

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

**Anti-inflammatorische und pro-angiogene Strategien  
zur Verbesserung der Revaskularisierung und endokrinen  
Funktion transplanterter Langerhans-Inseln**

---

**Dissertation**  
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften  
**Dr. rer. nat.**  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2023

vorgelegt von  
Selina Wrublewsky  
geb. am 15.02.1995 in Neunkirchen

Tag der Promotion: 18.07.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke

Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz

Prof. Dr. med. Uta Dahmen

Meiner Familie in tiefer Dankbarkeit gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Zusammenfassung</b> .....  | 1  |
| <b>2. Summary</b> .....  | 4  |
| <b>3. Einleitung</b> .....   | 6  |
| 3.1 Diabetes mellitus und Transplantation von Langerhans-Inseln.....                           | 6  |
| 3.2 <i>Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor protein (NLRP)3</i> ..... | 11 |
| 3.3 Mikrovaskuläre Fragmente (MVF) .....   | 14 |
| <b>4. Ziele der Arbeit</b> .....   | 17 |
| <b>5. Material und Methoden</b> .....  | 18 |
| 5.1 Zelllinien und Zellkultur.....   | 18 |
| 5.2 NLRP3-Inhibitor: CY-09.....  | 18 |
| 5.3 Hypoxie-Induktion .....  | 18 |
| 5.4 <i>Tube formation</i> -Assay .....   | 19 |
| 5.5 Versuchstiere .....  | 19 |
| 5.6 Isolierung von MVF aus dem epididymalen Fettgewebe.....                                    | 20 |
| 5.7 Isolierung von Langerhans-Inseln aus dem Pankreas .....                                    | 20 |
| 5.8 Propidiumiodid- und Calcein-Färbung .....  | 22 |
| 5.9 Durchflusszytometrische Analyse.....   | 22 |
| 5.10 Einbetten isolierter Langerhans-Inseln in eine HepatoQuick®-Matrix .....                  | 23 |
| 5.11 <i>Ribonucleic acid (RNA)</i> -Isolation .....  | 23 |
| 5.12 Reverse Transkription .....   | 24 |
| 5.13 <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)</i> .....                   | 24 |
| 5.14 Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion .....   | 24 |
| 5.15 Bestimmung der Insulinmenge .....   | 25 |
| 5.16 <i>Sprouting</i> -Assay von MVF-Sphäroiden.....   | 25 |
| 5.17 <i>Aortic ring</i> -Assay .....   | 26 |
| 5.18 Ca <sup>2+</sup> -Messung .....   | 26 |
| 5.19 Zytoplasmatische und nukleäre Proteinextraktion .....                                     | 27 |
| 5.20 Gesamtzell-Proteinextraktion .....  | 27 |
| 5.21 <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)</i> .....         | 28 |
| 5.22 Western Blot .....  | 28 |
| 5.23 Ko-Immunpräzipitation .....   | 29 |
| 5.24 Modell der Rückenhautkammer und Transplantation von Langerhans-Inseln....                 | 29 |
| 5.24.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....  | 30 |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.24.2    | Experimentelles Protokoll.....   | 32        |
| 5.25      | Diabetisches Mausmodell und Transplantation von Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel oder in das subkutane Gewebe..... | 32        |
| 5.25.1    | Intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test (IPGTT) .....  | 34        |
| 5.25.2    | Experimentelles Protokoll.....   | 35        |
| 5.26      | Immunhistochemie .....   | 37        |
| 5.27      | Statistische Analyse .....   | 38        |
| <b>6.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>39</b> |
| 6.1       | Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln .....                           | 39        |
| 6.1.1     | Viabilität isolierter Langerhans-Inseln.....   | 39        |
| 6.1.2     | Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln.....  | 41        |
| 6.1.3     | Revaskularisierung transplantierte Langerhans-Inseln .....   | 41        |
| 6.1.4     | VEGF-A <i>messenger ribonucleic acid</i> (mRNA) Expression isolierter Langerhans-Inseln .....                              | 46        |
| 6.1.5     | Insulin-Sekretion isolierter Langerhans-Inseln.....  | 47        |
| 6.1.6     | Insulin-induzierte angiogene Aktivität von Endothelzellen .....  | 47        |
| 6.1.7     | Ca <sup>2+</sup> -Homöostase und Insulin-Genexpression isolierter Langerhans-Inseln .....                                  | 50        |
| 6.1.8     | Regulatorischer Mechanismus der erhöhten Insulin-Genexpression .....   | 51        |
| 6.1.9     | Endokrine Funktion transplantierte Langerhans-Inseln.....  | 53        |
| 6.1.10    | Zusammenfassung der Ergebnisse .....   | 60        |
| 6.2       | Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln .....                             | 61        |
| 6.2.1     | Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln und MVF .....   | 61        |
| 6.2.2     | Viabilität isolierter Langerhans-Inseln und MVF.....   | 61        |
| 6.2.3     | Ko-Transplantation isolierter Langerhans-Inseln und MVF .....  | 62        |
| 6.2.3.1   | Ko-Transplantation isolierter Langerhans-Inseln und MVF unter die Nierenkapsel.....  | 63        |
| 6.2.3.2   | Ko-Transplantation isolierter Langerhans-Inseln und MVF in das subkutane Gewebe.....                                       | 68        |
| 6.2.4     | Zusammenfassung der Ergebnisse .....   | 73        |
| <b>7.</b> | <b>Diskussion</b> .....  | <b>75</b> |
| 7.1       | Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln .....                           | 75        |
| 7.1.1     | Schlussfolgerung und Ausblick.....   | 81        |
| 7.2       | Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln .....                             | 82        |
| 7.2.1     | Schlussfolgerung und Ausblick.....   | 85        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>               | <b>87</b>  |
| <b>9. Danksagung.....</b>                          | <b>105</b> |
| <b>10. Publikationen.....</b>                      | <b>106</b> |
| 10.1 Originalarbeiten aus dieser Dissertation..... | 106        |
| 10.2 Weitere Originalarbeiten.....                 | 106        |
| 10.3 Zitierfähige Abstracts.....                   | 108        |
| 10.4 Nichtzitierfähige Abstracts.....              | 108        |
| <b>11. Lebenslauf .....</b>                        | <b>110</b> |

## 1. Zusammenfassung

Die Inseltransplantation stellt eine vielversprechende Strategie zur täglichen Insulinsubstitution bei Diabetes mellitus Typ 1 (T1D)-Patienten dar. Allerdings werden bis dato drei bis vier Spenderorgane benötigt, um einen T1D-Patienten erfolgreich zu transplantieren. Eine wesentliche Ursache hierfür ist, dass die Blutgefäße des Empfängergewebes nicht schnell genug in die transplantierten Langerhans-Inseln einwachsen. Diese unzureichende Revaskularisierung führt zu einer Minderversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, wodurch ein Großteil der Langerhans-Inseln direkt nach der Transplantation abstirbt. Dementsprechend sind therapeutische Strategien, welche die Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln verbessern, von großem klinischen Interesse.

### 1. Studienabschnitt:

Das *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor protein (NLRP3)*-Inflammasom ist ein zytoplasmatischer Multiproteinkomplex, der nicht nur in Immunzellen, sondern auch in  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln vorkommt. Allerdings ist bis heute nur wenig über die Funktion von NLRP3 in Langerhans-Inseln bekannt. Im ersten Studienabschnitt dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Aktivität von NLRP3 die Revaskularisierung und endokrine Funktion transplantiert Langerhans-Inseln beeinflusst.

Hierfür wurden isolierte Wildtyp (WT) Langerhans-Inseln, die mit Vehikel (WT + Vehikel) oder dem NLRP3-Inhibitor CY-09 (WT + CY-09) behandelt wurden, mithilfe von immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Analysen auf ihre zelluläre Zusammensetzung sowie Viabilität untersucht. Des Weiteren wurde die endokrine Funktion der isolierten WT, NLRP3-*knockout* (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>), WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. Mithilfe von Western Blot-Analysen, *quantitative real-time polymerase chain reactions* (qRT-PCR) und verschiedenen Angiogenese-Assays wurde der zugrundeliegende regulatorische Mechanismus der erhöhten Insulin-Sekretion und der verbesserten Revaskularisierung nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 entschlüsselt. *In vivo* wurden WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln auf die quergestreifte Hautmuskulatur der Rückenhautkammerpräparation von WT Empfängermäusen transplantiert, um die Revaskularisierung der Transplantate unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren. Abschließend wurden WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen WT Empfängertieren transplantiert, um die Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel untersuchen zu können.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktivität von NLRP3 keinen Einfluss auf die Viabilität und zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln hat. Hingegen beeinflusst das

Inflammasom die endokrine Funktion der Langerhans-Inseln, denn nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 konnte eine deutlich erhöhte Insulin-Sekretion festgestellt werden. Detaillierte Analysen zeigten, dass diese durch eine gesteigerte Aktivität der Transkriptionsfaktoren *pancreatic and duodenal homeobox-1* (PDX-1) und *v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A* (MafA) vermittelt wird. *In vivo* konnte nicht nur eine verbesserte Insulin-abhängige Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln nach Inhibition von NLRP3 festgestellt werden, sondern auch eine beschleunigte Wiederherstellung einer Normoglykämie nach Transplantation der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Langerhans-Inseln in diabetische Mäuse. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die pharmakologische Inhibition von NLRP3 eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Verbesserung der Inseltransplantation darstellt.

### **2. Studienabschnitt:**

Mikrovaskuläre Fragmente (MVF) sind kleine Blutgefäßsegmente, welche in zahlreichen experimentellen Studien der letzten Jahre erfolgreich als Prävasikularisierungseinheiten eingesetzt wurden. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich in einer *proof-of-concept* Studie gezeigt werden, dass MVF auch den Erfolg der Inseltransplantation steigern. Hierbei wurden MVF und dissoziierte Inselzellen zu sogenannten prävasikularisierten Pseudoinseln fusioniert und anschließend in diabetische Mäuse transplantiert. Die Verlaufsanalyse zeigte eindrücklich eine beschleunigte Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel. Allerdings ist die Generierung dieser Pseudoinseln ein zeitaufwendiger und komplikationsanfälliger Prozess, welcher sich nicht in den klinischen Alltag integrieren lässt. Daher sollte im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit eine vereinfachte Strategie entwickelt werden, welche es erlaubt, MVF zur Verbesserung der Inseltransplantation einzusetzen.

Zu Beginn wurde die zelluläre Zusammensetzung sowie Viabilität isolierter Langerhans-Inseln und MVF immunhistochemisch untersucht. Anschließend wurden definierte Anzahlen von MVF und Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel oder in das subkutane Gewebe diabetischer Empfängermäuse ko-transplantiert. Als Kontrolle wurde die identische Zahl an Langerhans-Inseln oder MVF alleine transplantiert. Die endokrine Funktion der Transplantate wurde anhand der Messung der Blutglukosespiegel analysiert. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurde den Empfängertieren das Gewebe mit den Transplantaten für immunhistochemische Färbungen und zur Bestimmung des Insulingehalts entnommen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Ko-Transplantation von 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF unter die Nierenkapsel diabetischer Empfängermäuse innerhalb von 14 Tagen zu einer Normoglykämie führt. Hingegen führte die alleinige Transplantation der identischen Anzahl an Langerhans-Inseln oder MVF über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht zu physiologischen Blutglukosespiegeln. Die Ko-Transplantation von 500 oder 1000 Langerhans-

Inseln mit 40000 MVF in das subkutane Gewebe von diabetischen Empfängertieren stellte ebenfalls wieder eine Normoglykämie her. Auch hier zeigte sich, dass Empfängertiere, die lediglich mit Langerhans-Inseln alleine transplantiert wurden, hyperglykäm blieben. Zusammenfassend stellt die im zweiten Studienabschnitt entwickelte Ko-Transplantation von MVF und Langerhans-Inseln nicht nur eine sehr effiziente, sondern auch eine leicht durchzuführende Strategie dar, die zukünftig die klinische Inseltransplantation verbessern könnte.

## 2. Summary

### **Anti-inflammatory and pro-angiogenic strategies to improve revascularization and endocrine function of transplanted islets**

Pancreatic islet transplantation represents a promising therapeutic strategy to improve glycometabolic control in patients with type 1 diabetes mellitus. However, currently this approach requires 3-4 donor organs for successful treatment of one patient. A major reason for this is the fact that the blood vessels of the recipient tissue do not grow fast enough into the transplanted avascular islets. This inadequate revascularization leads to an insufficient supply with nutrients and oxygen, resulting in the regression of many islets immediately after transplantation. Accordingly, therapeutic strategies that improve the revascularization of transplanted islets are of major clinical interest.

#### **1. Study section:**

The nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor protein (NLRP3) inflammasome is a cytoplasmic multiprotein complex that is found not only in immune cells but also in  $\beta$ -cells of islets. However, the effect of NLRP3 on islet transplantation is still unknown. Therefore, the aim of the first study section of this thesis was to clarify whether loss or inhibition of NLRP3 influences the revascularization and endocrine function of transplanted islets.

For this purpose, the cellular composition and viability of isolated wild-type (WT) islets exposed to vehicle (WT + Vehicle) or the NLRP3 inhibitor CY-09 (WT + CY-09) were analyzed by means of immunohistochemistry and flow cytometry. Furthermore, the endocrine function of isolated WT, NLRP3-knockout (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>), WT + Vehicle and WT + CY-09 islets was investigated by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The underlying regulatory mechanism of the increased insulin secretion and enhanced revascularization after loss or inhibition of NLRP3 was unraveled by means of Western blotting, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and different angiogenesis assays. *In vivo*, WT + Vehicle and WT + CY-09 islets were transplanted onto the striated muscle tissue of WT dorsal skinfold chamber-equipped mice. The revascularization of the grafts was analyzed by intravital fluorescence microscopy. Finally, WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, WT + Vehicle and WT + CY-09 islets were transplanted under the kidney capsule of diabetic WT mice to study the restoration of normoglycemia.

The results showed that the activity of NLRP3 does not affect the viability and cellular composition of isolated islets. In contrast, the inflammasome affects the endocrine function of isolated islets, as indicated by a significantly improved insulin secretion after loss or inhibition of NLRP3. Detailed analyses revealed that this was caused by an increased activity of the transcription factors pancreatic and duodenal homeobox-1 (PDX-1) and v-maf avian

musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MafA). *In vivo*, not only an improved insulin-induced revascularization of transplanted WT + CY-09 islets was detected, but also an accelerated restoration of physiological blood glucose levels in diabetic animals transplanted with *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and WT + CY-09 islets. In conclusion, these results demonstrate that the pharmacological inhibition of NLRP3 represents a promising therapeutic strategy to improve the outcome of islet transplantation.

### **2. Study section:**

Microvascular fragments (MVF) are small blood vessel segments that have been successfully used as vascularization units in numerous experimental studies. Recently, a proof-of-concept study demonstrated that MVF also improve the success of islet transplantation. In this study, MVF and dissociated islet cells were fused into prevascularized pseudoislets, which were subsequently transplanted under the kidney capsule of diabetic mice. The obtained data showed an accelerated restoration of physiological blood glucose levels after transplantation of the prevascularized pseudoislets. However, the generation of these pseudoislets is a time-consuming and complicate process, which cannot be easily implemented into clinical practice. Therefore, the aim of the second study section of the present thesis was to develop a simplified strategy that allows the use of MVF to improve islet transplantation.

First, the cellular composition and viability of isolated islets and MVF were assessed by immunohistochemistry. Subsequently, defined numbers of MVF and islets were co-transplanted under the kidney capsule or into the subcutaneous tissue of diabetic mice. As a control, identical numbers of islets or MVF alone were transplanted. The endocrine function of the grafts was analyzed by measuring blood glucose levels. At the end of the observation period, the tissue with the grafts was explanted for immunohistochemical stainings and the determination of insulin content.

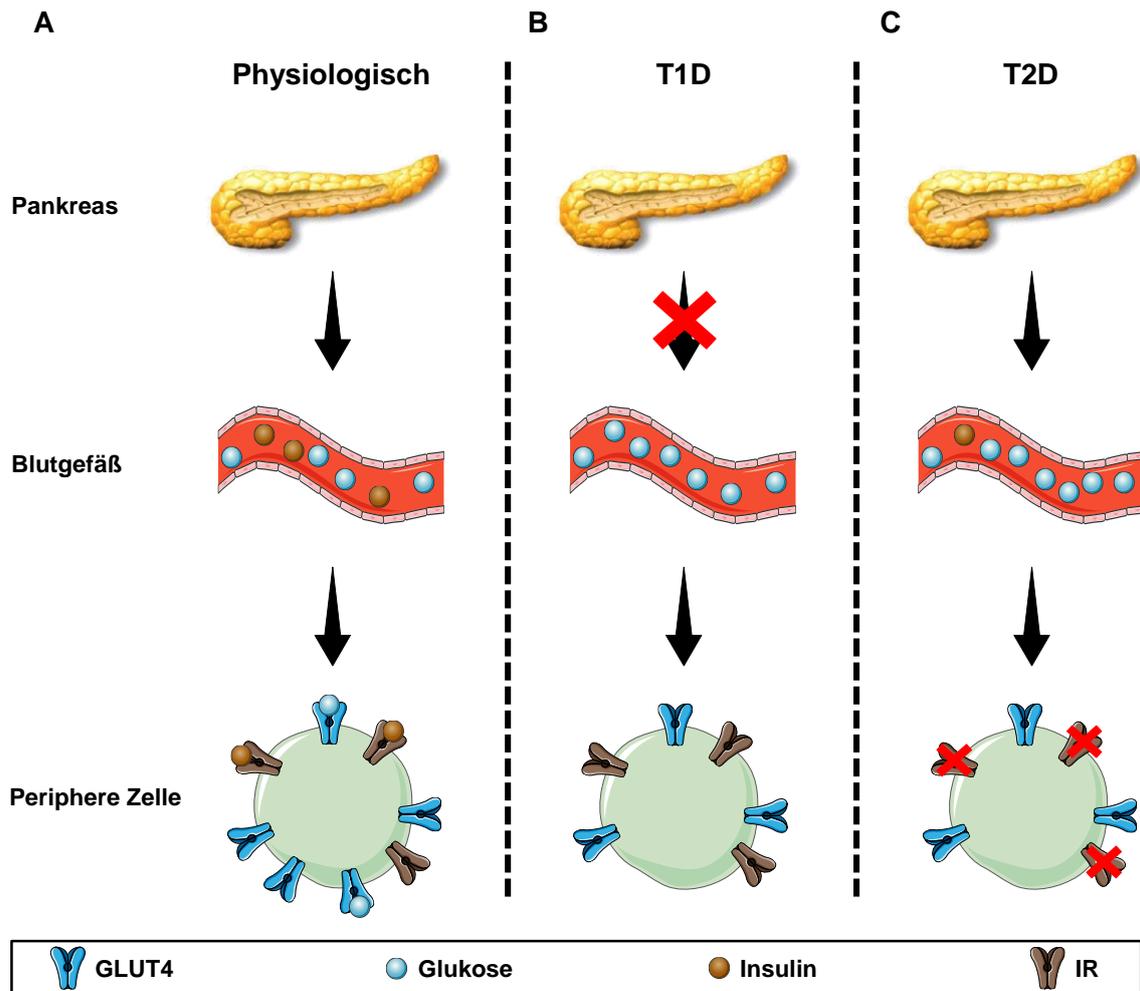
The results showed that co-transplantation of 250 islets and 20000 MVF under the kidney capsule of diabetic animals results in normoglycemia within 14 days. In contrast, transplantation of the identical number of islets or MVF alone did not restore physiological blood glucose levels throughout the observation period. The co-transplantation of 500 or 1000 islets with 40000 MVF into the subcutaneous tissue of diabetic animals also resulted in normoglycemia, whereas animals transplanted with islets alone remained hyperglycemic. In summary, the herein introduced co-transplantation of MVF and islets represents not only a very efficient but also an easy-to-perform strategy that may markedly improve the outcome of clinical islet transplantation in the future.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Diabetes mellitus und Transplantation von Langerhans-Inseln

Das Peptidhormon Insulin wird bei steigendem Blutglukosespiegel (Hyperglykämie) von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ins Blut sekretiert und gelangt über den Blutkreislauf zu den verschiedenen Geweben und Organen. Dort bindet Insulin an den Insulinrezeptor (IR), wodurch die Glukoseaufnahme durch den Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) und die Glukosespeicherung über die Glykogensynthese induziert werden (*Abbildung 1A*). Dieser Mechanismus ist essentiell zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels [Leto & Saltiel, 2012]. Störungen des Insulinstoffwechsels haben fundamentale Folgen, welche sich im Krankheitsbild des Diabetes mellitus äußern.

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, bei der die Patienten unter einer chronischen Hyperglykämie leiden [American Diabetes Association, 2011]. Laut der *International Diabetes Federation* (IDF) sind derzeit mehr als 536 Millionen Menschen betroffen und die Diabetes-Prävalenz wird bis 2045 auf 780 Millionen Menschen geschätzt [Sun *et al.*, 2022]. Zudem zählt diese Erkrankung zu den häufigsten Todesursachen weltweit [Danaei *et al.*, 2011]. Ursächlich für Diabetes mellitus sind Defekte in der Sekretion und/oder Wirkung von Insulin an den peripheren Geweben [American Diabetes Association, 2011]. Abhängig von den unterschiedlichen pathologischen Prozessen gibt es mehrere Typen von Diabetes mellitus, aber grundsätzlich wird in Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) und Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) unterschieden [Arneth *et al.*, 2019]. T1D ist charakterisiert durch eine, meist genetisch oder viral bedingte, autoimmunologische Zerstörung der  $\beta$ -Zellen [American Diabetes Association, 2011; Quattrin *et al.*, 2023]. Folglich kann kein Insulin mehr produziert werden, weshalb es zu einem absoluten Insulinmangel und einer chronischen Hyperglykämie kommt (*Abbildung 1B*) [Warshauer *et al.*, 2020]. T1D entwickelt sich hauptsächlich im Kindes- und Jugendalter und betrifft ~5 % aller Diabetes mellitus-Patienten [American Diabetes Association, 2011]. Im Gegensatz dazu tritt der weitaus häufiger vorkommende T2D meist erst im mittleren Alter (ab dem 40. Lebensjahr) auf und ist auf eine ungesunde und kalorienreiche Ernährung zurückzuführen [Arneth *et al.*, 2019]. T2D entsteht durch eine Insulinresistenz der peripheren Zellen in Kombination mit einer unzureichenden Insulin-Sekretion der  $\beta$ -Zellen, was in einem relativen Insulinmangel resultiert (*Abbildung 1C*) [Elk & Iwuchukwu, 2017; Artasensi *et al.*, 2020]. Die daraus entwickelte Hyperglykämie führt zu Schädigungen des Herzens, der Augen, der Nieren, des Nervensystems und der Blutgefäße [Danaei *et al.*, 2011; DeFronzo *et al.*, 2015]. Dementsprechend leiden die meisten T1D- und T2D-Patienten unter Begleiterkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Retinopathien, Nephropathien, Neuropathien und/oder es kommt zu Amputationen von Gliedmaßen.



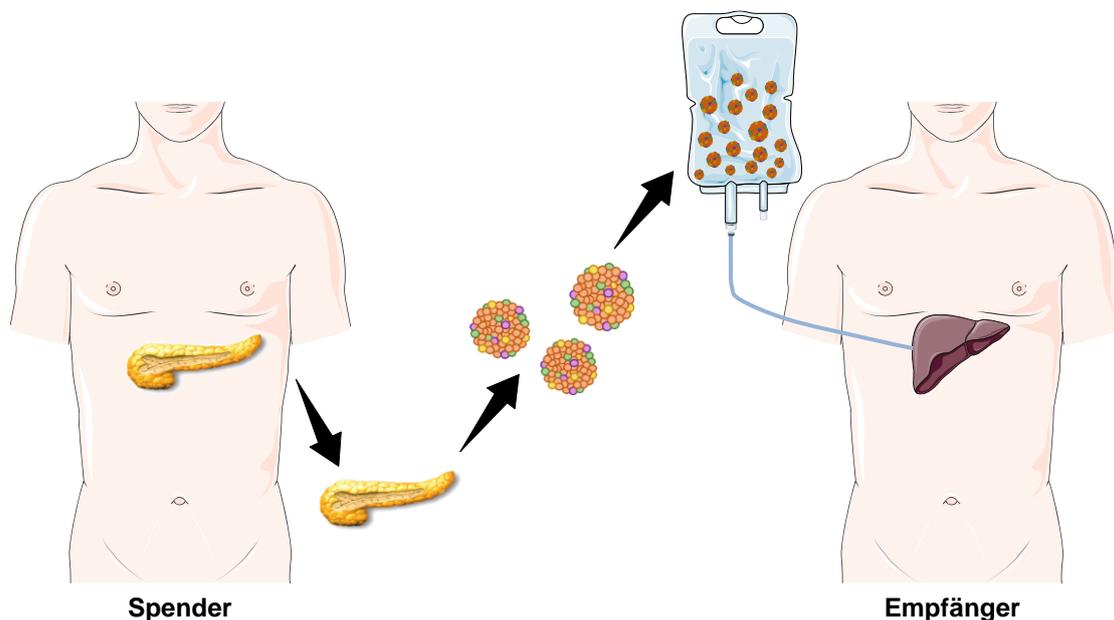
**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Regulation des Blutglukosespiegels bei einem gesunden Menschen sowie bei T1D- und T2D-Patienten.** (A) Bei einem gesunden Menschen wird abhängig vom Blutglukosespiegel Insulin von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ins Blut sekretiert. Über den Blutkreislauf gelangt es zu den peripheren Geweben und bindet an den membranständigen IR, wodurch die Glukoseaufnahme durch GLUT4 aktiviert wird. (B) Durch die autoimmunologische Zerstörung der  $\beta$ -Zellen bei T1D-Patienten kann die insulinabhängige GLUT4-Aktivierung nicht stattfinden, weshalb die Glukose nur unzureichend in die peripheren Zellen aufgenommen wird. (C) Bei T2D-Patienten entwickeln die peripheren Zellen eine Insulinresistenz, die meist auch zu einer verminderten Insulin-Sekretion der  $\beta$ -Zellen führt. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

Die Therapie des T2D umfasst in der Regel eine Kombination aus Lebensstilveränderungen und Medikamenten. Wobei meist eine gesunde Ernährung, körperliche Aktivität und Gewichtsverlust zu einer Verbesserung des T2D führen und nur in einigen Fällen eine Insulin-Therapie notwendig ist [Colberg *et al.*, 2010]. T1D-Patienten wird zwar auch eine kohlenhydratarme Ernährung und viel Bewegung empfohlen, jedoch ist eine lebenslange exogene Insulin-Therapie obligatorisch [Warshauer *et al.*, 2020]. Diese muss auf jeden Patienten individuell angepasst werden, da die Menge des verabreichten Insulins abhängig von Faktoren wie Alter, Gewicht und Ernährung ist [Hirsch *et al.*, 1990]. Durch eine Überdosierung von Insulin kommt es zu einem stark erniedrigten Blutglukosespiegel (Hypoglykämie), der bei schlechter Konstitution des T1D-Patienten auch zur Bewusstlosigkeit

führen kann [Swinen *et al.*, 2009]. Ein weiterer Nachteil der lebenslangen Insulinapplikation sind Spätfolgen, wie die diabetische Retinopathie [Gargiulo *et al.*, 2004].

Alternativ zur Insulin-Therapie kann auch eine Pankreastransplantation durchgeführt werden. Dies ist allerdings ein komplizierter chirurgischer Eingriff, der mit schweren Komplikationen einhergehen kann und somit nur bei bestimmten T1D-Patienten, beispielsweise mit einer terminalen Niereninsuffizienz, in Betracht gezogen wird [Robertson *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 2017]. Zudem sind die Patienten auf eine lebenslange Immunsuppression angewiesen, um eine Abstoßung des transplantierten Pankreas zu verhindern [Robertson *et al.*, 2000; Burke *et al.*, 2015a; Dean *et al.*, 2017].

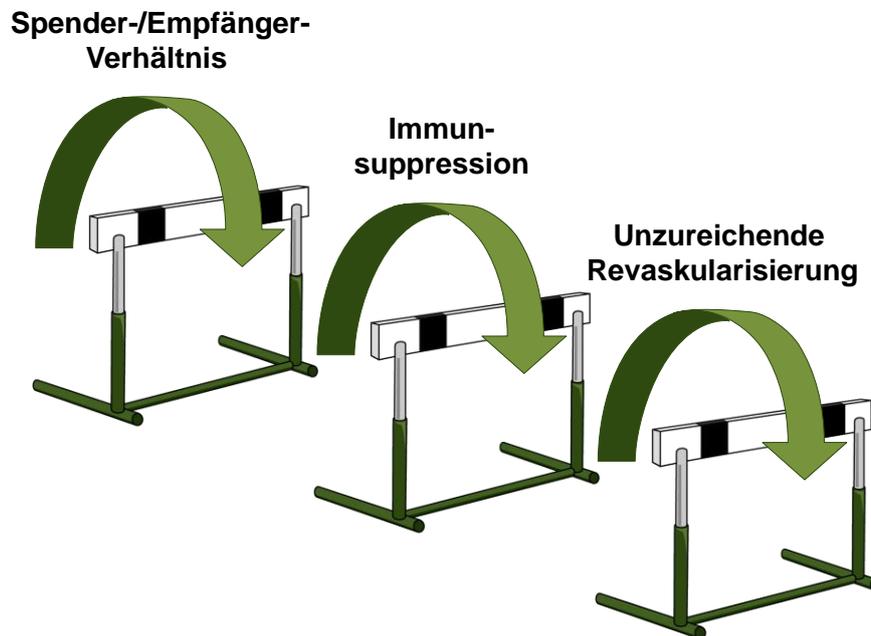
Eine mit weitaus weniger Komplikationen verbundene Strategie stellt die Inseltransplantation dar. Hierbei werden die Langerhans-Inseln aus dem Pankreas eines Todspenders enzymatisch isoliert, aufkonzentriert und anschließend über einen Katheter in das Portalvenensystem des Empfängers injiziert (*Abbildung 2*) [Ricordi *et al.*, 1988; Shapiro *et al.*, 2000]. Über das Blutgefäßnetzwerk gelangen die Langerhans-Inseln in die kleinen Lebersinusoide, wo sie aufgrund ihres Durchmessers hängen bleiben und anwachsen [Shapiro *et al.*, 2017]. Folglich können die transplantierten und endokrin aktiven Langerhans-Inseln den Blutglukosespiegel regulieren [Bruni *et al.*, 2014].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der klinischen, intrahepatischen Inseltransplantation.** Die Langerhans-Inseln werden aus dem Pankreas eines Todspenders entnommen, isoliert und aufkonzentriert. Anschließend werden diese über einen Katheter in das Portalvenensystem des Empfängers injiziert. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

Obwohl die Transplantation von Langerhans-Inseln die Lebensumstände und Überlebenschancen eines T1D-Patienten deutlich verbessert, konnte sie sich bis heute nicht als Standardtherapie für T1D durchsetzen. Dies kann anhand drei wesentlicher „Hürden“ erklärt werden: (1) das hohe Spender-/Empfänger-Verhältnis, (2) die lebenslange

Immunsuppression zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion und (3) die unzureichende Revaskularisierung der Langerhans-Inseln nach der Transplantation (*Abbildung 3*) [Plesner & Verchere, 2011].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der „Hürden“ der klinischen Inseltransplantation.** Das hohe Spender-/Empfänger-Verhältnis, die lebenslange Immunsuppression und die unzureichende Revaskularisierung der transplantierten Langerhans-Inseln stellen die drei wesentlichen Limitationen für den Erfolg der klinischen Inseltransplantation dar. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

Das Spender-/Empfänger-Verhältnis der Inseltransplantation liegt gegenwärtig bei 3-4:1 [Shapiro *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2001]. Dieses Ungleichgewicht ist auf zwei Hauptursachen zurückzuführen: Erstens können mit den derzeitigen Isolierungs-Protokollen nur 30-50 % aller Langerhans-Inseln isoliert werden [Sabek *et al.*, 2005]. Zweitens sind nur ~65 % der Langerhans-Inseln nach dem enzymatischen und mechanischen Isolationsprozess vital [Boker *et al.*, 2001; Toso *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2007]. Im Zuge dessen wurde 1988 erstmals eine automatisierte Methode für die Isolation von humanen Langerhans-Inseln entwickelt [Ricordi *et al.*, 1988]. Dieses Verfahren gewährleistet 1) eine kontinuierliche Verdauung des Pankreasgewebes, 2) ein minimales menschliches Eingreifen in den Verdauungsprozess, 3) eine hohe Ausbeute und Reinheit der isolierten Langerhans-Inseln und 4) eine minimale Schädigung der Langerhans-Inseln durch den Isolierungsprozess [Ricordi *et al.*, 1988]. Diese Methode hat zwar die Inselisolation schon deutlich verbessert, jedoch wird bis heute an neuen automatisierten Techniken, um die Anzahl an isolierten und vitalen Langerhans-Inseln weiter zu erhöhen, geforscht.

Um dem hohen Spender-/Empfänger-Verhältnis entgegenzuwirken, werden ebenfalls alternative Quellen für  $\beta$ -Zellen untersucht. In Bezug darauf stellt die Isolation von Langerhans-Inseln aus Pankreata unterschiedlichster Organsimen einen vielversprechenden Ansatz dar.

Beispielsweise war es möglich, eine große Anzahl vitaler, porciner Langerhans-Inseln zu isolieren und diese in diabetische nicht-humane Primaten zu transplantieren, was zur Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel führte [Korbitt *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; van der Windt *et al.*, 2012].

Die zweite „Hürde“ für die klinische Inseltransplantation stellt die lebenslange Immunsuppression zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion dar. Im 20. Jahrhundert wurden T1D-Patienten, die eine Inseltransplantation erhielten, mit Glucocorticoiden zur Vermeidung der Transplantatabstoßung behandelt. Allerdings führte diese Behandlung zu Steroid-induzierten Funktionsstörungen der  $\beta$ -Zellen und somit zu deren Zelltod [Delangre *et al.*, 2021]. Die Veröffentlichung des Edmonton-Protokolls im Jahr 2000 war ein Meilenstein in der Weiterentwicklung der Inseltransplantation, da die Empfänger seitdem mit einer steroidfreien Kombination der Immunsuppressiva Sirolimus, Tacrolimus und Daclizumab therapiert werden [Bottino *et al.*, 2018; Shapiro *et al.*, 2000]. Obwohl mit dieser steroidfreien Kombinationstherapie weitaus weniger die Viabilität der transplantierten Langerhans-Inseln beeinträchtigt wird, ist auch diese Immuntherapie mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen, wie Ödemen, Hautausschlägen, Hypercholesterinämien bis hin zu Leukopenien und Anämien, verbunden [Hafiz *et al.*, 2005; Berney & Secchi, 2009]. Ebenso kann sich die langandauernde Behandlung mit Tacrolimus toxisch auf die transplantierten Langerhans-Inseln auswirken [Posselt *et al.*, 2010]. Somit ist nicht nur die Entwicklung und Identifizierung neuer, immunsuppressiver Therapien Gegenstand der Forschung, sondern es wird auch versucht, die Immunsuppression komplett zu umgehen. Hierbei spielen besonders Stammzellen, wie *induced pluripotent stem cells* (iPSC), *human embryonic stem cells* (hESC) oder auch *adipose-tissue-derived stem cells* (ADSC), eine wichtige Rolle. Zahlreiche Studien zeigten bereits das Potential dieser Zellen, sich zu *insulin-producing cells* (IPC) differenzieren zu können [Serup *et al.*, 2001; Timper *et al.*, 2006; Bose *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2012; Sasaki & Miyatsuka, 2023]. Die anschließende Transplantation der IPC zeigte im experimentellen Kleintiermodell (Maus/Ratte) positive Ergebnisse [Jeon *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass nur eine minimale oder auch keine immunsuppressive Therapie nach Transplantation der IPC benötigt wird.

Trotz aller zuvor erwähnten Probleme und den damit verbundenen Verbesserungen ist der Erfolg der Inseltransplantation letztlich noch durch eine zu langsam vorstattgehende Revaskularisierung der Transplantate im Empfängergewebe limitiert. Der Prozess der Revaskularisierung dauert mehrere Tage bis Wochen und erfordert sowohl die Vaskulogenese als auch die Angiogenese [Contreras *et al.*, 2003; Brissova & Powers, 2008; Kang *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013]. Die Vaskulogenese ist charakterisiert durch die Bildung neuer Blutgefäße aus *endothelial progenitor cells* (EPC). Diese befinden sich normalerweise im Knochenmark und gelangen bei einer Verletzung oder Schädigung des Gewebes in den Blutkreislauf. Anhand

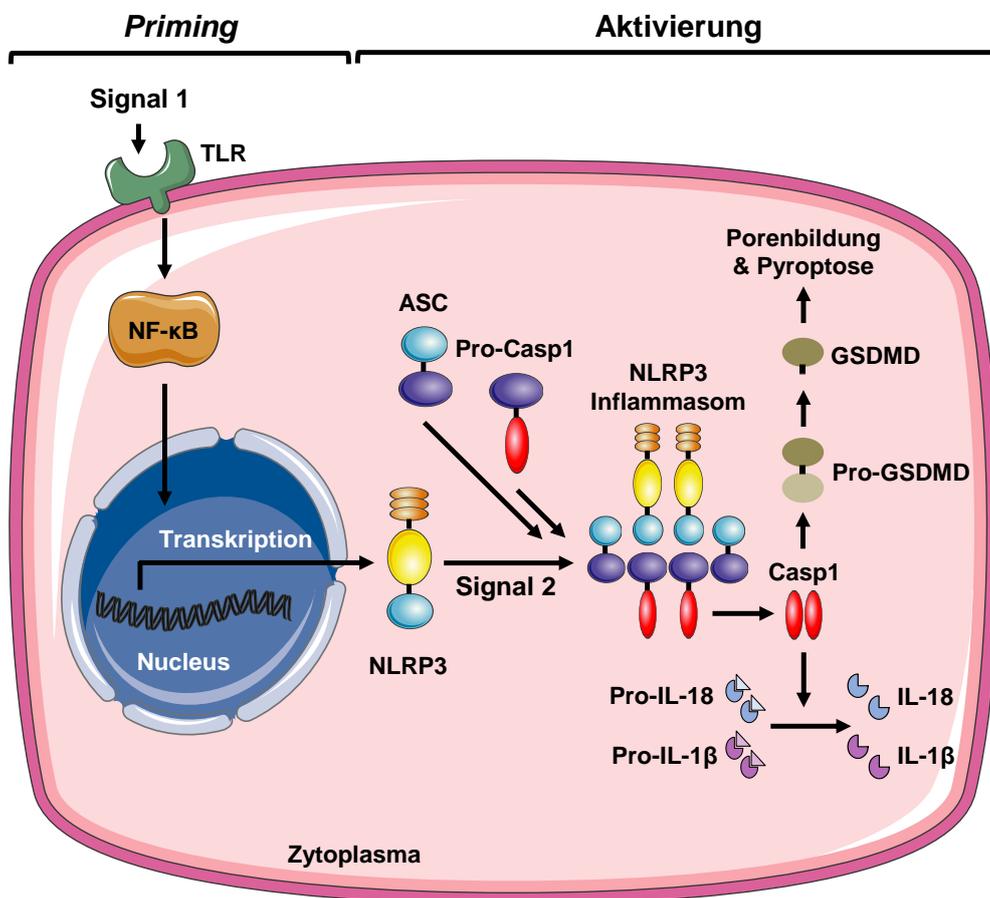
von Signalen, wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren sowie Chemokinen, finden die EPC an ihren Wirkungsort. Dort differenzieren sie zu reifen Endothelzellen und/oder übernehmen die Regulation vorhandener Endothelzellen über parakrine oder juxtakrine Signale [Balaji *et al.*, 2013]. Im Gegensatz zur Vaskulogenese stellt die Angiogenese die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen dar [Bouis *et al.*, 2006]. Diese neuen Gefäße wachsen in hypoxisches Gewebe ein, um dort die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der umgebenen Zellen zu gewährleisten [Persson & Buschmann, 2011]. Zuerst kommt es zur Stimulation von Endothelzellen durch Wachstumsfaktoren, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), wodurch eine Vasodilatation sowie erhöhte Gefäßpermeabilität und somit eine vermehrte Ausschüttung von Plasmaproteinen induziert wird [Carmeliet, 2000]. Dadurch wird folgend die vaskuläre Basalmembran und umliegende extrazelluläre Matrix (EZM) mithilfe verschiedener Matrixmetalloproteasen (MMP) proteolytisch abgebaut [van der Windt *et al.*, 2012]. Somit können einzelne Endothelzellen durch die Destabilisierung der Gefäßstruktur zu dem initialen Stimulus migrieren [Conway *et al.*, 2001]. Diese richtungsweisenden Endothelzellen werden *Tip*-Zellen genannt, während die nachfolgenden proliferierenden Endothelzellen als *Stalk*-Zellen bezeichnet werden [Zeng *et al.*, 2021]. Im letzten Schritt bilden die *Stalk*-Zellen nicht nur Gefäßsprossen und ein Lumen aus, sondern werden durch die Bildung neuer EZM, rekrutierte Perizyten sowie glatte Muskelzellen stabilisiert [Conway *et al.*, 2001]. Dieser Angiogenese- und Revaskularisierungsprozess dauert bis zu 2 Wochen [Cauwenbergh, 1989; Jansson & Carlsson, 2002; Konstantinova & Lammert, 2004]. In dieser Zeit sind die transplantierten Langerhans-Inseln einem Sauerstoff- und Nährstoffdefizit ausgesetzt [Menger *et al.*, 2001]. Dies führt dazu, dass die endokrine Funktion und ein langfristiges Überleben der Transplantate nicht gewährleistet werden kann. Aus diesem Grund wird mit Hochdruck an neuen Strategien zur Verbesserung der Revaskularisierung transplanterter Langerhans-Inseln geforscht.

### 3.2 *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor protein (NLRP)3*

Die NLRP-Inflammasome sind große, zytoplasmatische Multiproteinkomplexe und wichtige Komponenten des angeborenen Immunsystems [Yashiro *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023]. Sie dienen der Erkennung von intrazellulären Infektionen und Zellschäden. Zu der Familie der NLRP-Inflammasome gehören über 20 Mitglieder, die eine ähnliche Grundstruktur besitzen [Shen *et al.*, 2022]. Die C-terminale *leucin-rich-repeat* (LRR)-Domäne dient der Ligandenerkennung, während die zentralgelegene NOD-Domäne die Oligomerisierung von sich selbst initiiert. Am N-Terminus befindet sich die Effektor-domäne, die mit Signalmolekülen

interagiert und somit für die Signalweiterleitung verantwortlich ist [Chen & Pedra, 2010; Velloso *et al.*, 2019].

Das NLRP3-Inflammasom ist im Hinblick auf seine pathophysiologischen Eigenschaften das am besten untersuchte und charakterisierte Inflammasom [Shin *et al.*, 2015]. Es wird hauptsächlich in Immunzellen, wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert [Yashiro *et al.*, 2021]. In den letzten Jahren konnte NLRP3 mit der Pathogenese vieler Krankheiten, wie Adipositas, Arteriosklerose, Alzheimer, Parkinson und T2D, in Verbindung gebracht werden [Wang *et al.*, 2020b]. Das NLRP3-Inflammasom besteht aus dem Sensorprotein NLRP3, dem Adaptorprotein *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain* (CARD) (ASC) und dem Effektorprotein Caspase (Casp)1 [Song *et al.*, 2017a]. Die Induktion des NLRP3-Inflammasoms wird in zwei Schritte unterteilt, dem *Priming* und der Aktivierung (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung.** Durch die Bindung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), *reactive oxygen species* (ROS) und/oder Zytokine (Signal 1) an TLR wird das *Priming* ausgelöst. Anschließend kommt es zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges, wodurch die Expression von NLRP3 induziert wird. Das Signal 2 (PAMP, *damage-associated molecular patterns* (DAMP), ROS, K<sup>+</sup>- und/oder Cl<sup>-</sup>-Ausstrom) führt zum Aktivierungsschritt, bei dem es zur Oligomerisierung von NLRP3 und zur Rekrutierung von ASC sowie Casp1 kommt. Nach der Zusammenlagerung der drei Proteine zu einem Komplex wird die Casp1-abhängige Spaltung von pro-Interleukin (IL)-18 und pro-IL-1β zu IL-18 und IL-1β initiiert. Pro-*gasdermin D* (GSDMD) wird ebenfalls durch die Casp1 gespalten, wodurch GSDMD im Anschluss eine Pore in der Zellmembran bildet und somit die Pyroptose induziert. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art und modifiziert nach Wrublewsky [2020])

Das *Priming* (Signal 1) wird durch PAMP, ROS und/oder Zytokine, wie IL-1 $\alpha$ , die durch ihre Bindung an *Toll-like receptors* (TLR) den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren, ausgelöst. Dadurch wird die Expression von NLRP3 induziert (*Abbildung 4*) [Swanson *et al.*, 2019; Long *et al.*, 2020]. Der anschließende Aktivierungsschritt (Signal 2) wird durch ein breites Spektrum exogener und endogener Stimuli, wie PAMP, DAMP, ROS, K<sup>+</sup>- und/oder Cl<sup>-</sup>-Ausstrom vermittelt [Song *et al.*, 2017a; Swanson *et al.*, 2019]. Es kommt anschließend zur Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms unter Beteiligung von ASC und Casp1. Dieser Komplex kann folgend die Casp1-abhängige Spaltung der Zymogene pro-IL-18 und pro-IL-1 $\beta$  zu deren reifen, biologisch aktiven Formen IL-18 und IL-1 $\beta$  initiieren. Zudem kann die durch das NLRP3-Inflammasom aktivierte Casp1 auch GSDMD von der inaktiven in die aktive Form überführen, wodurch die Pyroptose induziert wird (*Abbildung 4*) [Swanson *et al.*, 2019].

NLRP3 wird aber nicht nur von Zellen des Immunsystems exprimiert. So konnten Studien das Inflammasom ebenfalls in  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln nachweisen [Chen *et al.*, 2018; Lebreton *et al.*, 2018]. Zudem sind NLRP3 sowie die NLRP3-assoziierten Gene, wie Casp1 und IL-1 $\beta$ , sowohl in isolierten Langerhans-Inseln nach Hypoxie-induziertem Stress als auch in der frühen Phase nach der Transplantation in Langerhans-Inseln vermehrt exprimiert. Daraus kann auf eine überaus wichtige Funktion des Inflammasoms in diesen Zellen geschlossen werden [Chen *et al.*, 2018; Lebreton *et al.*, 2018; Lavallard *et al.*, 2020]. In der Tat ist NLRP3 nicht nur an der Regulation der mitochondrialen Aktivität beteiligt, sondern zeigt auch eine hemmende Wirkung auf die Insulin-Sekretion [Morgan & Liu, 2011; Song *et al.*, 2017b; Sokolova *et al.*, 2018; Lavallard *et al.*, 2020]. Allerdings ist der zugrundeliegende regulatorische Mechanismus hierzu bis heute ungeklärt.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde bereits in meiner vorangegangenen Masterarbeit untersucht, welchen Einfluss der globale *knockout* (KO) von NLRP3 (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) auf die Funktion und die Revaskularisierung isolierter und transplantierte Langerhans-Inseln hat [Wrublewsky, 2020]. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von NLRP3 weder die zelluläre Zusammensetzung noch die Viabilität isolierter Langerhans-Inseln beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu konnte eine beschleunigte *In-vivo*-Revaskularisierung von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln gezeigt werden [Wrublewsky, 2020]. Diese vielversprechenden Daten können jedoch nicht in der klinischen Praxis angewendet werden, da es sowohl ethisch als auch technisch bislang nicht möglich ist, einen KO von NLRP3 in humanen Langerhans-Inseln herzustellen. Aus diesem Grund wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Langerhans-Inseln mit dem pharmakologischen NLRP3-Inhibitor CY-09 behandelt und die in der Masterarbeit durchgeführten Versuche wiederholt. Darauf aufbauend wurden weitere *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimente sowohl mit dem globalen KO von NLRP3 als auch mit CY-09 durchgeführt. Hierbei wurde nicht nur die endokrine Funktion isolierter Langerhans-Inseln nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 untersucht, sondern auch der zugrundeliegende

regulatorische Mechanismus entschlüsselt. Abschließend wurde analysiert, ob sich die Transplantation von *Nlrp3<sup>-/-</sup>* und WT + CY-09 Langerhans-Inseln positiv auf die Wiederherstellung einer Normoglykämie von diabetischen Mäusen auswirkt.

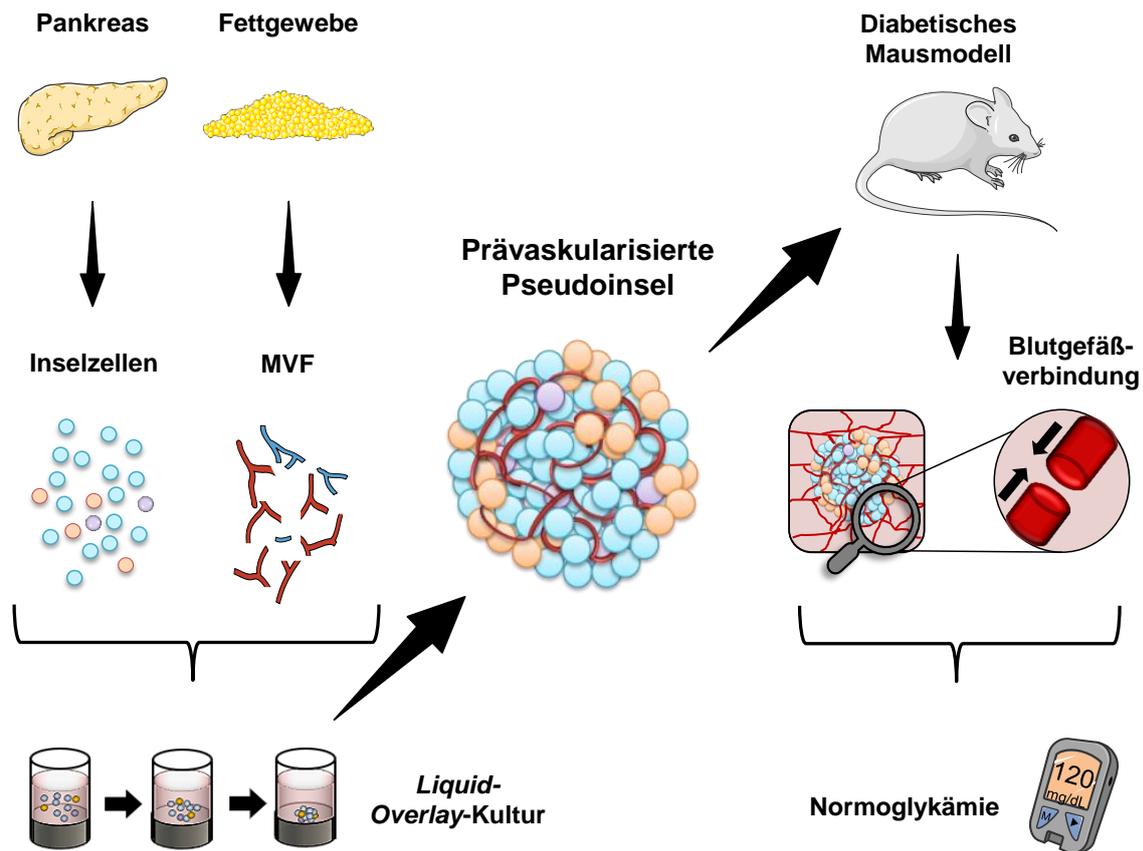
### 3.3 Mikrovaskuläre Fragmente (MVF)

Der Isolationsprozess von Langerhans-Inseln hat nicht nur zur Folge, dass ein Großteil der Langerhans-Inseln eine verminderte endokrine Aktivität aufweist, sondern verursacht ebenfalls, dass sie ihr dichtes Blutgefäßnetzwerk verlieren [Bottino *et al.*, 2004; Benton *et al.*, 2008; Brissova & Powers, 2008]. Letzteres führt dazu, dass die Langerhans-Inseln nach der Transplantation erst wieder ein Blutgefäßnetzwerk ausbilden müssen. Wie schon erwähnt, ist dieser Angiogenese- und Revaskularisierungsprozess zeitintensiv und dauert bis zu 2 Wochen [Cauwenbergh, 1989; Jansson & Carlsson, 2002; Konstantinova & Lammert, 2004]. In der Zwischenzeit sind die transplantierten Langerhans-Inseln auf die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Empfängergewebe angewiesen [Menger *et al.*, 2001]. In den meisten Fällen ist diese Diffusion jedoch nicht ausreichend, weshalb es vermehrt zu Ischämiebedingten Apoptosen und Nekrosen kommt [Brissova *et al.*, 2004; Pepper *et al.*, 2013; Delaune *et al.*, 2017].

In den letzten Jahren wurde daher intensiv an Strategien zur Beschleunigung der Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln geforscht. Beispielsweise führte die Transduktion von Langerhans-Inseln mit adenoviralen Vektoren, die für VEGF oder Angiopoietin (Ang-1) codieren, und deren anschließende Transplantation zu einer deutlich schnelleren Revaskularisierung [Zhang *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2007]. Jedoch besteht bei Adenoviren-basierten Methoden das Risiko einer chromosomalen Instabilität und einer starken Immunreaktion [Baum *et al.*, 2004]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass die Behandlung von isolierten Langerhans-Inseln oder Empfängertieren mit dem pro-angiogenen Hormon Erythropoietin (EPO) die Blutgefäßneubildung innerhalb der transplantierten Langerhans-Inseln und des umgebenden Gewebes verbessert [Menger *et al.*, 2020a; Menger *et al.*, 2021]. Allerdings führt eine langandauernde EPO-Behandlung zu einem erhöhten Hämatokrit-Level, wodurch das Risiko für Thrombosen und Schlaganfälle erhöht ist [Menger *et al.*, 2020a]. Die Ko-Transplantation von Langerhans-Inseln mit verschiedenen Zelltypen, wie Endothelzellen, Fibroblasten und *mesenchymal stem cells* (MSC), stellt eine weitere interessante Strategie dar [Coppens *et al.*, 2013; Kerby *et al.*, 2013; Quaranta *et al.*, 2014; Perez-Basterrechea *et al.*, 2017]. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Bildung neuer Blutgefäße aus beispielsweise Endothelzellen nicht schnell genug ist, um eine adäquate Revaskularisierung der Transplantate zu gewährleisten. Ein neuer Ansatz könnte die Ko-Transplantation von Langerhans-Inseln und MVF sein.

MVF sind eine Mischung aus arteriolären, venulären und kapillären Segmenten mit einer Länge von 20-200 µm [Laschke & Menger, 2015]. Sie können leicht in großen Mengen durch einen enzymatischen Verdau aus dem Fettgewebe isoliert werden [Frueh *et al.*, 2017a; Frueh *et al.*, 2017b]. MVF besitzen eine intakte Gefäßmorphologie bestehend aus einem zentralen Lumen, Endothel und stabilisierenden perivaskulären Zellen, wodurch sie sich nach ihrer Transplantation untereinander sowie mit den im umliegenden Gewebe befindlichen Blutgefäßen verbinden können [Laschke & Menger, 2015; Frueh *et al.*, 2017a]. Zudem bestehen MVF neben Endothelzellen und Perizyten auch aus MSC [McDaniel *et al.*, 2014]. Letztere sekretieren pro-angiogene Wachstumsfaktoren, wie *hepatocyte growth factor* (HGF) und *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), und stimulieren somit die Angiogenese im umgebenden Gewebe [Bai *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2012]. Aufgrund dieser vielversprechenden Charakteristika der MVF wurden sie in den letzten Jahren in den Bereichen des Tissue Engineerings sowie der Regenerativen Medizin als Prävasikularisierungseinheiten eingesetzt [Laschke & Menger, 2015; Frueh *et al.*, 2017a; Frueh *et al.*, 2022; Laschke & Menger, 2022]. So konnte unsere Arbeitsgruppe in einer Machbarkeitsstudie einen positiven Effekt der MVF auf die Inseltransplantation nachweisen. Hierbei wurden Langerhans-Inseln in ihre Einzelzellen dissoziiert und mit MVF zu sogenannten prävasikularisierten Pseudoinseln fusioniert (*Abbildung 5*). Nachfolgende *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Experimente zeigten ein hohes angiogenes Potential dieser Pseudoinseln [Nalbach *et al.*, 2021b]. Des Weiteren führte die Transplantation der prävasikularisierten Pseudoinseln in diabetische Tiere zu einer beschleunigten Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel im Vergleich zu Pseudoinseln ohne MVF (*Abbildung 5*).

Dieser Ansatz hat zwar den Vorteil, dass er den engen Kontakt und somit die direkte Interaktion der Langerhans-Inseln mit den MVF gewährleistet, allerdings muss für die Anwendung dieser Strategie im klinischen Alltag beachtet werden, dass die Generierung der prävasikularisierten Pseudoinseln sehr kosten- und zeitintensiv ist. Zudem führen die vielen unterschiedlichen Arbeitsschritte zu einem erhöhten Risiko für Kontaminationen.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fusion von Inselzellen und MVF zu prävascularisierten Pseudoinseln.** Für die Generierung von prävascularisierten Pseudoinseln werden Langerhans-Inseln aus dem Pankreas und MVF aus dem epididymalen Fettgewebe isoliert. Im Anschluss werden die Langerhans-Inseln enzymatisch in Einzelzellen dissoziiert und mit den MVF mithilfe der *Liquid-Overlay-Kultur* zu prävascularisierten Pseudoinseln fusioniert. Die Transplantation dieser Pseudoinseln in diabetische Tiere führte innerhalb weniger Tage zur Wiederherstellung einer Normoglykämie. (Modifiziert nach dem graphischen Abstract (nur online verfügbar) von Nalbach *et al.* [2021b])

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte daher in der vorliegenden Arbeit eine unkompliziertere Methode zur Verbesserung der Inseltransplantation unter Verwendung der MVF entwickelt werden. Hierfür wurden Langerhans-Inseln sowie MVF isoliert und als Gemisch unter die Nierenkapsel oder in das subkutane Gewebe von diabetischen Mäusen ko-transplantiert. Anschließend wurden die Revaskularisierung und endokrine Funktion der Transplantate untersucht.

## 4. Ziele der Arbeit

Die klinische Inseltransplantation stellt eine vielversprechende Behandlungsmethode für T1D-Patienten dar. Jedoch kommt es aufgrund der unzureichenden und langsamen Revaskularisierung der transplantierten Langerhans-Inseln zu einem Sauerstoff- und Nährstoffdefizit, wodurch das dauerhafte Überleben und die endokrine Funktion der Transplantate nicht gewährleistet werden kann. Daher wird an neuen Strategien zur Verbesserung der Revaskularisierung transplantierte Langerhans-Inseln geforscht.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte aufbauend auf den Daten meiner vorangegangenen Masterarbeit der Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion transplantierte Langerhans-Inseln untersucht werden. Hierbei sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Beeinflusst die Inhibition von NLRP3 die Viabilität und zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln negativ?
2. Kann die Inhibition von NLRP3 die Revaskularisierung transplantierte Langerhans-Inseln verbessern?
3. Welcher regulatorische Mechanismus führt zu der erhöhten Insulin-Sekretion isolierter Langerhans-Inseln nach Verlust oder Inhibition von NLRP3?
4. Führt die Transplantation von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln oder Wildtyp (WT) Langerhans-Inseln, die mit dem NLRP3-Inhibitor CY-09 behandelt wurden, zu einer beschleunigten Wiederherstellung der Normoglykämie von diabetischen Mäusen?

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion transplantierte Langerhans-Inseln untersucht werden. Hierbei sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Beeinflusst der Isolierungsprozess die zelluläre Zusammensetzung und Viabilität von Langerhans-Inseln und MVF negativ?
2. Verbessert die Ko-Transplantation von MVF und Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen die Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel?
3. Verbessert die Ko-Transplantation von MVF und Langerhans-Inseln in das subkutane Gewebe von diabetischen Mäusen die Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel?

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Zelllinien und Zellkultur

Die verwendeten *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC; PromoCell, Heidelberg, Deutschland) wurden in *endothelial cell growth medium* (ECGM; PromoCell) (100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Die Kultivierung der murinen pankreatischen  $\beta$ -Zelllinie MIN6 (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Prof. Dr. Claudia Götz, Homburg, Deutschland) erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Thermo Fisher Scientific) (25 mmol/l Glukose, 10 % *fetal calf serum* (FCS; Thermo Fisher Scientific), 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin). Beide Zelllinien wurden bei 37 °C, 20 % Sauerstoff (O<sub>2</sub>), 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert (Binder, Tuttlingen, Deutschland) und bei einer Konfluenz von 80 % im Verhältnis 1:3 passagiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 5.2 NLRP3-Inhibitor: CY-09

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von CY-09 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) auf biologische Prozesse *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* untersucht. In der Literatur wird CY-09 als Inhibitor für das NLRP3-Inflammasom beschrieben [Jiang *et al.*, 2017]. CY-09 bindet direkt an die Adenosintriphosphat (ATP)-Bindestelle der NACHT-Domäne von NLRP3 und inhibiert dessen Adenosintriphosphatase (ATPase)-Aktivität, wodurch die Zusammenlagerung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms blockiert wird. Für die Verwendung des Inhibitors wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von 20 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit dem CY-09-Pulver (Reinheit > 98 %) hergestellt. Die Stocklösung wurde bei -20 °C gelagert und für die Verwendung unmittelbar vor Gebrauch 1:2000 in dem entsprechenden Medium verdünnt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die MIN6-Zellen für 24 h und die Langerhans-Inseln für 16 h mit DMSO (Vehikel) oder CY-09 (10  $\mu$ M) behandelt. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt.

### 5.3 Hypoxie-Induktion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Hypoxie auf biologische Prozesse *in vitro* und *ex vivo* untersucht. Hierfür wurden MIN6-Zellen für 24 h und Langerhans-Inseln für 16 h bei 37 °C, 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert (Binder) und anschließend unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt.

## 5.4 *Tube formation-Assay*

Mithilfe des *Tube formation*-Assays kann die Fähigkeit von Endothelzellen, kapillarartige Strukturen (Gefäßmaschen) zu bilden, untersucht werden. Hierzu wurden  $1,5 \times 10^4$  HUVEC in 100  $\mu$ l ECGM (100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) auf 50  $\mu$ l polymerisiertes Matrigel (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix; Sigma-Aldrich) pro Well in eine 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Kombinationen von Insulin (1,5 mmol/l; Sigma-Aldrich), CY-09 (10  $\mu$ M), dem IR- und IGF-1 Rezeptor (IGF-1R)-Inhibitor Linsitinib (800 nmol/l; Selleck Chemicals GmbH; Planegg, Deutschland) und DMSO (Vehikel) behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde die Anzahl der Gefäßmaschen pro *high-power field* (HPF) mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen (BZ-8000; Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) dokumentiert und mithilfe der FIJI-Software (GitHub, San Francisco, USA) analysiert.

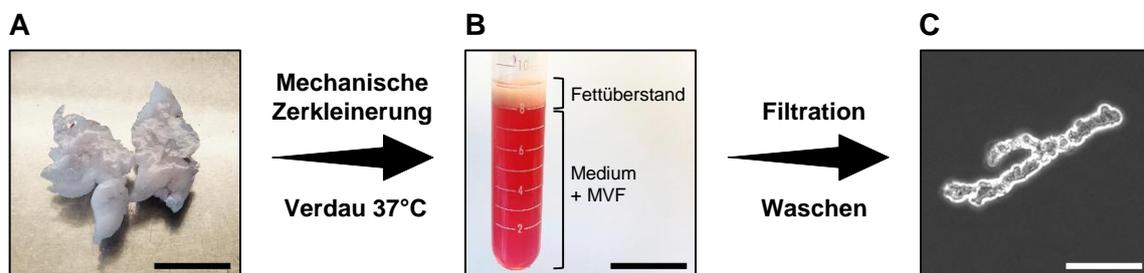
## 5.5 Versuchstiere

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden unter einem 12h/12h-Tag/Nacht-Zyklus bei einer Raumtemperatur von 20 - 24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 10$  % in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, gehalten. Den Versuchstieren war Trinkwasser und Standard-Pellet-Futter (Altromin, Lage, Deutschland) *ad libitum* zugänglich. Neben dem Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde deren Verhalten und Körpergewicht stetig kontrolliert. Für die Isolierung von Langerhans-Inseln wurden homozygote C57BL/6J oder C57BL/6N WT-Mäuse sowie homozygote transgene *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäuse (B6.129S6-*Nlrp3*<sup>tm1Bhk</sup>/J; JAX stock #021302; Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) und *Casp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse (B6N.129S2-*Casp1*<sup>tm1Fiv</sup>/J; JAX stock #016621; Jackson Laboratory) im Alter von 10-20 Wochen und einem Körpergewicht von 22-30 g als Spendertiere verwendet. Männliche C57BL/6J oder C57BL/6N WT-, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>- und *Casp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Alter von 15-35 Wochen mit einem Körpergewicht von 25-35 g dienten als Spendertiere für die Isolierung der MVF. Männliche C57BL/6J oder C57BL/6N WT-Mäuse in einem Alter von 8-16 Wochen und einem Gewicht von 24-28 g wurden als Empfängertiere für die Präparation der Rückenhautkammer und das diabetische Mausmodell verwendet.

Alle Tierexperimente wurden von der lokalen Tierschutzkommission und dem Landesamt für Verbraucherschutz (Abt. C „Veterinärwesen, Tierschutz“; Saarbrücken, Deutschland) genehmigt (Zulassungsnummern: 18/2017, 45/2018, 30/2019) und gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes sowie den Leitlinien der *National Institutes of Health* (NIH) für die Pflege und Verwendung von Labortieren (Institute of Laboratory Animal Resources, Washington, D.C., USA) durchgeführt.

## 5.6 Isolierung von MVF aus dem epididymalen Fettgewebe

Die Isolierung der MVF erfolgte nach Frueh *et al.* [2017b]. Hierfür wurden die Spendermäuse durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht; Serumwerke Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Das Abdomen wurde durch eine mediane Laparotomie eröffnet, das epididymale Fettgewebe oberhalb des Nebenhodens entnommen und in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS; Thermo Fisher Scientific) gewaschen (*Abbildung 6A*). Zuerst wurde das Fettgewebe mit einer Schere mechanisch zerkleinert und anschließend unter langsamen Rühren in einer Kollagenaselösung (0,1 mg Kollagenase NB 4G (5 U/mg; Nordmark, Uetersen, Deutschland) in 1 ml *phosphate-buffered saline* (PBS; Thermo Fisher Scientific)) für 10 min bei 37 °C enzymatisch verdaut. Nach Inaktivierung der Kollagenase mit DMEM (25 mmol/l Glukose, 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) wurde die Suspension für 5 min bei 37 °C inkubiert und danach der Fettüberstand entfernt (*Abbildung 6B*). Nun wurden die MVF mittels eines 500- $\mu$ m-Filters (pluriSelect, Leipzig, Deutschland) von den unverdauten Kollagenfasern der EZM separiert und bis zur weiteren Verwendung in DMEM (25 mmol/l Glukose, 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (*Abbildung 6C*).

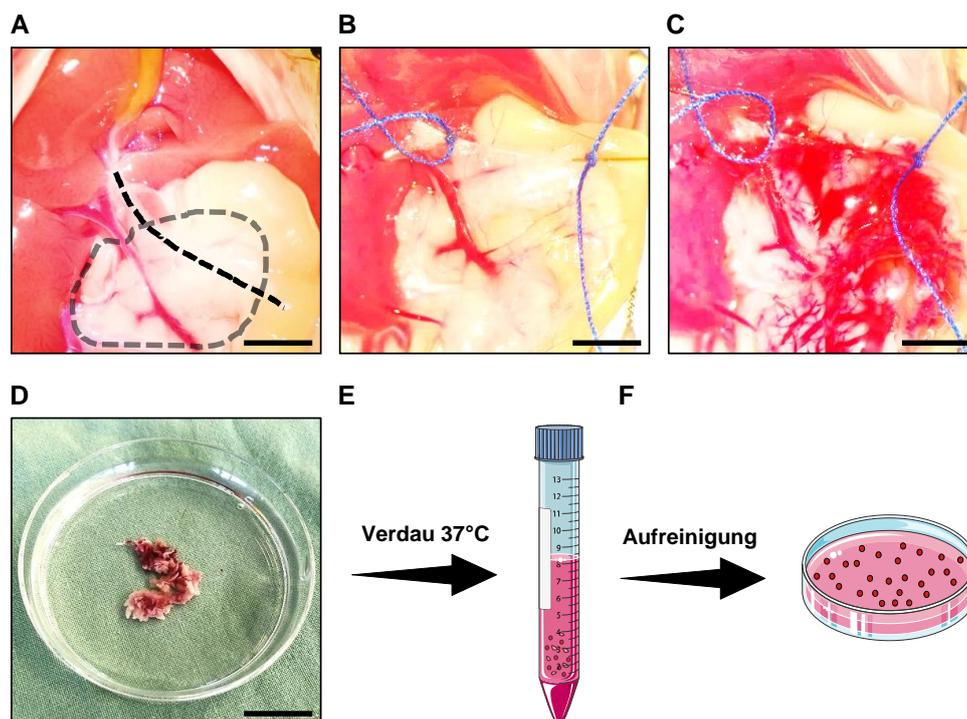


**Abbildung 6: Isolierung von MVF aus epididymalem Fettgewebe.** (A) Das entnommene epididymale Fettgewebe der Maus wird mechanisch zerkleinert und enzymatisch verdaut. Maßstab: 20 mm. (B) Nach dem enzymatischen Verdau und der Inaktivierung der Kollagenase befinden sich die MVF im Medium, während das verdaute Fettgewebe die obere Phase der Suspension bildet. Der Fettüberstand wird abgenommen und die MVF durch Filtration der Zellsuspension über einen 500- $\mu$ m-Filter von den unverdauten Kollagenfasern getrennt. Nach der Aufreinigung können die MVF für weiterführende Versuche verwendet werden. Maßstab: 20 mm. (C) Lichtmikroskopische Aufnahme eines isolierten MVF. Maßstab: 20  $\mu$ m.

## 5.7 Isolierung von Langerhans-Inseln aus dem Pankreas

Die Isolierung der Langerhans-Inseln erfolgte nach Gotoh *et al.* [1987]. Hierfür wurden die Spendermäuse durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Nach Öffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie wurde der Gastrointestinaltrakt zur rechten Seite ausgelagert (*Abbildung 7A*). Nach der Ligatur

des *Ductus pancreaticus* nahe des *Ductus choledochus* wurde unmittelbar vor der *Papilla Vateri* eine flexible 34 G Kanüle (World Precision Instruments, Sarasota, USA) mit einem zweiten Faden fixiert (*Abbildung 7B*), sodass 1 ml einer 4 °C kalten Kollagenaselösung (10 mg Kollagenase NB 8 (1 U/mg; Nordmark), 10 ml HBSS, 250 µl Neutralrot (Sigma-Aldrich)) über den *Ductus pancreaticus* in das Pankreas injiziert werden konnte (*Abbildung 7C*). Das in der Kollagenaselösung enthaltene Neutralrot färbt die vitalen endokrinen Langerhans-Inseln an, wodurch sich diese bei der späteren Aufreinigung von dem verdauten exokrinen Gewebe besser unterscheiden lassen. Nach der Injektion wurde das Pankreasgewebe entnommen (*Abbildung 7D*) und das exokrine Gewebe durch eine 15-minütige Inkubation im Wasserbad (Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C enzymatisch verdaut (*Abbildung 7E*). Abschließend wurden die vereinzelt Langerhans-Inseln mithilfe einer 200 µl Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung in DMEM (25 mmol/l Glukose, 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (*Abbildung 7F*).



**Abbildung 7: Isolation von Langerhans-Inseln aus dem Pankreas.** (A) Das Abdomen der narkotisierten Maus wird durch eine mediane Laparotomie eröffnet und das Pankreas freigelegt (grau gestrichelte Linie: Pankreas; schwarz gestrichelte Linie: *Ductus pancreaticus*). Maßstab: 10 mm. (B) Nach Kanülierung des *Ductus pancreaticus* wird dieser beidseitig ligiert. Maßstab: 10 mm. (C) Über den *Ductus pancreaticus* wird die mit Neutralrot-gefärbte Kollagenaselösung in das Pankreas injiziert. Maßstab: 10 mm. (D) Das angefärbte Pankreas wird entnommen. Maßstab: 20 mm. (E) Anschließend wird das Pankreas enzymatisch verdaut. (F) Nach der Aufreinigung können die Langerhans-Inseln kultiviert und für weiterführende Versuche verwendet werden. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art und modifiziert nach Wrublewsky [2020])

## 5.8 Propidiumiodid- und Calcein-Färbung

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe der Propidiumiodid- und Calcein-Färbung die Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln analysiert. Hierbei dienten Langerhans-Inseln, die für 24 h in 0,2 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) inkubiert wurden, als Positivkontrolle. Für die Färbung wurden die Langerhans-Inseln mit PBS gewaschen und für 20 min bei 37 °C mit Propidiumiodid (50 µg/ml; BD GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Calcein (1 µg/ml; Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Die Zellkerne wurden für 10 min bei 37 °C mittels Hoechst 33342 (2 µg/ml; Roche, Mannheim, Deutschland) angefärbt. Im Anschluss wurden die Langerhans-Inseln erneut mit PBS gewaschen, in Glycerin-Gelatine (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und auf einem Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland) eingedeckt. Die zelluläre Färbung wurde mittels eines BX60 Fluoreszenz-Mikroskops (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) in 200-facher Vergrößerung visualisiert.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe der Propidiumiodid-Färbung nekrotische Zellen innerhalb isolierter Langerhans-Inseln und MVF analysiert werden. Hierbei dienten Langerhans-Inseln bzw. MVF, die für 24 h in 0,2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden, als Positivkontrolle. Für die Färbung wurden die Langerhans-Inseln bzw. MVF mit PBS gewaschen und für 20 min bei 37 °C mit Propidiumiodid (50 µg/ml) inkubiert. Die Zellkerne wurden für 10 min bei 37 °C mittels Hoechst 33342 (2 µg/ml) angefärbt. Im Anschluss wurden die Langerhans-Inseln bzw. MVF erneut mit PBS gewaschen, in Glycerin-Gelatine aufgenommen und auf einem Objektträger eingedeckt. Die zelluläre Färbung wurde mittels eines BX60 Fluoreszenz-Mikroskops in 200-facher Vergrößerung visualisiert.

## 5.9 Durchflusszytometrische Analyse

Mithilfe einer Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie wurde die Viabilität der Einzelzellen innerhalb isolierter Langerhans-Inseln analysiert. Hierzu wurden die Langerhans-Inseln mit PBS gewaschen und mittels Accutase® (Biolegend GmbH, Koblenz, Deutschland) in Einzelzellen separiert. Im Anschluss wurden die Einzelzellen für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Propidiumiodid und Annexin V (100 µg/ml) (Propidiumiodid- und Annexin V-kit; BD GmbH) inkubiert, mit einem FACSLyrics Durchflusszytometer (BD GmbH) gemessen und, wie in Tabelle 1 dargestellt, in vier Gruppen eingeteilt.

**Tabelle 1: Bestimmung der Viabilität mittels Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung.** Der Anteil an vitalen, apoptotischen, nekrotischen und nekroptotischen Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln kann anhand ihres Färbeverhaltens detektiert werden.

|                               | <b>Annexin V-negativ</b> | <b>Annexin V-positiv</b> |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Propidiumiodid-negativ</b> | Vital                    | Apoptotisch              |
| <b>Propidiumiodid-positiv</b> | Nekrotisch               | Nekroptotisch            |

## 5.10 Einbetten isolierter Langerhans-Inseln in eine HepatoQuick®-Matrix

Um immunhistochemische Färbungen isolierter Langerhans-Inseln durchführen zu können, mussten die Langerhans-Inseln zunächst in eine HepatoQuick®-Matrix eingebettet werden. Hierzu wurde ein Gemisch aus 100 µl HepatoQuick® (Stago, Asnières sur Seine, Frankreich), 50 µl *platelet-poor plasma* (PPP; eigene Herstellung) und 10 µl 10 % CaCl<sub>2</sub>-Lösung in den Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Durch eine Inkubation von 45 min bei 37 °C wurde das Aushärten dieses Gemischs induziert. Anschließend wurden 30 Langerhans-Inseln in 10 µl HepatoQuick® aufgenommen, mittig auf die ausgehärtete Matrix pipettiert und 5 µl PPP sowie 1 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Durch eine erneute Inkubation von 15 min bei 37 °C wurden die Langerhans-Inseln auf der unteren Matrix fixiert. Zuletzt wurde eine dritte Schicht aus 100 µl HepatoQuick®, 50 µl PPP und 10 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf die Matrix pipettiert und für 60 min bei 37 °C zum Aushärten inkubiert. Abschließend wurde die Matrix mithilfe einer Kanüle (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes gelöst. Für die folgenden immunhistochemischen Analysen wurde die entnommene Matrix für 24 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA; Morphisto, Offenbach am Main, Deutschland) bei 4 °C fixiert.

## 5.11 Ribonucleic acid (RNA)-Isolation

Für die Isolation der RNA aus Langerhans-Inseln wurden diese in PBS gewaschen und in 400 µl *QIAzol™ Lysis Reagent* (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei -80 °C eingefroren. Die Proben wurden nach dem Auftauen resuspendiert und durch eine Inkubation (5 min bei 30 °C) aufgeschlossen. Nach Zugabe von 80 µl Chloroform (Carl Roth GmbH) wurden die Proben für 40 s gemischt, bei 30 °C für 3 min inkubiert und bei 4 °C für 20 min bei 9500 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde die obere wässrige Phase in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co. KG) überführt und die RNA durch Zugabe von Isopropanol (Carl Roth GmbH) über Nacht bei -20 °C gefällt. Am Folgetag wurden die Proben bei 4 °C für 10 min bei 12000 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde Ethanol (75 %) hinzugegeben, erneut bei 4 °C für 5 min bei 7500 xg zentrifugiert und das RNA-Pellet getrocknet. Dieses wurde in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 30 min auf Eis gelöst. Zuletzt wurde die RNA-Konzentration mithilfe

eines *DeNovix NanoDrops* (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) bei 260 nm gemessen und die Reinheit mithilfe der Quotienten 260/280 nm und 260/230 nm überprüft. Die eluierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 5.12 Reverse Transkription

Mithilfe des *HighScriber™ reverse transcriptase mix kit* (HighQu, Kraichtal, Deutschland) wurde die RNA durch das Enzym reverse Transkriptase in *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde 1 µg isolierte RNA eingesetzt und die cDNA-Synthese nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurde die Konzentration und Reinheit der cDNA mithilfe eines *DeNovix NanoDrops* gemessen und diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 5.13 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Mithilfe der qRT-PCR konnte die Genexpression von Zellen quantifiziert werden. Hierzu wurden der *ORA™ SEE qPCR Green ROX L Mix* (HighQu), 100 ng cDNA (siehe Abschnitt 5.13) und 500 nM Primer (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Die qRT-PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Erhebung der Daten erfolgte mit dem *MiniOpticon™ Real-Time PCR Detection*-System in Kombination mit der *CFX Manager™*-Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Es wurden folgende Primer-Paare für die qRT-PCR verwendet:

Ins1: f 5'-AACAACTGGAGCTGGGAGGAAG-3', r 5'-GGTGCAGCACTGATCCACAATG-3'

Ins2: f 5'-GCAGCACCTTTGTGGTTCC-3', r 5'-CTTGTGGGTCCTCCACTTC-3'

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

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

## 5.14 Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion

Um die Insulin-Sekretion von isolierten Langerhans-Inseln *in vitro* zu bestimmen, wurden je 10 Langerhans-Inseln pro Well in eine 24-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH) pipettiert und diese für 16 h entweder unter normoxischen (37 °C, 20 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) oder hypoxischen (37 °C, 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Im Anschluss wurden die Langerhans-Inseln mit *krebs ringer buffer* (KRB; 115 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 1,28 mmol/l CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 1,2 mmol/l MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0,1 % *bovine serum albumin* (BSA; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)) gewaschen und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in KRB mit 16,5

mM Glukose inkubiert. Der Überstand wurde bei -80 °C für die darauffolgende *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Messung gelagert.

### 5.15 Bestimmung der Insulinmenge

Sowohl die Menge an sekretiertem Insulin der isolierten Langerhans-Inseln als auch die Menge an Insulin im Plasma und in den Transplantaten (Nierenkapsel und subkutanes Gewebe) wurde mithilfe des *rat insulin ELISA-kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben quantifiziert. Hierfür wurden die Proben als Doppelbestimmung auf die ELISA-Platte aufgetragen und für 2,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach Verwerfen der Proben wurde die ELISA-Platte für 1 h mit dem biotinylierten Antikörper und anschließend für 45 min mit *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppeltem Streptavidin bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die ELISA-Platte wurde daraufhin mit dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet, die Absorption bei 450 nm in dem Plattenlesegerät PHOmo (Anthos, Friesoythe, Deutschland) gemessen und die Menge an Insulin mithilfe der Standardreihe bestimmt.

### 5.16 *Sprouting*-Assay von MVF-Sphäroiden

Mithilfe eines *Sprouting*-Assays konnte das *Sprouting*-Verhalten von MVF-Sphäroiden in einem 3D-Zellkulturmodell untersucht werden. Hierzu wurden MVF aus dem epididymalen Fettgewebe von C57BL/6J WT- und *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Spendermäusen isoliert (siehe Abschnitt 5.6) und deren Anzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland) bestimmt. Die MVF-Sphäroide wurden mithilfe der *Liquid Overlay*-Technik über 5 Tage generiert, indem 750 MVF in 100 µl DMEM (25 mmol/l Glukose, 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) auf 40 µl ausgehärtete Agarose (1 %) (Sigma-Aldrich) pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät wurden. Um die angiogene Aktivität der MVF-Sphäroide analysieren zu können, wurden je 300 µl einer 4 °C-kalten Kollagen-Lösung (120 µl Kollagen-Extrakt (Advanced Biomatrix, Carlsbad, USA), 15 µl 10x M199 (Sigma-Aldrich), 15 µl 0.2 M NaOH, 60 µl DMEM, 60 µl 0,5 % Methylcellulose (Thermo Fisher Scientific), 30 µl FCS) pro Well in eine 24-Well-Platte pipettiert und im Brutschrank bei 37 °C für 45 min ausgehärtet. Im Anschluss wurden je 300 µl der Kollagen-Lösung mit 15 MVF-Sphäroiden pro Well auf die untere Kollagen-Matrix gegeben und erneut bei 37 °C für 45 min auspolymerisiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Kollagen-Matrix mit 500 µl DMEM (25 mmol/l Glukose, 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin), das mit unterschiedlichen Kombinationen von Insulin (1,5 mmol/l) und CY-09 (10 µM) versetzt wurde,

überschichtet. Die *Sprouting*-Fläche wurde an Tag 3 mittels Hellfeldmikroskopie (Leica DFC450C; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) dokumentiert und mithilfe der FIJI-Software analysiert.

### 5.17 *Aortic ring*-Assay

Mithilfe eines *Aortic ring*-Assays konnte die angiogene Wirkung von unterschiedlichen Substanzen auf das *Sprouting*-Verhalten von Aorten-Ringen untersucht werden. Für die Entnahme der Aorten-Ringe wurden C57BL/6J WT- und *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Spendermäuse durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Nach einer medianen Laparotomie wurde dem Spendertier die thorakale Aorta entnommen und in DMEM (25 mmol/l Glukose, 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) gereinigt, um Gewebe-, Fett- und Blutreste zu entfernen. Anschließend wurde die Aorta mit einer Mikroschere in 0,5 mm-breite Ringe geschnitten und je ein Ring in 100 µl flüssiges Matrigel pro Well in eine 96-Well-Platte eingebettet. Nach 15-minütiger Polymerisation des Matrigels wurde auf dieses 100 µl DMEM (25 mmol/l Glukose, 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin), das mit unterschiedlichen Kombinationen von Insulin (1,5 mmol/l), CY-09 (10 µM), Linsitinib (800 nmol/l) und DMSO (Vehikel) versetzt wurde, gegeben. Die Aorten-Ringe wurden anschließend für 6 Tage bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde an Tag 3 durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde die *Sprouting*-Fläche mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen (BZ-8000) dokumentiert und mithilfe der FIJI-Software analysiert.

### 5.18 Ca<sup>2+</sup>-Messung

Für die Messung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration innerhalb der Langerhans-Inseln wurden diese für 2 h mit 5 µM Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2AM) (Sigma-Aldrich) in KRB ohne Glukose beladen und 2-mal mit PBS gewaschen. Im Anschluss konnte die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mithilfe der Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen werden (CLARIOstar; BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland). Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte alle 20 s über einen Beobachtungszeitraum von 25 min, währenddessen drei unterschiedliche Konditionen gemessen wurden. Zur Bestimmung der Basislinie wurden die Langerhans-Inseln zunächst für 5 min in KRB ohne Glukose inkubiert und anschließend folgte eine 15-minütige Inkubation in KRB mit 20 mM Glukose. Für die vollständige Depolarisation der Langerhans-Inseln wurde zuletzt 30 mM KCl (K<sup>+</sup>) zugegeben.

## 5.19 Zytoplasmatische und nukleäre Proteinextraktion

Um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen mittels Western Blot-Analysen detektieren zu können, müssen zuerst Proteinextrakte der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion generiert werden. Hierfür wurden Langerhans-Inseln in PBS (4 °C) gewaschen und anschließend erfolgte die Zellyse durch Zugabe von Puffer A (10 mM HEPES-KOH (pH 7,9), 10 % Glycerol, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 % NP-40, 1:100 Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche)) für 20 min auf Eis. Die lysierten Proben wurden bei 4 °C für 5 min bei 14800 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser enthielt die Proteine der zytoplasmatischen Fraktion und wurde bis zur Proteinbestimmung auf Eis gelagert. Zur Isolation der nukleären Proteinfraktion wurde das Pellet in Puffer C (10 mM HEPES-KOH (pH 7,9), 10 % Glycerol, 500 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1:100 Protease-Inhibitor-Cocktail) gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 14800 xg wurde der Überstand (nukleärer Proteinextrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakts wurde mithilfe des Bradford Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH) und dem DeNovix DS-11 Spektrophotometer (Biozym Scientific GmbH) gemessen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 5.20 Gesamtzell-Proteinextraktion

Für Western Blot-Analysen mussten die Proteine zunächst aus den isolierten Langerhans-Inseln extrahiert werden. Hierzu wurden die Langerhans-Inseln in PBS gewaschen und anschließend erfolgte die Zellyse durch Zugabe von Lysepuffer (10 mM TRIS (pH 7,5), 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Triton-X-100, 0,02 % NaN<sub>3</sub>), supplementiert mit 1:500 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Carl Roth GmbH), 1:100 Protease-Inhibitor-Cocktail und 1:100 Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich), für 30 min auf Eis. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 14000 xg wurde der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford Reagenz und dem DeNovix DS-11 Spektrophotometer gemessen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 5.21 *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*

Die SDS-PAGE wurde zur Analyse von Proteinen verwendet, indem diese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt wurden. Hierzu wurden die Proben der Proteinextrakte (siehe Abschnitt 5.20 und 5.21) mit 2x Laemmli-Puffer (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert. Im Anschluss wurden die Proteinextrakte auf ein 10 % oder 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 100 V und 30-40 mA entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker peqGOLD IV (VWR, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

## 5.22 Western Blot

Bevor die aufgetrennten Proteine mithilfe von Antikörpern visualisiert werden konnten, mussten diese zuerst mithilfe des *Semi dry*-Verfahrens auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Bio-Rad Laboratories GmbH) transferiert werden. Hierzu wurden das SDS-Gel und die PVDF-Membran zwischen Whatman-Papieren in einer *Semi dry*-Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) übereinandergeschichtet und eine Spannung von 25 V und 1,3 A für 7 min angelegt. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran in *tris-buffered saline + Tween20* (TBST; Sigma-Aldrich) und 5 % BSA für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Primärantikörper (*pancreatic and duodenal homeobox-1* (PDX-1; sc-25403; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), *v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A* (MafA; sc-390491; Santa Cruz Biotechnology), *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP; #14715; Cell Signaling Technology Europe, Leiden, Niederlande), NLRP3 (#15101; Cell Signaling Technology Europe), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; 60004; Proteintech Group, Rosemont, USA), Nucleolin (Serum #36; Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Prof. Dr. Claudia Götz, [Spohrer *et al.*, 2017]) wurden in TBST und 1 % BSA 1:500 verdünnt und auf der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3-mal für 10 min in TBST gewaschen, mit den entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (1:2000; anti-Rabbit IgG HRP (HAF008; R&D Systems, Minneapolis, USA), anti-Mouse IgG HRP (P044701-2; Aligent Technologies, Santa Clara, USA)) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3-mal für 10 min in TBST gewaschen. Zuletzt wurde die Expression der Proteine durch Zugabe des *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Reagenz (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in einem *ECL Chemocam Imager* (Intas GmbH, Göttingen, Deutschland) visualisiert. Mithilfe der *ChemoStar*-Software (Intas GmbH) erfolgte die Quantifizierung der Antikörperintensitäten, welche auf das entsprechende Haushaltsgen normiert wurden.

### 5.23 Ko-Immünpräzipitation

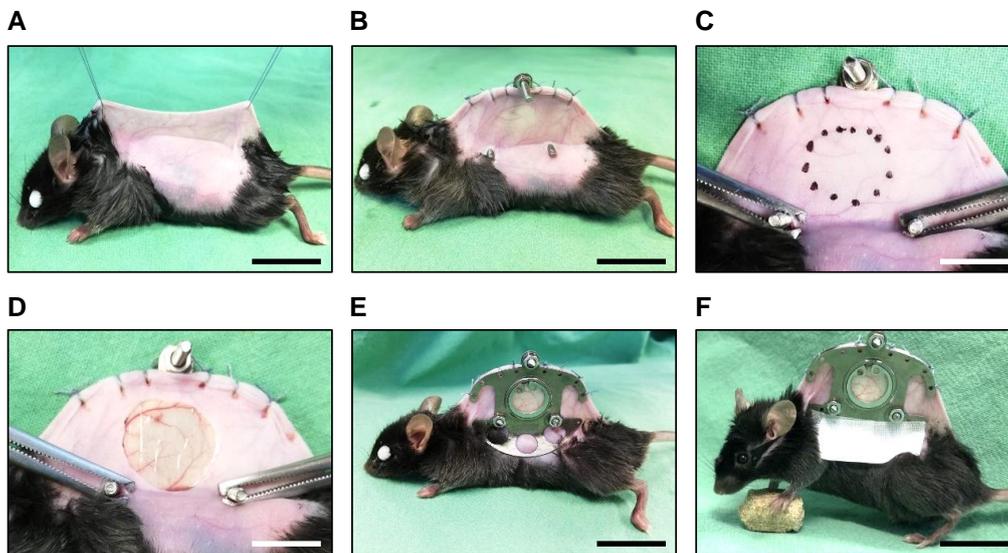
Unter Verwendung der Ko-Immünpräzipitation konnten Protein-Protein-Wechselwirkungen identifiziert und analysiert werden. Hierzu wurden die behandelten MIN6-Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 200xg erfolgten die Zellyse und die Bestimmung der Proteinkonzentration wie zuvor in Abschnitt 5.21 geschrieben. Die Ko-Immünpräzipitation der Proteinextrakte wurde mithilfe des *Pierce™ Crosslink IP kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden durch ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abschnitt 5.22), auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels Western Blot (siehe Abschnitt 5.23) analysiert.

### 5.24 Modell der Rückenhautkammer und Transplantation von Langerhans-Inseln

Mithilfe des Modells der Rückenhautkammer kann die Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln *in vivo* repetitiv analysiert werden [Laschke *et al.*, 2011]. Die aus zwei Titanrahmen bestehende Rückenhautkammer ermöglicht durch das integrierte Beobachtungsfenster die Mikroskopie der Mikrozirkulation des Rückenhautkammerngewebes und der transplantierten Langerhans-Inseln.

Für die Präparation der Rückenhautkammer wurden die Empfängertiere durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und zur Analgesie erfolgte eine subkutane Injektion von Carprofen (10 mg/kg Körpergewicht; Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland). Anschließend wurde die Rückenhaut rasiert und mithilfe chemischer Depilation enthaart. Unter Gegenlichtkontrolle wurden die Blutgefäße der Rückenhautfalte in eine kongruente Position gebracht und die Rückenhaut an ihrer Mittellinie cranial und caudal fixiert (*Abbildung 8A*). Im Anschluss wurde der rückwärtige Titanrahmen apikal entlang der Rückenhautfalte mithilfe von Einzelknopfnähten fixiert und dessen Verbindungsschrauben mithilfe zweier Inzisionen implantiert (*Abbildung 8B*). Das zu entfernende Gewebe im Beobachtungsfenster (15 mm Durchmesser) wurde markiert (*Abbildung 8C*). Innerhalb dieser Markierung wurden die Kutis, Subkutis, quergestreifte Hautmuskulatur und die zwei Schichten des *Musculus retractor* mithilfe einer Schere und Mikroschere entfernt (*Abbildung 8D*). Nach mehrmaligem Spülen der verbleibenden Rückenhautgewebeschichten mit Kochsalzlösung (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) wurde der vordere Titanrahmen unter Zuhilfenahme von Muttern als Abstandshalter (~1,0 mm) zu dem rückwärtigen Titanrahmen aufgesetzt. Das Beobachtungsfenster wurde mit einem Deckglas luftblasenfrei verschlossen und mit einem

abnehmbaren Sprengring fixiert (*Abbildung 8E*). Vor der Transplantation der Langerhans-Inseln konnten sich die Versuchstiere 48 h von dem operativen Eingriff und der Anästhesie erholen (*Abbildung 8F*).



**Abbildung 8: Präparation der Rückenhautkammer.** (A) Für die Präparation der Rückenhautkammer wird die narkotisierte Maus rasiert, enthaart und die Rückenhaut an der Mittellinie cranial und caudal fixiert. Maßstab: 20 mm. (B) Die rückwärtige Kammerhälfte wird mit Einzelknopfnähten an der Rückenhaut fixiert und die Verbindungsschrauben mithilfe zweier Inzisionen implantiert. Maßstab: 20 mm. (C) Das zu entfernende Gewebe im Bereich des Beobachtungsfensters wird unter Gegenlichtkontrolle markiert. Maßstab: 15 mm. (D) Die Kutis, Subkutis, quergestreifte Hautmuskulatur und die zwei Schichten des *Musculus retractor* werden im Bereich des Beobachtungsfensters entfernt. Maßstab: 15 mm. (E) Abschließend wird die zweite Kammerhälfte fixiert und das Beobachtungsfenster mit einem Deckglas und Sprengring luftblasenfrei verschlossen. Maßstab: 20 mm. (F) Das Versuchstier kann sich vor der Transplantation der Langerhans-Inseln 48 h von dem operativen Eingriff erholen. Maßstab: 20 mm. (Modifiziert nach Wrublewsky [2020])

Nach dieser Erholungszeit wurden die Versuchstiere durch eine erneute i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und der Sprengring sowie das Deckglas entfernt. Nach mehrmaligem Spülen des Präparationsfeldes mit einer Kochsalzlösung wurden 8 Langerhans-Inseln auf den quergestreiften Hautmuskel transplantiert. Für die folgende intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde das Beobachtungsfenster wieder mit einem neuen Deckglas und Sprengring luftblasenfrei verschlossen.

#### 5.24.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie konnten die Revaskularisierung und Mikrozirkulation der transplantierten Langerhans-Inseln *in vivo* repetitiv analysiert werden. Hierfür wurden die Rückenhautkammer-Tiere durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und es erfolgte anschließend eine intravenöse (i.v.) Injektion von 0,05 ml 5 % *fluorescein isothiocyanate* (FITC)-markiertes Dextran (Sigma-Aldrich) und 0,05 ml 0,1 % Rhodamin 6G

(Sigma-Aldrich) in den retrobulbären Venenplexus. FITC-markiertes Dextran ist ein an FITC gekoppeltes Biopolysaccharid mit einem hohen Molekulargewicht von 150.000 Da, weshalb es größtenteils intravasal verbleibt und somit zur Kontrastierung der Blutgefäße dient. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G besitzt ein geringeres Molekulargewicht und dient zum Nachweis der Fenestrierung von Blutgefäßen, indem er die Poren von fenestriertem Endothel passieren kann und sich anschließend in den Mitochondrien der umliegenden endokrinen Zellen akkumuliert. Das Endothel von Langerhans-Inseln ist aufgrund ihrer hohen Sekretionsleistung stark fenestriert, weshalb sich Rhodamin 6G in den Zellen der transplantierten Langerhans-Inseln ansammelt und somit als Marker für die endokrine Revaskularisierung dient [Vajkoczy *et al.*, 1995; Olsson & Carlsson, 2006; Zanone *et al.*, 2008; Kolka & Bergman, 2012].

Nach der Farbstoff-Injektion wurden die narkotisierten Rückenhautkammer-Tiere auf einer Plexiglasbühne in lateraler Position fixiert und unter einem mit einer 100 W Quecksilberdampflampe ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop (Axio 2; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem blauen (Anregungswellenlänge: 450-490 nm; Emissionswellenlänge: > 515 nm) und grünen (Anregungswellenlänge: 530-560 nm; Emissionswellenlänge: > 585 nm) Filterblock positioniert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe einer Videokamera (Pieper GmbH, Cottbus, Deutschland), einem Monitor (Sony Europe B.V., Berlin, Deutschland) und einem DVD-Recorder (Panasonic, Wiesbaden, Deutschland) an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 aufgezeichnet. Um immunhistochemische Analysen der transplantierten Langerhans-Inseln durchführen zu können, wurde das Rückenhautgewebe nach der letzten Intravitalmikroskopie an Tag 14 entnommen. Hierfür wurden die Rückenhautkammer-Tiere mittels zervikaler Dislokation euthanasiert, die Gewebereiche mit den transplantierten Langerhans-Inseln mithilfe eines Skalpells exzidiert und für 24 h in 4 % PFA bei 4 °C fixiert.

Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm CapImage (Version 8.5; Zeintl, Dreieich, Deutschland). Hierbei wurden planimetrisch die revaskularisierte Fläche (mm<sup>2</sup>) und der prozentuale Anteil der Rhodamin 6G-positiven Fläche (%) der Langerhans-Inseln analysiert. Die revaskularisierte Fläche stellte dabei den Gewebereich dar, in dem Gefäßausprossungen oder die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke zu detektieren waren. Ergänzend wurden der Gefäßdurchmesser (µm), die Fließgeschwindigkeit (Zentralstromgeschwindigkeit der roten Blutzellen) (µm/s) sowie der daraus resultierende Blutvolumenfluss (pl/s) von bis zu 8 neu gebildeten Mikrogefäßen pro transplantierte Langerhans-Insel bestimmt [De Vriese *et al.*, 2000]. Der Blutvolumenfluss wurde mithilfe der Formel

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

unter Berücksichtigung des Gefäßdurchmesser (d), der Fließgeschwindigkeit (v) und dem Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor von 1,3 berechnet [Lipowsky *et al.*, 1978]. Zudem wurde die Anwachsrate (%), die den Anteil der angewachsenen Langerhans-Inseln an Tag 14 im Verhältnis zu allen transplantierten Langerhans-Inseln an Tag 0 widerspiegelt, bestimmt.

#### 5.24.2 Experimentelles Protokoll

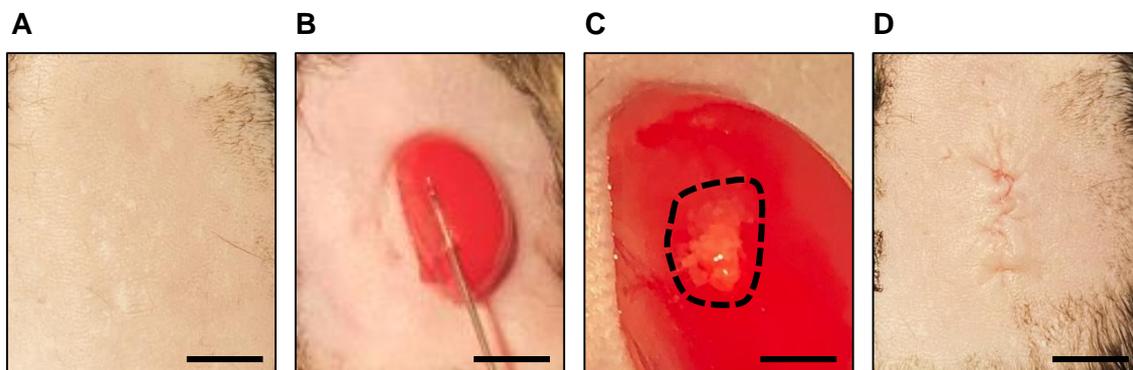
Das Rückenhautkammer-Modell wurde im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit für die Analyse von 2 unterschiedlichen Gruppen angewandt. Für die Transplantation von WT + Vehikel oder WT + CY-09 Langerhans-Inseln dienten jeweils 5 C57BL/6J WT-Mäuse als Empfängertiere. Insgesamt wurden in diesem Studienabschnitt 10 C57BL/6J WT-Mäuse als Empfängertiere und verwendet. Als Spendertiere dienten 5 C57BL/6J WT-Mäuse.

#### 5.25 Diabetisches Mausmodell und Transplantation von Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel oder in das subkutane Gewebe

Mithilfe des diabetischen Mausmodells kann die endokrine Funktion von transplantierten Langerhans-Inseln analysiert werden [Menger *et al.*, 2020a; Nalbach *et al.*, 2021b; Wrublewsky *et al.*, 2022b]. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit der T1D-Phänotyp durch eine einmalige i.p. Injektion des Glukoseanalogons Streptozotocin (STZ; 180 mg/kg Körpergewicht; Carl Roth GmbH) 8 Tage vor der Transplantation der Langerhans-Inseln induziert. Auf molekularer Ebene kommt es hierbei zu einer zellulären Aufnahme von STZ über den Glukosetransporter Typ 2 (GLUT2) der  $\beta$ -Zellen. Intrazellulär wird STZ abgebaut, wobei Diazomethan entsteht, was wiederum zur Methylierung verschiedener Makromoleküle, wie der DNA führt, weshalb die  $\beta$ -Zellen letztlich in die Apoptose gehen [Furman, 2015]. Das Körpergewicht und die Blutglukosespiegel der Versuchstiere wurden während des gesamten Beobachtungszeitraums von 36, 39 oder 116 Tagen 2-mal wöchentlich gemessen. Für die Messung der Blutglukosespiegel wurde den Versuchstieren die Schwanzvene punktiert und die Blutprobe mit einem Blutzuckermessgerät (Beurer, Ulm, Deutschland) analysiert. Hierbei dienten Mäuse mit einer Glukosekonzentration im Blut von 350 bis 450 mg/dl als Empfänger für die Transplantation der Langerhans-Inseln. Gesunde, nicht-diabetische Mäuse, die keine Transplantation von Langerhans-Inseln erhielten, dienten als Negativkontrolle.

Transplantation unter die Nierenkapsel:

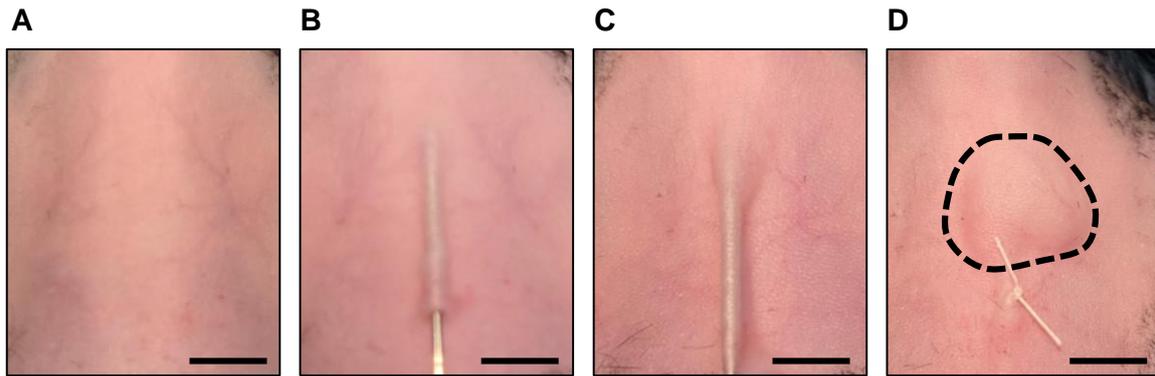
Für die Transplantation der Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel wurde die diabetische Maus zunächst mit Isofluran (Einleitung: 4 %; Aufrechterhaltung: 2 %; Piramal Critical Care, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert. Die rechte Flanke wurde rasiert und mithilfe chemischer Depilation enthaart (*Abbildung 9A*). Nach einer Haut- und Muskelinzision im Bereich des Retroperitoneums wurde die rechte Niere ausgelagert (*Abbildung 9B*) und die Langerhans-Inseln wurden mithilfe einer 10 µl Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) unter die Nierenkapsel injiziert (*Abbildung 9C*). Anschließend wurde die Niere vorsichtig zurück in den Retroperitonealraum gelagert und sowohl die Muskel- als auch die Hautinzision mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (*Abbildung 9D*).



**Abbildung 9: Transplantation von Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel.** (A) Für die Transplantation der Langerhans-Inseln wird die rechte Flanke der narkotisierten Maus rasiert und enthaart. Maßstab: 5 mm. (B) Die rechte Niere wird über einen retroperitonealen Zugang ausgelagert. Maßstab: 5 mm. (C) Die Langerhans-Inseln werden mithilfe einer Hamilton-Spritze unter die Nierenkapsel injiziert (umrandet mit gestrichelter schwarzer Linie). Maßstab: 1,5 mm. (D) Abschließend wird die Niere zurück in den Retroperitonealraum gelagert und sowohl die Muskel- als auch die Hautinzision mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Maßstab: 5 mm.

Transplantation in das subkutane Gewebe:

Für die Transplantation der Langerhans-Inseln in das subkutane Gewebe wurde die diabetische Maus zunächst mit Isofluran (Einleitung: 4 %; Aufrechterhaltung: 2 %) narkotisiert und deren Rücken mittels Elektrorasur und chemischer Depilation enthaart (*Abbildung 10A*). Anschließend wurde ein Stichkanal in der Haut mit einer 24G-Kanüle vorbereitet (*Abbildung 10B*), in den die Langerhans-Inseln nach Entfernen der Kanüle mithilfe einer 10 µl Hamilton-Spritze injiziert wurden (*Abbildung 10C*). Zuletzt wurde die Einstichstelle mit einer Einzelknopfnaht verschlossen (*Abbildung 10D*).



**Abbildung 10: Transplantation von Langerhans-Inseln in das subkutane Gewebe.** (A) Für die Transplantation der Langerhans-Inseln wird der Rücken der narkotisierten Maus rasiert und enthaart. Maßstab: 5 mm. (B) Mithilfe einer 24G-Kanüle wird ein Stichkanal vorbereitet. Maßstab: 5 mm. (C) Nach Entfernen der Kanüle werden die Langerhans-Inseln mithilfe einer Hamilton-Spritze in den Stichkanal injiziert. Maßstab: 1,5 mm. (D) Abschließend wird die Einstichstelle mit einer Einzelknopfnaht verschlossen (schwarz gestrichelte Linie: Depot der transplantierten Langerhans-Inseln). Maßstab: 5 mm.

Nach der Transplantation wurden das Körpergewicht sowie die Blutglukosespiegel der Versuchstiere über die folgenden 28, 31 oder 108 Tage wie oben beschrieben überwacht und dokumentiert. Versuchstiere mit einer Glukosekonzentration im Blut von 80 bis 200 mg/dl wurden als normoglykäm angesehen. Um zu bestätigen, dass es aufgrund der transplantierten Langerhans-Inseln zu einer Normoglykämie kommt, wurden die Transplantate durch eine Nephrektomie oder subkutane Exzision an Tag 28 oder 105 explantiert. Die Versuchstiere wurden für den operativen Eingriff erneut mit Isofluran (Einleitung: 4 %; Aufrechterhaltung: 2 %) narkotisiert. Bei der Nephrektomie wurde die rechte Niere ausgelagert und die renalen Blutgefäße sowie der Harnleiter ligiert. Im Anschluss konnte das Organ entnommen werden und die Muskel- und Hautinzision wurde mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Bei der subkutanen Exzision wurde die Haut in einem 5 mm-Radius ausgehend von der Transplantationsstelle entnommen und die Inzision mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Das entnommene Nieren- und Hautgewebe wurde für die folgenden immunhistochemischen Analysen für 24 h in 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Nach der Transplantatentnahme wurden die Körpergewichte sowie die Blutglukosespiegel der Versuchstiere über die folgenden 3 Tage gemessen, um die Rückkehr zur Hyperglykämie beobachten zu können. Anschließend wurden die Versuchstiere durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

#### 5.25.1 Intraperitonealer Glukose-Toleranz-Test (IPGTT)

Ein IPGTT wurde 28 oder 105 Tage nach der Transplantation der Langerhans-Inseln durchgeführt. Nach einer Fastenzeit von 16 h wurde den Versuchstieren eine Glukoselösung (10 %) i.p. injiziert. Anschließend wurde die Schwanzvene punktiert, ~10 µl Blut entnommen

und mittels eines Blutzuckermessgeräts der Blutglukosespiegel nach 0, 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min gemessen. Für die Bestimmung der Insulin-Konzentration im Plasma wurden zusätzliche Versuchstiere 15 min nach der Glukose-Injektion durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und ~800 µl Blut aus der *Vena cava* entnommen. Dieses wurde in einem EDTA-Röhrchen überführt und für 10 min bei 14000 xg (Sarstedt AG & Co. KG) zentrifugiert. Das somit gewonnene Plasma wurde für darauffolgende ELISA-Messungen (siehe Abschnitt 5.16) bei -80 °C gelagert. Zudem wurden diesen Versuchstieren die Transplantate entnommen, um den zellulären Insulingehalt zu bestimmen. Hierbei wurden die Transplante durch Zugabe von Lysepuffer (10 mM TRIS (pH 7,5), 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Triton-X-100, 0,02 % NaN<sub>3</sub>), supplementiert mit 1:500 PMSF, 1:100 Protease-Inhibitor-Cocktail und 1:100 Phosphatase-Inhibitor-Cocktail, für 30 min auf Eis lysiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 14000 xg wurde der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die anschließende ELISA-Messung (siehe Abschnitt 5.16) bei -80 °C gelagert.

### 5.25.2 Experimentelles Protokoll

Das diabetische Mausmodell wurde in beiden Studienabschnitten der vorliegenden Arbeit angewandt. Dabei wurden insgesamt 21 unterschiedliche Gruppen analysiert (*Tabelle 2*). Im ersten Studienabschnitt teilen sich insgesamt 12 Gruppen in jeweils 3 Gruppen für die Bestimmung der kritischen Anzahl der zu transplantierenden WT Langerhans-Inseln (n = 4 Empfängertiere pro Gruppe) und 9 Gruppen für den Hauptversuch (n = 7 Empfängertiere pro Gruppe) auf. Im Hauptversuch wurden in 5 Gruppen 6 zusätzliche Versuchstiere für die Bestimmung der Insulin-Konzentration benötigt. Im zweiten Studienabschnitt wurden insgesamt 9 Gruppen (n = 6 oder 8 Empfängertiere pro Gruppe) analysiert. Hierbei wurden in 7 Gruppen 3 zusätzliche Versuchstiere für die Bestimmung der Insulin-Konzentration benötigt. Pro Empfängertier wurden im ersten Studienabschnitt 200 bis 400 Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von insgesamt 78 C57BL/6J WT-Mäusen transplantiert (*Tabelle 2*). Im zweiten Studienabschnitt wurden pro Empfängertier 250 bis 1000 Langerhans-Inseln in Kombination mit MVF unter die Nierenkapsel oder in das subkutane Gewebe von insgesamt 63 C57BL/6N WT-Mäusen transplantiert (*Tabelle 2*). In beiden Studienabschnitten dienten gesunde, nicht-diabetische C57BL/6J oder C57BL/6N WT-Mäuse, denen keine Langerhans-Inseln transplantiert wurden, als Negativkontrolle (*Tabelle 2*). Als Spendertiere dienten im ersten Studienabschnitt 52 C57BL/6J WT-, 13 *Nlrp3*<sup>-/-</sup>- und 13 *Casp1*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Im zweiten Studienabschnitt wurden 107 C57BL/6N WT-Mäuse als Spendertiere verwendet.

**Tabelle 2: Übersicht der Anzahl an Empfängertieren im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** Im ersten Studienabschnitt wurden 105 C57BL/6J WT-Mäuse als Empfängertiere verwendet. Im zweiten Studienabschnitt wurden 83 C57BL/6N WT-Mäuse als Empfängertiere verwendet.

Studienabschnitt 1: Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln

Bestimmung der kritischen Anzahl der zu transplantierenden Langerhans-Inseln:

| Gruppe | Anzahl der Empfänger | Transplantate            |
|--------|----------------------|--------------------------|
| 1      | n = 4                | 200 WT Langerhans-Inseln |
| 2      | n = 4                | 300 WT Langerhans-Inseln |
| 3      | n = 4                | 400 WT Langerhans-Inseln |

Hauptversuch:

| Gruppe | Anzahl der Empfänger | Transplantate                                     |
|--------|----------------------|---|
| 1      | n = 13               | gesunde, nicht-diabetische Mäuse                  |
| 2      | n = 13               | 300 WT Langerhans-Inseln                          |
| 3      | n = 13               | 300 <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln |
| 4      | n = 7                | gesunde, nicht-diabetische Mäuse                  |
| 5      | n = 7                | 300 WT + Vehikel Langerhans-Inseln                |
| 6      | n = 13               | 300 WT + CY-09 Langerhans-Inseln                  |
| 7      | n = 7                | gesunde, nicht-diabetische Mäuse                  |
| 8      | n = 7                | 300 WT Langerhans-Inseln                          |
| 9      | n = 13               | 300 <i>Casp1</i> <sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln |

Studienabschnitt 2: Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln

| Gruppe | Anzahl der Empfänger | Transplantate                     |
|--------|----------------------|-----------------------------------|
| 1      | n = 11               | gesunde, nicht-diabetische Mäuse  |
| 2      | n = 11               | 250 Langerhans-Inseln             |
| 3      | n = 11               | 20000 MVF                         |
| 4      | n = 11               | 250 Langerhans-Inseln + 20000 MVF |

|   |       |                                    |
|---|-------|------------------------------------|
| 5 | n = 9 | gesunde, nicht-diabetische Mäuse   |
| 6 | n = 6 | 500 Langerhans-Inseln              |
| 7 | n = 9 | 500 Langerhans-Inseln + 40000 MVF  |
| 8 | n = 6 | 1000 Langerhans-Inseln             |
| 9 | n = 9 | 1000 Langerhans-Inseln + 40000 MVF |

## 5.26 Immunhistochemie

Alle fixierten Gewebepräparate wurden mithilfe eines Gewebereinbettautomaten (SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland) in einer Alkoholreihe (70, 80, 90, 100 % Ethanol) entwässert und in Paraffin (Carl Roth GmbH) eingebettet, sodass 3 µm-dünne Schnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden mit Citracon-Puffer (0,05 %, pH 7,4) für 60 min im Wasserbad bei 97 °C permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen in 3 % Ziegen-Serum für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation der Gewebepräparate mit den monoklonalen Primärantikörpern (1:300) gegen Insulin (ab181547; Abcam, Cambridge, UK), Glukagon (ab10988; Abcam), Somatostatin (ab30788; Abcam), *cluster of differentiation 31* (CD31; DIA-310; Dianova, Hamburg, Deutschland), PDX-1 (ab47308; Abcam), *α-smooth muscle actin* (α-SMA; ab5694; Abcam), Myeloperoxidase (MPO; ab9535; Abcam), *cluster of differentiation 68* (CD68; ab125212; Abcam) und *cluster of differentiation 3* (CD3; ab16669; Abcam) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Schnitte mit den entsprechenden polyklonalen Sekundärantikörpern (1:100; Fluoreszenzmikroskopie: anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 555 (A-21429; Thermo Fisher Scientific), anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488 (A-11001; Thermo Fisher Scientific), anti-Rat IgG Alexa Fluor 488 (A-21434; Thermo Fisher Scientific), anti-Guinea pig IgG Alexa Fluor 488 (A-11073; Thermo Fisher Scientific); Hellfeldmikroskopie: anti-Rabbit IgG Biotin (ab64256; Abcam), Streptavidin HRP (ab64269; Abcam), *AEC substrate kit* (ab64252; Abcam)) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 für die Fluoreszenzmikroskopie und mit Hematoxylin (Sigma-Aldrich) für die Hellfeldmikroskopie angefärbt. Die Färbung der Gewebepräparate wurde mithilfe eines BX60 Fluoreszenz-Mikroskops in 200-facher Vergrößerung dokumentiert. Die Anzahl der Insulin-, Glukagon-, Somatostatin-, CD31-, PDX-1-, α-SMA-, MPO-, CD68- und CD3-positiven Zellen wurde mithilfe der FIJI-Software quantifiziert und in % aller Insel- bzw. MVF-Zellen oder als absolute Werte dargestellt.

## 5.27 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten wurde mithilfe der Prism 8-Software (GraphPad, San Diego, USA) durchgeführt. Zunächst wurden die Daten hinsichtlich ihrer Normalverteilung und Varianzgleichheit überprüft. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mittels eines ungepaarten *Student's t*-Test auf Signifikanzen überprüft, wohingegen beim Vergleich von mehr als 2 Gruppen eine *one-way analysis of variance* (ANOVA) gefolgt von einem *Tukey-Post-hoc*-Test zur Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers nach Bonferroni durchgeführt wurde. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert und entsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet. Alle Werte wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  *standard error of the mean* (SEM) angegeben.

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln

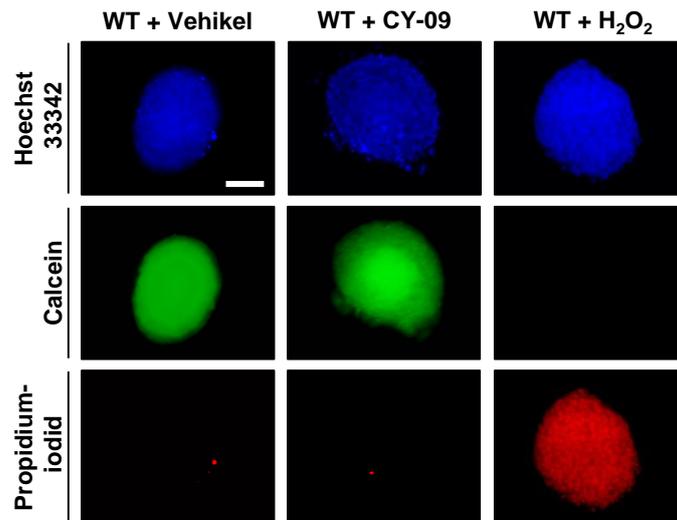
Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion transplanteder Langerhans-Inseln analysiert. Im Rahmen meiner vorangegangenen Masterarbeit wurde bereits gezeigt, dass der KO von NLRP3 weder die zelluläre Zusammensetzung noch die Viabilität isolierter Langerhans-Inseln beeinflusst [Wrublewsky, 2020]. Jedoch konnte mithilfe des Rückenhautkammer-Modells eine verbesserte Revaskularisierung transplanteder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln im Vergleich zu WT Langerhans-Inseln nachgewiesen werden [Wrublewsky, 2020].

Um diese vielversprechenden Ergebnisse gegebenenfalls im klinischen Alltag anwenden zu können, muss jedoch die Aktivität von NLRP3 in den isolierten Langerhans-Inseln pharmakologisch gehemmt werden. Daher wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit, die in der Masterarbeit durchgeführten Versuche mit dem NLRP3-Inhibitor CY-09 wiederholt. Die darauf aufbauenden Experimente wurden dann sowohl an isolierten *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln als auch an WT Langerhans-Inseln, die mit CY-09 behandelt wurden, durchgeführt. Hierbei wurde anhand von ELISA-Messungen die Insulin-Sekretion der isolierten Langerhans-Inseln nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 bestimmt. Anschließend wurde anhand von unterschiedlichen Angiogenese-Assays, qRT-PCRs und Western Blot-Analysen der zugrundeliegende regulatorische Mechanismus der erhöhten Insulin-Sekretion von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Langerhans-Inseln entschlüsselt. Abschließend wurde im diabetischen Mausmodell analysiert, ob der KO oder die Inhibition von NLRP3 die endokrine Funktion transplanteder Langerhans-Inseln verbessert.

#### 6.1.1 Viabilität isolierter Langerhans-Inseln

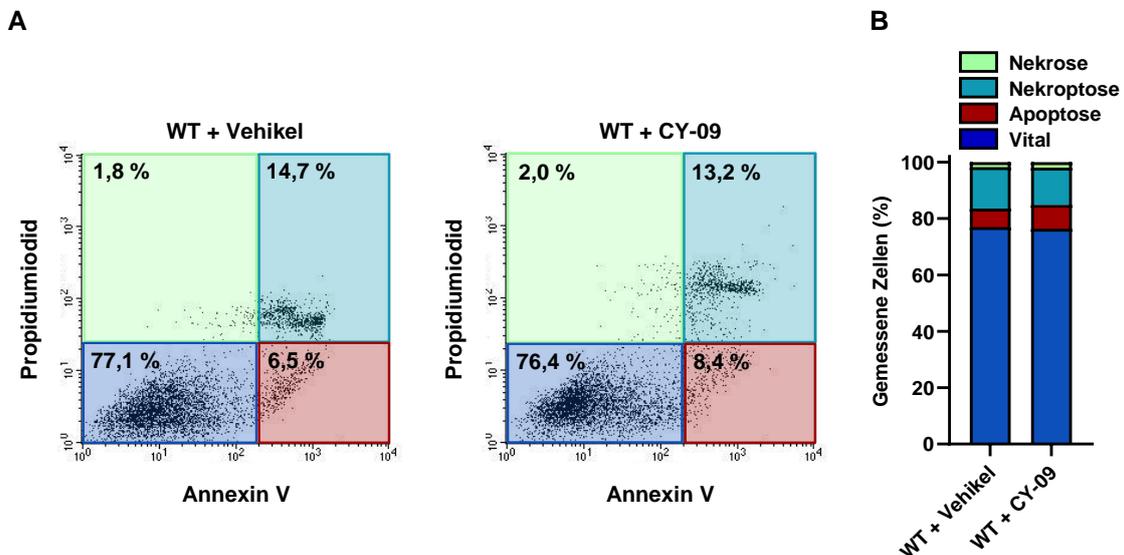
Um ausschließen zu können, dass die Inhibition von NLRP3 die zelluläre Viabilität der Langerhans-Inseln beeinflusst, wurde zunächst die Viabilität von WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln unter Verwendung zweier unterschiedlicher Methoden untersucht.

Für die Propidiumiodid- und Calcein-Färbung wurden die Zellen der WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln mit Propidiumiodid (nekrotische Zellen), Calcein (vitale Zellen) und Hoechst 33342 (Zellkerne) angefärbt (*Abbildung 11*). Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln festgestellt werden. Als Positivkontrolle dienten WT Langerhans-Inseln, die für 24 h in 0,2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kultiviert wurden. Hierbei war deutlich zu sehen, dass die Zellen innerhalb dieser Langerhans-Inseln negativ für Calcein und positiv für Propidiumiodid waren (*Abbildung 11*).



**Abbildung 11: Propidiumiodid- und Calcein-Färbung isolierter Langerhans-Inseln.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln nach Propidiumiodid (rot)- und Calcein (grün)-Färbung. WT Langerhans-Inseln, die für 24 h in 0,2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kultiviert wurden, dienten als Positivkontrolle. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert (n = 3).

Unter Verwendung einer Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung mit darauffolgender Durchflusszytometrie konnte zusätzlich die Viabilität isolierter Langerhans-Inseln auf Einzelzellniveau analysiert werden (*Abbildung 12A und B*).



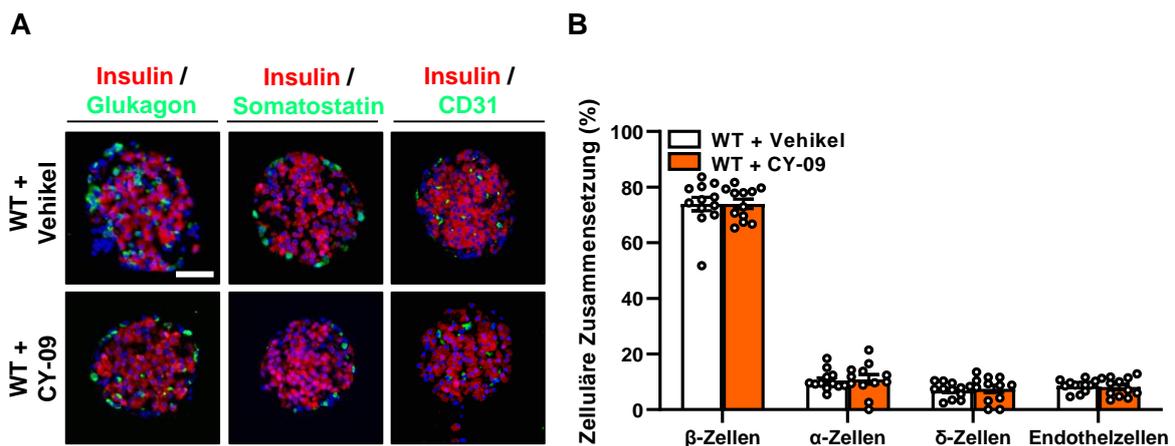
**Abbildung 12: Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung isolierter Langerhans-Inseln.** (A) Repräsentative Streudiagramme der durchflusszytometrischen Analyse von Propidiumiodid- und Annexin V-gefärbten Zellen der WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln. (B) Quantitative Analyse der Propidiumiodid- und Annexin V-gefärbten Zellen der WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln unterteilt in vitale (dunkelblau), apoptotische (rot), nekroptotische (hellblau) und nekrotische (grün) Zellen. Pro Analyse wurden 10000 Zellen gemessen und die gewonnenen Daten in % aller gemessenen Zellen dargestellt (n = 3).

Die quantitative Analyse der durchflusszytometrischen Messung wies keinen Unterschied bezüglich der Anzahl von vitalen, apoptotischen, nekroptotischen und nekrotischen Zellen innerhalb der WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln auf (*Abbildung 12B*). Somit

wurde mit beiden Viabilitätsanalysen bestätigt, dass die Inhibition von NLRP3 die zelluläre Viabilität isolierter Langerhans-Inseln nicht beeinträchtigt.

### 6.1.2 Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln

Um untersuchen zu können, ob sich die Inhibition von NLRP3 in Langerhans-Inseln auf deren zelluläre Zusammensetzung auswirkt, wurden isolierte WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln in eine HepatoQuick®-Matrix eingebettet, geschnitten und Insulin-, Glukagon-, Somatostatin- und CD31-exprimierende Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln mittels immunhistochemischer Färbungen visualisiert (*Abbildung 13A*). Die quantitativen Analysen zeigten, dass sich der Anteil der endokrinen Insulin-positiven  $\beta$ -Zellen, Glukagon-positiven  $\alpha$ -Zellen und Somatostatin-positiven  $\delta$ -Zellen innerhalb der WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln nicht unterschied (*Abbildung 13B*). Ebenfalls konnte kein Unterschied in der Anzahl der CD31-positiven Endothelzellen zwischen den Gruppen detektiert werden (*Abbildung 13B*).



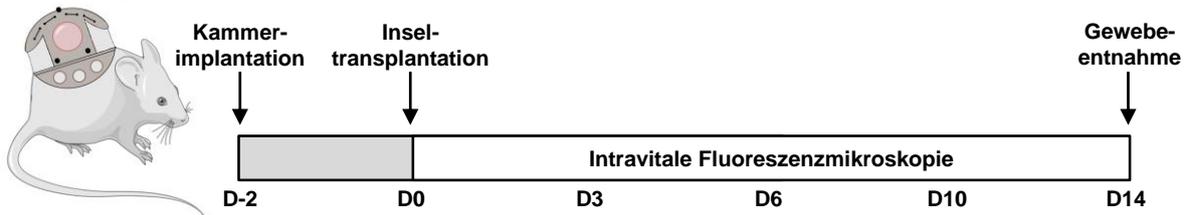
**Abbildung 13: Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln.** (A) Repräsentative, immunhistochemische Färbungen von Insulin / Glukagon, Insulin / Somatostatin und Insulin / CD31 isolierter WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 75  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse des Anteils der Insulin- ( $\beta$ -Zellen), Glukagon- ( $\alpha$ -Zellen), Somatostatin- ( $\delta$ -Zellen) und CD31- (Endothelzellen) positiven Zellen in WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln. Die gewonnenen Daten sind in % aller Inselzellen dargestellt (n = 12). MW  $\pm$  SEM.

### 6.1.3 Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln

Die Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln wurde unter Verwendung des Rückenhautkammer-Modells in Kombination mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierfür wurde dem Empfängertier zwei Tage vor der Transplantation der Langerhans-Inseln die Rückenhautkammer implantiert. An Tag 0 wurden 8 Langerhans-Inseln auf die quergestreifte Hautmuskulatur der Rückenhautkammerpräparation transplantiert. Die Analyse der Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln erfolgte repetitiv an den

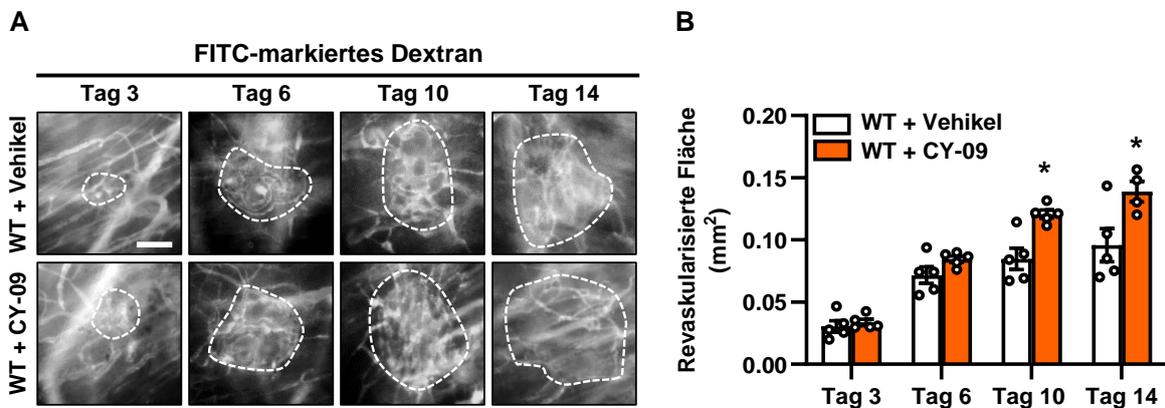
Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie. Nach der letzten Intravitalkroskopie an Tag 14 wurde das Rückenhautkammerngewebe mit den Transplantaten für weitere immunhistochemische Analysen entnommen (*Abbildung 14*).

**Rückenhautkammer-Modell**



**Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Analyse der Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln im Rückenhautkammer-Modell.** Die Rückenhautkammer wurde dem Empfängertier an Tag -2 (D-2) implantiert. Am Tag 0 (D0) folgte die Transplantation der WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Langerhans-Inseln erfolgte an D0 sowie an den Tagen 3 (D3), 6 (D6), 10 (D10) und 14 (D14). Nach der letzten mikroskopischen Aufnahme an D14 wurde das Rückenhautgewebe für immunhistochemische Analysen entnommen. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

Durch die i.v. Injektion des Plasmamarkers FITC-markiertes Dextran konnte sowohl die Revaskularisierung als auch die Mikrozirkulation der transplantierten Langerhans-Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 visualisiert und analysiert werden (*Abbildung 15A*).

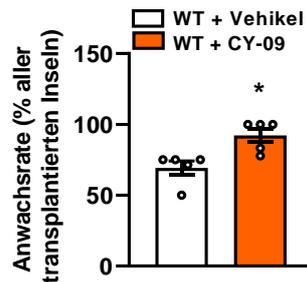


**Abbildung 15: Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln.** (A) Repräsentative, intravitalkroskopische Aufnahmen der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln (umrandet mit gestrichelten weißen Linien: neu gebildetes Gefäßnetzwerk) an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach deren Transplantation auf die quergestreifte Hautmuskulatur der Rückenhautkammerpräparation. FITC-markiertes Dextran wurde für die Visualisierung der Blutgefäße verwendet. Maßstab: 150 µm. (B) Quantitative Analyse der revaskularisierten Fläche (mm<sup>2</sup>) der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 (n = 5 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel.

In beiden Gruppen konnten bereits an Tag 3 nach Transplantation typische Merkmale der Angiogenese, wie das Aussprossen erster Mikrogefäße, im Bereich der transplantierten Langerhans-Inseln nachgewiesen werden. Diese unregelmäßigen Gefäßstrukturen bilden sich vor allem aus Kapillaren und Venolen des Empfänger-Gefäßnetzwerkes aus und wachsen im Laufe der folgenden Tage in die Transplantate ein, wodurch sich ein kompaktes Gefäßnetzwerk innerhalb und um die transplantierten Langerhans-Inseln entwickelt

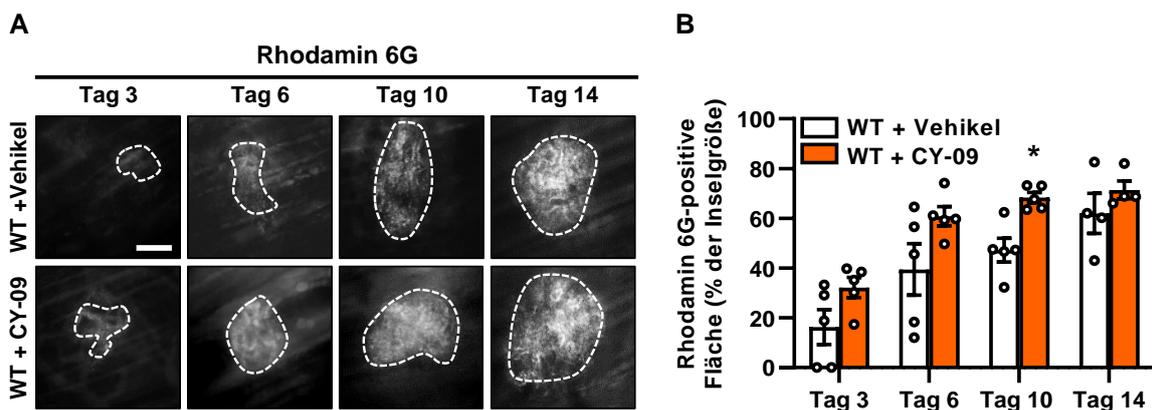
(Abbildung 15A). Die revaskularisierte Fläche nahm von Tag 3 bis Tag 14 nach der Transplantation der Langerhans-Inseln kontinuierlich zu. Interessanterweise war an den Tagen 10 und 14 die revaskularisierte Fläche der transplantierten WT + CY-09 Langerhans-Inseln signifikant größer im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (Abbildung 15B).

Die Anwachsrate der transplantierten Langerhans-Inseln wurde an Tag 14 bestimmt und stellt den prozentualen Anteil der angewachsenen Transplantate im Verhältnis zur initialen Anzahl transplantierte Langerhans-Inseln pro Empfängertier dar. Mit  $92,2 \pm 4,8 \%$  wies die WT + CY-09 Gruppe eine signifikant verbesserte Anwachsrate im Vergleich zu ihrer entsprechenden Kontrolle (WT + Vehikel:  $69,3 \pm 4,9 \%$ ) auf (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Anwachsrate der Langerhans-Inseln an Tag 14 nach Transplantation.** Anwachsrate der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln (n = 5 Tiere pro Gruppe). Dargestellt ist der Anteil (%) der angewachsenen Langerhans-Inseln an Tag 14 im Verhältnis zu allen transplantierten Langerhans-Inseln an Tag 0. MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel.

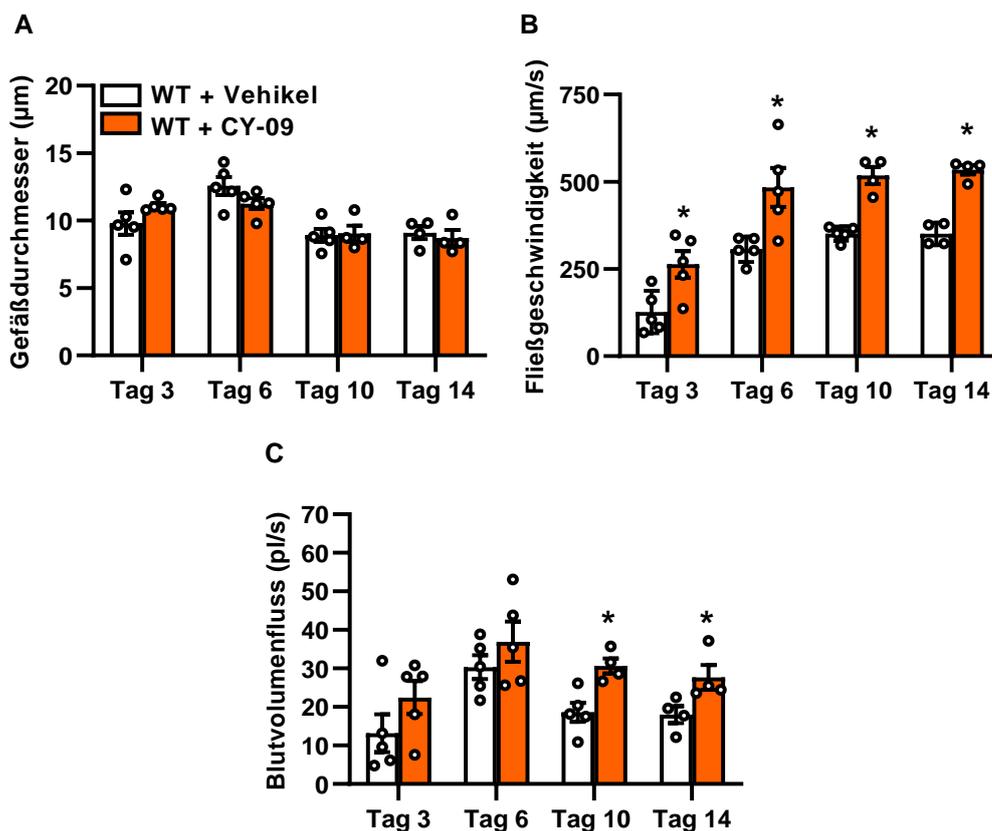
Durch die i.v. Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 6G konnte die Fenestrierung des Endothels der transplantierten Langerhans-Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 visualisiert und analysiert werden (Abbildung 17A).



**Abbildung 17: Fenestrierung des Endothels transplantierte Langerhans-Inseln.** (A) Repräsentative, intravitalmikroskopische Aufnahmen der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln (umrandet mit gestrichelten weißen Linien: endokrine Revaskularisierung) an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach deren Transplantation auf die quergestreifte Hautmuskulatur der Rückenhautkammerpräparation. Rhodamin 6G wurde für die Visualisierung des fenestrierten Endothels (helle Signale) verwendet. Maßstab: 150 µm. (B) Quantitative Analyse der Rhodamin 6G-positiven Fläche (% der Inselgröße) der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 (n = 5 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel.

Das Endothel der Langerhans-Inseln ist aufgrund ihrer hohen Sekretionsleistung stark fenestriert, sodass Rhodamin 6G aufgrund seines geringen Molekulargewichts das neu gebildete, fenestrierte Endothel der transplantierten Langerhans-Inseln passiert und anschließend in den Mitochondrien der umliegenden endokrinen Zellen akkumuliert [Kolka & Bergman, 2012; Olsson & Carlsson, 2006; Zanone *et al.*, 2008]. Somit kann anhand der Rhodamin 6G-positiven Fläche die Fenestrierung des Endothels bzw. die endokrine Revaskularisierung transplantiert Langerhans-Inseln beurteilt werden [Vajkoczy *et al.*, 1995]. Die Analyse der Rhodamin 6G-positiven Fläche zeigte, dass die WT + CY-09 Langerhans-Inseln eine signifikant höhere endokrine Revaskularisierung an Tag 10 im Vergleich zur Kontrolle besitzen (Abbildung 17B). Dies lässt auf eine verstärkte Fenestrierung des Endothels innerhalb der WT + CY-09 Langerhans-Inseln schließen.

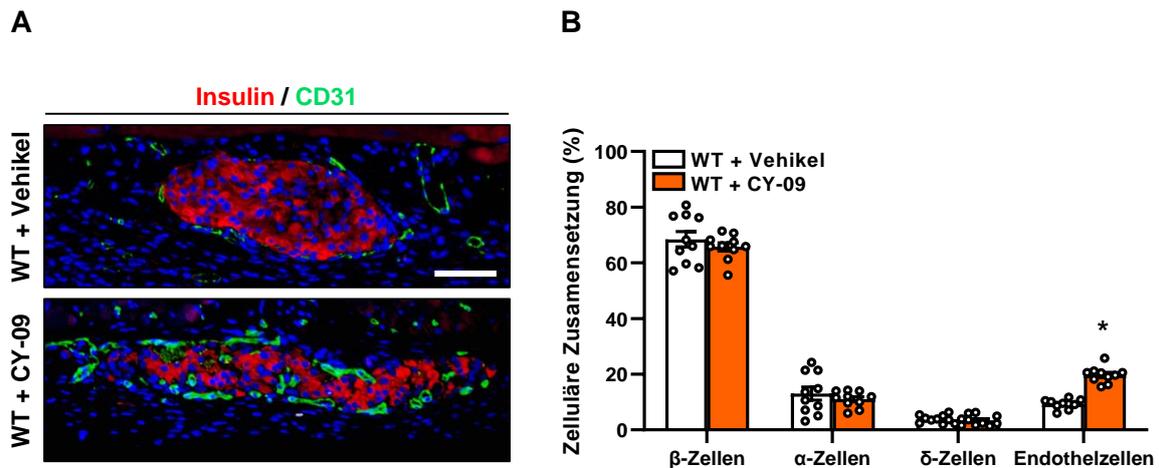
Die zusätzliche Messung mikrohämodynamischer Parameter zeigte, dass die Inhibition von NLRP3 den Durchmesser der Blutgefäße innerhalb der transplantierten Langerhans-Inseln nicht beeinflusst (Abbildung 18A).



**Abbildung 18: Mikrohämodynamische Parameter transplantiert Langerhans-Inseln.** (A) Quantitative Analyse des Gefäßdurchmessers (µm) innerhalb der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 (n = 5 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. (B) Quantitative Analyse der Fließgeschwindigkeit (µm/s) der Mikrogefäße innerhalb der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 (n = 5 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel. (C) Quantitative Analyse des Blutvolumenflusses (pl/s) der Mikrogefäße innerhalb der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 (n = 5 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel.

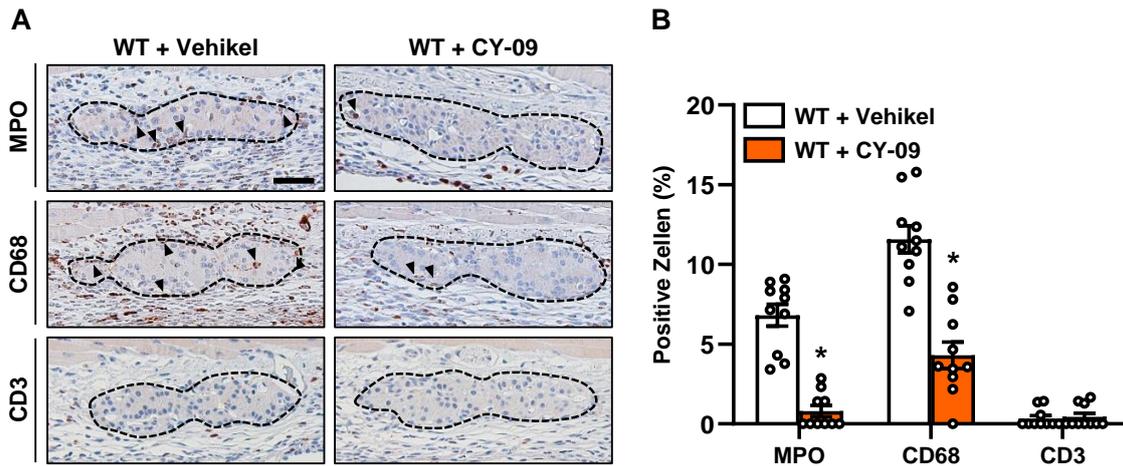
Allerdings war die Fließgeschwindigkeit innerhalb der Mikrogefäße von transplantierten WT + CY-09 Langerhans-Inseln im Vergleich zur Kontrolle über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant erhöht (*Abbildung 18B*). Zudem war eine signifikante Erhöhung des Blutvolumenflusses der transplantierten WT + CY-09 Langerhans-Inseln an den Tagen 10 und 14 zu beobachten (*Abbildung 18C*). Die Zunahme der Fließgeschwindigkeit und des Blutvolumenflusses nach Inhibition von NLRP3 lässt sich durch die generell beschleunigte Revaskularisierung erklären, da die WT + CY-09 Transplantate im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen früher ein besser entwickeltes Gefäßnetzwerk ausbildeten.

Um die zelluläre Zusammensetzung der transplantierten Langerhans-Inseln an Tag 14 zu charakterisieren, wurde das Rückenhautkammerngewebe entnommen und die Expression von Insulin, Glukagon, Somatostatin und CD31 immunhistochemisch untersucht (*Abbildung 19A und B*). Hierbei konnten keine Unterschiede in der Anzahl der endokrinen  $\beta$ -,  $\alpha$ - und  $\delta$ -Zellen innerhalb der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln festgestellt werden (*Abbildung 19B*). Allerdings führte die Inhibition von NLRP3 im Vergleich zu der Kontrolle zu einem signifikant höheren Anteil an CD31-positiven Endothelzellen innerhalb der Transplantate (*Abbildung 19B*).



**Abbildung 19: Zelluläre Zusammensetzung transplantiertier Langerhans-Inseln.** (A) Repräsentative, immunhistochemische Färbungen von Insulin / CD31 der transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an Tag 14. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 75  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der Insulin- ( $\beta$ -Zellen), Glukagon- ( $\alpha$ -Zellen), Somatostatin- ( $\delta$ -Zellen) und CD31- (Endothelzellen) positiven Zellen in WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an Tag 14. Die gewonnenen Daten sind in % aller Inselzellen dargestellt (n = 10). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel.

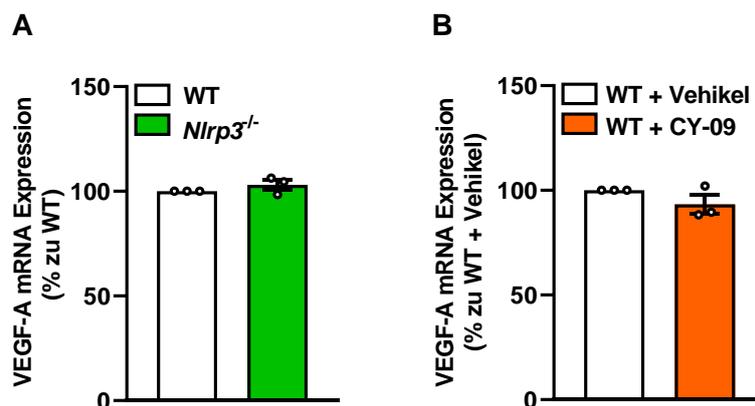
Mithilfe zusätzlicher immunhistochemischer Färbungen von MPO, CD68 und CD3 wurde die Infiltration von Immunzellen in die transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an Tag 14 analysiert (*Abbildung 20A*). Hierbei konnten einige MPO-positive neutrophile Granulozyten und CD68-positive Makrophagen, jedoch kaum CD3-positive Lymphozyten detektiert werden (*Abbildung 20A und B*). Interessanterweise führte die Inhibition von NLRP3 zu einer signifikanten Verringerung der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (*Abbildung 20B*).



**Abbildung 20: Infiltration von Immunzellen in transplantierte Langerhans-Inseln.** (A) Repräsentative, immunhistochemische Färbungen von MPO-, CD68- und CD3-positiven Zellen (Pfeilspitzen) des Rückenhautkammerngewebes mit den transplantierten WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln (umrandet mit gestrichelten schwarzen Linien) an Tag 14. Die Zellkerne wurden mit Hematoxylin (blau) visualisiert. Maßstab: 75 µm. (B) Quantitative Analyse der MPO-, CD68- und CD3-positiven Zellen in WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln an Tag 14. Die gewonnenen Daten sind in % aller Inselzellen dargestellt (n = 10). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel.

#### 6.1.4 VEGF-A messenger ribonucleic acid (mRNA) Expression isolierter Langerhans-Inseln

VEGF-A wird in den β-Zellen der Langerhans-Inseln exprimiert und stellt einen essentiellen Faktor bei der Entwicklung und dem Erhalt der Vaskularisierung von Langerhans-Inseln dar [Watada, 2010; Reinert *et al.*, 2013; Staels *et al.*, 2019]. Außerdem wird vermutet, dass sich NLRP3 und VEGF-A gegenseitig regulieren können [Marneros, 2016; Shah *et al.*, 2022]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die VEGF-A mRNA Expression in WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln untersucht (Abbildung 21A und B).



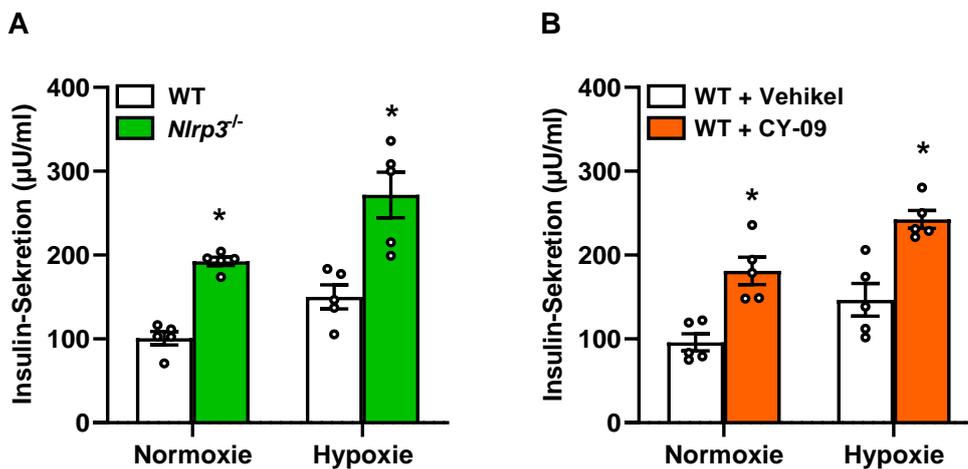
**Abbildung 21: VEGF-A mRNA Expression isolierter Langerhans-Inseln.** (A und B) Quantitative Analyse der VEGF-A mRNA Expression in hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln (A) sowie in WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln (B). Die gewonnenen Daten wurden auf WT oder WT + Vehikel normiert und sind in % dargestellt (n = 3). MW ± SEM.

Um die nachfolgenden *Ex-vivo*-Ergebnisse mit den vorangegangenen *In-vivo*-Ergebnissen, bei welchen die Langerhans-Inseln in der initialen post-Transplantationsphase einer Ischämie

ausgesetzt waren, verglichen zu können, wurden die Langerhans-Inseln für 16 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Allerdings zeigten die qRT-PCR-Analysen der VEGF-A mRNA keinen signifikanten Unterschied zwischen der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT + CY-09 Gruppe im Vergleich zu ihren entsprechenden Kontrollen (Abbildung 21A und B). Somit kann die verbesserte Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 nicht auf die pro-angiogene Wirkung von VEGF-A zurückgeführt werden.

### 6.1.5 Insulin-Sekretion isolierter Langerhans-Inseln

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 die Insulin-Sekretion von isolierten Langerhans-Inseln unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen beeinträchtigt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl der Verlust als auch die Inhibition von NLRP3 die Insulin-Sekretion der Langerhans-Inseln nach normoxischer und hypoxischer Kultivierung signifikant verbessert (Abbildung 22A und B).

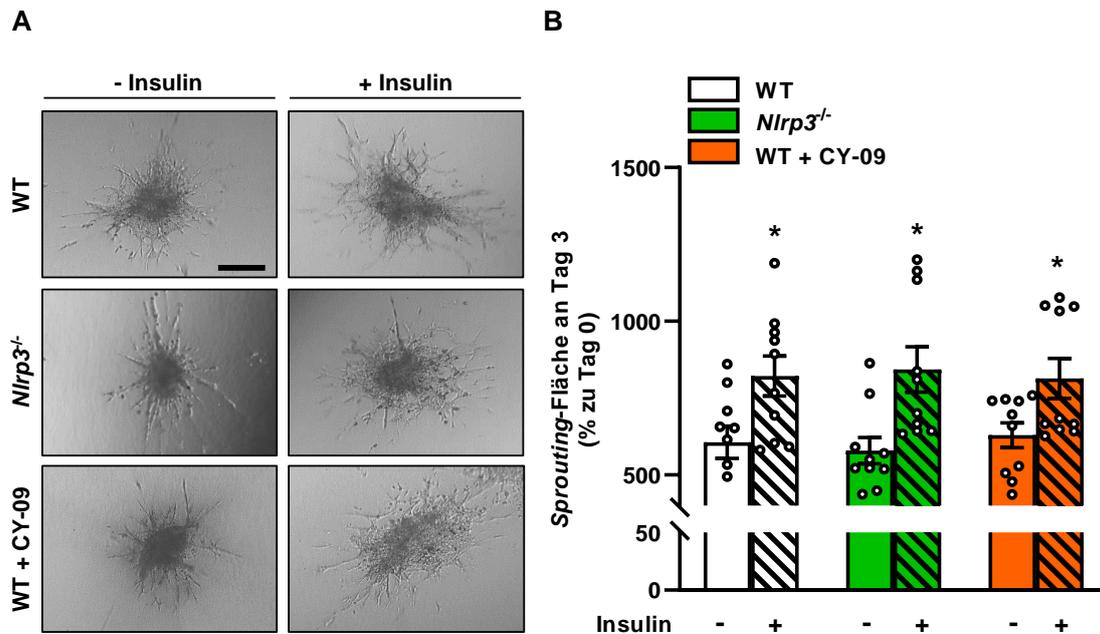


**Abbildung 22: Insulin-Sekretion isolierter Langerhans-Inseln.** (A und B) Quantitative Analyse der Insulin-Sekretion in WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln (A) sowie in WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln (B) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und in µU/ml dargestellt (n = 5). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT Normoxie, WT Hypoxie, WT + Vehikel Normoxie oder WT + Vehikel Hypoxie.

### 6.1.6 Insulin-induzierte angiogene Aktivität von Endothelzellen

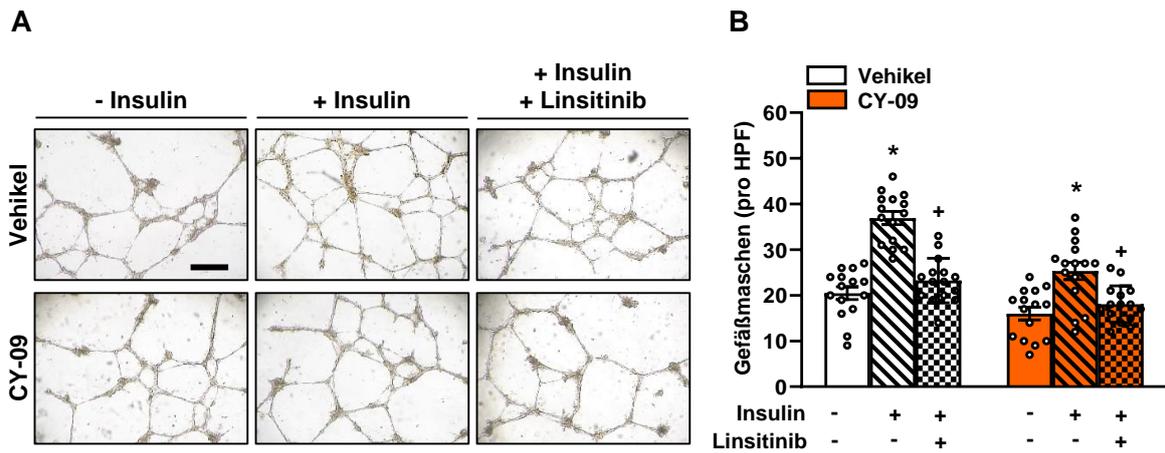
Insulin stimuliert über die Bindung an den IR und IGF-1R angiogene Signalwege von Endothelzellen und fördert somit über die Proliferation der Endothelzellen die Angiogenese [Straus, 1981; Shrader *et al.*, 2009]. In Kapitel 6.1.5 wurde bereits eine signifikant erhöhte Insulin-Sekretion isolierter *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Langerhans-Inseln detektiert, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit hypothetisiert wurde, dass die verbesserte Insulin-Sekretion und nicht die verringerte Aktivität von NLRP3 in den Endothelzellen der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT + CY-09 Langerhans-Inseln die Revaskularisierung der Transplantate stimuliert. Um dies zu klären, wurden unterschiedliche *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Angiogenese-Assays durchgeführt.

Für den *Sprouting*-Assay wurden WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 MVF-Sphäroide in eine Kollagen-Matrix eingebettet und über 3 Tage ohne oder mit Insulin kultiviert (Abbildung 23A). Wie erwartet, zeigte die Quantifizierung der *Sprouting*-Fläche, dass weder der Verlust noch die Inhibition von NLRP3 einen Effekt auf das Aussprossen der Endothelzellen hat. Allerdings vergrößerte sich die *Sprouting*-Fläche der WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 MVF-Sphäroide durch die Behandlung von Insulin signifikant (Abbildung 23B).



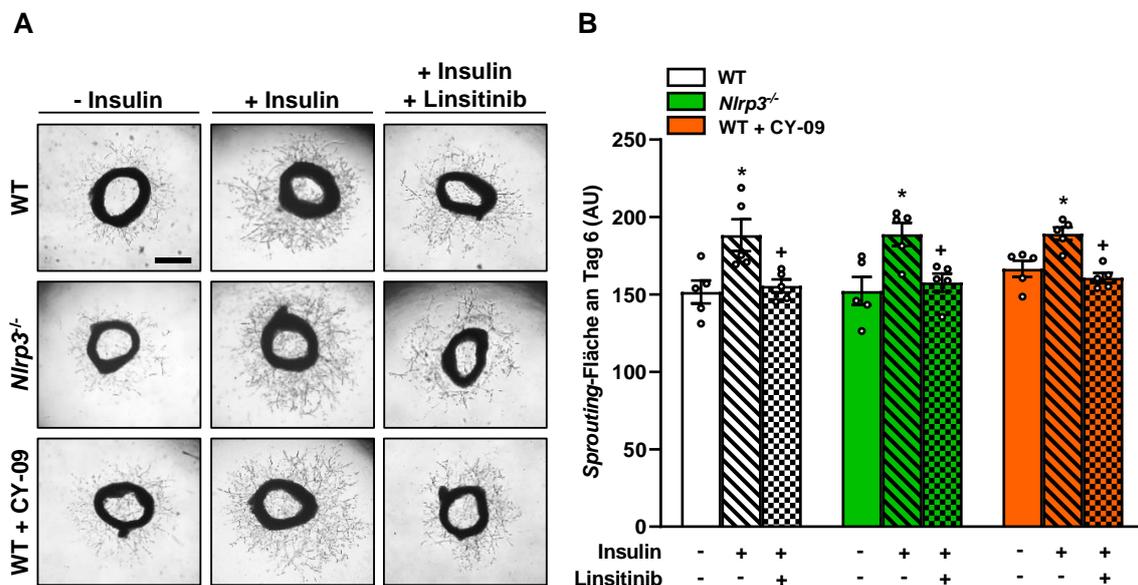
**Abbildung 23: *Sprouting*-Assay von MVF-Sphäroiden in Abhängigkeit von Insulin.** (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahmen der WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 MVF-Sphäroide an Tag 3 des *Sprouting*-Assays, die ohne oder mit Insulin behandelt wurden. Die *Sprouting*-Fläche wurde an Tag 3 analysiert. Maßstab: 250 µm. (B) Quantitative Analyse der *Sprouting*-Fläche von WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 MVF-Sphäroiden an Tag 3. Die gewonnenen Daten sind in % zu der initialen Größe an Tag 0 dargestellt (n = 10). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT - Insulin, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> - Insulin oder WT + CY-09 - Insulin.

In einem darauffolgenden Angiogenese-Assay, dem *Tube formation*-Assay, wurden HUVEC auf Matrigel ausgesät und für 24 h in Kombinationen aus DMSO (Vehikel), CY-09, Insulin und Linsitinib, einem IR- und IGF-1R-Inhibitor, behandelt (Abbildung 24A). Anschließend wurde die Anzahl gefäßähnlicher Strukturen (Gefäßmaschen) analysiert. Hierbei konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen der Vehikel und CY-09 Gruppe festgestellt werden. Allerdings konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des *Sprouting*-Assays gezeigt werden, dass Insulin die Formation der Gefäßmaschen signifikant steigert, wohingegen die zusätzliche Inhibition von IR und IGF-1R mit Linsitinib die pro-angiogene Wirkung von Insulin aufhebt (Abbildung 24B).



**Abbildung 24: Tube formation-Assay mit HUVEC.** (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahmen von HUVEC im *Tube formation*-Assay, die mit unterschiedlichen Kombinationen von DMSO (Vehikel), CY-09, Insulin und Linsitinib behandelt wurden. Die Bildung gefäßähnlicher Strukturen (Gefäßmaschen) wurde nach 24 h analysiert. Maßstab: 400 µm. (B) Quantitative Analyse der Anzahl an Gefäßmaschen pro HPF nach 24 h (n = 15). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. Vehikel - Insulin oder CY-09 - Insulin; +P < 0,05 vs. Vehikel + Insulin oder CY-09 + Insulin.

Zur Validierung der vorangegangenen Ergebnisse, wurde der pro-angiogene Effekt von Insulin in einem *Aortic ring*-Assay untersucht. Hierfür wurden Aorten-Ringe von WT- und *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Mäusen in Matrigel eingebettet und mit Medium überschichtet, welches mit CY-09, Insulin oder Linsitinib versetzt war (Abbildung 25A).



**Abbildung 25: Aortic ring-Assay.** (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahmen der WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Aorten-Ringe an Tag 6 des *Aortic ring*-Assays, die mit CY-09, Insulin oder Linsitinib behandelt wurden. Die *Sprouting*-Fläche wurde an Tag 6 analysiert. Maßstab: 500 µm. (B) Quantitative Analyse der *Sprouting*-Fläche der WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Aorten-Ringe an Tag 6. Die gewonnenen Daten sind als *arbitrary units* (AU) dargestellt (n = 5). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT - Insulin, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> - Insulin oder WT + CY-09 - Insulin; +P < 0,05 vs. WT + Insulin, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> + Insulin oder WT + CY-09 + Insulin.

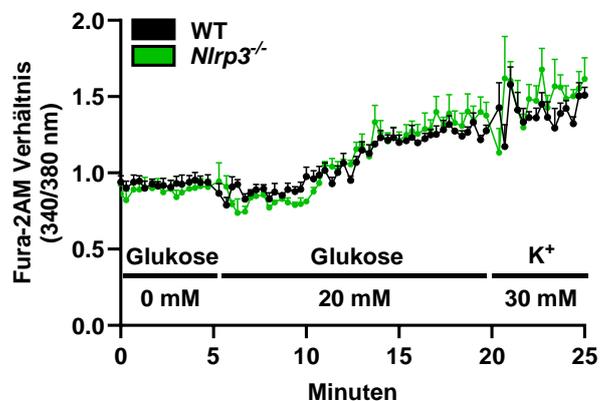
Das Aussprossen der vaskulären Zellen wurde an Tag 6 analysiert. Einhergehend mit dem *Sprouting*- und *Tube formation*-Assay steigerte die Insulin-Behandlung das Aussprossen der Zellen aus den Aorten-Ringen signifikant (Abbildung 25B). Die *Sprouting*-Fläche der Aorten-

Ringe, die sowohl mit Insulin als auch mit Linsitinib behandelt wurden, war vergleichbar mit der *Sprouting*-Fläche un behandelter Aorten-Ringe (*Abbildung 25B*).

Zusammenfassend konnte mit den hier durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 in vaskulären Zellen keinen Einfluss auf die Angiogenese hat. Somit unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die erhöhte Insulin-Sekretion aufgrund der verringerten Aktivität von NLRP3 die Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln verbessert.

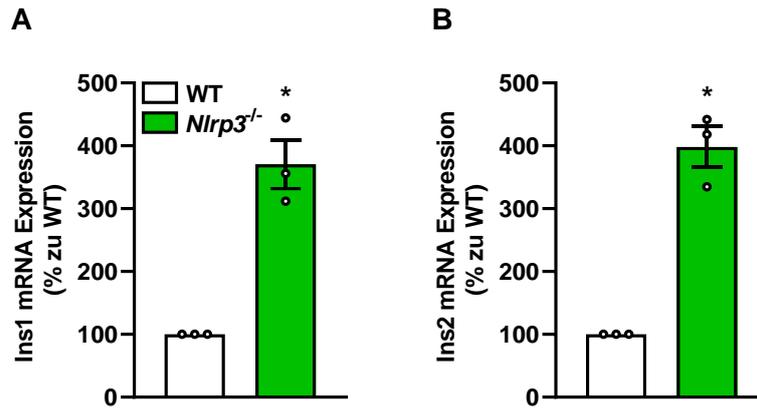
### 6.1.7 $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und Insulin-Genexpression isolierter Langerhans-Inseln

Die gesteigerte Insulin-Sekretion nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 könnte durch einen erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursacht werden [Cho *et al.*, 2022; Pretorius & Huang, 2022]. Für die Analyse des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms wurden isolierte WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln für 16 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Basislinie wurde der Einstrom zuerst ohne Glukose gemessen. Anschließend wurde der Glukose-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen nicht unterscheiden (*Abbildung 26*).



**Abbildung 26:  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase isolierter Langerhans-Inseln.** Dynamische Messung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln. Die Langerhans-Inseln wurden mit Fura-2AM beladen und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Bestimmung der Basislinie für 5 min ohne Glukose gemessen. Anschließend folgte eine 15-minütige Messung mit 20 mM Glukose und für die vollständige Depolarisation eine 5-minütige Messung mit 30 mM  $\text{K}^+$  ( $n = 3$ ). MW  $\pm$  SEM.

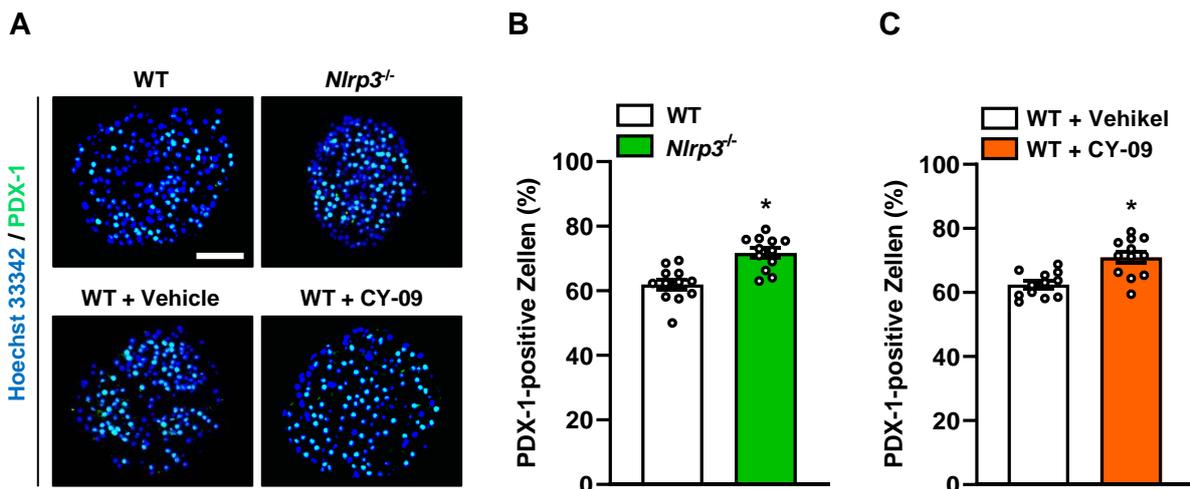
Da NLRP3 keinen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase hat, wurde im Folgenden die mRNA Expression der Gene *Ins1* und *Ins2* in hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln untersucht. Interessanterweise führte der Verlust von NLRP3 zu einer signifikant erhöhten mRNA Expression beider Gene (*Abbildung 27A und B*).



**Abbildung 27: Ins1 und Ins2 mRNA Expression isolierter Langerhans-Inseln.** (A und B) Quantitative Analyse der Ins1 (A) und Ins2 (B) mRNA Expression in hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln. Die gewonnenen Daten wurden auf WT normiert und sind in % dargestellt (n = 3). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT.

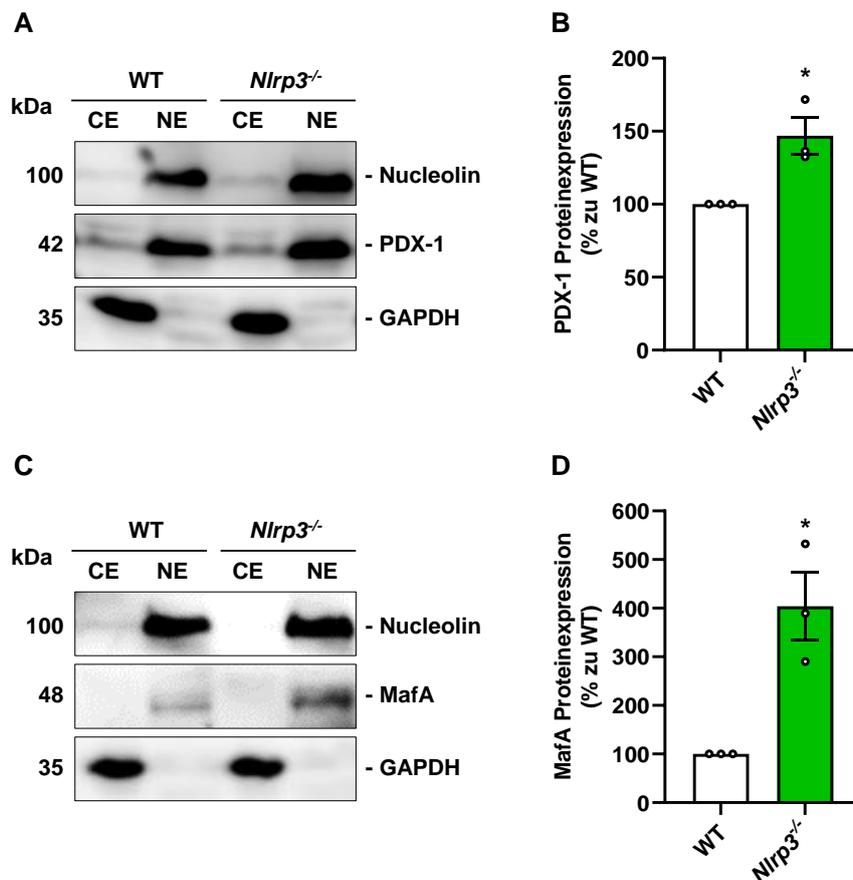
### 6.1.8 Regulatorischer Mechanismus der erhöhten Insulin-Genexpression

Um den zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismus der erhöhten Genexpression von Insulin zu entschlüsseln, wurde die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und MafA, den beiden wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Insulin-Genexpression, untersucht. Für eine immunhistochemische Analyse von PDX-1 wurden hypoxische WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln in eine HepatoQuick®-Matrix eingebettet, geschnitten und die PDX-1-exprimierenden Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln visualisiert (*Abbildung 28A*). Die quantitativen Analysen zeigten eine signifikant höhere Anzahl von PDX-1-positiven Zellkernen der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Langerhans-Inseln im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (*Abbildung 28B und C*).



**Abbildung 28: Nukleäre Expression von PDX-1 in isolierten Langerhans-Inseln.** (A) Repräsentative, immunhistochemische Färbungen von PDX-1 in hypoxischen WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 75 µm. (B und C) Quantitative Analyse der PDX-1-positiven Zellen in WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln (B) sowie in WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln (C). Die gewonnenen Daten sind in % aller Inselzellen dargestellt (n = 12). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT oder WT + Vehikel.

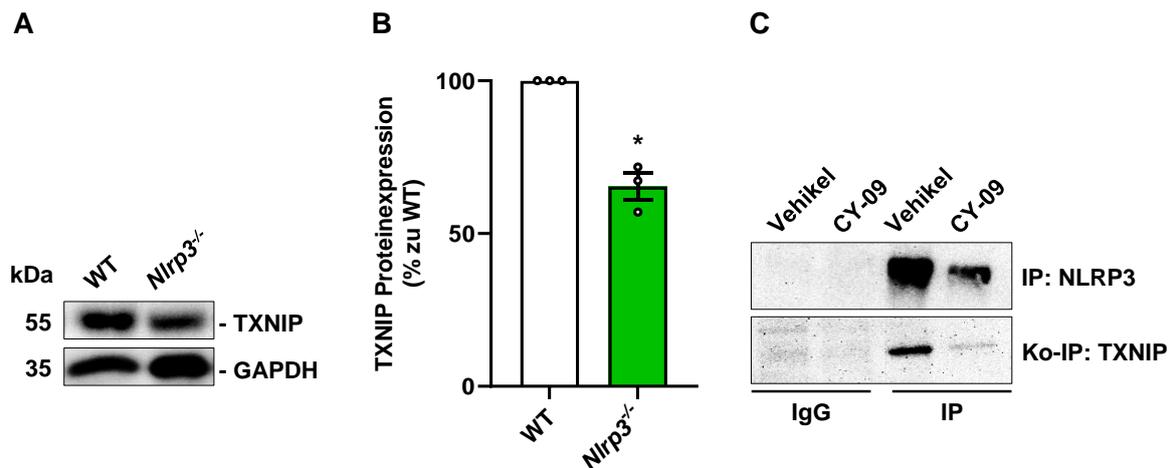
Zudem wurden zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte von hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln generiert, um die subzelluläre Lokalisation von PDX-1 und MafA mithilfe von Western Blot-Analysen detektieren zu können. Wie erwartet, steigerte der Verlust von NLRP3 den Transport beider Transkriptionsfaktoren in den Zellkern (Abbildung 29A und C). Hierbei war die Proteinexpression von PDX-1 bzw. MafA in den *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln auf  $146,8 \pm 10,2$  % bzw.  $403,8 \pm 57,3$  % im Vergleich zu WT Langerhans-Inseln ( $100,0 \pm 0,0$  %) signifikant erhöht (Abbildung 29B und D). Somit könnte die erhöhte Expression beider Transkriptionsfaktoren für die gesteigerte Expression und folglich auch Sekretion von Insulin nach Verlust von NLRP3 verantwortlich sein.



**Abbildung 29: Proteinexpression von PDX-1 und MafA in isolierten Langerhans-Inseln.** (A) Zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte von hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln wurden mittels Western Blot analysiert und die Expression von Nucleolin (100 kDa), PDX-1 (42 kDa) und GAPDH (35 kDa) unter Verwendung spezifischer Antikörper gemessen. (B) Quantitative Analyse der nukleären PDX-1-Expression von (A) normiert auf Nucleolin. Die gewonnenen Daten sind in % dargestellt (n = 3). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. WT. (C) Zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte von hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln wurden mittels Western Blot analysiert und die Expression von Nucleolin (100 kDa), MafA (48 kDa) und GAPDH (35 kDa) unter Verwendung spezifischer Antikörper gemessen. (D) Quantitative Analyse der nukleären MafA-Expression von (C) normiert auf Nucleolin. Die gewonnenen Daten sind in % dargestellt (n = 3). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. WT.

Das NLRP3-Inflammasom interagiert mit dem Redox-Regulator TXNIP, welcher wiederum die MafA-abhängige Insulin-Expression hemmt [Zhou *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013]. Daher wurde als nächstes die Expression von TXNIP in hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln

analysiert (Abbildung 30A). Die Quantifizierung der Western Blots zeigte eine signifikante Reduktion von TXNIP nach Verlust von NLRP3 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 30B). Mithilfe zusätzlicher Ko-Immunpräzipitations-Analysen von hypoxischen MIN6-Zellen, die mit DMSO (Vehikel) oder CY-09 behandelt wurden, konnte festgestellt werden, dass die Inhibition von NLRP3 die Interaktion von TXNIP und NLRP3 deutlich verringert (Abbildung 30C). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die pharmakologische NLRP3-Inhibition zu einer reduzierten Expression von NLRP3 führt und somit weniger TXNIP gebunden werden kann [Matsuoka *et al.*, 2020].

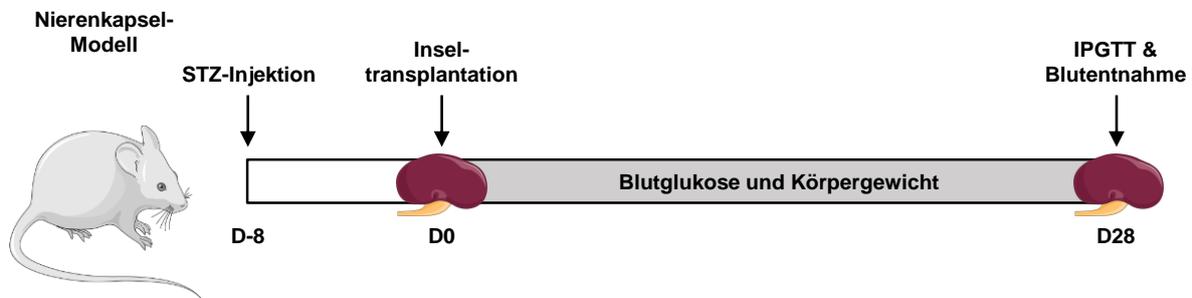


**Abbildung 30: Proteinexpression von TXNIP in isolierten Langerhans-Inseln und MIN6-Zellen.** (A) Proteinextrakte von hypoxischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln wurden mittels Western Blot analysiert und die Expression von TXNIP (55 kDa) und GAPDH (35 kDa) unter Verwendung spezifischer Antikörper gemessen. (B) Quantitative Analyse der TXNIP-Expression von (A) normiert auf GAPDH. Die gewonnenen Daten sind in % dargestellt (n = 3). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT. (C) Repräsentativer Western Blot der Ko-Immunpräzipitations-Analyse. MIN6-Zellen wurden mit DMSO (Vehikel) und CY-09 behandelt und unter hypoxischen Bedingungen für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgten eine Immunpräzipitation (IP) von NLRP3 und eine Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) von TXNIP. Die Ko-Immunpräzipitation mit IgG Antikörpern diente als Negativkontrolle.

### 6.1.9 Endokrine Funktion transplanteder Langerhans-Inseln

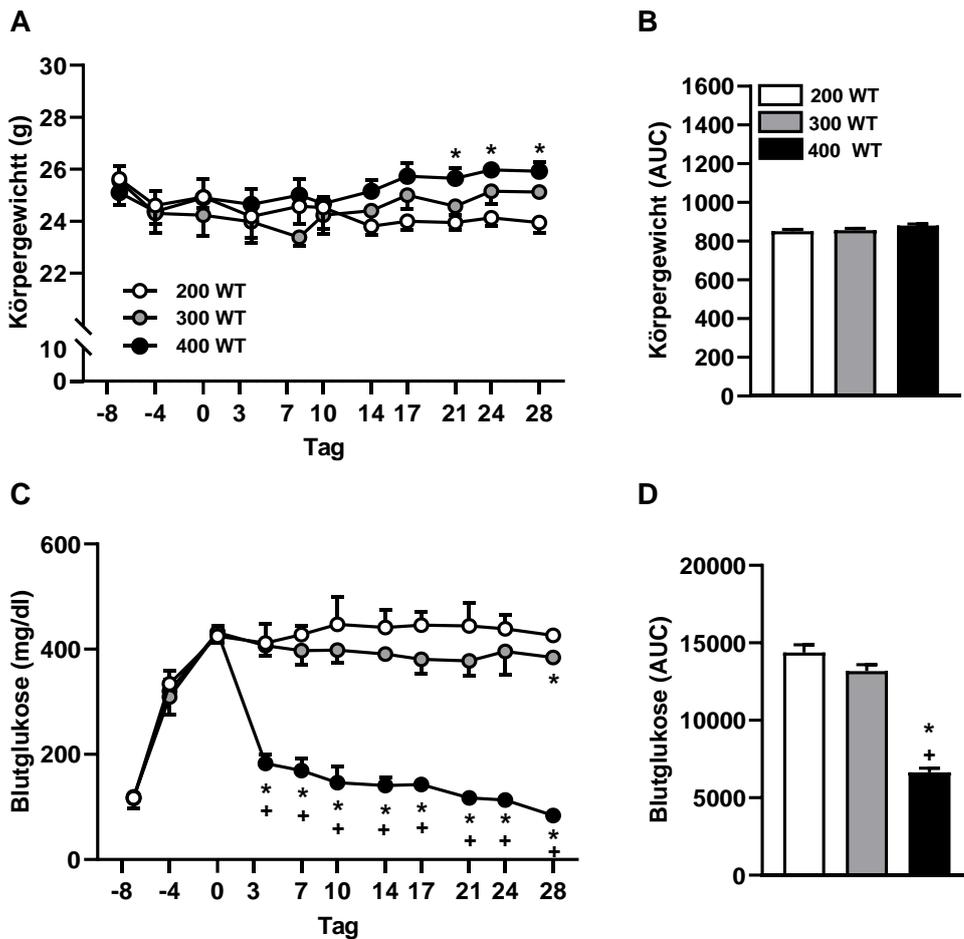
Die vorherigen Experimente zeigten, dass der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 sowohl die endokrine Funktion isolierter Langerhans-Inseln *in vitro* als auch die Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln *in vivo* signifikant verbessert. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 in transplanteden Langerhans-Inseln auch die Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel (80 bis 200 mg/dl) von diabetischen Mäusen beschleunigen kann. Hierzu wurde die endokrine Funktion transplanteder Langerhans-Inseln unter Verwendung des STZ-induzierten diabetischen Mausmodells analysiert. Acht Tage vor der Transplantation der Langerhans-Inseln wurde durch eine einmalige Injektion des Glukoseanalogons STZ ein T1D-Phänotyp bei den Empfängertieren induziert. An Tag 0 wurden den Empfängertieren mit einem Blutglukosespiegel von 350 bis 450 mg/dl die Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel

transplantiert und die Blutglukosespiegel sowie das Körpergewicht 2-mal wöchentlich bestimmt. An Tag 28 wurde ein IPGTT durchgeführt und bei zusätzlichen Empfängertieren 15 min nach Glukose-Injektion das Blut entnommen, um Plasma herstellen zu können (*Abbildung 31*).



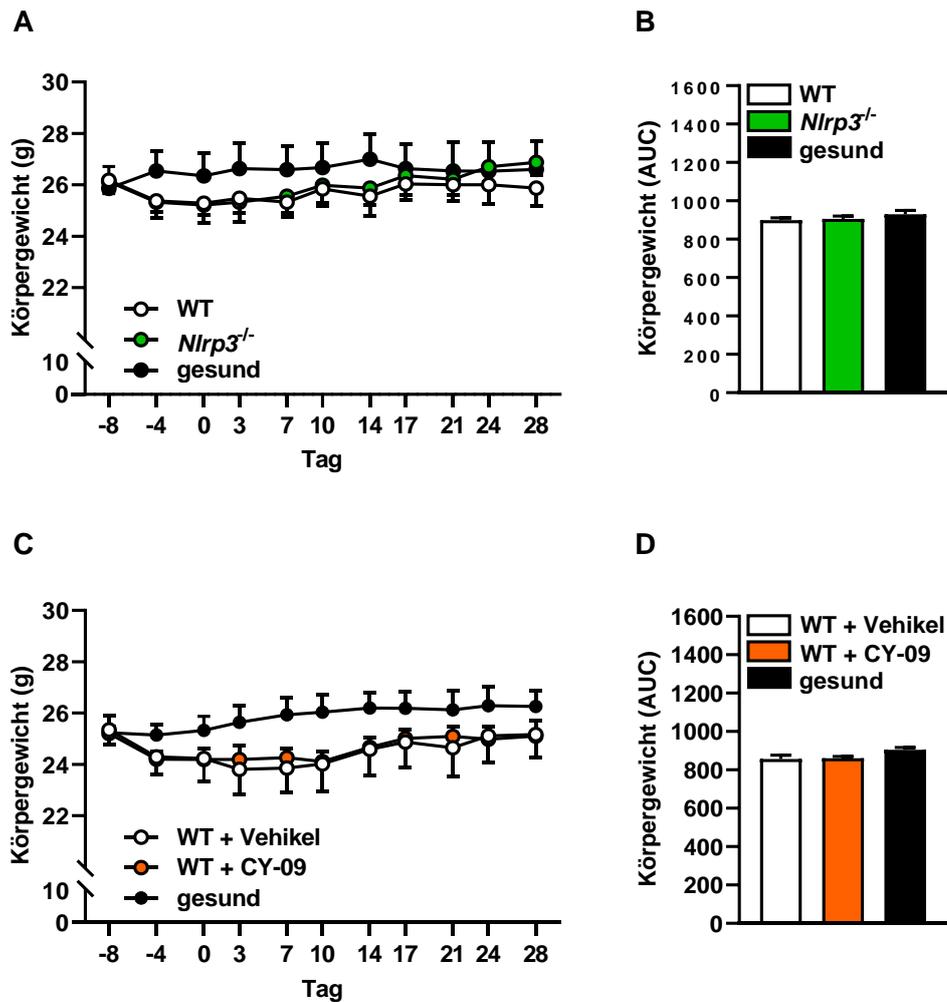
**Abbildung 31: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Analyse der endokrinen Funktion transplanteder Langerhans-Inseln im diabetischen Mausmodell.** Der T1D-Phänotyp wurde 8 Tage (D-8) vor der Transplantation der Langerhans-Inseln durch die einmalige Injektion von STZ (180 mg/kg) induziert. An Tag 0 (D0) wurden 300 Langerhans-Inseln unter die rechte Nierenkapsel des Empfängertieres transplantiert. Der Blutglukosespiegel und das Körpergewicht wurden 2-mal wöchentlich von D-8 bis Tag 28 (D28) gemessen. An D28 wurde ein IPGTT durchgeführt. Zur Bestimmung der Insulin-Konzentration im Plasma wurde zusätzlichen Empfängertieren 15 min nach der Injektion einer Glukoselösung (10 %) das Blut entnommen. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

In einem Vorversuch wurde zuerst die kritische Anzahl von WT Langerhans-Inseln, die nach der Transplantation in diabetische Mäuse nicht innerhalb des 28-tägigen Beobachtungszeitraums zu einer Wiederherstellung einer Normoglykämie führt, bestimmt. Für diese Dosisfindung wurden 200, 300 oder 400 WT Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen Empfängertieren transplantiert und das Körpergewicht sowie die Blutglukosespiegel repetitiv gemessen (*Abbildung 32A-D*). Hierbei war lediglich das Körpergewicht der Tiere, die 200 WT Langerhans-Inseln erhielten, an den Tagen 21, 24 und 28 signifikant reduziert im Vergleich zu der mit 400 WT Langerhans-Inseln transplantierten Gruppe (*Abbildung 32A und B*). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Transplantation von 400 WT Langerhans-Inseln innerhalb von 3 Tagen eine Normoglykämie wiederherstellt, während die Transplantation von 200 und 300 WT Langerhans-Inseln nicht zu physiologischen Blutglukosespiegeln innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums führt (*Abbildung 32C und D*). Basierend darauf wurden im folgenden Versuchsaufbau 300 *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT + CY-09 Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von STZ-induzierten diabetischen Mäusen transplantiert, um den möglichen positiven Einfluss von NLRP3 auf die Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel analysieren zu können. Die Transplantation von 300 WT bzw. WT + Vehikel Langerhans-Inseln diente als Positivkontrolle, wohingegen gesunde Mäuse ohne STZ-Injektion und Inseltransplantation als Negativkontrolle mitgeführt wurden.



**Abbildung 32: Bestimmung der kritischen Anzahl zu transplantierender WT Langerhans-Inseln im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A und B) Quantitative Analyse der Körpergewichte (g) (A) und entsprechende *area under the curve* (AUC) (B) von diabetischen Mäusen, welchen 200, 300 oder 400 WT Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28; n = 4 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. 200 WT. (C und D) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) (C) und entsprechende AUC (D) von diabetischen Mäusen, welchen 200, 300 oder 400 WT Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28; n = 4 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. 200 WT; \*P < 0,05 vs. 300 WT.

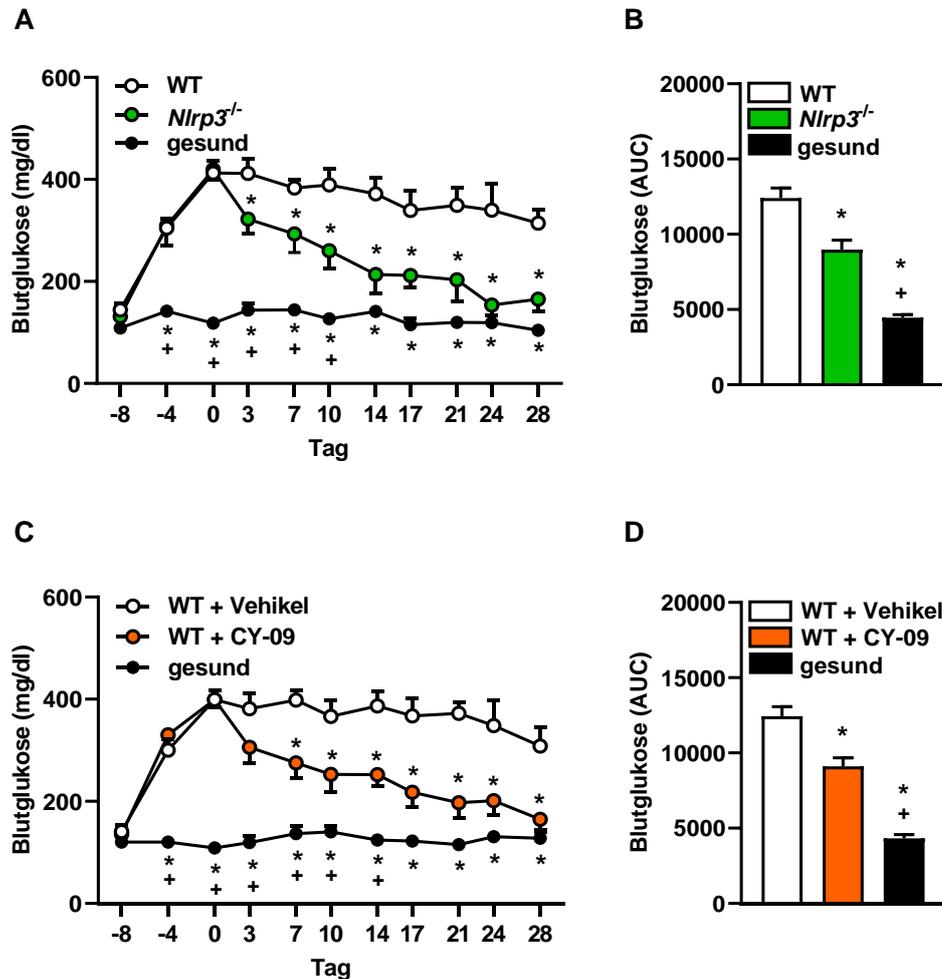
Die Transplantation der *Nlrp3<sup>-/-</sup>* bzw. WT + CY-09 Langerhans-Inseln zeigte im Vergleich zu transplantierten WT bzw. WT + Vehikel Langerhans-Inseln und gesunden Mäusen über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Auswirkungen auf das Körpergewicht (Abbildung 33A und C). Dementsprechend wies auch die AUC der Körpergewichte aller Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 33B und D).



**Abbildung 33: Bestimmung der Körpergewichte der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A und B) Quantitative Analyse der Körpergewichte (g) (A) und entsprechende AUC (B) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28). Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. (C und D) Quantitative Analyse der Körpergewichte (g) (C) und entsprechende AUC (D) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT + Vehikel oder WT + CY-09 Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28). Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM.

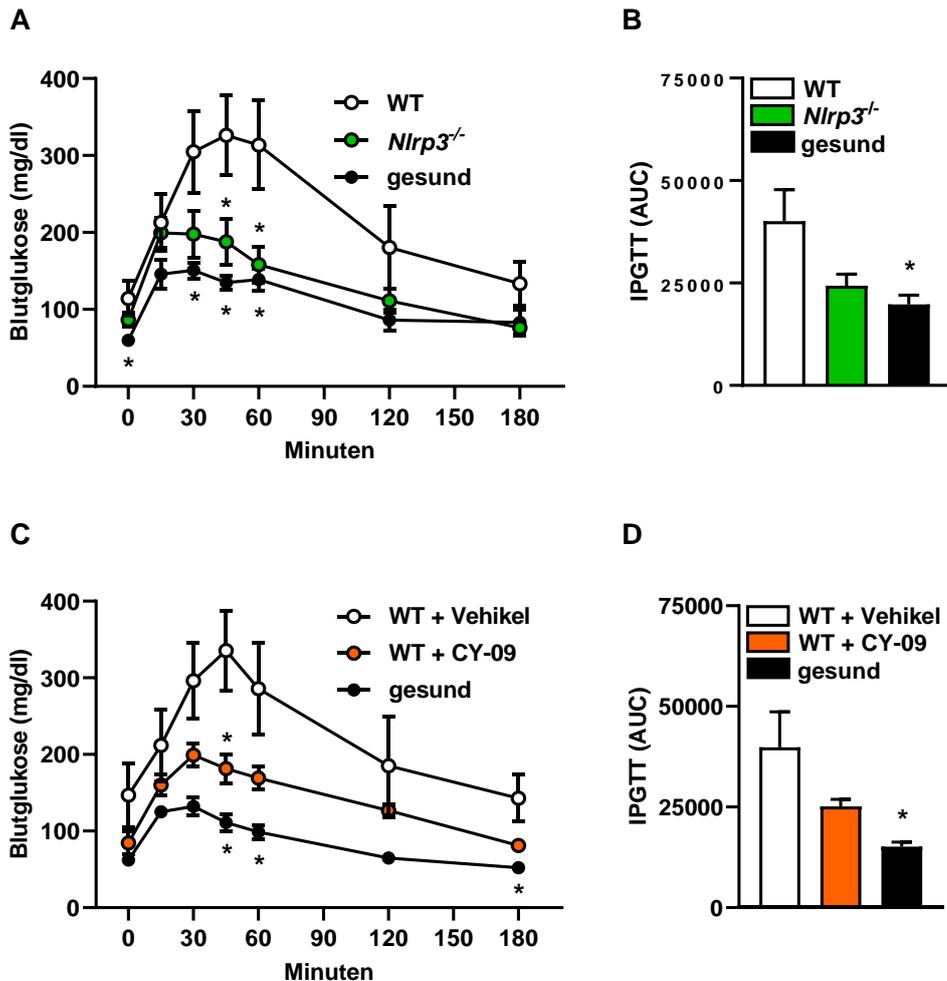
Im Gegensatz zu den Körpergewichten konnte bei der Analyse der Blutglukosespiegel bereits an Tag 3 bzw. Tag 7 nach Transplantation eine signifikante Reduktion des Blutglukosespiegels festgestellt werden. Im Detail zeigte die *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT + CY-09 Gruppe Blutglukosespiegel von  $322,3 \pm 27,4$  mg/dl bzw.  $275,1 \pm 30,2$  mg/dl (Abbildung 34A und C). Hingegen waren die Blutglukosespiegel in den Kontrollgruppen weiterhin stark erhöht (WT:  $411,7 \pm 28,9$  mg/dl; WT + Vehikel:  $398,1 \pm 19,5$  mg/dl) (Abbildung 34A und C). Ab Tag 14 bzw. Tag 17 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT + CY-09 Gruppe und der gesunden Negativkontrolle nachgewiesen werden. Interessanterweise führte der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 an Tag 28 nach der Transplantation der Langerhans-Inseln zu physiologischen Blutglukosespiegeln, wohingegen die Transplantation von WT und WT + Vehikel Langerhans-Inseln während des gesamten Beobachtungszeitraums die Normoglykämie nicht wiederherstellte (Abbildung 34A und C). Dementsprechend war auch die

AUC der Blutglukosespiegel der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden Positivkontrollen signifikant reduziert (Abbildung 34B und D).



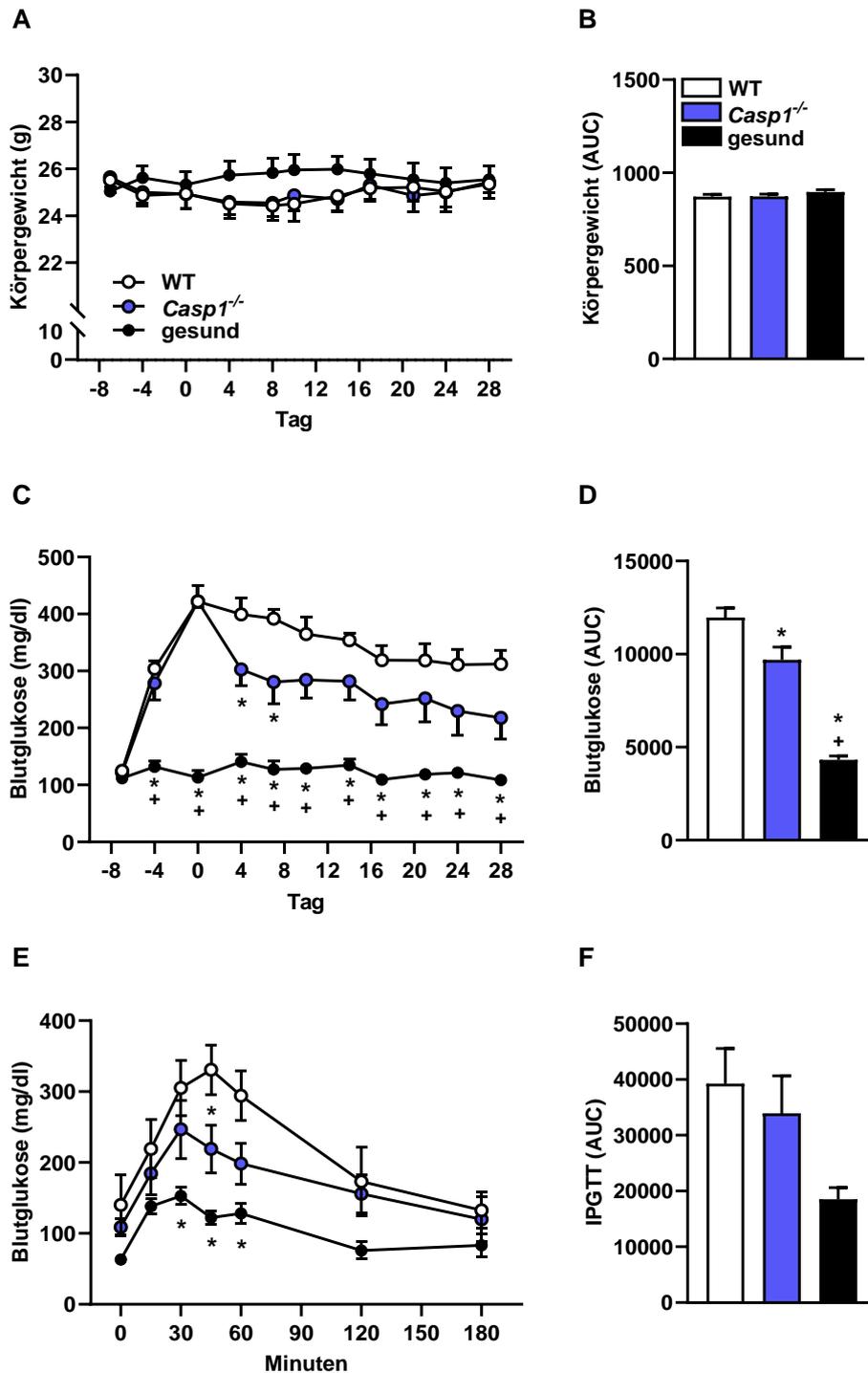
**Abbildung 34: Messung der Blutglukosespiegel der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A und B) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) (A) und entsprechende AUC (B) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28). Gesunde Mäuse dienen als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT; +P < 0,05 vs. *Nlrp3*<sup>-/-</sup>. (C und D) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) (C) und entsprechende AUC (D) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT + Vehikel oder WT + CY-09 Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28). Gesunde Mäuse dienen als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel; +P < 0,05 vs. WT + CY-09.

Für den IPGTT wurden die Blutglukosespiegel der Versuchstiere nach einer Fastenzeit von 16 h gemessen. Anschließend erfolgte die Injektion einer 10 %-igen Glukoselösung und die Analyse der Blutglukosespiegel nach 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Blutglukosespiegel der mit *Nlrp3*<sup>-/-</sup> oder WT + CY-09 Langerhans-Inseln transplantierten Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Positivkontrollen signifikant reduziert waren (Abbildung 35A und C). Zudem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT + CY-09 Gruppe und der gesunden Negativkontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 35A und C). Dementsprechend konnte bei der AUC des IPGTT lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Positiv- und Negativkontrollen festgestellt werden (Abbildung 35B und D).



**Abbildung 35: IPGTT der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A und B) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) während des IPGTT an Tag 28 (A) und entsprechende AUC (B) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT. (C und D) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) während des IPGTT an Tag 28 (C) und entsprechende AUC (D) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT + Vehikel oder WT + CY-09 Langerhans-Inseln transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT + Vehikel.

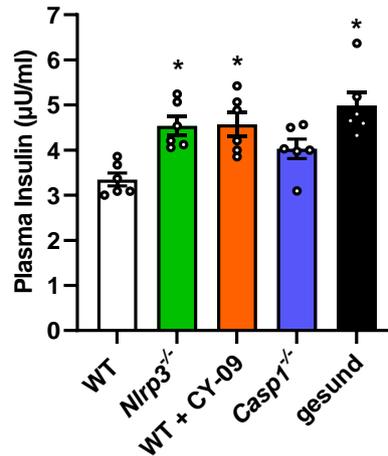
Um auszuschließen, dass eine verminderte Casp1-Aktivität für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, wurden im nächsten Schritt WT und *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von STZ-induzierten diabetischen Mäusen transplantiert. Hierbei wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Körpergewichte festgestellt (Abbildung 36A und B). Der Verlust von Casp1 führte zu einer leichten Verbesserung der Hyperglykämie im Vergleich zur WT Gruppe (Abbildung 36C und D). Jedoch konnten während des gesamten Beobachtungszeitraums keine physiologischen Blutglukosespiegel in der *Casp1*<sup>-/-</sup> Gruppe detektiert werden (Abbildung 36C und D). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte die Analyse der Blutglukosespiegel im IPGTT lediglich 45 min nach der Glukose-Injektion einen signifikant reduzierten Blutglukosespiegel der mit *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantierten Mäusen im Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 36E und F).



**Abbildung 36: Körpergewichte, Blutglukosespiegel und IPGTT der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A und B) Quantitative Analyse der Körpergewichte (g) (A) und entsprechende AUC (B) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT oder *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28). Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. (C und D) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) (C) und entsprechende AUC (D) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT oder *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28). Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT; +P < 0,05 vs. *Casp1*<sup>-/-</sup>. (E und F) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) während des IPGTT an Tag 28 (E) und entsprechende AUC (F) von diabetischen Mäusen, welchen 300 WT oder *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 7 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM.

Für die Analyse der Insulin-Konzentration im Plasma an Tag 28 wurden zusätzliche diabetische Versuchstiere, die eine Transplantation der WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, WT + CY-09 oder *Casp1*<sup>-/-</sup>

Langerhans-Inseln erhielten, für 16 h gefastet. Als Negativkontrolle dienten gefastete, gesunde Mäuse. Mithilfe eines ELISA wurde die Menge an Insulin im Plasma bestimmt. Wie erwartet, konnte eine signifikant höhere Insulin-Konzentration im Plasma der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT + CY-09 Gruppe im Vergleich zur WT Gruppe nachgewiesen werden (Abbildung 37). Hingegen unterschieden sich die Insulin-Konzentrationen der mit *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantierten Tiere nicht signifikant von der Positivkontrolle (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Insulin-Konzentration im Plasma der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** Insulin-Konzentration (an Tag 28) im Plasma von diabetischen Mäusen, die mit 300 WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup>, WT + CY-09 oder *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle. Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und in µU/ml dargestellt (n = 6 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. WT.

#### 6.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

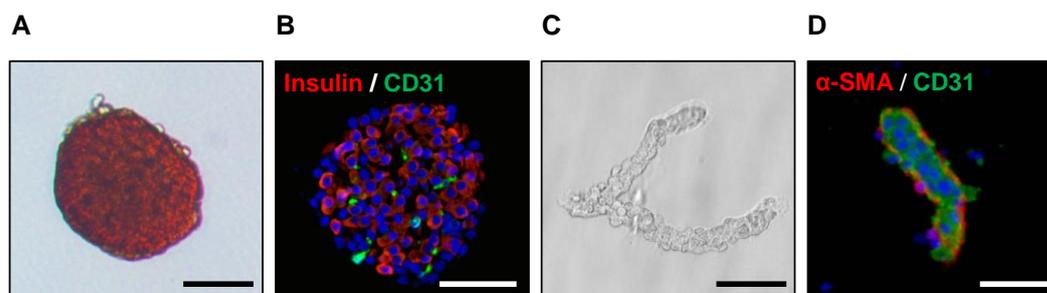
Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass die Inhibition von NLRP3 weder die Viabilität noch die zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln beeinflusst. Jedoch konnte bei der Analyse der endokrinen Funktion *in vitro* festgestellt werden, dass der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 die Sekretion und Expression von Insulin der Langerhans-Inseln signifikant erhöht. Die Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus der erhöhten Insulin-Expression zeigte, dass diese über die beiden Transkriptionsfaktoren PDX-1 und MafA reguliert wird. Unter Verwendung des Rückenhautkammer-Modells konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass die Inhibition von NLRP3 die Revaskularisierung transplantiert Langerhans-Inseln verbessert. Weiterführende Untersuchungen der Angiogenese bestätigten, dass das vermehrt sekretierte Insulin der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT + CY-09 Langerhans-Inseln deren Revaskularisierung stimuliert. Abschließend führte die Transplantation von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> oder WT + CY-09 Langerhans-Inseln in diabetische Mäuse zur Wiederherstellung einer Normoglykämie, wohingegen entsprechende WT und WT + Vehikel Kontrollgruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum hyperglykäm blieben.

## 6.2 Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion transplantierter Langerhans-Inseln analysiert. Hierzu wurde zuerst die zelluläre Zusammensetzung und Viabilität isolierter Langerhans-Inseln sowie isolierter MVF analysiert. Danach wurde der Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion transplantierter Langerhans-Inseln unter Verwendung des diabetischen Mausmodells untersucht.

### 6.2.1 Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln und MVF

Um die zelluläre Zusammensetzung von Langerhans-Inseln bzw. MVF analysieren zu können, wurden diese zuerst aus dem Pankreas bzw. dem epididymalen Fettgewebe von WT-Mäusen isoliert (*Abbildung 38A und C*). Anschließend wurden sowohl die isolierten Langerhans-Inseln als auch die MVF in eine HepatoQuick<sup>®</sup>-Matrix eingebettet und histologische Präparate hergestellt. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurden die Insulin- und CD31-exprimierenden Zellen der Langerhans-Inseln und die CD31- und  $\alpha$ -SMA-exprimierenden Zellen der MVF visualisiert (*Abbildung 38B und D*). Wie erwartet, bestanden die Langerhans-Inseln zum größten Teil aus Insulin-positiven  $\beta$ -Zellen und nur wenigen CD31-positiven Endothelzellen (*Abbildung 38B*). Die isolierten MVF waren durch ein CD31-positives Endothel, das von  $\alpha$ -SMA-positiven Perizyten umgeben war, gekennzeichnet (*Abbildung 38D*).

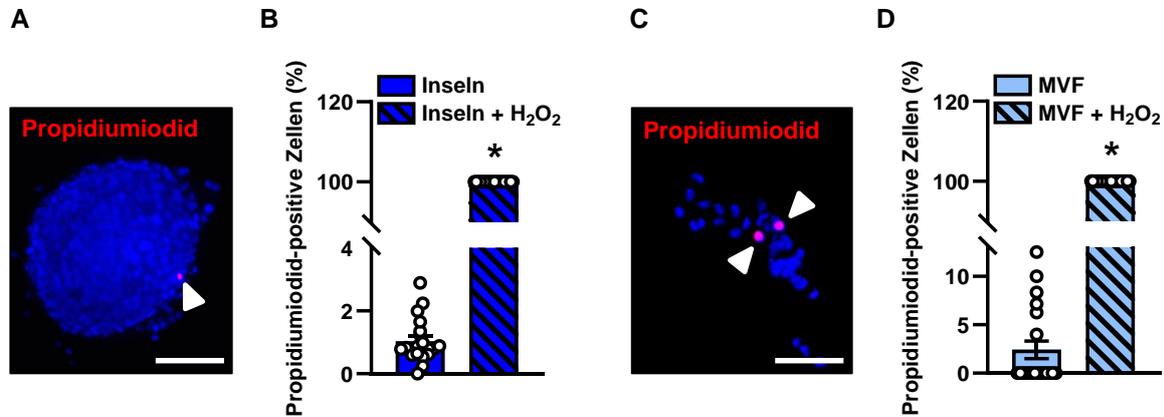


**Abbildung 38: Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln und MVF.** (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahme einer isolierten, Neutralrot-gefärbten Langerhans-Insel. Maßstab: 50  $\mu$ m. (B) Repräsentative, immunhistochemische Färbung von Insulin (rot) / CD31 (grün) einer isolierten Langerhans-Insel. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 50  $\mu$ m. (C) Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahme eines isolierten MVF. Maßstab: 15  $\mu$ m. (D) Repräsentative, immunhistochemische Färbung von  $\alpha$ -SMA (rot) / CD31 (grün) eines isolierten MVF. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 15  $\mu$ m.

### 6.2.2 Viabilität isolierter Langerhans-Inseln und MVF

Für die Analyse der Viabilität isolierter Langerhans-Inseln und MVF wurden diese mit Propidiumiodid (nekrotische Zellen) und Hoechst 33342 (Zellkerne) angefärbt (*Abbildung 39A und C*). Als Positivkontrolle dienten Langerhans-Inseln und MVF, die für 24 h in 0,2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

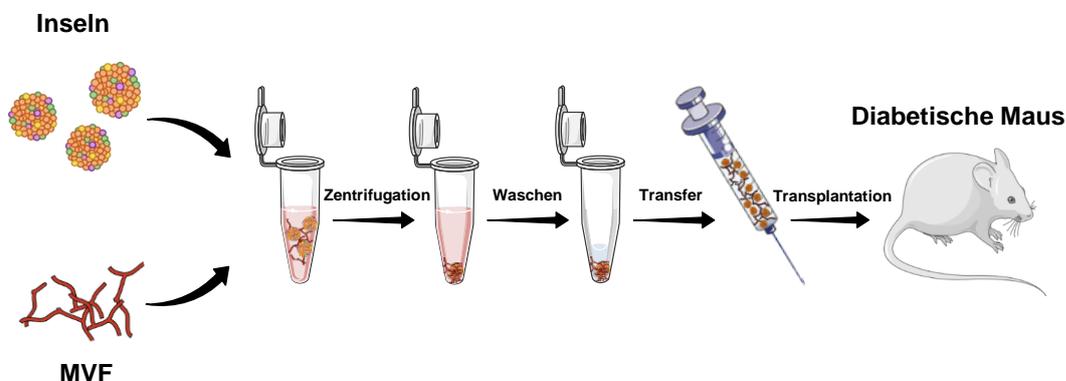
kultiviert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Zellen der mit  $H_2O_2$ -inkubierten Langerhans-Inseln bzw. MVF positiv für Propidiumiodid und somit nekrotisch waren, wohingegen bei den unbehandelten Langerhans-Inseln bzw. MVF lediglich  $1,0 \pm 0,1 \%$  bzw.  $2,4 \pm 0,9 \%$  nekrotische Zellen detektiert wurden (Abbildung 39B und D).



**Abbildung 39: Viabilität isolierter Langerhans-Inseln und MVF.** (A) Repräsentative, immunhistochemische Färbung von Propidiumiodid (rot) einer isolierten Langerhans-Insel. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 100  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der Propidiumiodid-positiven Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln direkt nach deren Isolation. Die gewonnenen Daten sind in % aller Zellen dargestellt (n = 20). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. Inseln. (C) Repräsentative, immunhistochemische Färbung von Propidiumiodid (rot) eines isolierten MVF. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 15  $\mu$ m. (D) Quantitative Analyse der Propidiumiodid-positiven Zellen innerhalb der MVF direkt nach deren Isolation. Die gewonnenen Daten sind in % aller Zellen dargestellt (n = 20). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. MVF.

### 6.2.3 Ko-Transplantation isolierter Langerhans-Inseln und MVF

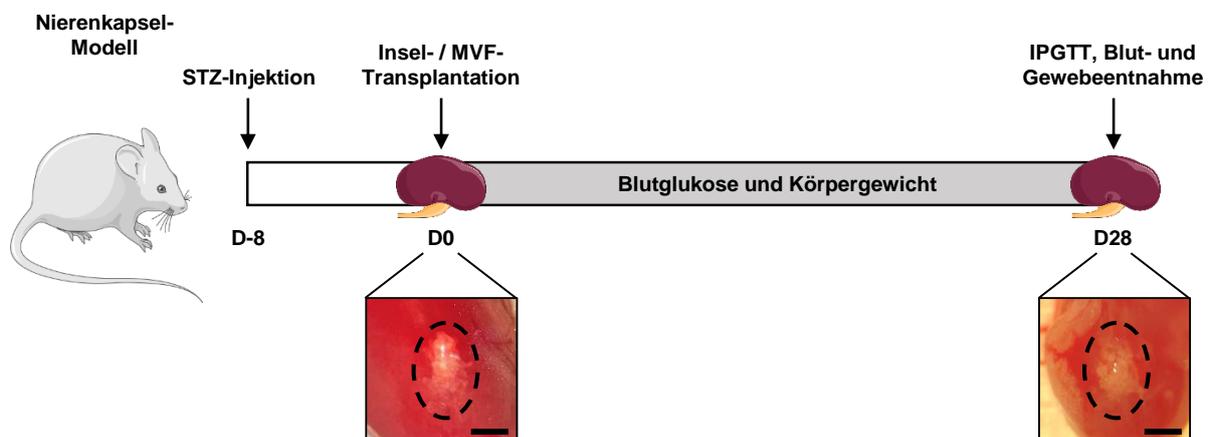
Um frisch isolierte Langerhans-Inseln und MVF ko-transplantieren zu können, wurden diese in DMEM vereint und durch Zentrifugation zu einem Pellet aufkonzentriert (Abbildung 40). Dieses Pellet wurde in einem geringen Volumen physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und in eine 10  $\mu$ l Hamilton-Spritze überführt (Abbildung 40). Im Anschluss wurde die Suspension aus Langerhans-Inseln und MVF unter die Nierenkapsel oder in das subkutane Gewebe von diabetischen Mäusen injiziert (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Schematische Darstellung der Ko-Transplantation von Langerhans-Inseln und MVF in diabetische Mäuse.** Die frisch isolierten Langerhans-Inseln und MVF werden in DMEM gemischt, pelletiert und in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Anschließend wird das Gemisch aus Langerhans-Inseln und MVF mithilfe einer Hamilton-Spritze unter die Nierenkapsel oder in das subkutane Gewebe diabetischer Mäuse transplantiert. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

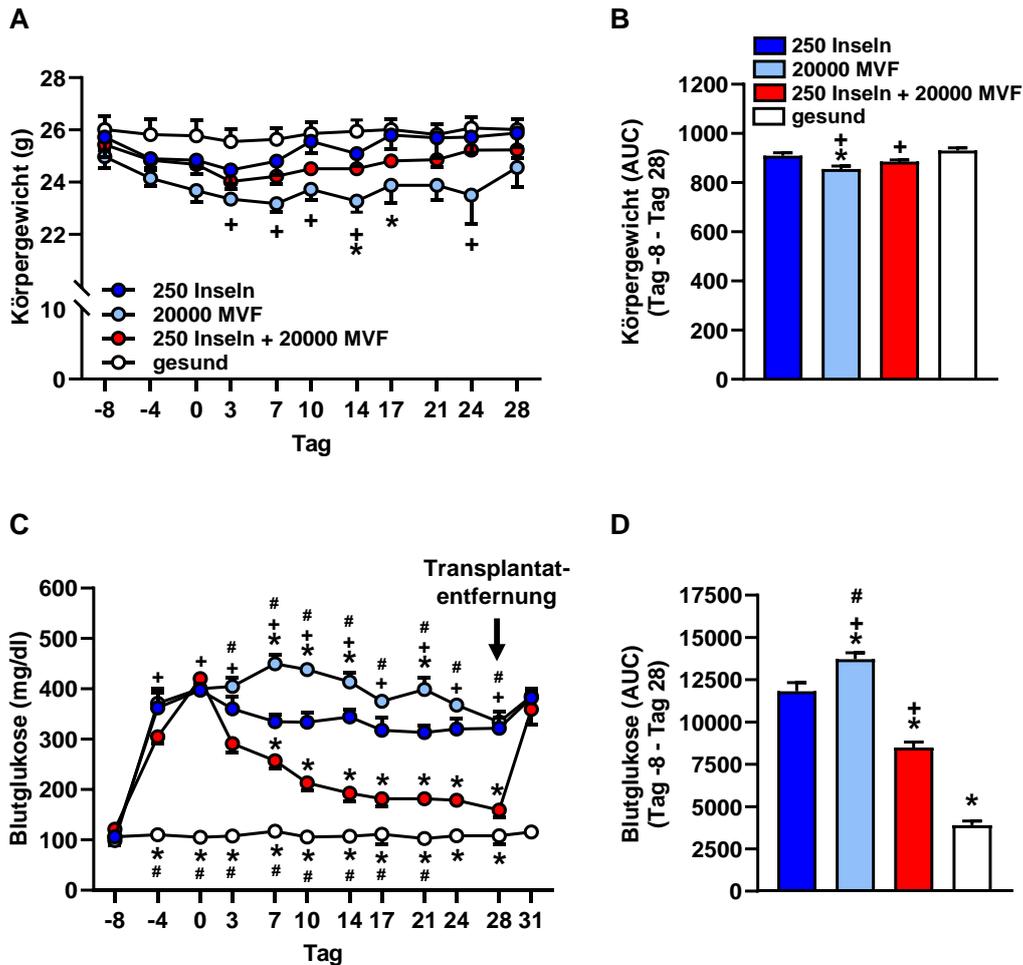
### 6.2.3.1 Ko-Transplantation isolierter Langerhans-Inseln und MVF unter die Nierenkapsel

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Ko-Transplantation von Langerhans-Inseln und MVF unter die Nierenkapsel von diabetischen Tieren im Vergleich zur Transplantation von Langerhans-Inseln alleine die Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel (80 bis 200 mg/dl) beschleunigen kann. Hierbei wurde, wie im ersten Studienabschnitt, das STZ-induzierte diabetische Mausmodell verwendet. Den Empfängertieren mit einem Blutglukosespiegel von 350 bis 450 mg/dl wurden 8 Tage nach der STZ-Injektion jeweils 250 Langerhans-Inseln, 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF oder 20000 MVF unter die Nierenkapsel transplantiert. Die Transplantation von 250 Langerhans-Inseln oder 20000 MVF diente als Positivkontrolle, wohingegen gesunde Mäuse ohne STZ-Injektion und Transplantation als Negativkontrolle mitgeführt wurden. Die Blutglukosespiegel und das Körpergewicht der Versuchstiere wurden 2-mal wöchentlich bestimmt. An Tag 28 wurde sowohl ein IPGTT durchgeführt als auch die transplantierte Niere für immunhistochemische Analysen entnommen (*Abbildung 41*). Drei Tage nach der Transplantatentfernung wurde der Blutglukosespiegel zum letzten Mal gemessen, um eine spontane Erholung der noch vorhandenen Langerhans-Inseln in den STZ-behandelten Tieren ausschließen zu können. Zusätzlichen Empfängertieren wurde an Tag 28 eine 10 %-ige Glukoselösung injiziert und 15 min danach das Blut entnommen, um Plasma herzustellen. Um den Insulingehalt der Transplantate bestimmen zu können, wurden diesen Versuchstieren ebenfalls die Transplantate explantiert (*Abbildung 41*).



**Abbildung 41: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Analyse der endokrinen Funktion transplanteder Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel diabetischer Mäuse.** Der T1D-Phänotyp wird 8 Tage (D-8) vor der Transplantation durch die einmalige Injektion von STZ (180 mg/kg) induziert. An Tag 0 (D0) werden 250 Langerhans-Inseln, 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF oder 20000 MVF unter die rechte Nierenkapsel des Empfängertieres transplantiert (linkes Bild; Maßstab: 3 mm). Der Blutglukosespiegel und das Körpergewicht werden 2-mal wöchentlich von D-8 bis Tag 31 (D31) gemessen. An Tag 28 (D28) wird ein IPGTT durchgeführt, die transplantierte Niere entnommen (rechtes Bild; Maßstab: 3 mm) und der Blutglukosespiegel 3 Tage nach der Transplantatentfernung gemessen, um die Rückkehr zur Hyperglykämie beobachten zu können. Zur Bestimmung der Insulin-Konzentration im Plasma und in den Transplantaten an D28 wird zusätzlichen Empfängertieren das Blut und die Niere entnommen. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

Die Körpergewichte gesunder sowie diabetischer Tiere, welchen 250 Langerhans-Inseln oder 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF transplantiert wurden, unterschieden sich während des 36-tägigen Beobachtungszeitraumes nicht (*Abbildung 42A und B*). Im Gegensatz dazu wurden signifikant verringerte Körpergewichte in der 20000 MVF Gruppe im Vergleich zur gesunden und mit 250 Langerhans-Inseln transplantierten Gruppe detektiert (*Abbildung 42A*). Dementsprechend war auch die AUC der Körpergewichte von Mäusen, welche eine Transplantation von 20000 MVF erhielten, signifikant reduziert (*Abbildung 42B*).

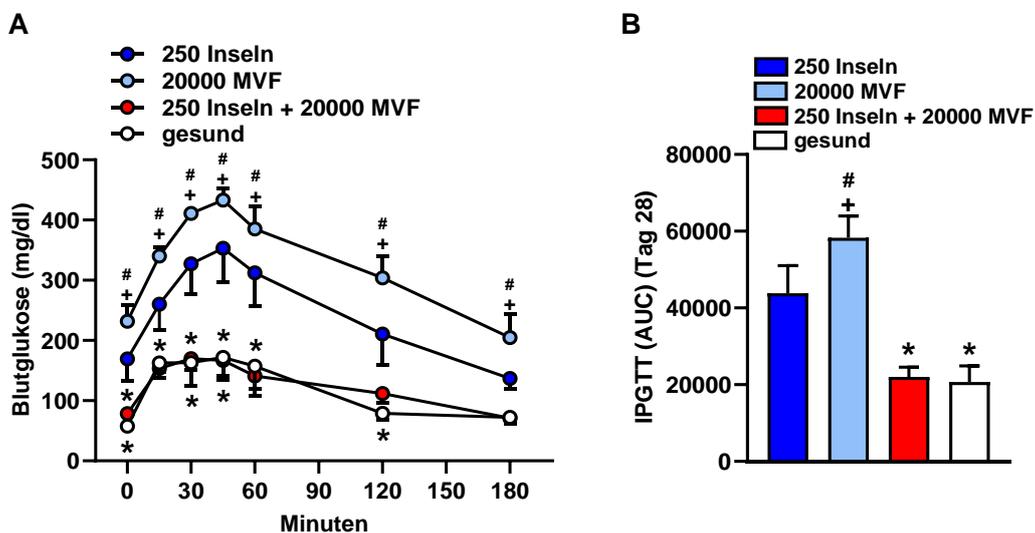


**Abbildung 42: Bestimmung der Körpergewichte und Messung der Blutglukosespiegel der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A und B) Quantitative Analyse der Körpergewichte (g) (A) und entsprechende AUC (B) von diabetischen Mäusen, welchen 250 Langerhans-Inseln, 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF oder 20000 MVF transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 28). Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 8 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. 250 Inseln; \*P < 0,05 vs. gesund; #P < 0,05 vs. 250 Inseln + 20000 MVF. (C) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) von diabetischen Mäusen, welchen 250 Langerhans-Inseln, 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF oder 20000 MVF transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 31). Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 8 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. 250 Inseln; \*P < 0,05 vs. gesund; #P < 0,05 vs. 250 Inseln + 20000 MVF. (D) AUC der Blutglukosespiegel von (C) (Tag -8 bis Tag 28; n = 8 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. 250 Inseln; \*P < 0,05 vs. gesund; #P < 0,05 vs. 250 Inseln + 20000 MVF.

Bei der Analyse der Blutglukosespiegel konnte festgestellt werden, dass die Transplantation von 250 Langerhans-Inseln oder 20000 MVF nicht zur Wiederherstellung einer Normoglykämie führt (*Abbildung 42C*). Allerdings reduzierte die Ko-Transplantation von 250

Langerhans-Inseln und 20000 MVF ( $257,4 \pm 14,6$  mg/dl) im Vergleich zu den beiden Positivkontrollen (250 Langerhans-Inseln:  $334,9 \pm 14,3$  mg/dl; 20000 MVF:  $449,5 \pm 18,5$  mg/dl) die Blutglukosespiegel nach 7 Tagen signifikant. Ebenfalls konnten 14 Tage nach der Ko-Transplantation von 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF physiologische Blutglukosespiegel ( $192,9 \pm 16,1$  mg/dl) gemessen werden (Abbildung 42C). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen war die AUC der Blutglukosespiegel von Mäusen, welchen 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF transplantiert wurden, im Vergleich zu den Positivkontrollen signifikant reduziert (Abbildung 42D). Nach der Transplantatentfernung an Tag 28 stieg der Blutglukosespiegel der mit 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF transplantierten Mäuse von  $159,1 \pm 13,6$  mg/dl auf  $359,0 \pm 30,5$  mg/dl an, wodurch eine spontane Erholung der noch vorhandenen Langerhans-Inseln in den STZ-behandelten Tieren ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 42C).

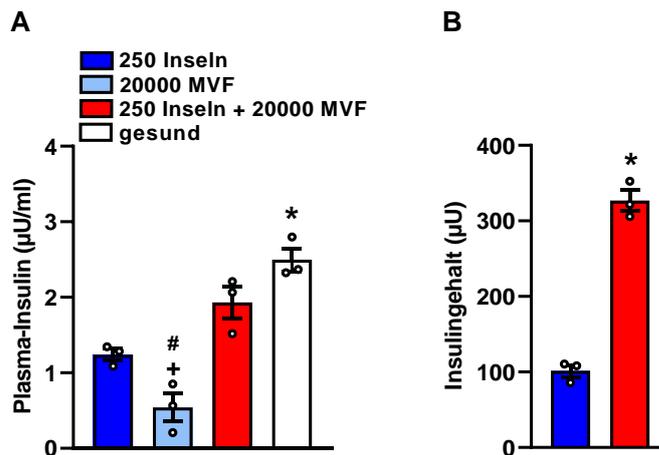
Der IPGTT an Tag 28 nach der Transplantation zeigte signifikant geringere Blutglukosespiegel von ko-transplantierten Mäusen im Vergleich zu den Positivkontrollen (Abbildung 43A). Zudem unterschieden sich die Blutglukosespiegel zwischen den mit 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF transplantierten Mäusen und der gesunden Kontrollgruppe nicht (Abbildung 43A). Die Analyse der AUC des IPGTT zeigte eine signifikante Erhöhung der Blutglukosespiegel von Mäusen, die mit 250 Langerhans-Inseln oder 20000 MVF transplantiert wurden, im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen (Abbildung 43B).



**Abbildung 43: IPGTT der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell. (A und B)** Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) während des IPGTT an Tag 28 (A) und entsprechende AUC (B) von diabetischen Mäusen, welchen 250 Langerhans-Inseln, 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF oder 20000 MVF transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 8 Tiere pro Gruppe). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. 250 Inseln; +P < 0,05 vs. gesund; #P < 0,05 vs. 250 Inseln + 20000 MVF.

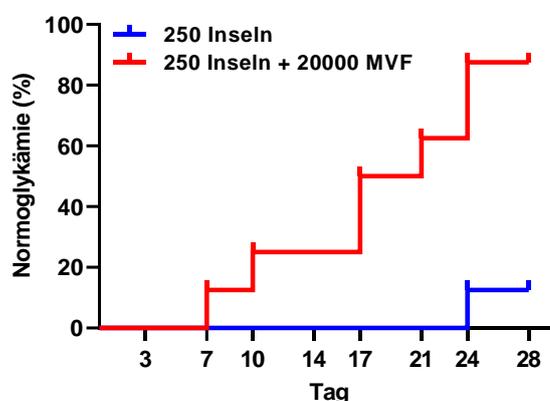
Für die Analyse der Insulin-Konzentration im Plasma an Tag 28 wurden zusätzliche Versuchstiere für 16 h gefastet. Im Anschluss wurde den Versuchstieren eine 10 %-ige Glukoselösung injiziert und 15 min danach die Konzentration von Insulin im Plasma mithilfe

eines ELISA analysiert. Hierbei konnte eine tendenziell höhere Insulin-Konzentration im Plasma der 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF Gruppe im Vergleich zur Transplantation von 250 Langerhans-Inseln nachgewiesen werden (*Abbildung 44A*). Wichtiger ist jedoch, dass kein signifikanter Unterschied der Insulin-Konzentration zwischen den ko-transplantierten Mäusen und der gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden konnte (*Abbildung 44A*). Die Analyse des Insulingehalts der Transplantate zeigte, dass die ko-transplantierten Mäuse mit  $326,8 \pm 11,2 \mu\text{U}$  einen signifikant erhöhten Insulingehalt im Vergleich zur Transplantation von 250 Langerhans-Inseln ( $101,4 \pm 6,4 \mu\text{U}$ ) aufwiesen (*Abbildung 44B*).



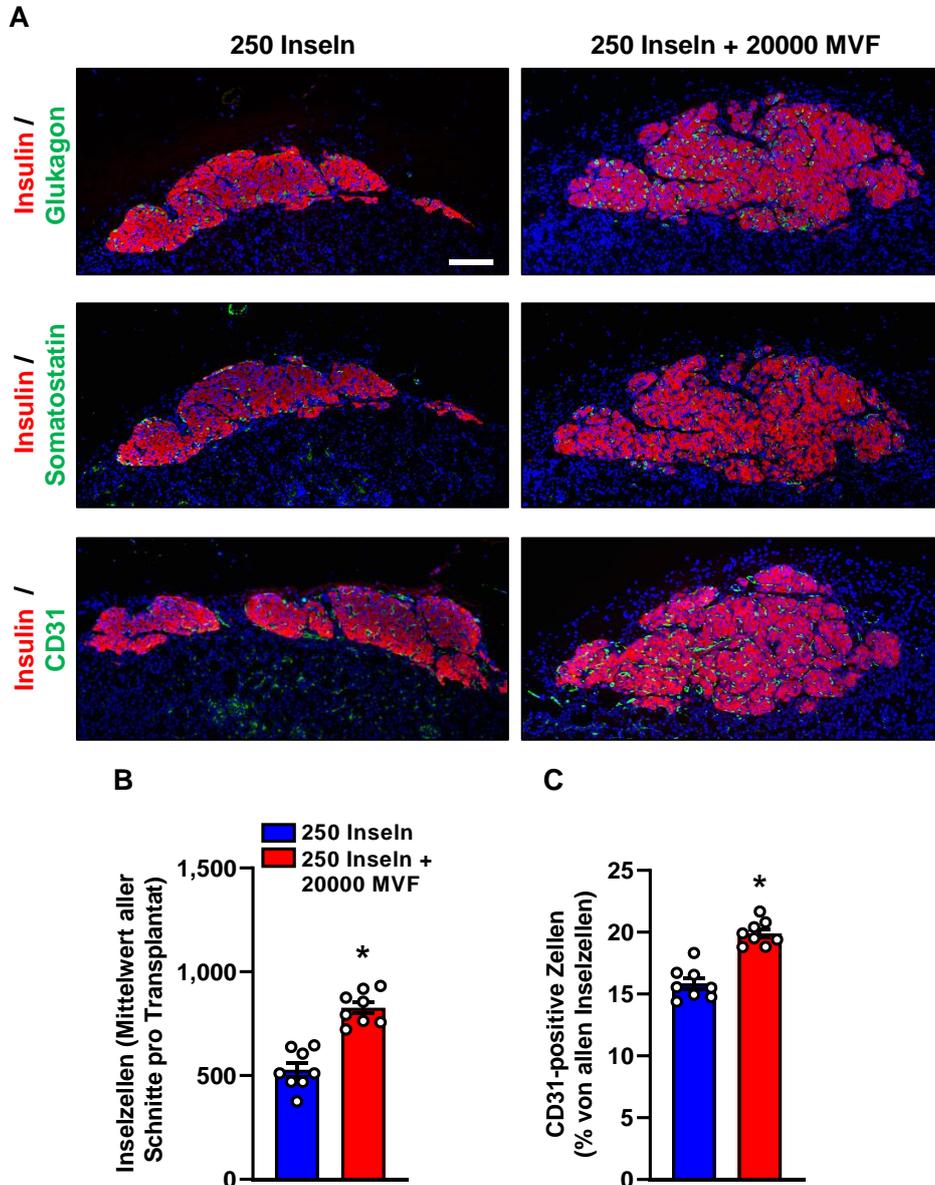
**Abbildung 44: Insulin-Konzentration im Plasma und in den Transplantaten der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A) Insulin-Konzentration (an Tag 28) im Plasma von diabetischen Mäusen, welchen 250 Langerhans-Inseln, 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF oder 20000 MVF transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle. Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und in  $\mu\text{U}/\text{ml}$  dargestellt ( $n = 3$  Tiere pro Gruppe). MW  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  vs. 250 Inseln; \* $P < 0,05$  vs. gesund; # $P < 0,05$  vs. 250 Inseln + 20000 MVF. (B) Insulingehalt ( $\mu\text{U}$ ) der Transplantate an Tag 28 von diabetischen Mäusen, welchen 250 Langerhans-Inseln oder 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF transplantiert wurden ( $n = 3$  Tiere pro Gruppe). MW  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  vs. 250 Inseln.

Interessanterweise führte die Ko-Transplantation von 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF bei 87,5 % der Empfängertiere zur Wiederherstellung einer Normoglykämie, wohingegen nur bei 12,5 % der mit 250 Langerhans-Inseln transplantierten Mäuse physiologische Blutglukosespiegel detektiert werden konnten (*Abbildung 45*).



**Abbildung 45: Wiederherstellung einer Normoglykämie.** Anteil der diabetischen Mäuse, die nach der Transplantation von 250 Langerhans-Inseln oder 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF eine Normoglykämie erreichten ( $n = 8$  Tiere pro Gruppe).

Am Ende des *In-vivo*-Experiments wurden die Nieren der Empfängertiere, welchen 250 Langerhans-Inseln oder 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF transplantiert wurden, entnommen und die zelluläre Zusammensetzung der Transplantate mithilfe immunhistochemischer Färbungen analysiert (*Abbildung 46A*).



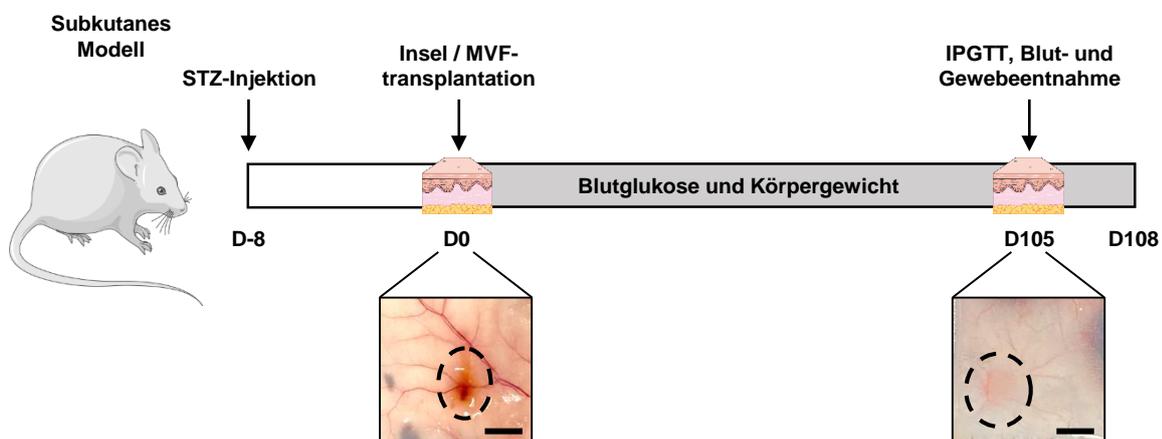
**Abbildung 46: Zelluläre Zusammensetzung der Transplantate unter der Nierenkapsel.** (A) Repräsentative, immunhistochemische Färbungen von Insulin / Glukagon, Insulin / Somatostatin und Insulin / CD31 der Gruppe mit 250 Langerhans-Inseln sowie der Gruppe mit 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF an Tag 28 nach deren Transplantation. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 100  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der Inselzellen in der Gruppe mit 250 Langerhans-Inseln sowie der Gruppe mit 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF. Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und als Mittelwert aller Schnitte pro Transplantat dargestellt (n = 8 Tiere pro Gruppe). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. 250 Inseln. (C) Quantitative Analyse der CD31-positiven Endothelzellen in der Gruppe mit 250 Langerhans-Inseln sowie der Gruppe mit 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF. Die gewonnenen Daten sind in % aller Inselzellen dargestellt (n = 8 Tiere pro Gruppe). MW  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 vs. 250 Inseln.

Hierbei konnte eine signifikant höhere Anzahl an Inselzellen in den Ko-Transplantaten im Vergleich zur Transplantation von 250 Langerhans-Inseln nachgewiesen werden (*Abbildung*

46B). Wie erwartet, war auch der Anteil an CD31-positiven Endothelzellen der Ko-Transplantate mit  $19,9 \pm 0,3 \%$  im Vergleich zur Positivkontrolle ( $15,8 \pm 0,4 \%$ ) signifikant erhöht (Abbildung 46C). Dies deutet darauf hin, dass die Normoglykämie der Ko-Transplantatgruppe durch eine beschleunigte Vaskularisierung vermittelt wird.

### 6.2.3.2 Ko-Transplantation isolierter Langerhans-Inseln und MVF in das subkutane Gewebe

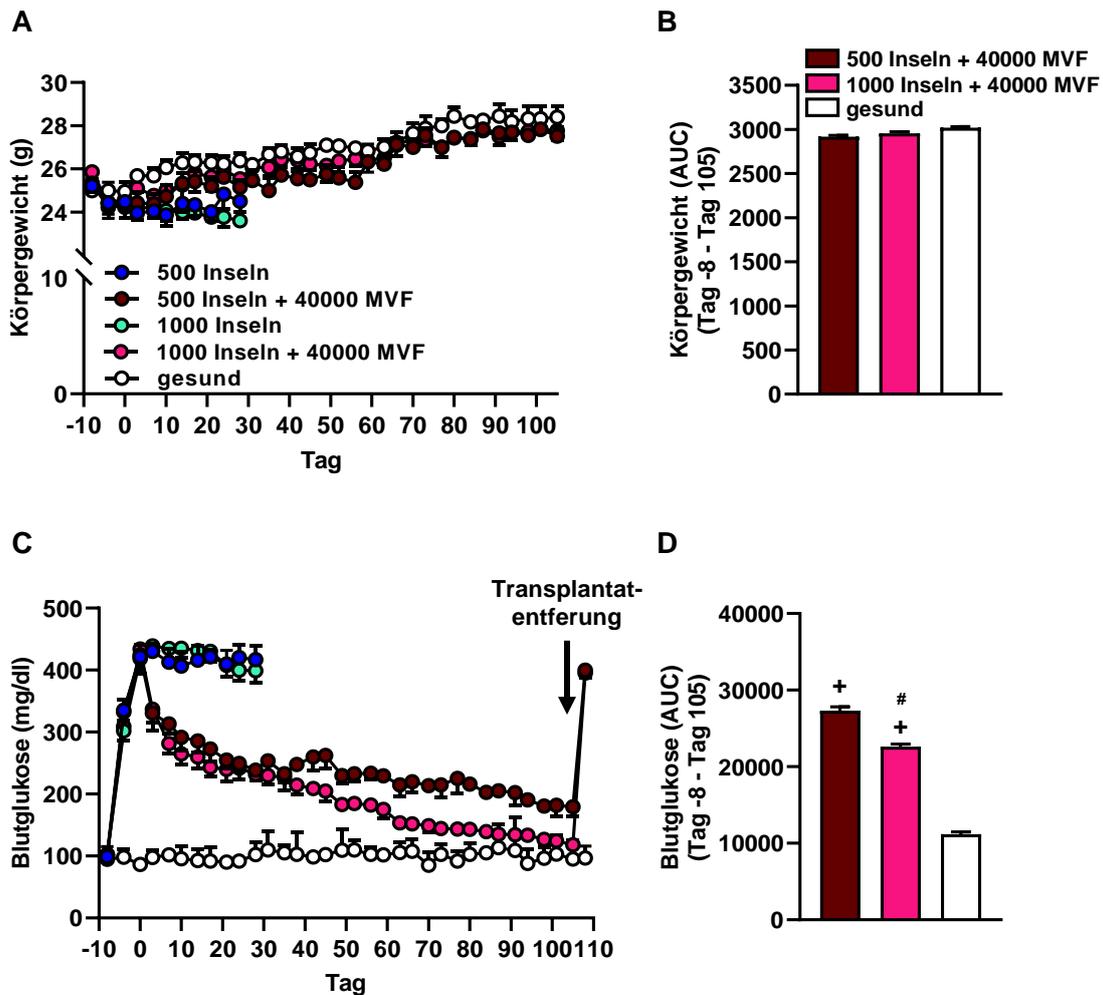
In der zweiten Versuchsreihe lag der Fokus auf dem subkutanen Gewebe als potenzielle, klinisch einfach zu nutzende Transplantationsstelle. Hierbei wurde die endokrine Funktion der Transplantate ebenfalls unter Verwendung des STZ-induzierten diabetischen Mausmodells analysiert. Den Empfängertieren mit einem Blutglukosespiegel von 350 bis 450 mg/dl wurden 8 Tage nach der STZ-Injektion 500 Langerhans-Inseln, 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF, 1000 Langerhans-Inseln oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF in das subkutane Gewebe transplantiert. Die Transplantation von 500 oder 1000 Langerhans-Inseln diente als Positivkontrolle, wohingegen gesunde Mäuse ohne STZ-Injektion und Transplantation als Negativkontrolle mitgeführt wurden. Die Blutglukosespiegel und das Körpergewicht der Versuchstiere wurden 2-mal wöchentlich über insgesamt 116 Tage bestimmt. Aufgrund der Schwere des Diabetes mussten die Positivkontrollen 28 Tage nach der Transplantation aus dem Versuch genommen werden. An Tag 105 wurde sowohl ein IPGTT durchgeführt als auch das transplantierte Gewebe für immunhistochemische Analysen entnommen (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Analyse der endokrinen Funktion transplanteder Langerhans-Inseln in das subkutane Gewebe diabetischer Mäuse.** Der T1D-Phänotyp wird 8 Tage (D-8) vor der Transplantation durch die einmalige Injektion von STZ (180 mg/kg) induziert. An Tag 0 (D0) werden 500 Langerhans-Inseln, 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF, 1000 Langerhans-Inseln oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF in das subkutane Gewebe des Empfängertieres transplantiert (linkes Bild; Maßstab: 2 mm). Der Blutglukosespiegel und das Körpergewicht werden 2-mal wöchentlich von D-8 bis Tag 108 (D108) gemessen. An Tag 105 (D105) wird ein IPGTT durchgeführt, das transplantierte Gewebe entnommen (rechtes Bild; Maßstab: 2 mm) und der Blutglukosespiegel 3 Tage nach der Transplantatentfernung gemessen, um die Rückkehr zur Hyperglykämie beobachten zu können. Zur Bestimmung der Insulin-Konzentration im Plasma und in den Transplantaten an D105 werden zusätzlichen Empfängertieren das Blut und die Niere entnommen. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

Drei Tage nach der Transplantatentfernung wurden die Blutglukosespiegel zum letzten Mal gemessen, um eine spontane Erholung der noch vorhandenen Langerhans-Inseln in den STZ-behandelten Tieren ausschließen zu können. Zusätzlichen Empfängertieren wurde an Tag 105 eine 10 %-ige Glukoselösung injiziert und 15 min danach das Blut entnommen, um Plasma herzustellen. Um den Insulingehalt der Transplantate bestimmen zu können, wurde diesen Versuchstieren ebenfalls das subkutane Gewebe mit den transplantierten Langerhans-Inseln explantiert (*Abbildung 47*).

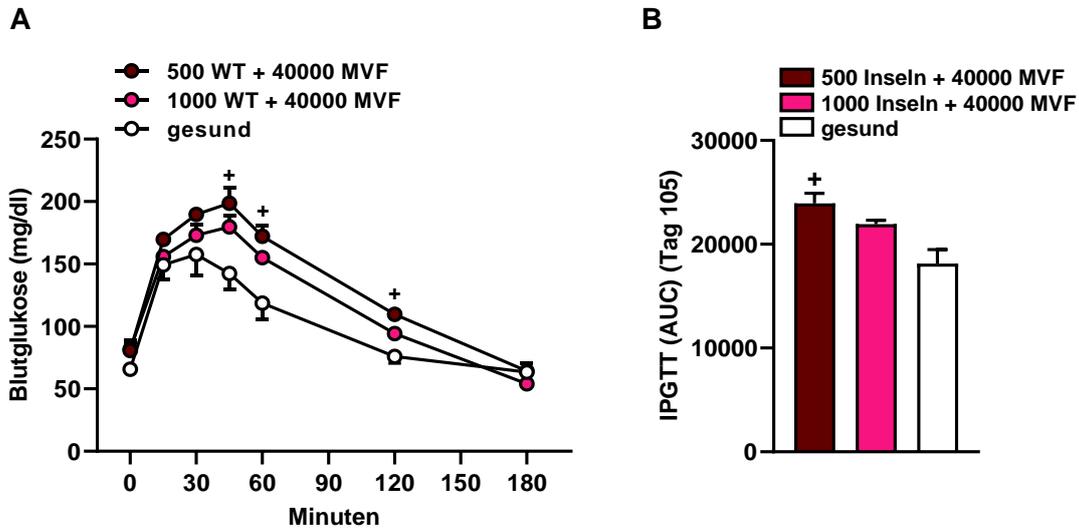
Bei der Analyse der Körpergewichte konnten während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Unterschiede zwischen den gesunden und diabetischen Mäusen, welchen 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden, festgestellt werden (*Abbildung 48A*). Dementsprechend unterschied sich auch die AUC der Körpergewichte nicht (*Abbildung 48B*). Die Positivkontrollen zeigten jedoch in den ersten 28 Tagen nach der Transplantation eine deutliche Reduktion der Körpergewichte, die mit sehr hohen Blutglukosespiegeln einherging (*Abbildung 48A und C*). Da beide Parameter auf einen schweren Diabetes hindeuten, mussten diese Mäuse aus dem Versuch genommen werden. Die Ko-Transplantation von 500 oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF verringerte die Hyperglykämie der Mäuse deutlich (*Abbildung 48C*). Interessanterweise konnten am Ende des Beobachtungszeitraums physiologische Blutglukosespiegel bei Mäusen, die eine Ko-Transplantation von 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF ( $179,2 \pm 15,7$  mg/dl) sowie von 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF ( $118,3 \pm 2,9$  mg/dl) erhielten, festgestellt werden. Zudem ist zu vermerken, dass die Blutglukosespiegel, der mit 1000 Langerhans-Inseln und 40000 MVF transplantierten Mäuse, den Blutglukosespiegeln von gesunden Mäusen ( $95,3 \pm 12,5$  mg/dl) entsprachen (*Abbildung 48C*). Die AUC der Blutglukosespiegel von Mäusen, die mit 1000 Langerhans-Inseln und 40000 MVF ko-transplantiert wurden, war im Vergleich zu der anderen Ko-Transplantationsgruppe signifikant reduziert (*Abbildung 48D*). Eine spontane Erholung der endogenen Langerhans-Inseln im Pankreas nach der STZ-Applikation konnte ausgeschlossen werden, da die Blutglukosespiegel nach der Transplantatentfernung an Tag 108 wieder deutlich erhöht waren (500 Langerhans-Inseln + 40000 MVF:  $399,7 \pm 11,9$  mg/dl; 1000 Langerhans-Inseln + 40000 MVF:  $395,3 \pm 5,8$  mg/dl) (*Abbildung 48C*).



**Abbildung 48: Bestimmung der Körpergewichte und Messung der Blutglukosespiegel der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell.** (A) Quantitative Analyse der Körpergewichte (g) von diabetischen Mäusen, welchen 500 Langerhans-Inseln, 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF, 1000 Langerhans-Inseln oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 105). Gesunde Mäuse dienen als Negativkontrolle (n = 6 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. (B) AUC der Körpergewichte von (A) der diabetischen Mäuse, welchen 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 105). Gesunde Mäuse dienen als Negativkontrolle (n = 6 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. (C) Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) von diabetischen Mäusen, welchen 500 Langerhans-Inseln, 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF, 1000 Langerhans-Inseln oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 108). Gesunde Mäuse dienen als Negativkontrolle (n = 6 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. (D) AUC der Blutglukosespiegel von (C) der diabetischen Mäuse, welchen 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden (Tag -8 bis Tag 105). Gesunde Mäuse dienen als Negativkontrolle (n = 6 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. +P < 0,05 vs. gesund; #P < 0,05 vs. 500 Inseln + 40000 MVF.

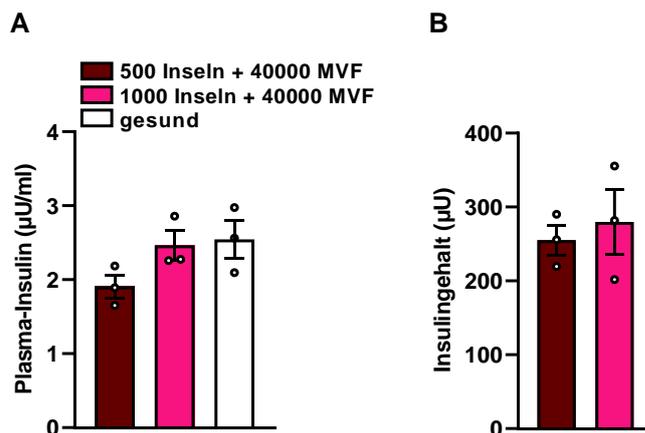
Mithilfe des IPGTT an Tag 105 nach der Transplantation konnte festgestellt werden, dass sich die Blutglukosespiegel von Mäusen, die eine Ko-Transplantation von 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF erhielten, im Vergleich zur anderen Ko-Transplantatgruppe und gesunden Kontrollgruppe nicht signifikant unterschieden (*Abbildung 49A*). Die Blutglukosespiegel der mit 500 Langerhans-Inseln und 40000 MVF ko-transplantierten Mäusen war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nach 45, 60 und 120 min signifikant erhöht (*Abbildung 49A*). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte die Analyse der AUC des IPGTT lediglich eine signifikante Erhöhung der Blutglukosespiegel von Mäusen, die mit 500 Langerhans-Inseln

und 40000 MVF transplantiert wurden, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 49B).



**Abbildung 49: IPGTT der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell. (A und B)** Quantitative Analyse der Blutglukosespiegel (mg/dl) während des IPGTT an Tag 105 (A) und entsprechende AUC (B) von diabetischen Mäusen, welchen 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle (n = 6 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. \*P < 0,05 vs. gesund.

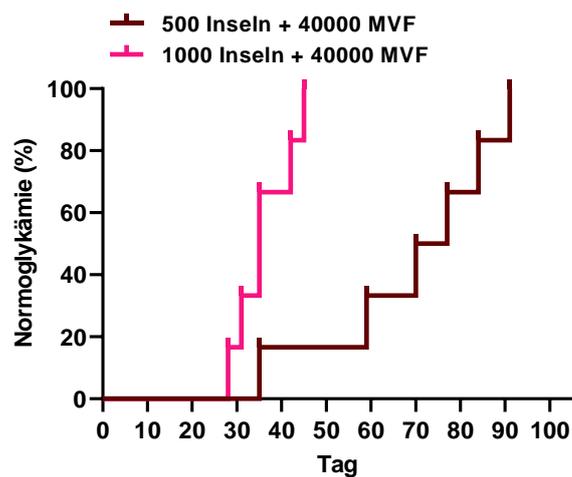
Die Analyse der Insulin-Konzentration im Plasma erfolgte an Tag 105. Hierfür wurden gesunde und diabetische Mäuse, die mit 500 oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF ko-transplantiert wurden, für 16 h gefastet. Anschließend wurde den Versuchstieren eine 10 %-ige Glukoselösung injiziert und die Insulin-Konzentration im Plasma bestimmt (Abbildung 50A).



**Abbildung 50: Insulin-Konzentration im Plasma und in den Transplantaten der Empfängertiere im STZ-induzierten diabetischen Mausmodell. (A)** Insulin-Konzentration (an Tag 105) im Plasma von diabetischen Mäusen, welchen 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden. Gesunde Mäuse dienten als Negativkontrolle. Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und in µU/ml dargestellt (n = 3 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM. **(B)** Insulingehalt (µU) der Transplantate an Tag 105 von diabetischen Mäusen, welchen 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF transplantiert wurden (n = 3 Tiere pro Gruppe). MW ± SEM.

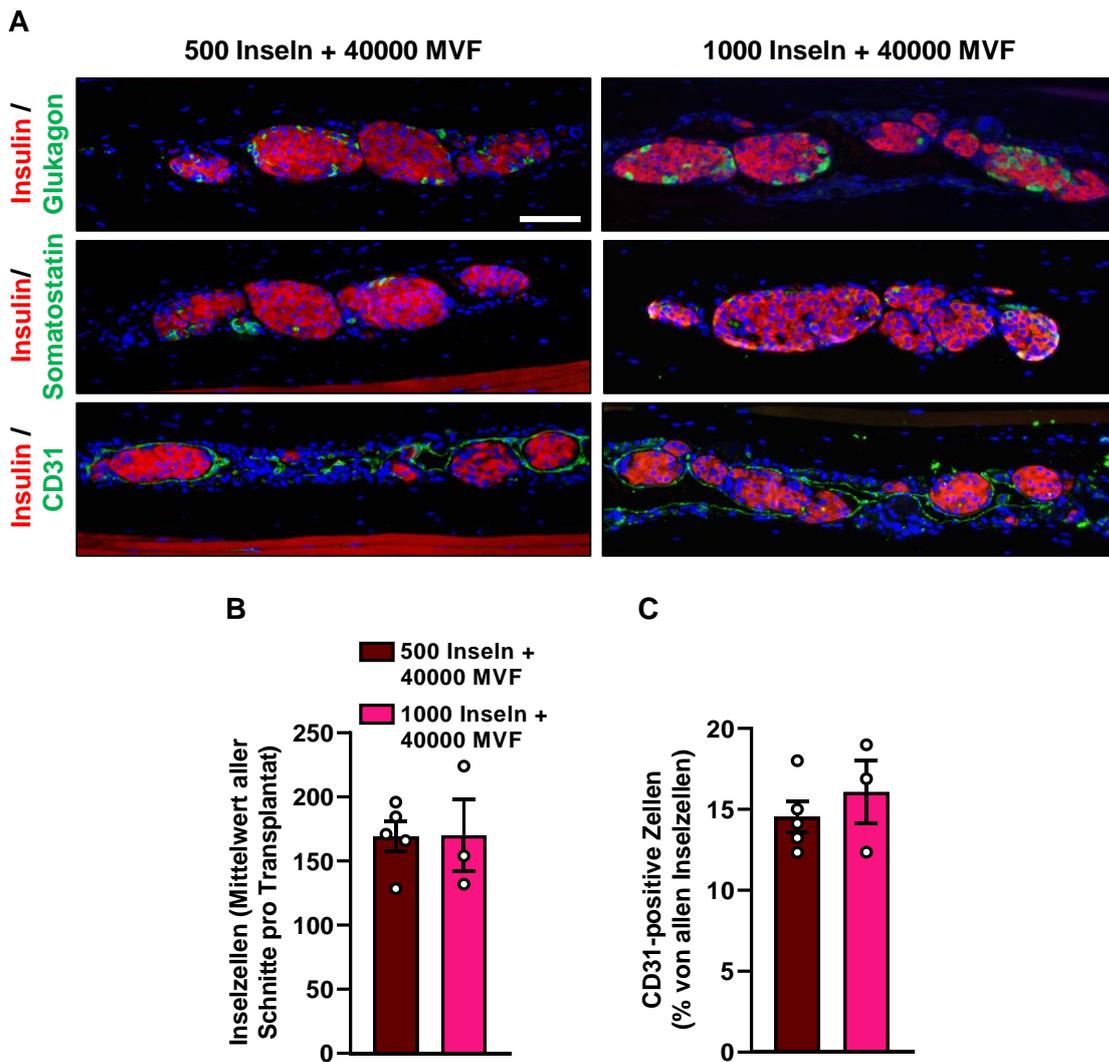
Wie erwartet, konnte eine tendenziell höhere Konzentration von Insulin im Plasma der Tiere, denen 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF ko-transplantiert wurden, im Vergleich zur anderen Ko-Transplantationsgruppe gemessen werden (*Abbildung 50A*). Zudem zeigte die Analyse, dass die Insulin-Konzentration der mit 1000 Langerhans-Inseln und 40000 MVF ko-transplantierten Mäuse identisch mit der Konzentration der gesunden Kontrollgruppe war (*Abbildung 50A*). Hingegen konnte kein Unterschied im Insulingehalt der Transplantate beider Ko-Transplantationsgruppen festgestellt werden (*Abbildung 50B*).

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen führte die Ko-Transplantation von 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF sowie von 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF bei allen Empfängertieren zur Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel (*Abbildung 51*). Hierbei war zu beobachten, dass alle Mäuse der Ko-Transplantationsgruppe von 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF erst an Tag 91 nach der Transplantation normoglykäm waren, wohingegen die mit 1000 Langerhans-Inseln und 40000 MVF transplantierten Mäuse schon an Tag 45 physiologische Blutglukosespiegel aufwiesen (*Abbildung 51*).



**Abbildung 51: Wiederherstellung einer Normoglykämie.** Anteil der diabetischen Mäuse, die nach der Transplantation von 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF oder 1000 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF eine Normoglykämie erreichten (n = 6 Tiere pro Gruppe).

Am Ende des *In-vivo*-Experiments wurden die Ko-Transplantate entnommen und ihre zelluläre Zusammensetzung analysiert. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass die Transplantate beider Gruppen Insulin-positive  $\beta$ -, Glukagon-positive  $\alpha$ - und Somatostatin-positive  $\delta$ -Zellen aufwiesen, jedoch wurde kein Unterschied in der Gesamtzahl der Inselzellen detektiert (*Abbildung 52A und B*). Auch der Anteil von CD31-positiven Endothelzellen war in den beiden Ko-Transplantationsgruppen nicht signifikant verschieden (*Abbildung 52A und C*).



**Abbildung 52: Zelluläre Zusammensetzung der Transplantate im subkutanen Gewebe.** (A) Repräsentative, immunhistochemische Färbungen von Insulin / Glukagon, Insulin / Somatostatin und Insulin / CD31 der Gruppe mit 500 Langerhans-Inseln und 40000 MVF sowie der Gruppe mit 1000 Langerhans-Inseln und 40000 MVF an Tag 105 nach deren Transplantation. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert. Maßstab: 100  $\mu$ m. (B) Quantitative Analyse der Inselzellen in der Gruppe mit 500 Langerhans-Inseln und 40000 MVF (n = 5 Tiere pro Gruppe) sowie der Gruppe mit 1000 Langerhans-Inseln und 40000 MVF (n = 3 Tiere pro Gruppe). Die gewonnenen Daten sind absolute Werte und als Mittelwert aller Schnitte pro Transplantat dargestellt. MW  $\pm$  SEM. (C) Quantitative Analyse der CD31-positiven Endothelzellen in der Gruppe mit 500 Langerhans-Inseln und 40000 MVF (n = 5 Tiere pro Gruppe) sowie der Gruppe mit 1000 Langerhans-Inseln und 40000 MVF (n = 3 Tiere pro Gruppe). Die gewonnenen Daten sind in % aller Inselzellen dargestellt. MW  $\pm$  SEM.

#### 6.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln untersucht. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass der Isolierungsprozess von Langerhans-Inseln und MVF deren zelluläre Zusammensetzung sowie Viabilität nicht beeinflusst. Unter Verwendung des STZ-induzierten diabetischen Mausmodells konnte nachgewiesen werden, dass die Ko-Transplantation von Langerhans-Inseln und MVF unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen innerhalb weniger Tage zur Wiederherstellung einer Normoglykämie

führt. Abschließend konnte gezeigt werden, dass diese vereinfachte Strategie auch im subkutanen Gewebe erfolgreich angewendet werden kann. So konnten durch die Ko-Transplantation einer höheren Anzahl von Langerhans-Inseln und MVF in das subkutane Gewebe von diabetischen Tieren ebenfalls physiologische Blutglukosespiegel erreicht werden.

## 7. Diskussion

Die Entwicklung des Edmonton-Protokolls im Jahr 2000 stellte einen Meilenstein im Bereich der Inseltransplantation dar, denn damit konnten die für die endokrinen Zellen toxischen Glucocorticoide zur Immunsuppression vermieden werden [Shapiro *et al.*, 2000]. Trotz dieser Verbesserung etablierte sich die Inseltransplantation bis heute nicht zu einer breit angewandten Therapieoption für T1D-Patienten [Shapiro *et al.*, 2001; Nyqvist *et al.*, 2011; Agarwal & Brayman, 2012; McCall & Shapiro, 2012; Bottino *et al.*, 2018; Pepper *et al.*, 2018;]. Hierfür ist vor allem die langandauernde und oft unzureichende Revaskularisierung und der damit verbundene Hypoxie-induzierte Zelltod der Transplantate verantwortlich [Brissova *et al.*, 2004; Emamaullee & Shapiro, 2007; Kobayashi, 2008; Nyqvist *et al.*, 2011; Paredes-Juarez *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2019]. Dementsprechend wurde in den letzten Jahren intensiv nach Strategien geforscht, die den Prozess der Revaskularisierung beschleunigen. Hierbei wurden nicht nur unterschiedliche pro-angiogene Substanzen und Wachstumsfaktoren verwendet, sondern es wurde auch die Ko-Kultivierung von isolierten Langerhans-Inseln mit Endothelzellen oder die Fusion von Inselzellen und MVF zu prävaskularisierten Pseudoinseln untersucht [Cheng *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2009; Golocheikine *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Coppens *et al.*, 2013; Barba-Gutierrez *et al.*, 2016; Staels *et al.*, 2018; Menger *et al.*, 2020a; Nalbach *et al.*, 2021b]. Allerdings verbesserten diese Strategien die Revaskularisierung der Transplantate nicht ausreichend, um die Transplantation von Langerhans-Inseln als echte Alternative zur Insulinsubstitution in der klinischen Praxis anzuwenden. Somit wird derzeit mit Hochdruck sowohl an der Identifizierung neuer pro-angiogener oder anti-inflammatorischer Faktoren als auch an der Etablierung neuer Vaskularisierungsstrategien, die den Prozess der Revaskularisierung beschleunigen, geforscht.

### 7.1 Einfluss von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln

Das NLRP3-Inflammasom ist ein zytoplasmatischer Multiproteinkomplex, der eine wichtige Funktion bei der angeborenen Immunantwort hat und verstärkt in Immunzellen exprimiert wird [Yashiro *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023]. Somit ist dieses Inflammasom auch an der Pathogenese unterschiedlichster Krankheiten, wie Arteriosklerose, Alzheimer und Parkinson, beteiligt [Wang *et al.*, 2020b]. Im Jahr 2018 wurde erstmalig beschrieben, dass NLRP3 auch in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln exprimiert wird und diese Expression nach Hypoxie-induziertem Stress hochreguliert wird [Chen *et al.*, 2018; Lebreton *et al.*, 2018]. Im Zusammenhang damit konnten Lavallard *et al.* [2020] eine deutlich erhöhte Expression von NLRP3, Casp1 und IL-1 $\beta$  in transplantierten Langerhans-Inseln nachweisen. Ebenfalls führt

der Verlust von NLRP3 zu einer verbesserten endokrinen Funktion isolierter Langerhans-Inseln. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NLRP3 auch bei der Transplantation von Langerhans-Inseln eine wichtige Funktion haben könnte. Aus diesem Grund sollte im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion transplanteder Langerhans-Inseln hat.

Der Isolationsprozess als auch die anschließende Kultivierung führen zu zellulärem und hypoxischem Stress innerhalb der Langerhans-Inseln. Dies begünstigt insbesondere bei Langerhans-Inseln mit großem Durchmesser die Entstehung von zentralen Nekrosen [Kauri *et al.*, 2003; MacGregor *et al.*, 2006; Suszynski *et al.*, 2014; Barisam *et al.*, 2018; Komatsu *et al.*, 2018; Saravanan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020a]. Studien zeigen, dass die Gegenwart verschiedener Substanzen während der Kultivierung zusätzlich die Langerhans-Inseln schädigen kann [Hashemitabar *et al.*, 2015; Rodríguez-Comas *et al.*, 2020]. Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit durchgeführte Isolierung und/oder Kultivierung der Langerhans-Inseln mit dem NLRP3-Inhibitor CY-09 die Viabilität der Langerhans-Inseln beeinträchtigt, wurden unterschiedliche Viabilitätsanalysen durchgeführt. Unter Verwendung der Propidiumiodid- und Calcein-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass sich weder die Isolierung noch die Inhibition von NLRP3 negativ auf die Viabilität von Langerhans-Inseln auswirkt. Da die Sensitivität dieser Methode gering ist und somit minimale Auswirkungen auf die Viabilität oft nicht detektiert werden können, wurde die Viabilität zusätzlich auf Einzelzellniveau mittels durchflusszytometrischen Analysen untersucht. Auch hier ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Verteilung von vitalen, apoptotischen, nekroptotischen und nekrotischen Zellen erkennen. Die immunhistochemischen Analysen der zellulären Zusammensetzung isolierter WT + Vehikel und WT + CY-09 Langerhans-Inseln zeigten ebenfalls keinen Unterschied in den Fraktionen der endokrinen  $\beta$ -,  $\alpha$ - und  $\delta$ -Zellen sowie der endothelialen Zellen. Folglich konnte im Rahmen dieser Analysen festgestellt werden, dass die Inhibition von NLRP3 keinen Einfluss auf die Viabilität und die zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln hat.

In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass NLRP3 sowohl eine entscheidende Funktion bei der endokrinen Funktion als auch bei der Stress-induzierten Entzündungsreaktion besitzt [Lebreton *et al.*, 2018; Sokolova *et al.*, 2018; Sharma & Kanneganti, 2021]. Ebenfalls wurde kürzlich von Lavallard *et al.* [2020] eine signifikant hochregulierte Expression von NLRP3 in transplantierten Langerhans-Inseln während der frühen post-Transplantationsphase nachgewiesen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit hypothetisiert, dass eine verringerte Aktivität von NLRP3 in isolierten Langerhans-Inseln nach deren Transplantation ihr Anwachsen verbessert. Diese Hypothese wurde anhand des Rückenhautkammer-Modells, welches eine repetitive intravitalfluoreszenzmikroskopische Analyse der Revaskularisierung

und Mikrozirkulation von transplantierten Langerhans-Inseln ermöglicht, überprüft [Menger *et al.*, 2020a; Nalbach *et al.*, 2021b; Wrublewsky *et al.*, 2022a]. Dabei kann nicht nur die revaskularisierte Fläche, die Anwachsrate und die endotheliale Fenestrierung der Insel-Transplantate analysiert werden, sondern es kann ebenfalls der Durchmesser, die Fließgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss neu gebildeter Blutgefäße innerhalb der transplantierten Langerhans-Inseln bestimmt werden [Lipowsky *et al.*, 1978; Vajkoczy *et al.*, 1995; Menger *et al.*, 2020a; Menger *et al.*, 2020b]. Mithilfe der hier durchgeführten *In-vivo*-Analysen konnte eine signifikant größere revaskularisierte Fläche und erhöhte Anwachsrate der transplantierten WT + CY-09 Langerhans-Inseln im Vergleich zu den WT + Vehikel Langerhans-Inseln detektiert werden. Ebenfalls war die endotheliale Fenestrierung der transplantierten Langerhans-Inseln nach Inhibition von NLRP3 deutlich erhöht. Diese Ergebnisse könnten durch die generell größere revaskularisierte Fläche und somit vermehrte Anzahl an Blutgefäßen innerhalb des Inselnetzwerkes begründet werden, wodurch vermehrt Rhodamin 6G die Blutgefäße passieren kann und sich in den Mitochondrien der umliegenden endokrinen Zellen ansammelt. In Übereinstimmung mit den *In-vivo*-Ergebnissen konnte im Rahmen zusätzlicher immunhistochemischer Analysen gezeigt werden, dass die Anzahl an Endothelzellen in den transplantierten WT + CY-09 Langerhans-Inseln im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ist. Diese Ergebnisse sind allerdings entgegen der Beobachtung von Chai *et al.* [2020]. Die Autoren fanden eine verringerte Sekretion pro-angiogener Zytokine sowie eine verminderte Expression von *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) und VEGF in retinalen Endothelzellen in Abhängigkeit einer reduzierten NLRP3-Aktivität. Zudem erhöhte eine NLRP3-Überexpression die Expression von HIF-1 $\alpha$  und VEGF [Chai *et al.*, 2020]. HIF-1 $\alpha$  wird in mehreren Studien als induzierender Faktor für die VEGF-Expression beschrieben und VEGF wiederum fördert angiogene Prozesse [Liu *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2021; Abhinand *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023a; Liu *et al.*, 2023b]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der VEGF-A-Expression zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dementsprechend kann nur spekuliert werden, dass die hier beobachtete beschleunigte Revaskularisierung HIF-1 $\alpha$ -unabhängig ist oder der NLRP3-abhängige anti-angiogene Effekt von einem pro-angiogenen Effekt übertroffen wird. Letzteres könnte durch die erhöhte Insulin-Sekretion nach NLRP3-Inhibition vermittelt werden, denn Insulin kann über die Bindung an den IR und IGF-1R von Endothelzellen deren Proliferation und somit die Bildung neuer Blutgefäße fördern [Straus, 1981; Shrader *et al.*, 2009; Sokolova *et al.*, 2018]. In der Tat zeigten die Ergebnisse deutlich, dass die Stimulation mit Insulin das Aussprossen von Endothelzellen und die Ausbildung von Gefäßmaschen signifikant verbessert, wohingegen diese Effekte durch die Inhibition des IR- und IGF-1R-Signalweges aufgehoben wurden. Interessanterweise hat die verringerte Aktivität von NLRP3 in Endothelzellen keinen Einfluss auf deren angiogene Aktivität. Daher kann davon ausgegangen werden, dass alleinig die

erhöhte Sekretion von Insulin nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 für die schnellere Entstehung neuer Blutgefäße verantwortlich ist.

Die Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln dauert mehrere Tage und erfordert sowohl die Angiogenese als auch in geringem Maße die Vaskulogenese [Contreras *et al.*, 2003; Asahara & Kawamoto, 2004; Brissova & Powers, 2008; Kang *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013; Mitsiou *et al.*, 2022]. Deng *et al.* [2017] berichteten, dass das Potential von EPC zu migrieren und gefäßähnliche Strukturen *in vitro* auszubilden, nach einer NLRP3-Inhibition deutlich erhöht ist. Zudem zeigte eine andere Studie, dass durch oxidiertes *low-density lipoprotein* (LDL) NLRP3 in EPC aktiviert wird und in Folge dessen deren Proliferation und Migration vermindert ist [Qian *et al.*, 2019]. Dementsprechend könnten residente EPC in transplantierten WT + CY-09 Langerhans-Inseln zur verbesserten Revaskularisierung beitragen. Allerdings ist deren Existenz in Langerhans-Inseln noch nicht bewiesen.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ist Voraussetzung für eine Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion [Navarro-Tableros *et al.*, 2007]. Interessanterweise ist auch die Aktivität von NLRP3 zumindest teilweise  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, denn eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht die Aktivität des Inflammasoms [Murakami *et al.*, 2012]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich untersucht, ob der Verlust von NLRP3 die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Insulin-Sekretion beeinflusst. Jedoch konnte kein Unterschied hinsichtlich des Glukose-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms zwischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln festgestellt werden. Folglich kann die hier beobachtete erhöhte Insulin-Sekretion nicht durch eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalübertragung begründet werden. In weiterführenden Experimenten, welche den zugrundeliegenden Mechanismus der erhöhten Insulin-Sekretion klären sollten, konnte nicht nur eine erhöhte Expression der Insulin-Gene *Ins1* und *Ins2* festgestellt werden, sondern es konnte mit dem Redox-Regulator TXNIP auch ein entscheidender Faktor identifiziert werden, der die Insulin-Genexpression indirekt induziert. TXNIP wird unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert, interagiert direkt mit NLRP3 und beeinflusst somit die Insulin-Sekretion negativ [Zhou *et al.*, 2010; Lavallard *et al.*, 2020]. Die Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus zeigte, dass TXNIP die Expression der microRNA (miRNA)-204 induziert [Xu *et al.*, 2013]. Die miRNA-204 wiederum bindet an die *MafA* mRNA, wodurch die Insulin-Genexpression reduziert wird [Xu *et al.*, 2013]. Ebenfalls ist bekannt, dass der *knockdown* von TXNIP in  $\beta$ -Zellen zu einer gesteigerten Expression von PDX-1 führt [Shao *et al.*, 2020]. Interessanterweise konnte in den hier durchgeführten Analysen sowohl ein geringerer Proteingehalt von TXNIP als auch eine erhöhte nukleäre Lokalisation von *MafA* und PDX-1 in hypoxischen *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann daher angenommen werden, dass die vermehrte nukleäre Lokalisation von *MafA* und PDX-1 die transkriptionelle Aktivität der Insulin-Expression und somit -Sekretion begünstigt. Zudem

wurde die direkte Interaktion von NLRP3 mit TXNIP untersucht, um die Ursache des reduzierten Proteingehalts des Redox-Regulators zu analysieren, denn eine reduzierte NLRP3-Genexpression könnte zu einer vermehrten Freisetzung und folglich zur Degradation von TXNIP führen. In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutlich reduzierte NLRP3/TXNIP-Interaktion nach Inflammasom-Inhibition detektiert werden. In diesem Kontext stehen auch die Ergebnisse von Matsuoka *et al.* [2020], welche eine reduzierte NLRP3-Genexpression nach Inhibition von NLRP3 zeigten. Insofern kann spekuliert werden, dass die Inhibition von NLRP3 die eigene Expression negativ reguliert.

Schließlich wurde noch untersucht, ob die erhöhte Insulin-Sekretion und somit die Insulin-abhängige verbesserte Revaskularisierung der WT + CY-09 Langerhans-Inseln auch zu einer beschleunigten Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel in diabetischen Tieren führt. Hierfür wurde das STZ-induzierte diabetische Mausmodell in Kombination mit der Transplantation von Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel verwendet. Seit nun fast 40 Jahren wird die Nierenkapsel als Transplantationsstelle für Langerhans-Inseln bei Nagetieren für präklinische Studien präferiert [Mellgren *et al.*, 1986]. Dies ist damit zu begründen, dass sich die Langerhans-Inseln unter der Nierenkapsel im Vergleich zu anderen Transplantationsstellen, wie dem Omentum, der Lunge, der Leber, der Milz oder der Muskulatur, nicht nur exakt lokalisieren lassen, sondern es ist auch möglich, eine Nephrektomie durchzuführen und die Transplantate für molekularbiologische und histologische Analysen zu explantieren [Hayek *et al.*, 1990; Hayek & Beattie, 1997; Kim *et al.*, 2010; Addison *et al.*, 2020]. Die Anzahl der zu transplantierenden Langerhans-Inseln, welche zur Senkung der Blutglukosespiegel diabetischer Tiere führt, ist sowohl abhängig von dem Gewicht und der Spezies der Empfänger als auch von der Transplantationsstelle [Hesse *et al.*, 1986; Zmuda *et al.*, 2011; Stokes *et al.*, 2017a; Stokes *et al.*, 2017b]. Zmuda *et al.* [2011] zeigten, dass die Transplantation von 150 bis 250 Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen mit einem Körpergewicht von 18 bis 20 g die Blutglukosespiegel nur leicht senkt. Allerdings führte die Transplantation von 300 Langerhans-Inseln zur Wiederherstellung einer Normoglykämie [Zmuda *et al.*, 2011]. Da in der vorliegenden Arbeit Mäuse mit einem Körpergewicht von ~25 g verwendet wurden, musste vor Beginn des Hauptversuches die kritische Anzahl der zu transplantierenden Langerhans-Inseln ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Dosisfindung zeigten, dass die Transplantation von 400 WT Langerhans-Inseln zu physiologischen Blutglukosespiegeln in den Empfängertieren führt, während Mäuse mit 200 und 300 transplantierten WT Langerhans-Inseln hyperglykäm bleiben. Basierend auf diesen Vorversuchen wurden 300 Langerhans-Inseln als kritische Anzahl für die Transplantation unter die Nierenkapsel von diabetischen Tieren verwendet. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust oder die Inhibition von NLRP3 in transplantierten Langerhans-Inseln die Blutglukosespiegel der Empfängertiere 7 Tage nach

der Transplantation signifikant erniedrigt und am Ende des Beobachtungszeitraums (28 Tage) zu physiologischen Blutglukosespiegeln führt.

Mehrere Studien zeigten bereits, dass die Behandlung von  $\beta$ -Zelllinien und Langerhans-Inseln mit IL-1 $\beta$  deren Insulin-Sekretion deutlich verschlechtert [Corbett & McDaniel, 1995; Burke *et al.*, 2015b; Sun *et al.*, 2020]. Für die Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$  ist die Casp1 verantwortlich, die innerhalb des NLRP3-Inflammasomkomplexes die katalytische Komponente darstellt [Kelley *et al.*, 2019]. Um zu untersuchen, ob die beschleunigte Wiederherstellung der Normoglykämie nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 durch IL-1 $\beta$  vermittelt wird, wurden in einem zusätzlichen Experiment 300 *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen transplantiert. Die Analyse der Blutglukosespiegel zeigte, dass sich diese zwar nach der Transplantation von *Casp1*<sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln verbesserten, aber über den ganzen Beobachtungszeitraum nicht zu einem physiologischen Level zurückkehrten. Dies deutet daraufhin, dass die verbesserte endokrine Funktion nach Verlust oder Inhibition von NLRP3 größtenteils durch NLRP3 selbst und weniger durch die katalytische Aktivität der Casp1 verursacht wird. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Casp1 neben IL-1 $\beta$  noch weitere Proteine, wie IL-18 und Sirtuin-1, spaltet und folglich diese die Inseltransplantation verschlechtern könnten [Molla *et al.*, 2020]. Um alleinig den Effekt von IL-1 $\beta$  auf die endokrine Funktion transplanteder Langerhans-Inseln untersuchen zu können, müssten entweder *IL-1 $\beta$* <sup>-/-</sup> Langerhans-Inseln transplantiert werden oder die WT Empfängertiere vor der Transplantation mit einem spezifischen IL-1-Rezeptor-Inhibitor behandelt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zudem eine signifikant reduzierte Anzahl von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in transplantierten WT + CY-09 Langerhans-Inseln im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle detektiert werden. Langerhans-Inseln besitzen ~2 % residente Makrophagen, die als potenzieller Modulator der T-Zellaktivierung agieren [Ferris *et al.*, 2017]. Des Weiteren führt Hypoxie zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Makrophagen, wodurch die Inflammasom-vermittelte Entzündung und die Casp1-abhängige Pyroptose induziert wird [Bergsbaken *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2020]. Dementsprechend ist es denkbar, dass die verminderte Aktivität von NLRP3 in den residenten Makrophagen der transplantierten Langerhans-Inseln und somit die verringerte Freisetzung der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie die Infiltration der Transplantate mit Makrophagen aus dem Empfängergewebe reduziert. Entsprechend berichteten Matsuoka *et al.* [2020] kürzlich, dass die Behandlung von diabetischen Mäusen mit dem NLRP3-Inhibitor MCC950 die hepatische Transplantation von Langerhans-Inseln aufgrund einer verringerten Makrophageninfiltration verbessert. Somit kann geschlossen werden, dass sich nicht nur die erhöhte Insulin-Sekretion, sondern auch die reduzierte

Immunzellinfiltration nach Inhibition von NLRP3 positiv auf die Transplantation von Langerhans-Inseln auswirkt.

In der Regel werden in der klinischen Praxis isolierte Langerhans-Inseln vor deren Transplantation kultiviert, um 1) den isolationsbedingten zellulären Stress zu reduzieren, 2) die Anzahl residenter Leukozyten zu verringern und 3) Azinus- und/oder apoptotische Zellen aus dem Isolat zu entfernen [Markmann *et al.*, 1990; Abdelli *et al.*, 2004; Rijkelijhuizen *et al.*, 2006; Noguchi *et al.*, 2015]. Dementsprechend empfiehlt das *Clinical Islet Transplantation*-Protokoll, die Kultivierung von Langerhans-Inseln vor deren Transplantation als Standardverfahren für die klinische Inseltransplantation [Rickels *et al.*, 2013]. Die in diesem Studienabschnitt angewandte Präkultivierungsstrategie mit dem NLRP3-Inhibitor CY-09 wäre somit ein in den klinischen Alltag einfach zu implementierender Schritt, welcher die klinische Inseltransplantation deutlich verbessern könnte.

### 7.1.1 Schlussfolgerung und Ausblick

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass eine verringerte Aktivität von NLRP3 in isolierten Langerhans-Inseln die Revaskularisierung nach deren Transplantation in Abhängigkeit von der erhöhten Insulinsekretion verbessert. Indirekt konnte somit ebenfalls das Spender-/Empfänger-Verhältnis gesenkt werden, da eine geringere Anzahl transplanteder *Nlrp3<sup>-/-</sup>* und WT + CY-09 Langerhans-Inseln benötigt wird, um physiologische Blutglukosespiegel in diabetischen Empfängertieren zu erreichen. Da in der vorliegenden Arbeit alle Experimente nur mit murinen Langerhans-Inseln durchgeführt wurden, stellt sich die Frage, ob die hier generierten Ergebnisse der NLRP3-Inhibition auch in humanen Langerhans-Inseln detektiert werden können. Murine Langerhans-Inseln unterscheiden sich nämlich nicht nur in ihrem zellulären Aufbau, sondern auch in der Sekretion von Insulin von humanen Langerhans-Inseln [Eizirik *et al.*, 1994; Cabrera *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Kilimnik *et al.*, 2012; Alcazar & Buchwald, 2019]. Um dies zu klären, müssten einige Schlüsselexperimente der vorliegenden Arbeit mit humanen Langerhans-Inseln durchgeführt werden. Hierzu sollten humane Langerhans-Inseln mit dem NLRP3-Inhibitor behandelt und deren endokrine Funktion *in vitro* untersucht werden. Zusätzlich könnten humane Langerhans-Inseln nach Inhibition von NLRP3 in diabetische immundefiziente Mäuse transplantiert werden, um deren Revaskularisierung und endokrine Funktion unter hyperglykämischen Bedingungen analysieren zu können.

## 7.2 Einfluss von MVF auf die Revaskularisierung und endokrine Funktion von Langerhans-Inseln

Um die Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln zu beschleunigen, stehen verschiedene pro-angiogene Strategien im Fokus der Forschung [Menger *et al.*, 2020a; Nalbach *et al.*, 2021b]. In einer vorangegangenen Studie zu dieser Arbeit konnte bereits ein vielversprechendes MVF-basiertes Konzept für die Inseltransplantation entwickelt werden [Nalbach *et al.*, 2021b]. Hierzu wurden prävasikularisierte Pseudoinseln durch die Fusion von Inselzellen und MVF generiert. Diese Pseudoinseln wiesen neben einer erhöhten Proliferationsrate auch eine hohe angiogene Aktivität auf, die durch eine parakrine Signaltransduktion zwischen Endothel- und  $\beta$ -Zellen vermittelt wurde. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Transplantation der kritischen Anzahl von 250 Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen nicht zu physiologischen Blutglukosespiegeln führt, wohingegen die identische Anzahl von prävasikularisierten Pseudoinseln eine Normoglykämie kurz nach deren Transplantation wiederherstellt [Nalbach *et al.*, 2021b]. Trotz dem Erfolg dieser Strategie ist die Generierung prävasikularisierter Pseudoinseln aufgrund des komplexen und zeitaufwändigen Kultivierungsverfahrens im klinischen Alltag nur schwer zu implementieren. Um dieses Problem zu lösen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Strategie entwickelt, um die erwähnte MVF-basierte Methode zu vereinfachen.

MVF stellen vielversprechende Vaskularisierungseinheiten dar und können durch eine einfache Vorgehensweise aus dem Fettgewebe von Mäusen, Ratten und Menschen isoliert werden [Wagner *et al.*, 1972; Wagner & Matthews, 1975; Laschke & Menger, 2015; Xu *et al.*, 2021]. Sie sind Gefäßsegmente aus Arteriolen, Venolen und Kapillaren, die eine physiologische Mikrogefäßmorphologie aufweisen und sich nach Transplantation schnell wieder miteinander sowie mit den umgebenden Blutgefäßen des Empfängers zu einem dichten Netzwerk verbinden [Hoying *et al.*, 1996; Frueh *et al.*, 2017b; Nalbach *et al.*, 2021a]. MVF bestehen neben Endothelzellen, Fibroblasten, MSC und Präadipozyten auch aus Perizyten [McDaniel *et al.*, 2014]. Letztere sind besonders wichtig, da sie durch den direkten Kontakt mit den Endothelzellen und der EZM vasokonstriktiv sowie vasodilatativ wirken und somit den kapillaren Blutfluss beeinflussen [Rucker *et al.*, 2000; Armulik *et al.*, 2005]. In Langerhans-Inseln besitzen Perizyten eine entscheidende Rolle, da sie deren endokrine Funktion regulieren [Sasson *et al.*, 2016]. Zudem sind sie an der vaskulären Regeneration beteiligt, indem sie durch die Ausschüttung pro-angiogener Faktoren die Bildung neuer Blutgefäße stimulieren [Juang *et al.*, 2015]. Wie schon im Fall der Langerhans-Inseln kann auch der Isolierungsprozess der MVF zu zellulärem Stress führen und somit deren Viabilität beeinträchtigen [Bottino *et al.*, 2004; Benton *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2012]. Anhand der hier

durchgeführten Viabilitätsanalysen konnte dies jedoch ausgeschlossen werden, da in einzelnen MVF nur wenige nekrotische Zellen nachweisbar waren.

In einem nächsten Schritt wurden isolierte Langerhans-Inseln und MVF einzeln oder zusammen unter die Nierenkapsel von STZ-induzierten diabetischen Tieren transplantiert. Nalbach *et al.* [2021b] konnten bereits zeigen, dass die Transplantation von 250 prävasikularisierten Pseudoinseln, in die insgesamt 50000 MVF inkorporiert sind, in diabetischen Tieren zu einer Wiederherstellung der Normoglykämie führt. Auf dieser Grundlage wurden in der vorliegenden Arbeit 250 Langerhans-Inseln und 20000 MVF verwendet. Die Ko-Transplantation von Langerhans-Inseln und MVF normalisierte den Blutglukosespiegel der Empfängertiere innerhalb von 14 Tagen. Hingegen führte die Transplantation der gleichen Anzahl von Langerhans-Inseln oder MVF alleine nicht zu einer Normoglykämie. Wie erwartet, konnten auch in der immunhistologischen Analyse der Ko-Transplantate deutlich mehr Blutgefäße im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. In Übereinstimmung damit wiesen die Ko-Transplantate ebenfalls eine höhere Anzahl von Inselzellen auf. Basierend auf diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die schnelle und adäquate Revaskularisierung, hervorgerufen durch die Ko-Transplantation der MVF, für das Überleben transplantiert Langerhans-Inseln verantwortlich ist.

Mehrere Studien berichteten bereits, dass die i.v. Transplantation von MSC die  $\beta$ -Zellen vor einem STZ-induzierten Zelltod schützt. Jedoch ist bis heute nicht geklärt, ob dieser schützende Effekt aus den von MSC sekretierten Faktoren, wie HGF und IGF-1, oder durch die MSC-vermittelte Inhibition der  $\beta$ -zellspezifischen T-Zellantwort resultiert [Urbán *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2012; Ionescu *et al.*, 2012; Izumoto-Akita *et al.*, 2015]. Um auszuschließen, dass nicht die in den MVF enthaltenen MSC den STZ-induzierten Diabetes mildern, sondern der hier beobachtete Effekt ausschließlich durch die verbesserte MVF-induzierte Revaskularisierung hervorgerufen wurde, wurden als zusätzliche Kontrollgruppe 20000 MVF alleine unter die Nierenkapsel diabetischer Tiere transplantiert. Hierbei zeigte sich, dass die transplantierten MVF nicht in der Lage waren, der Hyperglykämie entgegenzuwirken.

Wie schon zuvor erwähnt, stellt die Nierenkapsel die bevorzugte Transplantationsstelle für Langerhans-Inseln in präklinischen Studien dar [Mellgren *et al.*, 1986]. Jedoch findet sie aufgrund der häufigen Diabetes-bedingten Nierenkomplikationen keine Anwendung bei T1D-Patienten [Stokes *et al.*, 2017a]. Unter klinischen Bedingungen werden Langerhans-Inseln derzeit intrahepatisch transplantiert [Ricordi *et al.*, 1992; Luzi *et al.*, 2001; Cayabyab *et al.*, 2021]. Die Leber als Transplantationsstelle hat aber ebenfalls viele Nachteile, wie beispielsweise das Risiko einer Pfortaderthrombose, weshalb weiterhin nach alternativen Transplantationsstellen gesucht wird [Goto *et al.*, 2004; Sakata *et al.*, 2013]. Für die klinische Inseltransplantation würde insbesondere das subkutane Gewebe ein großes Potential bieten, denn diese Stelle ist nicht nur leicht zugänglich, sondern erlaubt auch die repetitive Kontrolle

der Transplantate sowie gegebenenfalls ihre minimalinvasive Entfernung [Merani *et al.*, 2008; Nishimura *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2011; Schubert *et al.*, 2013; Kikawa *et al.*, 2014; Sakata *et al.*, 2014]. Entsprechend wurde schon mehrfach versucht, das subkutane Gewebe als Transplantationsstelle zu etablieren. Dies war jedoch in den meisten Fällen erfolglos, da das subkutane Gewebe im Vergleich zu anderen Geweben eine relativ geringe Blutgefäßdichte besitzt, was den Prozess der Revaskularisierung transplantiertes Langerhans-Inseln deutlich erschwert [Yu *et al.*, 2020; Cayabyab *et al.*, 2021]. Bisherige Studien konnten nur mit großem experimentellem und/oder zeitlichem Aufwand das subkutane Gewebe als mögliche Transplantationsstelle erschließen [Fumimoto *et al.*, 2009; Pepper *et al.*, 2015]. Fumimoto *et al.* [2009] konnten beispielsweise zeigen, dass sich durch die Transplantation von Fettgewebe und zusätzlichen ADSC in das subkutane Gewebe diabetischer Tiere eine stark vaskularisierte Tasche bildet. Die anschließend in diese Tasche transplantierten Langerhans-Inseln fanden schnell Anschluss an das Empfänger-Gefäßnetzwerk, was zu physiologischen Blutglukosespiegeln führte [Fumimoto *et al.*, 2009]. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Pepper *et al.* [2015]. Ihnen ist es gelungen, eine vaskularisierte Tasche im subkutanen Gewebe durch die Implantation und Explantation eines Nylon-Katheters zu erzeugen. Auch hier fanden die nachfolgend transplantierten Langerhans-Inseln Anschluss an das Blutgefäßsystem des Empfängers [Pepper *et al.*, 2015]. Allerdings sind beide Ansätze, obwohl sie erfolgreich waren, aufgrund ihrer komplizierten und zeitintensiven Vorbehandlung des Empfängers nur schwer im klinischen Alltag umsetzbar.

Basierend auf unseren vielversprechenden *In-vivo*-Ergebnissen des Nierenkapsel-Modells sollte nachfolgend überprüft werden, ob die hier entwickelte Ko-Transplantationsstrategie auch das Überleben der Langerhans-Inseln im subkutanen Gewebe ermöglicht. Hierbei konnten nach der Ko-Transplantation von 500 Langerhans-Inseln mit 40000 MVF physiologische Blutglukosespiegel in allen zuvor diabetischen Tieren detektiert werden. Wie erwartet, führte die Ko-Transplantation der identischen Anzahl an MVF jedoch mit 1000 Langerhans-Inseln nicht nur zu einer beschleunigten Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel, sondern diese waren auch gegen Ende des Beobachtungszeitraums mit denen von gesunden Tieren vergleichbar. Im Gegensatz dazu mussten die Tiere, die alleinig mit 500 oder 1000 Langerhans-Inseln transplantiert wurden, aufgrund der Schwere des Diabetes nach 28 Tagen aus dem Versuch genommen werden. Interessanterweise berichteten Aghazadeh *et al.* [2021], dass 2000 ins subkutane Gewebe transplantierte Langerhans-Inseln zur Wiederherstellung einer Normoglykämie ausreichend waren. In dieser Studie wurden die Langerhans-Inseln jedoch vor der Transplantation in Kollagenhydrogele eingebettet, wodurch sich die konträren Ergebnisse der genannten und der vorliegenden Arbeit erklären lassen. In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass exogenes Kollagen die Viabilität von Langerhans-Inseln verbessern kann [Llacua *et al.*, 2018]. Zudem fördert das Kollagenhydrogel die vermehrte

Sekretion von VEGF und *platelet-derived growth factor* (PDGF) aus den MVF, wodurch die Gefäßneubildung stimuliert wird [Marech *et al.*, 2016; Salamone *et al.*, 2021]. Allerdings bringen Kollagenhydrogele auch einige Nachteile mit sich, weshalb sie sich zur Unterstützung der Transplantation von Langerhans-Inseln nur bedingt zur klinischen Anwendung eignen. Hierbei ist zu erwähnen, dass Kollagenhydrogele in ihrer Herstellung sehr variabel bezüglich ihrer mechanischen und strukturellen Eigenschaften sind. Dadurch ist die Standardisierung und Vergleichbarkeit in unterschiedlichen Studien nicht gewährleistet [Antoine *et al.*, 2014]. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch das Einbetten in ein Kollagenhydrogel kein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den Langerhans-Inseln und den MVF gewährleistet werden kann, wodurch sie oft räumlich voneinander getrennt liegen. Dies kann die Zeit, in der die Transplantate über Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden müssen, deutlich verlängern.

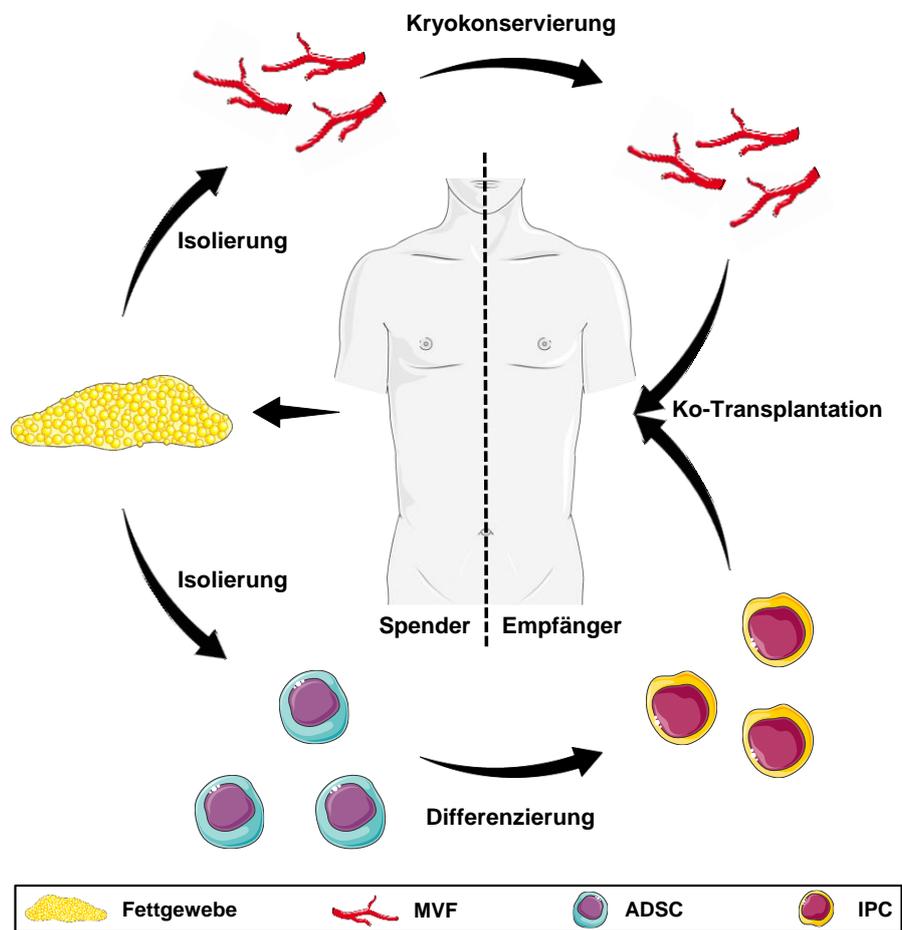
Zusammenfassend konnte in diesem Studienabschnitt eine einfache und effektive Methode zur Beschleunigung der Revaskularisierung von Langerhans-Inseln durch die Ko-Transplantation mit MVF etabliert werden. Diese Strategie ist sehr vielversprechend, da die Transplantation einer geringen Anzahl von Langerhans-Inseln zur schnellen Wiederherstellung physiologischer Blutglukosespiegel führt. Somit könnte das derzeit hohe Spender-/Empfänger-Verhältnis von 3-4:1 der klinischen Inseltransplantation, welches größtenteils durch die zu langsame Revaskularisierung der transplantierten Langerhans-Inseln bedingt ist, deutlich gesenkt werden. Darüber hinaus könnte diese Methode leicht in der klinischen Praxis angewendet werden, da sie komplexe und zeitaufwändige Tissue Engineering Methoden umgeht.

### 7.2.1 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ko-Transplantation von Langerhans-Inseln und MVF könnte den Erfolg der klinischen Inseltransplantation deutlich verbessern. Diese Methode ermöglicht nicht nur das subkutane Gewebe als Transplantationsstelle, sondern beschleunigt auch die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans-Inseln und könnte somit auch das derzeit benötigte hohe Spender-/Empfänger-Verhältnis reduzieren. Die hier entwickelte Ko-Transplantationsstrategie könnte auch in Kombination mit *β-cell-replacement*-Therapien, bei denen iPSC oder hESC zu IPC differenziert und anschließend transplantiert werden, angewendet werden [Timper *et al.*, 2006; Bose *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2012; Sasaki & Miyatsuka, 2023].

Das Wunschziel der Inseltransplantationsforschung ist jedoch nicht nur eine schnelle sowie adäquate Revaskularisierung der Transplantate und die Senkung des Spender-/Empfänger-Verhältnisses, sondern auch der Verzicht auf eine immunsuppressive Therapie nach Transplantation. Diese Anforderung könnte zukünftig erfüllt werden, indem ADSC für die

Differenzierung zu IPC verwendet werden. Diese haben den großen Vorteil, dass sie zum einen in großer Anzahl aus dem Eigenfett des T1D-Patienten isoliert werden können und zum anderen nach deren Transplantation in den gleichen Patienten keine Abstoßungsreaktion aufgrund ihrer Syngenetität hervorrufen [Araki *et al.*, 2013; de Almeida *et al.*, 2014]. Diese *β-cell-replacement*-Methode in Kombination mit in der hier etablierten Ko-Transplantation von MVF könnte somit alle drei Limitationen der klinischen Inseltransplantation überwinden. Hierbei könnten aus dem subkutanen Eigenfett des T1D-Patienten sowohl die MVF als auch die ADSC gewonnen werden. Während der langen Differenzierungszeit der ADSC zu IPC wäre es möglich, die Viabilität und das angiogene Potential der MVF durch Kryokonservierung zu erhalten [Laschke *et al.*, 2018]. Anschließend könnten die IPC und aufgetauten MVF in den Patienten ko-transplantiert werden (Abbildung 53).



**Abbildung 53: Schematische Darstellung einer zukünftigen Alternative zur derzeitigen Durchführung der klinischen Inseltransplantation.** Aus dem Fettgewebe eines T1D-Patienten werden sowohl MVF als auch ADSC isoliert. Die MVF werden während der Differenzierung der ADSC zu IPC kryokonserviert. Anschließend werden die IPC mit den MVF in den gleichen T1D-Patienten ko-transplantiert. (Erstellt mithilfe von Servier Medical Art)

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Abdelli S, Ansite J, Roduit R, Borsello T, Matsumoto I, Sawada T, Allaman-Pillet N, Henry H, Beckmann JS, Hering BJ, Bonny C.** Intracellular stress signaling pathways activated during human islet preparation and following acute cytokine exposure. *Diabetes* 53: 2815-2823, 2004
2. **Abhinand CS, Galipon J, Mori M, Ramesh P, Prasad TSK, Raju R, Sudhakaran PR, Tomita M.** Temporal phosphoproteomic analysis of VEGF-A signaling in HUVECs: An insight into early signaling events associated with angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 17: 1067-1079, 2023
3. **Addison P, Fatakhova K, Rodriguez Rilo HL.** Considerations for an alternative site of islet cell transplantation. *J Diabetes Sci Technol* 14: 338-344, 2020
4. **Agarwal A, Brayman KL.** Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes. *Semin Intervent Radiol* 29: 90-98, 2012
5. **Aghazadeh Y, Poon F, Sarangi F, Wong FTM, Khan ST, Sun X, Hatkar R, Cox BJ, Nunes SS, Nostro MC.** Microvessels support engraftment and functionality of human islets and hESC-derived pancreatic progenitors in diabetes models. *Cell Stem Cell* 28: 1936-1949, 2021
6. **Alcazar O, Buchwald P.** Concentration-dependency and time profile of insulin secretion: Dynamic perfusion studies with human and murine islets. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 680, 2019
7. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33 Suppl 1: S62-69, 2011
8. **Antoine EE, Vlachos PP, Rylander MN.** Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: Characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Eng Part B Rev* 20: 683-696, 2014
9. **Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M.** Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 494: 100-104, 2013
10. **Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C.** Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97: 512-523, 2005
11. **Arneth B, Arneth R, Shams M.** Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. *Int J Mol Sci* 20: 2467, 2019
12. **Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L.** Type 2 diabetes mellitus: A review of multi-target drugs. *Molecules* 25: 1987, 2020

13. **Asahara T, Kawamoto A.** Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C572-579, 2004
14. **Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, Zaremba A, Miller RH.** Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci* 15: 862-870, 2012
15. **Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG.** The role of endothelial progenitor cells in postnatal vasculogenesis: Implications for therapeutic neovascularization and wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2: 283-295, 2013
16. **Barba-Gutierrez DA, Daneri-Navarro A, Villagomez-Mendez JJA, Kanamune J, Robles-Murillo AK, Sanchez-Enriquez S, Villafan-Bernal JR, Rivas-Carrillo JD.** Facilitated engraftment of isolated islets coated with expanded vascular endothelial cells for islet transplantation. *Transplant Proc* 48: 669-672, 2016
17. **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
18. **Baum C, von Kalle C, Staal FJ, Li Z, Fehse B, Schmidt M, Weerkamp F, Karlsson S, Wagemaker G, Williams DA.** Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* 9: 5-13, 2004
19. **Benton RL, Maddie MA, Worth CA, Mahoney ET, Hagg T, Whitemore SR.** Transcriptomic screening of microvascular endothelial cells implicates novel molecular regulators of vascular dysfunction after spinal cord injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1771-1785, 2008
20. **Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT.** Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7: 99-109, 2009
21. **Berney T, Secchi A.** Rapamycin in islet transplantation: Friend or foe? *Transpl Int* 22: 153-161, 2009
22. **Boker A, Rothenberg L, Hernandez C, Kenyon NS, Ricordi C, Alejandro R.** Human islet transplantation: Update. *World J Surg* 25: 481-486, 2001
23. **Bose B, Shenoy SP, Konda S, Wangikar P.** Human embryonic stem cell differentiation into insulin secreting  $\beta$ -cells for diabetes. *Cell Biol Int* 36: 1013-1020, 2012
24. **Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, Milton M, Ziegenfuss A, Trucco M, Piganelli JD.** Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 53: 2559-2568, 2004
25. **Bottino R, Knoll MF, Knoll CA, Bertera S, Trucco MM.** The future of islet transplantation is now. *Front Med (Lausanne)* 5: 202, 2018

26. **Bouïs D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GA.** A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacol Res* 53: 89-103, 2006
27. **Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC.** Intraislet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. *Diabetes* 53: 1318-1325, 2004
28. **Brissova M, Powers AC.** Revascularization of transplanted islets: Can it be improved? *Diabetes* 57: 2269-2271, 2008
29. **Bruni A, Gala-Lopez B, Pepper AR, Abualhassan NS, Shapiro AMJ.** Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: Recent advances and future challenges. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 211-223, 2014
30. **Burke GW 3rd, Vendrame F, Viridi SK, Ciancio G, Chen L, Ruiz P, Messinger S, Reijonen HK, Pugliese A.** Lessons from pancreas transplantation in type 1 diabetes: Recurrence of islet autoimmunity. *Curr Diab Rep* 15: 121, 2015a
31. **Burke SJ, Stadler K, Lu D, Gleason E, Han A, Donohoe DR, Rogers RC, Hermann GE, Karlstad MD, Collier JJ.** IL-1 $\beta$  reciprocally regulates chemokine and insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells via NF- $\kappa$ B. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E715-726, 2015b
32. **Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A.** The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2334-2339, 2006
33. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000
34. **Cauwenbergh G.** Safety aspects of ketoconazole, the most commonly used systemic antifungal. *Mycoses* 32 Suppl 2: 59-63, 1989
35. **Cayabyab F, Nih LR, Yoshihara E.** Advances in pancreatic islet transplantation sites for the treatment of diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 732431, 2021
36. **Chai G, Liu S, Yang H, Du G, Chen X.** NLRP3 blockade suppresses pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokine secretion in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13: 3047-3058, 2020
37. **Chen C, Ma X, Yang C, Nie W, Zhang J, Li H, Rong P, Yi S, Wang W.** Hypoxia potentiates LPS-induced inflammatory response and increases cell death by promoting NLRP3 inflammasome activation in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem Biophys Res Commun* 495: 2512-2518, 2018
38. **Chen G, Pedra JHF.** The inflammasome in host defense. *Sensors (Basel)* 10: 97-111, 2010

39. **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
40. **Cho JH, Li ZA, Zhu L, Muegge BD, Roseman HF, Lee EY, Utterback T, Woodhams LG, Bayly PV, Hughes JW.** Islet primary cilia motility controls insulin secretion. *Sci Adv* 8: eabq8486, 2022
41. **Chung H, Hong SJ, Choi SW, Koo JY, Kim M, Kim HJ, Park SB, Park CG.** High mobility group box 1 secretion blockade results in the reduction of early pancreatic islet graft loss. *Biochem Biophys Res Commun* 514: 1081-1086, 2019
42. **Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, Chasan-Taber L, Albright AL, Braun B, American College of Sports Medicine, American Diabetes Association.** Exercise and type 2 diabetes: The American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: Joint position statement. *Diabetes Care* 33: e147-167, 2010
43. **Contreras JL, Smyth CA, Eckstein C, Bilbao G, Thompson JA, Young CJ, Eckhoff DE.** Peripheral mobilization of recipient bone marrow-derived endothelial progenitor cells enhances pancreatic islet revascularization and engraftment after intraportal transplantation. *Surgery* 134: 390-398, 2003
44. **Conway EM, Collen D, Carmeliet P.** Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521, 2001
45. **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
46. **Corbett JA, McDaniel ML.** Intra-islet release of interleukin 1 inhibits  $\beta$  cell function by inducing  $\beta$  cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 181: 559-568, 1995
47. **Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M, Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group.** National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378: 31-40, 2011
48. **de Almeida PE, Meyer EH, Kooreman NG, Diecke S, Dey D, Sanchez-Freire V, Hu S, Ebert A, Odegaard J, Mordwinkin NM, Brouwer TP, Lo D, Montoro DT, Longaker MT, Negrin RS, Wu JC.** Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nat Commun* 5: 3903, 2014
49. **Dean PG, Kukla A, Stegall MD, Kudva YC.** Pancreas transplantation. *BMJ* 357: j1321, 2017

50. **DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, Hu FB, Kahn CR, Raz I, Shulman GI, Simonson DC, Testa MA, Weiss R.** Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 1: 15019, 2015
51. **Delangre E, Liu J, Tolu S, Maouche K, Armanet M, Cattan P, Pommier G, Bailbé D, Movassat J.** Underlying mechanisms of glucocorticoid-induced  $\beta$ -cell death and dysfunction: A new role for glycogen synthase kinase 3. *Cell Death Dis* 12: 1136, 2021
52. **Delaune V, Berney T, Lacotte S, Toso C.** Intraportal islet transplantation: The impact of the liver microenvironment. *Transpl Int* 30: 227-238, 2017
53. **Deng Y, Han X, Yao Z, Sun Y, Yu J, Cai J, Ren G, Jiang G, Han F.** PPAR $\alpha$  agonist stimulated angiogenesis by improving endothelial precursor cell function via a NLRP3 inflammasome pathway. *Cell Physiol Biochem* 42: 2255-2266, 2017
54. **De Vriese AS, Verbeuren TJ, Vallez MO, Lameire NH, De Buyzere M, Vanhoutte PM.** Off-line analysis of red blood cell velocity in renal arterioles. *J Vasc Res*, 37: 26-31, 2000
55. **Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellerström C, Andersson A.** Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic  $\beta$ -cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9253-9256, 1994
56. **Elk N, Iwuchukwu OF.** Using personalized medicine in the management of diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 37: 1131-1149, 2017
57. **Emamaullee JA, Shapiro AMJ.** Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation. *Cell Transplant* 16: 1-8, 2007
58. **Ferris ST, Zakharov PN, Wan X, Calderon B, Artyomov MN, Unanue ER, Carrero JA.** The islet-resident macrophage is in an inflammatory state and senses microbial products in blood. *J Exp Med* 214: 2369-2385, 2017
59. **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
60. **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* 122: 55721, 2017b
61. **Frueh FS, Gassert L, Scheuer C, Müller A, Fries P, Boewe AS, Ampofo E, Rube CE, Menger MD, Laschke MW.** Adipose tissue-derived microvascular fragments promote lymphangiogenesis in a murine lymphedema model. *J Tissue Eng* 13: 20417314221109957, 2022

62. **Fumimoto Y, Matsuyama A, Komoda H, Okura H, Lee CM, Nagao A, Nishida T, Ito T, Sawa Y.** Creation of a rich subcutaneous vascular network with implanted adipose tissue-derived stromal cells and adipose tissue enhances subcutaneous grafting of islets in diabetic mice. *Tissue Eng Part C Methods* 15: 437-444, 2009
63. **Furman BL.** Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 70: 5.47.1-5.47.20, 2015
64. **Gargiulo P, Giusti C, Pietrobono D, La Torre D, Diacono D, Tamburrano G.** Diabetes mellitus and retinopathy. *Dig Liver Dis* 36 Suppl 1: S101-105, 2004
65. **Golocheikine A, Tiriveedhi V, Angaswamy N, Benshoff N, Sabarinathan R, Mohanakumar T.** Cooperative signaling for angiogenesis and neovascularization by VEGF and HGF following islet transplantation. *Transplantation* 90: 725-731, 2010
66. **Goto M, Johansson H, Maeda A, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B.** Low molecular weight dextran sulfate prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets. *Transplantation* 77: 741-747, 2004
67. **Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP.** Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43: 725-730, 1987
68. **Hafiz MM, Faradji RN, Froud T, Pileggi A, Baidal DA, Cure P, Ponte G, Poggioli R, Cornejo A, Messinger S, Ricordi C, Alejandro R.** Immunosuppression and procedure-related complications in 26 patients with type 1 diabetes mellitus receiving allogeneic islet cell transplantation. *Transplantation* 80: 1718-1728, 2005
69. **Hashemitabar M, Bahramzadeh S, Saremy S, Nejaddehbashi F.** Glucose plus metformin compared with glucose alone on  $\beta$ -cell function in mouse pancreatic islets. *Biomed Rep* 3: 721-725, 2015
70. **Hayek A, Lopez AD, Beattie GM.** Factors influencing islet transplantation. Number, location, and metabolic control. *Transplantation* 49: 224-225, 1990
71. **Hayek A, Beattie GM.** Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2471-2475, 1997
72. **Hesse U, Sutherland DE, Florack G, Field J, Ward S, Najarian JS.** Comparison of two methods of islet preparation and transplantation in dogs. *Diabetes* 35: 1109-1118, 1986
73. **Hirsch IB, Farkas-Hirsch R, Skyler JS.** Intensive insulin therapy for treatment of type I diabetes. *Diabetes Care* 13: 1265-1283, 1990
74. **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

75. **Ionescu L, Byrne RN, van Haften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, Weissmann G, Hall A, Eaton F, Thébaud B.** Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: In vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L967-977, 2012
76. **Izumoto-Akita T, Tsunekawa S, Yamamoto A, Uenishi E, Ishikawa K, Ogata H, Iida A, Ikeniwa M, Hosokawa K, Niwa Y, Maekawa R, Yamauchi Y, Seino Y, Hamada Y, Hibi H, Arima H, Ueda M, Oiso Y.** Secreted factors from dental pulp stem cells improve glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetic mice by increasing pancreatic beta-cell function. *BMJ Open Diabetes Res Care* 3: e000128, 2015
77. **Jansson L, Carlsson PO.** Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* 45: 749-763, 2002
78. **Jeon K, Lim H, Kim JH, Thuan NV, Park SH, Lim YM, Choi HY, Lee ER, Kim JH, Lee MS, Cho SG.** Differentiation and transplantation of functional pancreatic beta cells generated from induced pluripotent stem cells derived from a type 1 diabetes mouse model. *Stem Cells Dev* 21: 2642-2655, 2012
79. **Jiang H, He H, Chen Y, Huang W, Cheng J, Ye J, Wang A, Tao J, Wang C, Liu Q, Jin T, Jiang W, Deng X, Zhou R.** Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *J Exp Med* 214: 3219-3238, 2017
80. **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
81. **Kang S, Park HS, Jo A, Hong SH, Lee HN, Lee YY, Park JS, Jung HS, Chung SS, Park KS.** Endothelial progenitor cell cotransplantation enhances islet engraftment by rapid revascularization. *Diabetes* 61: 866-876, 2012
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. **Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y.** The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci* 20: 3328, 2019
84. **Kerby A, Jones ES, Jones PM, King AJ.** Co-transplantation of islets with mesenchymal stem cells in microcapsules demonstrates graft outcome can be improved in an isolated-graft model of islet transplantation in mice. *Cytotherapy* 15: 192-200, 2013
85. **Kikawa K, Sakano D, Shiraki N, Tsuyama T, Kume K, Endo F, Kume S.** Beneficial effect of insulin treatment on islet transplantation outcomes in Akita mice. *PLoS One* 9: e95451, 2014
86. **Kilimnik G, Jo J, Perival V, Zielinski MC, Hara M.** Quantification of islet size and architecture. *Islets* 4: 167-172, 2012

87. **Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M.** Islet architecture: A comparative study. *Islets* 1: 129-136, 2009
88. **Kim HI, Yu JE, Park CG, Kim SJ.** Comparison of four pancreatic islet implantation sites. *J Korean Med Sci* 25: 203-210, 2010
89. **Kobayashi N.** The current status of islet transplantation and its perspectives. *Rev Diabet Stud* 5: 136-143, 2008
90. **Kolka CM, Bergman RN.** The barrier within: Endothelial transport of hormones. *Physiology (Bethesda)* 27: 237-247, 2012
91. **Komatsu H, Kandeel F, Mullen Y.** Impact of oxygen on pancreatic islet survival. *Pancreas* 47: 533-543, 2018
92. **Konstantinova I, Lammert E.** Microvascular development: Learning from pancreatic islets. *Bioessays* 26: 1069-1075, 2004
93. **Korbutt GS, Elliott JF, Ao Z, Smith DK, Warnock GL, Rajotte RV.** Large scale isolation, growth, and function of porcine neonatal islet cells. *J Clin Invest* 97: 2119-2129, 1996
94. **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; discussion 164-167, 2011
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, Karschnia P, Scheuer C, Heß A, Metzger W, Menger MD.** Effects of cryopreservation on adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng Regen Med* 12: 1020-1030, 2018
97. **Laschke MW, Menger MD.** Microvascular fragments in microcirculation research and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 28: 1109-1120, 2022
98. **Lavallard V, Cottet-Dumoulin D, Wassmer CH, Rouget C, Parnaud G, Brioudes E, Lebreton F, Bellofatto K, Berishvili E, Berney T, Bosco D.** NLRP3 inflammasome is activated in rat pancreatic islets by transplantation and hypoxia. *Sci Rep* 10: 7011, 2020
99. **Lebreton F, Berishvili E, Parnaud G, Rouget C, Bosco D, Berney T, Lavallard V.** NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets. *Cell Death Dis* 9: 726, 2018
100. **Leto D, Saltiel AR.** Regulation of glucose transport by insulin: Traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 383-396, 2012
101. **Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW.** The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ Res* 43: 738-749, 1978

- 
102. **Liu J, Liu Y, Wang H, Hao H, Han Q, Shen J, Shi J, Li C, Mu Y, Han W.** Direct differentiation of hepatic stem-like WB cells into insulin-producing cells using small molecules. *Sci Rep* 3: 1185, 2013
103. **Liu J, Kang H, Lu J, Dai Y, Wang F.** Experimental study of the effects of hypoxia simulator on osteointegration of titanium prosthesis in osteoporotic rats. *BMC Musculoskelet Disord* 22: 944, 2021
104. **Liu L, Han Q, Cai J, Xiao M, Huang D, Cao J.** The clinical validity of miR-126 as a prognostic marker in epithelial ovarian cancer. *Medicine (Baltimore)* 102: e33085, 2023a
105. **Liu Y, Qu HC, Huang Y.** Renal clear cell carcinoma-derived CXCL5 drives tumor-associated fibroblast formation and facilitates cancer progression. *Pathol Res Pract* 244: 154319, 2023b
106. **Llacia LA, Hoek A, de Haan BJ, de Vos P.** Collagen type VI interaction improves human islet survival in immunisolating microcapsules for treatment of diabetes. *Islets* 10: 60-68, 2018
107. **Long Y, Liu X, Tan XZ, Jiang CX, Chen SW, Liang GN, He XM, Wu J, Chen T, Xu Y.** ROS-induced NLRP3 inflammasome priming and activation mediate PCB 118-induced pyroptosis in endothelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 189: 109937, 2020
108. **Luzi L, Perseghin G, Brendel MD, Terruzzi I, Battezzati A, Eckhard M, Brandhorst D, Brandhorst H, Friemann S, Socci C, Di Carlo V, Piceni Sereni L, Benedini S, Secchi A, Pozza G, Bretzel RG.** Metabolic effects of restoring partial  $\beta$ -cell function after islet allotransplantation in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 50: 277-282, 2001
109. **MacGregor RR, Williams SJ, Tong PY, Kover K, Moore WV, Stehno-Bittel L.** Small rat islets are superior to large islets in in vitro function and in transplantation outcomes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E771-779, 2006
110. **Marech I, Leporini C, Ammendola M, Porcelli M, Gadaleta CD, Russo E, de Sarro G, Ranieri G.** Classical and non-classical proangiogenic factors as a target of antiangiogenic therapy in tumor microenvironment. *Cancer Lett* 380: 216-226, 2016
111. **Markmann JF, Tomaszewski J, Posselt AM, Levy MM, Woehrle M, Barker CF, Najj A.** The effect of islet cell culture in vitro at 24 degrees C on graft survival and MHC antigen expression. *Transplantation* 49: 272-277, 1990
112. **Marneros AG.** VEGF-A and the NLRP3 inflammasome in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 854: 79-85, 2016
113. **Matsumoto S, Noguchi H, Naziruddin B, Onaca N, Jackson A, Nobuyo H, Teru O, Naoya K, Klintmalm G, Levy M.** Improvement of pancreatic islet cell isolation for transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 20: 357-362, 2007

114. **Matsuoka T, Yoshimatsu G, Sakata N, Kawakami R, Tanaka T, Yamada T, Yoshida Y, Hasegawa S, Kodama S.** Inhibition of NLRP3 inflammasome by MCC950 improves the metabolic outcome of islet transplantation by suppressing IL-1 $\beta$  and islet cellular death. *Sci Rep* 10: 17920, 2020
115. **McCall M, Shapiro AMJ.** Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007823, 2012
116. **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
117. **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
118. **Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B.** Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* 25: 509-515, 2001
119. **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
120. **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
121. **Menger MM, Nalbach L, Roma LP, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E.** Erythropoietin exposure of isolated pancreatic islets accelerates their revascularization after transplantation. *Acta Diabetol* 58: 1637-1647, 2021
122. **Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AMJ.** Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg* 95: 1449-1461, 2008
123. **Mitsiou G, Tokmakidis SP, Dinas PC, Smilios I, Nanas S.** Endothelial progenitor cell mobilization based on exercise volume in patients with cardiovascular disease and healthy individuals: A systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J Open* 2: oeac078, 2022
124. **Molla MD, Akalu Y, Geto Z, Dagneb B, Ayelign B, Shibabaw T.** Role of caspase-1 in the pathogenesis of inflammatory-associated chronic noncommunicable diseases. *J Inflamm Res* 13: 749-764, 2020
125. **Morgan MJ, Liu ZG.** Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res* 21: 103-115, 2011
126. **Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Horng T.** Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 11282-11287, 2012

- 
127. **Nalbach L, Müller D, Wrublewsky S, Metzger W, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E.** Microvascular fragment spheroids: Three-dimensional vascularization units for tissue engineering and regeneration. *J Tissue Eng* 12: 20417314211035593, 2021a
128. **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, Manning Fox JE, MacDonald PE, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E.** Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels. *EMBO Mol Med* 13: e12616, 2021b
129. **Navarro-Tableros V, Fiordeliso T, Hernández-Cruz A, Hiriart M.** Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat  $\beta$ -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1018-1029, 2007
130. **Negi S, Park SH, Jetha A, Aikin R, Tremblay M, Paraskevas S.** Evidence of endoplasmic reticulum stress mediating cell death in transplanted human islets. *Cell Transplant* 21: 889-900, 2012
131. **Nishimura R, Goto M, Sekiguchi S, Fujimori K, Ushiyama A, Satomi S.** Assessment for revascularization of transplanted pancreatic islets at subcutaneous site in mice with a highly sensitive imaging system. *Transplant Proc* 43: 3239-3240, 2011
132. **Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M.** Islet culture/preservation before islet transplantation. *Cell Med* 8: 25-29, 2015
133. **Nyqvist D, Speier S, Rodriguez-Diaz R, Molano RD, Lipovsek S, Rupnik M, Dicker A, Ilegems E, Zahr-Akrawi E, Molina J, Lopez-Cabeza M, Villate S, Abdulreda MH, Ricordi C, Caicedo A, Pileggi A, Berggren PO.** Donor islet endothelial cells in pancreatic islet revascularization. *Diabetes* 60: 2571-2577, 2011
134. **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
135. **Olsson R, Carlsson PO.** The pancreatic islet endothelial cell: Emerging roles in islet function and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 710-714, 2006
136. **Pang L, Tian P, Cui X, Wu X, Zhao X, Wang H, Wang D, Pan H.** In situ photo-cross-linking hydrogel accelerates diabetic wound healing through restored hypoxia-inducible factor 1-alpha pathway and regulated inflammation. *ACS Appl Mater Interfaces* 13: 29363-29379, 2021
137. **Paredes-Juarez GA, Sahasrabudhe NM, Tjoelker RS, de Haan BJ, Engelse MA, de Koning EJP, Faas MM, de Vos P.** DAMP production by human islets under low oxygen and nutrients in the presence or absence of an immunoisolating-capsule and necrostatin-1. *Sci Rep* 5: 14623, 2015

- 
138. **Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AMJ.** Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. *Clin Dev Immunol* 2013: 352315, 2013
139. **Pepper AR, Gala-Lopez B, Pawlick R, Merani S, Kin T, Shapiro AMJ.** A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation. *Nat Biotechnol* 33: 518-523, 2015
140. **Pepper AR, Bruni A, Shapiro AMJ.** Clinical islet transplantation: Is the future finally now? *Curr Opin Organ Transplant* 23: 428-439, 2018
141. **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
142. **Persson AB, Buschmann IR.** Vascular growth in health and disease. *Front Mol Neurosci* 4: 14, 2011
143. **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
144. **Posselt AM, Szot GL, Frassetto LA, Masharani U, Tavakol M, Amin R, McElroy J, Ramos MD, Kerlan RK, Fong L, Vincenti F, Bluestone JA, Stock PG.** Islet transplantation in type 1 diabetic patients using calcineurin inhibitor-free immunosuppressive protocols based on T-cell adhesion or costimulation blockade. *Transplantation* 90: 1595-1601, 2010
145. **Pretorius M, Huang C.** Beta-cell adaptation to pregnancy - Role of calcium dynamics. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 853876, 2022
146. **Qian W, Cai X, Qian Q, Zhuang Q, Yang W, Zhang X, Zhao L.** Astragaloside IV protects endothelial progenitor cells from the damage of ox-LDL via the LOX-1/NLRP3 inflammasome pathway. *Drug Des Devel Ther* 13: 2579-2589, 2019
147. **Quaranta P, Antonini S, Spiga S, Mazzanti B, Curcio M, Mulas G, Diana M, Marzola P, Mosca F, Longoni B.** Co-transplantation of endothelial progenitor cells and pancreatic islets to induce long-lasting normoglycemia in streptozotocin-treated diabetic rats. *PLoS One* 9: e94783, 2014
148. **Quattrin T, Mastrandrea LD, Walker LSK.** Type 1 diabetes. *Lancet* 401: 2149-2162, 2023
149. **Reinert RB, Brissova M, Shostak A, Pan FC, Poffenberger G, Cai Q, Hundemer GL, Kantz J, Thompson CS, Dai C, McGuinness OP, Powers AC.** Vascular endothelial growth factor-A and islet vascularization are necessary in developing, but not adult, pancreatic islets. *Diabetes* 62: 4154-4164, 2013

150. **Rickels MR, Liu C, Shlansky-Goldberg RD, Soleimanpour SA, Vivek K, Kamoun M, Min Z, Markmann E, Palangian M, Dalton-Bakes C, Fuller C, Chiou AJ, Barker CF, Luning Prak ET, Naji A.** Improvement in  $\beta$ -cell secretory capacity after human islet transplantation according to the CIT07 protocol. *Diabetes* 62: 2890-2897, 2013
151. **Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW.** Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37: 413-420, 1988
152. **Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, Zeng YJ, Rilo HL, Alejandro R, Shapiro R, Fung JJ, Demetris AJ, Mintz DH, Starzl TE.** Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 53: 407-414, 1992
153. **Rijkelijkhuizen JKRA, van der Burg MPM, Töns A, Terpstra OT, Bouwman E.** Pretransplant culture selects for high-quality porcine islets. *Pancreas* 32: 403-407, 2006
154. **Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE.** Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 23: 112-116, 2000
155. **Rodríguez-Comas J, Moreno-Vedia J, Obach M, Castaño C, de Pablo S, Alcarraz-Vizán G, Díaz-Catalán D, Mestre A, Horrillo R, Costa M, Novials A, Servitja JM.** Alpha1-antitrypsin ameliorates islet amyloid-induced glucose intolerance and  $\beta$ -cell dysfunction. *Mol Metab* 37: 100984, 2020
156. **Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE.** Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull* 51: 363-369, 2000
157. **Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AMJ.** Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 50: 710-719, 2001
158. **Sabek OM, Fraga DW, Minoru O, McClaren JL, Gaber AO.** Assessment of human islet viability using various mouse models. *Transplant Proc* 37: 3415-3416, 2005
159. **Saito T, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano T, Gotoh M.** Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation* 92: 1231-1236, 2011
160. **Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M.** Clinical experiences in the treatment of pancreatic arteriovenous malformation by total pancreatectomy with islet autotransplantation. *Transplantation* 96: e38-40, 2013
161. **Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Unno M.** Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. *Diabetes Metab Res Rev* 30: 1-10, 2014

- 
162. **Salamone M, Rigogliuso S, Nicosia A, Campora S, Bruno CM, Gherzi G.** 3D collagen hydrogel promotes in vitro Langerhans islets vascularization through ad-MVFs angiogenic activity. *Biomedicines* 9: 739, 2021
163. **Saravanan PB, Kanak MA, Chang CA, Darden C, Yoshimatsu G, Lawrence MC, Naziruddin B.** Islet damage during isolation as assessed by miRNAs and the correlation of miRNA levels with posttransplantation outcome in islet autotransplantation. *Am J Transplant* 18: 982-989, 2018
164. **Sasaki S, Miyatsuka T.** Heterogeneity of islet cells during embryogenesis and differentiation. *Diabetes Metab J* 47: 173-184, 2023
165. **Sasson A, Rachi E, Sakhneny L, Baer D, Lisnyansky M, Epshtein A, Landsman L.** Islet pericytes are required for  $\beta$ -cell maturity. *Diabetes* 65: 3008-3014, 2016
166. **Schubert U, Schmid J, Lehmann S, Zhang XY, Morawietz H, Block NL, Kanczkowski W, Schally AV, Bornstein SR, Ludwig B.** Transplantation of pancreatic islets to adrenal gland is promoted by agonists of growth-hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2288-2293, 2013
167. **Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, Bhoumik A, Cepa I, Cesario RM, Haakmeester C, Kadoya K, Kelly JR, Kerr J, Martinson LA, McLean AB, Moorman MA, Payne JK, Richardson M, Ross KG, Sherrer ES, Song X, Wilson AZ, Brandon EP, Green CE, Kroon EJ, Kelly OG, D'Amour KA, Robins AJ.** A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 7: e37004, 2012
168. **Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T.** Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMJ* 322: 29-32, 2001
169. **Shah MA, Hamid A, Faheem HI, Rasul A, Baokbah TAS, Haris M, Yousaf R, Saleem U, Iqbal S, Alves MS, Khan Z, Hussain G, Alsharfi I, Khan H, Jeandet P.** Uncovering the anticancer potential of polydatin: A mechanistic insight. *Molecules* 27: 7175, 2022
170. **Shao W, Liu W, Liang P, Song Z, Israel O, Prud'homme GJ, Wang Q, Jin T.** GABA requires GLP-1R to exert its pancreatic function during STZ challenge. *J Endocrinol* 246: 207-222, 2020
171. **Shapiro AMJ, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt 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
172. **Shapiro AMJ, Ryan EA, Lakey JR.** Diabetes. Islet cell transplantation. *Lancet* 358 Suppl: S21, 2001
173. **Shapiro AMJ, Pokrywczynska M, Ricordi C.** Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol* 13: 268-277, 2017

- 
174. **Sharma BR, Kanneganti TD.** NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol* 22: 550-559, 2021
175. **Shen Y, Qian L, Luo H, Li X, Ruan Y, Fan R, Si Z, Chen Y, Li L, Liu Y.** The significance of NLRP inflammasome in neuropsychiatric disorders. *Brain Sci* 12: 1057, 2022
176. **Shin JJ, Lee EK, Park TJ, Kim W.** Damage-associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. *Ageing Res Rev* 24: 66-76, 2015
177. **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
178. **Sokolova M, Sahraoui A, Høyem M, Øgaard J, Lien E, Aukrust P, Yndestad A, Ranheim T, Scholz H.** NLRP3 inflammasome mediates oxidative stress-induced pancreatic islet dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 315: E912-923, 2018
179. **Song HJ, Xue WJ, Li Y, Tian XH, Song Y, Ding XM, Feng XS, Tian PX, Li ZL.** Improved islet survival and function with rat endothelial cells in vitro co-culture. *Transplant Proc* 41: 4302-4306, 2009
180. **Song HJ, Xue WJ, Li Y, Tian XH, Ding XM, Feng XS, Song Y, Tian PX.** Prolongation of islet graft survival using concomitant transplantation of islets and vascular endothelial cells in diabetic rats. *Transplant Proc* 42: 2662-2665, 2010
181. **Song L, Pei L, Yao S, Wu Y, Shang Y.** NLRP3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies. *Front Cell Neurosci* 11: 63, 2017a
182. **Song Y, Wang Y, Zhang Y, Geng W, Liu W, Gao Y, Li S, Wang K, Wu X, Kang L, Yang C.** Advanced glycation end products regulate anabolic and catabolic activities via NLRP3-inflammasome activation in human nucleus pulposus cells. *J Cell Mol Med* 21: 1373-1387, 2017b
183. **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  $\beta$ -cells. *Sci Rep* 7: 16367, 2017
184. **Staels W, Verdonck Y, Heremans Y, Leuckx G, de Groef S, Heirman C, de Koning E, Gysemans C, Thielemans K, Baeyens L, Heimberg H, de Leu N.** VEGF-A mRNA transfection as a novel approach to improve mouse and human islet graft revascularisation. *Diabetologia* 61: 1804-1810, 2018
185. **Staels W, Heremans Y, Heimberg H, de Leu N.** VEGF-A and blood vessels: A beta cell perspective. *Diabetologia* 62: 1961-1968, 2019
186. **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

187. **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
188. **Straus DS.** Effects of insulin on cellular growth and proliferation. *Life Sci* 29: 2131-2139, 1981
189. **Su D, Zhang N, He J, Qu S, Slusher S, Bottino R, Bertera S, Bromberg J, Dong HH.** Angiopoietin-1 production in islets improves islet engraftment and protects islets from cytokine-induced apoptosis. *Diabetes* 56: 2274-2283, 2007
190. **Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ.** IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 183: 109119, 2022
191. **Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM.** Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 98: 1417-1422, 1996
192. **Sun Y, Zhou S, Shi Y, Zhou Y, Zhang Y, Liu K, Zhu Y, Han X.** Inhibition of miR-153, an IL-1 $\beta$ -responsive miRNA, prevents beta cell failure and inflammation-associated diabetes. *Metabolism* 111: 154335, 2020
193. **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
194. **Swanson KV, Deng M, Ting JPY.** The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19: 477-489, 2019
195. **Swinnen SG, Hoekstra JB, DeVries JH.** Insulin therapy for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32 Suppl 2: S253-259, 2009
196. **Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H.** Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1135-1140, 2006
197. **Toso C, Oberholzer J, Ris F, Triponez F, Bucher P, Demirag A, Anderegg E, Buehler L, Cretin N, Fournier B, Majno P, Hong Y, Lou J, Morel P.** Factors affecting human islet of Langerhans isolation yields. *Transplant Proc* 34: 826-827, 2002
198. **Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Gócza E, Vas V, Monostori E, Uher F.** Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26: 244-253, 2008
199. **Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K.** Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation* 60: 123-127, 1995

- 
200. **van der Windt DJ, Bottino R, Kumar G, Wijkstrom M, Hara H, Ezzelarab M, Ekser B, Phelps C, Murase N, Casu A, Ayares D, Lakkis FG, Trucco M, Cooper DKC.** Clinical islet xenotransplantation: How close are we? *Diabetes* 61: 3046-3055, 2012
201. **Velloso FJ, Trombetta-Lima M, Anschau V, Sogayar MC, Correa RG.** NOD-like receptors: Major players (and targets) in the interface between innate immunity and cancer. *Biosci Rep* 39: BSR20181709, 2019
202. **Wagner RC, Kreiner P, Barnett RJ, Bitensky MW.** Biochemical characterization and cytochemical localization of a catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 3175-3179, 1972
203. **Wagner RC, Matthews MA.** The isolation and culture of capillary endothelium from epididymal fat. *Microvasc Res* 10: 286-297, 1975
204. **Wang H, Li S, Dai Q, Gonzalez A, Tran ON, Sun H, DeFronzo RA, Dean DD, Yeh CK, Chen XD.** Culture on a native bone marrow-derived extracellular matrix restores the pancreatic islet basement membrane, preserves islet function, and attenuates islet immunogenicity. *FASEB J* 34: 8044-8056, 2020a
205. **Wang Z, Zhang S, Xiao Y, Zhang W, Wu S, Qin T, Yue Y, Qian W, Li L.** NLRP3 inflammasome and inflammatory diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 4063562, 2020b
206. **Warshauer JT, Bluestone JA, Anderson MS.** New frontiers in the treatment of type 1 diabetes. *Cell Metab* 31: 46-61, 2020
207. **Watada H.** Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocr J* 57: 185-191, 2010
208. **Watanabe S, Usui-Kawanishi F, Karasawa T, Kimura H, Kamata R, Komada T, Inoue Y, Mise N, Kasahara T, Takahashi M.** Glucose regulates hypoxia-induced NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *J Cell Physiol* 235: 7554-7566, 2020
209. **Wrublewsky S.** Der Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf die Funktion und Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln. *Masterarbeit, Universität des Saarlandes*, 2020
210. **Wrublewsky S, Glas J, Carlein C, Nalbach L, Hoffmann MDA, Pack M, Vilas-Boas EA, Ribot N, Kappl R, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E, Roma LP.** The loss of pancreatic islet NADPH oxidase (NOX)2 improves islet transplantation. *Redox Biol* 55: 102419, 2022a
211. **Wrublewsky S, Speer T, Nalbach L, Boewe AS, Pack M, Alansary D, Roma LP, Hoffmann MDA, Schmitt BM, Weinzierl A, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E.** Targeting pancreatic islet NLRP3 improves islet graft revascularization. *Diabetes* 71: 1706-1720, 2022b
212. **Xu G, Chen J, Jing G, Shalev A.** Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. *Nat Med* 19: 1141-1146, 2013

- 
213. **Xu X, Liang C, Gao X, Huang H, Xing X, Tang Q, Yang J, Wu Y, Li M, Li H, Liao L, Tian W.** Adipose tissue-derived microvascular fragments as vascularization units for dental pulp regeneration. *J Endod* 47: 1092-1100, 2021
214. **Yang XF, Chen T, Ren LW, Yang L, Qi H, Li FR.** Immunogenicity of insulin-producing cells derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med* 13: 1456-1464, 2017
215. **Yashiro T, Yamamoto M, Araumi S, Hara M, Yogo K, Uchida K, Kasakura K, Nishiyama C.** PU.1 and IRF8 modulate activation of NLRP3 inflammasome via regulating its expression in human macrophages. *Front Immunol* 12: 649572, 2021
216. **Yu M, Agarwal D, Korutla L, May CL, Wang W, Griffith NN, Hering BJ, Kaestner KH, Velazquez OC, Markmann JF, Vallabhajosyula P, Liu C, Naji A.** Islet transplantation in the subcutaneous space achieves long-term euglycaemia in preclinical models of type 1 diabetes. *Nat Metab* 2: 1013-1020, 2020
217. **Zanone MM, Favaro E, Camussi G.** From endothelial to  $\beta$  cells: Insights into pancreatic islet microendothelium. *Curr Diabetes Rev* 4: 1-9, 2008
218. **Zeng A, Wang SR, He YX, Yan Y, Zhang Y.** Progress in understanding of the stalk and tip cells formation involvement in angiogenesis mechanisms. *Tissue Cell* 73: 101626, 2021
219. **Zhang N, Richter A, Suriawinata J, Harbaran S, Altomonte J, Cong L, Zhang H, Song K, Meseck M, Bromberg J, Dong H.** Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. *Diabetes* 53: 963-970, 2004
220. **Zhang X, Wang Z, Zheng Y, Yu Q, Zeng M, Bai L, Yang L, Guo M, Jiang X, Gan J.** Inhibitors of the NLRP3 inflammasome pathway as promising therapeutic candidates for inflammatory diseases (Review). *Int J Mol Med* 51: 35, 2023
221. **Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J.** Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11: 136-140, 2010
222. **Zmuda EJ, Powell CA, Hai T.** A method for murine islet isolation and subcapsular kidney transplantation. *J Vis Exp* 50: 2096, 2011

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M.D. Menger und Herrn Prof. Dr. M.W. Laschke sowohl für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie als auch für die Bereitstellung aller benötigten Materialien und Geräte bedanken.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. M.W. Laschke für die Überlassung der Themen dieser Arbeit, die konstruktiven Diskussionen, Kritiken und Ideen danken. Vielen Dank für jegliche Unterstützung im wissenschaftlichen Präsentieren und Schreiben sowie für die Korrektur dieser Arbeit als Gutachter! Ebenfalls möchte ich mich für das Vertrauen in meine Laborarbeit und das Anlernen in die unterschiedlichsten Themengebiete bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn PD Dr. Emmanuel Ampofo für die jahrelange Betreuung und Unterstützung während meiner Master- und Promotionsarbeit. Vielen Dank für die viele Zeit und Geduld beim Ausarbeiten von neuen Projekten sowie beim Schreiben von Publikationen! Durch deine wissenschaftliche Begeisterung und Motivation durfte ich nicht nur viel über den Laboralltag lernen, sondern wurde auch bei Präsentationen auf Kongressen sowie bei der Arbeit mit Kooperationspartnern jederzeit unterstützt. Ein unendliches Dankeschön für deine absolute Ehrlichkeit und dein offenes Ohr für all meine Zweifel!

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeiter/-innen des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie. Hierbei möchte ich besonders Frau Caroline Bickelmann und Frau Ruth Nickels für die uneingeschränkte Hilfe bei der Laborarbeit danken. Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei Frau Anne Böwe, Frau Mandy Pack, Frau Dr. Andrea Weinzierl, Frau Dr. Greta Simionato, Frau Dr. Jeanette Rudzitis-Auth, Frau Dr. Lisa Nalbach, Frau Dr. Beate Schmitt, Frau Sandra Hans, Frau Christina Marx und Frau Janine Becker für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. L.P. Roma möchte ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung danken. Vielen Dank für die ehrlichen und aufmunterten Worte, die mich gelehrt haben, für mich selbst einzustehen!

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. M. Montenarh und Frau Prof. Dr. C. Götz aus der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie für die Bereitstellung der pankreatischen  $\beta$ -Zelllinie MIN6.

Zuletzt danke ich zutiefst meinen Freunden, meinem Partner und meiner Familie. Hierbei geht ein besonderes Dankeschön an meine Mutter Andrea Schiehl und meinen Bruder Aaron Wrublewsky, die mir nicht nur in schwierigen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite standen, sondern auch Erfolge mit mir gefeiert haben. Vielen Dank für eure unendliche Liebe und Fürsorge!

## 10. Publikationen

### 10.1 Originalarbeiten aus dieser Dissertation

**Wrublewsky S**, Speer T, Nalbach L, Boewe AS, Pack M, Alansary D, Roma LP, Hoffmann MDA, Schmitt BM, Weinzierl A, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Targeting pancreatic islet NLRP3 improves islet graft revascularization. *Diabetes* 71: 1706-1720, 2022

**Wrublewsky S\***, Weinzierl A\*, Hornung I, Roma LP, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Co-transplantation of pancreatic islets and microvascular fragments effectively restores normoglycemia in diabetic mice. *NPJ Regen Med* 7: 67, 2022

\*Geteilte Erstautorenschaft

### 10.2 Weitere Originalarbeiten

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, 2020

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, 2020

Linnenberger R, Hoppstädter J, **Wrublewsky S**, Ampofo E, Kiemer AK. Statins and bempedoic acid: Different actions of cholesterol inhibitors on macrophage activation. *Int J Mol Sci* 22: 12480, 2021

Nalbach L, Müller D, **Wrublewsky S**, Metzger W, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Microvascular fragment spheroids: Three-dimensional vascularization units for tissue engineering and regeneration. *J Tissue Eng* 12: 20417314211035593, 2021

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. Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels. *EMBO Mol Med* 13: e12616, 2021

Pack M, Götz C, **Wrublewsky S**, Montenarh M. SGC-CK2-1 is an efficient inducer of insulin production and secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Pharmaceutics* 14: 19, 2021

Schunk SJ, Triem S, Schmit D, Zewinger S, Sarakpi T, Becker E, Hütter G, **Wrublewsky S**, Küting F, Hohl M, Alansary D, Roma LP, Lipp P, Möllmann J, Lehrke M, Laschke MW, Menger MD, Kramann R, Boor P, Jahnen-Dechent W, März W, Böhm M, Laufs U, Niemeyer BA, Fliser D, Ampofo E, Speer T. Interleukin-1 $\alpha$  is a central regulator of leukocyte-endothelial adhesion in myocardial infarction and in chronic kidney disease. *Circulation* 144: 893-908, 2021

Boewe AS, Wemmert S, Kulas P, Schick B, Götz C, **Wrublewsky S**, Montenarh M, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Inhibition of CK2 reduces NG2 expression in juvenile angiofibroma. *Biomedicines* 10: 966, 2022

Pack M, Gulde TN, Völker MV, Boewe AS, **Wrublewsky S**, Ampofo E, Montenarh M, Götz C. Protein kinase CK2 contributes to glucose homeostasis by targeting fructose-1,6-biphosphatase 1. *Int J Mol Sci* 24: 428, 2022

**Wrublewsky S\***, Glas J\*, Carlein C, Nalbach L, Hoffmann MDA, Pack M, Vilas-Boas EA, Ribot N, Kappl R, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E, Roma LP. The loss of pancreatic islet NADPH oxidase (NOX)2 improves islet transplantation. *Redox Biol* 55: 102419, 2022

\*Geteilte Erstautorenschaft

**Wrublewsky S**, Wilden C, Bickelmann C, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Absent in melanoma (AIM)2 promotes the outcome of islet transplantation by repressing ischemia-induced interferon (IFN) signaling. (unter Revision: *Cells*)

**Wrublewsky S**, Rother S, Pohlemann F, Radanovic T, Junker F, Boewe AS, Schunk S, Roma LP, Gómez G, Pisabarro M, MacDonald PE, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Heparan sulfate fine-tuned interleukin (IL)-1 signaling inhibits insulin secretion of grafted pancreatic islets. (unter Revision: *Sci Transl Med*)

Boewe AS, **Wrublewsky S**, Hoppstädter J, Kiemer AK, Götz C, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. C-Myc/H19/miR-29b axis downregulates nerve/glia (NG)2 expression in glioblastoma multiforme. (unter Revision: *Mol Ther Nucleic Acids*)

Ampofo E\*, Pack M\*, **Wrublewsky S\***, Boewe AS, Spigelman AF, Koch H, MacDonald PE, Laschke MW, Montenarh M, Götz C. Protein kinase CK2 regulates glucagon expression in pancreatic  $\alpha$ -cells. (unter Revision: *Diabetologia*)

\*Geteilte Erstautorenschaft

### 10.3 Zitierfähige Abstracts

**Wrublewsky S**, Speer T, Nalbach L, Pack M, Schmitt BM, Roma LP, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. The inhibition of the NLRP3 inflammasome improves islet transplantation by accelerating graft revascularization in an insulin-dependent manner. *Eur Surg Res* 62: 167, 2021

Vortrag im Rahmen der 24. Chirurgischen Forschungstage 2021 digital aus Leipzig

**Wrublewsky S**, Speer T, Nalbach L, Boewe AS, Pack M, Roma LP, Hoffmann MDA, Schmitt BM, Weinzierl A, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Targeting pancreatic islet NLRP3 improves graft revascularization in an insulin-dependent manner. *Diabetologia* 65 Suppl 1: S139, 2022

Vortrag im Rahmen des 58. Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2022 in Stockholm

**Wrublewsky S**, Speer T, Nalbach L, Boewe AS, Pack M, Roma LP, Hoffmann MDA, Schmitt BM, Weinzierl A, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Targeting pancreatic islet NLRP3 improves graft revascularization. *Eur Surg Res* 64: 31, 2023

Vortrag auf dem 140. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2023 digital aus München

**Wrublewsky S**, Pohlemann F, Roma LP, Rother S, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Interleukin (IL)-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  released from islet resident macrophages impair the success of islet transplantation. *Diabetologia* 66 Suppl 1: S299, 2023

Vortrag im Rahmen des 59. Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes 2023 in Hamburg

### 10.4 Nichtzitierfähige Abstracts

**Wrublewsky S**, Weinzierl A, Hornung I, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Co-transplantation of pancreatic islets and microvascular fragments effectively restores normoglycemia in diabetic mice.

Vortrag im Rahmen der 25. Chirurgischen Forschungstage 2022 in Freiburg

**Wrublewsky S**, Pohlemann F, Rother S, Boewe AS, Schunk S, Roma LP, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Interleukin (IL)-1 $\alpha$ -driven signaling is enhanced by heparan sulfate during islet transplantation.

Vortrag im Rahmen der 26. Chirurgischen Forschungstage 2023 in Mannheim

**Wrublewsky S**, Larhrissi K. Quantification of in vivo flow of blood cells – Lingering, adhesion cascade and effect of membrane rigidity.

Vortrag im Rahmen des Research Unit FOR 2688 2023 in Wien

**Wrublewsky S**, Weinzierl A, Hornung I, Menger, MD, Laschke MW, Ampofo E. Co-transplantation of pancreatic islets and microvascular fragments effectively restores normoglycemia in diabetic mice.

Vortrag im Rahmen der 46. Jahrestagung der österreichischen Gesellschaft für chirurgische Forschung in Schladming

## **11. Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.