

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes
(Direktor: Professor Dr. med. M. D. Menger)

*Steigerung der Funktionalität in vitro generierter
modifizierter Pseudoinseln durch Inkorporation von
Knochenmarkszellen zur Verbesserung der Revaskularisierung
und des Langzeit-Überlebens nach Transplantation im
(diabetischen) Tiermodell*

Dissertation zur Erlangung
der Doktorwürde der
Theoretischen Medizin
an der
Medizinischen Fakultät
der
Universität des Saarlandes



2010

vorgelegt von

Christine Wittig

Referent:

Korreferent:

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

Tag der mündlichen Prüfung:

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	3
3. EINLEITUNG	5
3.1 Die Entdeckung der Langerhans-Inseln und des Insulins.....	5
3.2 Das Pankreas.....	6
3.2.1 Aufbau und anatomische Lage.....	6
3.2.2 Exokrines Pankreas.....	7
3.2.3 Endokrines Pankreas.....	7
3.3 Die Langerhans-Insel.....	7
3.3.1 Zelltypen und deren Funktion.....	7
3.3.2 Struktureller Aufbau.....	8
3.4 Insulinbildung und Insulinspeicherung.....	9
3.4.1 Molekulare und physiologische Insulinwirkung.....	10
3.5 Diabetes mellitus.....	11
3.5.1 Diabetes mellitus Typ 1.....	12
3.5.1.1 Manifestation und Marker.....	13
3.5.2 Diabetes mellitus Typ 2.....	13
3.5.2.1 Epidemiologie.....	14
3.5.3 Weitere Diabetesformen.....	14
3.6 Tiermodelle des insulinabhängigen Diabetes.....	15
3.7 Therapie.....	16
3.7.1 Basistherapie und Anwendung oraler Antidiabetika.....	16

3.7.2	Insulintherapie.....	17
3.7.3	Pankreastransplantation.....	17
3.7.4	Inseltransplantation.....	18
3.7.4.1	Vor- und Nachteile der Inseltransplantation.....	19
3.8	Alternative Therapieansätze.....	20
3.8.1	Zellen aus fetalem Gewebe.....	20
3.8.2	Xenotransplantation von Schweineinseln.....	21
3.8.3	Herstellung von Pseudoinseln.....	21
3.9	Ziel der Arbeit.....	23

4. MATERIAL 24

4.1	Antikörper.....	24
4.1.1	Primär.....	24
4.1.2	Sekundär.....	24
4.2	Arbeitsmaterialien.....	25
4.3	Chemikalien, Lösungen, Membranen, Filter.....	26
4.4	Enzyme und Wachstumsfaktoren.....	27
4.5	Farbstoffe.....	27
4.6	Kulturmedien und Antibiotika.....	27
4.7	Laborgeräte.....	28
4.8	Narkotika und Schmerzmittel.....	28
4.9	Puffer.....	28
4.10	Reaktions- und Messgefäße.....	28

5. METHODEN 29

5.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	29
5.2	Das Rückenhautkammermodell.....	29
5.2.1	Präparation der Rückenhautkammer.....	30

5.3 Zellkultur.....	32
5.3.1 Isolierung der Zellen.....	32
5.3.1.1 Isolierung der Langerhans-Inseln.....	32
5.3.1.2 Isolierung der Knochenmarkszellen.....	34
5.3.2 Passagieren der Knochenmarkszellen.....	35
5.3.3 Kryokonservierung der Zellen.....	36
5.3.4 Auftauen der Zellen.....	36
5.3.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	36
5.3.6 Vitalitätstests.....	37
5.3.6.1 Neutralrot-Test.....	37
5.3.6.2 Trypanblau-Test.....	37
5.3.7 Pseudoinseln (PI) und modifizierte Pseudoinseln (ModPI).....	38
5.3.7.1 in vitro Generierung von PI und ModPI.....	38
5.3.7.2 Transplantation von Inseln, PI und ModPI.....	39
5.4 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkszellen.....	40
5.4.1 Prinzip der FACS-Analyse.....	40
5.4.2 Immunfärbung und FACS-Analyse der Knochenmarkszellen.....	40
5.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM).....	42
5.5.1 Physikalische Grundlagen.....	43
5.5.2 Ausstattung.....	44
5.5.3 Untersuchung der Mikrozirkulation mittels IVM.....	45
5.6 Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter.....	45
5.6.1 Revaskularisierte Fläche.....	46
5.6.2 Funktionelle Kapillardichte.....	46
5.6.3 Gefäßdurchmesser.....	46
5.6.4 Blutzellgeschwindigkeit.....	46
5.6.5 Volumenfluss.....	47
5.6.6 Statistische Analyse.....	48

5.7 Glukosestimulations-Test und ELISA.....	48
5.7.1 Bestimmung der Anzahl an Inseläquivalenten (IEQ).....	48
5.7.2 Durchführung des Glukose-Stimulationstests.....	49
5.7.3 Statische Glukosestimulation.....	49
5.7.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	50
5.7.4.1 Das Testprinzip.....	51
5.8 Proteinbiochemischer Nachweis von Insulin im Western-Blot.....	51
5.8.1 Proteinextraktion.....	51
5.8.2 Konzentrationsbestimmung und Denaturierung der Proteine.....	52
5.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
5.8.4 Blotting.....	54
5.8.5 Detektion.....	55
5.8.6 Quantitative Auswertung.....	56
5.9 Histologie.....	57
5.9.1 Einbetten isolierter Inseln, PI und ModPI in HepatoQuick.....	57
5.9.2 Entnahme der Kammerpräparationen.....	57
5.9.3 HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin).....	58
5.9.4 Immunhistologie.....	58
5.9.4.1 Immunfärbung auf Insulin, Glukagon und Somatostatin.....	58
5.10 In vivo Analyse der Funktionalität von ModPI.....	60
5.10.1 Studiendesign.....	60
5.10.2 Wirkmechanismus des Streptozotocins (STZ).....	60
5.10.2.1 Diabetes-Induktion mittels STZ.....	61
5.10.3 Versuchsaufbau.....	61
5.10.4 Transplantation der verschiedenen Inseltypen.....	62
5.10.5 Postoperative Nachsorge der Transplantat-Empfänger.....	63
5.10.6 Blutentnahme und Blutzuckermessung.....	63
5.10.7 Statistik.....	64

5.10.8 Organentnahmen.....	64
5.10.8.1 Nephrektomie.....	64
5.10.8.2 Pankreatektomie.....	65
5.10.9 Histologie.....	65
5.10.9.1 HE-Färbung der Nierenschnitte.....	65
5.10.9.2 Immunfärbung der Nierenschnitte auf Insulin und CD31.....	66
5.11 Generierung von ModPI aus murinen GFP-KMZ und Inselzellen.....	67
5.11.1 Doppelfärbung der GFP-ModPI gegen Insulin und GFP.....	67

6. ERGEBNISSE

68

6.1 Ergebnisse der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.....	68
6.1.1 Transplantatgrößen und Durchmesser am Tag 0.....	68
6.1.2 Revaskularisierte Fläche und funktionelle Kapillardichte.....	69
6.1.3 Anwachsrate <i>n</i> (<i>take rate</i>).....	73
6.1.4 Mikrohämodynamische Parameter.....	74
6.1.4.1 Gefäßdurchmesser.....	74
6.1.4.2 Blutzellgeschwindigkeit.....	75
6.1.4.3 Volumenfluss.....	76
6.2 Ergebnisse der in vitro Versuche.....	77
6.2.1 FACS-Analyse.....	77
6.2.2 Immunhistochemie.....	79
6.2.2.1 Insulin in RHK-Präparaten.....	79
6.2.2.2 Pankreatische Hormone in eingebetteten Präparaten.....	80
6.2.3 Ergebnisse der Western-Blot Analyse.....	81
6.2.3.1 Insulingehalt der Inseln, PI und ModPI.....	81
6.2.3.2 Insulingehalt der Inseln im Zeitverlauf.....	83
6.2.4 Glukosestimulations-Test und ELISA.....	85
6.3 Zusammenfassung der IVM- und in vitro-Ergebnisse.....	88
6.4 Ergebnisse der Diabetes-Studie.....	89
6.4.1 Diabetes-Induktion mit STZ.....	89

6.4.2	Direkte Auswirkungen des STZ.....	90
6.4.2.1	Auswirkungen des STZ auf das Nierengewebe.....	90
6.4.2.2	Auswirkungen des STZ auf das exo- und endokrine Pankreasgewebe.....	92
6.4.3	Direkte Auswirkungen des STZ auf den Organismus/Metabolismus.....	93
6.4.4	in vivo Funktionalität der ModPI im Vergleich zu Inseln und PI.....	93
6.4.4.1	Blutzuckeruntersuchungen.....	93
6.4.4.2	Körpergewichtsbestimmungen	95
6.4.4.3	Histologische Untersuchungen.....	97
6.4.4.3.1	HE-Färbung.....	97
6.4.4.3.2	Anti Insulin-Färbung.....	98
6.4.4.3.3	Anti CD31-Färbung.....	100
6.5	Doppelfärbung gegen Insulin und GFP auf GFP-ModPI.....	101
6.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der in vivo Studie.....	102

7. DISKUSSION

104

7.1	Diskussion von Material und Methoden.....	104
7.1.1	Rückenhautkammermodell.....	104
7.1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	105
7.1.3	Diabetisches Tiermodell.....	106
7.1.4	Pseudoinseln und Transplantation.....	108
7.1.5	Glukosetoleranztest.....	111
7.1.6	Aktuelle Probleme der Klinischen Inseltransplantation.....	111
7.2	Diskussion der Ergebnisse.....	112
7.2.1	Vaskularisierung von Inseln und Pseudoinseln.....	112
7.2.2	Hormonproduktion von Inseln und Pseudoinseln.....	114
7.2.3	Funktion modifizierter Pseudoinseln bei Diabetes mellitus.....	117
7.2.4	Ausblick.....	121

8. LITERATURVERZEICHNIS	123
9. DANKSAGUNG	138
10. LEBENSLAUF	139
11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	141
12. VERÖFFENTLICHUNGEN	142

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1:** Mittels FACS-Analyse überprüfte Oberflächenantigene
- Tab. 2:** Umrechnungsfaktor zur Berechnung der IEQ
- Tab. 3:** Zusammensetzung des Gels für die SDS-PAGE
- Tab. 4:** Gefäßdurchmesser der Transplantate
- Tab. 5:** Blutzellgeschwindigkeit in den neugebildeten Blutgefäßen
- Tab. 6:** Volumenfluss der neugebildeten Blutgefäße

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Lage und Anatomie des menschlichen Pankreas
- Abb. 2:** Langerhans-Insel von Maus und Mensch
- Abb. 3:** Bildung eines Insulinmoleküls
- Abb. 4:** Implantation der Rückenhautkammer
- Abb. 5:** Isolierung der Langerhans-Inseln
- Abb. 6:** Isolierung der Knochenmarkszellen
- Abb. 7:** Herstellung der PI und ModPI
- Abb. 8:** Hamster mit RHK und Inseln nach Transplantation in die RHK
- Abb. 9:** Aufbau eines Aufricht-Fluoreszenzmikroskops
- Abb. 10:** Strukturformeln von Glukose und Streptozotocin
- Abb. 11:** Transplantation der Inseln unter die Nierenkapsel
- Abb. 12:** Blutgefäße im Nagerfuß
- Abb. 13:** Transplantatfläche am Tag 0
- Abb. 14:** Transplantatdurchmesser am Tag 0
- Abb. 15:** IVM-Aufnahmen einer PI in der RHK an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14
- Abb. 16:** FKD und revaskularisierte Fläche der Transplantate
- Abb. 17:** IVM-Aufnahmen einer Insel, PI und ModPI am Tag 6 nach Tx
- Abb. 18:** Anwachsrate der Transplantate
- Abb. 19:** Gefäßdurchmesser der Transplantate

- Abb. 20:** Blutzellgeschwindigkeit der Transplantate
- Abb. 21:** Volumenfluss der Transplantate
- Abb. 22:** Ergebnisse der FACS-Analyse
- Abb. 23:** Immunhistochemische Insulin-Färbung von RHK-Präparaten
- Abb. 24:** Immunhistochemische Färbungen eingebetteter Inseln, PI und ModPI gegen Glukagon, Insulin und Somatostatin
- Abb. 25:** Western-Blot-Analyse gegen Insulin und GAPDH
- Abb. 26:** Western-Blot-Analyse vor Abgleich mit dem GAPDH-Protein
- Abb. 27:** Western-Blot-Analyse nach Abgleich mit dem GAPDH-Protein
- Abb. 28:** Western-Blot-Analyse von Inseln im Zeitverlauf
- Abb. 29:** Western-Blot-Analyse der Inseln nach Abgleich mit GAPDH
- Abb. 30:** ELISA-Messung des Insulins von Langerhans-Inseln im Zeitverlauf
- Abb. 31:** ELISA-Messung des Insulins der verschiedenen Inseltypen
- Abb. 32:** HE-Färbung auf gesundes und diabetisches Nierengewebe
- Abb. 33:** HE- und Insulinfärbung auf Pankreata vor und nach STZ-Behandlung
- Abb. 34:** Blutzucker
- Abb. 35:** Körpergewicht
- Abb. 36:** HE-gefärbter Nierenschnitt mit Insel-Transplantaten
- Abb. 37:** Insulin-Färbung von (Insel-)Präparaten unter der Nierenkapsel
- Abb. 38:** Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung gegen CD31
- Abb. 39:** Gefäßdichte innerhalb der Transplantate
- Abb. 40:** Doppelfärbung gegen Insulin und GFP auf GFP-ModPI
- Abb. 41:** Vergleich des Kapillarnetzwerks einer Insel in situ und nach Tx in die RHK

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillatum, destilliertes Wasser
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
Bis-AA	Bis-Acrylamid
BLZ	Blutzucker
BMC	bone marrow cell
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
C-Peptid	inaktives Abspaltprodukt der primären AS-Kette des Proinsulins
CT	konventionelle Insulintherapie
Cu ²⁺	Kupfer
Cy3	Cyanin 3, synthetischer Polymethinfarbstoff
δ	delta
DAB	3,3-Diaminobenzidin
d.h.	das heißt
DK (-Gruppe)	diabetische Kontrolle (-Gruppe)
DM (Typ 1/2)	Diabetes mellitus (Typ 1/2)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ϵ	Epsilon
ECL	enhanced chemiluminescence, Detektionssystem für Western-Blot
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E λ	Extinktion bei der Wellenlänge λ
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum

et al.	„et alii“ (m), „et aliae“ (f), und andere
$\epsilon\lambda$	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
$\times g$	Erdbeschleunigung
GLUT2/4	Glukosetransporter 2/4
h	hour, Stunde
H ₂ O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IAA	Insulinautoantikörper
IAK	islet after kidney (Insel- nach Nierentransplantation)
IA-2-AK	Tyrosinphosphatasen-Antikörper
ICA	Inselzellautoantikörper
ICT	intensivierte konventionelle Insulintherapie
IDDM	„insulin dependent diabetes mellitus“, bis 1999 gebräuchliche Bezeichnung des Diabetes mellitus Typ 1
IDF	International Diabetes Federation
IEQ	„islet equivalent“, Inseläquivalent
IgG	Immunglobulin G
IK (-Gruppe)	(Gruppe der) Inseln+Knochenmarkszellen
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ITA	islet transplantation alone (alleinige Inseltransplantation)
ITR	International Islet Transplant Registry (Giessen, Germany)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
λ	Wellenlänge Lambda
l	Liter
LADA	„latent autoimmune diabetes in adults“
Lsg.	Lösung
M	Molarität
m	milli
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mM	millimolar
Mio.	Millionen
ModPI (-Gruppe)	(Gruppe der) modifizierten Pseudoinseln
MODY	„maturity onset diabetes of the young“
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NIDDM	„non insulin dependent diabetes mellitus“, bis 1999 gebräuchliche Bezeichnung des Diabetes mellitus Typ 2
NIH	National Institutes of Health
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OGTT	oraler Glukose-Toleranztest
P	Passage
pAb	primary antibody, Primärantikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	„pancreas after kidney transplantation“, Tx von Pankreas nach Nierentransplantation
PBS	phosphate buffered saline
pc	polyclonal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PC2	Endoprotease, welche das C-Peptid am AS-Paar Arg31-Arg32 von der B-Kette schneidet
PC3	Endoprotease, welche das C-Peptid am AS-Paar Lys64-Arg65 von der A-Kette schneidet
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ Konzentration
PI (-Gruppe)	(Gruppe der) Pseudoinsel(n)
PIC	Proteinase-Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PP	pankreatisches Polypeptid
PTA	pancreas transplantation alone (alleinige Tx des Pankreas)

RER	Endoplasmatisches Reticulum mit Ribosomen
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sAb	secondary antibody, Sekundärantikörper
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	standard error of the means, Standardfehler des Mittelwertes
SIK	„simultaneous islet and kidney transplantation“, gleichzeitige Tx von Inseln und Niere
SPK	simultaneous pancreas and kidney transplantation (gleichzeitige Tx von Pankreas und Niere)
Stabw	Standardabweichung
STZ	Streptozotocin
T	Tag
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N`N`-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tx	Transplantation
U	Unit(s), Einheit(en)
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
WB	Western-Blot
w/v	Gewichtsprozent/Volumen
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius

1. Zusammenfassung

1.1 Generierung modifizierter Pseudoinseln zur Verbesserung der Revaskularisierung nach Transplantation

Diabetes mellitus zählt weltweit zu einer der schwerwiegendsten Stoffwechselerkrankungen. Neben Akutkomplikationen, wie hypoglykämischer Schock oder diabetisches Koma, haben die Patienten oftmals Probleme durch periphere (Begleit-) Erkrankungen, wie z.B. Bluthochdruck oder Schädigungen an Gefäßen, Augen, Nieren und dem Nervensystem. Aus diesem Grund richtet sich der Fokus der Diabetes-Therapie auf neue Strategien zum Ersatz der nicht mehr funktionierenden β -Zellmasse. Die sogenannte Inseltransplantation hat sich dabei als sehr erfolgversprechende Therapie herausgestellt. Hierbei werden Langerhans-Inseln aus Spenderpankreaata isoliert und dem Patienten über die Pfortader implantiert. Diese Therapie ist allerdings diversen Einschränkungen unterworfen, hauptsächlich aufgrund der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Spenderorgane und der unzureichenden Revaskularisierung der Transplantate. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob die Generierung sogenannter modifizierter Pseudoinseln (ModPI) sich vorteilhaft auf den Erfolg der Inseltransplantation auswirkt.

Hierfür wurden Langerhans-Inseln sowie Knochenmarkszellen aus Syrischen Goldhamstern isoliert. Nach Digestion der Inseln zu Einzelzellen wurden diese für 6 Tage mit Knochenmarkszellen als Hängender Tropfen co-kultiviert. In den so entstandenen ModPI wurde nach Transplantation die Revaskularisierung untersucht und mit der von Langerhans-Inseln und Pseudoinseln (PI) verglichen. Des Weiteren wurde *in vitro* ihre Fähigkeit zur Produktion von Insulin und anderen Insel-spezifischen Hormonen mit und ohne Stimulation überprüft. In einem weiteren Versuchsansatz wurde zusätzlich ihre Fähigkeit zur Wiederherstellung des normoglykämischen Zustandes im diabetischen Tiermodell untersucht und ebenfalls mit dem der Langerhans-Inseln, PI sowie Inseln unter Co-Transplantation mit Knochenmarkszellen (KMZ) verglichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass ModPI besser revaskularisieren, als Langerhans-Inseln und PI. Dies verdeutlichte sich anhand einer über den gesamten Versuchsverlauf signifikant erhöhten funktionellen Kapillardichte sowie einer signifikant vergrößerten revaskularisierten Fläche ab Tag 3. Ebenso zeigten ModPI signifikant vergrößerte Ge-

fäßdurchmesser sowie einen erhöhten Volumenfluss ab Tag 3. Die durchflusszytometrische Untersuchung der im ModPI-Verband enthaltenen Knochenmarkszellen ergab zudem, dass innerhalb des Knochenmarks viele Zellen mit endothelialelem und Stammzell- bzw. Progenitorzellcharakter enthalten waren. Die Immunhistochemie zeigte, dass die ModPI annähernd gleich viele Insulin-positive Zellen wie Präparate der Insel- und PI-Gruppe enthalten. Auch der intrazelluläre Gehalt von Glukagon und Somatostatin war bei den ModPI, Inseln und PI nahezu identisch. In vitro zeigten die ModPI, wie auch die PI, einen im Vergleich zu den Inseln etwas geringeren Insulingehalt. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Stimulierung der modifizierten Pseudoinseln im Rahmen des Glukosestimulationstests ergab, dass die ModPI erst nach Stimulierung mit hohen Glukosekonzentrationen eine adäquate sekretorische Antwort zeigten.

Auch in der anschließend durchgeführten in vivo Studie konnten die ModPI ihren therapeutischen Nutzen unter Beweis stellen. Hier waren sie im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen am schnellsten dazu in der Lage den Blutzucker zu normalisieren. Das Ausmaß des wiederhergestellten normoglykämischen Zustands war in der Gruppe der ModPI am stärksten ausgeprägt. Entsprechend zeigten die Tiere der ModPI-Gruppe eine adäquate Gewichtszunahme. Immunhistochemisch zeigten bei den ModPI 82% aller Transplantate intrazelluläres Insulin. Dieser Wert war höher, als die 79% der reinen Inseln. Die CD31-Färbung zeigte überdies, dass unter die Nierenkapsel transplantierte ModPI die meisten Mikrogefäße enthielten. Dies bestätigte eine verbesserte Revaskularisierung im diabetischen Empfängergewebe.

Aufgrund der im Rahmen dieser Studie erhaltenen Ergebnisse könnte die hier propagierte und praktizierte Generierung in vitro modifizierter Pseudoinseln durch die Kombination von Inselzellen und Knochenmarkszellen eine ideale Möglichkeit zur Anreicherung des transplantierfähigen Gewebes bieten. Hierbei beruht der therapeutisch relevante Effekt der modifizierten Pseudoinseln in der verbesserten Revaskularisierung der Transplantate im Empfänger unter gleichzeitiger Einsparung von β -Zellen bei erhaltener sekretorischer Kapazität.

2. Summary

2.1 Modified pseudoislets enhance revascularization after transplantation

Diabetes mellitus is one of the most serious metabolic disorders. In addition to acute complications, such as hypoglycemic shock or diabetic coma, patients often suffer from concomitant diseases, such as hypertension and damage to blood vessels, eyes, kidneys and the nervous system. For this reason diabetes therapy focuses on new strategies for the replacement of the nonfunctional β -cell mass, including islet (cell) transplantation. Therefore, pancreatic islets are isolated from donor pancreata and transplanted via the portal vein. However, this therapy is limited because of various restrictions, mainly due to lack of donor organs and an insufficient revascularization of the grafts. In the present study we investigated whether the generation of modified pseudoislets (ModPI), which include bone marrow cells, has an advantageous effect on the success of islet transplantation.

For this reason, pancreatic islets and bone marrow cells were isolated from Syrian golden hamsters. After digestion of the islets into single cells, these were co-cultured with bone marrow cells for 6 days in hanging drops. Revascularization of these ModPI was analyzed by intravital microscopy and compared with that of pancreatic islets and pseudoislets (PI). Furthermore insulin production and endocrine pancreatic hormone expression was tested in vitro with and without stimulation. Finally, restoration of normoglycemia was analyzed after ModPI transplantation in a diabetic animal model and compared with that of pancreatic islets, PI and islets that were co-transplanted with the equivalent amount of bone marrow cells.

ModPI showed an accelerated and improved vascularization compared to pancreatic islets and PI. This became obvious by a significantly increased functional capillary density and a significantly enlarged revascularized tissue area. Likewise ModPI showed increased vessel diameters and an increased volumetric blood flow. Flow cytometric analysis of the bone marrow cells of the ModPI showed a considerable number of cells with endothelial, stem cell and progenitor cell characteristics. Immunohistochemistry showed that ModPI contained the same number of insulin-positive cells as observed in islets and PI. Moreover, the intracellular content of the two other endocrine pancreatic hormones glucagon and somatostatin was almost identical in ModPI, islets and PI. Comparing the insulin protein production, ModPI showed slightly, but not significantly lower insulin levels than islets, but similar levels compared to PI.

The stimulation of the ModPI in the glucose stimulation test revealed an increased secretory response only after high glucose stimulation.

In a second in vivo study, the ModPI showed an effective therapeutic benefit. They were able to normalize blood glucose after transplantation faster than islets and islets with co-transplanted BMCs, whereas PI could not revert glycemic derailments at all. In addition, blood glucose levels were lowest after ModPI transplantation. Accordingly, the animals of the ModPI group showed the best weight gain during the experimental period. Histologically, 82% of all investigated transplants of the ModPI group showed positive staining for insulin, which was even higher than that of the islet group with 79%. CD31 stainings confirmed that ModPIs developed the most microvessels, indicating the improved revascularization in the diabetic recipient tissue.

Based on the results of the present study, the generation of modified pseudoislets by combination of islet cells and bone marrow cells may represent an ideal tool to enrich the transplantable tissue. The therapeutic benefit of the modified pseudoislets includes the enhanced revascularization of the grafts and a reduced mass of islet tissue for maintaining an adequate secretory capacity.

3. Einleitung

3.1 Die Entdeckung der Langerhans-Inseln und des Insulins

Die Symptomatik des Diabetes mellitus wurde bereits um ca. 1500 v. Chr. in dem altägyptischen Papyrus Ebers als eine mit einem vermehrten Harnfluss zusammenhängende Erkrankung beschrieben und aufgrund der damit einhergehenden Glukosurie als „Honigsüßer Durchfluss“ bezeichnet. Genauere Ursachen der Erkrankung waren zu diesem Zeitpunkt allerdings noch unbekannt und es dauerte bis zum Jahr 1869 bis Paul Langerhans jr. bei Untersuchungen des Kaninchenpankreas im Rahmen seiner Doktorarbeit zum ersten Mal einen „Körnchenbaum“ beschrieb. Hiermit waren die sich verzweigenden abführenden Pankreasgänge mit den umliegenden Langerhans-Inseln gemeint. Die Aufklärung der genaueren Funktion seiner Entdeckung sowie weitere Forschungserfolge auf diesem Gebiet erlebte Langerhans allerdings nicht mehr, da er 1881 im Alter von nur 40 Jahren an Tuberkulose verstarb.

Oscar Minkowski wies 1892 nach, dass der Diabetes mellitus bei pankreatektomierten Hunden durch subkutane Transplantation von Pankreasgewebe therapiert werden kann (Huismans, 2005). Der französische Forscher Edouard Laguesse stellte 1893 die Theorie auf, dass die Langerhans'schen Inseln ein Sekret produzieren, das den Blutglukosespiegel reguliert (Pliska et al., 2005). Im Jahr 1909 gab Jean de Meyer diesem hypothetischen Pankreashormon den Namen „Insulin“. Erst im Jahr 1921 gelang es dem kanadischen Chirurgen Frederick Grant Banting und seinem Schüler Charles Herbert Best aus Bauchspeicheldrüsen von Hunden und Kälbern einen Insulin-haltigen Extrakt zu isolieren, dessen intravenöse Applikation bei einem pankreatektomierten Hund zur Blutzuckersenkung führte. Für ihre Ergebnisse wurden sie im Jahr 1923 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Während John Jacob Abel bereits 1926 die chemische Reindarstellung des Insulinmoleküls gelang (Anderson, 2009), erfolgte die synthetische Gewinnung von Rinderinsulin erstmalig im Jahr 1963 (Meienhofer et al., 1963). Die ersten diabetischen Patienten wurden allerdings bereits seit 1923 mit Insulinpräparaten behandelt (Mehnert und Schulz, 1999). 1965 gelang es zum ersten Mal, funktionsfähige Inseln durch Kollagenase-Digestion des Pankreas aus dem Meerschweinchen zu isolieren (Moskalewski, 1965). Lacy und Kostianovsky injizierten im Jahr 1967 erstmalig die Kollagenaselösung direkt über den Ausführungsgang des Pankreas, was bewirkte, dass sich die Inseln durch gezielte Zerstörung der Stützstrukturen wesentlich

leichter isolieren ließen (Lacy und Kostianovsky, 1967). Horaguchi und Merrell übernahmen diese Methode und etablierten sie als Standardmethode zur Isolierung von Langerhans-Inseln, die bis heute noch angewendet wird (Horaguchi und Merrell, 1981).

3.2 Das Pankreas

3.2.1 Aufbau und anatomische Lage

Das Pankreas ist eine quer im Oberbauch liegende ca. 15-20cm lange Drüse, bestehend aus exo- und endokrinen Anteilen. Das keilförmige Organ, welches sich in unregelmäßige Läppchen untergliedert, liegt sekundär retroperitoneal zwischen Magen, Milz, Leber und den großen Bauchgefäßen (Aorta und untere Hohlvene) und steht in enger Beziehung zum Duodenum. Die einzelnen Pankreasabschnitte (Kopf, Körper und Schwanz) werden vollständig von dem Ausführungsgang (Ductus pancreaticus) durchzogen, welcher gemeinsam mit dem von Leber und Gallenblase kommenden Hauptgallengang (Ductus choledochus) in den Zwölffingerdarm (Duodenum pars descendens) mündet (Abb. 1A). Dieser gemeinsame Ausführungsgang endet in einer warzenförmigen Schleimhautfalte im Duodenum, der sogenannten Papilla duodeni major. Ausgehend vom Ductus pancreaticus fließen die zahlreichen verzweigten Zuflüsse in die einzelnen Pankreasläppchen hinein. In manchen Fällen ist sogar ein zusätzlicher Pankreasgang vorhanden, der Ductus pancreaticus accessorius (Abb. 1B), welcher dann über die Papilla duodeni minor in das Duodenum mündet.

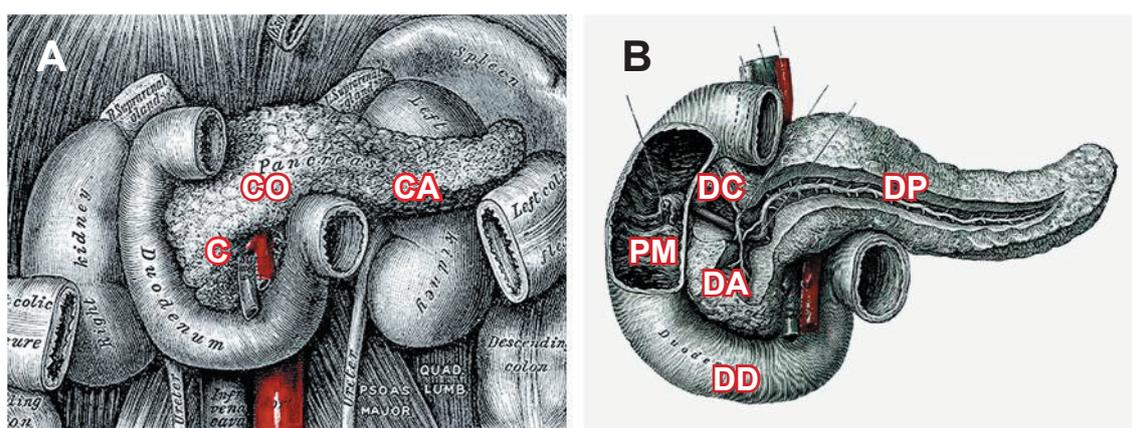


Abb. 1: **A:** Schematische Darstellung der anatomischen Lage des Pankreas, C: Caput (Kopf), CO: Corpus (Körper), CA: Cauda (Schwanz). **B:** Anatomie des Pankreas und seiner Ausführungsgänge. Quelle: Henry Gray, *Anatomy of the Human Body* (1918) auf <http://www.bartleby.com>. PM: Papilla duodeni major, DC: Ductus choledochus, DA: Ductus pancreaticus accessorius, DD: Duodenum pars descendens, DP: Ductus pancreaticus. Quelle: Henry Gray's anatomy of the human body, 1918, www.bartleby.com/107/indexillus.html

3.2.2 Exokrines Pankreas

Ca. 98-99% des Pankreasgewebes sind dem exokrinen Drüsenanteil zugehörig und sind somit für die Bildung von Verdauungsenzymen verantwortlich. Durch das Hormon Pankreozymin (Cholecystokinin) werden die Azinuszellen zur Abgabe von Zymogengranula in das Bicarbonat-haltige, alkalische Verdauungssekret angeregt (Harper und Raper, 1949). Das Peptidhormon Sekretin regt das Pankreas zur Produktion des Bicarbonat-haltigen Verdauungssekrets an und hemmt somit die Magensäureproduktion (Bayliss und Starling, 1902). Täglich produziert die Bauchspeicheldrüse zwischen 1-1,5 l dieses alkalischen Verdauungssekrets (pH 8,3), welches die wichtigsten Eiweiß-, Kohlehydrat-, und Fett-spaltenden Enzyme enthält (Beck, 1973). Bis auf Amylase und Lipase liegen diese Enzyme in der Drüse als inaktive Proenzyme vor und werden zum Schutz vor einer Autodigestion des Pankreas erst im Dünndarm durch Trypsin aktiviert (Steinberg und Tenner, 1994).

3.2.3 Endokrines Pankreas

Vom endokrinen Drüsenanteil des Pankreas, dem sogenannten Inselapparat, werden Hormone direkt ins Blut abgegeben. Die als Langerhans'sche Inseln bezeichneten Zellverbände sind über die komplette Bauchspeicheldrüse verteilt. Die Anzahl der Inseln ist dabei im Schwanzbereich im Vergleich zu Kopf und Körper des Pankreas signifikant erhöht (Gustafsson und Islam, 2007; Wittingen und Frey, 1974). Die Inseln setzen sich zum größten Teil aus vier verschiedenen endokrinen Zelltypen zusammen, den α -, β -, δ - und PP-Zellen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass ein adultes menschliches Pankreas etwa 1 Mio. Inseln enthält. Neuere Studien, in welchen Pankreata morphometrisch untersucht wurden, sprechen aber eher für eine Gesamtanzahl von 3,6 bis 14,8 Mio. dieser endokrinen Miniorgane (Korsgren et al., 2005; Srinivasan et al., 2006). Trotz dieser außerordentlich groß anmutenden Anzahl macht der gesamte Inselapparat nur ein Gewicht von 1-2g aus, was einem Anteil von 0,8–3,8% des Gesamtgewebes der Bauchspeicheldrüse entspricht (Hedekov, 1980; Shapiro und Shaw, 2007).

3.3 Die Langerhans-Insel

3.3.1 Zelltypen und deren Funktion

Die Größe der Inseln kann von wenigen hundert Zellen und einem Durchmesser von 40 μ m bis zu Aggregaten von rund 5000 Zellen mit einem Durchmesser von 300-400 μ m variieren (Bon-

ner-Weir, 1991). Durchschnittlich bestehen sie aus etwa 1000-2000 endokrinen Zellen (Hellman et al., 1964) und besitzen einen Durchmesser von $157\mu\text{m}$ (Shapiro und Shaw, 2007). Die stark kapillarisierten und innervierten Langerhans-Inseln sind in histologischen Präparaten leicht vom umliegenden Gewebe abgrenzbar. Neben den endokrinen Zellen setzen sich die Inseln zudem aus Fibroblasten sowie endothelialen und neuronalen Zellen zusammen (Bonner-Weir, 1991). Die stark ausgeprägte Mikrovaskularisierung der Inseln weist einen direkten arteriellen Blutfluss auf, welcher bei einem Anstieg des Blutglukosespiegels die unmittelbare Sekretion der Pankreashormone ins Blut ermöglicht. Durch ihr fenestriertes Endothel laufen in den Inselkapillaren zwischen 10-20% des pankreatischen Gesamtblutflusses ab. Unter den vier essenziellen endokrinen Zelltypen (α -, β -, δ - und PP-Zellen) haben die Insulin-produzierenden β -Zellen mit ca. 65-80% den größten Anteil an der Insel, gefolgt von den Glukagon-sezernierenden α -Zellen mit rund 15-20%. Die Somatostatin-produzierenden δ -Zellen tragen mit 3-10% einen relativ geringen Anteil am Aufbau der Insel, während die Polypeptid-produzierenden PP-Zellen mit nur noch 1-2% die kleinste Population innerhalb einer Insel darstellen (Ashcroft und Gribble, 1999).

Diese vier endokrinen Zelltypen beeinflussen sich gegenseitig über parakrine Sekretionseffekte in ihrer Hormonproduktion sowie -sekretion. Die Langerhans-Inseln regulieren durch die Ausschüttung von Insulin und Glukagon und deren aufeinander abgestimmtes Gegenspiel den Blutzuckerspiegel, wobei diese selbst der Regulation durch andere Hormone sowie nervalen und metabolischem Reizen unterliegen. Vor wenigen Jahren konnte eine weitere kleine Population endokriner Zellen innerhalb der Insel nachgewiesen werden: die Ghrelin-produzierenden ϵ -Zellen (Wierup und Sundler, 2005).

3.3.2 Struktureller Aufbau

Der strukturelle Aufbau der Langerhans-Inseln ist speziesspezifisch. Die dreidimensionale Inselstruktur und das Verhältnis der einzelnen endokrinen Zelltypen zueinander sind beim Nager und Menschen unterschiedlich ausgeprägt. Humane Inseln werden erst seit kurzem genauer hinsichtlich ihrer zellulären Komposition untersucht, wohingegen schon relativ früh die Architektur von Nager-Inseln beschrieben wurde (Cirulli et al., 1994). Im Jahr 2005 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Insulin-produzierenden β -Zellen humaner Inseln über die gesamte Insel verteilt sind, wohingegen sie bei Nagern fast ausschließlich im Zentrum der Inseln

lokalisiert sind (Abb. 2B) (Brissova et al., 2005). Der relative Anteil an β -Zellen ist in humanen Inseln mit 55% sehr viel geringer, als in Nager-Inseln mit rund 77%. Umgekehrt ist der Anteil an α -Zellen in humanen Inseln wesentlich höher als in Nager-Inseln (rund 35% im Vergleich zu 18%) (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006). Inseln von Ratte und Maus weisen eine sehr homogene und konstante β -Zell-Verteilung auf (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006), im Gegensatz zu humanen und caninen Inseln, in denen die β -Zellzahl von Insel zu Insel sehr unterschiedlich ausfallen kann (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006). Abgesehen von den Unterschieden zwischen den verschiedenen Spezies hängt die strukturelle Heterogenität der Inseln von weiteren Faktoren ab. Beispielsweise sind Inseln im splenischen Teil des Pankreas reich an Glukagon-positiven Zellen und arm an PP-produzierenden Zellen. Bei Glukosestimulation setzen diese mehr Insulin frei, als Inseln im duodenalen Teil des Pankreas (Trimble et al., 1982). Nicht alle β -Zellen innerhalb einer Insel zeigen dabei eine gleichgeschaltete Glukose-induzierte Insulinsekretion. Bei Erhöhung der Glukosekonzentration werden deshalb mehr und mehr β -Zellen rekrutiert, die ihrerseits mit der Insulinsekretion beginnen (Schuit et al., 1988).

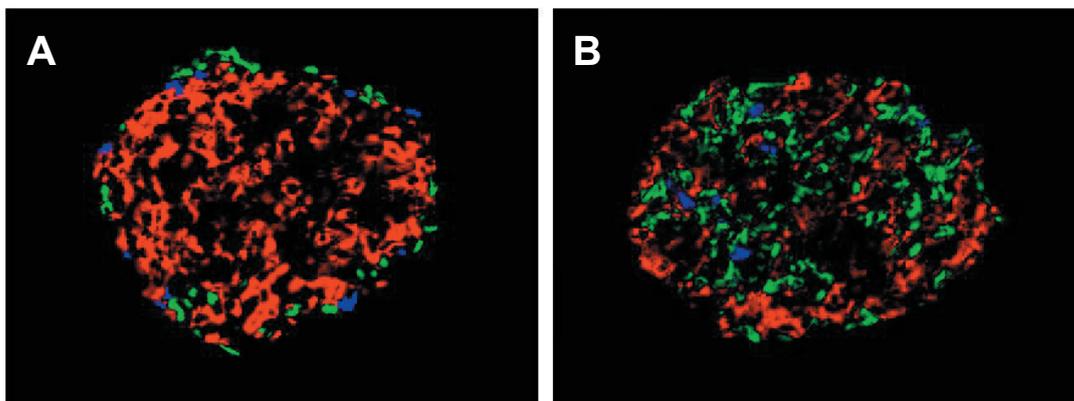


Abb. 2: **A:** Murine Insel mit klar strukturierter Anordnung der einzelnen endokrinen Zelltypen, **B:** Humane Insel mit unstrukturierter Anordnung der einzelnen endokrinen Zelltypen (rot: Insulin-positive Zellen, grün: Glukagon-positive Zellen, blau: Somatostatin-positive Zellen). Quelle: Brissova et al., 2005.

3.4 Insulinbildung und Insulinspeicherung

Die 104 AS lange mRNA des Präproinsulin-Gens, welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 sitzt, wird durch ihre Signalsequenz an das raue ER (RER) innerhalb der β -Zelle transportiert. Hier entsteht durch proteolytische Abspaltung der Signalsequenz und Ausbildung dreier Disulfidbrücken das Proinsulin (Abb. 3) (Steiner et al., 1985). Die aus 21 AS zusammengesetzte A-Kette ist hierbei mit der 30 AS langen B-Kette über zwei Disulfidbrücken an Cysteinresten

miteinander verbunden. Eine dritte raumstabilisierende Disulfidbrücke findet sich zusätzlich innerhalb der A-Kette. Vom Golgi-Apparat werden Proinsulinmoleküle in sekretorische Granula verpackt und dort bis zum Gebrauch in Form von Hexameren als Insulin-Zink-Komplex gespeichert. Erst beim Ansteigen des Blutglukosespiegels schneiden spezifische Peptidasen die 31 AS lange C-Peptid-Sequenz, welche die A- und B-Kette des Proinsulins miteinander verbindet, aus diesem heraus und es entsteht das aktive Insulin, welches nun zusammen mit C-Peptid und Zink ausgeschüttet wird. Hierbei wird die Verknüpfung zwischen B-Kette und C-Peptid am basischen AS-Paar Arg31-Arg32 durch die Endoprotease PC2 geschnitten und die Verknüpfung zwischen A-Kette und C-Peptid am AS-Paar Lys64-Arg65 wird durch die Endoprotease PC3 aufgespalten (Abb. 3).

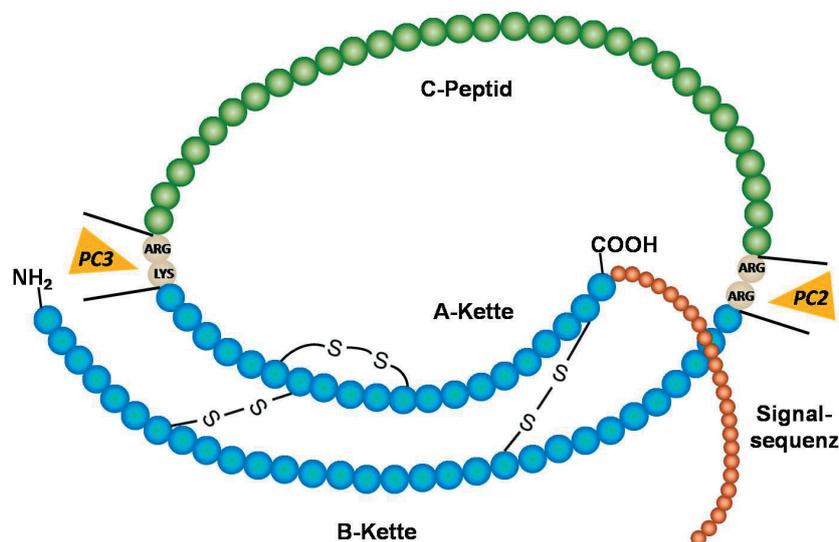


Abb. 3: Schematische Darstellung der Bildung eines Insulinmoleküls (blau) durch Abspaltung der Signalsequenz vom Präproinsulinmolekül (braun) und anschließende Abspaltung des C-Peptides vom Proinsulinmolekül (grün).

3.4.1 Molekulare und physiologische Insulinwirkung

Beim Überschreiten einer Blutglukosekonzentration von 6mmol werden Glukosemoleküle in den Intrazellularraum der β -Zelle geschleust, wo es zu einem spannungsabhängigen vermehrten Einstrom von Kalziumionen kommt. Dies ist der entscheidende Reiz für die Verschmelzung insulinhaltiger Vesikel mit der Zellmembran und der Sekretion von Insulin aus der β -Zelle in den Blutkreislauf (Hedekov et al., 1980). Zielzellen des Insulins sind dabei grundsätzlich alle Körperzellen. Die Hauptwirkungsorte stellen jedoch die Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche von Hepatozyten, Skelett- und Herzmuskelfasern, Adipozyten sowie Fibroblasten dar.

Der Blutglukosespiegel wird durch die vermehrte Glukoseaufnahme in die Leberzellen über den insulinunabhängigen GLUT2-Transporter und im Muskel- und Fettgewebe über den insulinabhängigen GLUT4-Transporter gesenkt (Bell et al., 1990). Insulin induziert zudem in den Leber- und Muskelzellen die Glukosespeicherung durch die Glykogensynthese. Des Weiteren erfolgt eine Hemmung der Glukoneogenese in den Leberzellen (Brealey und Singer, 2009). In Hepatozyten und Adipozyten wird unter Insulineinfluss die Bildung von Triglyceriden stimuliert. Zusätzlich wird durch Insulin die Speicherung von Aminosäuren in den Muskeln gefördert. Bei einem Abfallen des Blutzuckerspiegels unter einen Wert von 80-85mg/dl wird zunächst die Insulinsynthese gestoppt. Bei fortschreitender Hypoglykämie wird ab Serumblutglukosewerten von 65-70mg/dl die Glukagon-Produktion erhöht. Auch Epinephrin, Kortisol und Somatotropin werden nun vermehrt produziert und in das Blut abgegeben (Cryer, 2008). Beim Typ 1 Diabetes ist dieser Gegenregulationsmechanismus oftmals gestört, was dann zur Ausbildung von Hypoglykämien führen kann.

3.5 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM) bezeichnet eine Stoffwechselerkrankung, die durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert ist und auf einem relativen oder absoluten Insulinmangel beruht. Dieser Mangel wird entweder durch eine Insulinsekretionsstörung ausgelöst, wie im Fall des Diabetes mellitus Typ 1 (DM Typ 1), oder durch eine Insulinsekretionsstörung in Kombination mit einer (erworbenen) Insulinresistenz der peripheren Gewebe, wie beim Diabetes mellitus Typ 2 (DM Typ 2) (Kerner et al., 2004). Die WHO definiert den DM als manifest bei mehrmals gemessenen Nüchternblutzuckerwerten über 126mg/dl oder bei einem Maximalwert von > 200mg/dl und/oder einem Wert von > 140mg/dl zwei Stunden nach Belastung im Verlauf eines oralen Glukosetoleranztests (WHO, 2006).

Seit 1998 werden die beiden klinisch am häufigsten vorkommenden Diabetesformen als DM Typ 1 (vormals insulinabhängiger DM = IDDM) und DM Typ 2 (vormals nichtinsulinabhängiger DM = NIDDM) bezeichnet (Alberti und Zimmet, 1998). Der DM Typ 1 ist durch eine vollständige Destruktion der β -Zellen und somit durch einen absoluten Insulinmangel definiert. Der DM Typ 2 ist zum einen durch einen relativen Insulinmangel infolge einer Insulinresistenz und/oder durch einen Insulinsekretionsdefekt charakterisiert (Melchionda et al., 2002; WHO, 2006). Die klassischen Symptome des DM Typ 1 sind Hyperglykämie, Polydipsie, Polyurie, Ge-

wichtsverlust und Ketoazidose (Kerner et al., 2004). Neben den Akutkomplikationen, wie z.B. hypoglykämischer Schock oder diabetisches Koma, spielen auch diabetische Folgeerkrankungen eine wesentliche Rolle für die Prognose der Patienten. Trotz regelmäßiger Insulininjektionen kann es zu (chronischen) Hyperglykämien kommen, welche ursächlich für die Entstehung mikrovaskulärer Komplikationen wie z.B. Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie sowie makrovaskulärer Komplikationen wie z.B. die Arteriosklerose der (Koronar-) Arterien sind (Heller et al., 2004). Aufgrund dieser Diabetes-begleitenden Komplikationen haben Diabetiker im Vergleich mit gesunden Menschen eine durchschnittlich um 8 Jahre kürzere Lebenserwartung (Franco et al., 2007).

3.5.1 Diabetes mellitus Typ 1

Nur etwa 5-10% aller Diabetes-Patienten leiden unter einem DM Typ 1, welcher vorwiegend in jüngeren Lebensjahren auftritt. Dies bedeutet dass bis zum 20. Lebensjahr rund 40% der Patienten und bis zur Vollendung des 25. Lebensjahrs sogar 90% aller Patienten bereits an einem DM Typ 1 erkrankt sind (Hürter et al., 2005; Freiberg, 2004). Der DM Typ 1 teilt sich in zwei Subtypen auf: den immunologisch vermittelten Typ 1A, welcher auf einer Entzündungsreaktion des Pankreas basiert (Wild et al., 2004) und den idiopathisch vermittelten Typ 1B, bei welchem keine ätiopathogenetischen Ursachen zugrunde liegen. Bei diesem Subtyp lassen sich deshalb auch keine Marker eines Autoimmunprozesses nachweisen (WHO, 2006). Die Zahl der Betroffenen mit einem DM Typ 1 beläuft sich in Deutschland derzeit auf ca. 400.000-800.000 Erkrankte. Bei weltweit über 246 Mio. an Diabetes Erkrankten kann davon ausgegangen werden, dass zwischen 12,3 und 24,6 Mio. an einem DM Typ 1 leiden (IDF, 2006).

Die im Rahmen der Insulitis, einer Entzündung der Bauchspeicheldrüse, verlaufende Zerstörung der β -Zellen beruht auf einem komplexen Prozess. Hierbei infiltrieren Makrophagen die Zelle und schütten cytokinabhängig Stickstoffmonoxid (NO) aus, was die Bildung freier Radikale begünstigt (Mandrup-Poulsen, 1996). Bei der T-Zell-vermittelten autoimmunen Destruktion der Insulin-produzierenden Zellen leiten β -zellspezifische $CD4^+$ -Lymphozyten den Zerstörungsprozess ein (Bendelac et al., 1987). Die Lyse der β -Zellen erfolgt nach dem Anlagern der Lymphozyten an die Zellwand (Lampeter et al., 1995), wobei sich die Inselinfiltration dabei lediglich auf die β -Zellen beschränkt und die α - und δ -Zellen verschont. Durch diese initiale Attacke der Immunzellen wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, in deren Verlauf über

Präsentation des β -Zell-Antigens spezifische autoaggressive Zellen aktiviert werden, wodurch die Sezernierung spezifischer Zytokine initiiert wird (Ohashi et al., 1991). Die freigesetzten Zytokine setzen wiederum eine Signalkaskade in Gang, die zur Apoptose der β -Zellen führt. Nach Aktivierung setzt sich dieser selbst aufrechterhaltende Prozess der β -Zellzerstörung so lange fort, bis keine β -Zellen mehr vorhanden sind (Yoon und Jun, 2001). Die Manifestation eines Autoimmundiabetes hat multifaktorielle Ursachen, wie z.B. eine genetische Prädisposition oder Umweltreize wie Infektionen (Burgess und Forrest, 2009), Chemikalien (Penforinis und Kury-Paulin, 2006) oder Nahrungsmittelbestandteile (Virtanen und Knip, 2003). Darüber hinaus kann die Ausbildung eines DM Typ 1 auch durch die starke Analogie zwischen viralen bzw. bakteriellen Proteinen mit körpereigenen Proteinen begünstigt werden (Wucherpfennig, 2001). Aber auch zu hohe Hygienestandards können durch den Mangel an „nützlichen“ bzw. harmlosen Bakterien wie Enterokokken oder Bifidobakterien und einer damit verbundenen mangelnden Immunabwehr zur Ausbildung des DM Typ 1 führen (Wen et al., 2008).

3.5.1.1 Manifestation und Marker

Der DM Typ 1 wird erst bei einem Verlust von 80-90% der β -Zellmasse klinisch manifest (Eisenbarth et al., 1986). Im Blut von DM Typ 1 Patienten lassen sich Diabetes-spezifische Antikörper nachweisen, wie z.B. ICA (islet cell specific antigen), IAA (Insulinautoantikörper), IA2-AK (Tyrosin-Phosphatase Antikörper), GADA (Glutamat-Decarboxylase Antikörper) oder das 38kDa-Antigen (Ziegler et al., 1999; Atkinson und McLaren, 1990; Roep et al., 1991). In 80% der Patienten ist mindestens einer der Autoantikörper zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung nachweisbar (Zimmet et al., 1994). Etwa ein Zehntel der als DM Typ 2 diagnostizierten Patienten leidet in Wirklichkeit unter einem autoimmun verursachten Insulinmangeldiabetes (Giani et al., 2004). Dieses als LADA (late onset diabetes in adults) bezeichnete Syndrom ist ebenfalls gekennzeichnet durch eine Autoantikörperreaktion gegen die pankreatischen β -Zellen.

3.5.2 Diabetes mellitus Typ 2

Der DM Typ 2 manifestiert sich in der Regel nicht vor dem 30. Lebensjahr, betrifft häufig adipöse Menschen und stellt mit ca. 90-95% aller diagnostizierten Erkrankungen die häufigste Form des Diabetes mellitus dar (DeFronzo, 1992). Trotz der Tatsache, dass es ab dem 50. Lebensjahr zu einer sprunghaften Zunahme an DM Typ 2-Erkrankungen kommt, sind immer mehr jüngere

Patienten betroffen. Die Manifestation des DM Typ 2 vollzieht sich schleichend und wird häufig erst bei Behandlung diabetesbegleitender Erkrankungen, wie z.B. einer Retinopathie oder eines Herzinfarkts, diagnostiziert. Beim DM Typ 2 besteht eine deutliche phänotypische Variabilität mit unterschiedlich stark ausgeprägten Störungen der Insulinwirkung (Insulinresistenz) (Rett et al., 1994; Zhang et al., 1996) sowie der Insulinsekretion (Martin et al., 1992, Zimmet et al., 2001). Die durch die genetische Prädisposition ausgelöste Resistenz wird durch einen Rezeptordefekt an der Zellmembran verursacht (Abdul-Ghani und DeFronzo, 2010). Bei dem Versuch durch Produktion großer Insulinmengen den Mangel zu kompensieren, induziert die Bauchspeicheldrüse an den Insulin-abhängigen Organen (Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe) eine sekundäre Hyperinsulinämie. Nach Jahren kommt es zu einer Erschöpfung der Insulinproduktion im Pankreas und einem Abfall der Sekretionskinetik. Die produzierte Insulinmenge reicht dann nicht mehr aus, um den Blutzuckerspiegel zu kontrollieren und der DM Typ 2 wird manifest.

3.5.2.1 Epidemiologie

Der Anteil der Diabetiker innerhalb der deutschen Bevölkerung steigt dabei stetig an. Berechnungen für den Zeitraum 1998 bis 2004 ergaben im Bundesland Hessen einen Wert von 7,9% an Diabetes-Erkrankten (Hauner et al., 2007). Im Jahr 2006 lag nach Angaben der WHO in Deutschland die Zahl der an Diabetes erkrankten Menschen bereits bei 8 Mio., was etwa 9,7% entspricht. Im Jahr 2010 soll die Zahl der Betroffenen auf schätzungsweise zehn Mio. steigen. Die International Diabetes Federation (IDF) berechnete, dass 2006 weltweit 5,9% der erwachsenen Bevölkerung an einem DM erkrankt waren, was 246 Mio. Menschen entspricht. Chronische Erkrankungen wie der DM nehmen besonders in Entwicklungsländern stark zu. Laut IDF sterben jährlich 3,8 Mio. Menschen an Diabetes mellitus und seinen Folgeerkrankungen (IDF, 2006).

3.5.3 Weitere Diabetesformen

Alle übrigen Formen des DM, die sich nicht den Gruppen des DM Typ 1 und Typ 2 zuordnen lassen, werden in der Gruppe der „anderen spezifischen Diabetesformen“ (neuerdings als DM Typ 3 bezeichnet) zusammengefasst. Zur Klasse der genetischen Defekte der β -Zelle kann auch der sogenannte „Maturity onset diabetes of the young“ (MODY) gezählt werden, wel-

cher sich bereits in der Kindheit oder Jugend manifestiert und sich in 6 verschiedene Unterformen unterteilen lässt. Die Erkrankung bei den MODY-Formen beruht auf Mutationen von Genen des Glukosestoffwechsels (Weir et al., 2001). Während der Schwangerschaft kann es unter Umständen zur Ausbildung eines sogenannten Gestationsdiabetes kommen, der etwa bei 5% aller schwangeren Frauen auftritt und unmittelbar nach der Geburt des Kindes wieder verschwindet (WHO, 2006).

3.6 Tiermodelle des insulinabhängigen Diabetes

Schon seit langem werden Tiermodelle zur Erforschung des Insulin-abhängigen DM genutzt. Zu Beginn der Diabetes-Forschung wurde in Hunden durch Pankreatektomie ein hyperglykämischer Zustand herbeigeführt. In der jüngeren Vergangenheit konnten durch selektive Inzucht Tierstämme herangezüchtet werden, die als adäquate Modelle des DM Typ 1 und Typ 2 sowie den damit verbundenen Phänotypen der Adipositas und der Insulinresistenz gelten (Rees und Alcolado, 2005). Zu den wichtigsten diabetischen Tiermodellen, die einen spontanen DM Typ 1 entwickeln, zählen zum einen die NOD-Maus (Non-obese diabetic) (Kikutani und Makino, 1992) und die Wistar-BB-Ratte (Bio breeding) (Rees und Alcolado, 2005). Als gängige Tiermodelle des DM Typ 2 gelten die NZO-Maus (New Zealand obese), die ob/ob-Maus (Punktmutation im obese-Gen) sowie die db/db-Maus (Punktmutation im diabetic-gene) (Pelleymounter, 1995)

Es sind derzeit einige Tiermodelle beschrieben, die sich zur Untersuchung eines induzierten Diabetes mellitus eignen. Neben der Behandlung mit Alloxan und Doxycyclin (Claudino et al., 2007; Nir et al., 2007) ist die Applikation von Streptozotocin die am häufigsten beschriebene Methode zur Induktion eines Diabetes. Hierbei werden bevorzugt Nagetiere verwendet, welche das Agens einmalig als höhere Dosis oder mehrmalig als niedrige Dosis, injiziert bekommen.

Bei dem Breitbandspektrum-Antibiotikum Streptozotocin handelt es sich um ein N-methyl-N-nitroso-urea D-glucosamin Derivat, welches 1959 erstmals aus dem Bakterium *Streptomyces achromogenes* isoliert wurde (Vavra et al., 1959). Schnell entdeckte man, dass es auf die Insulin-produzierenden β -Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln selektiv toxisch wirkt und hat es sich schon sehr früh zur Herstellung von Tiermodellen des DM Typ 1 zunutze gemacht (Mansford und Opie, 1968). Unter dem Handelsnamen Zanosar[®] wird es bei der Krebsthera-

pie eingesetzt. Aufgrund seiner carcinogenen, cytotoxischen und teratogenen Eigenschaften (Weisberger et al., 1974) ist eine therapeutische Anwendung von Streptozotocin heutzutage allerdings lediglich auf die Behandlung von nicht operablen Insulinomen beschränkt (Brentjens und Saltz, 2001). Versuchstiere mit einer Streptozotocin-Behandlung entwickeln einen Diabetes, basierend auf einer Autoimmunreaktion gegenüber den β -Zellen des Pankreas ähnlich wie bei einer Insulitis (McEvoy et al., 1984). Die Tiere sind durch eine schwere Hyperglykämie bei einer Insulindefizienz in Pankreas und Plasma charakterisiert (Like et al., 1978), womit dieses Modell Parallelen zum DM Typ 1 beim Menschen bietet (Ziegler et al., 1984).

3.7 Therapie

3.7.1 Basistherapie und Anwendung oraler Antidiabetika

Bei Patienten mit einem leichten DM Typ 2 kann man die Hyperglykämie mit einer Ernährungsumstellung einschließlich einer Gewichtsreduktion und sportlicher Aktivität revertieren. Durch Sport wird die Skelettmuskulatur dazu angeregt, wieder mehr Glukose aufzunehmen und zu verstoffwechseln. In fortgeschritteneren Stadien, in denen die Basistherapie alleine nicht mehr ausreicht, Hyperglykämien zu verhindern, kommen orale Antidiabetika zum Einsatz. Es gibt zahlreiche orale Antidiabetika, die auf unterschiedliche Weise Einfluss auf die Blutzuckerregulation nehmen. Die Biguanide, wozu beispielsweise Metformin zählt, vermindern die Glukoseabgabe aus der Leber mit gleichzeitig gesteigerter Glukoseaufnahme durch das Gewebe, insbesondere der Skelettmuskulatur (Harborne et al., 2005).

Andere, wie z.B. die Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Tolbutamid, rufen durch Depolarisation der β -Zellmembran eine erhöhte Insulinausschüttung hervor. Ihre weiteren Wirkmechanismen können eine künstlich verlängerte Insulinausschüttung und eine langsamer ansteigende Glukosekonzentration im Blut sein (Chen et al., 2005). α -Glukosidasehemmer wie Acarbose wirken kompetitiv hemmend auf die α -Glukosidasen im Darm und verzögern so die Glukoseaufnahme in das Blut (Cheng und Fantus, 2005). Mit der Darreichung von GLP-1 Analoga wie Exenatid wird die gezielte Steigerung der Insulinsyntheserate und eine Steigerung der β -Zellmasse beabsichtigt. Desweiteren werden β -Zellapoptose und Glukagonsekretion des Pankreas vermindert (Robles und Singh-Franco, 2009). Zu guter Letzt seien noch die Dipeptidyl-Peptidase-4-Hemmer (DPP-4-Hemmer) erwähnt, welche durch Unterdrückung der DPP-4 den Effekt der körpereigenen Inkretine GLP1- und GIP verstärken. Sildagliptin und Vil-

dagliptin sind zwei in der Diabetestherapie häufig verwendete Präparate aus der Klasse dieser DPP-4-Hemmer (Haidinger et al., 2010).

3.7.2 Insulintherapie

Bei vielen Patienten die unter einem DM Typ 2 leiden muss Insulin im Rahmen einer Insulintherapie substituiert werden. Bei der konventionellen Insulintherapie (CT) werden zu festgelegten Zeiten bestimmte Mengen von Mischinsulin injiziert. Unter Umständen wird jedoch der Insulinbedarf bei unzureichender Eigensekretion nur unvollständig gedeckt. Darüber hinaus wird vom Patienten eine enorme Selbstdisziplin aufgrund des eingeschränkten Ernährungsplans abverlangt. Bei DM Typ 1 Patienten kommt die sogenannte intensivierete konventionelle Insulintherapie (ICT) zum Einsatz. Bei dieser Zwei-Spritzen-Therapie wird durch 1- bis 3-malige tägliche Insulininjektionen eine Grundversorgung des Organismus mit Insulin gewährleistet (= Basis). Zusätzlich erfolgen zu jeder Mahlzeit einzelne Insulininjektionen (= Bolus), wodurch die Insulinsekretion einer gesunden Bauchspeicheldrüse nachgeahmt wird (Jaeckel und Lehner, 2009). Die ICT ermöglicht dem Patienten im Gegensatz zur konventionellen Insulintherapie eine unabhängigere Lebensgestaltung.

Nachteilig sind hingegen die manchmal ungenügende nächtliche Versorgung mit Insulin sowie potentielle hypoglykämische Episoden durch Dosierungsfehler des Insulins oder durch Diätfehler. Zur Vermeidung glykämischer Entgleisungen kommt bei immer mehr Typ 1 Patienten eine Insulinpumpe zum Einsatz, mit welcher die basale Insulinrate genauer gesteuert werden kann. Die über einen Katheter mit dem Körper verbundene Pumpe gibt in regelmäßigen Abständen von wenigen Minuten schnell wirkendes Insulin ab, sodass ein konstanter Basis-Insulinspiegel aufrechterhalten wird.

3.7.3 Pankreastransplantation

Nur bei schwerstgradig erkrankten DM Typ 1 Patienten mit unvermeidbaren Entgleisungen des Blutzuckerhaushalts wird das funktionslos gewordene Insulin-produzierende Gewebe durch Transplantation eines kompletten vaskularisierten Pankreas ersetzt. Die Erneuerung des Inselapparats durch eine Pankreastransplantation oder die Transplantation isolierter Inseln stellt auch heute noch die einzige Therapiemöglichkeit dar, durch welche ein Insulin-unabhängiger und konstant normoglykämischer Status des Patienten erreicht werden kann (Sutherland et

al., 1993). Seit der ersten Pankreastransplantation im Jahr 1966 (Kelly et al., 1967) wurden bis zum Jahr 2004 bereits mehr als 23.000 Pankreastransplantationen weltweit durchgeführt (IPTR, 2004; Gruessner und Sutherland, 2005). Hierbei handelte es sich bei der überwiegenden Zahl der Fälle um eine simultane Pankreas-Nierentransplantation (simultaneous pancreas kidney, SPK) bei Patienten die zusätzlich unter einer schwerwiegenden Nephropathie litten. Weitere Transplantations-Vorgehensweisen bestehen in einer Pankreastransplantation nach bereits erfolgter Nierentransplantation (pancreas after kidney, PAK) oder einer alleinigen Pankreastransplantation (pancreas transplantation alone, PTA). Die anfänglich schweren (postoperativen) Komplikationen konnten im Lauf der letzten Jahre durch Verbesserung der chirurgischen Techniken sowie des perioperativen Managements und der Weiterentwicklung immunsupprimierender Strategien gesenkt werden. Die im Anschluss an eine Transplantation folgende lebenslange immunsupprimierende Induktionstherapie besteht aus einer Kombination verschiedenster Immunsuppressiva und Steroiden.

Doppeltransplantationen zeigen hierbei günstigere Erfolgsaussichten, was sich an dem Ein-Jahres-Überleben der Spenderorgane von etwa 80-90% widerspiegelt. Im Vergleich dazu zeigt die alleinige Verpflanzung des Pankreas lediglich eine Ein-Jahres-Überlebensrate von 50-60% (Jaeckel und Lehner, 2009). Entscheidende Gründe für die Durchführung einer PTA, trotz der damit verbundenen Risiken, sind ein besonders labiler, nicht beherrschbarer Stoffwechselverlauf sowie der Verlust der Wahrnehmung wiederholt auftretender schwerster Hypoglykämien. Ungeachtet aller Erfolge, die auf dem Gebiet der Pankreastransplantation errungen werden konnten, ist diese allerdings immer noch verknüpft mit einer perioperativen Sterblichkeit und einer signifikanten Morbidität (Gruessner et al., 1997; Manske, 1999; Venstrom et al., 2003).

3.7.4 Inseltransplantation

Zwischen Januar 1990 und Mai 2005 wurden weltweit insgesamt 577 vom ITR (Islet Transplant Registry) registrierte Inseltransplantationen durchgeführt (Lehmann et al., 2005). Im Zeitraum zwischen 1999 und 2005 betrug das Patientenüberleben rund 97%. Funktionelle Inseltransplantate wurden in 82% der Fälle nachgewiesen, während Insulinfreiheit nur in 43% der Fälle zu beobachten war. Im Jahr 2000 gelang der Durchbruch auf dem Feld der klinischen Inseltransplantation, nachdem die erfolgreiche Transplantation in sieben DM Typ 1 Patienten zu

einer 1-Jahres-Insulinunabhängigkeit führte (Shapiro et al., 2000). Der neueinsetzende Erfolg beruhte dabei auf verschiedenen Veränderungen, wie der Verwendung einer Kombination verschiedener Immunsuppressiva, der Verkürzung der kalten Ischämiezeit sowie dem Vermeiden der vorangehenden Kultivierung der Inseln. Zusätzlich überstieg die Transplantatzahl erstmals einen Wert von 9.000 Inseläquivalenten (IEQ) pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers. In einer darauffolgenden Transplantationsserie konnte bei insgesamt 11 von 12 Patienten eine Insulinunabhängigkeit erzielt werden. Bei neun der behandelten Empfänger hielt diese auch 20 Monate nach Transplantation noch an (Ryan et al., 2001).

Seit Einführung der im sogenannten Edmonton-Protokoll festgelegten Neuerungen erreichte die Rate der Ein-Jahres-Insulinunabhängigkeit einen Wert zwischen 50-80% (Bretzel et al., 2007). Wie die Pankreastransplantation kann die Inseltransplantation entweder allein, oder in Kombination mit der Transplantation anderer Organe (in der Regel der Niere) erfolgen. Hierbei sind die Transplantat-Überlebensraten bei gleichzeitiger Nieren-Insel-Transplantation (simultaneous islet kidney, SIK) im Vergleich zur Insel- nach Nierentransplantation (islet after kidney, IAK) erhöht. Trotz allem scheint die IAK gegenüber einer alleinigen Inseltransplantation (islet transplantation alone, ITA) überlegen zu sein, trotz ähnlicher Werte für Insulinunabhängigkeit, funktioneller Inselmasse sowie Dauer des Transplantatüberlebens (Deng et al., 2009).

3.7.4.1 Vor-und Nachteile der Inseltransplantation

Durch die Implantation isolierter Langerhans-Inseln wird das Problem der Immunsuppression relativ minimiert und zudem werden nur die zerstörten Zellen ersetzt, da das Pankreas des Patienten in der Regel noch in der Lage ist, bis auf Insulin alle Hormone und Verdauungssekrete zu produzieren. Aufgrund dessen entfällt auch eine mit einer Transplantation des kompletten Pankreas einhergehende Transplantatpankreatitis, die nahezu bei allen Patienten auftritt (Liong et al., 2010). Die Inseln können in einem minimal-invasiven Eingriff mittels percutaner Katheterisierung der Portalvene unter Lokalanästhesie implantiert werden, was im Gegensatz zu einer konventionellen Organtransplantation unter Vollnarkose viel schonender für den Organismus ist. Mit Hilfe der transplantierten Inseln wird eine verminderte exogene Insulinzufuhr erzielt, wodurch der Patient unter Umständen sogar Insulinfreiheit erreicht. Probleme, die sich bei dieser Therapieform stellen, sind allerdings der Verlust größerer Inselmassen durch die

Isolierungsprozedur und die unzureichende bzw. verzögerte Revaskularisierung im Empfängerewebe. Darüber hinaus werden für eine erfolgreiche Transplantation bei einem Patienten die Inseln aus 2-3 Spenderpankreatata benötigt (Shapiro et al., 2000). Ein weiteres Problem stellt die Menge der zur Verfügung stehenden Spenderorgane dar. Jährlich kommt es allein in Deutschland zu 5000-6000 Neuerkrankungen mit DM Typ 1, 2000-3000 allein in der Altersgruppe der 15-20-jährigen (Scherbaum und Kiess, 2004). Somit wäre es unmöglich, den gesamten Gewebebedarf aus humanen Spenderpankreatata zu decken. Aus diesem Grund wird nach alternativen Methoden zur Steigerung der Zahl Insulin-produzierender Zellen gesucht.

3.8 Alternative Therapieansätze

Die Therapieform der Inseltransplantation hat eine Basis für die Anwendung vieler unterschiedlicher alternativer Therapieansätze geschaffen. Durch den Einsatz verschiedenster Strategien könnten Inselzellen in Zukunft für die klinische Anwendung vollkommen unbegrenzt verfügbar sein. Hierzu zählen unter anderem die Verwendung xenogener Inseln aus großen Säugetieren, oder die *in vitro* Differenzierung von (embryonalen) Stammzellen zu Insulin-produzierenden Zellen. Aber auch die Generierung sogenannter Pseudoinseln hat in den letzten Jahren großes Interesse geweckt.

3.8.1 Zellen aus fetalem Gewebe

Die Zelltherapie mit Stammzellen wird beim DM bislang noch nicht klinisch eingesetzt. Vor einigen Jahren gelang es mehreren Forschungsgruppen weltweit Insulin-produzierende Zellen aus murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu generieren, auch wenn der prozentuale Anteil an Hormon-produzierenden Zellen noch sehr gering war. Ebenso führten Versuche mit humanen ES-Zellen nach einiger Zeit zu positiven Ergebnissen (Lumelsky et al., 2001; Zhang et al., 2006). Im Tierversuch waren diese Hormon-produzierenden Zellen den endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln sowohl morphologisch, als auch auf physiologischer Ebene sehr ähnlich und konnten den Blutzucker im diabetischen Tiermodell regulieren. Trotz der vielversprechenden Erfolge, die bislang mit embryonalen Stammzellen erzielt wurden, ist deren routinemäßiger Einsatz zur Therapie aufgrund ethischer Gesichtspunkte sehr umstritten. Aus diesem Grund wird auch weiterhin nach Alternativen zur β -Zell-Ersatz-Therapie gesucht.

3.8.2 Xenotransplantation von Schweineinseln

In einer aktuellen Studie wurde diabetischen Ratten porcine ES-Zellen in das Pankreas sowie unter die Nierenkapsel transplantiert. Diese embryonalen Zellen haben die Zellen des Rattenorganismus dahingehend präkonditioniert, dass bei einer anschließenden Transplantation adulter porciner Langerhans-Inseln diese nicht mehr als fremd erkannt wurden, womit eine Immunsuppression nicht notwendig war (Rogers et al., 2010). In bereits durchgeführten Studien an Primaten konnte durch Transplantation von Schweineinseln für einen Zeitraum von etwa 6 Monaten Insulinunabhängigkeit erreicht werden (Dufrane et al., 2006). In diesem Fall wurde durch Mikroverkapselung der Inseln deren Abstoßung unterdrückt. Eine weitere Arbeitsgruppe hat bereits porcine Inseln in diabetische Patienten implantiert. Hier wurde die immunologische Reaktion auf das Fremdgewebe durch Co-Transplantation porciner Sertoli-Zellen, welche normalerweise im Hodengewebe vorkommen und die unreifen Spermatozoen vor dem körpereigenen Immunsystem schützen, verhindert (Valdes-Gonzalez et al., 2005).

Ein Vorteil der Transplantation von tierischem Gewebe liegt darin, dass speziell für die Inselisolierung gezüchtete Schweine zum Zeitpunkt der Spende vital sind im Gegensatz zu humanen Spendern, bei denen es sich meist um Hirntod-Patienten handelt (Hunter, 2009). Die lange Phase zwischen Hirntod des humanen Spenders und Transplantation der Inseln hat negative metabolische Auswirkungen auf das zu transplantierende Gewebe (Cooper et al., 1989). Wesentliche Nachteile, die eine Xenotransplantation mit sich bringt, sind nach wie vor die nicht beherrschbare hyperakute Abstoßung sowie mögliche Gefahren, die sich durch porcine endogene Retroviren (PERVs) für den Menschen ergeben könnten. Die Gefahren, die von einer potentiellen Infektion mit PERVs ausgehen können, werden allerdings noch kontrovers diskutiert (Dinsmore et al., 2000; Specke et al., 2001; van der Laan et al., 2000). Der Durchbruch auf diesem Gebiet wurde noch nicht geschafft, sodass diese Therapie noch nicht angewandt wird.

3.8.3 Herstellung von Pseudoinseln

Die bereits erwähnte Knappheit an Spenderorganen hat großes Interesse an der Erforschung alternativer Therapieansätze geweckt, welche die komplette Organtransplantation ersetzen sollen. Aus diesem Grund wurden bereits schon vor ca. 20 Jahren die ersten Versuche mit Pseudoinseln (PI) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um in vitro generierte Zellcluster, beste-

hend aus separierten und in vitro reaggregierten Inselzellen. Der Vorteil dieses neuen Inseltypus im Vergleich zur normalen Langerhans-Insel besteht in der selbst definierbaren Größe und der damit verbundenen gesteigerten Überlebensrate durch eine schnellere und verbesserte Revaskularisierung nach Transplantation (Cavallari et al., 2007; Lehmann et al., 2007). Überdies könnte der Einsatz von PI bei diabetischen Patienten eine beträchtliche Dezimierung des für die Wiederehrstellung einer Normoglykämie notwendigen Gewebes bedeuten. Durch die verbesserte Revaskularisierung würde der Transplantatverlust durch Apoptose und Nekrose minimiert. Schon im Jahr 1982 war es der Arbeitsgruppe um Tze et al. gelungen, Pseudoinseln aus Einzelsuspensionen von Ratten-Inseln herzustellen. Auf Glukosestimulation reagierten diese mit Insulinsekretion und waren zudem in vivo in der Lage den Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere zu regulieren (Tze und Tai, 1982). Halban et al. ließen Einzelzellen von Ratten-Inseln während einer 6-tägigen Suspensionskultur in vitro reaggregieren und konnten zeigen, dass sowohl die zelluläre Komposition der entstandenen Aggregate, als auch deren Organisation, den Langerhans-Inseln ähnelte (Halban et al., 1987).

An der Universität in Memphis wurden humane Spender-Pankreata bis zur Entstehung einer epithelioiden Einzelsuspension verdaut, welche Insulin-positive Zellen enthielt. Bei Behandlung dieser Zellsuspension mit EDTA kam es zur Ausbildung inselartiger Aggregate, bei welchen die Insulin-positiven Zellen, im Gegensatz zu den humanen Inseln hauptsächlich in der Peripherie zu finden waren (Kuo et al., 1992). Hauge-Evans und Kollegen stellten aus Min6-Monolayer-Zellen Pseudoinseln her durch eine Ca^{2+} -abhängige Inkubation auf Gelatineböden. Das hormonale Sekretionsverhalten dieser neuentstandenen PI nach Stimulierung durch diverse Nährstoffe war demjenigen der Langerhans-Inseln sehr ähnlich (Hauge-Evans et al., 1999). In einer aktuellen Studie zur Generierung von PI wurden frisch isolierte Langerhans-Inseln mittels enzymatischer Trypsin-Digestion zu Einzelzellen zerlegt und als Hängende Tropfen-Kulturen in Kulturmedien mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen inkubiert (Cavallari et al., 2007). All diese Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von PI für die routinemäßige Anwendung bei diabetischen Patienten prinzipiell möglich ist und diese zudem in ihrer Funktionalität bezüglich der Insulinproduktion den normalen Langerhans-Inseln sehr ähnlich sind.

3.9 Ziel der Arbeit

Durch den Mangel an potentiellen Spenderorganen nimmt die Transplantation inselartiger Aggregate aus in vitro differenzierten Stammzellen als regenerative Therapie bei Diabetes-Patienten immer mehr an Attraktivität zu. Hierbei eröffnen sich viele Vorteile durch die nahezu unlimitiert verfügbare Quelle transplantierbaren Gewebes. Die Nachteile der Verwendung von Stammzellen liegen, wie bereits erwähnt, in der geringen Zahl an neuentstandenen Insulin-positiven Zellen und zum anderen besteht auch hier immer noch ein Problem in der ungenügenden Revaskularisierung im Empfängergewebe. Darüber hinaus müssten neben der in vitro Generierung Hormon-produzierender Zellen, für den Nachbau einer vollständig funktionstüchtigen Insel zusätzlich die ebenso wesentlich am Inselaufbau beteiligten nichtendokrinen Zellen wie Endothelzellen und Fibroblasten ersetzt werden. All diese Überlegungen führten zu der Hypothese, dass die in vitro Generierung eines Inseltypus, welcher je zur Hälfte aus Inselzellen und Knochenmarkszellen besteht einen Ausweg aus der Zellknappheit darstellt und des Weiteren neben der Differenzierung der im Knochenmark residierenden Stammzellen zudem eine Quelle der anderen essentiellen Zelltypen liefert um eine optimale Funktionalität der neuentstandenen Inseln zu gewährleisten.

In der vorliegenden Arbeit wurden modifizierte PI (ModPI), als möglicher therapeutischer Ansatz zur Bekämpfung des DM erforscht. Die durch Co-Kultivierung von Inselzellen und Knochenmarkszellen entstandenen ModPI haben, neben ihrer regulierbaren Größe und der damit verbundenen schnelleren Vaskularisierung, den Vorteil, dass sie eine gesteigerte Anzahl an Zellen mit endotheliale Charakter, aber auch Zellen mit Stammzellcharakter enthalten. Dieser vermehrte Anteil an Vorläuferzellen soll sich primär auf ihre Revaskularisierung und des Weiteren auf ihr Langzeit-Überleben im Empfänger auswirken. Hierzu wurde zunächst die Revaskularisierung der ModPI im Rückenhautkammermodell untersucht und mit Inseln und Pseudoinseln verglichen. Darüber hinaus wurde sowohl in vitro, als auch in vivo die Fähigkeit der ModPI zur Insulinproduktion und -sekretion überprüft. In der zweiten in vivo-Studie wurde darüber hinaus untersucht, ob die ModPI in der Lage sind, den Blutzucker diabetischer Tiere zu normalisieren. Die hier vorliegende Studie sollte klären, in wie weit die in vitro Generierung von ModPI einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Behandlung des DM Typ 1 und 2 darstellt.

4. Material

4.1 Antikörper

4.1.1 Primär

CD31 rat anti mouse	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD34 rat anti mouse/FITC	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
CD73 rat anti mouse	BD Pharmingen
CD105 rat anti mouse	Santa Cruz
CD117 rat anti human, mouse	Santa Cruz
CD133 rat anti mouse/Biotin	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD202b goat anti mouse	R&D, Wiesbaden-Nordenstedt, Deutschland
CD309 rat anti mouse	Biolegend, Uithoorn, Niederlande
CXCR-4 rat anti mouse	eBioscience
eNOS pc rabbit anti human, mouse, rat	BD Pharmingen
GAPDH rabbit anti human (FL-335)	Santa Cruz
Glucagon, monoclonal mouse to Glucagon	Abcam, Cambridge, UK
Insulin guinea pig anti human, mouse, rat	Abcam
Insulin rabbit anti human, mouse, rat	Santa Cruz
Sca-1 rat anti mouse	BD-Pharmingen
Somatostatin, pAb	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
VEGFR-2, rat anti mouse	BD-Pharmingen
vWF, monoclonal mouse anti human land	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

4.1.2 Sekundär

Donkey anti guinea pig POD	Dianova, Hamburg, Deutschland
Donkey anti rabbit HRP	GE healthcare, Freiburg, Deutschland
Goat anti guinea pig Cy3	Abcam
Goat anti rabbit Cy3	Dianova
Goat anti rabbit FITC	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat anti rabbit POD	Dianova

Goat anti rat Biotin-SP	Jackson ImmunoResearch
Goat anti rat Cy3	Jackson ImmunoResearch
Goat anti rat FITC	Invitrogen
Goat anti rat POX	Dianova
Rabbit anti goat Cy3	Jackson ImmunoResearch

4.2 Arbeitsmaterialien

AccuChek Compact (Blutzucker-Messgerät und Teststreifen)	QuickPharma, Berlin, Deutschland
Kryoboxen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser (11,8 mm)	Vogelgesang Labortechnik, Blieskastel, Deutschland
DVD-Rohlinge (DVD-R)	Sony, Berlin, Deutschland
Einbettkassetten	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Einfrierhilfe	Nalgene Labware, Hereford, UK
Filterpapier (25µm, Whatman)	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Fotofilm (6,5 x 9 cm)	AGFA Healthcare GmbH, Köln, Deutschland
Kanülen für Pankreas (Braunülen)	BBraun, Melsungen, Deutschland
Kompressen (5x5cm und 10x10cm)	P.Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Muttern für RHK	Hinkel-Elektronik, Pirmasens-Winzeln, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pflaster (1,25 und 2,5 cm)	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter/Ruhr, Deutschland
Pipetten (5, 10 und 25 ml)	VWR International
Pipettenspitzen (10, 100 und 1000µl)	Sarstedt
Schrauben für RHK	Hinkel-Elektronik
Sprengringe (Form DIN 472)	online-schr@uben.de, e. K. Wuppertal, Deutschland
Videoprinterpapier K65MM	Asmuth GmbH, Minden, Deutschland
Wattestäbchen	P.Hartmann AG

4.3 Chemikalien, Lösungen, Membranen, Filter

ACD-A	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
-------	-------------------------------------

Aqua dest.	BBraun
β-Mercaptoethanol	Roth
Cell Strainer 40µm / 100µm	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cytofix/CytopermTM	BD biosciences
DAB-Tabletten Set	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich
ECL-Detektionslösung	GE healthcare
Ethanol 99,9 %	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Böhringer, Ingelheim, Deutschland
FACS Lysing Solution	BD biosciences
FACS Clean	BD biosciences
FACS Rinse	BD biosciences
Fetales Kälberserum	Gibco BRL, München, Deutschland
Folin Reagenz	Sigma-Aldrich
Formalin/Formaldehyd 4 %	Roth
Goatserum normal	Dako
HepatoQuick	Roche
HEPES-Puffer	Gibco
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck
Lympholyte	Biozol, Eching, Deutschland
Mayers Hämalau	Merck
Methanol	Roth
Molekulargewichtsstandard	GE healthcare
NaCl (0,9%)	BBraun
Nicotinamid	Sigma-Aldrich
PBS (10x)	PAN, Aidenbach, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Proteinaseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich
Rat Insulin ELISA Kit	Matritech, Freiburg, Deutschland
Spritzenfilter (22µm und 45µm)	Roth
Tween 20	Roth

TEMED	Serva
Tissue Tek [®]	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Otto Fischar GmbH und Co.KG, Saarbrücken, Deutschland
WST-Reagenz	Roche

4.4 Enzyme und Wachstumsfaktoren

Accutase Cell Syntacher	PAA, Pasching, Österreich
b-FGF human	Provitro, Berlin, Deutschland
BSA-Standard Stocksolution	BioRad, München, Deutschland
Kollagenase Typ V	SERVA, Amstetten, Österreich
FBS (Gold) Fetal Bovine Serum	PAA
Trypsin/EDTA	PAA

4.5 Farbstoffe

Annexin-V-FITC	BD biosciences
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich
Dithizone	Sigma-Aldrich
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich
Neutralrot	Sigma-Aldrich
Rhodamin-6-G	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich

4.6 Kulturmedien und Antibiotika

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	PAA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	PAA

4.7 Laborgeräte

Biofuge fresco	Kendro, Hanau, Deutschland
ELISA-Reader	ASYS HITECH DigiScan, Deelux

GelDoc™XR	Labortechnik, Gödenstorf, Deutschland
Inkubator (37°C)	Biorad, München, Deutschland
Inkubator (29°C)	Galaxy B, RS Biotech, Irvine, Schottland
Lichtmikroskop	SalvisLab Biocenter BC 150, Fa. Rengli, Wohlen, Schweiz
Scanner (EPSON GT 9000)	Leica DMIL, Solms, Deutschland
	Epson Deutschland, Meerbusch, Deutschland

4.8 Narkotika und Schmerzmittel

Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Rimadyl® sterile injectable solution (Carprofen)	Pfizer Animal Health, NY, USA

4.9 Puffer

Lämmli-Puffer	Sigma
Perm/Wash-Buffer	BD biosciences
Triton X-100 (Waschpuffer)	Serva
Tris-Puffer	Roth

4.10 Reaktions-und Messgefäße

15ml/50ml Reaktionsgefäße	Greiner, Nürtingen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Roth
FACS Röhrchen	BD biosciences
Kryogefäße	Nunc, Roskilde, Dänemark
Loch-Platten (96 well)	Roth
Petrischalen (5 und 10cm)	Greiner

5. Methoden

5.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die tierexperimentellen Studien wurden Syrische Goldhamster (LVG-Hamster: Crl:LVG (SYR), straincode: 049) beiderlei Geschlechts verwendet. Die Spendertiere hatten ein Gewicht über 100g und die Empfängertiere im Fall der in vivo Mikrozirkulationsstudie ein Gewicht zwischen 60-80g und im Fall der in vivo Diabetes-Studie ein Gewicht zwischen 120-170g. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und anschließend in der Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar gezüchtet.

Die Tiere wurden unter standardmäßigen Bedingungen, d.h. einem 12h Tag/Nacht-Rhythmus bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-65% und einer RT von 22-24°C gehalten. Die Versuchstiere wurden, je nach Bedarf, jedoch mindestens einmal pro Woche umgesetzt und bekamen über die gesamte Zeit Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser ad libitum. Alle Experimente wurden zuvor von der staatlichen Ethikkommission für Tierexperimente genehmigt. Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte gemäß den Richtlinien der NIH publication No. 85-23, in der revidierten Fassung von 1985. Die genaue Einhaltung der Tierschutzverordnung wurde zudem regelmäßig von der, an der Universitätsklinik ansässigen, Tierschutzbeauftragten Frau Dr. med. vet. Monika Frings überwacht.

5.2 Das Rückenhautkammermodell

Die Mikrozirkulation ist netzwerkartig in die Gewebe eingebettet und trägt so zur Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts als Voraussetzung für das Überleben von Einzelzellen und Zellverbänden bei (Messmer und Krombach, 1998). Bereits in den 70ern wurden mikrozirkulatorische Akutversuche an leicht zugänglichen Geweben durchgeführt. Die Untersuchungen wurden jedoch durch physiologische Veränderungen, ausgelöst durch mechanisches Trauma sowie Exposition der Gewebe gegenüber Raumluft, erschwert. 1980 beschrieben Endrich und Kollegen das Modell der Rückenhautkammer beim Syrischen Goldhamster. Dieses chronische Modell erlaubte erstmals die möglichst artefaktfreie Untersuchung der Dynamik der Mikrozirkulation (Endrich et al., 1980). Nach leichter Modifikation war dieses Modell später auch an Mäusen anwendbar (Lehr et al., 1993). Die Rückenhautkammer ermöglichte die

repetitive intravitalmikroskopische Untersuchung der in der Kammerpräparation enthaltenen Gewebe, des Subcutangewebes und des Rückenhautmuskels über ganze 4 Wochen (Messmer und Krombach, 1998). Dies war mit den bisher verwendeten Akutmodellen, die meist auf einen Untersuchungszeitraum von nur wenigen Stunden beschränkt waren, nicht möglich (Fraser und Henderson, 1980; Klar et al., 1990; Schmidt et al., 1995). Darüber hinaus konnte zum ersten Mal bei transplantierten Fremdgeweben bzw. Einzelzellen die Dynamik von Angiogenese und Vaskularisierung über längere Zeiträume verfolgt werden (Menger et al., 1989 und 2002; Vajkoczy et al., 1995 und 1999).

5.2.1 Präparation der Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters dient als tierexperimentelles Modell zur Langzeit-Untersuchung der Revaskularisierung transplantierte Gewebe. Die sich aus einem Doppelrahmen zusammensetzende Kammer besteht aus Titan. Aus diesem Grund hat sie ein geringes Gewicht (komplette Kammer 4,5g) und zeichnet sich zudem durch eine gute Gewebsverträglichkeit aus. Nach vollständiger dorsaler Enthaarung wurde die Rückenhautkammer in tiefer Narkose (50mg/kg KG Pentobarbital, Narcoren®, 160 mg/ml, Merial, Hallbergmoos, i.p.) auf dem Rücken der Tiere implantiert.

Hierzu wurde in Bauchlage unter Gegenlichtkontrolle zunächst die Rückenhautfalte des Versuchstieres angehoben und mit Haltefäden fixiert (Abb. 4B). Im Anschluss daran wurde die Rückseite des Doppelrahmens kranial des Insertionsgebietes des Retractor Muskels und kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße implantiert (Abb. 4C). Im Bereich des Beobachtungsfensters der Kammer ($\varnothing = 11\text{mm}$) wurden zuvor die dem Fenster zugewandte Kutis, Subkutis mit Hautmuskel sowie die beiden Schichten des M. retractor entfernt (Abb. 4D), sodass der gegenüberliegende quergestreifte Hautmuskel und die Subkutis freilagen (Abb. 4E).

Anschließend wurde die Vorderseite des Doppelrahmens implantiert, wobei das mittels Sprengring (DIN 472, online-schr@ubn.de, e. K., Wuppertal, Deutschland) im Titanrahmen fixierte Deckglas ($\varnothing = 11,8\text{mm}$, Vogelgesang Labortechnik, Blieskastel, Deutschland) des Beobachtungsfensters durch Adhäsion auf die Hautmuskelpräparation aufgebracht wurde (Abb. 4F). Schließlich wurden die beiden Rahmen der Rückenhautkammer an ihren Rändern mit 5.0 Seide-Fäden an der Hautfalte fixiert. Der gesamte Eingriff dauerte ca. 20-25 min. Die Kammer

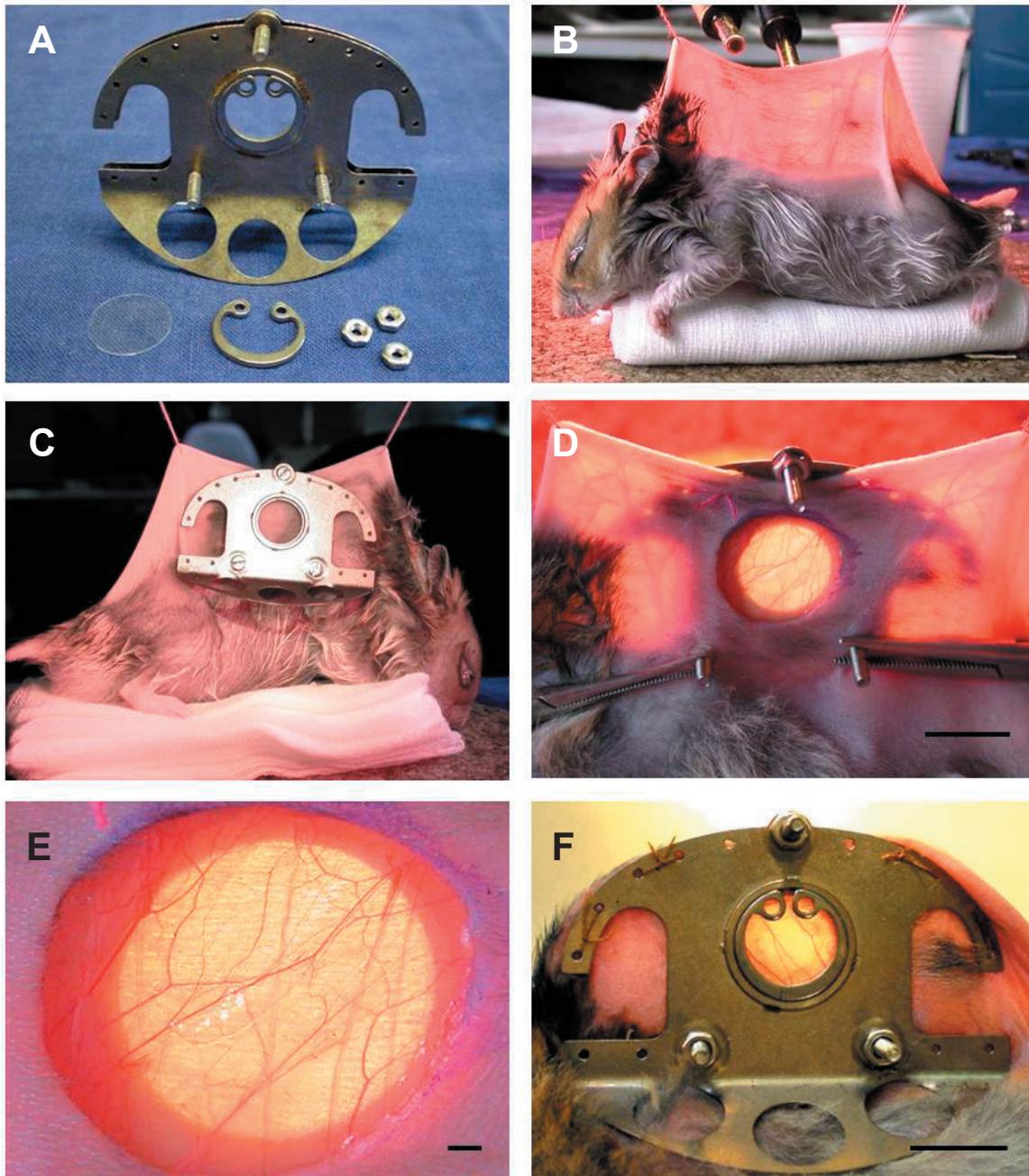


Abb. 4: **A:** Rückenhautkammer bestehend aus 2 Titanrahmen, einem Deckglas ($\varnothing = 11,8\text{mm}$) sowie einem Sprengring. **B:** Unter Gegenlichtkontrolle wurde die Rückenhautfalte angehoben und mit Fäden fixiert, so dass die großen Gefäße der Rückenhaut genau aufeinander lagen. **C:** Die Kammerrückseite wurde kranial des Insertionsgebietes des Retractor Muskels und kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße implantiert. **D:** Im Bereich des Beobachtungsfensters der Kammer wurden Kutis, Subkutis mit Hautmuskel sowie die beiden Schichten des M. retractor entfernt, Maßstab = 1cm. **E:** Vergrößerte Ansicht aus Abb. D; der quergestreifte Hautmuskel sowie die Subkutis lagen nun frei, Maßstab = 1mm. **F:** Bei Implantation der Vorderseite des Kammerdoppelrahmens wurde das fixierte Deckglas durch Adhäsion auf die Hautmuskelpreparation aufgebracht und die beiden Rahmen der Rückenhautkammer an ihren Rändern an der Hautfalte fixiert, Maßstab = 1cm.

war für die Versuchstiere nur wenig belastend, die weiterhin einen normalen Schlaf-Wachrhythmus und ein regelhaftes Putz- und Fressverhalten aufwiesen. Die Tiere konnten sich nach der Kammerpräparation für 48h von dem Eingriff erholen. Anschließend erfolgte die syngene Transplantation von isolierten Langerhans-Inseln, Pseudoinseln bzw. modifizierten Pseudoinseln in die Kammer, die über einen Zeitraum von 14 Tagen in regelmäßigen Abständen intravitalmikroskopisch untersucht wurden.

5.3 Zellkultur

Alle im folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit auto-klavierten Materialien bzw. Geräten und sterilfiltrierten Lösungen (Porendurchmesser der Filter 0,22 µm). Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 29°C bzw. 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Die regelmäßige phasenkontrastmikroskopische Untersuchung der Zellkulturen erfolgte am Invert-Mikroskop mit 50-, 100-, 200- und 320-facher Vergrößerung. Die Photodokumentation wurde mittels einer PC-gesteuerten Videokamera (Inteq 000610) mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware (Axiovision) durchgeführt.

5.3.1 Isolierung der Zellen

5.3.1.1 Isolierung von Langerhans-Inseln

Zur Isolierung pankreatischer Inseln wurde eine modifizierte Methode der stationären Digestion des Pankreas nach duktaler Injektion einer Kollagenase-Lösung angewandt (Gotoh et al., 1987). Hierbei wurde beim Spendertier nach intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG, Narcoren®, 160mg/ml, Merial, Hallbergmoos) eine mediane Laparotomie durchgeführt. Nach Auslagerung des Darms wurde das Duodenum durch mehrere Klemmen so fixiert, dass der Ductus colchedochus gut eingesehen werden konnte. Dieser wurde mit einem 5.0 Seidenfaden unterhalb des Leberhilus ligiert. Der Pankreasgang wurde dann unmittelbar vor Einmündung in das Duodenallumen geschlitzt, sodass retrograd ein Katheter (Venenerweilkanüle, BD Neoflon[®], 0,6 x 19mm (26 GA), REF 391349, BD, Heidelberg, Deutschland) in das Lumen vorgeschoben und durch eine weitere Ligatur fixiert werden konnte. Anschließend erfolgte die Tötung des Spendertieres durch Inzision der intraabdominellen Aorta, um spätere

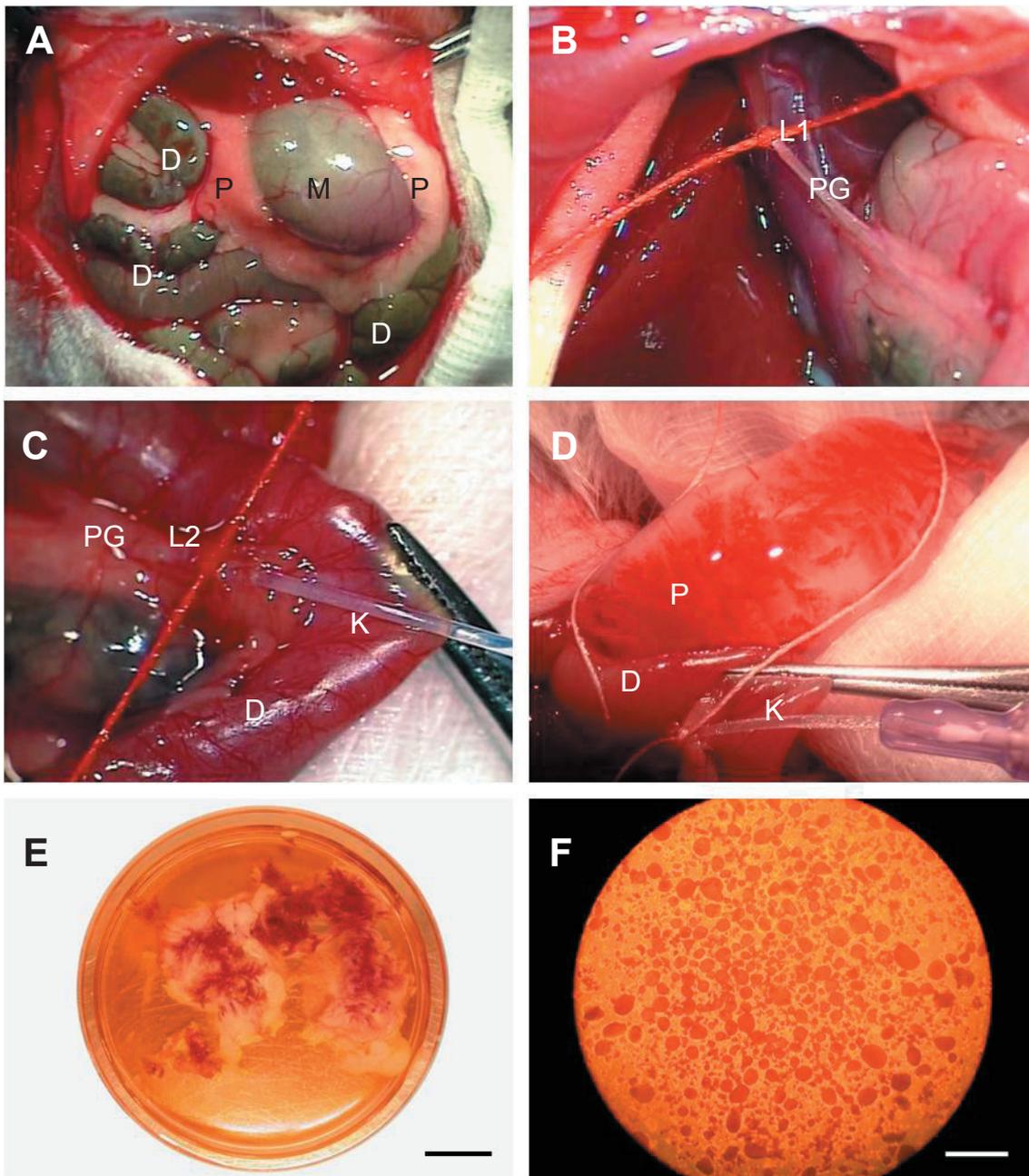


Abb. 5: **A:** Nach medianer Laparotomie liegen der Dünndarm (D), der Magen (M) und das Pankreas (P) frei. **B:** Nach Auslagerung des Darms wird der Ductus colchedochus unterhalb des Leberhilus ligiert (L1). **C:** Unmittelbar vor dem Übergang ins Duodenum wird eine zweite Ligatur (L2) vorgelegt. Der Pankreasgang (PG) wird vor der Einmündung in das Duodenallumen geschlitzt, sodass retrograd ein Katheter (K) in das Lumen vorgeschoben und durch die Ligatur fixiert werden kann. **D** und **E:** Nach Injektion der 5ml Kollagenase-Lösung (0,8mg/ml Kollagenase Typ V) über den Ductus pancreaticus kann das aufgedehnte Pankreas exzidiert und in eine Petrischale überführt werden, die mit weiteren 5 ml der Kollagenase-Lösung gefüllt ist, Maßstab = 1cm. **F:** Frisch isolierte mit Neutralrot angefärbte Langerhans-Inseln, Maßstab = 1mm.

interstitielle Blutungen während des Kollagenase-Verdau möglichst gering zu halten. Danach wurden über den befestigten Katheter 5ml Kollagenase-Lösung (0,8mg/ml Kollagenase Typ V

von SERVA gelöst in Dulbecco's 1 x PBS und versetzt mit 120µl Neutralrot-Lösung zum anfärben der Inseln) in den Ductus pancreaticus injiziert und damit das Pankreas aufgedehnt. Dieses konnte nun vorsichtig exzidiert und in eine Petrischale überführt werden, die mit weiteren 5ml der Kollagenase-Lösung gefüllt war.

Nach ca. 25-35 min Inkubation des Gewebes bei 37°C, ließ sich das Gewebe mit einer gläsernen Pasteurpipette manuell zerkleinern und die entstandene Gewebesuspension konnte in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt werden. Das zerkleinerte Gewebe wurde nun mit weiteren 30ml eiskühlter PBS-Lösung versetzt und das Röhrchen auf Eis gestellt. Auf diese Weise wurde die Kollagenase inaktiviert und die weitere Verdauung der Langerhans-Inseln vermieden. Es folgten nun mehrere Waschschrirte mit eiskaltem PBS, bis die Lösung klar war. Die einzelnen, mit Neutralrot angefärbten Inseln konnten schließlich aus dem verbleibenden Medium pipettiert und in eine Petrischale mit Nährmedium DMEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin, und 100mg/ml Streptomycin (in Zukunft als Pen/Strep bezeichnet) transferiert werden. Pro Tier konnten auf diese Weise zwischen 400-500 Inseln gewonnen werden.

5.3.1.2 Isolierung der Knochenmarkszellen

Für die Isolierung der Knochenmarkszellen wurden Insel-Spendertiere verwendet. Nach vorangegangener Tötung der Tiere durch Inzision der abdominellen Aorta wurden beidseitig die Tibiae und Femora entfernt und vollständig von Geweberesten befreit. Diese wurden bis zur weiteren Aufbereitung in Isolierungspuffer (PBS, ACD-A 1%, HEPES-Puffer 20mmolar) auf Eis inkubiert (Abb. 6A). Die Zellaufbereitung fand unter der Sterilbank statt. Bei der Knochenmarksaufbereitung wurden die Epiphysen der Knochen (jeweils 2 x Femur und Tibia) mit einer sterilen Schere abgetrennt (Abb. 6B) und die Knochenmarkshöhle mit einer Spritze punktiert und durchgespült (Abb. 6C).

Die so entstandene Zellsuspension (Abb. 6D) wurde mit 1ml DMEM (ohne FCS) + 1% ACD-A auf- und abpipettiert und mit dem Nylon Cell Strainer (100 µm) filtriert. Dieser wurde dann mit 9ml DMEM + 1% ACD-A durchgespült um möglichst alle Knochenmarkszellen in das Röhrchen zu überführen. Nach Bestimmen der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde die gewünschte Zellzahl in 10ml des Kulturmediums (DMEM + 20% FCS) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

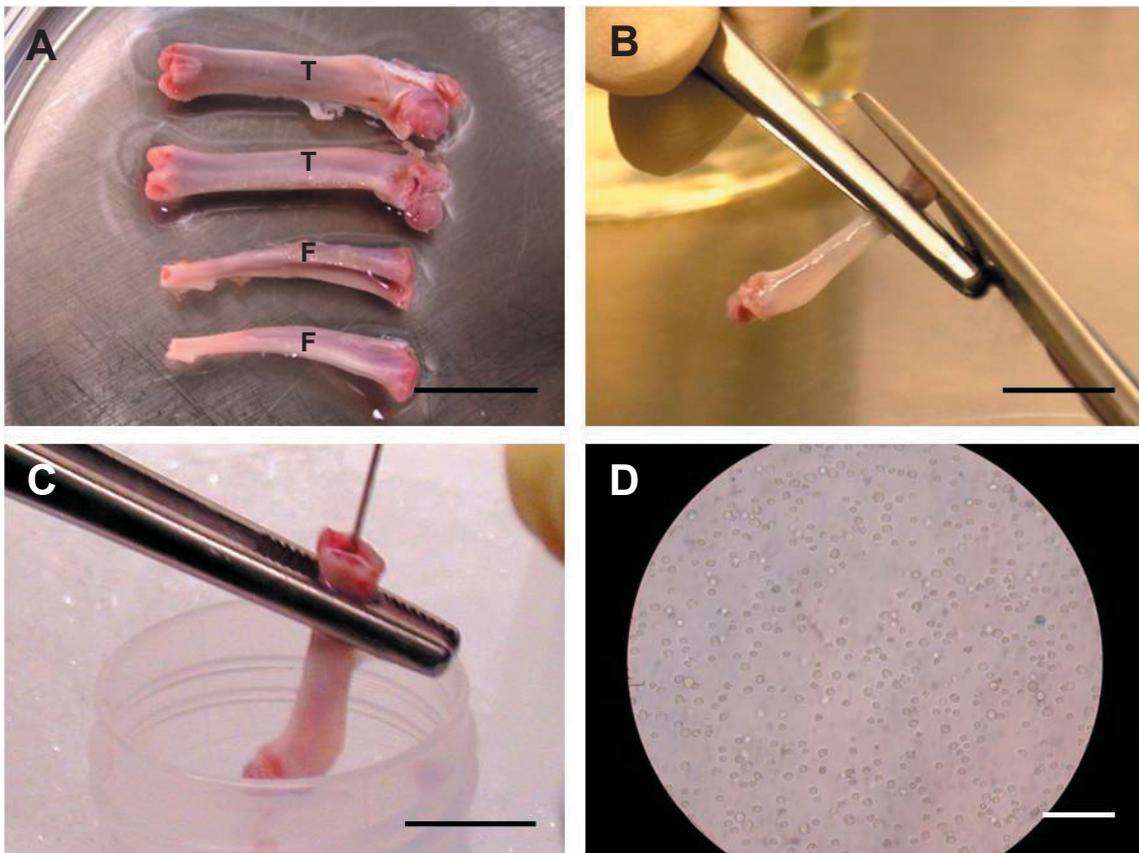


Abb. 6: **A:** Femur- (F) und Tibiaknochen (T) werden für die Zellaufbereitung in einer Petrischale mit frischem Isolierungspuffer aufgenommen, Maßstab = 1cm. **B:** An den Knochen werden beidseitig mit einer sterilen Schere die Epiphysen abgetrennt. **C:** Die Knochenmarkshöhlen werden mit einer Kanüle punktiert und das Knochenmark wird mit Isolierungspuffer ausgespült. **D:** Nach Filtration der Zellsuspension wird diese zur weiteren Kultivierung in DMEM aufgenommen. Maßstab = 50 μ m.

5.3.2 Passagieren der Knochenmarkszellen

Das erstmalige Passagieren der Knochenmarkszellen erfolgte nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers bei einer Zelldichte von mindestens 60%, was nach einem Zeitraum von etwa 1 Woche der Fall war. Je nach Zelldichte wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:4 gesplittet. Zur Kultivierung der Hamster-Knochenmarkszellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen in der Petrischale mit PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 3ml Trypsin/EDTA-Lösung (Trypsin/EDTA (1x) 0,05%/ 0,02% in DPBS) bedeckt und für ca. 12min bei 37°C inkubiert. Mit einer 1000 μ l-Eppendorfpipette konnten die Zellen vom Kulturschalenboden gelöst und in ein Röhrchen mit 10ml PBS + 10% FCS überführt werden. Durch einmaliges Waschen der Zellen für 5 min bei 2000rpm (630 x g) und RT wurde gleichzeitig die

Enzymwirkung gestoppt. Das so entstandene Zellpellet wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Einzelzellen zerlegt und in neue Kulturschalen ausgesät bzw. für die Zellzählung verwendet.

5.3.3 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen enzymatisch vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 2000rpm (630 x g) wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 900µl FCS überschichtet und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in ein Kryoröhrchen (5-8 x 10⁶ Zellen pro Röhrchen) mit 900µl Einfriermedium (DMEM + 20% FCS + 20% DMSO) überführt und vorsichtig auf Eis gemischt. Bei der Handhabung mit konzentriertem DMSO musste genau darauf geachtet werden, dass die Zellen auf Eis standen, da dieses bei RT eine für die Zellen zytotoxische Wirkung hat. Die Zellen wurden zunächst in einer Isopropanol-befüllten und vorgekühlten Einfrierhilfe (Freezing Container, Nalgene® Labware, Roskilde, Dänemark) ü. N. im Gefrierschrank auf -80°C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Schockgefrieren zu vermeiden. Nach ca. 24h wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert. Die Protokollierung der Zellen erfolgte in einem dafür vorgesehenen Heft.

5.3.4 Auftauen der Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt auf Eis gegeben und vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10ml vorgewärmtes Kulturmedium langsam aufgenommen und 5 min bei 1100 rpm (190 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Nährmedium erneuert.

5.3.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung der abgelösten bzw. vereinzelt und mit PBS (+10% FCS) gewaschenen Zellen wurde ein Hämocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer sowie Trypanblau verwendet. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte die Gesamtzellzahl ermittelt und gleichzeitig die Zellen auf ihre Vitalität überprüft werden, wobei nur nichtgefärbte Zellen gezählt wurden. Jeweils 10µl der Zellsuspension und 10µl der 0,4%igen Trypanblau-

Lösung wurden mit 80µl PBS gemischt und ein 20µl Aliquot dieses Zell-Farbstoffgemischs in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von 4 Großquadraten, bestehend aus jeweils 16 Kleinquadraten, summiert und anschließend der Mittelwert gebildet. Aus der berechneten Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \begin{aligned} & \text{MW der Zellzahl aus 4 Großquadraten} \\ & \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ & \times \text{Kammerkonstante } (10^4) \end{aligned}$$

5.3.6 Vitalitätstests

5.3.6.1 Neutralrot-Test

Vor der Transplantation in die Rückenhautkammer wurden die verschiedenen Inseletypen mittels des Neutralrot-Tests auf ihre Vitalität überprüft. Neutralrot ist ein nichttoxischer leicht kationischer Farbstoff, der durch ionische Diffusion in die Lysosomen vitaler Zellen gelangt, wo er an anionische Bestandteile der lysosomalen Matrix bindet. In beschädigten, bzw. toten Zellen sind sowohl Zellmembran als auch lysosomale Membran zerstört. Dies bewirkt eine verminderte oder gar gänzlich ausbleibende Aufnahme von Neutralrot in die Zelle. In unserem Experiment konnte so aufgrund der Menge des gebundenen Farbstoffs Aufschluss über die Anzahl vitaler, beschädigter und toter Zellen innerhalb des Inselverbands gezogen werden.

5.3.6.2 Trypanblau Test

Zur Bestimmung der Zahl und Lebensfähigkeit von Einzelzellen wurde der Trypanblau-Test angewandt. Durch die defekten Zellmembranen toter Zellen dringen die Anionen dieses sauren Farbstoffs in das Zytosol ein, wo sie an Zellproteine binden und die Zellen blau anfärben. Die intakten Zellmembranen vitaler Zellen sind für Trypanblau impermeabel, weshalb die Zellen unter dem Mikroskop leuchtend hell erscheinen. Je nach Zelldichte wurde ein Aliquot von 10-50µl der Zellsuspension mit 0,4% (w/v) Trypanblau/PBS 9:1 verdünnt. Nach ca. 2 min. wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen in einem Ansatz ließ sich nach folgender Gleichung errechnen:

$$\text{Anzahl lebender Zellen (\%)} = \frac{\text{Anzahl gefärbte Zellen} \times 100}{\text{Anzahl gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen}}$$

5.3.7 Pseudoinseln (PI) und modifizierte Pseudoinseln (ModPI)

5.3.7.1 in vitro Generierung von PI und ModPI

Für die in vitro-Generierung der PI sowie der ModPI wurden verschiedene Methoden ausgetestet, wobei sich die Kultivierung der Zellen im „Hängenden Tropfen“ als die am besten geeignete Methode erwies. Hierfür wurden frisch isolierte Langerhans-Inseln durch eine 10-12minütige enzymatische Digestion mit Trypsin/EDTA (2,5g/l) bei 37°C und einer anschließenden manuellen Zerkleinerung mittels einer Eppendorf-Pipette in Einzelzellen aufgespal-

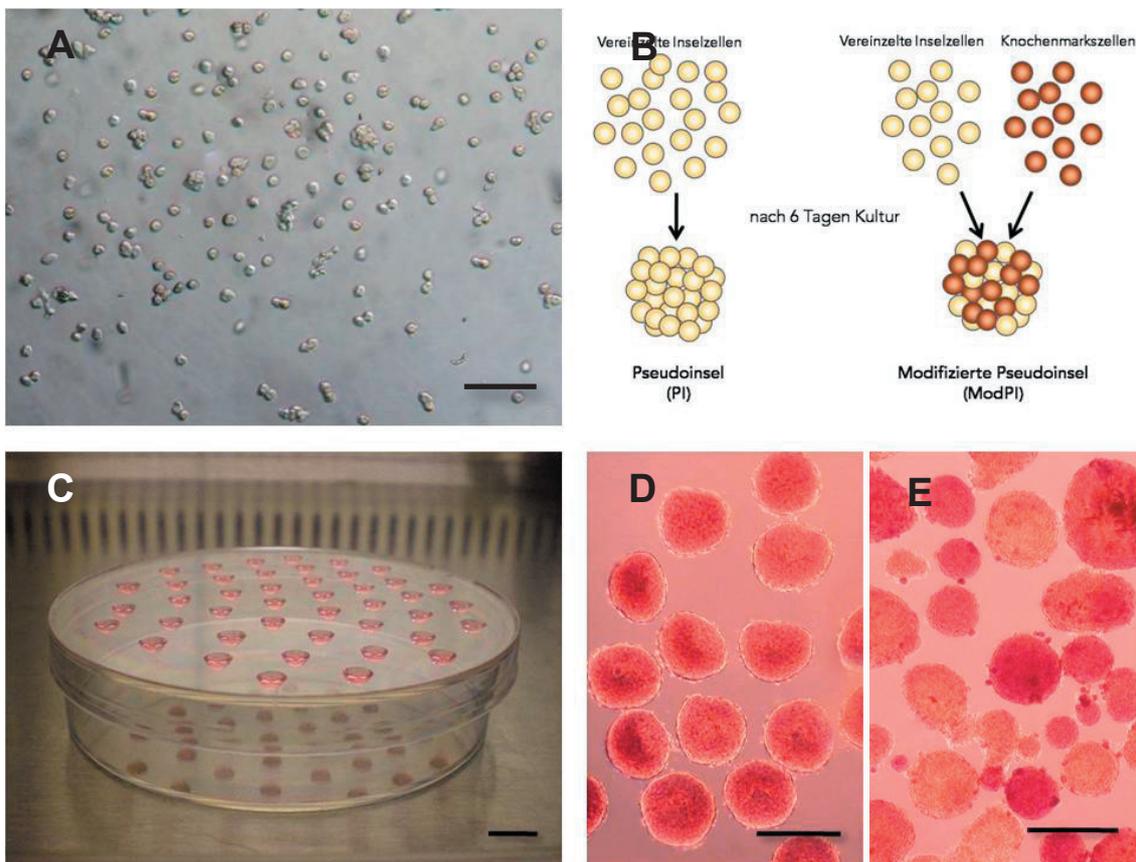


Abb. 7: **A:** Mittels Trypsin-Digestion zu einer Einzelzellsuspension zerlegte Langerhans-Inseln, Maßstab 50µm, **B:** Die Einzelzellen werden für 6 Tage bei 29°C und 5% CO₂ als „Hängender Tropfen“- Kultur inkubiert. **C:** Einzelzellen im Hängenden Tropfen, Maßstab = 1cm. **D:** Durch Reaggregation von Inselzellen entstandene Pseudoinseln. **E:** Durch Reaggregation von Inselzellen mit Knochenmarkszellen entstandene modifizierte Pseudoinseln. D und E: beide Neutralrot gefärbt, Maßstab = 200µm.

ten (Abb. 7A). Die Vitalität der Einzelzellen wurde mit dem Trypanblau-Test bestimmt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1600rpm ($400 \times g$) wurden die Zellen erneut in DMEM (+ 10% FCS, + Pen/Strep) resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde nun als 20 μ l Tropfen in den Petrischalendeckel aufgebracht und anschließend invertiert als "Hängender Tropfen" (Abb. 7C) für mindestens 5 Tage bei 29°C im Brutschrank kultiviert, um die Reaggregation der Einzelzellen zu PI (Abb. 7D) zu ermöglichen (Cavallari et al., 2007). Für die Generierung von ModPI wurden frische Knochenmarkszellen der Passagen 0 bis maximal 1 verwendet, was bedeutete, dass diese maximal eine Woche alt waren. Die aus Femur- und Tibiaknochen von Spenderhamstern isolierten Knochenmarkszellen wurden hierbei zu gleichen Teilen mit Inselzellen gemischt (Abb. 7B). Diese beiden co-kultivierten Zellpopulationen wurden nun ebenso für mindestens 5 Tage bei 29°C als Hängender Tropfen mit einem Volumen von 20 μ l bis zur Entstehung der ModPI (Abb. 7E) kultiviert.

5.3.7.2 Transplantation von Inseln, PI und ModPI in die RHK

Die Kammerpräparationen waren nach spätestens 48h frei von den durch die chirurgische Präparation induzierten, inflammatorischen Veränderungen (Messmer et al., 1984) und somit bereit für die Transplantation. Zur syngenen Transplantation der Langerhans-Inseln wurden die mit Pentobarbital narkotisierten Empfängertiere auf einer Plexiglas-Bühne durch Fixierung der Rückenhautkammer in Seitenlage immobilisiert. Nach Lösen des Sprenglings wurde das Deckglas des Beobachtungsfensters kurzzeitig entfernt und jeweils 7-8 Langerhans-Inseln, Pseudoinseln oder modifizierte Pseudoinseln aus dem Nährme-

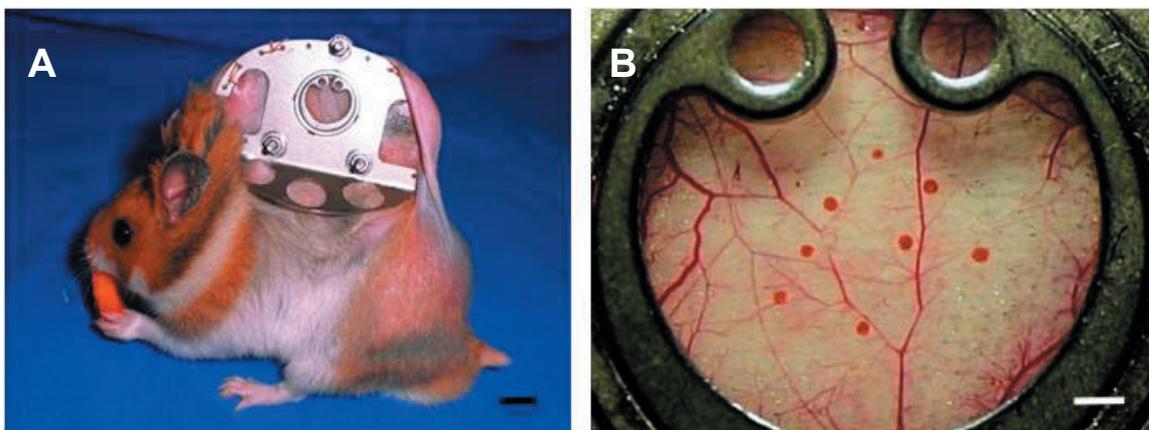


Abb. 8: **A:** Syrischer Goldhamster nach Implantation der Rückenhautkammer, Maßstab = 1cm, **B:** Neutralrot angefärbte Langerhans-Inseln am Tag 0 direkt nach Transplantation auf die quergestreifte Muskulatur in der Rückenhautkammer des Empfängertieres, Maßstab = 1mm.

dium auf die quergestreifte Hautmuskulatur der Kammerpräparation platziert. Anschließend wurde die Kammer mit einem frischen Deckgläschen und dem Sprengring wieder luftblasenfrei verschlossen.

5.4 Durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarkszellen

5.4.1 Prinzip der FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein auf Immunfluoreszenz basierendes Messverfahren zur Bestimmung von Größe und Granularität von Zellen sowie deren Expression von Zelloberflächenmolekülen (Herzenberg et al., 2002). Grundlage ist die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion, welche im Verlauf einer immunhistochemischen Färbung bestimmter Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern abläuft. Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht in der hydrodynamischen Fokussierung, wobei die zu untersuchenden Fluoreszenz-markierten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander durch eine Messkammer (flow cell) wandern, in welcher sie von einem Laser angestrahlt werden.

Neben der Fluoreszenzintensität, welche sich anhand der emittierten Photonen des Fluoreszenzlichts bemessen lässt, werden durch die charakteristische Lichtbeugung bzw. -streuung zusätzlich Informationen über die Zellgröße und Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas und Kerngröße) gewonnen. Zur Analyse von Zelloberflächenantigenen wurden in der vorliegenden Arbeit Cy3- (Carbocyanin3) und FITC-(Fluoresceinisothiocyanat) konjugierte monoklonale Antikörper, mit einem Absorptionsmaximum von 488nm bzw. 550nm und einem Emissionsmaximum von 520nm bzw. 570nm, verwendet. Der zur FACS-Analyse benutzte Zytometer (FACSCalibur™, BD Biosciences, SanJose, Kalifornien, USA) arbeitet mit einem dualen Laser-System bestehend aus einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488nm und einem Rot-Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635nm. Die durch Filtersysteme und Photomultiplier verstärkten Signale werden anschließend mit Hilfe der Cell Quest 3.3 Software hinsichtlich der Zellgröße (forward scatter = FSC) und Granularität (sideward scatter = SSC) analysiert.

5.4.2 Immunfärbung und FACS-Analyse der Knochenmarkszellen

In der aktuellen Studie wurden vier Tage alte Knochenmarkszellen (= P0) durchflusszytometrisch untersucht. Für die FACS-Färbung wurden die Knochenmarkszellen mit Accutase (Accutase® solution, A 6964, SigmaAldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) aus den Pe-

trischalen abgelöst. Pro Färbeansatz wurden je 5×10^5 Zellen entnommen und 2 x mit je 500µl PBS gewaschen. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 2000rpm ($630 \times g$) wurde der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet in 100µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden nun für 30 min bei RT mit 1µg des Primärantikörpers inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 2 x mit je 500µl PBS gewaschen und für weitere 20 min mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern bei RT inkubiert. Nach erneutem 2-maligem Waschen mit PBS

Marker	Zelltypus bzw. Gewebe	Referenz
CD31 (PECAM)	Vaskuläres Endothel, Leukozyten, Precursorzellen	DeLisser et al., 1997
CD34	Vaskuläres Endothel, Hämatopoetische Progenitorzellen (HSCs)	Dao und Nolta, 2007
CD73	Endothelzellen, HSCs	Kalsi et al., 2002
CD105 (Endoglin)	Endothelzellen, Subpopulation von KMZ, ((Hämatopoetische) Progenitorzellen)	Cho et al., 2001; Pierelli et al., 2001
CD117 (c-Kit)	Knochenmark, HSCs, Progenitorzellen	Zhang et al., 2006
CD133	Stammzellen, Progenitorzellen, HSCs, Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)	Yang et al., 2004
CD184 (CXCR-4)	HSCs, endotheliale und epitheliale Zellen	Li et al. , 2010
CD202b (Tie-2)	Endothelzellen, EPCs	Dumont et al., 1992
CD309 (VEGFR-2)	Stammzellen, Progenitorzellen, ruhende HSCs, EPCs	Eichmann et al., 1997
eNOS	Endothelzellen	Palmer und Moncada, 1989
Sca-1	Unreife HSCs, Lymphozyten, aktivierte B- und T-Zellen	Spangrude und Scollay, 1990
vWF	vaskuläre Endothelzellen, Thrombozyten	Jones et al., 1981

Tab. 1: Auflistung der in der FACS-Analyse untersuchten Oberflächenantigene

wurden die Zellen für die Messung in 300µl PBS aufgenommen. Für jeden Oberflächenmarker wurde die durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Messung von 2.000 bis maximal 20.000 Ereignissen gestoppt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression der Endothelzell-, Progenitorzell- und Stammzell- Oberflächenantigene CD31 (PECAM-1), CD34 (Mucosialin), CD73 (ECTO-5 nucleotidase), CD105 (Endoglin), CD117 (c-Kit), CD133 (PROM-1), CD184 (CXCR-4), CD202b (TIE-2), CD309 (VEGFR-2) sowie eNOS (endotheliale NO Synthase), Sca-1 (Stem cell antigen-1, Ly-6) und vWF (von Willebrand Faktor, Faktor VIII) untersucht. Als Negativkontrollen wurden Cy3- und FITC- konjugierte Isotypkontrollen benutzt. Der im Ergebnisteil dargestellte Prozentsatz von positiven Zellen entspricht der Differenz, zwischen den Prozentsätzen der mit spezifischem Antikörper gefärbten Zellen und den IgG-Kontrollen.

5.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

Vor jeder intravitalemikroskopischen Untersuchung wurden den Versuchstieren Fluoreszenzmarker zur Kontrastierung des Gefäßsystems (FITC-Dextran 150.000) und der Leukozyten (Rhodamin 6G) unter Kurznarkose (50 mg/kg KG Pentobarbital i.p.) intravenös durch retrobulbäre Injektion appliziert. Zur intravitalemikroskopischen Untersuchung, die etwa 20 Minuten pro Tier beanspruchte, wurden die Hamster auf einer Plexiglas-Bühne fixiert. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten am Tag der Transplantation (Tag 0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation. Nach Beendigung der letzten mikroskopischen Untersuchung wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis des Anästhetikums (200mg/kg KG Pentobarbital) getötet und die Rückenhautkammer-Präparationen für histologische und immunhistochemische Untersuchungen exzidiert.

Dieser chronische Versuch erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt 14 Tagen. Sämtliche Präparationen und Untersuchungen wurden in tiefer Narkose durchgeführt. Zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten hatten die Tiere ausreichend Zeit, um sich von der Belastung durch die Narkose zu erholen. Die Implantation der Rückenhautkammer stellte hier nur eine geringe zusätzliche Belastung für die Versuchstiere dar, was sich an einem normalen Schlaf-Wach-Rhythmus und einem regelhaften Putz- und Fressverhalten zeigte. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde makroskopisch das Aussehen der Rückenhautkammern und der darin befindlichen Transplantate täglich qualitativ beurteilt und dokumentiert. Wies eine Kammer vor Ablauf des Versuchszeitraums Entzündungszeichen auf, wurde das Versuchs-

tier vorzeitig aus dem Versuch genommen und durch eine Überdosis des Anästhetikums eingeschläfert.

5.5.1 Physikalische Grundlagen

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie bedient sich der Eigenschaft fluoreszierender Substanzen, bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge (λ), Lichtquanten zu emittieren. Bei der Absorption des auftreffenden Lichts kollidieren einfallende Photonen mit Elektronen des bestrahlten Stoffes und übertragen ihre kinetische Energie auf dessen Elektronen. Dieser geht durch die zugeführte Energie in einen energetisch höheren Zustand über. Die zugeführte Lichtenergie wird anschließend in andere Energieformen umgewandelt und zwischengespeichert. Eine chemische Verbindung strebt im Normalfall ihren stabilsten und auch gleichzeitig energieärmsten Zustand an. Aus diesem Grund ist eine angeregte Substanz bestrebt, diesen

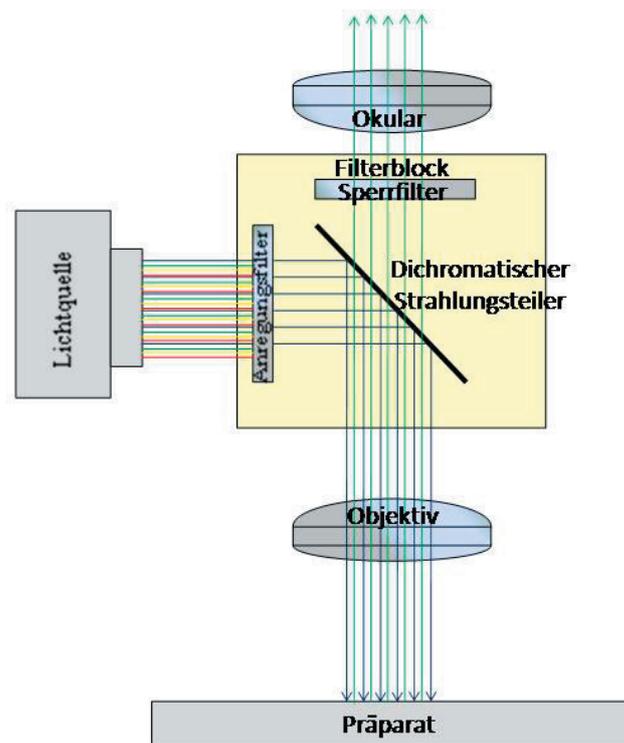


Abb. 9: Schematischer Aufbau eines Aufricht-Fluoreszenzmikroskops

nicht als Licht zurückgestrahlt, sondern in einer anderen Energieform (z.B. Wärme) abgegeben, weshalb die emittierten Lichtquanten energieärmer als die einfallenden Quanten sind. Das Spektrum der emittierten Wellenlängen ist nicht abhängig von der Anregungswellenlänge, sondern von Fluoreszenz-Eigenschaften des angeregten Moleküls. Dieser Unterschied zwi-

schen den Wellenlängen erlaubt mit Hilfe von speziellen Filtern die Anregung von Fluorochromen, welche das absorbierte kurzwellige Licht als langwelligeres, schwächeres Licht emittieren. Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie in Epi-Illuminationstechnik bedarf es einer speziellen Filteranordnung innerhalb des Mikroskops. Der sogenannte Anregungsfilter isoliert aus dem gesamten Wellenlängenspektrum der Lichtquelle denjenigen Wellenlängenbereich, der zur Anregung des entsprechenden Fluorochroms erforderlich ist (Abb.9).

Ein nachgeschalteter dichromatischer Teilerspiegel reflektiert das Anregungslicht auf das zu mikroskopierende Objekt. Gleichzeitig muss er für das emittierte Fluoreszenzlicht möglichst vollständig durchlässig sein. Da dieser, auch als Reflexions-Kurzpassfilter bezeichnete Spiegel, bestimmte Bereiche eines Spektrums vollständig reflektieren und andere durchlassen kann, ist es möglich, Anregungs- und Emissionslicht exakt voneinander zu trennen. Als letztes wird mittels eines Sperrfilters aus dem verbleibenden Wellenlängenspektrum nur dasjenige herausgefiltert, das für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist.

5.5.2 Ausstattung

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde mittels eines modifizierten Zeiss-Axiotech-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100W HBO-Quecksilberdampfampe in Auflichttechnik durchgeführt. In den Strahlengang des Mikroskops wurden zwei verschiedene Filtersysteme (Blaufilter: 450-490 nm Erregungs- />520 nm Emissionswellenlänge; Grünfilter: 530-560 nm Erregungs- />580 nm Emissionswellenlänge) und drei verschiedene Objektive eingebracht, die die Quantifizierung mikrozirkulatorischer Parameter nach Injektion von FITC-Dextran und Rhodamin 6G erlaubten. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein $\times 5$ Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar $\times 5/0.15$, Zeiss, Oberkochen, Deutschland), für die Parameter der Revaskularisierung ein $\times 10$ Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar $\times 10/0.30$, Zeiss) und für die mikrohämodynamischen Parameter ein $\times 20$ Objektiv (Leitz EF-L20/0.32, Leitz, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

Die intravitalkroskopischen Bilder wurden von einer hochempfindlichen CCD (charge-coupled device) Videokamera (FK 6990; Lichtempfindlichkeit 10-2 lux; Prospective Measurements, San Diego, California, USA) aufgenommen, über einen Bildschirm (33 cm Bildschirmdiagonale; PVM-1444 QM, Sony, München, Deutschland) an ein DVD-Rekorder System mit einer Aufzeichnungsrate von 50 Bildern pro Sekunde (DVD-R121, Samsung, Schwalbach im Taunus, Deutschland) weitergeleitet. Je nach verwendetem Objektiv konnte so eine 216-fa-

che, 432-fache bzw. 864-fache Gesamtvergrößerung auf dem Bildschirm der Aufnahmeeinheit erzielt werden. Diese Art der Aufnahmetechnik erlaubte eine spätere computergestützte (CapImage, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) off-line Auswertung der Mikrozirkulation durch Bild-zu-Bild-Analyse und trug somit zur Minimierung der Lichtexpositionszeit bei (Langer et al., 2002).

5.5.3 Untersuchung der Mikrozirkulation mittels IVM

Als direkte Methode zur Untersuchung der Mikrozirkulation wurde die Intravitale Fluoreszenzmikroskopie benutzt, mit Hilfe derer unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene Parameter der Mikrozirkulation untersucht werden können. Die intravitalmikroskopische Analyse der Mikrozirkulation erfolgte durch die Kontrastierung einzelner Blutbestandteile mit 2 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Dazu wurden die narkotisierten Versuchstiere auf einer Plexiglasbühne fixiert und Fluoreszein-Isothiocyanat markiertes Dextran (FITC-Dextran 5 %, 0,25ml, MG 150000, Exzitationsmaximum 490nm; Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA) zur Kontrastverstärkung (Menger et al., 1992) und Rhodamin-6G (0,1-0,2µmol/kg KG i.v.; MG 479; Exzitationsmaximum 530nm Merck, Darmstadt, Deutschland) zur in vivo Kontrastierung von Leukozyten retrobulbär appliziert (Vollmar et al., 1997).

Der Plasma-Marker FITC-Dextran stellt den Erythrozyten-freien Plasmaraum der Gefäße dar, sodass damit durch die Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie die Gefäßgrenzen erfasst werden konnten. Am Tag 0 direkt nach Transplantation wurde von den transplantierten Inseln, PI und ModPI mit dem ´5 Objektiv eine Übersichtsaufnahme gemacht. Für die spätere Bestimmung von Fläche und Durchmesser am Tag 0 wurde darüber hinaus jede Insel einzeln im ´10 Objektiv aufgenommen. Durch die vorherige Färbung mit Neutralrot leuchteten die Transplantate im Blaufilter ohne weitere Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen.

5.6 Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter

An den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation wurden die Transplantate für die Bestimmung der revaskularisierten Fläche und der funktionellen Kapillardichte im ´10 Objektiv für ca. 20-30s aufgenommen. Für die Bestimmung von Blutzellgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser wurden je 2-3 Gesichtsfelder für ca. 20s mit dem ´20 Objektiv aufgenommen. Die anschließende quantitative off-line Analyse der Mikrozirkulations-Parameter erfolgte mit Hilfe der

computergestützten Auswertungssoftware CapImage (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

5.6.1. Revaskularisierte Fläche

Zur Messung der Transplantatgröße und der revaskularisierten Fläche der transplantierten Inseln wurden die Stellen an welchen bereits Angiogenese zu erkennen war am Auswertebildschirm durch Umrandung markiert. Bei mehreren Angiogeneseherden wurden deren Messwerte im Anschluss addiert und so der gesamte Flächeninhalt in mm^2 bestimmt. Die revaskularisierte Fläche der Transplantate (in mm^2) wurde an den einzelnen Versuchszeitpunkten als das Verhältnis (in Prozent) zwischen der jeweils gemessenen mikrovaskulären Netzwerkfläche und der Transplantatgröße berechnet.

5.6.2 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte beschreibt die Länge der von Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Gewebefläche. Hierfür wurde wiederum zuvor die Fläche der Transplantate umrandet woran sich die Messung der perfundierten Kapillaren durch digitales Nachzeichnen am bewegten Bild anschloss. Der Quotient aus der Gesamtlänge der nachgezeichneten Kapillaren und der Fläche des Transplantats ergab die funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 .

5.6.3 Gefäßdurchmesser

Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten wurden pro Inseltransplantat jeweils 20 Durchmesser neugebildeter Gefäße erfasst. Die Auswahl der Gefäße war randomisiert durch Auflegen einer mit einem Achsenkreuz versehenen Folie auf den Auswertebildschirm. Nur die Kapillaren wurden gemessen, die entweder die vertikale oder die horizontale Linie dieses Achsenkreuzes schnitten. Aus diesen 20 Einzeldurchmessern wurde anschließend der Mittelwert in μm gebildet. Waren weniger als 20 unterschiedliche Gefäße zu sehen, wurden alle Durchmesser addiert und durch die entsprechende Anzahl geteilt um den Mittelwert zu erhalten.

5.6.4 Blutzellgeschwindigkeit

Für die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurden wieder die gleichen Gefäße ausgewählt, an welchen zuvor der Durchmesser erfasst wurde. Die Messung erfolgte mit Hilfe der computerunterstützten Line-Shift-Diagramm-Methode (Klyscz et al., 1997). Hierbei wurde eine zentral

im Gefäßlumen gelegene Messlinie entlang der Blutflussrichtung definiert. Die Auswahlkriterien für einen bestimmten Gefäßabschnitt waren hierbei Geradlinigkeit und die Abwesenheit von Gefäßverzweigungen, um eine laminare Strömung gewährleisten zu können. Die Videoaufzeichnung wurde für 10 bis 15 Sekunden in Echtzeit abgespielt, wodurch für jedes Halbbild ein Grauwertprofil entlang der Messlinie erstellt und im Bildspeicher aufgezeichnet werden konnte.

Während der Messung wurde die Zeitdifferenz ermittelt, die ein Erythrozyt im Gefäßlumen benötigte, um die zuvor definierte Strecke zurückzulegen. Daraus erstellte der Computer dann ein Line-Shift-Diagramm, in dem helle und dunkle schrägverlaufende Linien zu erkennen waren, wenn sich während der Messung Plasmalücken (hell) bzw. Erythrozyten (dunkel) entlang der Messlinie bewegt hatten. Durch Markierung der Linien wurde so aus deren Steigung die Blutzellgeschwindigkeit in der Gefäßmitte (V_{RBC} = velocity of red blood cells) in $\mu\text{m/s}$ berechnet. Bei einem Durchgang ließen sich maximal 9 Gefäße messen. Pro Insel wurden ein bis 2 Durchgänge gemessen, sodass man am Ende die Einzelwerte von 9 bis maximal 18 Gefäßen hatte, welche im Anschluss wiederum gemittelt wurden.

5.6.5 Volumenfluss

Für größere Gefäße erfolgt die Berechnung des Blutflusses durch Multiplikation der Blutzellgeschwindigkeit mit dem Gefäßquerschnitt. Da in der vorliegenden Studie allerdings Mikrogefäße mit parabolischem Geschwindigkeitsprofil analysiert wurden, wurde hier der Baker-Wayland-Faktor (K) (Baker und Wayland, 1974) eingesetzt, der den Unterschied zwischen den gemessenen Blutzellgeschwindigkeiten im Zentralstrom und der durchschnittlichen Blutzellgeschwindigkeit ausgleicht. Somit konnte anhand der gemessenen Blutzellgeschwindigkeit (v) und des Gefäßdurchmessers (d) der Volumenfluss individueller Mikrogefäße (VQ) mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$VQ = \pi \times (d/2)^2 \times v/K$$

Entsprechend der in der Studie analysierten Durchmesser von $\sim 5\text{-}10\mu\text{m}$ wurde nach Lipowsky und Zweifach ein Faktor (K) von 1,3 eingesetzt (Lipowsky und Zweifach, 1978).

5.6.6 Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Daten wurden zuerst auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden dann mittels Analyse der Varianz (one way ANOVA), gefolgt vom Tukey-Test für multiple Vergleiche, kalkuliert. Das Kriterium für Signifikanz wurde mit $p < 0.05$ angesetzt. Die Durchführung sämtlicher statistischer Berechnungen erfolgte unter Verwendung des Software Pakets SigmaStat 3.0 (Jandel Corporation, San Rafael, Kalifornien, USA).

5.7 Glukosestimulations-Test und ELISA

5.7.1 Bestimmung der Anzahl an Inseläquivalenten (IEQ)

Vor Beginn des eigentlichen Glukosetoleranz-Tests mussten sogenannte Inseläquivalente (IEQ) mit Hilfe eines Mikrometermaßstabs unter dem Mikroskop ausgemessen und in eine 48 well Platte gepickt werden. Ein Inseläquivalent entspricht dabei einer durchschnittlich großen Insel von $150\mu\text{m}$ (Ricordi et al., 1990) (Tab. 2). Pro well wurden jeweils 50 IEQs gepickt. Für die Versuchsdurchführung war die Bestimmung von IEQs notwendig, da die generierten PI und Mod PI sowie die Langerhans-Inseln teilweise Größenunterschiede zeigten. Die Inseläquivalent-Berechnung geschah dabei wie folgt:

Durchmesser Insel (μm)	Umrechnungsfaktor
50 - 99	0,16
100 - 149	0,66
150 - 199	1,7
200 - 249	3,5
250 - 299	6,3
300 - 349	10,4
> 350	15,8

Tab. 2: Umrechnungsfaktoren (nach Ricordi et al., 1990) für Inseln unterschiedlicher Größe bzw. unterschiedlichen Durchmessers

5.7.2 Durchführung des Glukose-Stimulationstests

Der in vitro Glukosestimulations- oder auch Toleranztest wurde mit Inseln, PI sowie ModPI durchgeführt und diente der Überprüfung ihrer Funktionalität. Für den Vergleich von PI und ModPI mit normalen Langerhans-Inseln wurden Inseln vom Tag 5 verwendet, da die PI und ModPI frühestens 5 Tage nach ihrer Generierung fest genug zum abernten waren. Pro Inseltypus wurden 3 parallele Ansätze mit jeweils 50 IEQs durchgeführt, was bedeutete, dass insgesamt jeweils 3 x 50 IEQs, also 150 IEQs, verwendet wurden.

Die erhaltenen Werte für die einzelnen wells wurden im Nachhinein gemittelt und der Standardfehler (standard error of the means = SEM) berechnet. Zu jedem Inseltypus liefen zusätzlich parallel 2 wells mit Leerwerten mit, also wells in denen nur das entsprechende Kulturmedium enthalten war. Eventuelle unspezifische Signale konnten so anschließend von den eigentlichen Messwerten abgezogen werden. Zusätzlich wurden einzelne wells mit Langerhans-Inseln (je 50 IEQs) unterschiedlichen Kultivierungsalters (Tag 0, 1, 3 und 5) bestückt und ebenfalls gemessen, um so die Insulinsekretion im zeitlichen Verlauf bestimmen zu können. Vor der Durchführung des eigentlichen Tests wurden alle Inseln in low-glucose Medium präinkubiert, um die Insulinsekretion der Proben auf das gleiche Level zu bringen.

5.7.3 Statische Glukosestimulation

Bei der Isolierung humaner Inseln wurden die statischen Stimulationstests mit Glukose zur Überprüfung der Inselfunktionalität bereits standardisiert eingesetzt. Hierbei wird mit einer speziellen Glukoselösung stimuliert und die Insulinsekretion gemessen.

Ansetzen der Stimulationslösungen:

Molekulargewicht von Glukose: 180,16g/mol

Ausgehend von einem Niedrig-Glukose (low) enthaltenden DMEM-Medium (1,0g/l, PAA, Pasching, Österreich), was einer 5,56mmolaren Glukose-Konzentration entspricht, wurden die Stimulationslösungen, d.h. ein Medium mit einer mittleren (mid) (4,5g/l = 24,9mM) und ein Medium mit einer hohen Glukosekonzentration (high) (9,0g/l = 50mM) angesetzt.

Stammlösungen:

low-glucose:	100ml DMEM (DMEM low Glucose (1,0g/l), with L-Glutamine, PAA, Pasching, Österreich) + 1ml Penicillin/Streptomycin (PAA)
mid-glucose:	100ml DMEM (DMEM low Glucose) + 0,35g D-Glukose (Sigma, München, Deutschland) + 1ml Pen/Strep
high-glucose:	100ml DMEM (DMEM low Glucose, with L-Glutamine, PAA) + 0,8g D-Glukose + 1ml Pen/Strep

Gebrauchslösungen:

low-glucose:	40 ml angesetzte Stammlsg. + 10ml FCS Gold (PAA)
mid-glucose:	40 ml angesetzte Stammlsg. + 10ml FCS Gold
high-glucose:	40 ml angesetzte Stammlsg. + 10ml FCS Gold

Insulinsekretion:

Nach dem Picken der unterschiedlichen Inseltypen in die einzelnen wells wurden diese erst mit PBS gewaschen und anschließend für 30min bei 37°C in jeweils 300µl low-glucose Medium im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation wird das in diesem Zeitraum sezernierte Insulin, durch Austauschen des Mediums durch frisches low-glucose Medium, entfernt. Dieser Vorinkubationsschritt führt zu einer erheblichen Senkung der aus einer Mischung von passiver Insulinfreisetzung (z.B. durch geschädigte Zellen) und der basalen Insulinsekretion der bei 100mg/dl resultierenden Basalrate.

Nun erfolgte die eigentliche Glukosestimulation. Hierfür wurden je 50 IEQs in jeweils 300µl low-glucose Medium für 60min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Medium abgehoben und in vorbereitete Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C weggefroren. Die IEQs wurden jetzt für wiederum 1h bei 37°C in Medium mittleren Glukosegehalts inkubiert mit anschließendem Abheben und Wegfrieren der Überstände. Als letztes wurden die Inseläquivalente in dem High-Glukose Medium inkubiert. Auch hier wurden nach 60min bei 37°C die Überstände entfernt und bis zu ihrer Messung bei -20°C weggefroren.

5.7.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Begriff Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Der ELISA gehört zur Gruppe der Immunassay-Verfahren. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren aber auch nie-

dermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das nachzuweisende Antigen bzw. Substrat wird während einer enzymatischen Reaktion umgesetzt wobei das resultierende Reaktionsprodukt üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, sodass der ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

5.7.4.1 Das Testprinzip

Mercodia Insulin ELISA ist ein enzymatischer, zweiseitiger Immunoassay mit einer Festphase. Der Test basiert auf der direkten Sandwichtechnik, in welcher zwei monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen im Insulinmolekül gerichtet sind. Während der Inkubation reagiert das Insulin in der Probe mit den Insulin-Antikörpern im Peroxidase-Konjugat und den Insulin-Antikörpern, welche auf der Mikrotiterplatte gebunden sind. Eine einfache Waschung entfernt die ungebundenen, enzymatisch gekennzeichneten Antikörper. Das gebundene Konjugat wird durch 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) sichtbar gemacht. Durch Zugabe von Säure wird die Reaktion gestoppt. Der dadurch erhaltene kolorimetrische Endpunkt wird nun spektrophotometrisch abgelesen.

5.8 Proteinbiochemischer Nachweis von Insulin im Western-Blot

5.8.1 Proteinextraktion

Zur Herstellung von Gesamtzell-Extrakten wurden die Knochenmarkszellen mit Hilfe von Accutase vom Petrischalenboden abgelöst. Die Inseln, PI und ModPI wurden mittels enzymatischen Verdau mit Trypsin/EDTA in ihre einzelnen Bestandteile aufgelöst. Nach Neutralisierung mit Vollmedium wurden die Zellen dreimal mit 4°C kaltem sterilen PBS-Puffer gewaschen. Je nach Größe des Zellpellets wurde dieses in unterschiedlichen Volumina Lysispuffer (10mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), pH 7,5; 10mM NaCl; 0,1mM EDTA; 0,5% Triton X 100; 0,02% NaN₃ (Roth)) unter dem Zusatz des Proteinaseinhibitor-Cocktails (PIC) (Sigma) sowie PMSF (Roth) (jeweils im Verhältnis 1:75 eingesetzt) resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Nach

einer 30-minütigen Zentrifugation (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland) bei 13000 U/min ($16000 \times g$) bei 4°C wurden die Überstände abpipettiert und Aliquots bei -20°C kryokonserviert bzw. auf Eis gelagert und sofort zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt.

5.8.2 Konzentrationsbestimmung und Denaturierung der Proteine

Die kolorimetrische Proteinbestimmung nach Lowry ist eine einfache und zuverlässige Methode zur Bestimmung der Konzentration löslicher sowie unlöslicher Proteine (Lowry et al., 1951). Sie beruht auf einer Farbreaktion mit Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz (Folin Reagenz) und Kupfersulfat, wobei Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen in alkalischer Lösung einen Kupfer-Protein-Komplex ausbilden. Cu^{2+} wird dabei zu Cu^{+} reduziert und reagiert mit dem Folin-Reagenz durch Reduktion von Heteropolysäuren zu einem tiefblauen bis violetten Farbkomplex. Die Absorption dieses Farbkomplexes wird mittels eines Photometers gemessen und ist der Proteinkonzentration proportional.

Die Messlösungen wurden unmittelbar vor der Bestimmung frisch zusammengebracht. Reagenz A (10g Na_2CO_3 / 500ml 0,1M NaOH, Roth) wurde in einer 50:1 Verdünnung mit Reagenz B (0,5g KNa-Tartrat, 0,25g Cu-Sulfat $\times 5\text{H}_2\text{O}$ /50ml A. dest., Merck) gemischt. Zu 250 μl dieser Lösung wurden nun 50 μl Proteinextrakt (1:10 mit A.dest vorverdünnt) zugegeben und sofort für 15s gemischt (Vortex, Heidolph Reax top, Fisher Scientific). Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte der Zusatz von 25 μl der 1:2 mit A. dest. verdünnten Folinlösung (Sigma) und ein unmittelbares Vortexen für weitere 15s. Der Ansatz wurde 30min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption des entstandenen Farbkomplexes photometrisch (GeneQuant pro, GE healthcare, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595nm gegen A. dest. gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Standardkurve ermittelt. Zu jedem Proteinextrakt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die auf Eis gelagerten Proteinextrakte wurden nach der Konzentrationsbestimmung mit A. dest. verdünnt, sodass die Konzentration zwischen 0,5 und 2 μg Protein/ μl betrug. Die verdünnten Extrakte wurden mit 2 \times 'Sample Buffer' nach Laemmli (4% SDS; 20% Glycerin; 10% β -Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenolblau; 0,125M TRIS-HCl (pH 6,8); Sigma) versetzt und 5min im kochenden Wasserbad denaturiert. Die denaturierten Extrakte ($c = 0,5\text{-}2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden bei -20°C kryokonserviert oder sofort in der anschließenden Western-Blot-Analyse eingesetzt.

5.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Grundlegendes Prinzip der elektrophoretischen Trennung von Proteinen ist die Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Zur Trennung von Proteinen wird nahezu ausschließlich Polyacrylamid als Träger verwendet, das durch radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden N, N'-Methylenbisacrylsäureamids („Bis“) eine dreidimensionale Matrix ausbildet.

Zusätze (ml)	Sammelgel (5%)	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)
30% Acrylamid/Bis	0,67	2,7	3,3	4
Trenngelpuffer	-	2,5	2,5	2,5
Sammelgelpuffer	0,5	-	-	-
Aqua dest.	2,7	4,6	4	3,3
10% SDS	0,04	0,1	0,1	0,1
10% APS	0,04	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,02	0,02	0,02	0,02

Tab. 3: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels für die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

Die Proteine passieren zuerst das Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Anschließend wandern sie in das Trenngel, welches neben einer geringeren Porenweite zudem eine höhere Salzkonzentration und einen höheren pH-Wert als das Sammelgel aufweist (Tab. 3). Beim Einwandern der Proben in das Trenngel wandern die Glycin-Ionen aufgrund ihrer pH-abhängigen negativen Ladung an der Front und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Alle Western-Blot-Analysen wurden als eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Die SDS-Page erfolgte mit einer generellen Acrylamidkonzentration von 5% im Sammelgel und einer, je nach Molekulargewicht des Targetproteins, variierenden Acrylamidkonzentration zwischen 8 und 12% im Trenngel (Tab. 3). Die Gele wurden in einer vertikalen Flachgelapparatur mit Gießstand für Minigel (Mini-Protean II, BioRad) gegossen. Nach Einfüllen der Trenngellösung wurden nun vorsichtig 200µl Isopropanol (Roth) überschichtet, um eine

Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch Luftsauerstoff zu verhindern und die Ausbildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten. Nach einer einstündigen Polymerisationszeit wurde nach Entfernung des Alkohols das Sammelgel in die Apparatur gegossen. Die Geltaschen, die mit einem sofort ins Sammelgel zentriert eingesteckten Teflonkamm (15 Zähne, 0,75mm, BioRad) ausgeformt wurden, erlaubten ein maximales Beladungsvolumen von 15µl, sodass bei jeder Analyse 5-15µg Protein pro Geltasche aufgetragen wurden. Während der 45-minütigen Polymerisation wurden 10µl eines Proteinmolekulargewicht-Standards (Rainbow High Range, GE healthcare) mit 5µl Laemmli 2x "Sample Buffer" (Sigma) verdünnt und in gleicher Weise wie die Proteinextrakte im kochenden Wasserbad denaturiert.

Nach Beladung des Gels wurde die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean3) in einem Tris/Glycinpuffer (0,125M Tris-Base; 0,96M Glycin; 0,5% SDS, Roth) durchgeführt. Die erforderliche Niederspannung wurde mit Hilfe eines speziellen Netzgerätes für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad) generiert. Zur Konzentrierung der Proteine im Sammelgel wurde eine anfängliche Spannung von 100V gewählt. Nach ca. 15min wurde diese zur Passage durch das Trenngel für ca. 1h auf 140V erhöht. Die Auftrennung der Proteine wurde beendet, wenn die blaue Lauf-front der Bromphenolblau-Bande des 'Sample Buffers' das untere Gelende erreichte. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entnommen und in einem Transferpufferbad (12mM Tris-Base, 96mM Glycin, Roth) für das anschließende Membranblotting äquilibriert.

5.8.4 Blotting

Ziel dieser Methodik ist es, die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine synthetische Membran zu transferieren, sodass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters resultiert. Die auf der Membrantextur gebundenen Targetproteine sind dann für einen immunchemischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern leicht zugänglich.

Der horizontale Proteintransfer erfolgte als Tank-Blotting in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad). Die PVDF-Membran (0,2µm Porengröße, BioRad) wurde zunächst zum Ausgleich von Oberflächenladungen für 20s in Methanol (Roth) gebadet und sofort mit A. dest. abgespült. Danach erfolgte eine 10-minütige Äquilibrierung in Transferpuffer (25mM TRIS Base,

192mM Glycin in A. dest). Das Blot-Sandwich wurde wie folgt aufgebaut: Ein mit Transferpuffer getränkter Schwamm wurde in die Blotkassette eingelegt, darauf ein getränktes Filterpapier platziert (grade 114, Dicke 25µm, Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland). Anschließend wurden die äquilibrierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei positioniert und wiederum ein getränktes Filterpapier und ein Schwamm eingelegt. Nach Verschließen der Sandwich-Kassette wurde diese derart in der Blotkammer ausgerichtet, sodass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel zur Membran gewährleistete.

Um lokale Überhitzungen zu vermeiden und eine gleichmäßige niedrige Temperatur zu erhalten, wurde ein Eis-‘Spacer’ in die Blotkammer eingestellt, welche zudem auf einem Magnetrührer stand, wodurch die Kälte des Eises in der Pufferlösung verteilt wurde. Die Blotkammer wurde vollständig mit Transferpuffer aufgefüllt und die Elektroden am Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac 200, BioRad) angeschlossen. Der Proteintransfer wurde nach 2h bei einer angelegten konstanten Spannung von 50V (Anfangsstromstärke 800mA für 2 Gele) beendet. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in TBS-T Puffer (1,5mM Tris-Base pH 7,5; 1% NaCl; 0,01% Tween 20 in A. dest. (Roth)) bei 4°C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

5.8.5 Detektion

Die Detektion der Targetproteine erfolgt durch eine spezifische Antikörper-Färbung der membrantransferierten Proteine. Zur Sättigung überschüssiger Proteinbindestellen wurde die Membran mit einem Blockierungsreagenz behandelt, um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Die Nachweisreaktion erfolgt durch die Bindung eines spezifischen unkonjugierten Primärantikörpers am Targetprotein und einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper zur Signalverstärkung.

Die gebundenen Antikörper werden mittels ECL-Reagenz im Rahmen einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Durch Exposition eines Röntgenfilms auf der Membran kann die Position und Expressionsstärke des Targetproteins sichtbar gemacht werden, indem die Schwärzung des Röntgenfilms durch die proteinkonzentrationsabhängige emittierte Strahlung erfolgt. Die Antikörperfärbungen der Membranen wurden auf einem Horizontalrotator (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific) durchgeführt. Die über Nacht in TBS-T aufbewahrten Membranen wurden 3 x mit TBS-T gewaschen und zur Blockierung unspezifischer

scher Bindungsstellen in einer 5%igen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) in TBS-T für 30min inkubiert. Nach 3 x Waschen mit TBS-T wurden die entsprechenden Primärantikörper (Insulin, Santa Cruz; GAPDH,) für 2h bei RT inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Die Membranen wurden für 90min mit den 1:5000 verdünnten HRP-konjugierten Schaf-anti-Maus-IgG- bzw. Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (ECL Rabbit IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment from donkey, GE healthcare) exponiert. Nach 5 x Waschen in TBS-T wurden diese nun der Chemilumineszenzreaktion unterzogen. Dazu wurden die feuchten Membranen für 60s mit einem 1:2 Gemisch der ECL-Reagenz 1 und 2 (3-Aminophthalhydrazid + unbekannter Chemilumineszenzverstärker mit H₂O₂) inkubiert. Nach Entfernung des Reagenz wurden die in Autoklavierfolie eingepackten Membranen zur Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, GE healthcare) in einer Röntgenkassette positioniert.

Die Expositionszeiten waren von der Signalstärke der zu detektierenden Proteine abhängig und wurden zwischen 1 und 20min variiert. Die Signale der belichteten Filme wurden anschließend in Entwicklungs- bzw. Fixierbädern (Zahnfilm, Adefo GmbH, Nürnberg) visualisiert und haltbar gemacht. Zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers wurde der polyklonale GAPDH- Antikörper Klon FL-335 (Santa Cruz) als interner Standard eingesetzt. Das Housekeeping-Protein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein essentielles Enzym der Glykolyse und somit in allen Lebewesen nachweisbar (Ferguson et al., 2005). Die Antikörperkonzentration betrug für alle Analysen 1:5000.

5.8.6 Quantitative Auswertung

Die Analyse der Röntgenfilme erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und dem Quantifizierungsprogramm 'Quantity One-Geldoc' (BioRad). Die quantitative Analyse der Proteinmuster wurde als Vergleich der relativen Mengenverhältnisse der einzelnen Fraktionen durch densitometrische Bestimmung vorgenommen, indem die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung gemessen wurde. Die ermittelten Daten wurden über den internen GAPDH-Standard korrigiert.

5.9 Histologie

5.9.1 Einbetten isolierter Inseln, PI und ModPI in HepatoQuick

Mit Hilfe des Reagenz HepatoQuick (Roche, Diagnostica Stago, Mannheim, Deutschland), welches normalerweise der in-vitro Bestimmung der modifizierten Prothrombinzeit (Quick-Wert) im Citratplasma dient, konnten auch 8 Tage alte Inseln, PI und ModPI eingebettet und in 4% Formaldehyd fixiert werden. Hierfür wurden in den Deckel eines Eppendorf-Reaktionsgefäßes 100µl HepatoQuick, 50µl humanes Citratplasma sowie 10µl CaCl₂ gegeben und bei RT gelieren lassen. Nach Festwerden des Thromboplastin-Reagenz wurden pro Ansatz jeweils 10-15 Inseln überführt. Unmittelbar danach wurde eine zweite HepatoQuick-Schicht, wiederum mit dem Zusatz von Plasma und CaCl₂, auf die Inseln gegeben und ebenfalls gelieren gelassen. Nach etwa 30min konnten die mittlerweile verfestigten Insel-enthaltenden Gelschichten aus den Eppi-Deckeln gelöst und in Gewebe-Kassetten (Einbettkassette mit Deckel, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) zur weiteren Inkubation in 4% Paraformaldehyd überführt werden.

5.9.2 Entnahme der Kammerpräparationen zur Fixierung

Nach Exzision der Rückenhautkammerpräparationen am Tag 14 wurden diese in beschriftete Gewebe-Kassetten (Einbettkassette mit Deckel, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt. Diese wurden dann für 48h in einer Küvette mit 4% Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und danach für 2h in Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Proben in einem automatischen Histocycler, auch „tissue-processor“ genannt (Reichert Jung Histokinette 2000, Leica, Wetzlar, Deutschland), über eine aufsteigende Alkoholreihe weiter entwässert und kamen über einen Xylol-Zwischenschritt (Xylol, Carl Roth GmbH & Co. KG) in flüssigem Paraffin (Granopent® „P“, Paraffin in Plättchen, Carl Roth GmbH & Co. KG) zu liegen.

Dann wurden die Kammerpräparationen mit Hilfe eines Histo-Embedders (Leica) weiter zu Paraffinblöcken verarbeitet, um dann mit einem manuellen Mikrotom (Leica SM2000R, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) zu 5µm dicken Schnitten verarbeitet zu werden. Von den Rückenhautkammerpräparationen wurden sogenannte Serienschritte angefertigt, wobei die Objektträger von 1 bis 60 durchnummeriert wurden. Pro Objektträger (Objektträger, ca. 76x26mm, geputzt/gebrauchsfertig, Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braun-

schweig, Deutschland) wurden jeweils 2 bis 4 Schnitte aufgebracht, wo sie über Nacht bei 60°C im Trockenschrank gelagert wurden, um eine optimale Adhäsion zwischen Präparat und Objektträger zu gewährleisten.

5.9.3 HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt eine Routine-Färbemethode für morphologische Gewebeuntersuchungen dar. Mit ihr lässt sich eine gute Darstellung verschiedenster Gewebestrukturen erreichen, wobei Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa angefärbt werden. Die HE-Färbung erfolgte nach einem Standardprotokoll unter weitgehendem Lichtabschluss. Von den hergestellten Serienschnitten wurde für eine leichtere anschließende Detektion der Transplantate jeder sechste Schnitt HE gefärbt.

Hierfür wurden die Präparate über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe wieder entparaffiniert, bewässert (Xylol 2 x 3min, 100% Ethanol 2 x 3min, 95% Ethanol 2 x 3min, 2min H₂O) und anschließend für 5s mit Hämatoxylin (Harris Hematoxylin Solution, Sigma, Steinheim) gefärbt. Dann wurden die Schnitte für 2min unter fließendem Wasser gebläut und für 10s mit Eosin gefärbt. Es folgte wieder eine ansteigende Alkoholreihe (95% Ethanol 2 x 30s, 100% Ethanol 2 x 30s) und Xylol (2 x 30s). Um ein Dauerpräparat zu erhalten, wurden die Schnitte zuletzt mit Kaisers` Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) überschichtet und mit einem Deckglas eingedeckt.

5.9.4 Immunhistologie

5.9.4.1 Immunfärbung auf Insulin, Glukagon und Somatostatin

An Schnitten der Rückenhautkammerpräparate sowie der eingebetteten isolierten Inseln, PI und ModPI konnte die Insulinproduktion mittels eines primären polyklonalen Meerschweinchen anti-Insulin Antikörpers (1:100, guinea pig polyclonal to Insulin, ab7842, Abcam, Cambridge, UK) überprüft werden. Die Insulin-Färbung wurde mit Hilfe der indirekten Immunoperoxidasetechnik durchgeführt. Hierfür wurden die Präparate wieder über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und bewässert. Danach wurden die Schnitte zunächst zur Permeabilisierung für 10min in 0,2% Triton-X 100 Waschpuffer inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit dreiprozentigem H₂O₂ in Methanol (Merck) zur Blockierung endogener Peroxidasen. Die Entstehung unspezifischer Bindungen wurde durch

Inkubation mit einprozentigem Ziegen-Normalserum in Waschpuffer geblockt. Die Präparate wurden nun ü.N. bei RT mit dem primären Insulin-Antikörper inkubiert, danach mit Waschpuffer gewaschen und schließlich mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Esel-anti-Meerschweinchen-Antikörper (1:500, Peroxidase AffiniPure donkey anti-guinea pig IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, Pennsylvania, USA) für 30-45min bei RT inkubiert und anschließend durch die enzymatische Reaktion des Chromogens 3,3' Diaminobenzidin (DAB) (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) visualisiert.

Der Fortschritt der Färbung wurde unter dem Mikroskop verfolgt und die Reaktion wurde nach 15-60s durch Waschen mit PBS gestoppt. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte schließlich noch mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und unter dem Lichtmikroskop (BX60; Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht. An Präparaten eingebetteter isolierter Inseln, PI und ModPI wurde zusätzlich auch die Produktion von Glukagon und Somatostatin überprüft. Zu diesem Zweck wurden die histologischen Schnitte entweder mit einem monoklonalen Maus-anti-Glukagon-Antikörper (1:100, Mouse monoclonal (K79bB10) to Glucagon, ab10988, Abcam) oder einem polyklonalen Kaninchen-anti-Somatostatin-Antikörper (1:100, rabbit polyclonal antibody to Somatostatin, SZ 1114, Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland) ü.N. bei RT inkubiert.

Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe von Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörpern, zum einen einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:500, Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L), 111-035-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und zum anderen einem Ziege anti-Maus Antikörper (1:500, Peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG, 115-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.).

Auch hier folgte die Enzymreaktion mit 3,3' Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) als Chromogen und die Schnitte wurden wiederum mit Hämalaun gegengefärbt. Als Negativ-Kontrollen wurden Schnitte von jedem Inseltyp einem geeigneten IgG-Isotyp-Antikörper (Sigma-Aldrich) als primärem Antikörper unter den gleichen Bedingungen ausgesetzt, um die Spezifität der Antikörperbindung zu bestimmen. Alle Kontrollfärbungen wurden als negativ bewertet.

5.10 In vivo Analyse der Funktionalität von ModPI

5.10.1 Studiendesign

Um die Funktionalität der ModPI in vivo zu überprüfen wurden diese unter die Nierenkapsel Streptozotocin-diabetischer Hamster transplantiert und mit Inseln, PI sowie Inseln, die simultan mit KMZ transplantiert wurden, verglichen. Als Kontrollen dienten Streptozotocin-diabetische Tiere ohne anschließende Transplantation.

5.10.2 Wirkmechanismus des Streptozotocins (STZ)

Die natürlich vorkommende Chemikalie Streptozotocin (STZ) ist ein Antibiotikum, welches in den späten 60er Jahren erstmals aus dem Bakterium *Streptomyces achromogenes* isoliert wurde. Seine Struktur ist die eines Nitrosamid-Methyl-Nitroso-Harnstoffes, der an die C2-Position einer D-Glukose gebunden ist (Herr et al., 1967). STZ besitzt sowohl antibiotische, als auch karzinogene Eigenschaften (Bolzán und Bianchi, 2002) und hat in der Diabetes-Forschung einen besonderen Stellenwert eingenommen durch seine Eigenschaft glukoseabhängige β -Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln selektiv zu zerstören, ohne die anderen Zellen zu

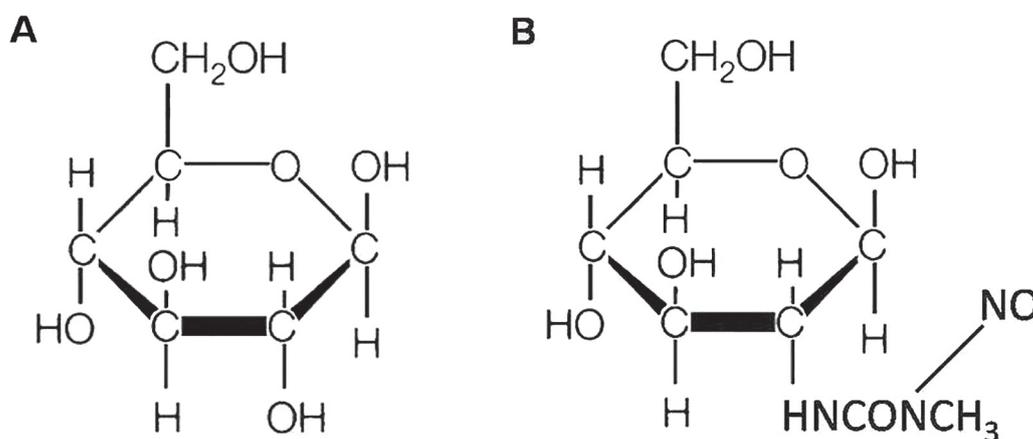


Abb. 10: Strukturformeln von Glukose (A) und Streptozotocin (B)

beeinträchtigen. Die Substanz wird hierbei aufgrund ihrer Glukosestruktur (Abb. 10B) durch den GLUT2-Transporter (Schnedl et al., 1994) ins Zellinnere der β -Zelle transportiert, wo dann die Aufspaltung in den Glukoseanteil und den Methylnitrosoharnstoff erfolgt. Dieser bewirkt durch den Einbau von Alkylgruppen Strangbrüche in der DNA (Elsner et al., 2000) und zerstört somit nach und nach die β -Zellen, was die Manifestation eines sogenannten Streptozotocin-

Diabetes auslöst. Neben der Zellschädigung und der damit einhergehenden Insulinknappheit wird auch die Insulinsekretion der Zellen selbst durch die Alkylierung gehemmt.

5.10.2.1 Diabetes-Induktion mittels STZ

Zur Nachahmung eines Diabetes Typ 1-ähnlichen Krankheitsverlaufs wurden in unserer Studie Syrische Goldhamster mit einem Gewicht zwischen 120 bis 170g mit einer einmaligen i.p. Injektion Streptozotocin (60mg/kg KG, Streptozotocin, Fluka, 85882, BioChemika, $\geq 98.0\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich) und der darauf folgenden selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln diabetisch gemacht. Eine Woche nach erfolgreicher Diabetes-Induktion wurde den Tieren Inseln, PI, ModPI (je 1000 IEQ pro Tier) oder Inseln zusammen mit KMZ (je 500 IEQ + 1×10^6 KMZ pro Tier) unter die rechte Nierenkapsel transplantiert. Als diabetisch wurden dabei Blutzuckerwerte von mindestens 200mg/dl angesehen. Über den Verlauf von drei Wochen wurden in regelmäßigen Abständen der Blutzucker und das Gewicht der Tiere überprüft. Zur Blutzuckermessung wurde ein handelsübliches Blutzuckermessgerät (AccuChek Compact Plus, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit Trommelsystem verwendet. Am Tag 21 erfolgte nach der letzten Messung die Exzision von Pankreas und rechter Niere. Diese wurden für histologische Untersuchungen in Gewebekassetten in 4% Formalin fixiert.

5.10.3 Versuchsaufbau

Für die Studie wurden wiederum Syrische Goldhamster beiderlei Geschlechts verwendet. Diese hatten ein Körpergewicht zwischen 120g bis 170g. Folgende Versuchsgruppen wurden untersucht:

- 1) Inseln (1000 IEQ, n=4)
- 2) Inseln + KMZ (500 IEQ + 1×10^6 KMZ, n=4)
- 3) Pseudoinseln (1000 IEQ, n=4)
- 4) Modifizierte PI (1000 IEQ, n=4)
- 5) Diabetische Kontrollen (ohne Tx, n=4)

Die Anzahl der Tiere betrug in allen Gruppen $n = 4$. Eine Woche nach Diabetes-Induktion erfolgte die Transplantation unter die rechte Nierenkapsel (Abb.11B). Auch im Fall der diabetischen Kontrolltiere zählte dieser Tag als Tag 0, ab welchem die Messungen begannen. Am

Tag der Transplantation (Tag 0) wurden Blutzucker und Gewicht unmittelbar vor der Operation bestimmt. Die weiteren Messungen von Blutzucker und Gewicht erfolgten an den Tagen 1, 3, 5, 7, 10, 14, 18 und 21 nach Transplantation. Am Tag 21 wurden nach der letzten Messung die rechte Niere und das Pankreas für histologische Untersuchungen entnommen.

5.10.4 Transplantation der verschiedenen Inseltypen

Die Transplantation der Inselpräparate erfolgte unter Isofluran-Inhalationsnarkose (Forene®, 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluor-methylether; Zul.-Nr. 2594.00.00; Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden), mit deren Hilfe sich die optimale Narkosetiefe während der Operation sicher steuern ließ. Operiert wurde unter semisterilen Bedingungen in 6-16facher Vergrößerung. Direkt nach Narkoseeinleitung wurde das Abdomen der Tiere enthaart und desinfiziert. Im Anschluss an die mediane Laparotomie wurde der Darm seitlich ausgelagert, sodass die rechte Niere frei lag. Um hierbei ein Austrocknen der Darmschlingen zu vermeiden wurden diese in feuchte, mit 0,9% NaCl getränkte Kompressen gehüllt. Die anschließende Auslagerung der

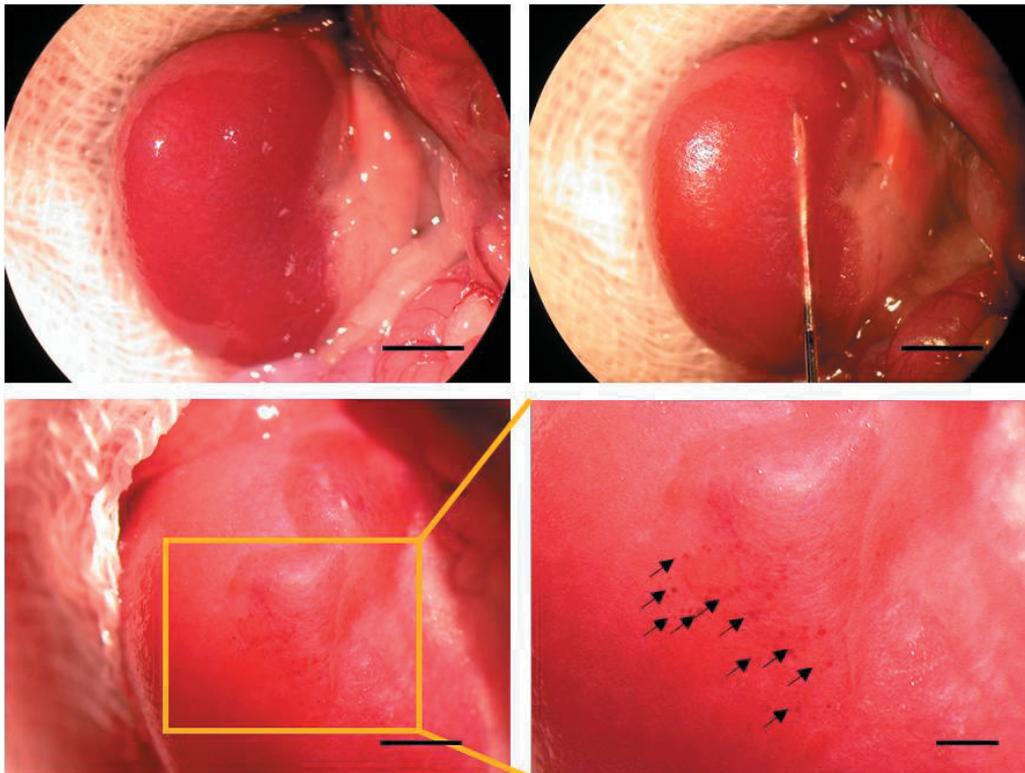


Abb. 11: **A:** Ausgelagerte rechte Niere beim Syrischen Goldhamster, **B:** Eine 25µl Hamilton-Spritze wurde vorsichtig unter die hauchdünne Nierenkapsel geschoben, ohne diese zu verletzen; A und B: Maßstab = 0,5cm **C:** Die Neutralrot-angefärbten transplantierten Inseln sammeln sich in einer durch die Flüssigkeit gebildeten Tasche und schimmern unter der Nierenkapsel durch, Maßstab = 0,25cm **D:** Vergrößerte Ansicht der transplantierten Inseln aus Abb. C. Schwarze Pfeile weisen auf einzelne Inseln; Maßstab = 1mm.

rechten Niere vor die Abdominalhöhle erfolgte unter Verwendung von mit NaCl getränkten Wattestäbchen und Kompressen (Abb. 11A). Zwischenzeitlich wurden die in ein frisches Eppendorfgefäß überführten Inseläquivalente mit einer Hamilton-Spritze ((84855) 802RN 25ul SYR (22s/2"/2), 800er Serie, pst2-Nadel, Hamilton Company Europe, Bonaduz, Schweiz) aufgesogen. Bei der großen Anzahl von 1000 IEQs war es notwendig die Inseln in 2 Portionen aufzusplitten, da mit der Spritze jeweils in einem Volumen von 25µl aufgesogen werden konnten. Mit einer Mikropinzette wurde die Niere am Fettgewebe unterhalb des unteren Nierenpols angepackt, sodass die Kanüle der Hamilton-Spritze dort angesetzt und unter Spannung mit leichtem Druck unter die Nierenkapsel in Richtung oberer Nierenpol geschoben werden konnte (Abb. 11B). Bei Erreichen des oberen Nierenpols wurde die Nadelspitze wieder ein kleines Stück herausgezogen, damit sich die Inseln während Abdrückens des Spritzenstempels in der sich bildenden Tasche unter der Nierenkapsel sammeln konnten (Abb. 11C und D). Beim Herausziehen der Nadel wurde mit einem feuchten Wattestäbchen ein leichter Druck auf die Einstichstelle ausgeübt, um einen Rückfluss der Inseltransplantate zu verhindern. Um alle Inseläquivalente zu transplantieren waren pro Tier bzw. Niere 2 Einstiche notwendig.

5.10.5 Postoperative Nachsorge der Transplantat-Empfänger

Nach der Transplantation erhielten die Tiere zur Schmerztherapie eine einmalige subkutane Injektion von 4,4mg/kg Körpergewicht Rimadyl (Rimadyl ® sterile injectable solution, Carprofen, Pfizer Animal Health, Div. of Pfizer Inc., New York, USA). Anschließend wurden die Tiere für mindestens 2h unter einer Rotlicht-Lampe gehalten und zunächst stündlich, später täglich visitiert. Hierbei wurden Fress- und Trinkverhalten, Bewegung und Reaktionsfähigkeit beurteilt. Zu den angegebenen Blutzuckermesszeitpunkten wurden darüber hinaus Gewichtszu- und abnahmen beurteilt und in einem Bewertungsbogen protokolliert. Die Gewichtsbestimmung erfolgte mit einer Laborwaage (Sartorius Waage GE412, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland, Genauigkeit von 0,01g).

5.10.6 Blutentnahme und Blutzuckermessung

An den angegebenen Messzeitpunkten wurden die Tiere durch eine Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt, um einen unnötigen Stress, wie er durch eine intraperitoneale Pentobarbital-Injektion hervorgerufen würde, zu vermeiden. Den Tieren wurde durch Punktion einer der dorsalen

metatarsalen Venen an einer der hinteren Extremitäten (Abb. 12) ein Tropfen Blut abgenommen. Dieser wurde unmittelbar danach auf einen frischen Teststreifen aufgebracht und mit einem handelsüblichen Blutzuckermessgerät (AccuChek Compact) der Blutzuckerspiegel gemessen.

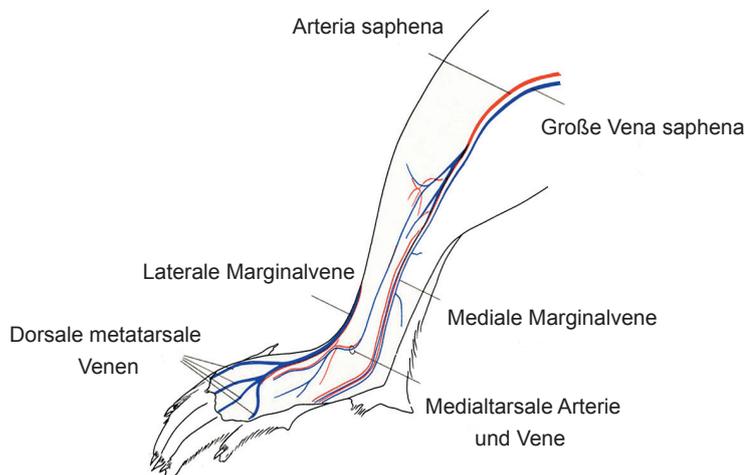


Abb. 12: Anordnung der Blutgefäße in der hinteren rechten Extremität beim Nager, Quelle: The anatomy of the laboratory mouse, www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure102.shtml

5.10.7 Statistik

Wie bei der Mikrozirkulations-Analyse wurden auch hier alle Daten als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Es erfolgte wiederum zuerst die Überprüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Anschließend kamen eine One-way-ANOVA sowie ein entsprechender post-hoc Test zur Anwendung. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert < 0.05 festgelegt. Alle statistischen Berechnungen erfolgten auch hier mit dem SigmaStat 3.0 Software Paket (Jandel Corporation).

5.10.8 Organentnahmen

5.10.8.1 Nephrektomie

Bei allen Tieren wurde nach Ablauf der 3-wöchigen Beobachtungsperiode eine Entnahme der rechten die Transplantate enthaltenden Niere durchgeführt, unabhängig von der Tatsache, ob bei den Tieren die Wiederherstellung einer Normoglykämie erzielt wurde oder nicht. Auch bei den diabetischen Kontrollen wurde so verfahren, um die Gewebe der verschiedenen Gruppen miteinander histologisch vergleichen zu können. Hierfür wurden die Tiere zunächst narkotisiert und das Abdomen entlang der „Linea alba“ wie bei der Vorbereitung für die Inselisolierung (Kap. 5.3.1) von kaudal nach kranial eröffnet. Laterale Entlastungsschnitte erleichter-

ten die anschließende Auslagerung der Organe. Nach Durchtrennen der Bauchaorta konnte die Niere aus dem entbluteten Tier entnommen und für die Inselwiederfindung (Kap. 6.4.3.3.1) vorbereitet werden.

5.10.8.2 Pankreatektomie

Um eine Beurteilung der verbliebenen eingewachsenen, ursprünglich transplantierten Inselmasse durchführen zu können, wurden die Zielorgane nach Versuchsablauf reseziert. Zur Abschätzung der Regeneration bzw. Degeneration des empfängereigenen Inselapparates wurde dem Empfängertier zugleich auch das Pankreas entnommen. Hierzu wurde an den bereits vor der Nierenentnahme entbluteten Tieren das Pankreas wie folgt entnommen: vom Magen und Milz ausgehend wurde das Organ zügig mit einer Mikroschere entlang des Duodenums abpräpariert, unverzüglich in eine beschrifteten Einbettkassette überführt und für 48h in einer Küvette mit frischem 4%igem Formalin fixiert.

5.10.9 Histologie

Nach 48-stündiger Inkubation in 4% Formaldehyd wurden die am Tag 21 entnommenen Nieren und Pankreata für 2h in Leitungswasser gewaschen. Darauf folgte die Entwässerung im automatischen Histocycler, über eine aufsteigende Alkoholreihe und einen Xylolschritt mit anschließender Inkubation in flüssigem Paraffin. Vor der Einbettung in Paraffin wurden die Nieren gedrittelt und konnten nun mit Hilfe des Histo-Embedders zu Paraffinblöcken verarbeitet werden. Sowohl die Nieren als auch die Pankreata wurden mit dem Mikrotom zu 5µm dicken Schnitten verarbeitet. Pro Objektträger wurden im Fall der Nieren jeweils 3 bis 6 Schnitte und bei den Pankreata 2 bis 4 Schnitte verbracht. Diese wurden über Nacht bei 60°C im Trockenschrank gelagert, um eine optimale Adhäsion zwischen Präparat und Objektträger zu gewährleisten. Von den Nieren wurden Serienschnitte angefertigt, wobei die Objektträger von 1 bis 60 durchnummeriert wurden.

5.10.9.1 HE-Färbung der Nierenschnitte

Von den zuvor hergestellten Serienschnitten wurde nun jeder 6. Schnitt angefärbt. Auch hier wurden die Präparate über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und bewässert und anschließend mit Hämatoxylin für 5s gefärbt. Danach wurden sie für 2min unter

fließendem Wasser gebläut und danach für 10s mit Eosin gefärbt. Es folgte wieder eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol für jeweils 2 x 30s. Abschließend wurden die Schnitte noch mit Kaisers` Glycingelatine eingedeckt.

5.10.9.2 Immunfärbung der Nierenschnitte auf Insulin und CD31

Wurden in den HE-gefärbten Schnitten Inseltransplantate gesichtet, so konnte an vorausgehenden und an Folgeschnitten eine immunhistochemische Färbung auf Insulin durchgeführt werden. Für die Überprüfung der Insulinproduktion wurde wieder der polyklonale primäre Meerschweinchen-anti-Insulin-Antikörper (1:100, Guinea pig polyclonal to Insulin, ab7842, Abcam) verwendet. Die Insulin-Färbung erfolgte erneut mit Hilfe der indirekten Immunoperoxidasetechnik. Nach der ü.N.-Inkubation der Präparate mit dem primären Insulin-Antikörper gefolgt von einem kurzen Waschschrift, wurden sie mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Esel-anti-Meerschweinchen-Antikörper (1:500, Peroxidase AffiniPure donkey anti- guinea pig IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories) für 30-45min bei RT inkubiert und durch anschließende enzymatische Reaktion des Chromogens DAB (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets Sigma-Aldrich Chemie GmbH) sichtbar gemacht.

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Schnitte mit Kaisers` Glycingelatine eingedeckt. Bei der immunhistochemischen Färbung gegen CD31 handelte es sich um eine Fluoreszenzfärbung. Zur Anfärbung CD31-positiver Zellen bzw. Kapillaren innerhalb der unter die Nierenkapsel transplantierten Präparate wurde der polyklonale Ratte-anti-Maus CD31 Primäantikörper (1:100, polyclonal rat anti mouse to CD31, DIA 310, Dianova, Deutschland) verwendet.

Auch hier wurden die Objektträger nach einer über Nacht Inkubation bei 4°C, gefolgt von einem Waschschrift, mit dem entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundäantikörper (goat anti rat Cy3, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) für 45min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33258, B-1155, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:5000. Auch die Fluoreszenz-markierten Präparate wurden im Anschluss für die dauerhafte Aufbewahrung mit Kaisers` Glycingelatine beschichtet und mit einem Deckglas versiegelt. Die anschließende Aufbewahrung der Objektträger im Kühlschrank trug zudem zu einer länger anhaltenden Fluoreszenzaktivität der Proben bei.

5.11 Generierung von ModPI aus murinen GFP-KMZ und Inselzellen

Zur Überprüfung auf in vitro Differenzierung der innerhalb des ModPI-Verbands residierenden Knochenmarkszellen zu Insulin-produzierenden Zellen wurden nun ein weiteres Mal ModPI generiert. Diesmal allerdings wurden Knochenmarkszellen aus den Femora und Tibiae von GFP-Mäusen (green fluorescent protein) (C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)10sb/J, Jackson Laboratories, Jackson, Missouri, USA) isoliert. GFP-transfizierte Tiere exprimieren dabei das grün fluoreszierende Protein in jeder Körperzelle, bis auf Haare und Erythrozyten, was unter Anregung des Gewebes mit blauem oder UV-Licht als grüne Fluoreszenz sichtbar wird. Zusätzlich wurden Inselzellen aus dem Pankreas von C57BL/6 Mäusen (C57BL/6NCrl, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) isoliert und zu gleichen Teilen mit den GFP-KMZ in der bereits beschriebenen „Hängenden Tropfen“-Kultur co-kultiviert. Nachdem die Einzelzellen nach der etwa 6-tägigen Kultivierung zu Aggregaten zusammen gewachsen waren wurden sie wie bereits für die ModPI beschrieben abgeschwemmt, gepickt und für die Fixierung in Formalin vorbereitet. Nach Einbetten in Paraffin wurden wiederum Serienschritte angefertigt von welchen jeder 6. Schnitt HE-gefärbt wurde. An Folgeschnitten positiver HE-Schnitte wurde nun eine immunhistologische Doppelfärbung gegen Insulin und GFP durchgeführt.

5.11.1 Doppelfärbung der GFP-ModPI gegen Insulin und GFP

Schnitte von eingebetteten ModPI, welche zur Hälfte aus GFP-positiven Knochenmarkszellen und zur Hälfte aus Inselzellen aus der Maus bestehen wurden immunhistochemisch gegen Insulin und GFP gefärbt. Hierbei wurde zum einen der primäre polyklonale Kaninchen anti-Insulin Antikörper (1:100, polyclonal rabbit anti insulin, Klon H-86, sc-9168, SantaCruz) und der primäre Ziege anti-GFP Antikörper (1:100, anti-GFP (goat) antibody, 600-101-215, Rockland Immunochemicals for research, Gilbertsville, Pennsylvania, USA) verwendet. Mit Hilfe der sekundären Cy3-gelabelten anti-Kaninchen (Dianova) und FITC-gelabelten anti-Ziege Antikörpern (Dianova) erfolgte die Visualisierung. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid angefärbt. Die immunhistologischen Präparate wurden nun am Fluoreszenzmikroskop überprüft (Keyence, Biozero BZ8000, Isenburg, Deutschland). Zellen die sowohl grün (GFP) als auch rot leuchteten (Insulin) wurden als differenzierte Knochenmarkszellen angesehen.

6. Ergebnisse

6.1 Ergebnisse der Intravitralen Fluoreszenzmikroskopie

6.1.1 Transplantatgrößen und Durchmesser am Tag 0

Die Auswertung der Mikrozirkulationsstudie vom Tag 0 ergab, dass sowohl die Gruppen der Inseln und PI, als auch die Gruppe der ModPI direkt nach Transplantation in die Rücken- hautkammer vergleichbare Transplantatgrößen von $0,081 \pm 0,007\text{mm}^2$, $0,077 \pm 0,010\text{mm}^2$ und $0,094 \pm 0,007\text{mm}^2$ zeigten (Abb. 13), ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Entsprechend wiesen sie vergleichbare Transplantatdurchmesser von $315 \pm 14\mu\text{m}$, $333 \pm 15\mu\text{m}$ und $304 \pm 20\mu\text{m}$ (Abb. 14) auf, ebenfalls ohne signifikante Unterschiede. Anschließende Unterschiede im Revaskularisierungsverhalten der Transplantate aufgrund von Größenunterschieden (Kampf et al., 2006) konnten damit ausgeschlossen werden.

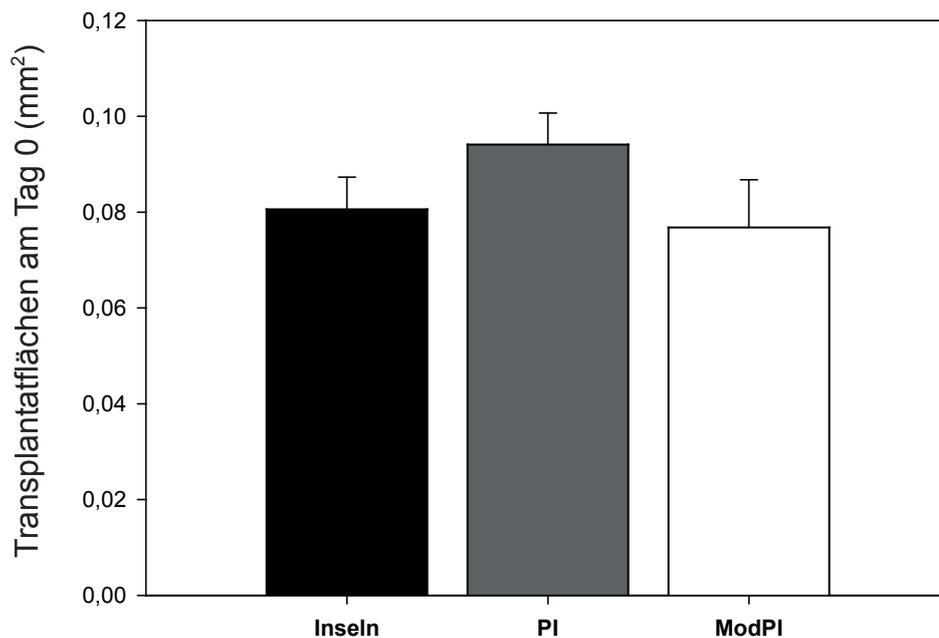


Abb. 13: Fläche in mm^2 der drei unterschiedlichen transplantierten Inseltypen am Tag 0, direkt nach Transplantation in die Rücken- hautkammer. Inseln (schwarzer Balken), PI (grauer Balken) und ModPI (weißer Balken) wiesen direkt nach Transplantation nahezu identische Transplantatgrößen auf, ohne signifikante Unterschiede. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Insel-Transplantate aller dreier Gruppen waren dazu in der Lage, nach Transplantation in die Rücken- hautkammer, zu revaskularisieren. Dieser Revaskularisationsprozess verlief in allen Versuchs- gruppen vergleichbar schnell, da bei allen Inseltypen ab Tag 3 erste Anzeichen von Angiogenese durch Aussprossen sogenannter "sprouts" beobachtet werden konnte und die Insel-, PI- bzw.

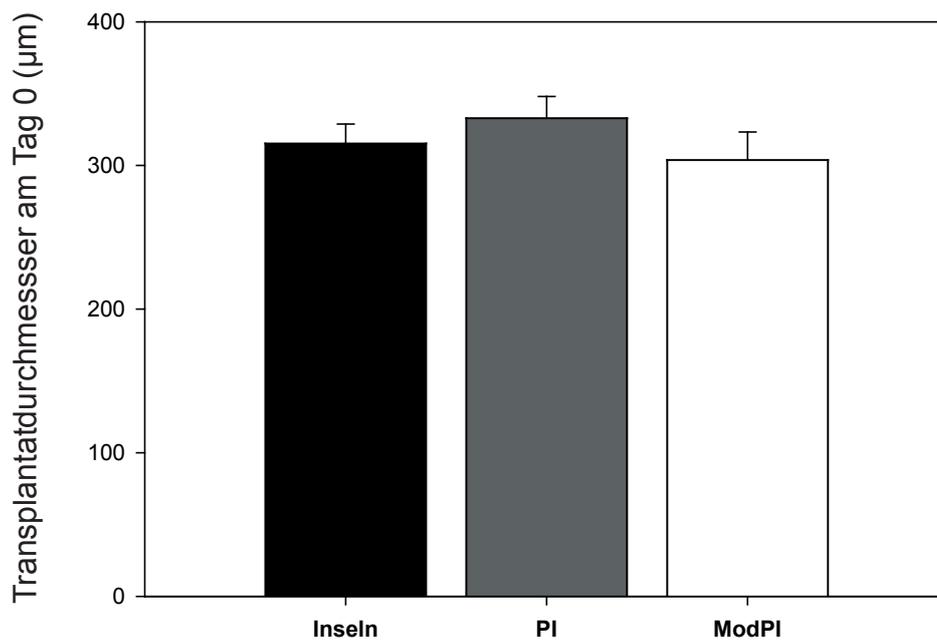


Abb. 14: Durchmesser in μm der drei unterschiedlichen transplantierten Inseln am Tag 0, direkt nach Transplantation in die Rückenhautkammer. Inseln (schwarzer Balken), PI (grauer Balken) und ModPI (weißer Balken) wiesen direkt nach Transplantation nahezu identische Durchmesser auf, ohne signifikante Unterschiede. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

ModPI-Transplantate am Tag 14 wieder vollständig revaskularisiert waren. Tatsächlich konnte, in Übereinstimmung mit vorangehenden Studien, gezeigt werden, dass die hier angewandte enzymatische Aufspaltung pankreatischer Inseln zu Einzelzellen, gefolgt von einer Reaggregation dieser Zellen zu Pseudoinseln, ihre Fähigkeit zur Ausbildung einer intakten insel-spezifischen Mikrovaskulation nicht beeinflusste (Beger et al., 1998).

6.1.2 Revaskularisierte Fläche und funktionelle Kapillardichte

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt (Tag 3, Tag 6, Tag 10 und Tag 14 nach Transplantation) wurde den Tieren retrobulbär ein Gemisch von 0,1ml FITC-Dextran und 0,1ml Rhodamin 6G injiziert woran unmittelbar die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der in die Rückenhautkammer transplantierten Inseln erfolgte. Der zu beobachtende Revaskularisierungsprozess der Insel-Transplantate war durch die Ausbildung kapillärer Knospen und Sprossen ab Tag 3 nach Transplantation charakterisiert, welche von Kapillaren und postkapillären Venolen des quergestreiften Empfänger-Muskelgewebes der Kammerpräparation stammten. Durch Inoskulation dieser neugebildeten Kapillaren mit den Gefäßen des Empfängergewebes kam es zwischen

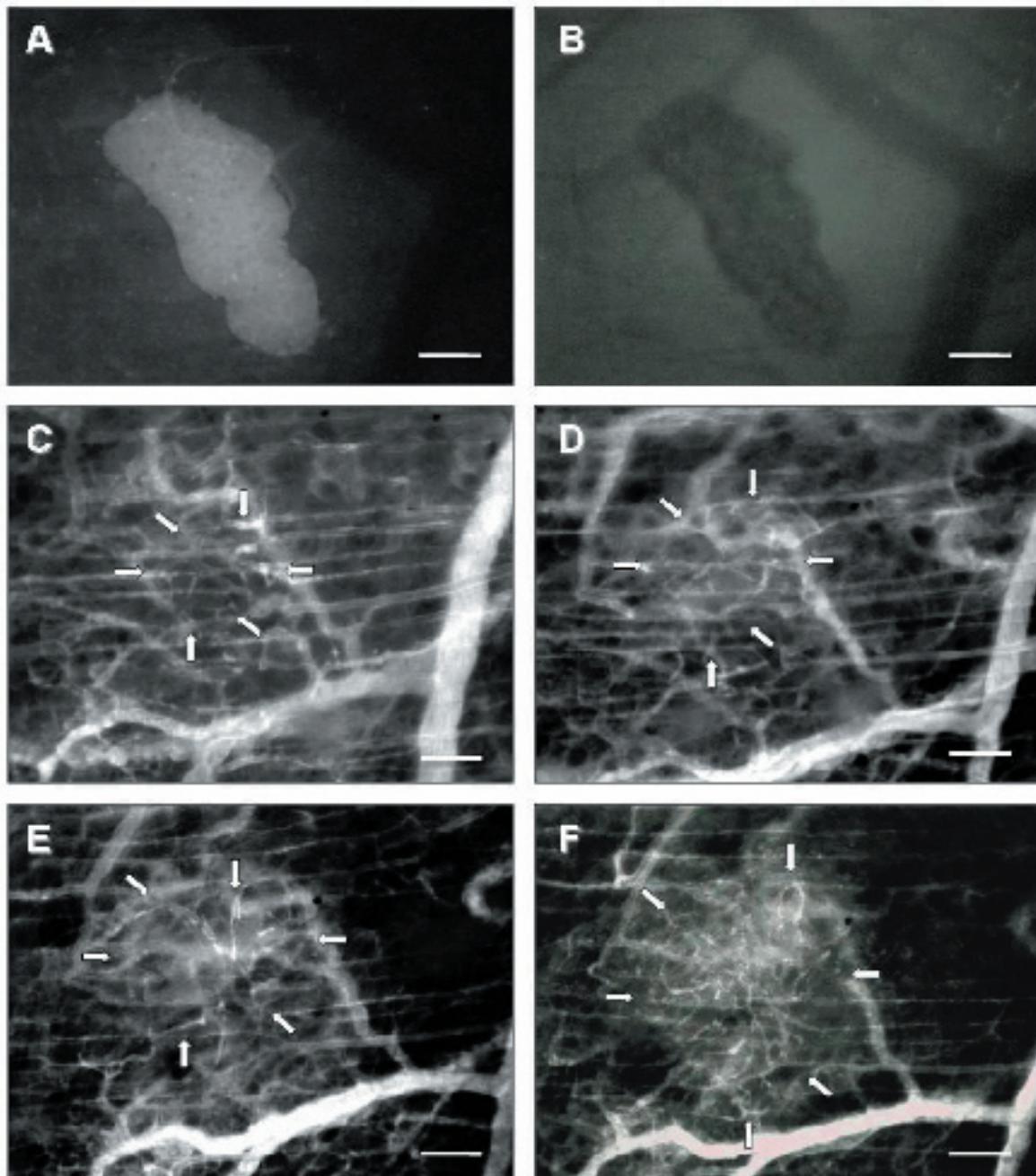


Abb. 15: A-F: Intravitalmikroskopische Aufnahmen einer transplantierten PI in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters über den Verlauf des 14-tägigen Beobachtungszeitraums; **A:** Neutralrot angefärbte PI direkt nach Transplantation in die Rückenhautkammer im Rhodamin-Filter, **B:** die gleiche PI direkt nach Transplantation im FITC-Filter, **C:** nach retrobulbärer Injektion von FITC-Dextran und Rhodamin 6G konnte die einsetzende Angiogenese mit der beginnenden Sprossbildung ab Tag 3 (**C**) und der voranschreitenden Revaskularisierung der Transplantate an den Tagen 6 (**D**) und 10 (**E**), bis zur Vollendung des Gefäßnetzwerks am Tag 14 (**F**) beobachtet werden. Visualisierung durch Blaulicht Epi-Illumination mit Kontrast-Steigerung durch 5% FITC-gelabeltes Dextran 150,000 i.p. Maßstab = 50µm.

den Tagen 6 und 10 zu einer voranschreitenden Angiogenese innerhalb der Transplantate bis letztendlich am Tag 14 nach Transplantation die Vollendung des Glomerulum-artigen Gefäß-

netzwerkes beobachtet werden konnte (Abb. 15 C-F). Dieser Prozess war über den gesamten Versuchsverlauf hinweg vergleichbar in den Gruppen der Inseln und Pseudoinseln, mit $92,3 \pm 9,3$ bzw. $127,0 \pm 4,2 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 3; $230,5 \pm 18,2$ bzw. $270,5 \pm 22,5 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 6; $330,7 \pm 31,9$ bzw. $355,2 \pm 14,2 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 10 und einer endgültigen funktionellen Kapillardichte von $386 \pm 32 \text{ cm/cm}^2$ bzw. $370 \pm 31 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 14, ohne über den gesamten Be-

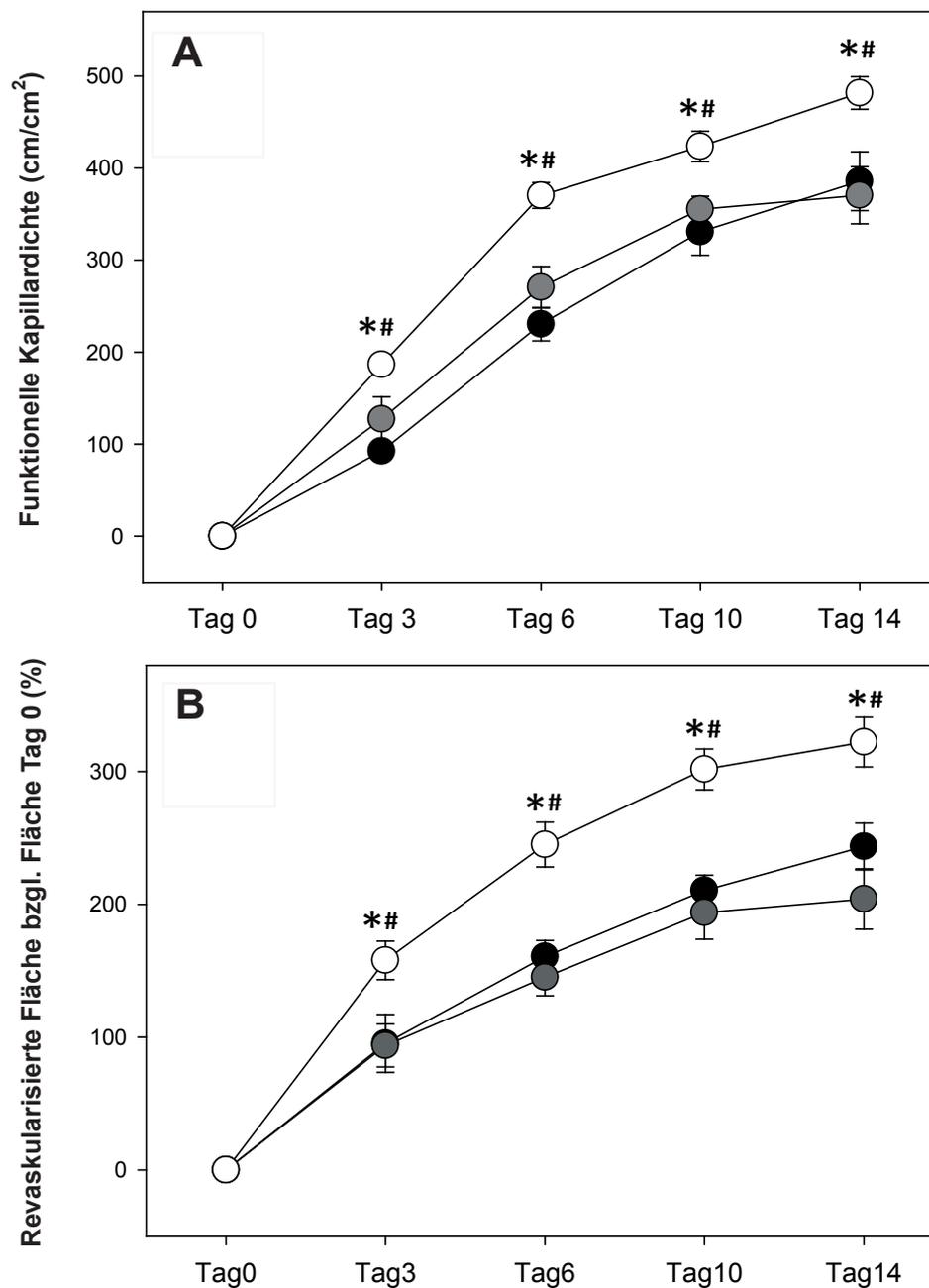


Abb. 16: Funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 (A) und revaskularisierte Fläche in % (B) transplanteder Inseln (schwarze Kreise), Pseudoinseln (dunkelgraue Kreise) und modifizierter Pseudoinseln (weiße Kreise) über den Zeitraum von 14 Tagen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Inseln, # $p < 0,05$ vs. Pseudoinseln.

obachtungszeitraum signifikante Unterschiede zu zeigen (Abb. 16A). Dagegen waren die Messwerte der funktionellen Kapillardichte bei den ModPI während des gesamten Beobachtungszeitraums im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen signifikant erhöht (Tag 3: $186,5 \pm 9,7 \text{ cm/cm}^2$; Tag 6: $370,3 \pm 14,1 \text{ cm/cm}^2$; Tag 10: $423,4 \pm 16,7 \text{ cm/cm}^2$ und Tag 14: $481,6 \pm 17,7 \text{ cm/cm}^2$).

Auch bei Analyse der Revaskularisierten Fläche zeigte die Gruppe der ModPI im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant höhere Messwerte mit $157,8 \pm 14,5\%$ am Tag 3, $245,0 \pm 16,8\%$ am Tag 6, $301,6 \pm 15,4\%$ am Tag 10 sowie $322,2 \pm 18,7\%$ am Tag 14. Im Gegensatz dazu wiesen die Gruppen der Inseln und PI wesentlich geringere Werte von $95,3 \pm 21,8$ bzw. $93,7 \pm 16,2\%$ am Tag 3, $160,6 \pm 12,1$ bzw. $145,1 \pm 14,0\%$ am Tag 6, $210,4 \pm 11,5$ bzw. $193,8 \pm 20,0\%$ am Tag 10 und $243,5 \pm 17,6$ bzw. $204,4 \pm 22,8\%$ am Tag 14 auf. Die nur geringen Unterschiede zwischen den Messwerten von Insel- und PI-Gruppe waren auch hier wiederum nicht signifikant (Abb. 16B). Die Fläche der Revaskularisierung der transplantierten Inseln war am Ende des Beobachtungszeitraums größer als die initiale Inselfläche. Genauer gesagt war die relative Größe der neuentstande-

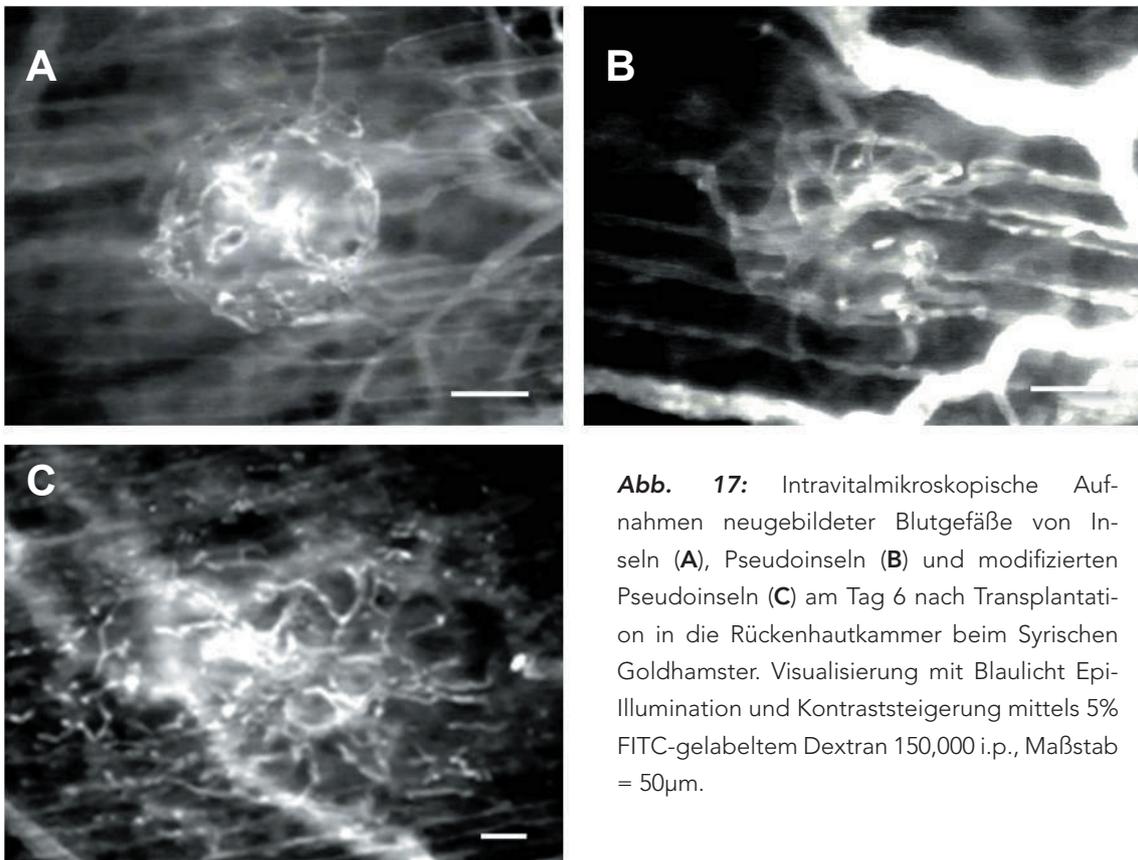


Abb. 17: Intravitalmikroskopische Aufnahmen neugebildeter Blutgefäße von Inseln (A), Pseudoinseln (B) und modifizierten Pseudoinseln (C) am Tag 6 nach Transplantation in die Rückenhautkammer beim Syrischen Goldhamster. Visualisierung mit Blaulicht-Epi-Illumination und Kontraststeigerung mittels 5% FITC-gelabeltem Dextran 150,000 i.p., Maßstab = $50 \mu\text{m}$.

nen mikrovaskulären Netzwerke am Tag 14 verglichen mit der initialen Transplantatfläche von Tag 0 (Abb. 13) bei den Inseln um den Faktor $2,4 \pm 0,2$; bei den PI um den Faktor $2,0 \pm 0,2$ und bei den ModPI sogar um den Faktor $3,2 \pm 0,2$ angestiegen (Abb. 16B), was in etwa den Ergebnissen einer vorangehenden Mikrozirkulationsstudie mit Langerhans-Inseln entsprach (Schramm et al., 2002). Wie schon anhand der Ergebnisse für die funktionelle Kapillardichte und die revaskularisierte Fläche ersichtlich, waren die Unterschiede der Revaskularisierung zwischen den einzelnen Gruppen ab Tag 6 besonders auffällig und waren auf intravitalmikroskopischen Aufnahmen anhand einer größeren revaskularisierten Fläche und eines deutlich dichteren Gefäßnetzwerks mit bloßem Auge zu erkennen (Abb. 17).

6.1.3 Anwachsrate (take rate)

Bei der Beurteilung der Revaskularisierungsparameter ergaben sich für die Transplantate der verschiedenen Gruppen vergleichbare Anwachsrate. Für die Inseln ergab sich ein Wert von 74%; 48 von insgesamt 65 transplantierten Inseln waren angewachsen. Die PI zeigten eine Anwachsrate von 82%, wobei 50 der 61 transplantierten PI angewachsen waren. Bei den ModPI waren insgesamt 52 von 63 transplantierten Inseln angewachsen, was einer minimal höheren Anwachsrate von 83% entsprach. Die Ergebnisse für die Anwachsrate der unterschiedlichen

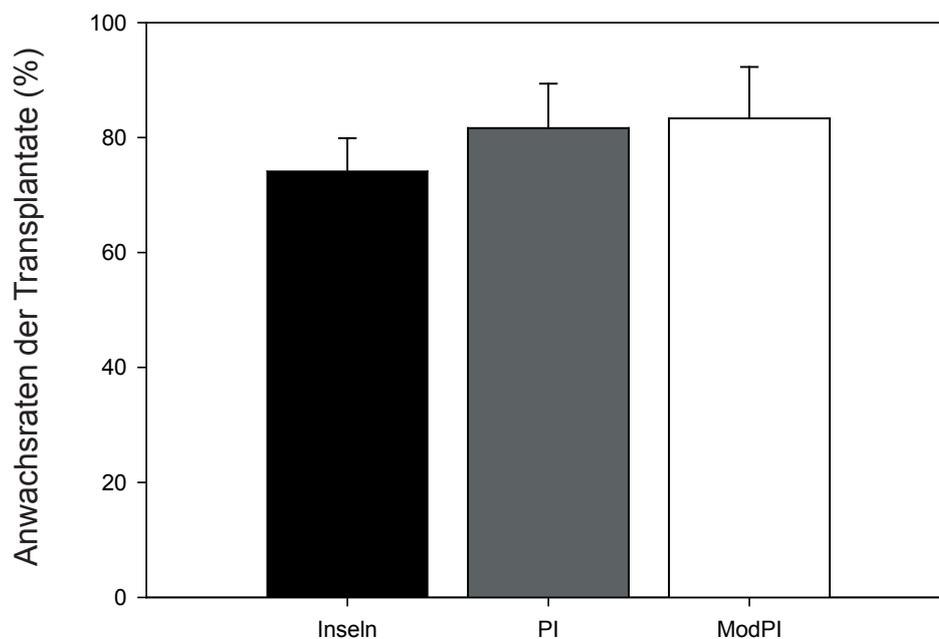


Abb. 18: Anwachsrate der Transplantate in Prozent (%). Inseln (schwarzer Balken), Pseudoinseln (grauer Balken) und modifizierte Pseudoinseln (weißer Balken) wiesen mit rund 80 Prozent vergleichbare Anwachsrate ohne signifikante Unterschiede auf. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Gruppen fielen demnach sehr ähnlich aus und zeigten auch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18).

6.1.4 Mikrohämodynamische Parameter

6.1.4.1. Gefäßdurchmesser

Die Analyse mikrohämodynamischer Parameter zeigte, dass die Durchmesser neugebildeter Gefäße in den ModPI im Vergleich zu den Inseln und PI über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant größer waren (Tab. 4) (Abb. 19).

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Inseln	6,3 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,3	6,6 ± 0,3
PI	7,1 ± 0,2*	7,2 ± 0,2	7,2 ± 0,1	7,2 ± 0,1
ModPI	7,5 ± 0,2*	7,9 ± 0,1*#	8,0 ± 0,1*#	7,9 ± 0,2*#

Tab. 4: Durchmesser (μm) neugebildeter Mikrogefäße innerhalb der revaskularisierten Inseln, Pseudoinseln und modifizierten Pseudoinseln am Tag 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer beim Syrischen Goldhamster. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * $p < 0,05$ vs. Inseln, # $p < 0,05$ vs. Pseudoinseln.

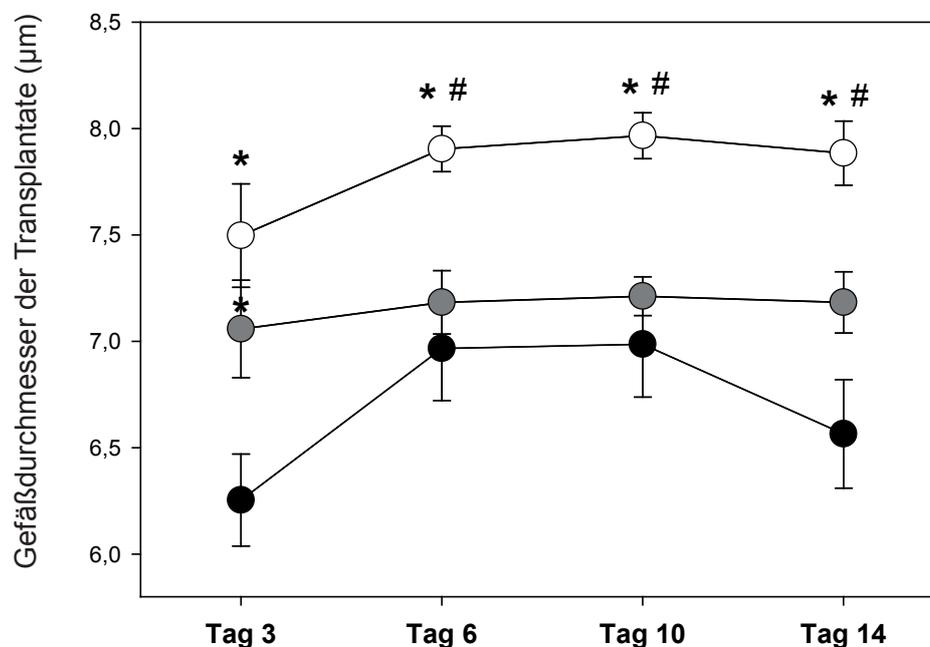


Abb. 19: Entwicklung der Gefäßdurchmesser der unterschiedlichen Gruppen über den gesamten Verlauf des 14-tägigen Beobachtungszeitraums. Die modifizierten PI (weiße Kreise) wiesen an allen Tagen signifikant erhöhte Gefäßdurchmesser auf, verglichen mit den Inseln (schwarze Kreise) und den Pseudoinseln (graue Kreise). Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * $p < 0,05$ vs. Inseln, # $p < 0,05$ vs. Pseudoinseln.

6.1.4.2 Blutzellgeschwindigkeit

Neben den signifikant vergrößerten Gefäßdurchmessern wiesen die ModPI eine signifikant erhöhte Geschwindigkeit der roten Blutkörperchen (V_{RBC}) von nahezu $140\mu\text{m/s}$ am Tag 3 nach Transplantation auf, verglichen mit den normalen Inseln ($92\mu\text{m/s}$) (Tab. 4 und Abb. 20). Hierbei war die Blutzellgeschwindigkeit innerhalb der Gefäße der PI derjenigen der ModPI vergleichbar,

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Inseln	$92,4 \pm 5,9$	$134,0 \pm 15,7$	$155,0 \pm 20,7$	$132,0 \pm 17,8$
PI	$140,0 \pm 21,5$	$155,0 \pm 22,1$	$140,0 \pm 16,2$	$147,0 \pm 17,5$
ModPI	$136,0 \pm 15,9^*$	$159,0 \pm 15,2$	$138,0 \pm 20,0$	$133,0 \pm 17,2$

Tab. 5: Fließgeschwindigkeit (Velocity) der roten Blutkörperchen ($\mu\text{m/s}$) innerhalb der neugebildeten Blutgefäße von Inseln, PI und ModPI am Tag 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer beim Syrischen Goldhamster. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * $p < 0,05$ vs. Inseln.

zeigte allerdings zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied gegenüber den Inseln. Am Tag 14 waren die Werte der Blutzellgeschwindigkeit aller Gruppen nahezu identisch (Abb. 20).

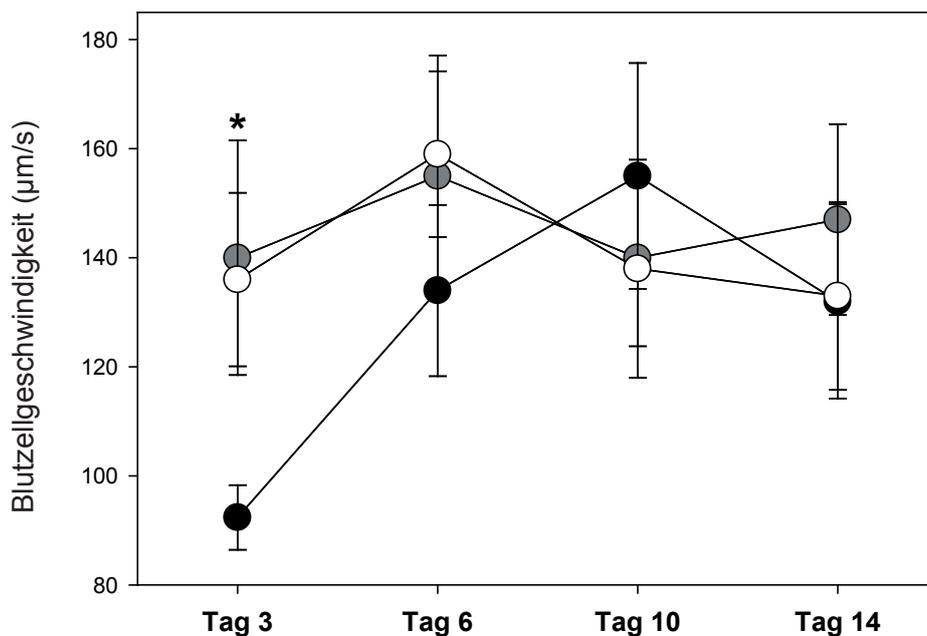


Abb. 20: Blutzellgeschwindigkeit der unterschiedlichen Gruppen im Verlauf des 14 tägigen Beobachtungszeitraums. Pseudoinseln (graue Kreise) und ModPI (weiße Kreise) zeigten schon zu Beginn vergleichbare Werte, im Gegensatz zu den normalen Langerhans-Inseln (schwarze Kreise), bei welchen die Geschwindigkeit erst im Lauf der Zeit zunahm. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, * $p < 0,05$ vs. Inseln.

6.1.4.3 Volumenfluss

Dementsprechend waren die Werte für den aus Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit ermittelten Volumenfluss sowohl bei den PI, als auch bei den ModPI am Tag 3 gegenüber den Langerhans-Inseln signifikant höher (Tab. 5 und Abb. 21).

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Inseln	2,2 ± 0,2	4,1 ± 0,7	4,8 ± 0,9	3,6 ± 0,8
PI	4,3 ± 0,7*	4,9 ± 0,8	4,4 ± 0,6	4,6 ± 0,6
ModPI	4,6 ± 0,5*	6,0 ± 0,6	5,4 ± 0,8	5,1 ± 0,7

Tab. 6: Der Volumenfluss (pl/s) innerhalb der neugebildeten Blutgefäße von Inseln, Pseudoinseln und modifizierten Pseudoinseln am Tag 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer beim Syrischen Goldhamster. Alle Werte werden als Mittelwert ± SEM angegeben, *p < 0,05 vs. Inseln.

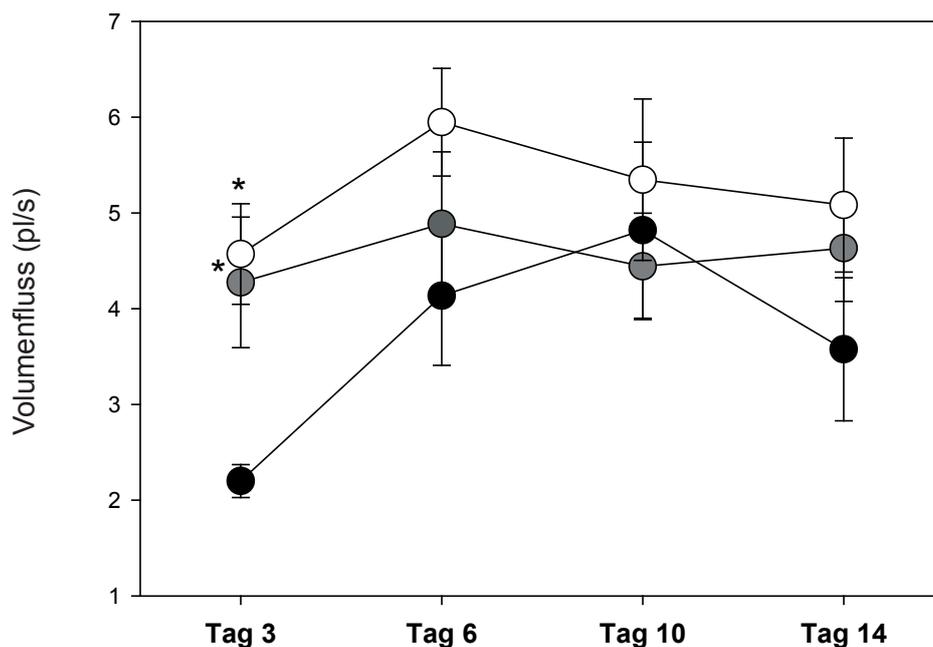


Abb. 21: Der Volumenfluss war bei den modifizierten Pseudoinseln (weiße Kreise) sowie den Pseudoinseln (graue Kreise) am Tag 3 gegenüber den Langerhans-Inseln (schwarze Kreise) signifikant höher. Auch an den Folgetagen war der Volumenfluss in der Gruppe der ModPI am höchsten. Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt, *p < 0,05 vs. Inseln.

Auch an den Folgetagen erreichten die ModPI die höchsten Werte für den Volumenfluss, wohingegen die Werte bei den PI über den gesamten Verlauf, abgesehen von kleineren Schwankungen, unverändert blieben. Den größten Zuwachs zwischen Tag 3 und 10 erreichten die

Langerhans-Inseln mit rund 120%, gefolgt von einer leichten Abnahme zwischen den Tagen 10 und 14. All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Verbindung von Knochenmarkszellen und Inselzellen zu sogenannten ModPI nicht nur eine verbesserte Revaskularisierung nach Transplantation bewirkt, sondern darüber hinaus auch für eine verbesserte Blutzirkulation innerhalb der Transplantate sorgt.

6.2 Ergebnisse der *in vitro* Versuche

6.2.1 FACS-Analyse

Die Untersuchung der Knochenmarkszellen auf Stammzell- bzw. Progenitorzellmarker, als auch auf Marker für Zellen mit endotheliale Charakter, erbrachte folgende Ergebnisse:

Die Antikörperfärbungen auf bestimmte Oberflächenantigene der Knochenmarkszellen unterschiedlicher Kultivierungspassagen erfolgten mindestens als Zweifachbestimmung. Hierbei zeigten sowohl frisch isolierte Zellen, als auch Zellen höherer Passagen (P11 und P22) keine Reaktion auf spezifische Antikörperfärbungen gegen die Oberflächenmarker CD31, CD34 und CD45 (nicht gezeigt).

Die Färbung gegen CD73 erbrachte bei den frisch isolierten Zellen schwach positive Signale zwischen 4-8% aller Zellen, wohingegen die Zellen höherer Passagen komplett negativ waren. Bei CD105 war das Verhältnis umgekehrt; hier waren frisch isolierte Zellen negativ und Zellen höherer Passagen mit bis zu 6% schwach positiv (Abb. 22). Die Antikörperfärbung gegen das für HSCs spezifische Oberflächenantigen CD117 (c-Kit) fiel bei frischen KMZ mit 1-3% schwach positiv aus und bei den höheren Passagen wiederum negativ (nicht gezeigt).

Der für HSCs, ESCs sowie Stamm- und Progenitorzellen im Allgemeinen spezifische Oberflächenmarker CD133 zeigte eine Färbung von 14-75% aller Zellen. Im Gegensatz dazu waren auch hier Zellen aus höheren Passagen durchweg negativ für CD133 (Abb. 22). Die Färbungen gegen CD184 (CXCR-4) zeigte einen deutlichen Abfall positiver Zellen zwischen der Passage 0 mit rund 30% aller Zellen auf einen Wert von nur noch rund 14% bei Passage 11. Auch die Endothelzell-spezifischen Oberflächenantigene vWF und eNOS nahmen mit weiterer Kultivierung der Zellen stark ab. Bei vWF fiel der Ausgangswert von 18% auf rund 8% aller Zellen bei Passage 11 ab. Die Messwerte für e-NOS fielen von einem anfänglichen Wert von nahezu 70% (68%) aller Zellen auf nur noch 4% in der Passage 11 ab (Abb. 22).

Tie-2, ein Marker für endotheliale Progenitorzellen und reife Endothelzellen zeigte anfänglich eine schwach positive Expression auf frischen KMZ, wohingegen er auf Zellen der Passage 11 und höher fast nicht mehr beobachtet werden konnte (Abb. 22).

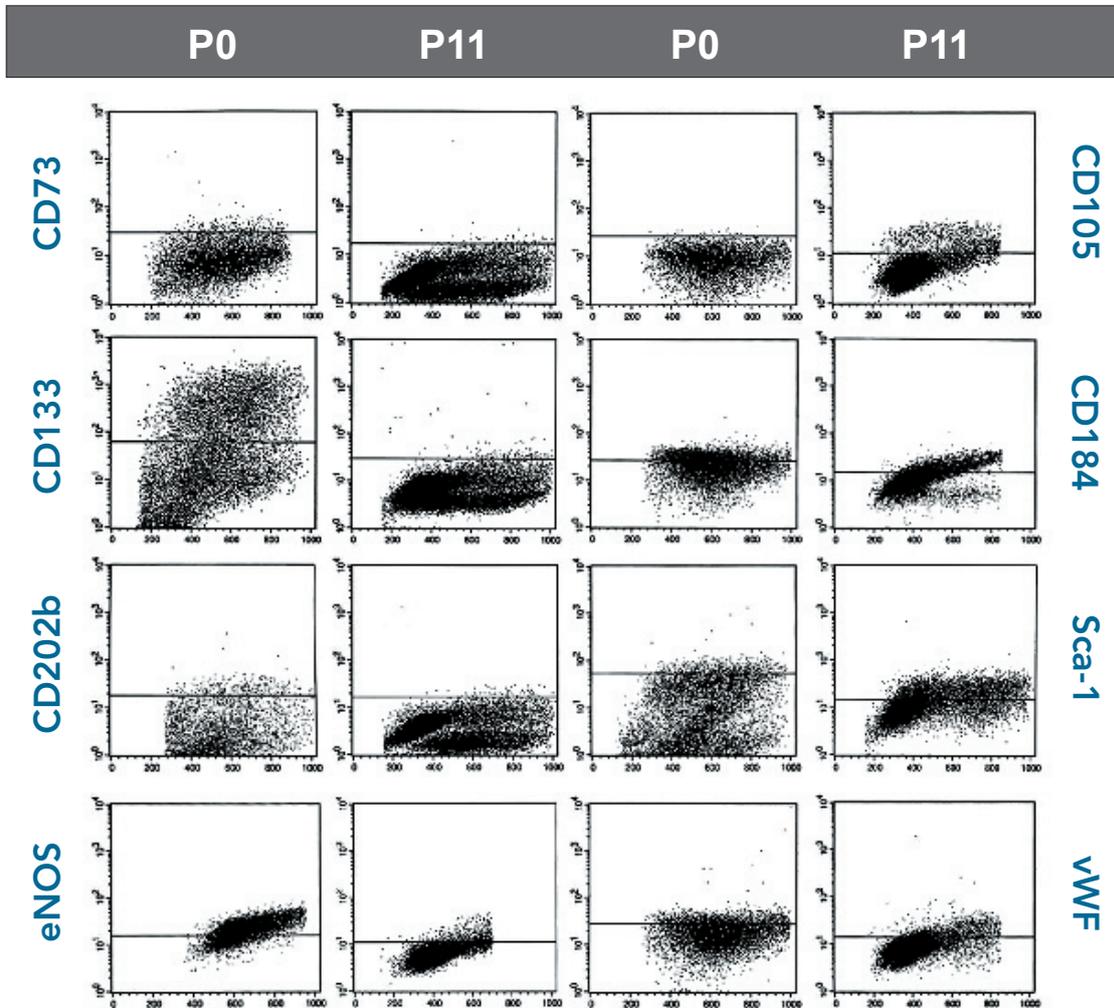


Abb. 22: Dot-Blot-Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse von KMZ der Passage 0 und 11 auf die Endothelzell-, Stammzell- und endothelialen Vorläuferzell-Marker CD73, CD105, CD133, CD184 (CXCR-4), CD202b (Tie-2), Sca-1, eNOS und vWF. Die Schranke für ein positives Signal der Zellen wurde für jeden Marker individuell anhand der entsprechenden IgG-Kontrolle gewählt. x-Achse = FSC, y-Achse = FL1 bzw. FL2.

Zu guter Letzt wurde die Expression der Kombination von Sca-1 mit VEGFR-2 untersucht und zeigte bei frischen Zellen ein sehr schwaches Signal von unter 0,5%, wohingegen bei älteren KMZ ein leicht positives Signal zwischen 0,5-1,0% aller Zellen zu beobachten war (nicht gezeigt). Betrachtete man jedoch nur die Sca-1 Expression für sich alleine, so zeigte sich deutlich, dass frisch isolierte Zellen mit 1-5% eine wesentlich schwächere Expression des Oberflächenantigens aufwiesen, als Zellen der höheren Passagen mit Werten zwischen 18-41% aller gemessenen Zellen. VEGFR-2 alleine betrachtet zeigte dagegen weder bei frischen noch älteren

Zellen ein positives Signal (nicht gezeigt). Die Zahl von nahezu einem Prozent bei den höheren Passagen an Zellen, die sowohl positiv auf Sca-1 als auch auf VGFR-2 reagierten, zeigt, dass hier eine relativ große Anzahl pro-angiogener Zellen vorhanden ist (Pöss et al., 2010). Bei einer Zahl von 1×10^6 Knochenmarkszellen hätten zwischen 5.000-10.000 Zellen pro-angiogene Kapazität und somit die Möglichkeit zu der Neubildung von Blutgefäßen beizutragen. Geht man nun davon aus, dass eine mittelgroße Insel aus etwa 1000-2000 Zellen besteht, so sind im Fall der ModPI innerhalb jedes Inseläquivalentes 5-10 der potentiellen pro-angiogenen Zellen (PAC) enthalten.

6.2.2 Immunhistochemie

6.2.2.1 Insulin in RHK-Präparaten

Histologische Schnitte von Rückenhautkammerpräparationen der Insel-, PI- und ModPI-Gruppe wurden einer immunhistochemischen anti-Insulin-Färbung unterzogen. Hierfür wurden diese mit einem polyklonalen Meerschweinchen-anti-Insulin Primärantikörper (guinea pig anti insulin, 1:100, Abcam, Cambridge, UK) gefärbt, gefolgt von einer Inkubation mit einem Per-

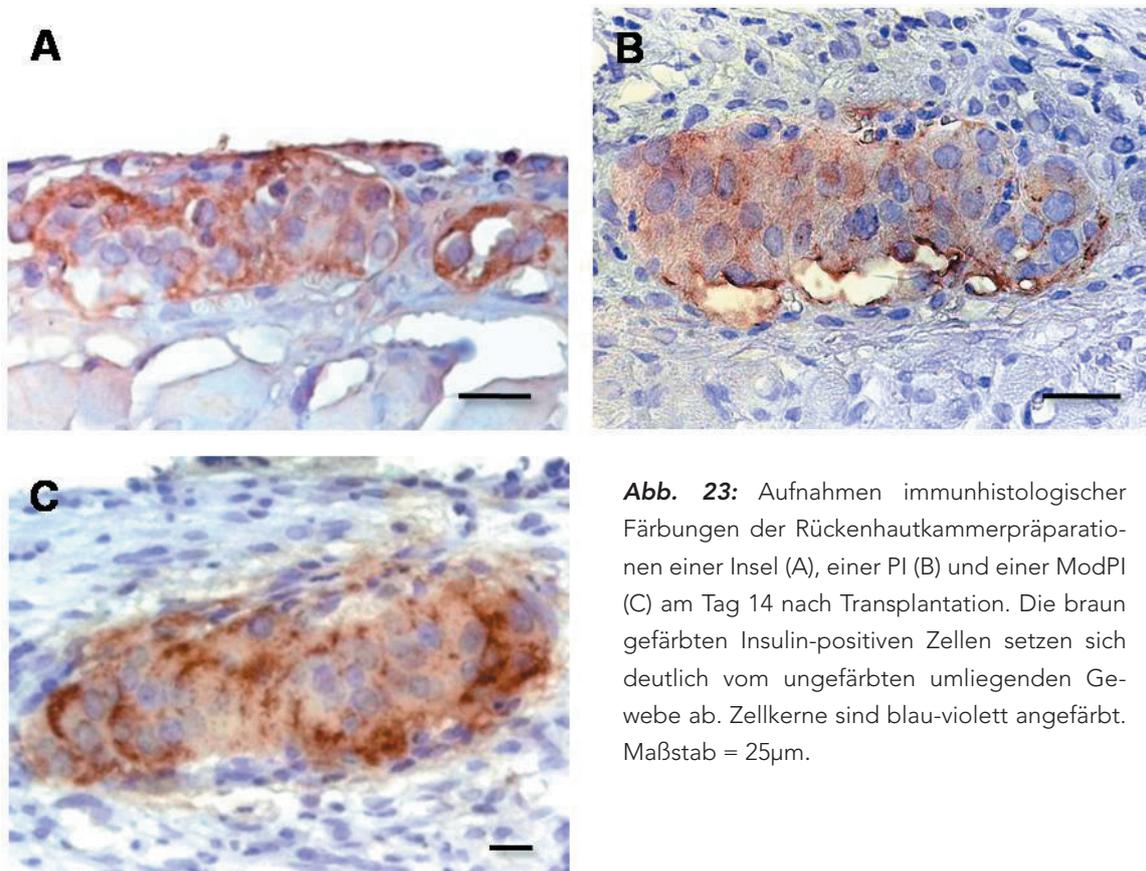


Abb. 23: Aufnahmen immunhistologischer Färbungen der Rückenhautkammerpräparationen einer Insel (A), einer PI (B) und einer ModPI (C) am Tag 14 nach Transplantation. Die braun gefärbten Insulin-positiven Zellen setzen sich deutlich vom ungefärbten umliegenden Gewebe ab. Zellkerne sind blau-violett angefärbt. Maßstab = 25µm.

oxidase-konjugierten Ziege-anti-Meerschweinchen Sekundärantikörper (1:500, goat anti-guinea pig IgG Jackson, Missouri, USA). Die Visualisierung erfolgte durch anschließende Inkubation mit DAB, welches an die Peroxidase des Sekundärantikörpers ankoppelte.

Der immunhistochemische Nachweis von Insulin in den Rückenhautkammerpräparationen von Tag 14 nach Transplantation zeigte, dass die revaskularisierten Inseln, PI und ModPI über eine vergleichbare Anzahl von insulinproduzierenden Zellen verfügen (Abb. 23A-C). Wie stark die Insulinproduktion der einzelnen β -Zellen innerhalb der verschiedenen Inseltypen allerdings ausfiel konnte anhand der Immunhistochemie nicht bestimmt werden.

6.2.2.2 Pankreatische Hormone in eingebetteten Präparaten

Isolierte, nicht-transplantierte Inseln, PI und ModPI wurden immunhistochemisch mit einem polyklonalen mouse anti-Glukagon Antikörper gefärbt (1:100; Biomol) und durch nachfolgende Inkubation mit einem sekundären Peroxidase-konjugierten goat anti-mouse IgG (1:500, Jackson) markiert. Zusätzlich wurden Proben jeder Gruppe sowohl mit einem primären guinea pig anti-Insulin Antikörper, als auch mit einem primären rabbit anti-Somatostatin Antikörper gefärbt. Die anschließende Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-gelabelter Sekundär-Antikörper (donkey anti-guinea pig IgG, bzw. goat anti-rabbit IgG) durch die Reaktion des POD mit 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Inseln aller drei Gruppen produzierten sowohl Glukagon und Insulin als auch Somatostatin ohne substantielle Unterschiede zwischen den Gruppen. Wie bereits in einer Studie von Cavallari et al. aus dem Jahr 2007 konnte anhand der immunhistologisch gefärbten Präparate gezeigt werden, dass die zelluläre Komposition und die Architektur von Inseln und Pseudoinselfn nahezu identisch war (Cavallari et al., 2007). Darüber hinaus wiesen die ModPI eine den Inseln und PI sehr ähnliche Verteilung der Hormonproduzierenden Zellen auf. (Abb. 24A-I).

Die periphere Anordnung der Glukagon-positiven Zellen in den Langerhans-Inselfn war hierbei typisch für Nager-Inselfn (Brissova et al., 2004) (Abb. 24A), wohingegen die Glukagon-positiven Zellen in den Pseudoinselfn und den modifizierten Pseudoinselfn über das gesamte Zellaggregat verstreut lagen (Abb. 24B und C). Insulin-positiven Zellen waren ebenfalls in allen drei Gruppen über die gesamte Insel verstreut (Abb. 24D-F). Proben aller drei Gruppen enthielten überdies wenige vereinzelt gelegene Somatostatin-positive Zellen (Abb. 24G-I).

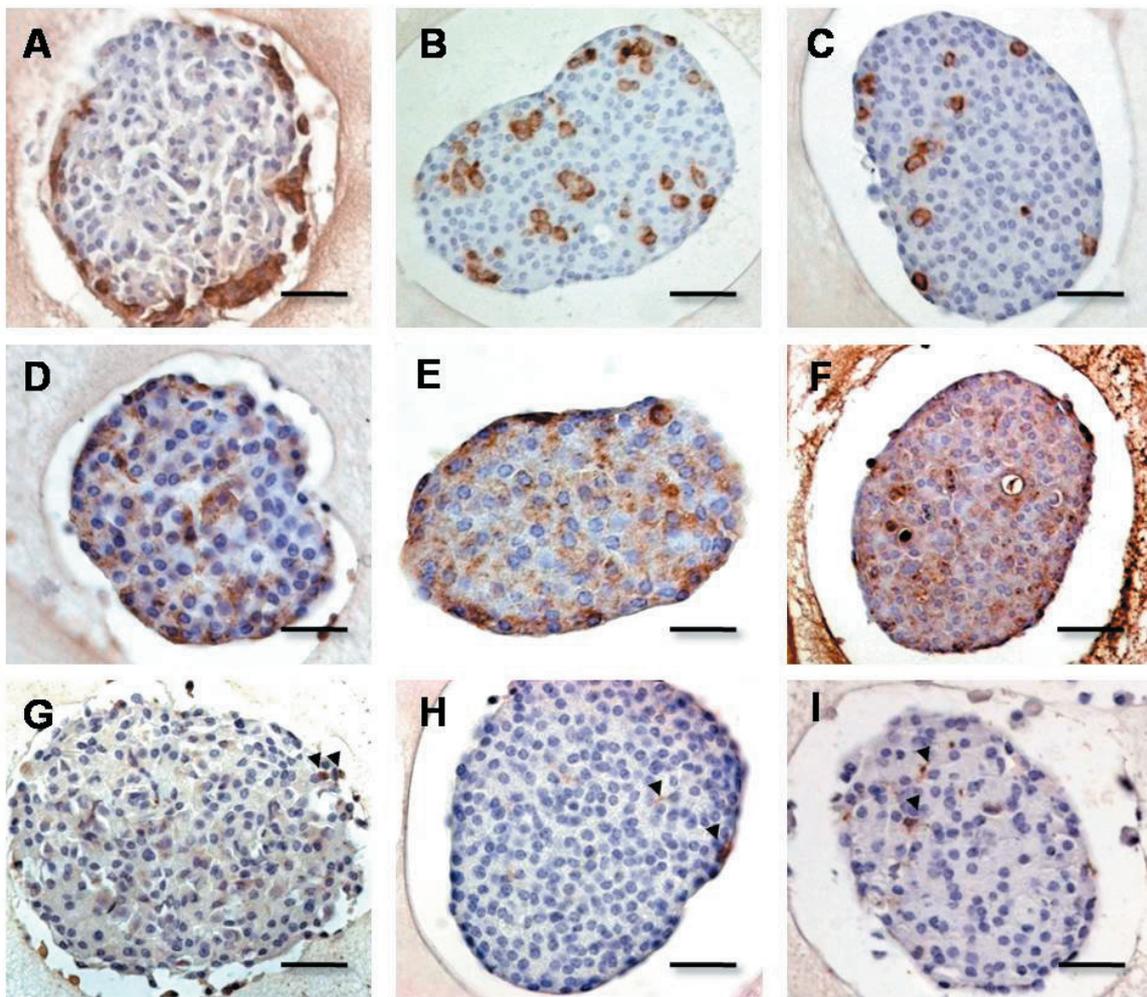


Abb. 24: Immunhistologische Bilder isolierter, nicht-transplantierter Inseln (**A, D, G**), PI (**B, E, H**) und ModPI (**C, F, I**) gefärbt mit einem polyklonalen mouse anti-Glukagon Antikörper (**A-C**). Darüber hinaus wurden Proben jeder Gruppe sowohl mit einem primären guinea pig anti-Insulin Antikörper (**D-F**) und einem primären rabbit anti-Somatostatin Antikörper gefärbt (**G-I**). Pankreashormon-positive Zellen erscheinen hell- bis dunkelbraun, Zellkerne sind blau bis violett. Schwarze Pfeilspitzen weisen auf vereinzelte Somatostatin-positive Zellen. (**G-I**). Maßstab = 50 μ m.

6.2.3 Ergebnisse der Western-Blot Analyse

6.2.3.1 Insulingehalt der Inseln, PI und ModPI

Um eine quantitative Aussage über den intrazellulären Insulingehalt pankreatischer Inseln, PI und ModPI (alle am Tag 5 fixiert) machen zu können, wurden pro Gruppe jeweils drei unabhängig voneinander isolierte Proben im Western-Blot aufgetragen (Abb. 25). Hierfür wurden pro Ansatz 5 μ g Protein-Lysat in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die erhaltenen Banden wurden in der Kammer der GelDoc-Station (GelDoc™XR, BioRad, München, Deutschland) digital photogra-

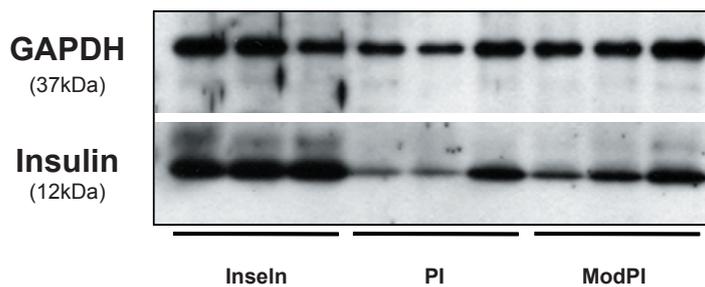


Abb. 25: Western-Blot-Analyse von Inseln am Tag 5 (Banden 1-3), PI (Banden 4-6) und ModPI (Banden 7-9). Alle Zelltypen exprimierten das Insulinprotein (12kDa) sowie das Haushaltsprotein GAPDH (37kDa).

fiert und mit Hilfe der Auswertesoftware Quantity-One 1-D Analysis Software ausgewertet. Die gemessenen Werte wurden anschließend gemittelt und graphisch als Mittelwert \pm SEM dargestellt (Abb. 26). Bei Betrachtung der reinen Messwerte für das Insulin-Protein wurden die höchsten Werte in der Gruppe der Langerhans-Inseln mit $14,3 \pm 3,3$ ($\text{OD} \cdot \text{mm}^2$) erzielt, was, verglichen mit den Werten der PI mit $6,2 \pm 2,5$ ($\text{OD} \cdot \text{mm}^2$) und den ModPI mit $7,5 \pm 1,3$ ($\text{OD} \cdot \text{mm}^2$) in etwa der doppelten mittleren Insulin-Menge entsprach (Abb. 25 und 26). Die zwischen den Gruppen gemessenen Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (Abb. 26).

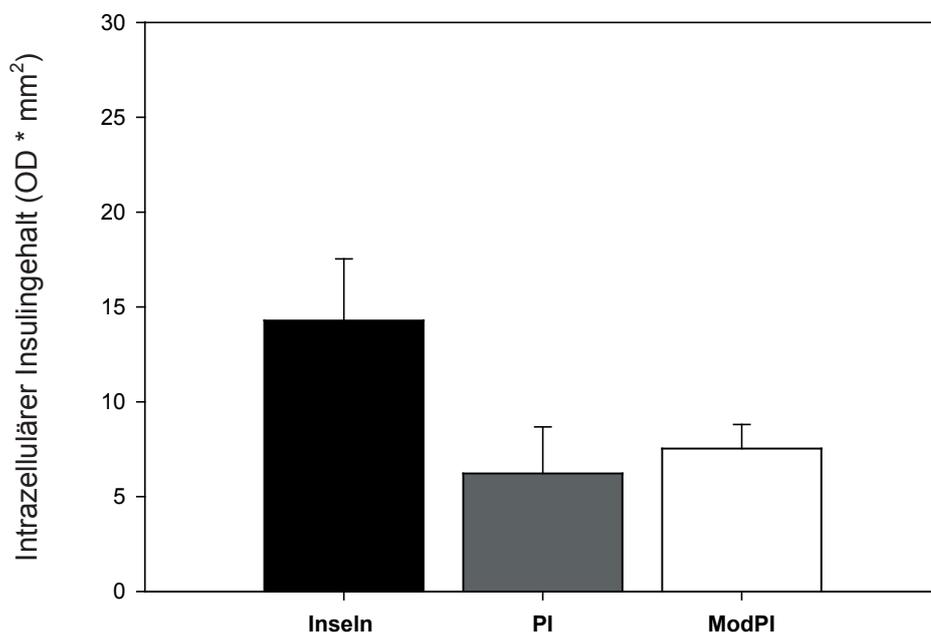


Abb. 26: Intrazellulärer Insulingehalt ermittelt mit Hilfe der Western-Blot-Analyse. Der Vergleich von Inseln Tag 5 (schwarzer Balken) mit PI (grauer Balken) und ModPI (weißer Balken) ergab für die Langerhans-Inseln etwa doppelt so hohe Werte für intrazelluläres Insulin-Protein. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Nach Abgleich der gemessenen Werte mit denen der GAPDH-Protein-Banden änderten sich die zuvor erhaltenen Proportionen der intrazellulären Insulinlevel zwischen den einzelnen Gruppen leicht ab. Die Inseln erreichten nun einen Wert von $20,1 \pm 6,6$ ($\text{OD} \cdot \text{mm}^2$). Der Insulingehalt

innerhalb der PI stieg jetzt auf einen Werte von $14,5 \pm 3,0$ ($\text{OD} * \text{mm}^2$) an und überstieg damit sogar die Werte der ModPI mit $12,2 \pm 1,1$ ($\text{OD} * \text{mm}^2$). Aber auch hier war der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant (Abb. 27). Die Insel-Gruppe erreichte jetzt nur noch 1,4 bzw. 1,6 mal so hohe Werte wie die PI-, bzw. ModPI-Gruppe für intrazelluläres Insulin.

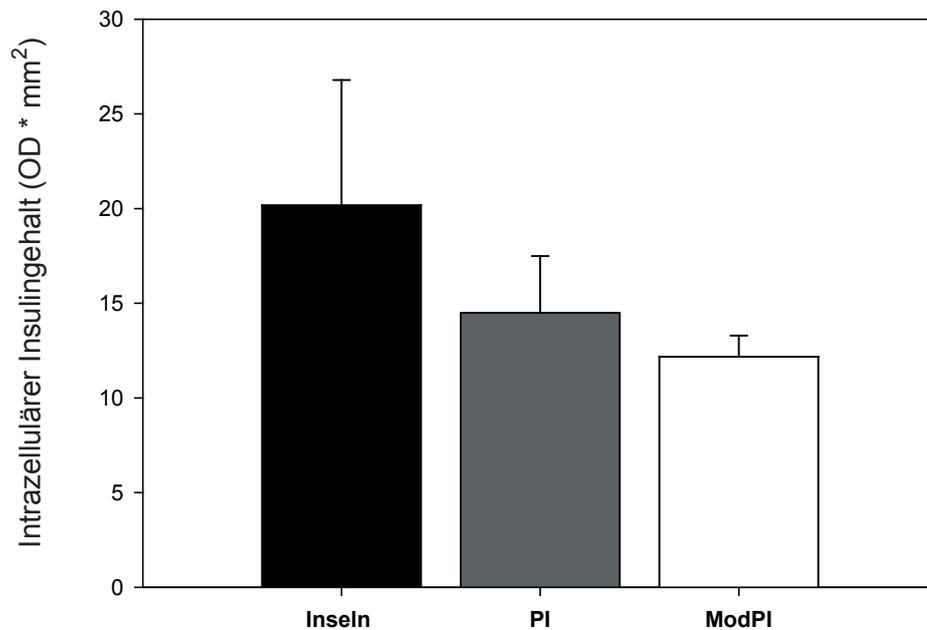


Abb. 27: Daten der Western-Blot Analyse nach Abgleich mit dem Housekeeping-Protein GAPDH: Vergleich von Inseln Tag 5 (schwarzer Balken) mit PI (dunkelgrauer Balken) und ModPI (weißer Balken) ergab für die Langerhans-Inseln 1,4 bzw. 1,6 mal so hohe Werte für intrazelluläres Insulin. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Für die quantitative Bestimmung des intrazellulären Insulingehaltes von Langerhans-Inseln im Zeitverlauf wurden in einem weiteren Versuch Einzelproben isolierter Langerhans-Inseln entweder direkt oder nach 1, 3 und 5 Tagen Kultivierung in DMEM-Medium mit 10% FCS in Lysispuffer fixiert. Nach Vorbereitung der Proben für die Western-Blot-Analyse wurden diese nebeneinander auf einem Gel aufgetragen und anschließend der Insulingehalt bestimmt, wobei GAPDH wieder als Standard verwendet wurde. Die erhaltenen Insulinbanden wurden auch in diesem Fall mit den Werten der GAPDH-Banden verrechnet.

6.2.3.2 Insulingehalt der Inseln im Zeitverlauf

Die Gegenüberstellung der Einzelproben der unterschiedlichen Kultivierungsstadien zeigte, dass die Langerhans-Inseln direkt am Tag der Isolierung den niedrigsten intrazellulären Insulingehalt von $14,0$ ($\text{OD} * \text{mm}^2$) hatten (Abb. 28). Mit voranschreitender Kultivierung nahm die

Insulinmenge zu. Ab Tag 1 nach Isolierung war der intrazelluläre Insulingehalt auf einen Wert von rund 20,0 ($OD \cdot mm^2$) gestiegen. Den höchsten intrazellulären Insulinlevel zeigten drei Tage kultivierte Inseln mit einem Wert von nahezu 25,0 ($OD \cdot mm^2$). Ab Tag 3 wirkte sich eine weitere Kultivierung der Langerhans-Inseln jedoch eher negativ auf das intrazellulär akkumulierte Insulin aus. Am Tag 5 war der Wert auf 14,0 ($OD \cdot mm^2$) gefallen, was dem Insulingehalt der Inseln am Tag der Isolierung entsprach (Abb. 28 und 29).

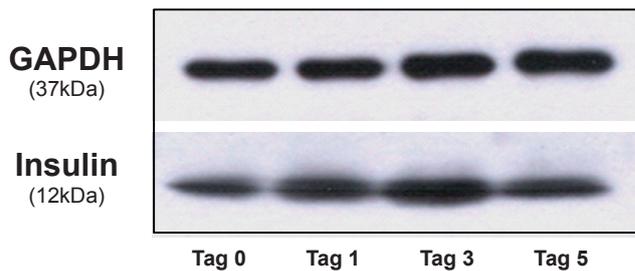


Abb. 28: Western-Blot Analyse von Langerhans-Inseln im Zeitverlauf. Die Fixierung der Einzel-Proben erfolgte an den Tagen 0, 1, 3 und 5 nach Isolierung. Die Proben aller Isolierungszeitpunkte exprimierten das Insulinprotein (12kDa) sowie das Haushalts-Protein GAPDH (37kDa).

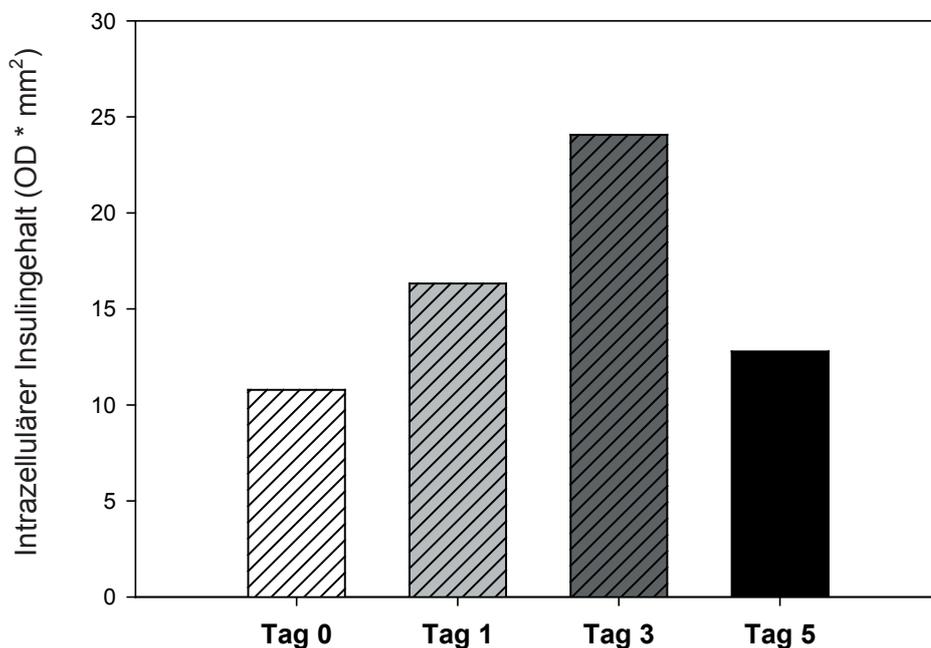


Abb. 29: Daten der Western-Blot-Analyse von Einzelproben der Inseln am Tag 0 (weiß/gesteift), Tag 1 (hellgrau/gestreift), Tag 3 (dunkelgrau/gestreift) und Tag 5 (schwarz) nach Isolierung nach Abgleich mit dem Housekeeping-Protein GAPDH. Die graphische Darstellung der in der Western-Blot-Analyse erhaltenen Werte zeigte, dass zwischen den Inseln unterschiedlicher Isolierungszeitpunkte verschiedene Expressionsmuster für intrazelluläres Insulin zu finden waren.

6.2.4 Glukosestimulations-Test und ELISA

Zum Vergleich der Insulinsekretion der drei verschiedenen Gruppen wurden wieder Langerhans-Inseln verwendet, die 5 Tage kultiviert wurden. Weiterhin untersuchten wir die Insulinsekretion in vitro kultivierter Langerhans'scher Inseln im Zeitverlauf anhand des Vergleichs von Proben der Tage 0, 1, 3 und 5 nach Isolierung. Der Vergleich von Inseln unterschiedlichen Kultivierungsalters zeigte, dass Inseln am Tag 0, also direkt nach Isolierung, auch nach Stimulierung mit Mittel- und Hoch-Glukose-haltigem Medium (25 und 50mmol/l), nicht in der Lage waren Insulin zu produzieren (Abb. 30A).

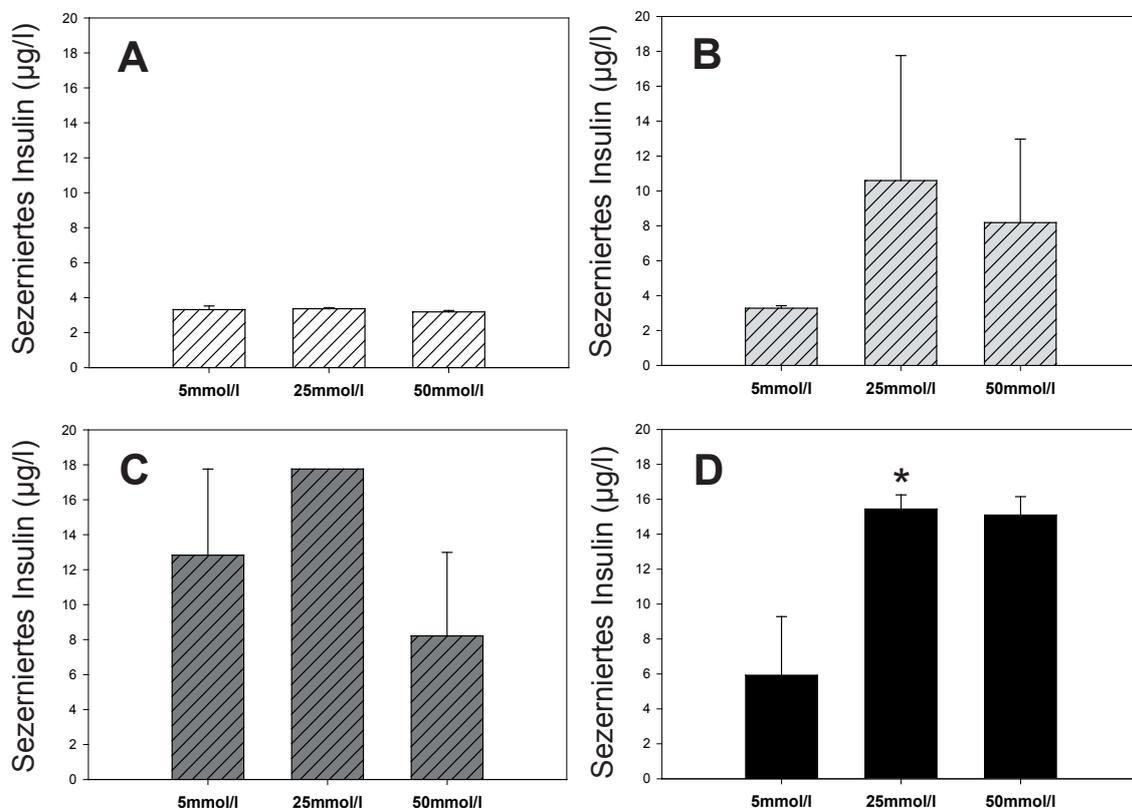


Abb. 30: Analyse des sezernierten Insulins nach Inkubation mit 5mmol/l Glukose, 25mmol/l Glukose und 50mmol/l Glukose von Inseln am Tag 0 (weiß-gestreift) (A), Tag 1 (hellgrau-gestreift) (B), Tag 3 (dunkelgrau-gestreift) (C) und Tag 5 (schwarz) (D) nach Isolierung. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. 5mmol/l Glukose (low-glucose).

Nach einem Tag Kultivierung in DMEM (10% FCS, P/S) hatten sich die Inseln wieder soweit erholt, dass sie nach der einstündigen Stimulierung mit 25mmol/l Glukose im Vergleich zur Basalrate von 3µg/l das nahezu Vierfache an Insulin (11µg/l) sezernierten (Abb. 30B). Während der nachfolgenden Stimulation mit der höchsten Glukosekonzentration von 50mmol/l, fiel der Insulingehalt im Überstand wieder zurück auf 8µg/l, was allerdings immer noch dem beinahe

Dreifachen der Basalrate entsprach. Drei Tage alte Inseln (Abb. 30C) zeigten mit fast $13\mu\text{g/l}$ Insulin die höchste Basalrate ohne Stimulierung im Niedrig-Glukose Medium (5mmol/l). Die Konzentration an sezerniertem Insulin stieg bei Stimulation mit 25mmol/l Glukose auf $18\mu\text{g/l}$; fiel jedoch bei stärkerer Stimulierung mit Hochglukose auf einen Wert von $8\mu\text{g/l}$ Insulin (Abb. 30C).

Inseln am Tag 5 hatten eine vergleichsweise niedrige Basalrate von nur $6\mu\text{g/l}$ Insulin, welche jedoch während der Stimulierung mit mittlerer Glukose mit $15\mu\text{g/l}$ auf das Dreifache anstieg und somit gegenüber der basalen Insulinsekretionsrate signifikant erhöht war. Bei weiterer Stimulation mit 50mmol/l Glukose war eine vergleichbare Insulinkonzentration zu finden (Abb. 30D).

Zusammenfassend ergab sich also:

- frisch isolierte Inseln lassen sich nicht zur Insulinsekretion anregen.
- die Basalrate von einem Tag alten Inseln stieg nach Mittelglukose-Stimulation um das 3-fache an, fiel bei höherer Stimulierung jedoch wieder zurück auf einen Wert, welcher der doppelten Basalrate entsprach
- Inseln von Tag 3 hatten die höchste initiale Insulinsekretionsrate von $13\mu\text{g/l}$, die bei Stimulierung in Mittelglukose noch weiter anstieg, in Hochglukose aber wieder unter den Wert der Basalrate abfiel.
- 5 Tage alte Inseln zeigten mit $6\mu\text{g/l}$ eine mittelmäßige Basalrate der Insulinsekretion, die bei Stimulierung mit 25mmol/l Glukose auf das Dreifache anstieg und sich auch bei höherer Stimulation nicht mehr veränderte.

Der Vergleich der Pseudoinseln und modifizierten Pseudoinseln mit Langerhans-Inseln von Tag 1 und Tag 5 erbrachte folgende Ergebnisse. Die PI zeigten eine mittlere Basalrate von $7\mu\text{g/l}$ Insulin, welche jedoch bei Stimulierung mit 25mmol/l Glukose auf einen Wert von $3\mu\text{g/l}$ abfiel, bei weiterer Stimulierung mit Hochglukose allerdings erneut auf einen Wert von $7,4\mu\text{g/l}$ anstieg, was gerade der basalen Insulinsekretion entsprach (Abb. 31C).

Die modifizierten Pseudoinseln hatten mit lediglich $3,2\mu\text{g/l}$ eine relativ geringe basale Insulinsekretion. Diese änderte sich auch bei Stimulation mit 25mmol/l Glukose nicht. Bei Inkubation mit Hochglukose stieg die Insulinsekretion jedoch auf das annähernd Dreifache der Basalrate mit einem Wert von $8,2\mu\text{g/l}$ an (Abb. 31D) und war somit im Vergleich mit den Wer-

ten von low- und mid-glucose signifikant erhöht. Beim Vergleich von PI und ModPI mit Inseln Tag 5 fiel auf, dass die letzteren die höchsten Werte bei der Glukose-induzierten Insulinsekretion erreichten (Abb. 31B-D). Beim Vergleich von PI und ModPI mit Inseln von Tag 1 fiel auf, dass letztere zwar bei der Stimulierung mit Mittelglukose die höchsten Werte für die Insulinsekretion erreichten (Abb. 31A); jedoch zeigten alle drei Gruppen nahezu identische Werte bei Stimulierung mit Hoch-Glukose (Abb. 31A, C und D).

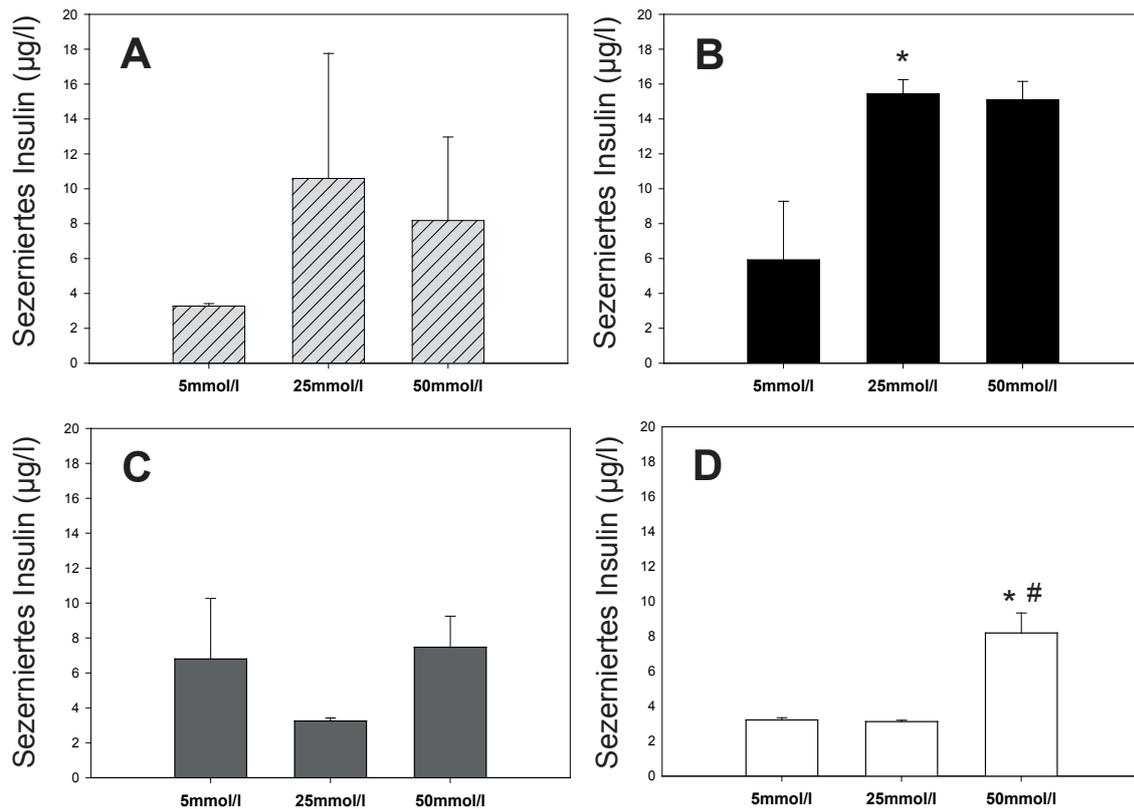


Abb. 31: Analyse des sezernierten Insulins nach Inkubation mit 5mmol/l Glukose, 25mmol/l Glukose und 50mmol/l Glukose von Inseln am Tag 1 (hellgrau-gestreift) (A) und Tag 5 (schwarz) (B) nach Isolierung sowie PI (grau) (C) und ModPI (weiß) (D). Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. 5mmol/l Glukose (low-glucose), # $p < 0,05$ vs. 25mmol/l Glukose (mid-glucose).

Zusammenfassend ergab sich also:

- die ModPI ließen sich erst durch Hochglukose-haltiges Medium zur Insulinsekretion stimulieren.
- Die PI zeigten eine mittelmäßige basale Insulinsekretion von $6\mu\text{g/l}$, welche bei leichter Stimulierung etwa um die Hälfte abfiel, bei höherer Stimulierung jedoch wiederauf den Wert der Basalrate zunahm
- Die Insulinsekretionsrate von 1 Tag kultivierten Inseln war bei starker Stimulierung vergleich-

bar mit PI und ModPI.

- Inseln von Tag 5 zeigten bei leichter Stimulierung eine etwa 4 mal so hohe Insulinsekretion und bei hoher Stimulierung noch eine etwa doppelt so hohe Insulinsekretion wie PI und ModPI.

6.3 Zusammenfassung der IVM- und in vitro-Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen in vivo-Studie wurde mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie das Revaskularisierungsverhalten in vitro generierter modifizierter Pseudoinseln untersucht und mit dem Langerhans'scher Inseln und Pseudoinseln verglichen. Darüber hinaus wurde mittels immunhistochemischer und proteinbiochemischer Untersuchungsmethoden ihre Hormonproduktion überprüft und ebenfalls mit Langerhans-Inseln und Pseudoinseln verglichen. Die in vivo- und in vitro-Experimente lieferten dabei folgende Ergebnisse:

- 1) Die Flächen und Durchmesser der transplantierten Inseltypen der drei unterschiedlichen Gruppen waren am Tag 0 direkt nach Transplantation in die RHK nahezu identisch ohne signifikante Unterschiede.
- 2) Bereits ab Tag 3 zeigte sich bei der Analyse der revaskularisierten Fläche und funktionellen Kapillardichte der modifizierten Pseudoinseln, dass diese, verglichen mit Inseln und Pseudoinseln, über den gesamten Zeitverlauf signifikant erhöht waren.
- 3) Der Vergleich der Anwachsrate zeigte zudem, dass die Transplantate aller drei Gruppen vergleichbar gut anwachsen.
- 4) ModPIs wiesen, verglichen mit den beiden anderen Gruppen ebenfalls ab Tag 3 signifikant vergrößerte Gefäßdurchmesser und einen erhöhten Volumenfluss auf.
- 5) In vivo transplantierte Inseln, PI und ModPI exprimieren in vergleichbarem Maß intrazelluläres Insulin.
- 6) In vitro kultivierte Inseln, PI und ModPI exprimieren Insulin, Glukagon und Somatostatin in vergleichbaren Mengen.
- 7) Mit Hilfe der Western-Blot Analyse wurde der intrazelluläre Insulingehalt der verschiedenen Inseltypen sowie Inseln unterschiedlichen Alters quantitativ bestimmt:

- a) Mit zunehmender Kultivierungsdauer stieg der Insulingehalt bis zum Tag 3 nach Isolierung.
- b) 5 Tage kultivierte Inseln enthielten das ca. 1,6-fache an Insulin verglichen mit den modifizierten Pseudoinseln und das 1,4-fache verglichen mit den Pseudoinseln.
- 8) 3 und 5 Tage kultivierte Inseln sezernierten am meisten Insulin nach Stimulierung
- 9) Die FACS-Analyse auf Oberflächenmarker von frisch isolierten sowie kultivierten Knochenmarkszellen zeigte, dass die Marker CD73, CD133, CD202b und Sca-1 bei frischen KMZ, nicht aber bei KMZ der Passage 11 erhöht waren. Im Gegensatz dazu waren die Marker CD105, CD184, eNOS und vWF bei KMZ der Passage 11, nicht aber bei frischen KMZ erhöht.

6.4. Ergebnisse der Diabetes-Studie

6.4.1 Diabetes-Induktion mit STZ

Die Diabetes-Induktion mit 60mg/kg Körpergewicht Streptozotocin war bei 2 von 3 Tieren erfolgreich, sodass diese spätestens nach etwa 3 Tagen Blutzuckerwerte über 200mg/dl erreicht hatten. Am Tag 7 nach Diabetes-Induktion wurden die diabetischen Tiere operiert. Am Tag der Transplantation (Tag 0) wurden die Tiere vor der Operation gewogen und der Blutzuckergehalt mit Hilfe eines Blutzuckermessgerätes überprüft. Der durchschnittliche Blutglukosegehalt aller untersuchten Tiere am Tag der Transplantation lag bei 279 ± 12 mg/dl, was einem Wert von $339\% \pm 15\%$ bezogen auf den Wert vom Tag der Induktion entsprach. Das durchschnittliche Körpergewicht lag bei 127 ± 4 g, was wiederum einem Wert von $89\% \pm 3\%$ bezüglich des Wertes vom Tag der Induktion entsprach.

Die durchschnittlichen Blutzuckerspiegel der verschiedenen Versuchsgruppen erreichten vergleichbare Werte ohne signifikante Unterschiede. Die Tiere der diabetischen Kontrollgruppe (DK) hatten dabei einen durchschnittlichen Blutzuckergehalt von 264 ± 34 mg/dl, die der Insel-Gruppe einen Wert von 246 ± 22 mg/dl und die Tiere der Insel + KMZ-Gruppe (IK) zeigten einen Wert 281 ± 27 mg/dl. Die höchsten Werte erreichten die Versuchstiere aus der PI-Gruppe mit 298 ± 14 mg/dl und die Tiere der ModPI-Gruppe mit 305 ± 33 mg/dl. Auch bei den Werten für das Körpergewicht am Tag 0 ergaben sich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Tiere der DK-Gruppe hatten am Tag 0 ein Durchschnitts-

gewicht von $123,0 \pm 6,5\text{g}$. Somit hatten sie innerhalb einer Woche insgesamt $16,7 \pm 3,2\%$ von ihrem Ursprungsgewicht verloren. Die Tiere der Insel-Gruppe wogen durchschnittlich $110,0 \pm 7,1\text{g}$, was einem Gewichtsverlust von $11,7 \pm 5,8\%$ entsprach. In der IK-Gruppe mussten die Tiere insgesamt $9,1 \pm 3,6\%$ ihres initialen Gewichts einbüßen und hatten 7 Tage nach Diabetes-Induktion noch $132 \pm 11,5\text{g}$. Die Tiere der PI- und der ModPI-Gruppe zeigten zwischen Induktion und Transplantation durchschnittlich die geringsten Verluste an Körpergewicht mit $8,7 \pm 3,1\%$ ($134,0 \pm 3,7\text{g}$ am Tag 0) bzw. $8,8 \pm 3,5\%$ ($138,0 \pm 10,8\text{g}$ am Tag 0).

6.4.2 Direkte Auswirkungen des STZ

6.4.2.1 Auswirkungen des STZ auf das Nierengewebe

Als direkte Auswirkung von STZ auf das Gewebe konnte eine starke Vakuolisierung von Nierenrinde und Nierenmark beobachtet werden (Abb. 32C und D).

Überdies waren die im Nierenmark befindlichen Nierenkörperchen, bestehend aus dem Gefäßknäuel, dem sogenannten Glomerulus und der Bowman-Kapsel, deutlich angegriffen, was sich unter anderem durch eine veränderte zelluläre Struktur und Vakuolisierung verdeutlichte. Die zellulären Veränderungen umfassten eine Verringerung der Podozytenanzahl (PC) sowie eine Verdickung der Glomerularbasalmembran (GBM), welche als hauchzarte Schicht die Vakuolen innerhalb der Glomeruli umgibt. Desweiteren kam es zu einer Hyperplasie der Mesangialzellen, welche sich zwischen den Gefäßen befinden, und einem damit verbundenen Zuwachs der mesangialen extrazellulären Matrix (MEM), wodurch das Lumen der Arteriolen verringert wird.

Dies führt zu einer Reduktion der Filtrationsoberfläche, was wiederum eine verminderte Filtrationsrate der Nierenkörperchen nach sich zieht. Insgesamt kommt es zu einem augenscheinlichen Volumenzuwachs des Glomerulus innerhalb der Bowman-Kapsel unter gleichzeitiger ungeordneter erscheinenden Anordnung der Kapillaren (Abb. 32H und J). Diese strukturelle Veränderung der Nierenkörperchen hat auf längere Sicht größeren Einfluß auf die Entstehung einer diabetischen Nephropathie.

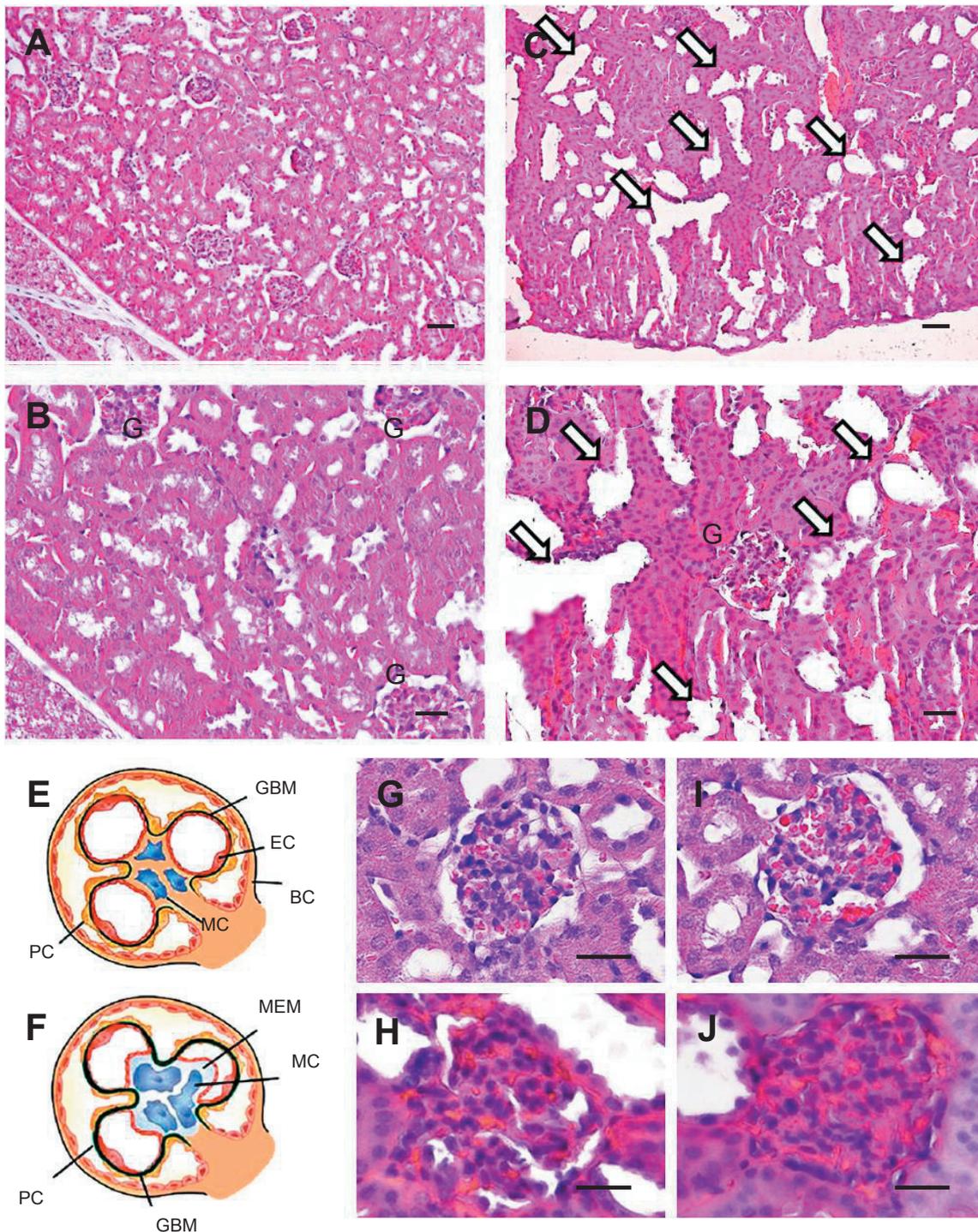


Abb. 32: HE-Färbungen einer gesunden Niere (**A** und **B**) im Vergleich zu einer diabetischen Niere (**C** und **D**), weiße Pfeile weisen auf die vergrößerten Vakuolen; A und C: Maßstab = 50µm, B und D: Maßstab = 25µm, G = Glomeruli. Schematische Darstellung eines gesunden (**E**) und eines diabetisch veränderten Nierenkörperchens (**F**), GBM = Glomerular Basalmembran, EC = Endothelzelle, BC = Bowman-Kapsel, MC = Mesangialzelle, PC = Podozyt, MEM = Mesangiale extrazelluläre Matrix. HE-Färbungen von Nierenkörperchen (Glomeruli) in einer gesunden, unbehandelten Niere (**G** und **I**) sowie einer diabetischen Niere (**H** und **J**), 4 Wochen nach STZ-Behandlung; Maßstab = 25µm.

6.4.2.2 Auswirkungen auf das exo- und endokrine Pankreasgewebe

Zur Überprüfung, dass STZ die β -Zellen der Inseln selektiv zerstört hatte, wurden von den eingebetteten Pankreata histologische Schnitte hergestellt und pro Tier 1-2 Pankreasschnitte mit HE angefärbt. Anhand der HE-gefärbten Schnitte konnte man deutlich die durch das STZ ausgelöste Destruktion innerhalb der Langerhans-Inseln erkennen, wo nur noch wenige Zellkerne zu sehen waren. Darüber hinaus war eine starke Vakuolisierung der Langerhans-Inseln zu beobachten (Abb. 33C).

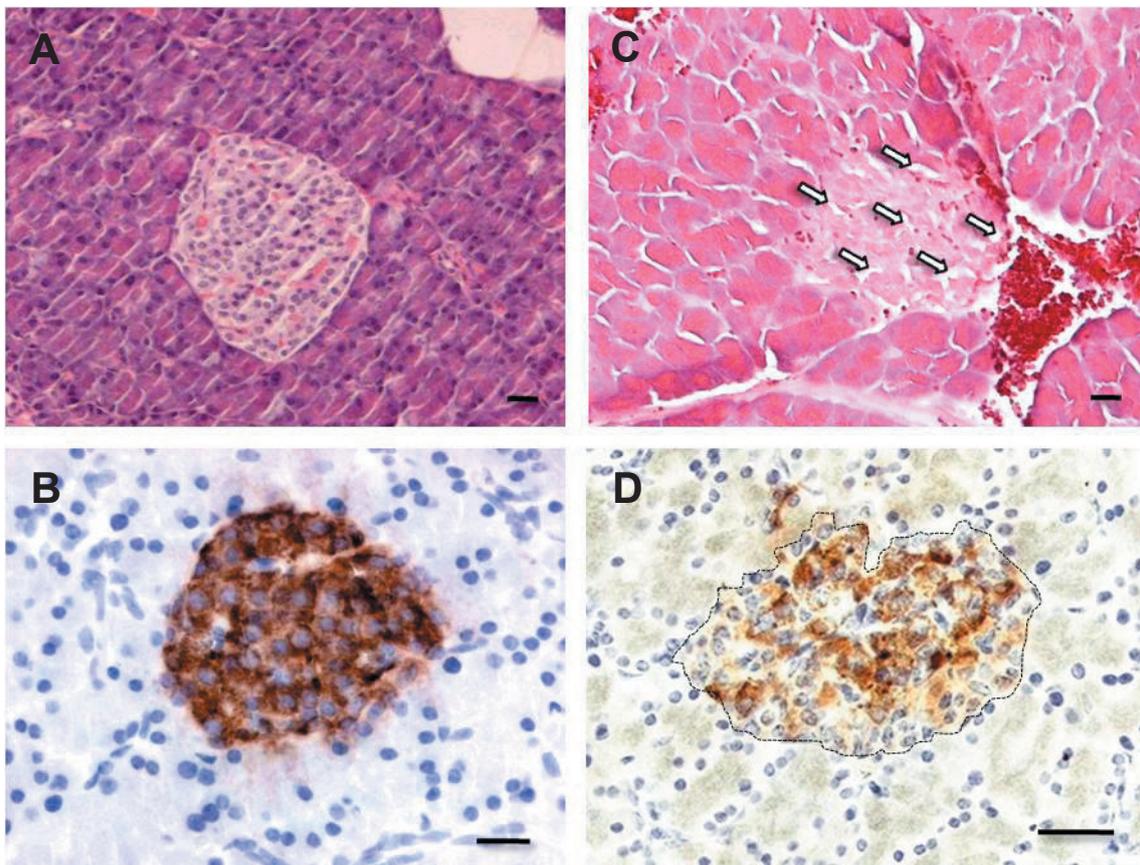


Abb. 33: HE- (A und C) und immunohistochemische (B und D) Färbungen von Pankreata eines gesunden, unbehandelten Kontrolltieres (A und B) und eines STZ-behandelten diabetischen Tieres (C und D). Durch eine einmalige Injektion von 60mg/kg STZ wurde die Inselstruktur bei den diabetischen Tieren fast vollständig zerstört (C; weiße Pfeile weisen auf Vakuolen innerhalb der Inseln), wohingegen sie bei unbehandelten Kontrolltieren intakt blieb (A). Dies wirkte sich auf ihre Fähigkeit der Insulinproduktion aus, was anhand einer immunohistochemischen anti-Insulin Färbung deutlich gemacht wurde (D). Im Gegensatz dazu zeigte die anti-Insulin Färbung histologischer Schnitte von Kontrolltieren, dass hier die Inselstruktur noch völlig intakt und die β -Zellen funktionsfähig waren. Maßstab = 25 μ m.

Zum Vergleich wurden Schnitte gesunder Pankreata ebenfalls HE-gefärbt, wobei man sehen konnte, dass hier die physiologische Inselstruktur noch vorhanden war (Abb. 33A). Die immunohistochemische anti-Insulin-Färbung auf Pankreas-Schnitte diabetischer Tiere zeigte darüber

hinaus, dass der Anteil Insulin-produzierender Zellen drastisch zurückgegangen war und zudem keine eindeutig abgrenzbare Inselstruktur mehr vorhanden war (Abb. 33D). Im Gegensatz dazu zeigte die immunhistologische Insulinfärbung auf Kontrollschnitten gesunder Tiere, dass sich die Inseln hauptsächlich aus Insulin-positiven Zellen zusammensetzten und die intrainsulären Zellen eine eindeutig abgrenzbare Struktur zum exokrinen Pankreasgewebe darstellten (Abb. 33B).

6.4.3 Direkte Auswirkungen des STZ auf den Organismus/Metabolismus

Als direkte Auswirkungen konnten bei allen Versuchstieren zwischen dem Tag der Diabetes-Induktion und dem Tag der Transplantation, also am Tag 0, ein starker Anstieg der Blutzuckerwerte sowie eine stetige Gewichtsabnahme beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten alle Tiere Polydipsie und eine damit verbundene Polyurie. Die Trinkmenge der Hamster betrug hierbei das 2-5 fache vom Normalwert, welcher etwa 7-15ml/Tag entspricht (Weiß et al., 2003). Bei einigen Tieren stellte sich eine Ketonurie ein, welche sich durch den stechenden süßlichen Geruch des Urins bemerkbar machte. Die gesteigerte Bildung von Ketonkörpern resultierte aus der Tatsache, dass es infolge des Insulin-abhängigen Glukosemangels innerhalb der Zellen zu einem vermehrten Fettabbau und einem Anstieg freier Fettsäuren im Blut kam. Durch den gestörten Glukosehaushalt wurde weniger Pyruvat gebildet und dadurch weniger Oxalacetat, was in der Leber die Bildung von Ketonkörpern aus Acetyl-CoA begünstigte, wodurch der pH-Wert im Blut immer weiter abnahm, was zur Übersäuerung führte.

6.4.4 In vivo- Funktionalität der ModPI im Vergleich zu Inseln und PI

Der Vergleich der Blutzuckerwerte sowie der Werte des Körpergewichts diabetischer Tiere mit transplantierten Tieren zeigte, dass bei allen Gruppen, bis auf die Gruppe der Pseudoinseln, der Diabetes mellitus im Verlauf der 21-tägigen Versuchsperiode revertiert werden konnte. Dies geschah jedoch in unterschiedlichem Ausmaß und unterschiedlichem Zeitverlauf.

6.4.4.1 Blutzuckeruntersuchungen

Diabetische Kontrolltiere zeigten über den Verlauf des 21-tägigen Beobachtungszeitraums einen Anstieg des Blutzuckers von anfänglich 264mg/dl um 76 mg/dl auf 342 mg/dl an (Abb. 35A), was einer Steigerung des basalen Serumglukosewertes um 37% (Abb. 34B) entspricht.

Transplantierte Pseudoinselfunktion konnten den diabetischen Zustand nicht revertieren, nach 21 Tagen war der Blutzucker im Vergleich zum Ausgangswert von 298mg/dl auf 355mg/dl (Abb. 34A) um ganze 19% (Abb. 34B) angestiegen.

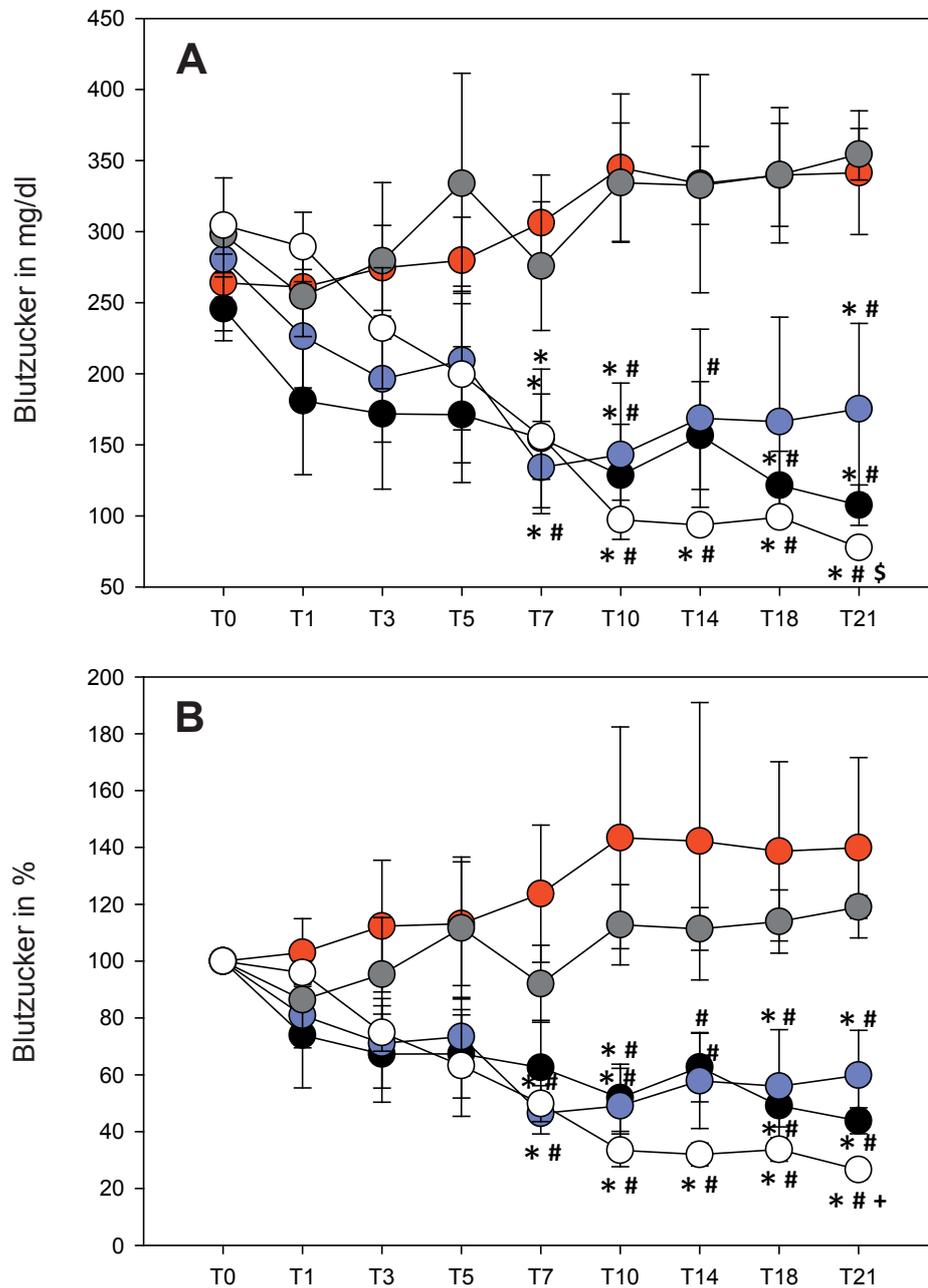


Abb. 34: Blutzuckerwerte in mg/dl (A) und in % (B) über den Verlauf des 3-wöchigen Beobachtungszeitraums. Weiß: ModPI, schwarz: Inseln, blau: Inseln+KMZ, rot: Diabetische Kontrolle, grau: Pseudoinselfunktion. * $p < 0,05$ vs. Diabetische Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Pseudoinselfunktion-Gruppe, § $p < 0,05$ vs. Insel+KMZ-Gruppe, + $p < 0,05$ vs. Insel-Gruppe.

Im Gegensatz dazu konnten Inseln und Inseln, die zusammen mit Knochenmarkszellen cotransplantiert wurden den Blutzucker um 56% bzw. 40% des Ausgangswertes reduzieren (Abb.

34B). Die Tiere der Insel-Gruppe erreichten mit einem finalen Blutzuckerwert von 108mg/dl am Tag 21 wieder Normoglykämie (Abb. 34A). Tiere, welche zur Hälfte Inseln und zur Hälfte KMZ transplantiert bekamen erreichten mit einem finalen Blutzuckerwert von 175mg/dl keine Normoglykämie, dafür allerdings eine starke Verbesserung des hyperglykämischen Zustandes (Abb 34A).

Die Transplantation von ModPI war am erfolgreichsten. Die ModPI-transplantierten Tiere zeigten nach 21 Tagen einen um 74% (Abb. 35B) reduzierten Blutzuckerwert nachdem dieser von anfänglich 305mg/dl auf 78 mg/dl gefallen war, womit auch hier wieder Normoglykämie erreicht wurde (Abb. 34A).

6.4.4.2 Körpergewichtsbestimmungen

Bei den Tieren der diabetischen Kontrollgruppe zeigte sich während der 3-wöchigen Beobachtungszeit keine Besserung hinsichtlich des enormen initialen Gewichtsverlusts. Die Tiere nahmen von anfänglich 148g am Tag der Diabetes-Induktion 17% ihres Körpergewichts auf ein Gewicht von 123g am Tag 0 ab. Zwischen dem Tag der Transplantation und dem Tag 21 nahmen die Tiere der DK-Gruppe um 2g auf ein Endgewicht von 125g zu, was umgerechnet einem Wert von nur noch 84% ihres Initialgewichtes entsprach (Abb. 35B).

Auch die transplantierten PI waren nicht in der Lage den STZ-vermittelten Diabetesbedingten Gewichtsverlust der Tiere zu revertieren. Die Tiere der PI-Gruppe nahmen von ursprünglich 147g auf 134g am Tag 0 rund 9% ihres initialen Körpergewichts ab. Innerhalb der 21-tägigen Beobachtungsperiode steigerte sich dieser Gewichtsverlust um weitere 14% auf einen Wert von insgesamt 23% des ursprünglichen Körpergewichts (Abb. 35B), sodass die Tiere der PI-Gruppe am Tag 21 lediglich noch ein Gewicht von 113g aufwiesen (Abb. 35A). Im Gegensatz hierzu konnten Inseln sowie Inseln, welche gleichzeitig mit KMZ co-transplantiert wurden eine Besserung des Gewichtsverlustes herbeiführen. Die Tiere der reinen Insel-Gruppe nahmen nach einem anfänglichen Gewichtsverlust von 12% des initialen Körpergewichts auf rund 131g am Tag 21 zu und lagen damit sogar noch 5% über ihrem Ausgangsgewicht von 125g (Abb. 35B). Die Tiere der Insel-Gruppe erlangten somit als einzige wieder ihr Ursprungsgewicht innerhalb des Versuchsverlaufs.

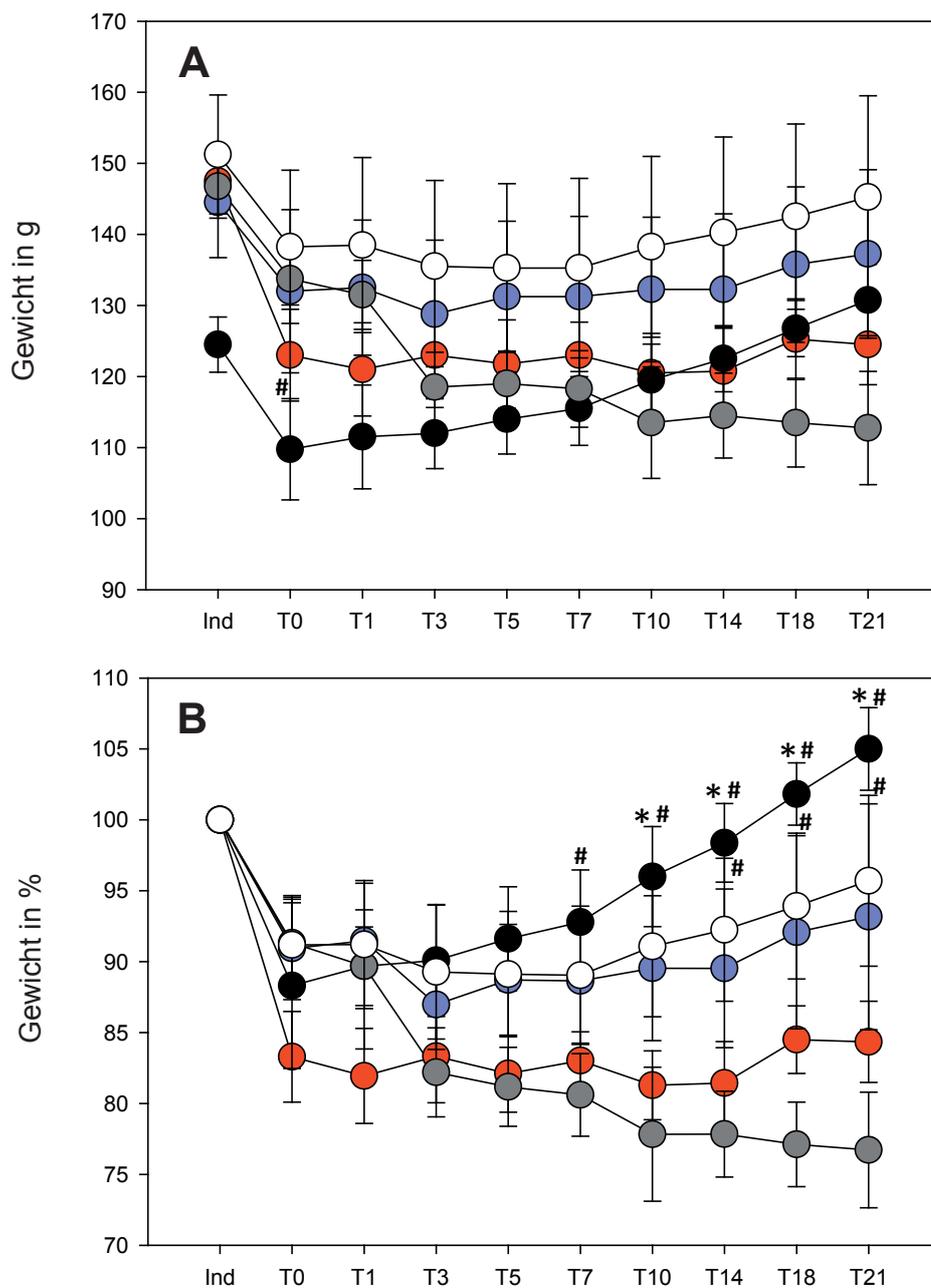


Abb. 35: Körpergewicht in g (A) und % (B) über den Verlauf des 3-wöchigen Beobachtungszeitraums, beginnend am Tag der Induktion. Grau: Pseudoinseln, rot: Diabetische Kontrolle, schwarz: Inseln, blau: Inseln+KMZ, weiß: ModPI. * $p < 0,05$ vs. Diabetische Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Pseudoinsel-Gruppe.

Die Tiere mit Inseln und KMZ nahmen von anfänglich 145g am Tag der Induktion um 9% auf einen Wert von 132g am Tag 0 ab. Während des 3-wöchigen Beobachtungszeitraums legten sie lediglich um 2% ihres Ursprungsgewichts auf 137g am finalen Tag zu und erlangten somit nur noch 93% ihres Initialgewichts (Abb. 35B). Die ModPI konnten nach den Langerhans-Inseln den Diabetes-bedingten Gewichtsverlust am zweitbesten regulieren. Hier nahmen die

Tiere von anfänglich durchschnittlichen 151g um 9% auf einen Wert von 138g ab. 3 Wochen nach Transplantation hatten die Tiere wieder 5% des verlorenen Gewichts zugenommen und zeigten am Tag 21 ein finales Körpergewicht von 145g, was rund 96% ihres Initialgewichts entsprach (Abb. 35B).

6.4.4.3 Histologische Untersuchungen

6.4.4.3.1 HE-Färbung

Nach Fixierung wurden die entnommenen Nieren in Paraffin eingebettet, sodass sie anschließend in 5µm dünne histologische Schnitte zerteilt werden konnten. Von den angefertigten Serienschritten der Organe wurde nun routinemäßig jeder sechste Schnitt Hämatoxylin-Eosin angefärbt, zur Überprüfung auf im Gewebe befindliche Inselstrukturen (Abb. 36). Positive Schnitte wurden nun genauer untersucht indem am Durchlicht-Mikroskop (Olympus) zunächst Übersichtsaufnahmen des Organs und schließlich Aufnahmen der unter der Nierenkapsel befindlichen Insel-Transplantate in 10- (Abb. 36A), 20- (Abb. 36B), und 40-facher Vergrößerung

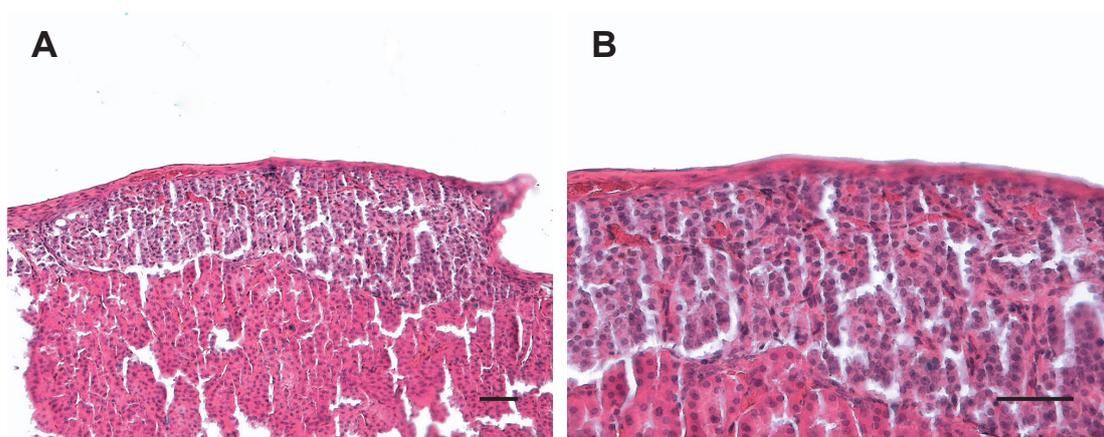


Abb. 36: HE-angefärbter Nierenschnitt mit den enthaltenen Inseltransplantaten 21 Tage nach Transplantation unter die Nierenkapsel. **A:** Insel-Transplantate unter der Nierenkapsel im 10er Objektiv. **B:** vergrößerte Ansicht aus A; bei 20-facher Vergrößerung kann man deutlich die Nierenkapsel mit den darunter liegenden Transplantaten erkennen. Maßstab = 50µm.

angefertigt wurden. Das endokrine Drüsengewebe der Inseltransplantate ließ sich innerhalb der HE-angefärbten Histologien deutlich vom Nierengewebe unterscheiden (Abb. 36), welches im Vergleich zu den Langerhans-Inseln unter dem Lichtmikroskop eher magenta angefärbt war, wohingegen die Inseln einen Farbton zwischen hell- und dunkellila annahmen. Auch anhand der Struktur unterschieden sich die Inseln vom umliegenden Gewebe ab, da sie eine höhere Zellkerndichte zeigten (Abb. 36).

6.4.3.3.2 Insulin-Färbung

Ausgehend von Transplantat-enthaltenden HE-Schnitten der Nieren (Abb. 37A, C, E und G) wurden immunhistochemische anti-Insulinfärbungen auf Folgeschnitte durchgeführt (Abb. 37B, D, F und H). Die histologischen Untersuchungen der gefärbten Nierenschnitte ergaben, dass sowohl die Präparate der Insel-Gruppe (Abb. 37A und B), als auch der Insel+KMZ-Gruppe (Abb. 37C und D) sowie der ModPI-Gruppe (Abb. 37G und H) alle gut angewachsen waren und demnach auch viele vitale Insulin-positive Zellen enthielten (Abb. 37B, D und H). Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Gruppe der Pseudoinseln deutlich weniger Insulin-positive Präparate aufwies (Abb. 37F).

Von allen untersuchten Transplantat-tragenden Schnitten enthielten bei der Insel-Gruppe insgesamt 31 der 40 untersuchten Schnitten Insulin-positive Inselpräparate, was einer Zahl von rund 79% entspricht. Bei der Gruppe, welche Inseln in Kombination mit den frisch isolierten Knochenmarkszellen erhielt, waren sogar insgesamt 36 von 38 Schnitten positiv auf Insulin, entsprechend 95% aller untersuchten Schnitte.

Das schlechteste Ergebnis wurde mit Präparaten der Pseudoinsel-Gruppe erzielt. Nur 26 von den insgesamt 54 histologischen Schnitten zeigten Insulin-positive Transplantate, was lediglich einem Anteil von 48% entspricht. Die Gruppe der modifizierten Pseudoinseln enthielt mit 41 von insgesamt 50 Histoschnitten den zweitgrößten Anteil an positiven Schnitten, entsprechend 82% aller Transplantat-tragenden Histoschnitte.

Auch diese Ergebnisse bestätigten, dass die Pseudoinseln eine erniedrigte Funktion im Vergleich zu den Transplantaten der anderen Versuchsgruppen haben.

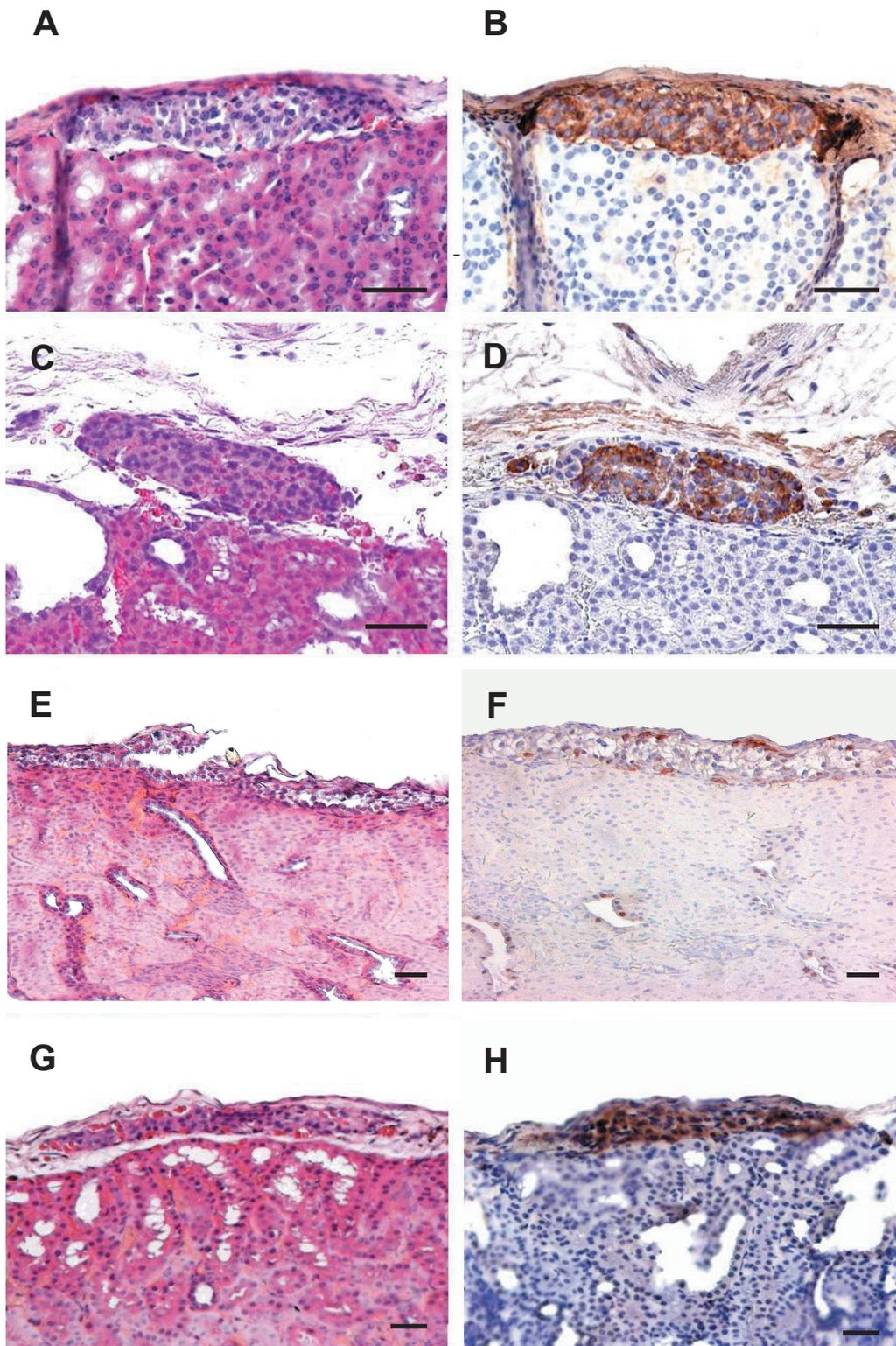


Abb. 37: Histologische Schnitte von Inseln (A+B), Inseln+KMZ (C+D), Pseudoinseln (E+F) sowie ModPI (G+H) 21 Tage nach Transplantation unter die Nierenkapsel diabetischer Tiere. Anhand der HE-gefärbten Schnitte (A, C, E und G) wurden Transplantat-tragende Folgeschnitte anti-Insulin (braun) gefärbt (B, D, F und H); Zellkerne sind blau-violett gefärbt. Die Präparate der PI-Gruppe (F) enthalten deutlich weniger Insulin-positive Zellen (braun) als die der anderen Gruppen. Maßstab = 50µm.

6.4.3.3.3 CD31-Färbung

Die anti-CD31-Färbungen auf Nierenschnitten ergaben, dass sowohl die Transplantate der Insel-Gruppe als auch der Insel+KMZ-Gruppe sowie der ModPI-Gruppe gut angewachsen waren. Dies war anhand der großen Zahl von Mikrogefäßen innerhalb der Transplantate ersichtlich (Abb. 38). Die Gruppe der Pseudoinseln zeigte auch hier wiederum deutlich weniger CD31-positive Endothelzellen, was gleichbedeutend mit weniger Blut-

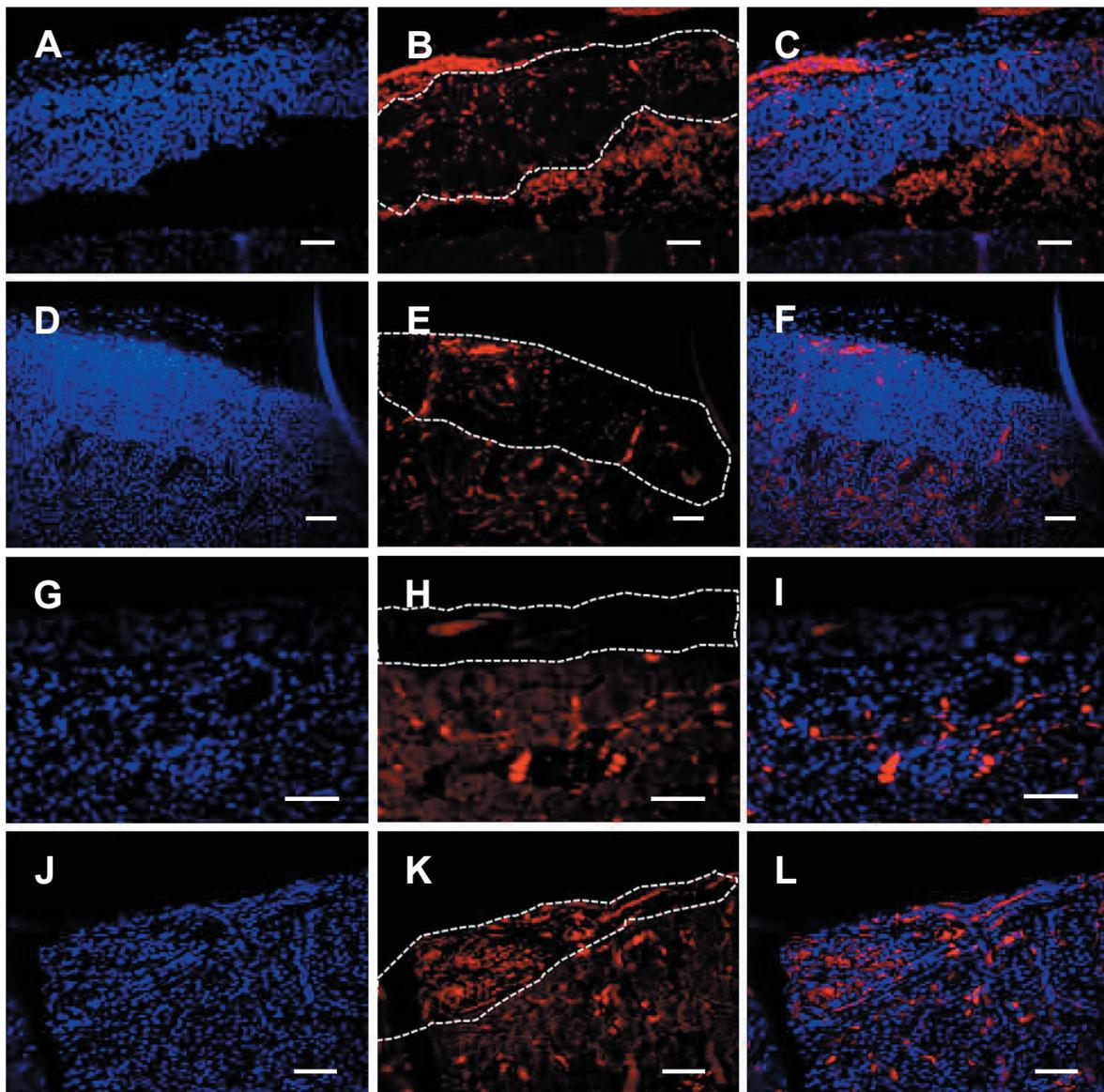


Abb. 38: Immunfluoreszenz von Transplantat-enthaltenden Nierenschnitten der vier Versuchsgruppen, welche immunhistochemisch gegen CD31 gefärbt wurden. **A-C:** Insel-Gruppe, **D-F:** Insel+KMZ-Gruppe, **G-I:** Pseudoinsel-Gruppe, **J-L:** ModPI-Gruppe. Jedes Transplantat wurde einmal einzeln im UV- und im Grün-Filter aufgenommen und anschließend wurden die beiden Bilder übereinander gelegt. Blau: Zellkerne, rot: CD31-positive Endothelzellen. B, E, H und K: weiße Umrandung markiert die Grenzen der Transplantate. Maßstab = 50µm.

gefäßen ist (Abb. 38). Für die Auswertung der histologischen Schnitte wurden für die Gruppen der Inseln, PI und ModPI die Blutgefäße innerhalb von je 12 Transplantaten und für die Gruppe der Inseln+KMZ innerhalb von 11 Transplantaten ausgezählt. Die Auswertung ergab, dass Präparate der Insel-Gruppe durchschnittlich 130 Mikrogefäße pro $0,1\text{mm}^2$ enthielten. Bei der Insel+KMZ-Gruppe waren es 180 Gefäße pro $0,1\text{mm}^2$. Die Gruppe der modifizierten Pseudoinselfn enthielt mit rund 240 Kapillaren pro $0,1\text{mm}^2$ die größte Anzahl an Gefäßen (Abb. 39). Lediglich die Präparate der Pseudoinselfn-Gruppe zeigten entsprechend den Ergebnissen der anderen histologischen Untersuchungen, dass die Transplantate im Durchschnitt wesentlich weniger Blutgefäße aufwiesen. Es waren es lediglich 50 Mikrogefäße pro $0,1\text{mm}^2$ zu finden (Abb. 39).

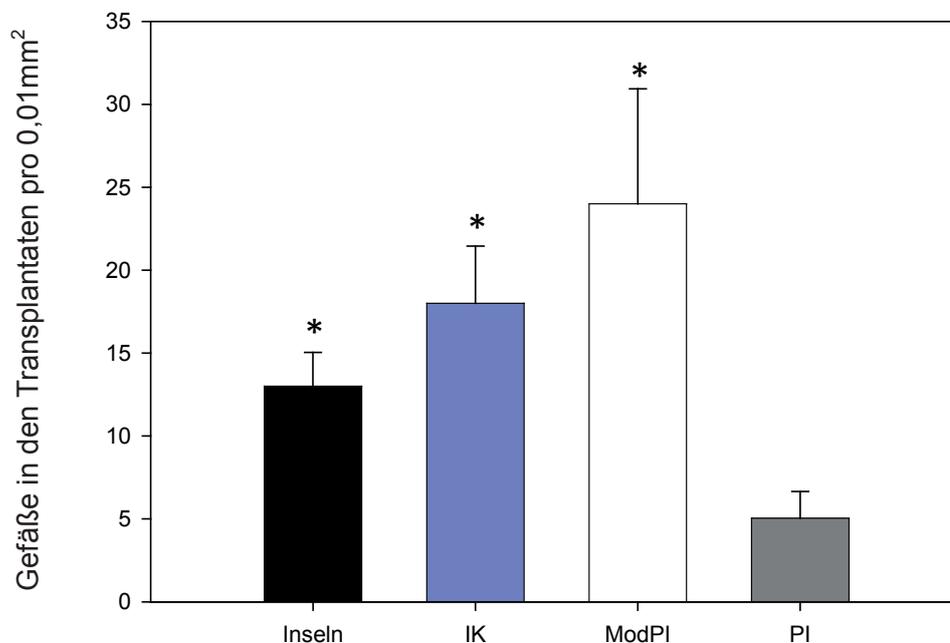


Abb. 39: Anzahl der Mikrogefäße pro $0,01\text{mm}^2$ Transplantatfläche, bestimmt anhand der CD31-Immunfluoreszenzfärbung.. Schwarz: Insel-Gruppe, hellblau: Insel+KMZ-Gruppe, weiß: ModPI-Gruppe, grau: PI-Gruppe. * $p < 0,05$ vs. PI.

6.5 Doppelfärbung gegen Insulin und GFP auf GFP-ModPI

Die immunhistochemische Doppelfärbung gegen Insulin und GFP auf Schnitten eingebetteter ModPI zur Hälfte bestehend aus GFP-Knochenmarkszellen und zur Hälfte aus Inselzellen aus der Maus zeigten, dass zumindest ein geringer Prozentsatz der GFP-positiven Knochenmarkszellen im Verband mit den Inselzellen sich zu einem Insulin-produzierenden Zelltypus differenzierte.

Dies war innerhalb der Histologien anhand sowohl rot (für Insulin) als auch grün (für GFP) leuchtender Zellen zu erkennen (Abb. 40).

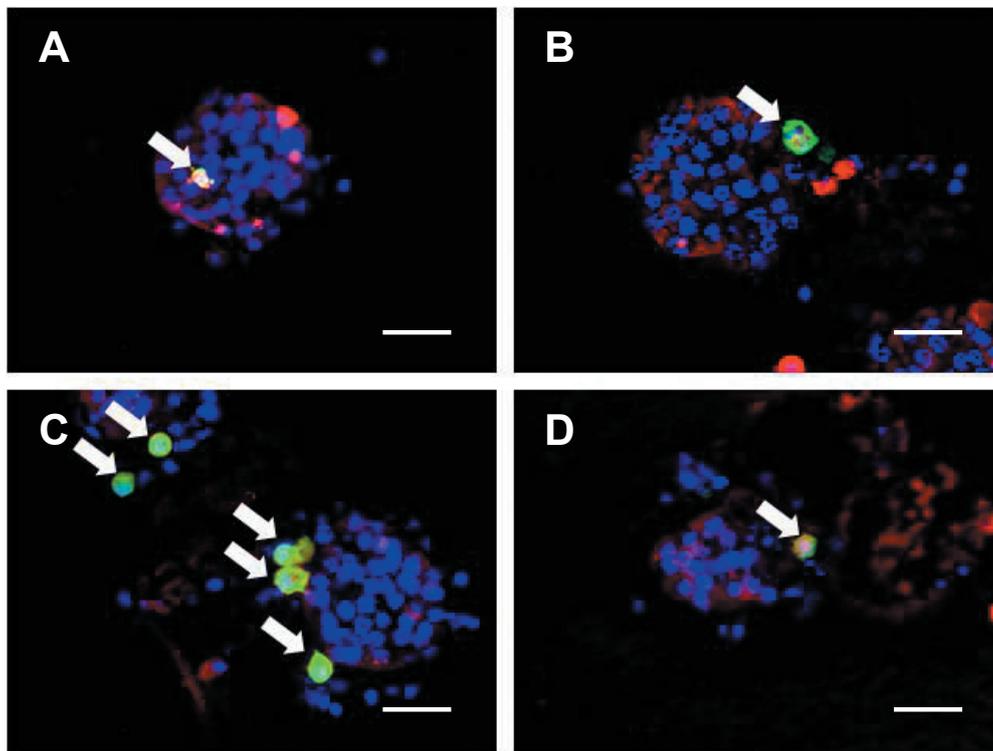


Abb. 40: Immunfluoreszenzfärbung auf GFP-ModPI gegen Insulin und GFP (A-D). Doppelt gefärbte Zellen leuchten sowohl grün (GFP) als auch rot (Insulin). Blau: Zellkerne, weiße Pfeile weisen auf doppelt gefärbte Zellen. Maßstab = 25µm

6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vivo* Studie

In der *in vivo*-Studie wurde die Fähigkeit der ModPI zur Diabetes-Reversion untersucht und mit der der Langerhans'schen Inseln, PI sowie einer Gruppe, welche Inseln in Kombination mit KMZ erhielt, verglichen. Zu diesem Zweck wurden Tiere mit einer einmaligen Injektion von Streptozotocin diabetisch gemacht und erhielten nach Ablauf einer Woche die verschiedenen (Insel-) Transplantate. Während einer dreiwöchigen Versuchsperiode wurde in regelmäßigen Abständen der Blutzuckerspiegel und das Körpergewicht gemessen und mit den Ergebnissen einer diabetischen Kontrollgruppe verglichen. Diese Studie zeigte folgende Ergebnisse:

- 1) Durch Streptozotocin wurde ein Großteil der β -Zellen selektiv zerstört und ein stabiler diabetischer Status in den Versuchstieren hervorgerufen.
 - a) Die diabetische Stoffwechsellage war anhand erhöhter Blutzuckerwerte und enormer Gewichtsverluste der Versuchstiere erkennbar.

-
- b) Des Weiteren konnte bei den Tieren eine Ketonurie und eine Polyurie sowie eine Polydipsie beobachtet werden.
- c) Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass das endokrine Gewebe strukturell schwer geschädigt und die Anzahl Insulin-positiver Zellen stark vermindert war.
- 2) Durch Transplantation wurden folgende Ergebnisse erzielt:
- a) Die Gruppe der Pseudoinseln war die einzige Versuchsgruppe, in welcher die Transplantate den Diabetes nicht revertieren konnten. In der Versuchsgruppe der ModPI konnte der diabetische Status am schnellsten und effektivsten rückgängig gemacht werden.
- b) Im Gegensatz zu allen übrigen Versuchsgruppen nahmen die Tiere der PI-Gruppe als einzige nicht an Gewicht zu und nahmen statt dessen weiter ab.
- c) Erwartungsgemäß nahmen die Tiere der DK-Gruppe im weiteren Versuchsverlauf nicht weiter zu. Verglichen mit der PI-Gruppe konnten sie ihr Gewicht allerdings halten, sodass es hier zu keiner weiteren Gewichtsabnahme kam.
- 3) Die Histologie und Immunhistochemie zeigten, dass Präparate der PI-Gruppe weniger Insulin-positive Zellen enthielten als die der anderen Gruppen. Nur etwa 50% der Präparate waren positiv auf Insulin.
- 4) Die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung gegen CD31 zeigte, dass die Gruppe der Pseudoinseln vergleichsweise wenig Gefäße enthielt. Dies bedeutet eine schlechtere Revaskularisierung. Die ModPI zeichneten sich dagegen durch eine überdurchschnittlich hohe Anzahl an Gefäßen innerhalb der Transplantate aus, welche die der Insel- und Insel+KMZ-Gruppe sogar übertraf.
- 5) EPCs aus dem Knochenmark differenzierten innerhalb der ModPI zu Insulin-produzierenden Zellen.

7. Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Rückenhautkammermodell

Anhand der Kammerpräparation des quergestreiften Unterhautmuskels der Rückenhaut (*Musculus cutaneus maximus*) des Syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) können mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie sämtliche Parameter der Mikrozirkulation in terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen quantitativ analysiert werden (Endrich et al., 1980). Hierbei weist die Kammerpräparation auch mehrere Tage nach Implantation der Titanrahmen keine Entzündungsanzeichen, wie z.B. Extravasation von Plasma und korpuskulären Bestandteilen, Leukozyten-Aktivierung, oder Degranulation von Mastzellen auf (Menger et al., 1990). Die ausgewerteten Daten mikrohämodynamischer Parameter von Arteriolen, Kapillaren und Venolen in der Präparation der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters sind dabei vergleichbar mit Daten aus Untersuchungen an anderen Tier-Modellen (Burton und Johnson, 1972; Endrich et al., 1980). Mittels der intravitalen Mikroskopie lassen sich an Präparationen des *Musculus cutaneus maximus* sowohl am Hamster, als auch an Maus und Ratte die Entwicklung mikrovaskulärer Netzwerke quergestreifter Muskulatur beobachten (Hobbs et al., 1976; Endrich et al., 1980; Lehr et al., 1993).

Der wesentliche Nachteil von Akut-Modellen liegt darin, dass die zu untersuchenden Organe unter physiologischen Bedingungen *in situ*, zum einen durch Übertragung der Atemexkursionen, oder aber, wie im Fall des Colons, durch die eigene Peristaltik, ständig in Bewegung sind (Kruschewski et al., 2001). Um diese zu minimieren, müssen diese Organe ausgelagert und nach Möglichkeit immobilisiert werden, was wiederum das Risiko des Austrocknens in sich birgt. Die Auslagerung und die damit verbundene Exposition gegenüber Raumluft, Licht und Temperaturschwankungen ist zudem Ursache für unphysiologische Veränderungen im Gewebe (Messmer und Krombach, 1998). Ebenso entsteht durch die Auslagerung und dem damit verbundenen mechanischen Reiz, der auf das Gewebe ausgeübt wird ein chirurgisches Trauma, welches Einfluss auf die mikrozirkulatorischen Parameter nimmt. Der maßgebliche Vorteil, den das Modell der chronischen Rückenhautkammer gegenüber Akut-Modellen bietet, ist die Möglichkeit über einen längeren Zeitraum von bis zu mehreren Wochen die Dynamik von Angiogenese und Revaskularisierung an transplantierten Fremdgeweben oder auch

Einzelzellen zu untersuchen (Menger et al., 1989; Messmer et al., 1984). Zudem hat die Analyse der Mikrozirkulation von Fremdgewebe in der Rückenhautkammer den entscheidenden Vorteil, dass hier das zu untersuchende Gewebe nur für kurze Zeit ex situ gehalten wird. Darüber hinaus kann an avaskulären Transplantaten wie im Fall der Langerhans-Inseln der Prozess der Neovaskularisierung von Beginn an beobachtet und dokumentiert werden. Der Raum zwischen Deckglas und Rückenhaut ist zudem groß genug, um die Entstehung 3-dimensionaler Gefäßnetzwerke der Transplantate zu gewährleisten. Ein weiterer entscheidender Vorteil des Rückenhautkammermodells liegt in der Unabhängigkeit von der Atembeweglichkeit der zu untersuchenden Zellen bzw. Gewebe.

Die Hamsterpräparation hat gegenüber dem Modell der Maus bzw. der Ratte den entscheidenden Vorteil, dass die zu präparierenden Muskelschichten, insbesondere der Re-tractormuskel, sich leicht voneinander lösen lassen, da lediglich eine geringe intermuskuläre Gefäßversorgung besteht. Weiterhin ist die Hamsterpräparation im Vergleich zu den Präparationen bei der Ratte oder der Maus deutlich transluzenter, wodurch zusätzlich die langfristige Beobachtung von Angiogenese und Revaskularisierung erleichtert wird. Da man bei Untersuchungen der Angiogenese im Tiermodell bestrebt ist Allo- und Xenotransplantationen zu vermeiden, wurden für die nachfolgenden in vitro Versuche an Inseln, Pseudoinseln und modifizierten Pseudoinseln sowie für deren spätere Transplantation in diabetische Empfängertiere gezielt das syngene Hamster-Modell ausgewählt. Da für die erwähnten Versuche größere Mengen an Langerhans-Inseln benötigt wurden, hatte sich auch hier die Insel-Isolierung aus dem Syrischen Goldhamster als optimal erwiesen, da die Ausbeute im Vergleich zur Maus wesentlich höher war. Um die gleiche Anzahl Inseln zu isolieren, hätte man, statt einem Hamster in der Regel 5 bis 10 Spendermäuse benötigt.

Die Nachteile am Hamster als tierexperimentelles Modell liegen nach wie vor in der ungenügenden Anzahl kommerziell verfügbarer monoklonaler Antikörper und DNA-Sonden sowie im Fehlen genmanipulierter Tiere (Messmer und Krombach, 1998).

7.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitalmikroskopische Untersuchung mikrovaskulärer Netzwerke verschiedenster Gewebe trug innerhalb der letzten dreißig Jahre entscheidend zur Verbesserung der quantitativen

Analyse ihrer Angioarchitektur und Mikrohämodynamik bei. Durch die intravenöse Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen wurde letztendlich auch die Beurteilung der Mikrozirkulation nicht transilluminierbarer Organe ermöglicht. So wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (IVM) bereits die Mikrohämodynamik von Niere, Pankreas, Leber, Milz und Herz quantifiziert (Sutton et al., 2006; Mithöfer et al., 1995; Vanheule et al., 2008; Grayson et al., 2001; Schramm et al., 2007). Bei den meisten der genannten Studien kamen sogenannte „Akut-Modelle“ zum Einsatz, wobei die Organe nach nur wenigen Stunden intravitalmikroskopischer Untersuchung entnommen wurden. Nachteile dieser Akut-Modelle liegen zum einen in der potentiellen Manipulation der mikrohämodynamischen Parameter sowohl durch die stundenlange Anästhesie, als auch infolge des durch die mikrochirurgische Präparation, die grundsätzlich ein Trauma induziert (Lindbom et al., 1982; Yamauchi et al., 1999). Beim Rückenhautkammer-Modell des Syrischen Goldhamsters wird den Tieren nach Implantation der Titanrahmen eine Ruhephase von 48h eingeräumt, um eine Restitution von chirurgischem Trauma und Narkose zu gewährleisten (Yamauchi et al., 1999). Anschließend ist die repetitive mikroskopische Beobachtung der Mikrozirkulation des gestreiften Unterhautmuskels auch ohne die erneute mikrochirurgische Traumatisierung möglich (Endrich et al., 1980).

Das Modell der Rückenhautkammer wurde in einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien für die Implantation von Tumor- und Knochengewebe sowie auch von Langerhans-Inseln genutzt (Menger et al., 1990; Leunig et al., 1999; Vajkoczy et al., 2000; Kraft et al., 2000). Dank der IVM war es dadurch erstmals möglich sowohl Veränderungen der Mikrozirkulation des Empfängergewebes als auch Veränderungen innerhalb der Transplantate zu untersuchen.

7.1.3 Diabetisches Tiermodell

Bereits in Vorversuchen wurde überprüft, ob sich im Hamster-Modell durch die einmalige intraperitoneale Injektion von 60mg Streptozotocin pro kg Körpergewicht ein stabiler, insulinabhängiger Diabetes mellitus induzieren lässt. Für die nachfolgende Transplantations-Studie spielte die erfolgreiche Diabetes-Induktion eine entscheidende Rolle, da die Demonstration einer erfolgreich verlaufenden Diabetes-Reversion nach Transplantation von Langerhans-Inseln bzw. PI und ModPI nur bei einem stabilen, nicht reversiblen Diabetes mellitus überzeugen kann. Würden die Insel-Transplantate in ein Tier mit instabilem Diabetes mellitus transplantiert, könnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine Diabetes-Reversion gegebenenfalls

durch Erholung des empfängereigenen Pankreasgewebes bewirkt wird. Um auch während des laufenden Experiments einen spontanen Rückgang der Hyperglykämie aufgrund Regeneration des Inselapparats in den diabetischen Tieren ausschließen zu können, wurden zusätzlich zu den transplantierten Empfängertieren nicht-transplantierte diabetische Tiere über den gesamten 3-wöchigen Beobachtungszeitraum in regelmäßigen Abständen auf Veränderungen des Blutzuckers und des Körpergewichts untersucht. Die im Kapitel 6.6.4.1.1 und 6.6.4.1.2 dargestellten Ergebnisse der unbehandelten Diabetes-Tiere zeigen eindeutig, dass durch die einmalige i.p. Injektion von 60mg/kg Streptozotocin ein schwerer über die gesamte Versuchsperiode irreversibler Diabetes mellitus ausgelöst werden konnte. Die Diabetes-Erkrankung wurde hierbei an den deutlich erhöhten Blutzuckerwerten und der Gewichtsabnahme offenbar. Diese pathologischen Veränderungen blieben bis zum Versuchsende erhalten. Da eine spontane Normalisierung des Blutzuckers oder des Körpergewichts nicht beobachtet werden konnte, konnte eine Regeneration des empfängereigenen endokrinen Gewebes ausgeschlossen werden konnte.

Bereits in der Vergangenheit zeigten andere Arbeitsgruppen in ihren Experimenten eine erfolgreiche und andauernde Diabetes-Induktion im Tiermodell mit einer einmaligen i.p. Injektion von 60mg STZ pro kg Körpergewicht (Gurney und Howarth, 2009). Der Zytotoxische Wirkmechanismus des Streptozotocins ist dabei strikt auf die Insulin-produzierenden β -Zellen limitiert. Junod und Mitarbeiter zeigten bereits in den 60er-Jahren, dass die Intensität des Streptozotocin-induzierten Diabetes im Nager-Modell Dosis-abhängig ist, wobei intravenös verabreichte Injektionen mit Dosierungen zwischen 25 bis 45mg/kg relativ milde Krankheits-symptome hervorrufen.

Erst Dosierungen zwischen 55-65mg/kg zeigten einen moderat verlaufenden Diabetes mellitus mit 3 bis 4-fach erhöhten Normal-Blutzuckerwerten. Die Injektion von 100mg/kg rief hingegen bereits nach wenigen Stunden einen stark diabetischen Status mit Ketonurie hervor, wobei die Tiere innerhalb 2-3 Tage nach Verabreichung verstarben (Junod et al., 1969).

Auch in den Vorversuchen für unsere Studie zeigte sich die später verwendete Dosis von 60mg/kg als am besten geeignet, da hier 2 von 3 Tieren einen irreversiblen Diabetes mellitus entwickelten und gleichzeitig keines der Versuchstiere verstarb. Allerdings setzte bereits bei einer geringfügigen Erhöhung der Dosis um 1-2 mg/kg eine allmähliche Mortalität

der Tiere ein. Entgegen der Studie von Junod et al. zeigte sich trotz der moderaten Dosierung von 60mg/kg STZ bei vereinzelt Tieren Anzeichen einer Ketonurie, welche immer mit einer Polyurie einherging. Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen Spezies liegen, da in der Studie von Junod und Mitarbeitern Wistar-Ratten, in der vorliegenden Studie aber Syrische Goldhamster verwendet wurden (Chang et al., 1977; Modak et al., 2007). Auch das durchschnittliche Anfangsgewicht der Tiere mag hierbei eine Rolle gespielt haben, da die Ratten rund 200g wogen und somit deutlich über dem der Hamster mit ca. 140g lagen.

7.1.4 Pseudoinseln und Transplantation

Verglichen mit der Generierung von Pseudoinseln in anderen Studien durch einfache Reaggregation der einzelnen Inselzellen in nichtadhärenten Kulturschalen (Beger et al., 1998; Hauge-Evans et al., 1999), garantierte die Verwendung der Methode des Hängenden Tropfens zur Herstellung der Pseudoinseln die Bildung von Aggregaten definierter Zellzahl und Größe durch die gezielte Limitierung der Zellanzahl in einem Tropfen (Cavallari et al., 2007; Lehmann et al., 2008). Je größer die Oberflächenspannung innerhalb eines Hängenden Tropfens ist, desto mehr nimmt dieser aufgrund der Erdanziehung wieder Kugelform an, wodurch sich die Zellen an einem Punkt akkumulieren und das Aggregieren der Einzelzellen zu einem Zellverband gefördert wird.

Ein weiterer Grund für die Wahl des Hängenden Tropfens als beste Methode zur Sphäroidbildung ist die proliferative Aktivität von Zellen im Allgemeinen und den Knochenmarkszellen innerhalb der ModPI im Besonderen. Durch diese Eigenschaft wäre die Generierung von nahezu kugelförmigen Gebilden bei normaler Kultivierung der Zellen in der Petrischale nicht möglich gewesen, da aufgrund von Oberflächeninteraktionen der Zellen mit der darunterliegenden Schicht die Ausbildung dreidimensionaler Gebilde unterbunden würde (Timmins und Nielsen, 2007).

Eine weitere häufig verwendete Methode zur Sphäroidbildung ist die Kultivierung der Zellen auf agarosebeschichteten Platten, was allerdings den Nachteil hat, dass man nicht voraussagen kann, wieviele der Zellen sich in den Zellverband einbauen lassen und sich somit auch keine verlässliche Prognose über die letztendliche Größe der neuentstehenden Aggregate machen lässt.

Kleinere Inseln mit einem Durchmesser unter $150\mu\text{m}$ haben gegenüber großen Inseln Vorteile, da letztere aufgrund nekrotischer und apoptotischer Stoffwechselwege sowie durch Ischämie und Hypoxie sehr schnell metabolisch erschöpft sind. Die Vorteile der Verwendung von Pseudoinseln für die Insel-Transplantation, ob mit oder ohne die Zugabe von Knochenmarkszellen, lägen in der bereits erwähnten kontrollierbaren Transplantatgröße, was zu definierten Bedingungen bezüglich morphogener Gradienten und hypoxischer Bedingungen führte, speziell im Vergleich mit sehr großen Langerhans-Inseln (Lehmann et al., 2007).

Bei der Untersuchung der Angiogenese intrahepatisch transplanteder Langerhans-Inseln größeren Durchmessers konnte eine Revaskularisierung hauptsächlich in der Peripherie nicht aber im Zentrum beobachtet werden (Lehmann et al., 2007). Dies bedeutet, dass größere Inseln im Vergleich zu kleinen Inseln schlechter, bzw. nur unvollständig anwachsen. Transplantate mit kleineren Durchmessern haben im Vergleich zu solchen mit größerem Durchmesser bezüglich ihrer Funktionalität einen enormen Vorteil, da die Sauer- und Nährstoffversorgung der Inseln *in vitro* sowie innerhalb der ersten 3 bis 6 Tage *in vivo* nur über Diffusion erfolgt (Menger et al., 2001; Lehmann et al., 2007). Aus diesem Grund können in kleineren Zellaggregaten, ob Insel oder Pseudoinsel, alle Zellen ausreichend versorgt werden, wohingegen bei größeren Aggregaten bereits nach wenigen Stunden aufgrund der Unterversorgung der Zellen zentrale Nekrosen auftreten (Cui et al., 2005).

Nicht nur das Anwachsen und die damit verbundene Versorgung der Inseltransplantate sind größenabhängig, auch für ihre Leistungsfähigkeit ist offensichtlich die Transplantatgröße relevant. So stieg in einer Studie von Lehmann et al. bei dem Vergleich der sekretorischen Leistung *in vitro* generierter Pseudoinseln bestimmter Größe mit normalen Langerhans-Inseln die Insulinsekretion nach Glukosestimulation um das 2,5-fache an (Lehmann, 2008). In unserer Studie besaßen die Transplantate vergleichbare Größen ohne signifikante Unterschiede, so dass Vergleiche der unterschiedlichen Gruppen möglich waren.

Für die Transplantation ist die Notwendigkeit der Generierung modifizierter PI anstatt einer simultanen Transplantation vereinzelter Inselzellen und Knochenmarkszellen zurückzuführen auf die Tatsache, dass β -Zellen nur in ihrem gewohnten Milieu, d.h. im Zellverband innerhalb der Langerhans-Insel, richtig funktionieren können. Hierfür benötigen sie sowohl die Zell-Zell-Interaktionen mit anderen β -Zellen, als auch mit α -Zellen. Dies zeigt sich, unter

anderem anhand einer stärkeren sekretorischen Antwort pankreatischer Inselzellen innerhalb eines Zellverbands auf äußere Stimuli im Vergleich zur Sekretion von Einzelzellen (Jaques et al., 2008).

Die Anordnung der Zellen innerhalb einer Insel ist erwiesenermaßen keineswegs rein zufällig, da der arterielle Blutfluss im Zellverband zuerst die β -Zellen passiert und von dort aus weiter zu den α -Zellen verläuft, bis er letztendlich die δ -Zellen erreicht (Samols et al., 1988). Bei den Nager-Inseln verzweigen sich die Kapillaren dabei ausgehend von den im Zentrum gelegenen β -Zellen weiter zu den in der Inselperipherie gelegenen α - und δ -Zellen, sodass die β -Zellen auf diese Weise so wenig wie möglich mit anderen Pankreashormonen in Kontakt kommen (Bonner-Weir und Orci, 1982; Menger et al., 1994). Sowohl in *in vivo*-, als auch in *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass PI eine sehr ähnliche sekretorische Kapazität im Vergleich mit normalen Langerhans-Inseln besitzen (Callewaert et al. 2007; Lehmann et al. 2007), was dafür spricht, dass die Zerlegung zu Einzelzellen und die anschließende Reaggregation ihre Fähigkeit zur Hormonproduktion und -regulation nicht beeinflussen.

Bei der Wahl des optimalen Transplantationsortes der Inseln müssen verschiedene Parameter berücksichtigt werden. In der klinischen Inseltransplantation beispielsweise hat sich die Leber als bestgeeignetes Transplantationsorgan erwiesen, da hier die Inseln dem Patienten durch einen minimal-invasiven Eingriff über die Pfortader injiziert werden können. Für die Forschung werden, je nachdem welchen Parameter man überprüfen möchte, verschiedene Organe bzw. Gewebe für die Inseltransplantation herangezogen.

So konnte in einer Studie von Mattsson et al. aus dem Jahre 2002 gezeigt werden, dass der Transplantationsort einen Einfluss auf die Revaskularisierung pankreatischer Nager-Inseln im Empfängergewebe hat, da unter die Nierenkapsel transplantierte Langerhans-Inseln ein dichteres Gefäßnetzwerk aufwiesen, als solche in Milz oder Leber (Mattsson et al., 2002). Intraportal in die Leber transplantierte Inseln zeigen im Nagermodell eine im Vergleich zu anderen Transplantationsorten verminderte Überlebensdauer auf, was auf eine verminderte Revaskularisierung zurückzuführen ist (Hiller et al., 1991).

In einer von der Arbeitsgruppe um Stagner und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurde auch das Pankreas selbst als potentieller Transplantationsort für Spender-Inseln untersucht. Bei der Transplantation isolierter Langerhans-Inseln in Pankreata von Ratten konnte hier

gezeigt werden, dass nur etwa ein Drittel der Inselmenge nötig war, wie für die Transplantation unter die Nierenkapsel, um die gleiche Überlebensrate der Empfängertiere zu erzielen. Um bei der Transplantation in die Leber ebenfalls diese Überlebensrate zu erreichen, mussten sogar fünfmal so viele Inseln transplantiert werden (Stagner et al., 2007).

7.1.5 Glukosetoleranztest

Die im Glukosestimulationstest verwendeten unterschiedlichen Glukosekonzentrationen ergaben sich im Fall der mittleren Konzentration zum einen aus der Tatsache, dass das normale Kulturmedium bereits einen Zuckergehalt von 4,5g/l enthält. Um eine Stimulierung zu erzielen, mussten die Inseln zuvor in Low-Glukose Medium (1g/l) inkubiert werden. Die mittlere Glukosekonzentration von 4,5g/l (also 450mg/dl) entspricht dabei einer pathologisch veränderten Blutglukosekonzentration, wie sie im Fall eines Diabetes mellitus vorkommt. Die höchste Glukosekonzentration von 9g/l (also 900mg/dl) entspräche in diesem Fall einer extrem pathologisch veränderten Blutglukosekonzentration. Mit Zuckerkonzentrationen bis 9mg/l werden also typische diabetische Blutglukosekonzentrationen von bis zu 900 mg/dl nachgeahmt, wie sie unter Umständen bei unbehandelten Fällen des Diabetes mellitus vorkommen (Carlotti et al., 2009; Yoshimi et al., 2009).

7.1.6 Aktuelle Probleme der klinischen Inseltransplantation

Auch 10 Jahre nach Einführung des Edmonton Protokolls stellen sich der routinemäßigen Inseltransplantation verschiedene Probleme, welche die Qualität und Überlebensrate der isolierten Inseln erheblich dezimieren. Neben den Faktoren der Ischämie während der Isolierungsprozedur und dem darauf folgenden oxidativen Stress spielen mehrere proinflammatorische Zytokine eine entscheidende Rolle bei der post-operativen β -Zell-Apoptose. Hierbei tragen die Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ zur Zerstörung transplantierte Inseln wie auch zur Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 1 bei (Mandrup-Poulsen, 1996; Riachy et al., 2002). Von diesen drei genannten Zytokinen stellt IL-1 β den wichtigsten pro-inflammatorischen Vermittler dar, welcher ursächlich für die Inseldysfunktion und -zerstörung im Pankreas ist (Mandrup-Poulsen et al., 1986). Im Nagermodell reicht die Anwesenheit von IL-1 β allein bereits aus, eine Apoptose der pankreatischen β -Zellen zu induzieren, wohingegen im Mensch erst in Kombination mit IFN- γ eine β -Zell-Apoptose innerhalb der Langerhans-Inseln ausgelöst wird (Eizirik und

Mandrup-Poulsen, 2001). Hierbei wirkt IL-1 β hauptsächlich durch die Aktivitätssteigerung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der Translokation des nuclear factor-kappa B (NF-kB) (Bonny et al., 2001; Papaccio et al., 2005). Letztendlich kann gesagt werden, dass neben der Zytokinstimulation Stressbedingungen, wie die Prozedur der Inselisolierung selbst, zu einer Verringerung der Überlebensfähigkeit und Funktion der Inseln führt, was wiederum große Verluste der Inselmasse direkt nach den letzten Reinigungsschritten nach sich zieht (Paraskevas et al., 2000). Die durch den Isolierungs-Stress gesteigerte JNK-Aktivität setzt direkt zu Beginn der Prozedur ein und hält bis zu 8h nach erfolgter Insel-Isolierung an (Abdelli et al., 2007).

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Vaskularisierung von Inseln und Pseudoinseln

Zur Vermeidung eines größenabhängigen Vaskularisierungsverhaltens der Transplantate (Folkman et al., 1995; Kampf et al., 2006) versuchten wir inselartige Zellaggregate durchschnittlich gleicher Größen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen herzustellen. Zwar repräsentieren die in der Rückenhautkammer gemessenen Transplantatdurchmesser aufgrund von Adhäsionskräften zwischen Deckglas und quergestreifter Muskulatur nicht die eigentlichen Transplantatgrößen. Die damit verbundene konzentrische Größenzunahme der Transplantate war allerdings bei allen Transplantaten zu beobachten und beeinflusste damit die vergleichende Studie nicht (Menger et al., 1992). Mit Hilfe der intravitalmikroskopischen Fluoreszenzmikroskopie konnte in der vorliegenden

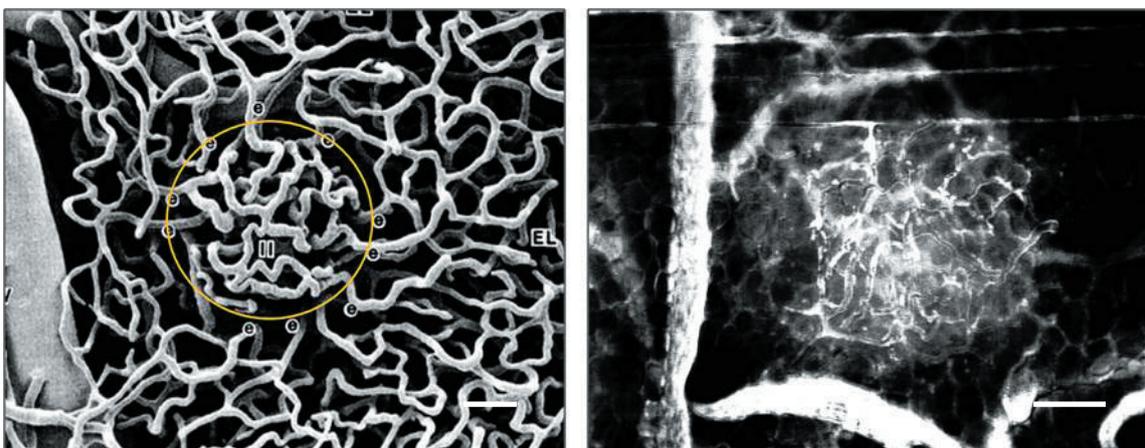


Abb. 41: A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Kapillarnetzwerkes einer Langerhans-Insel in situ, Maßstab = 50 μ m, Quelle: Murakami et al., 1993. B: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Langerhans-Insel am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer, Maßstab = 100 μ m.

Arbeit am Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters gezeigt werden, dass sowohl isolierte transplantierte Langerhans-Inseln, als auch Pseudoinseln und modifizierte Pseudoinseln in einem Zeitraum von 14 Tagen revaskularisiert werden. Sie bilden ein dichtes Glomerulum-artiges Netzwerk nutritiver Kapillaren, ähnlich dem der Langerhans-Inseln in situ (Abb. 41), aus (Griffith et al. 1977, Murakami 1992, Brunicardi et al. 1996). In der vorliegenden Studie propagieren wir die Zerlegung isolierter Langerhans-Inseln zu einer Einzelzell-Kultur, gefolgt von deren Co-Kultivierung zu gleichen Teilen mit Knochenmarkszellen und der Entstehung modifizierter Pseudoinseln, mit der Absicht die Menge transplantierbaren Insulinproduzierenden Gewebes, unter Beibehaltung des normalen intransulären β -Zell-Milieus, zu steigern. Wie in den in vivo Experimenten gezeigt, waren die ModPI dazu in der Lage, ein den Langerhans-Inseln sehr ähnliches, Glomerulum-artiges Gefäßnetzwerk aufzubauen und zeigten darüber hinaus eine verbesserte Vaskularisierung nach Transplantation im Vergleich zu Inseln und PI.

Die in vivo Experimente enthüllten, dass die ModPI in der Lage waren wieder ein kapilläres Netzwerk aufzubauen. Zum einen wurde dies durch Angiogenese aus bereits im Empfängergewebe vorliegenden Gefäßen (Vajkoczy et al., 1995) und zum anderen durch Vaskulogenese mit neuentstandenen Blutgefäßen aus endothelialen Zellen erzielt (Nyquist et al., 2005). Das neuentstandene Gefäßnetzwerk zeigte im Vergleich mit den Inseln und Pseudoinseln überdies eine verbesserte Vaskularisierung, welche durch eine signifikant erhöhte Kapillardichte und eine signifikant vergrößerte revaskularisierte Fläche gekennzeichnet war. Das gesteigerte angiogene Potential der ModPI kann dabei auf die im Knochenmark enthaltenen Stromazellen, Precursor- und (endothelialen) Progenitorzellen zurückgeführt werden, da diese zur Ausbildung neuer Blutgefäße beitragen (Wu et al., 2007).

Da frisch isolierten Langerhans-Inseln ein funktionelles Gefäßnetzwerk fehlt (Nyquist et al., 2005), verläuft die Ausbildung neuer Blutgefäße nach Transplantation sowohl durch Einsprossung von Blutgefäßen des Empfängergewebes (Vajkoczy et al., 1995) als auch durch Gefäßbildung aus verbliebenen intransulären Endothelzellen, welche eine enorme angiogene Kapazität besitzen (Brissova et al., 2004; Nyquist et al. 2005). Die Zahl dieser Insel-eigenen Endothelzellen nimmt mit fortdauernder Kultivierung allerdings stetig ab, nach 7 Tagen sind nahezu keine dieser Zellen mehr vorhanden (Olsson und Carlsson, 2005). Aus diesem Grund könnte die Generierung von ModPI diesen Mangel durch Zusatz von KMZ kompen-

sieren und so zu einer besseren und schnelleren Revaskularisierung im Empfänger beitragen. Dementsprechend bestätigten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Knochenmarkszellen, dass an der verbesserten Angiogenese sowohl (endotheliale) Vorläuferzellen (Tie-2, CD133, und Sca-1) (Asahara und Kawamoto, 2004) als auch Zellen mit Endothelcharakter (CD73, CD202b und CD309) beteiligt waren (Kalsi et al., 2002; Dumont et al., 1992; Eichmann et al., 1999).

Neben der signifikant verbesserten Vaskularisierung waren in der ModPI-Gruppe zusätzlich die Gefäßdurchmesser signifikant vergrößert. Durch den Zusatz von KMZ war der Anteil der Zellen mit endotheliale Charakter in der Gruppe der ModPI wesentlich höher als in den anderen beiden Gruppen. Dies spricht dafür, dass diese die Ausbildung neuer Blutgefäße verstärkt und beschleunigt haben. Da Inselkapillaren, wie die Blutgefäße vieler anderer Drüsengewebe, ein fenestriertes Endothel besitzen (Simionescu und Simionescu, 1991; Minshall et al., 2002), können die Nährstoffe aus dem Blut schneller in die Zellen gelangen. Vorteil einer mit einem größeren Durchmesser verbundenen größeren Oberfläche ist die gesteigerte Anzahl an semipermeablen Spalten, durch welche der Nährstofftransport stattfinden kann. Darüber hinaus ergab sich in unseren Versuchen durch die signifikant vergrößerten Gefäßdurchmesser auch ein durchschnittlich höherer Volumenfluß für die ModPI, was wiederum ein Indiz für eine schnellere und bessere Versorgung der einzelnen Zellen innerhalb des Inselverbandes und letztendlich für das Langzeitüberleben der Transplantate ist.

In der PI-Gruppe müssen das Endothel und die Mikrogefäße ebenfalls wieder von neuem aufgebaut werden, aber anders als bei den ModPI tragen hier keine aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Progenitorzellen zum Gefäßaufbau bei. Durch ihre lange Generierungsphase verlieren sie zudem ihre Insel-eigenen Endothelzellen. Diese Tatsache führt zur Neogenese von Blutgefäßen mit kleineren Durchmessern, vergleichbar denen der Insel-Gruppe.

7.3 Hormonproduktion von Inseln und Pseudoinseln

In der Studie konnte gezeigt werden, dass die ModPI neben der verbesserten Vaskularisierung, in vergleichbarem Ausmaß wie PI und Langerhans-Inseln, zur Produktion von Insulin, Glukagon und Somatostatin fähig sind. Die ModPI zeigten dabei sowohl in Präparaten isolierter, nicht

transplantiertter Inseln als auch in den Präparaten nach Transplantation in die Rückenhautkammer eine vergleichbare Anzahl Insulin-positiver Zellen.

Auch in der Western-Blot Analyse war der intrazelluläre Insulingehalt der PI und ModPI nahezu identisch. Im Vergleich zu den Langerhans-Inseln bestand ein geringer, jedoch nicht signifikanter Unterschied im intrazellulären Insulingehalt mit etwa 1,3 bzw. 1,5 mal so hohen Werten. Dies ist insofern bemerkenswert, da die ModPI im Vergleich zu Inseln oder PI nur 50% der Inselzellen enthalten und spricht wiederum dafür, dass zumindest bei einem Teil der im Zellverband enthaltenen KMZ eine Differenzierung zu einem Insulin-produzierenden Zelltypus stattfand. Die Differenzierung der Knochenmarkszellen konnte zudem anhand immunhistochemischer Insulin-GFP-Doppelfärbungen auf Schnitten von GFP-ModPI nachgewiesen werden.

Die Untersuchung von Präparaten der unter die Nierenkapsel diabetischer Tiere transplantierten Inseln und ModPI zeigte, dass diese annähernd die gleiche Anzahl Insulin-positiver Zellen enthielten. Bei den Pseudoinseln hingegen beinhalteten nur etwa die Hälfte der untersuchten Transplantate überhaupt Insulin-positive Zellen, deren Anzahl zudem auch noch sehr gering ausfiel.

Um die Auswirkungen des Isolierungstresses auf in vitro kultivierte Langerhans-Inseln beurteilen zu können, wurden diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0, 1, 3 und 5 nach Isolierung) sowohl auf intrazelluläres als auch auf sezerniertes Insulin überprüft. Für Langerhans-Inseln unterschiedlichen Isolierungs-Alters konnte sowohl anhand der Bestimmung des intrazellulären Insulins in der Western-Blot Analyse als auch über den Vergleich sezernierten Insulins mittels ELISA, gezeigt werden, dass Inseln am Tag 0, unmittelbar nach Isolierung in ihrem Metabolismus sehr geschwächt waren. Das zeigte sich im Glukosetoleranztest dadurch, dass frisch isolierte Inseln selbst nach Exposition hoher Glukosekonzentrationen von 50mmol/l keine Insulinsekretion aufzeigten. Auch der intrazelluläre Insulingehalt im Western-Blot war in den Inseln von Tag 0 am geringsten. Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmal die Beeinträchtigung des Zellmetabolismus unmittelbar nach Isolierung. Zwar konnten sich die Inseln zwischen Tag 1 und Tag 3 der Kultivierung temporär erholen, unterlagen aber ab Tag 5 apoptotischen und nekrotischen Prozessen, sodass ihre Insulinproduktion irreversibel gehemmt war. Die in vitro Stimulation der verschiedenen Inseltypen mit unterschiedlichen Glukosekonzent-

rationen erbrachte in der Gruppe der ModPI erst bei einem Glukosegehalt von 50mmol/l eine sekretorische Insulinantwort. Beim Übergang von Mittel- zu Hochglukose erreichten die 5 Tage kultivierten Langerhans-Inseln ein Plateau ihrer sekretorischen Leistung. Genau unter diesen, physiologisch gesehen, extremen Bedingungen von umgerechnet 450-900mg/dl begann der Glukose-abhängige sekretorische Wirkmechanismus der ModPI einzusetzen. Dies ist gerade bei der Behandlung von Diabetes Typ 1 Patienten mit extrem erhöhten Blutzuckerwerten von klinischer Relevanz. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist aber auch hier wiederum die Tatsache, dass die ModPI im Gegensatz zu den PI und den einen Tag alten Inseln nur aus der Hälfte der Inselzellen bestehen und unter Stimulierung dennoch die gleiche sekretorische Leistung aufweisen. Zum Vergleich der sekretorischen Funktionalität mussten PI und ModPI auch in diesem Fall zusätzlich wieder mit Inseln am Tag 5 verglichen werden. Für die Klinische Inseltransplantation ist allerdings eher der Vergleich mit 1 Tag alten Langerhans-Inseln von Relevanz, da Inseln direkt nach Isolierung ohne längere Kultivierungsphase transplantiert werden (Shapiro et al., 2000).

In den in vitro Versuchen zeigte sich, dass die sekretorische Funktion der ModPI und Pseudoinseln schlechter war, als die der Inseln nach 5 Tagen Kultivierung, jedoch vergleichbar mit der sekretorischen Kapazität der Inseln von Tag 1. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass die PI und ModPI zu diesem Zeitpunkt (Tag 5-6 nach Zerlegung) zwar schon vollständig reaggregiert waren; die Zeit bis zur vollständigen Reaggregation der Zellen reichte allerdings nicht aus die sekretorische Kapazität der Zellen vollends ausreifen zu lassen (Callewaert et al., 2007). Die primären interzellulären Aktivitäten beschränkten sich dabei in den ersten Tagen ausschließlich auf das Aggregieren der Einzelzellen zu einem Inselverband und auf die Ausbildung eines neuen Kapillarnetzwerks.

Diese vorübergehende Beeinträchtigung wird anhand der immunhistochemischen Analyse eingebetteter Inseln, PI und ModPI nicht deutlich. Hier erscheint es fast so, als enthielten die Präparate aller dreier Gruppen nahezu die gleiche Anzahl an Insulin-positiven Zellen. Die Ergebnisse von Western-Blot und ELISA jedoch zeigen ganz eindeutig, dass hier die Insulinsekretion der PI und ModPI eher mit der Insulinsekretion der Inseln vom Tag 1, als mit der der 5 Tage kultivierten Inseln, vergleichbar war. Bei längerer Kultivierung der PI und ModPI wäre deren sekretorische Kapazität vermutlich angestiegen, da die sekretorische Funktionali-

tät isolierter Inseln innerhalb von 3 Tagen ebenfalls erheblich zunimmt, wie in Abb. 30 deutlich zu sehen. Auch die Ergebnisse der in vivo Diabetes-Studie sprechen dafür, dass die ModPI nach einem längeren Zeitraum an sekretorischer Funktionalität dazugewonnen hätten, da diese nach 10 Tagen in situ ihre volle Funktionalität erlangten und im Bezug auf die Reversion der Hyperglykämie sogar die Insel-Gruppe übertrafen. Der Effekt dieser Leistungssteigerung der ModPI in situ ist verknüpft mit ihrer vergleichsweise verbesserten Revaskularisierung im Empfänger. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass eine solch starke sekretorische Leistung demnach in vitro gar nicht zu erreichen wäre.

7.2.4 Funktion modifizierter Pseudoinseln bei Diabetes mellitus

Die schnelle Reversion des hyperglykämischen Status durch transplantierte ModPI ist durch deren verbesserte Revaskularisierung im Empfängergewebe zu erklären, was bereits bei der Transplantation in die Rückenhautkammer anhand der signifikant gesteigerten funktionellen Gefäßdichte und der signifikant vergrößerten Transplantatfläche bewiesen wurde. Aufgrund ihrer gesteigerten Angiogenese als Ergebnis eines erhöhten Endothelzellanteils aus dem Knochenmark erzielten die ModPI signifikant vergrößerte Gefäßdurchmesser sowie einen gesteigerten Volumenfluss innerhalb der neuentstandenen Kapillarnetzwerke. Aus diesem Grund konnten die ModPI-Transplantate nach anfänglicher Nährstoffversorgung über Diffusionsvorgänge durch die beschleunigte primäre Sprossbildung neuentstehender Blutgefäße schneller wieder über Nährstoffe aus dem Blut versorgt werden.

Durch diese schnellere Revaskularisierung war das (Langzeit-) Überleben einer gesteigerten Anzahl von Transplantaten innerhalb der ModPI-Gruppe gewährleistet. Aufgrund der mit der effizienteren Revaskularisierung einhergehenden verbesserten Versorgung der Transplantate, gerade in der Anfangszeit, verlief die Wiederherstellung der Normoglykämie bei den Tieren der ModPI -Gruppe sogar noch schneller und effizienter als bei den Tieren der Insel- und der Insel+KMZ-Gruppe. Entscheidend war dabei wohl nicht die prozentuale Anzahl endokriner Inselzellen die transplantiert wurde, denn sonst müssten die normalen Langerhans-Inseln mit einem Gehalt von 100% Inselzellen die ModPIs mit einem Anteil von 50% Inselzellen in ihrer Effektivität bei der Diabetes-Reversion übertreffen. Der Grund hierfür ist durch die Tatsache zu erklären, dass von üblicherweise 100% transplantierten Inseln, durch apoptotische und nekrotische Prozesse aufgrund mangelnder Revaskularisierung und einer damit verbun-

denen Unterversorgung der Transplantate, letztendlich im Durchschnitt nur etwa 15% tatsächlich anwachsen (Korsgren et al., 2008). Dieser Umstand macht bei vielen Diabetes-Patienten oft eine mehrmalige Wiederholung der Inseltransplantation notwendig (Korsgren et al., 2008). Die immunhistochemische CD31-Färbung von Transplantaten unter der Nierenkapsel hat zudem gezeigt, dass die Zahl an Endothelzellen und somit zwangsläufig die Anzahl funktioneller Gefäße in der ModPI-Gruppe im Vergleich zu den Langerhans-Inseln fast verdoppelt war. Zwar zeigten Präparate der IK-Gruppe ebenfalls eine gesteigerte Anzahl CD31-positiver Endothelzellen, doch lagen diese zu einem großen Anteil außerhalb, bzw. zwischen den einzelnen Insel-Transplantaten und trugen somit nicht zur intrainsulären Revaskularisierung bei. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass durch die vermehrte Anzahl der aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen zwischen den einzelnen Inseltransplantaten eine verstärkte Gefäßbildung unmittelbar neben den Transplantaten stattfand, wodurch eine Verbesserung der Inselversorgung herbeigeführt wurde. Diese Schlussfolgerung lässt sich durch die immunhistochemische Insulin-Färbung der Insel+KMZ-Transplantate, wo über 90% der untersuchten Präparate Insulin-positiv waren, ziehen. Trotz des positiven Effekts der aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen bei der Co-Transplantation mit Inseln, konnten diese die Wirkung der im ModPI-Verband enthaltenen Endothelzellen und der damit verbundenen verbesserten Ausbildung eines neuen Gefäßnetzwerks nicht übertreffen.

In der Diabetes-Studie zeigte sich, dass einzig transplantierte Pseudoinseln keine Reversion der Hyperglykämie bewirken konnten. Das Körpergewicht nahm bei den Tieren der PI-Gruppe von Tag 0 an ab und fiel bis zum Tag 21 prozentual noch unter das Gewicht der Tiere der diabetischen Kontrollgruppe. Das Versagen der PI könnte unterschiedliche Ursachen haben. Während die Pseudoinseln in der Mikrozirkulationsstudie eine den normalen Langerhans-Inseln vergleichbare Revaskularisierung zeigten, waren sie im Rahmen der Diabetes-Studie nur in begrenztem Ausmaß zur Revaskularisierung befähigt, was sich deutlich bei der Auswertung der CD31-gefärbten Endothelzellen der histologischen Nierenschnitte zeigte. Da die PI nach Transplantation in die Rückenhautkammer als Einzel-Transplantate sehr wohl adäquat revaskularisierten ist die Beeinträchtigung der Revaskularisierung der PI nach Transplantation unter die Nierenkapsel wohl durch die Cluster-Transplantation bedingt. Hier wurden PI, welche im Zentrum eines solchen Clusters lagen nur ungenügend mit Nährstoffen versorgt und starben nach kurzer Zeit ab, da hier, im Gegensatz zu den Transplantaten der

anderen Gruppen, eine schnelle Vaskularisierung der Pseudoinsel-Transplantate durch neuentstandene Mikrogefäße fehlte.

Normale Langerhans-Inseln besitzen nach Isolierung kein vollständig funktionsfähiges Gefäßnetzwerk (Nyqvist et al., 2005). Jedoch enthalten sie noch die nach dem Isolierungsprozess übrig gebliebenen inseleigenen Endothelzellen (Linn et al., 2003), welche jedoch in Kultur spätestens nach einer Woche vollständig verschwinden (Olsson und Carlsson, 2005). Neben den inseleigenen Endothelzellen spielen zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPCs) aus dem Knochenmark spielen zusätzlich eine entscheidende Rolle bei der Neovaskularisierung isolierter Inseln. In einer Studie von Kang und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die Zahl zirkulierender EPCs in, durch STZ-Injektion diabetisch gemachten Empfänger-Mäusen, im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant reduziert war. Auch nach Ischämie in den Hintergliedmaßen zeigte sich entgegen aller Erwartungen, weiterhin eine supprimierte EPC-Mobilisierung in den Versuchstieren. Der Rückgang der basalen Rate zirkulierender EPCs ist im diabetischen Modell dabei zumindest teilweise zurückzuführen auf den verheerenden Verlust endothelialer Progenitorzellen durch erhöhte endotheliale Schäden (Kang et al., 2009).

Da die Langerhans-Inseln in unserer Studie frisch isoliert und direkt transplantiert wurden, reichte die Anzahl endothelialer Zellen innerhalb der Inseln aus, um eine Revaskularisierung der Langerhans-Inseln durch Vaskulogenese inseleigener Zellen und deren Inoskulation mit Empfängerkapillaren, zu gewährleisten. Bei den Pseudoinseln allerdings, welche über einen langen Zeitraum von 5-6 Tagen in der Hängenden Tropfen-Kultur reaggregieren, sind nach Ablauf der Zeit fast, bzw. gar keine Endothelzellen mehr vorhanden. Die Ausbildung eines intrainsulären Kapillarnetzwerks nach Transplantation wäre hier somit nur noch durch Einsprossung von Gefäßen des Empfängergewebes möglich, wobei die Zahl der EPCs im diabetischen Empfänger wie bereits erwähnt dezimiert, bzw. verringert ist (Nyquist et al., 2005).

Innerhalb der ModPI tragen die aus dem Knochenmark-Stroma stammenden EPCs zur Generierung eines neuen Kapillarnetzwerks bei und führen zu deren schnelleren und besseren Revaskularisierung im Empfängergewebe. Immunhistochemisch wurde gezeigt, dass die Zahl der Blutgefäße innerhalb der Insel-Transplantate um das 2,6-fache gegenüber den Pseudoinseln erhöht war. Bei der IK- und der ModPI-Gruppe war die Anzahl der Gefäße ebenfalls um den Faktor 3,6 bzw. 4,8 gegenüber der PI-Gruppe erhöht. Neben den aus dem

Knochenmark stammenden EPCs tragen zudem Progenitor- bzw. Stammzellen zusätzlich zur verbesserten Funktionalität der *in vitro* generierten ModPI bei. In geringem Maß adaptieren diese im Zellverband die Eigenschaften der benachbarten endokrinen Inselzellen, speziell der Insulin-produzierenden β -Zellen (Soria et al., 2001), wie bereits anhand der Präparate der GFP-ModPI gezeigt.

Die Revaskularisierung der PI in der Rückenhautkammer war zwar vergleichbar mit derjenigen der Langerhans-Inseln; ihre sekretorische Kapazität im Glukosetoleranztest war jedoch schlechter, als die der Inseln. Zusammen mit proinflammatorischen Prozessen im diabetischen und dazu noch durch die Transplantation traumatisierten Gewebe und einer Diabetes-bedingten Insulinresistenz im Empfängergewebe, führte dies letztendlich dazu, dass bei den Tieren der PI-Gruppe keine Reversion des DM beobachtet werden konnte. Die renalen Veränderungen bei einem STZ-induzierten Diabetes beruhen dabei hauptsächlich auf den Auswirkungen des diabetischen Status in den Versuchstieren und nicht auf der zytotoxischen Wirkung des STZ selbst (Churchill et al., 1993). Aus diesem Grund konnten die Transplantate der Insel-, IK- und ModPI-Gruppe nach Einsetzen der Revaskularisierung innerhalb kürzester Zeit den Diabetes mellitus revertieren ohne Gefahr zu laufen, durch den STZ-induzierten Zerstörungsmechanismus abgebaut zu werden.

Bei den PI-Transplantaten führte deren ungenügende Revaskularisierung dazu, dass diese nicht in der Lage waren den diabetischen Status innerhalb kürzester Zeit rückgängig zu machen. Neben der ungenügenden Versorgung infolge mangelnder Revaskularisierung wurden sie im weiteren Verlauf Opfer der Diabetes-bedingten metabolischen Veränderungen, was darüberhinaus dazu führte, dass ein Großteil der Pseudoinseln abstarb und folglich auch in den histologischen anti-Insulin Färbungen der Nierenschnitte der PI-Gruppe eine vergleichsweise viel geringere Zahl Insulin-positiver Präparate zu sehen war.

Die Frage ist nun, warum die Tiere der Pseudoinsel-Gruppe im Vergleich mit den Tieren der diabetischen Kontrollgruppe, trotz der über den Beobachtungszeitraum vergleichbaren Blutzuckerwerte, immer weiter an Gewicht verloren, während das Gewicht der Tiere der diabetischen Kontrollgruppe nahezu unverändert blieb. Ein Teil der Gewichtsabnahme bei den Tieren der PI-Gruppe lässt sich durch den während der Transplantation auftretenden operativen Stress erklären (Paquin, 1955 ; Hoover-Plow und Clifford, 1978). Im Gegensatz dazu

waren die Tiere der DK-Gruppe diesem Stress nicht ausgesetzt und zeigten somit, trotz dem mit der PI-Gruppe vergleichbaren diabetischen Status, auch keine Stress-induzierte postoperative Gewichtsabnahme. Die durch Anästhesie, Gewebeschädigung und postoperative Schmerzen verursachten Stress-Reaktionen lösen zumindest vorübergehend eine Änderung der normalen Physiologie im Empfängerorganismus aus, wobei die Sekretion von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde stimuliert wird, was unter anderem eine erhöhte Glukoneogenese in der Leber verursacht (Goldkuhl et al., 2010).

Auch ist mittlerweile allgemein bekannt, dass sich nach Verletzungen oder operativen Eingriffen eine Insulinresistenz entwickeln kann (Black et al., 1982). Anhand der immunhistochemischen Untersuchungen ist davon auszugehen, dass zumindest etwa die Hälfte der PI-Transplantate revaskularisierten und in der Lage waren Insulin zu sezernieren. Allerdings reichte die sekretorische Leistung dieser PI, trotz deren teilweise vorhandener Revaskularisierung nicht aus, die durch eine Stress-induzierte Glukoneogenese verstärkte Hyperglykämie unter gleichzeitiger gesteigerter Insulinresistenz des Empfängergewebes zu revertieren. Die fehlende Gewichtszunahme sowohl in der diabetischen Kontrollgruppe als auch der PI-Gruppe ist wohl durch die progrediente Hyperglykämie verursacht, da die Tiere der ModPI-, Insel- und IK-Gruppe trotz identischem Trauma eine Gewichtszunahme zeigten.

7.4 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie machen deutlich, dass die Generierung und Anwendung modifizierter Pseudoinseln eine vielversprechende Strategie zur Steigerung der Erfolgsraten der Inseltransplantation zur Behandlung des Diabetes mellitus darstellen könnten. In weiterführenden Studien muss noch die Frage geklärt werden, in welchem Ausmaß die in den modifizierten Pseudoinseln enthaltenen Knochenmarkszellen zur Insulinproduktion beitragen.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die Verwendung von ModPI ein interessanter Ansatz für die klinische Inseltransplantation sein könnte. Durch ihr verbessertes Anwachsverhalten und durch ihre Fähigkeit zur Insulinproduktion könnten sie durch die mit ihrer Generierung erzielten Einsparung an β -Zellmasse wesentlich dazu beitragen, die Knappheit an Spenderorganen zu überbrücken. Zukünftige Studien sollten daher die immunologische

Reaktion des Empfänger-Organismus nach ModPI-Transplantation untersuchen. Des Weiteren sollten Forschungsansätze entwickelt werden, die eine Massenproduktion von ModPI ermöglichen, da diese für die klinische Transplantation notwendig wäre.

Der Einsatz von ModPI hätte zudem den Vorteil, dass für deren Generierung empfangereigenes Knochenmark entnommen und daraus die Knochenmarkszellen isoliert werden könnten (Biermann, 1952). Dies würde die immunologische Abstoßung gegebenenfalls verringern.

8. Literaturverzeichnis

1. **Abdelli S, Abderrahmani A, Hering BJ, Beckmann JS, Bonny C.** The c-Jun N-terminal kinase JNK participates in cytokine- and isolation stress-induced rat pancreatic islet apoptosis. *Diabetologia*. 2007; 50: 1660-9.
2. **Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA.** Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol*. 2010; [Epub 2010 Apr 26].
3. **Alberti KG, Zimmet PZ.** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*. 1998; 15: 539-53.
4. **Anderson RJ.** John Jacob Abel: the fifth horseman. *Mol Interv*. 2009; 9: 52-60.
5. **Asahara T, Kawamoto A.** Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287: 572-9.
6. **Ashcroft FM, Gribble FM.** ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*. 1999; 42: 903-919.
7. **Atkinson MA, Maclaren NK.** What causes diabetes? *Sci Am*. 1990; 263: 62-3, 66-71.
8. **Baker M, Wayland H.** On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res*. 1974; 7: 131-43.
9. **Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ.** GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005; 21: 389-95.
10. **Bayliss WM, Starling EH.** The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol*. 1902; 28: 325-53.
11. **Beck IT.** The role of pancreatic enzymes in digestion. *Am J Clin Nutr*. 1973; 26: 311-25. Review.
12. **Beger C, Cirulli V, Vajkoczy P, Halban PA, Menger MD.** Vascularization of purified pancreatic islet-like cell aggregates (pseudoislets) after syngeneic transplantation. *Diabetes*. 1998; 47: 559-65.
13. **Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S.** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 1990; 13: 198-208.
14. **Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF.** Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T-cells. *J Exp Med*. 1987; 166: 823-32.
15. **Biermann HR.** Bone marrow aspiration of the posterior iliac crest, an additional safe site. *Calif Med*. 1952; 77: 138-9.
16. **Black PR, Brooks DC, Bessey PQ, Wolfe RR, Wilmore DW.** Mechanisms of insulin resistance following injury. *Ann Surg*. 1982; 196: 420-35.
17. **Bolt MW, Mahoney PA.** High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1997; 247: 185-92.

18. **Bolzán AD, Bianchi MS.** Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 2002; 512: 121-34. Review.
19. **Bonner-Weir S, Orci L.** New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes.* 1982; 31: 883-9.
20. **Bonner-Weir S.** Anatomy of islets of Langerhans. In: Samols E. *The endocrine pancreas.* Raven, New York, 1991, 15-27.
21. **Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF.** Cell permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes.* 2001; 50: 77–82.
22. **Brealey D, Singer M.** Hyperglycemia in critical illness: a review. *J Diabetes Sci Technol.* 2009; 3: 1250- 60.
23. **Brentjens R, Saltz L.** Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologists` perspective. *Surg Clin North Am.* 2001; 81: 527-42.
24. **Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD.** Islet cell transplantation today. *Langenbecks Arch Surg.* 2007; 392: 239-53.
25. **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.* 2004; 53: 1318-25.
26. **Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC.** Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53: 1087-97.
27. **Brunicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, Guth P, Menger M et al.** Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach veterans administration regional medical education center symposium. *Diabetes.* 1996; 45: 385-92.
28. **Burgess MA, Forrest JM.** Congenital rubella and diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2009; 52: 369-70.
29. **Burton KS, Johnson PC.** Reactive hyperemia in individual capillaries of skeletal muscle. *Am J Physiol* 1972; 223: 517-24.
30. **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.* 2006; 103: 2334-9.
31. **Callewaert HI, Gysemans CA, Ladrière L, D’Hertog W, Hagenbrock J, Overbergh L, Eizirik DL, Mathieu C.** Deletion of STAT-1 pancreatic islets protects against streptozotocin-induced diabetes and early graft failure but not against late rejection. *Diabetes.* 2007; 56: 2169-73.
32. **Carlotti AP, St George-Hyslop C, Guerguerian AM, Bohn D, Kamel KS, Halperin M.** Occult risk factor for the development of cerebral edema in children with diabetic ketoacidosis: possible role for stomach emptying. *Pediatr Diabetes.* 2009; 10: 522-33.
33. **Cavallari G, Zuellig RA, Lehmann R, Weber M, Moritz W.** Rat pancreatic islet size standardization by the „hanging drop“ technique. *Transplant Proc.* 2007; 39: 2018-20.
34. **Chang AY, Noble RE, Wyse BM.** Streptozotocin-induced diabetes in the Chinese hamster. *Biochemical and endocrine disorders. Diabetologia.* 1977; 13: 595-602.

35. **Chen YN, Chen SY, Zeng LJ, Ran JM, Wu MY.** Progressive decrease of proinsulin secretion in sulphonylurea-treated type 2 diabetes. *Br J Biomed Sci.* 2005; 62: 5-8.
36. **Cheng AY, Fantus IG.** Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ.* 2005; 172: 213-26.
37. **Cho SK, Bourdeau A, Letarte M, Zúñiga-Pflücker JC.** Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. *Blood.* 2001; 98: 3635-42.
38. **Churchill P, Churchill M, Bidani A, Dunbar J Jr.** Streptozotocin-induced renal hemodynamic changes in isogenic Lewis rats: a kidney transplant study. *Am J Physiol.* 1993; 264: 100-5.
39. **Cirulli V, Baetens D, Rutishauser U, Halban PA, Orci L, Rouiller DG.** Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci.* 1994; 107: 1429-36.
40. **Claudino M, Ceolin DS, Alberti S, Cestari TM, Spadella CT, Rubira-Bullen IR, Garlet GP, de Assis GF.** Alloxan-induced diabetes triggers the development of periodontal disease in rats. *PLoS One.* 2007; 2: 1320.
41. **Cooper DK, Novitzky D, Wicomb WN.** The pathophysiological effects of brain death on potential donor organs, with particular reference to the heart. *Ann r Coll Surg Engl.* 1989; 71: 261-6.
42. **Cryer PE.** The barrier of hypoglycemia in diabetes. *Diabetes.* 2008; 57: 3169-76. Review.
43. **Cui YF, Ma M, Wang GY, Han DE, Vollmar B, Menger MD.** Prevention of core cell damage in isolated islets of Langerhans by low temperature preconditioning. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 545-50.
44. **Dao MA, Nolta JA.** Cytokine and integrin stimulation synergize to promote higher levels of GATA-2, c-myb, and CD34 protein in primary human hematopoietic progenitors from bone marrow. *Blood.* 2007; 109: 2373-9.
45. **DeFronzo RA.** Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia.* 1992, 35: 389-97.
46. **DeLisser HM, Scott Baldwin H, Albelda SM.** Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1/CD31): A Multifunctional Vascular Cell Adhesion Molecule. *Trends Cardiovasc Med.* 1997, 6: 203-210.
47. **Deng S, Markmann JF, Rickels M, Yeh H, Kim JI, Lian MM, Gu Y, Markmann E, Palanijan M, Barker CF, Naji A.** Islet alone versus islet after kidney transplantation: metabolic outcomes and islet graft survival. *Transplantation.* 2009; 88: 820-5.
48. **Dinsmore JH, Manhart C, Raineri R, Jacoby B, Moore A.** No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells. *Transplantation.* 2000; 15: 1382-9.
49. **Dufrane D, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P.** Six-month survival of microencapsulated pig islets and alignate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation.* 2006; 81: 1345-53.
50. **Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML.** tek, a novel tyrosine

- kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*. 1992; 7: 1471-80.
51. **Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin NM.** Ligand-dependent development of the endothelial and hematopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 5141-6.
 52. **Eisenbarth GS.** Type 1 diabetes: A chronic autoimmune disease. *The New England Journal of medicine*. 1986; 314: 1360-1368.
 53. **Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T.** A choice of death - the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001; 44: 2115–2133.
 54. **Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S.** Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000; 43: 1528-33.
 55. **Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K.** Technical report: a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med*. 1980; 177: 125.
 56. **Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W.** Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*. 1998; 140: 947-59.
 57. **Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE.** Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. 2005; 5: 566-71.
 58. **Folkman J.** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995; 1: 27-31. Review.
 59. **Franco OH, Steyerberg EW, Hu FB, Mackenbach J, Nusselder W.** Associations of diabetes mellitus with total life expectancy and life expectancy with and without cardiovascular disease. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 1145-51.
 60. **Fraser PA, Henderson JR.** The arrangement of endocrine and exocrine pancreatic micro-circulation observed in the living rabbit. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1980; 65: 151-8.
 61. **Freiberg C.** Häufigkeit des Diabetes mellitus bei Kindern und Jugendlichen. Beitrag zum Tag der Medizin 2004, Göttingen. www.humanmedizin-goettingen.de/media/global/tag_der_medizin/tm_2004_diabetes_bei_kinder_u_jugendlichen.pdf.
 62. **Giani G, Janka HU, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A, Rathmann W, Rosenbauer J.** Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. 2004, Scherbaum WA, Kiess W (eds.). In: *Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft*. http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL_Epidemiologie_Update_2004.pdf.
 63. **Goldkuhl R, Klockars A, Carlsson HE, Hau J, Abelson KS.** Impact of surgical severity and analgesic treatment on plasma corticosterone in rats during surgery. *Eur Surg Res*. 2010; 44: 117-23.
 64. **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* 1987; 43: 725-30.

65. **Grayson MH, Chaplin DD, Karl IE, Hotchkiss RS.** Confocal fluorescent intravital microscopy of the murine spleen. *J Immunol Methods*. 2001; 256: 55-63.
66. **Griffith RC, Scharp DW, Hartman BK, Ballinger WF, Lacy PE.** A morphologic study of intrahepatic portal-vein islet isografts. *Diabetes*. 1977; 26: 201-14.
67. **Gruessner RW, Sutherland DE, Troppmann C, Benedetti E, Hakim N, Dunn DL, Gruessner AC.** The surgical risk of pancreas transplantation in the cyclosporine era: an overview. *J Am Coll Surg*. 1997; 185: 128-44.
68. **Gruessner AC, Sutherland DE.** Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant*. 2005; 19: 433-55.
69. **Gurney AM, Howarth FC.** Effects of streptozotocin-induced diabetes on the pharmacology of rat conduit and resistance intrapulmonary arteries. *Cardiovasc Diabetol*. 2009; 8: 4.
70. **Gustafsson AJ, Islam MS.** Islet of Langerhans: Cellular Structure and Physiology. In: *Chronic Allograft Failure: Natural History, Pathogenesis, Diagnosis and Management*, edited by N. Ahsan, Austin: Landes Bioscience, 2007.
71. **Haidinger M, Werzowa J, Voigt HC, Pleiner J, Stemer G, Hecking M, Döller D, Hörl WH, Weichhart T, Säemann MD.** A randomized, placebo-controlled, double-blind, prospective trial to evaluate the effect of vildagliptin in new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation. *Trials*. 2010; 11: 91.
72. **Halban PA, Powers SL, George KL, Bonner-Weir S.** Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets. *Diabetes*. 1987; 36: 783-90.
73. **Harborne LR, Sattar N, Norman JE, Fleming R.** Metformin and weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome: comparison of doses. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 4593-8.
74. **Harper AA, Raper HS.** Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine. *J Physiol*. 1943; 102: 115-25.
75. **Hauge-Evans AC, Squires PE, Persaud SJ, Jones PM.** Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca^{2+} and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes*. 1999; 48: 1402-8.
76. **Hauner H, Köster I, Schubert I.** Prevalence of Diabetes Mellitus and Quality of Care in Hessen, Germany, 1998–2004. Analysis of the Sample AOK Hessen/KV Hessen, 1998–2004 *Dtsch Arztebl* 2007; 104: 2799–805.
77. **Hedekov CJ.** Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev*. 1980; 60: 442-509.
78. **Heller G, Günster, C, Schellschmidt H.** Wie häufig sind Diabetes-bedingte Amputationen unterer Extremitäten in Deutschland? *Dtsch med Wochenschr*. 2004; 129: 429-433.
79. **Hellman B, Petersson, Hellerström C.** The growth pattern of the endocrine pancreas in mammals. In: *Structure and metabolism of the pancreatic islets*, Brolin S, Hellman B und Knutson H, Pergamon, Oxford. 1964: 45-60.

80. **Herr RR, Jahnke JK, Argoudelis AD.** The structure of streptozotocin. *J Am Chem Soc.* 1967; 89: 4808-9.
81. **Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA.** The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002; 48: 1819-27.
82. **Hiller WFA, Klempnauer J, Lueck R, Steiniger B.** Progressive deterioration of endocrine function after intraportal but not kidney subcapsular rat islet transplantation. *Diabetes.* 1991; 40: 134-140.
83. **Hobbs JB, Chusilp S, Hua A, Kincaid-Smith P, McIver MA.** The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976; 3: 73-75.
84. **Hoover-Plow JL, Clifford AJ.** The metabolic effects of surgical trauma on growing rats. *J Nutr.* 1978; 108: 1830-41.
85. **Horaguchi A, Merrell RC.** Preparation of viable islet cells from dogs by a new method. *Diabetes.* 1981; 30: 455-8.
86. **Huismans, Horst:** Lexikon der klinischen Diabetologie: praxisorientierte interdisziplinäre Darstellung.
87. **Hunter P.** Xeno's paradox: why pig cells are better for tissue transplants than human cells. *EMBO Rep.* 2009; 10: 554-7.
88. **Hürter P.** Epidemiologie des Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. In: *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. Grundlagen – Klinik – Therapie.* Springer Verlag, 2005.
89. **International Diabetes Federation (IDF).** Diabetes Atlas: Diabetes epidemic out of control. Presseausendung 04. Dez. 2006. <http://www.idf.org/diabetes-epidemic-out-of-control>.
90. **International Pancreas Transplant Registry (IPTR).** http://www.iptr.umn.edu/annual_reports/2004_annual_report/2_total/home.html
91. **Jaques F, Jousset H, Tomas A, Prost AL, Wollheim CB, Irminger JC, Demaurex N, Halban PA.** Dual effect of cell-cell contact disruption on cytosolic calcium and insulin secretion. *Endocrinology.* 2008; 149: 2494-505.
92. **Jaeckel E, Lehner F.** Pancreas and islet transplantation. *Internist.* 2009; 50: 536-49.
93. **Jones TR, Kao KJ, Pizzo SV, Bigner DD.** Endothelial cell surface expression and binding of factor VIII/von Willebrand factor. *Am J Pathol.* 1981; 103: 304-8.
94. **Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE.** Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* 1969; 48: 2129-39.
95. **Kalsi K, Lawson C, Dominguez M, Taylor P, Yacoub MH, Smolenski RT.** Regulation of ecto-5'-nucleotidase by TNF-alpha in human endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2002; 232: 113-9.
96. **Kampf , Mattsson G, Carlsson PO.** Size-dependent revascularization of transplanted pancreatic islets. *Cell Transplant.* 2006; 15: 205-9.
97. **Kang L, Chen Q, Wang L, Gao L, Meng K, Chen J, Ferro A, Xu B.** Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in

- diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009; 36: 47-56.
98. **Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC.** Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 1967; 61: 827-837.
 99. **Kerner W, Brückel B, Böhm O.** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: Evidenz-basierte Diabetes-Leitlinien DDG: Scherbaum WA, Lauterbach KW, Joost HG (Hrsg.). 1. Auflage. Deutsche Diabetes-Gesellschaft 2001. Evidenzbasierte Leitlinie DDG – Aktualisierung 10/2004.
 100. **Kikutani H, Makino S.** The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol*. 1992; 51: 285-322.
 101. **Klar E, Herfarth C, Messmer K.** Therapeutic effect of isovolemic hemodilution with dextran 60 on the impairment of pancreatic microcirculation in acute biliary pancreatitis. *Ann Surg*. 1990; 211: 346-53.
 102. **Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H.** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech*. 1997; 42: 168-75.
 103. **Korsgren O, Nilsson B, Berne C, Felldin M, Foss A, Kallen R, Lundgren T, Salmela K, Tibell A, Tufveson G.** Current status of clinical transplantation. *Transplantation*. 2005; 79: 1289-93.
 104. **Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD, Vollmar B.** Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res*. 2000; 49: 192-9.
 105. **Kruschewski M, Foitzik T, Perez-Canto A, Hubotter A, Buhr HJ.** Changes of colonic mucosal microcirculation and histology in two colitis models. An experimental study using intravital microscopy and a new histological scoring system. *Dig Dis Sci*. 2001; 46: 2336-2343.
 106. **Kuo CY, Herrod HG, Burghen GA.** Formation of pseudoislets from human pancreatic cultures. *Pancreas*. 1992; 7: 320-5.
 107. **Lacy PE, Kostianovsky M.** Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967; 16: 35-9.
 108. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
 109. **Lampeter EF, Tubes M, Klemens C, Brocker U, Friemann J, Kolb-Bachofen V, Gries FA, Kolb H.** Insulinitis and islet-cell antibody formation in rats with experimentally reduced beta-cell mass. *Diabetologia*. 1995; 38: 1397-404.
 110. **Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K.** Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Ann Plast Surg*. 2002; 48: 53-9.
 111. **Lehmann R, Pavlicek V, Spinass GA, Weber M.** Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus. *Ther Umsch*. 2005; 62: 481-6. Review.
 112. **Lehmann R.** Pseudoislet biology and possible approach for transplantation. Islet Cell Resource Center (ICR) Consortium 4th annual islet workshop. 2008. <http://icr.coh.org/>

docs/Abstracts/10032008/Lehman.pdf

113. **Lehmann R, Spinas GA, Moritz W, Weber M.** Has time come for new goals in human islet transplantation? *Am J Transplant.* 2008; 8: 1096-100.
114. **Lehmann R, Zuellig RA, Kugelmeier P, Baenninger PB, Moritz W, Perren A, Clavien PA, Weber M, Spinas GA.** Superiority of small islets in human islet transplantation. *Diabetes.* 2007; 56: 594-603.
115. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K.** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1055-1062.
116. **Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzl CR, Gries N, Schenk RK, Ganz R.** Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone: comparison of isograft and allograft bone in mice. *Acta Orthop Scand.* 1999; 70: 374-80.
117. **Li M, Yu J, Li Y, Li D, Yan D, Ruan Q.** CXCR4⁺ progenitors derived from bone mesenchymal stem cells differentiate into endothelial cells capable of vascular repair after arterial injury. *Cell Reprogram.* 2010; 12: 405-15.
118. **Like AA, Appel MC, Williams RM, Rossini AA.** Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies. *Lab Invest.* 1978; 38: 470-86.
119. **Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE.** Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observation. *Acta Physiol Scand.* 1982 ; 114: 121-7.
120. **Linn T, Schneider K, Hammes HP, Preissner KT, Brandhorst H, Morgenstern E, Kiefer F, Bretzel RG.** Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. *FASEB J.* 2003; 17: 881-3.
121. **Liong SY, Dixon R, Chalmers N, Tavakoli A, Augustin T, O'Shea S.** Complications following pancreatic transplantations: imaging features. *Abdom Imaging.* 2010; [Epub ahead of print].
122. **Lipowsky HH, Zweifach BW.** Application of the „two-slit“ photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc res.* 1978; 15: 93-101.
123. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-271.
124. **Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R.** Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001; 292: 1389.
125. **Mandrup-Poulsen T.** The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia.* 1996. 39: 1005-1029.
126. **Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH.** Affinity-purified human interleukin I is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia.* 1986; 29: 63-67.
127. **Mansford KR, Opie L.** Comparison of abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet.* 1968; 1: 670-1.
128. **Manske CL.** Risks and benefits of kidney and pancreas transplantation for diabetic pa-

- tients. *Diabetes Care*. 1999; 22: 114-20.
129. **Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR.** Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*. 1992; 340: 925-929.
130. **Mattsson G, Jansson L, Carlsson PO.** Vascular density in mouse pancreatic islets after transplantation. *Cell Transplant. Diabetes*. 2002; 751: 1362-1366.
131. **McEvoy RC, Anderson J, Sandler S, Hellerström C.** Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. *J Clin Invest*. 1984; 74: 715-22.
132. **Mehnert H, Schulz F.** Zeittafel zur Geschichte des Diabetes mellitus. In: *Diabetologie in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag, 1999.
133. **Meienhofer J, Schnabel E, Bremer H, Brinkhoff O, Zabel R, Sroka W, Klostermayer H, Brandenburg D, Okuda T, Zahn H.** Synthesis of insulin chains and their combination to insulin-active preparations. *Z Naturforsch B*. 1963; 18: 1120-1.
134. **Melchionda N, Forlani G, Marchesini G, Baraldi L, Natale S.** WHO and ADA criteria for the diagnosis of diabetes mellitus in relation to body mass index. Insulin sensitivity and secretion in resulting subcategories of glucose tolerance. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26: 90-6.
135. **Menger MD, Jäger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K.** Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes*. 1989, 38: 199-201.
136. **Menger MD, Jager S, Walter P, Hammersen F, Messmer K.** A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1990; 9: 103-117.
137. **Menger MD, Barker JH, Messmer K.** Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 89: 1104-14.
138. **Menger MD, Vajkoczy P, Beger C, Messmer K.** Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts. *The Journal of clinical investigation* 1994; 93: 2280-2285.
139. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B.** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002; 34: 83-91.
140. **Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B.** Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg*. 2001; 25: 509-15. Review.
141. **Merchant FA, Diller KR, Aggarwal SJ, Bovik AC.** Angiogenesis in cultured and cryopreserved pancreatic islet grafts. *Transplantation*. 1997; 63: 1652-60.
142. **Messmer K, Funk W, Endrich B, Zeintl H.** The perspectives of new methods in microcirculation research. In: *Messmer K. Progress in applied microcirculation*, Karger, Basel 1984; 6: 77-90.
143. **Messmer K, Krombach F.** Microcirculation research in experimental surgery. *Chirurg*. 1998; 69: 333-8.
144. **Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Malik AB.** Vesicle formation and trafficking in

- endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol.* 2002; 117:105-12.
145. **Mithöfer K, Schmidt J, Gebhard MM, Buhr HJ, Herfarth C, Klar E.** Measurement of blood flow in pancreatic exchange capillaries with FITC-labeled erythrocytes. *Microvasc Res.* 1995; 49: 33-48.
146. **Modak MA, Datar SP, Bhonde RR, Ghaskadbi SS.** Differential susceptibility of chick and mouse islets to streptozotocin and its co-relation with islet antioxidant status. *J Comp Physiol B.* 2007; 177: 247-57.
147. **Moskalewski S.** Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol.* 1965; 44: 342-53.
148. **Murakami T, Fujita T, Taguchi T, Nonaka Y, Orita K.** The blood vascular bed of the human pancreas, with special reference to the insulo-acinar portal system. Scanning electron microscopy of corrosion casts. *Arch Histol Cytol.* 1992; 55: 381-95.
149. **Nir T, Melton DA, Dor Y.** Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2553-61.
150. **Nyqvist D, Köhler M, Wahlstedt H, Berggren PO.** Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. *Diabetes.* 2005; 54: 2287-93.
151. **Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H.** Ablation of „tolerance“ and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell.* 1991; 65: 305-17.
152. **Olsson R, Carlsson PO.** Better vascular engraftment and function in pancreatic islets transplanted without prior culture. *Diabetologia.* 2005; 48: 469-76.
153. **Palmer RM, Moncada S.** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158: 348-52.
154. **Papaccio G, Graziano A, D'Àquino R, Valiante S, Naro F.** A biphasic role of nuclear transcription factor (NF)-kappaB in the islet beta-cell apoptosis induced by interleukin (IL)-1beta. *J Cell Physiol.* 2005; 204: 124-30.
155. **Paquin AJ, Lange J.** Studies on postoperative body weight loss. *Ann Surg.* 1956; 144: 809-15.
156. **Paraskevas S, Maysinger D, Wang R, Duguid TP, Rosenberg L.** Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas.* 2000; 20: 270-6.
157. **Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F.** Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995 Jul; 269: 540-3.
158. **Penforinis A, Kury-Paulin S.** Immunosuppressive drug-induced diabetes. *Diabetes Metab.* 2006; 32: 539-46. Review.
159. **Pierelli L, Bonanno G, Rutella S, Marone M, Scambia G, Leone G.** CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma.* 2001; 42: 1195-206. Review.
160. **Pliska V, Folkers G, Eberle AN.** Biofokus: Insulin - Eine Erfolgsgeschichte der moder-

- nen Medizin. 2005. <http://www.forschung-leben.ch/download/BioFokus69>.
161. **Pöss J, Werner C, Lorenz D, Gensch C, Böhm M, Laufs U.** The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. *Basic Res Cardiol.* 2010; [Epub ahead of print].
162. **Rees DA, Alcolado JC.** Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005; 22: 359-70. Review.
163. **Rett K, Wicklmayr M, Standl E.** The metabolic syndrome. Pathophysiologic causes, diagnosis, therapy. *Wien Klin Wochenschr.* 1994; 106: 750-757.
164. **Riachy R, Vandewalle B, Kerr Conte J.** 1,25 dihydroxyvitamin D3 protects RIN m5F and human islets cells against cytokines-induced apoptosis implication of the anti apoptotic protein A20. *Endocrinology.* 2002; 143: 4809-4819.
165. **Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM, Lake SP, London NJ, Socci C, Alejandro R, et al.** Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat.* 1990; 27: 185-95.
166. **Robles GI, Singh-Franco D.** A review of exenatide as adjunctive therapy in patients with type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther.* 2009; 3: 219-40.
167. **Roep BO, Kallan AA, Hazenbos WL, Bruining GJ, Bailyes EM, Arden SD, Hutton JC, de Vries RR.** T-cell reactivity to 38 kDa insulin-secretory-granule protein in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Lancet.* 1991; 337: 1439-41.
168. **Rogers SA, Mohanakumar T, Liapis H, Hammerman MR.** Engraftment of cells from porcine islets of Langerhans and normalization of glucose tolerance following transplantation of pig pancreatic primordia in nonimmune-suppressed diabetic rats. *Am J Pathol.* 2010; 177: 854-864.
169. **Ryan EA, Lakey JRT, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S.** Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes.* 2001; 50: 710-9.
170. **Samols E, Stagner JI, Ewart RB, Marks V.** The order of islet microvascular cellular perfusion is B----A----D in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest.* 1988; 82: 350-3.
171. **Scherbaum WA, Kiess W.** Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland: Evidenzbasierte Leitlinie DDG - Aktualisierung 05/2004. http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL_Epidemiologie_Update_2004.pdf
172. **Schmidt J, Hotz HG, Foitzik T, Ryschich E, Buhr HJ, Warshaw AL, Herfarth C, Klar E.** Intravenous contrast medium aggravates the impairment of pancreatic microcirculation in necrotizing pancreatitis in the rat. *Ann Surg.* 1995; 221: 257-64.
173. **Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB.** STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 1994; 43: 1326-33.
174. **Schramm R, Scheuer C, Yamauchi J, Vollmar B, Menger MD.** Heat shock preconditioning impairs revascularization of freely transplanted pancreatic islets. *Transplantation.* 2002; 74: 1544-50.
175. **Schramm R, Menger MD, Kirsch S, Langer F, Harder Y, Hamacher J, Schäfers HJ.** The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multicolor fluorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 134: 210-

- 7.
176. **Schuit FC, In't Veld PA, Pipeleers DG.** Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependant recruitment of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 3865-3869.
177. **Shapiro AM, 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 immuno-suppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343: 230-238.
178. **Shapiro AM, Shaw JA.** Islet transplantation and beta cell replacement therapy, 2007, Informa Healthcare
179. **Simionescu M, Simionescu N.** Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev.* 1991; 25: 5-78.
180. **Soria B, Skoudy A, Martin F.** From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2001; 44: 407-15.
181. **Spangrude GJ, Scollay R.** A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 1990; 18: 920-6.
182. **Specke V, Rubant S, Denner J.** Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology.* 2001; 285: 177-80.
183. **Srinivasan P, Huang GC, Amiel SA, Heaton ND.** Islet cell transplantation. *Postgrad Med J.* 2007; 83: 224-229. Review.
184. **Stagner J, Rilo HL, White KK.** The Pancreas as an Islet Transplantation Site. Confirmation in a Syngeneic Rodent and Canine Autotransplant Model. *JOP. J Pancreas.* 2007; 8: 628-636.
185. **Steinberg W, Tenner S.** Acute pancreatitis. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1198-210.
186. **Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC.** Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet.* 1985;19: 463-84.
187. **Sutherland DE, Gores PF, Farney AC, Wahoff DC, Matas AJ, Dunn DL, Gruessner RW, Najarian JS.** Evolution of kidney, pancreas, and islet transplantation for patients with diabetes at the University of Minnesota. *Am J Surg.* 1993; 166: 456-91.
188. **Sutton TA, Horbelt M, Sandoval RM.** Imaging vascular pathology. *Nephron Physiol.* 2006; 103: 82-5.
189. **Timmins NE, Nielsen LK.** Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med.* 2007; 140: 141-51.
190. **Trimble ER, Halban PA, Wollheim CB, Renold AE.** Functional differences between rat islets of ventral and dorsal pancreatic origin. *J Clin Invest.* 1982, 69: 405-13.
191. **Tze WJ, Tai J.** Preparation of pseudoislets for morphological and functional studies. *Transplantation.* 1982; 34: 228-31.
192. **Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K.** Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation.* 1995; 60: 123-7.
193. **Vajkoczy P, Vollmar B, Wolf B, Menger MD.** Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans. *Journal of molecular medicine* 1999; 77: 111-114.

194. **Vajkoczy P, Menger MD, Goldbrunner R, Ge S, Fong TA, Vollmar B, Schilling L, Ullrich A, Hirth KP, Tonn JC, Schmiedek P, Rempel SA.** Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC. *Int J Cancer*. 2000; 87: 261-8.
195. **Valdes-Gonzalez RA, Dorantes LM, Garibay GN, Bracho-Blanchet E, Mendez AJ, Davila-Perez R, Elliott RB, Teran L, White Dj.** Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur J Endocrinol*. 2005; 153: 419-27.
196. **van der Laan LJ, Lockey , Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Hering BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR.** Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature*. 2000; 407: 90-4.
197. **Vanheule E, Geerts AM, Van Huysse J, Schelfhout D, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I.** An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol*. 2008; 89: 419-32.
198. **Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokoloski WT.** Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu*. 1959-1960; 7: 230-5.
199. **Venstrom JM, McBride MA, Rother KI, Hirshberg B, Orchard TJ, Harlan DM.** Survival after pancreas transplantation in patients with diabetes and preserved kidney function. *JAMA*. 2003; 290: 2817-23.
200. **Virtanen SM, Knip M.** Nutritional risk predictors of cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr*. 2003; 78: 1053-67.
201. **Vollmar B, Rischter S, Menger MD.** Liver ischemia/reperfusion induces an increase of microvascular leukocyte flux, but not heterogeneity of leukocyte trafficking. *Liver*. 1997; 17: 93-8.
202. **Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A.** Beta-cell adaption and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*. 2001; 50: 154-9.
203. **Weisberger EK, Ward JM, Brown CA.** Dibenzamine: selective protection against diethylnitrosamine-induced hepatic carcinogenesis but not oral, pharyngeal and esophageal carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1974; 28: 477-84.
204. **Weiß J, Mae J und Nebendahl K.** Haus- und Versuchstierpflege. Enke Verlag, Stuttgart 2. berarbeitete Auflage, 2003.
205. **Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV.** Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008; 455: 1109-13.
206. **WHO World Health Organization.** Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF consultation. 2006.
207. **Wierup N, Sundler F.** Ultrastructure of islet ghrelin cells in the human fetus. *Cell Tissue Res*. 2005; 319: 423-8.
208. **Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.** Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27: 1047-53.

209. **Wittingen J, Frey CF.** Islet concentration in the head, body, tail and uncinat process of the pancreas. *Ann Surg.* 1974; 179: 412-4.
210. **Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE.** Bone-marrow derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen.* 2007; 1: 18-26. Review.
211. **Wucherpfennig KW.** Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1097-104. Review.
212. **Yamauchi JI, Vollmar B, Wolf B, Menger MD.** Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg.* 1999; 16: 400-6.
213. **Yang C, Zhang ZH, Li ZJ, Yang RC, Qian GQ, Han ZC.** Enhancement of neovascularization with cord blood CD133⁺ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost* 2004; 91: 1202-12.
214. **Yoon JW, Jun HS.** Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 928: 200-11. Review.
215. **Yoshimi Y, Narimatsu A, Nakayama K, Sekine S, Hattori K, Sakai K.** Development of an enzyme-free glucose sensor using the gate effect of a molecularly imprinted polymer. *J Artif Organs.* 2009; 12: 264-70.
216. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425-32.
217. **Zhang Y, Wat N, Stratton IM, Warren-Perry MG, Orho M, Groop L, et al.** UKPDS 19: Heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and beta 3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. *UK Prospective Diabetes Study. Diabetologia.* 1996; 39: 1505-11.
218. **Zhang W, Zhang G, Jin H, Hu R.** Characteristics of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in aged mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 348: 1018-23.
219. **Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E.** Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the german BABYDIAB study. *Diabetes* 1999; 48: 460-8.
220. **Ziegler M, Ziegler B, Hehmke B, Dietz H, Hildmann W, Kauert C.** Autoimmune response directed to pancreatic beta cells in rats induced by combined treatment with low doses of streptozotocin and complete Freud's adjuvant. *Biomed Biochim Acta.* 1984; 43: 675-81.
221. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J.** Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001; 414: 782-7. Review.
222. **Zimmet PZ, Shaten BJ, Kuller LH, Rowley MJ, Knowles WJ, Mackay IR.** Antibodies to glutamic acid decarboxylase and diabetes mellitus in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol.* 1994; 140: 683-90.

9. Danksagung

An dieser Stelle seien all jene erwähnt, die wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar. Danken möchte ich ihm dabei für die Bereitstellung des Themas, für die hilfreichen Anregungen während der Versuchsdurchführungen und für seine kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Matthias W. Laschke, stellvertretender Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, für die intensive persönliche Betreuung während der gesamten Doktorarbeit.

Desweiteren möchte ich Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer danken für ihre stets präsente fachliche, als auch moralische Unterstützung während der gesamten Zeit.

Mein weiterer Dank gilt Frau Julia Parakenings für ihre Hilfe bei der Aufarbeitung von Zellen für die Proteinbiochemie. Darüber hinaus möchte ich Frau Ruth M. Nickels danken für ihre kompetente Hilfe bei der FACS-Analyse. Frau Janine Becker und Frau Sandra Schuler danke ich sehr für ihre Unterstützung bei der Immunhistochemie.

Auch bei all meinen anderen Kolleginnen und Kollegen, die mich über die ganze Zeit hin begleitet haben, möchte ich mich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung auf arbeitstechnischer als auch menschlicher Ebene bedanken.

Die Zeit als Doktorandin im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie werde ich nie vergessen und ich möchte die gesammelten Erfahrungen auch nicht missen.

10. Lebenslauf

Geboren am: 20. 04.1978

Geboren in: Saarlouis

Familienstand: ledig

Eltern: Heinrich Wittig,
Ingrid Wittig, geb. Fix

Schulische Ausbildung: Aug. 1984 - Juli 1988
Grundschule Römerberg Saarlouis

Sept. 1988 - Juni 1997
Max-Planck-Gymnasium Saarlouis,
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Universitäre Ausbildung: Okt. 1997 - Juni 1998
2 Semester Kunstgeschichte an der Universität
des Saarlandes, Saarbrücken

Okt. 1998 - April 2003
Studium der Biologie an der Universität des
Saarlandes, Saarbrücken

Aug. 2000 - Sept. 2000
mündliche Vordiplomprüfungen
Prüfungsfächer: Zoologie, Botanik, Genetik,
Mikrobiologie

Feb. 2003 - April 2003
mündliche Diplomprüfungen
Prüfungsfächer: Genetik (Hauptfach), Virologie
und Mikrobiologie (Nebenfächer)

Juli 2003 - Juni 2004
Anfertigung der Diplomarbeit im Onkologischen
Labor der Inneren Medizin I der medizinischen
Abteilung der Universität des Saarlandes an der
Universitätsklinik in Homburg/Saar,
Abschluss Diplom

Berufliche Ausbildung: April 2005 - aktuell
Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für
Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität
des Saarlandes an der Universitätsklinik in Hom-
burg/Saar

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die von mir vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde zulässige Hilfe angefertigt worden ist. Alle Ausführungen, die anderen Schriften sowohl wörtlich als auch sinngemäß entnommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere desweiteren, dass die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse und Daten bislang nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung waren.

Datum

Unterschrift

12. Veröffentlichungen

1. Wadle A, Kubuschok B, Imig J, Wuellner B, **Wittig C**, Zwick C, Mischo A, Waetzig K, Romeike BF, Lindemann W, Schilling M, Pfreundschuh M, Renner C. Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2006; 119: 117-25.
2. **Wittig C**, Laschke MW, Menger MD. Intravitalmicroscopic analysis of vascularization of transplanted pancreatic islets, pseudoislets and modified pseudoislets. *Langenbecks Arch Surg*. 2008; 393: 759-815. (Abstract)
3. **Wittig C**, Laschke MW, Menger MD. Intravital microscopic analysis of vascularization of transplanted pancreatic islets, pseudoislets and modified pseudoislets. *Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2009*; Springer Verlag, Heidelberg, Volume 38, pp 167-169.
4. **Wittig C**, Laschke MW, Scheuer C, Menger. MD. Vascularization and blood perfusion of transplanted pancreatic Islets is improved by incorporation of bone marrow cells. *Langenbecks Arch Surg*. 2010; 395: 769–829. (Abstract)
5. **Wittig C**, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD. (2010) Increase in functionality of in vitro generated modified pseudoislets (ModPI) by incorporation of bone marrow derived cells to enhance revascularization and long-term survival after transplantation in the diabetic animal model. (In preparation)* **

* Angaben zu Autoren, Titel und Veröffentlichungsdatum sind vorläufig

** Manuskriptentwurf liegt bei