

**Erschließung, Charakterisierung und
dynamische Kultivierung einer autologen
humanen Zellquelle zur Endothelialisierung
einer bioartifiziellen Gefäßprothese**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Xenia Sabina Maria Kraus, M. Sc.

2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferentin: Prof. Dr. med. Cornelia Blume

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. habil. Ralf Pörtner

Tag der Promotion: 30.11.2022

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am Institut für Technische Chemie anzufertigen.

Ganz herzlich danke ich Frau Prof. Dr. med Cornelia Blume für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, das hochspannende Forschungsthema, die wissenschaftliche Anleitung, ihre motivierende Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen während der gesamten Promotion. Nicht zuletzt gehört dazu auch ein Dankeschön für die Begutachtung der Arbeit durch die Übernahme des Korreferats. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Ralf Pörtner meinen Dank für die Übernahme des Korreferats ausdrücken.

Ebenfalls danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Marie Weinhart für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Darüber hinaus gilt mein herzlichster Dank Stefanie Thoms und Rebecca Jonczyk für die fürsorgliche Betreuung und ein stets offenes Ohr bei allen theoretischen sowie praktischen Problemen. Gleichzeitig bedanke ich mich auch bei Martin Witt und Michael Pflaum für die tatkräftige Hilfestellung und Unterstützung rund um die q-RT-PCR. Außerdem möchte ich meinen besonderen Dank Edda van de Fliert für die schöne und angenehme Zusammenarbeit im Büro und Labor aussprechen. Vielen Dank auch an Tanja Hesse, Danijel Saveski und Bernd Wolfering für die wertvolle Unterstützung im NIFE sowie an Martina Weiß, Martin Pähler und Ulrike Dreschel für die Hilfe bei sämtlichen Angelegenheiten während des TCI-Institutsalltags.

Zudem danke ich Gresa Hasani, Lale Zerdali, Lea Finkbeiner und Kristina Miller für die engagierte und tolle Mitarbeit während ihrer Master- und Bachelorarbeiten.

Weiterhin möchte mich beim gesamten TCI und NIFE für die besondere Zeit während meiner Promotion bedanken. Vielen Dank an alle aus meiner Arbeitsgruppe für die stete Unterstützung mit Schokolade und Kuchen. Außerdem danke ich besonders Nils und Fabian für die stets gute Laune und Geduld bei allen technischen und untechnischen Fragen. Ein riesiges Dankeschön geht auch an Rebecca und Lisa, die sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit zu korrigieren. Danke euch!

Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt meiner kleinen wie auch großen Familie sowie all meinen Freunden für die bedingungslose Unterstützung, Geduld und das immerwährende Vertrauen, das mir stets den Rücken gestärkt hat.

Kurzfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Kultivierungskonzepts zur Endothelialisierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. Dazu wurde zunächst eine passende patienteneigene (autologe) Endothelzellquelle gesucht, die den klinischen Anforderungen einer endothelialisierten Gefäßprothese entsprachen. Dazu zählt, dass die verwendeten Endothelzellen einer leicht zugänglichen Quelle entstammen und immunologisch neutral eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) aus dem peripheren Blut in hoher Anzahl in unbeschichteten Zellkulturgefäßen ohne den Zusatz von artifiziellen Matrixproteinen isoliert und vermehrt werden konnten. Durch die Vermeidung fremdartiger (allogener) Oberflächenbeschichtungen wurden Richtlinien für Arzneimittel neuartiger Therapien (ATMP) berücksichtigt, die für die zukünftige medizinische Zulassung der bioartifiziellen Gefäßprothese relevant sind. Neben der immunologischen Neutralität der Zellen sollten die angesiedelten Endothelzellen auch ihre funktionellen und adhäsiven Eigenschaften unter *in vivo* Strömungsbedingungen beibehalten. Daher wurde die Auswirkung verschiedener Scherstressprofile sowie der Einfluss eines physiologischen Pulses auf die Funktion sowie Mechanosensitivität der isolierten ECFCs im Vergleich zu klassischen endothelialen Modellzellen aus der Literatur, den humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs), untersucht. Ein pulsatiler arterieller Scherstress erwies sich dabei als erforderlich, um in ECFCs eine signifikante Veränderung der Zellmorphologie, Zellausrichtung und Zell-Zell-Verbindungen hervorzurufen. Zudem wurde analysiert, inwieweit eine Vorkonditionierung unter einem hohen Scherstress zur arteriellen Differenzierung der unreifen ECFCs führte. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine dynamische Kultivierung der ECFCs unter einem arteriellen Scherstress ein Genprofil induzierte, das mehr in Richtung eines arteriellen als eines venösen Phänotyp weist. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Vorkonditionierung von ECFCs unter Fluss eine Unterdrückung atherogener Marker sowie eine Hochregulierung antithrombotischer Gene selbst unter dem Einfluss eines inflammatorischen Zytokins induzierte. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit die isolierten ECFCs die Fähigkeit besitzen, durch die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB in Gefäßmuskelzellähnliche Zellen zu transdifferenzieren. Dabei konnte eine signifikante Hochregulierung Gefäßmuskelzellähnlicher Marker mit zunehmender PDGF-BB-Konzentration im Medium in ECFCs nachgewiesen werden.

Schlagwörter: Endothelialisierung, bioartifizielle Gefäßprothese, endotheliale koloniebildende Zellen, Scherstress

Abstract

The aim of this work was to establish a cultivation concept for the endothelialization of a bioartificial vascular graft. For this purpose, a suitable source of the patient's own (autologous) endothelial cells (ECs) was sought to meet clinical requirements of an endothelialized vascular prosthesis. This includes that the ECs used derive from an easily accessible source and can be used in an immunologically neutral manner. In this work it was shown that endothelial colony-forming cells (ECFCs) could be isolated from peripheral blood and cultivated for further experiments in high numbers in uncoated culture vessels without using artificial matrix proteins as additives. By avoiding foreign (allogeneic) surface coatings, guidelines for advanced therapy medicinal products (ATMP) were taken into account, which are relevant for the future medical approval of the bioartificial vascular prosthesis.

In addition to the immunological neutrality of the cells, the seeded ECs should also maintain their functional and adhesive properties under *in vivo* flow conditions. Therefore, the effect of different shear stress rates and the influence of a physiological pulse on the function and mechanosensitivity of the isolated ECFCs were investigated in comparison to model endothelial cells from the literature, the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Pulsatile arterial shear stress was found to be required to induce significant changes in cell morphology, cell alignment, and cell-cell-contacts in ECFCs.

In addition, it was analyzed to what extent preconditioning under high shear stress led to arterial differentiation of the immature ECFCs. In this context, it was shown that dynamic cultivation of ECFCs under arterial shear stress induced a gene profile that pointed more into the direction of an arterial than a venous phenotype. In addition, it was found that preconditioning of ECFCs under flow induced suppression of atherogenic markers and upregulation of antithrombotic genes even under the influence of an inflammatory cytokine.

Furthermore, it was investigated to what extent the isolated ECFCs have the ability to transdifferentiate into smooth muscle cell-like cells when stimulated with the growth factor PDGF-BB. A significant upregulation of muscle cell-like markers with increasing PDGF-BB concentration in the medium in ECFCs could be detected.

Keywords: endothelialization, bioartificial vascular graft, endothelial colony forming cells, shear stress

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	3
3 Theoretischer Teil	4
3.1 Das vaskuläre System	4
3.1.1 Aufbau und Funktion des Endothels	5
3.1.2 Hämodynamische Kräfte	8
3.1.3 Einfluss von Scherstress	10
3.2 Vaskuläres <i>Tissue Engineering</i>	12
3.2.1 Klinischer Gefäßersatz	13
3.2.2 Bioartifizielle Gefäßprothesen	13
3.2.3 Endothelialisierung von Gefäßprothesen	14
3.2.4 Bioreaktorentwicklung	15
3.3 Endotheliale Vorläuferzellen	16
3.3.1 Identifizierung und Charakterisierung	17
3.3.2 Endotheliale koloniebildende Zellen	18
3.3.3 Gefäßmuskelzellen	20
4 Ergebnisse	22
4.1 Isolation und Charakterisierung von endothelialen koloniebildenden Zellen	23
4.1.1 Vorarbeiten zur Validierung und Standardisierung des Isolationsprozesses	23
4.1.1.1 MNC pro <i>buffy coat</i>	23
4.1.1.2 Kolonieentwicklung	25

4.1.2	Isolation und Kultivierung der ECFC	29
4.1.1	Charakterisierung der ECFC	32
4.1.1.1	Verdopplungszeiten	32
4.1.1.2	Nachweis endothelialer Marker	32
4.1.1.2.1	Durchflusszytometrie.....	33
4.1.1.2.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	34
4.1.1.3	Angiogenese-Assay.....	35
4.1.2	Schlussfolgerung	36
4.2	Auswirkungen von Scherstress auf ECFCs im Vergleich zu HUVECs.....	38
4.2.1	Auswirkung verschiedener Scherstressprofile auf Mechanosensitivität der Zellen 38	
4.2.1.1	Analyse der Zellmorphologie.....	39
4.2.1.2	Untersuchung der Zell-Zell-Verbindungen.....	41
4.2.1.3	Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts	43
4.2.1.4	Rundheit der Zellen und Zellausrichtung	45
4.2.2	Auswirkung von Scherstress auf Thrombogenität der Zellen	48
4.2.3	Analyse des Glukoseverbrauchs nach dynamischer Kultivierung	49
4.2.4	Schlussfolgerung	50
4.3	Arteriovenöse Differenzierungsanalyse der isolierten ECFCs	52
4.3.1	Analyse der Verdopplungszeit	53
4.3.2	Statische versus pulsatile Kultivierung	53
4.3.2.1	Analyse der Zellmorphologie.....	54
4.3.2.2	Untersuchung der Zell-Zell-Verbindungen.....	57
4.3.2.3	Rundheit und Ausrichtung der Zellen.....	59
4.3.3	TNF- α Stimulierung und Einfluss von Puls	61
4.3.3.1	Arteriovenöse Differenzierungsanalyse	61
4.3.3.2	Thrombogenitätsanalyse	63
4.3.4	Schlussfolgerung	66

4.4	Kultivierung unter verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen zur Gefäßmuskelzellähnlichen Differenzierung	68
4.4.1	Analyse der Verdopplungszeit	68
4.4.2.1	Immunfluoreszenzanalyse	70
4.4.2.2	Genexpressionsanalyse	71
4.4.3	Analyse der Kontraktionsfähigkeit	73
4.4.4	Schlussfolgerung	74
5	Diskussion	75
5.1	Isolation und Charakterisierung von endothelialen koloniebildenden Zellen	75
5.1.1	Abgrenzung von bisherigen Isolationsprotokollen	75
5.1.2	Isolation und Kultivierung der ECFC	76
5.1.3	Charakterisierung der ECFC	78
5.2	Auswirkung von Scherstress auf ECFCs im Vergleich zu HUVECs	79
5.2.1	Analyse verschiedener Scherstressprofile auf Mechanosensitivität der Zellen .	80
5.2.2	Auswirkung von Scherstress auf Thrombogenität der Zellen	82
5.2.3	Analyse des Glukoseverbrauchs nach dynamischer Kultivierung	83
5.3	Arteriovenöse Differenzierungsanalyse der isolierten ECFCs	84
5.3.1	Phänotypische Unterschiede nach TNF- α Stimulierung und dynamischer Kultivierung mit Puls	84
5.3.2	Unterschiede der Genexpression nach TNF- α Stimulierung und dynamischer Kultivierung mit Puls	86
5.4	Kultivierung unter verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen zur Gefäßmuskelzellähnlichen Differenzierung	90
6	Zusammenfassung und Ausblick	93
7	Anhang	97
7.1	Zusätzliche Daten und Ergebnisse	97
7.1.1	Durchflusszytometrischer Nachweis endothelialer Marker	97
7.1.2	Angiogenese-Assay	100

7.2	Material.....	104
7.2.1	Chemikalien	104
7.2.2	Puffer	105
7.2.3	Medien.....	105
7.2.4	Analyse-Kits.....	105
7.2.5	Antikörper	106
7.2.6	Primer	106
7.2.7	Verbrauchsmaterialien.....	107
7.2.8	Geräte	108
7.3	Methoden	109
7.3.1	Grundlagen der Zellkulturtechnik	110
7.3.1.1	Revitalisierung der Primärzellen.....	110
7.3.1.2	Passagieren der Primärzellen	110
7.3.1.3	Kryokonservierung der Primärzellen	111
7.3.2	Isolation und Charakterisierung von endothelialen koloniebildenden Zellen..	111
7.3.2.1	Isolierung und Kultivierung von ECFCs	111
7.3.2.2	Charakterisierung der ECFCs	114
7.3.2.2.1	Bestimmung der Verdopplungszeit	114
7.3.2.2.2	Durchflusszytometrische Analyse	114
7.3.2.2.3	Angiogenese Assay.....	115
7.3.3	Dynamische Kultivierung der Zellen in Durchfluskkammern	116
7.3.3.1	Beschichtung, Besiedlung und Kultivierung in μ -slides.....	116
7.3.3.2	Analyse der Rundheit und des Achsenverhältnisses.....	117
7.3.3.3	Metabolismus und Expressionsverhalten der konditionierten Zellen	118
7.3.3.3.1	Glukose-Verbrauch.....	118
7.3.3.3.2	RNA-Isolierung	118
7.3.3.3.3	cDNA-Synthese	118
7.3.3.3.4	Primerdesign.....	119

7.3.3.3.5	Gradienten Polymerase Chain Reaction	119
7.3.3.3.6	Agarosegelelektrophorese	119
7.3.3.3.7	Quantitative Echtzeit-Polymerase Chain Reaction.....	120
7.3.4	Gefäßmuskelzellähnliche Differenzierung der ECFCs	120
7.3.4.1	PDGF-BB Kultivierung	120
7.3.4.2	Funktionsanalyse der konditionierten ECFCs - Contraction Assay	121
7.3.4.3	Expressionsverhalten der konditionierten ECFCs	121
7.3.5	Zellfärbung und Immunfluoreszenz	122
7.3.5.1	Fixierung der Zellen.....	122
7.3.5.2	VE-Cadherin-Färbung.....	122
7.3.5.3	CD31-Färbung	122
7.3.5.4	vWF-Färbung.....	123
7.3.5.5	Phalloidin-Färbung	123
7.3.5.6	α -SMA-Färbung.....	123
7.3.5.7	Zellkernfärbung mittels Hoechst.....	123
7.3.6	Statistische Auswertung	124
	Abbildungsverzeichnis	125
	Tabellenverzeichnis.....	134
	Literaturverzeichnis.....	135
	Betreute Abschlussarbeiten	153
	Lebenslauf	154
	Publikationsliste	156

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	engl.: <i>arbitrary units</i>
α -SMA	engl.: <i>α-smooth-muscle-actin</i>
Ang-2	Angiopoetin-2
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
ATMP	Arzneimittel neuartiger Therapien
bFGF	basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CAC	zirkulierende angiogene Zellen hämatopoetischen Ursprungs
CD	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (engl.: <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP	ungenügendes Proliferationspotential (engl.: <i>deficient proliferative potential</i>)
ECFC	endotheliale koloniebildende Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	endotheliales Wachstumsmedium 2
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EOC	engl.: <i>endothelial outgrowth cells</i>
EPC	endotheliale Vorläuferzellen
EPO	Erythropoetin
ePTFE	expandiertes Polytetrafluoroethylen
FAM	F-Aktin-Mikrofilamente
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
HAEC	humane Aortenendothelzellen (engl.: <i>human aortic endothelial cells</i>)
HPP	hohes Proliferationspotential (engl.: <i>high proliferative potential</i>)
HSS	hoher Scherstress
HUVEC	humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (engl.: <i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
ICAM1	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (engl.: <i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
Il-1 β	Interleukin-1 β
Il-6	Interleukin-6
KDR	engl.: <i>kinase insert domain receptor</i>
KLF2	engl.: <i>Krüppel-like-factor-2</i>
LC	laminare Kultivierung
LPP	niedriges Proliferationspotential (engl.: <i>low proliferative potential</i>)
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
MSS	mittlerer Scherstress
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ -b (engl.: „ <i>Nuclear kappa-light-chain-enhancer</i> “ of activated B-cells)
NO	Stickstoffmonoxid
NOTCH4	Notch Rezeptor 4
NPP	kein Proliferationspotential (engl.: <i>non proliferative potential</i>)
O ₂	Sauerstoff
P	Passage
PBMNC	aus peripherem Blut gewonnene mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	pulsatile Kultivierung
PCL	Polycaprolacton

PDGF-BB	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (engl.: <i>platelet derived growth factor-BB</i>)
PDT	Verdopplungszeit (engl.: <i>population doubling time</i>)
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Plättchenadhäsionsmolekül-1 (engl.: <i>platelet endothelial adhesion molecule 1</i>)
PET	Polyethylenterephthalat
PGA	Polyglykolsäure
PFA	Paraformaldehyd
PLA	Piolymlchsäure
PPP	mögliches Proliferationspotential (engl.: <i>potentially proliferative potential</i>)
qRT-PCR	quantitativen Real-time Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SC	quasi-statische Bedingungen
TGF-β1	transformierenden Wachstumsfaktors-β1
TF	Gewebefaktor (engl.: <i>Tissue Factor</i>)
Tie2	Tyrosinkinase-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
tPA	Gewebeplasminogenaktivator
VCAM1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (engl.: <i>vascular cellular adhesion molecule-1</i>)
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor
VEGFR-2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (engl.: <i>vascular endothelial growth factor 2</i>)
vSMC	Gefäßmuskelzellen
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Im Jahr 2019 wurden 32 % aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Krankheiten zurückgeführt. Diese gingen zumeist mit der Häufung an atherosklerotisch bedingten Grunderkrankungen einher, welche sich u. a. in einer peripheren Verschlusskrankheit der Extremitäten, einer Carotisstenose oder einer koronaren Herzerkrankung manifestieren können (Siewert und Brauer, 2007). Die Weltgesundheitsorganisation ordnet derzeit kardiovaskuläre Erkrankungen als häufigste Todesursache weltweit ein (WHO, 2019). Gerade im Bereich der Koronararterien kann die Ablagerung fetthaltiger Plaques (Stenose) zur Verengung der Herzkranzgefäße und damit zur Schädigung des Herzmuskels führen, was einen tödlichen Herzinfarkt zur Folge hat (Zilles und Tillmann, 2011). Nach der Diagnose eines verengten Gefäßes gibt es verschiedene Therapiemöglichkeiten, um die Durchblutung des Gefäßes wiederherzustellen. Dazu zählen blutverdünnende medikamentöse Therapien sowie gefäßerweiternde Maßnahmen wie Ballondilatationen und Stentimplantierungen. (Siewert und Brauer, 2007) Ist die Wiederherstellung der Gefäßdurchblutung jedoch nicht mehr möglich, wird die Stenose mithilfe einer körpereigenen Vene (autolog) bzw. einer körperfremden (allogenen) Vene aus einer Leichenspende oder sogar einer xenogenen Vene aus einer Tierspezies oder mit einer synthetischen Gefäßprothese überbrückt. (Bergmeister et al., 2013) In der klinischen Praxis sind autologe Gefäße besonders günstig, da sie im Vergleich zu allogenen Gefäßen keine immunsuppressive oder antibiotische Therapie voraussetzen. Sie sind jedoch bei älteren Patienten aufgrund des Alters und Gesundheitszustandes nur begrenzt verfügbar. Aus diesem Grund werden seit einigen Jahrzehnten synthetische Gefäßprothesen auf Kunststoffbasis eingesetzt. Diese weisen eine gute Blutverträglichkeit auf und können in hoher Stückzahl produziert werden. Allerdings bergen synthetische Gefäße mit kleinen Durchmessern (<6 mm) trotz Begleitantikoagulation oft ein erhöhtes Thromboserisiko. Daher wird im Bereich des *Tissue Engineerings* an bioartifiziellen Gefäßprothesen geforscht. (Blume et al., 2022) Das *Tissue Engineering* bildet ein interdisziplinäres Forschungsfeld für Bio- und Ingenieurwissenschaften ab, dessen Grundprinzip aus der Gewebeneubildung durch die Ansiedlung von Zellen auf einer Trägerstruktur (*Scaffold*) besteht. Das *Scaffold*-Material sollte eine hohe Biokompatibilität aufweisen und entsprechend seines Degradationsverhaltens durch körpereigene Zellen im Organismus sukzessive ersetzt werden. (Aper, 2015) Eine Endothelialisierung vor Implantation der Gefäßprothese erscheint in jedem Falle günstig, um diesen Prozess zu unterstützen

(Cheng et al., 2013). Gleichzeitig sollten die hierfür verwendeten Zellen immunologisch neutral, leicht zugänglich und in einer hohen Zellzahl expandierbar sein (Blume et al., 2022; Brown et al., 2009). Weiterhin gilt die Besiedelung der innersten Schicht der Prothese mit patienteneigenen Zellen als vorteilhaft, um die Bioverträglichkeit der Gefäßprothese zu verbessern und die Risiken einer Thrombose zu minimieren. Zudem sollte die besiedelte Gefäßprothese den physiologischen Bedingungen standhalten, weswegen eine Kultivierung und Konditionierung der besiedelten Prothese in einem Bioreaktorsystem nötig ist (Melchiorri et al., 2016; Martin et al., 2014).

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Entwicklung von Kultivierungsstrategien zur Herstellung einer bioartifiziellen patientenspezifischen Gefäßprothese.

Als zentrales Ziel der Promotion steht die Erschließung einer autologen Zellquelle zur Endothelialisierung der Gefäßprothese. Diese sollte spenderunabhängig leicht isolierbar sein und ein hohes Proliferationspotential aufzeigen. Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) erweisen sich aufgrund ihres Stammzellcharakters als geeignete Zellquelle und sollen daher mithilfe eines Zellisoliationsverfahrens gewonnen und expandiert werden.

Als weiteres Ziel steht die Kultivierung der isolierten EPCs in Scherstress-Minikammern, um den Effekt eines physiologischen pulsatilen Blutflusses auf die Differenzierung, Zellmorphologie und Gewebebildung zu untersuchen. Dabei sollen verschiedene Scherstressbedingungen für die zukünftige Kultivierung in einem modularen Bioreaktorreaktorsystem ausgetestet werden.

3 Theoretischer Teil

In dieser Arbeit soll ein Kultivierungskonzept zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen entwickelt werden. Im Folgenden werden daher zunächst die Grundlagen des anatomischen Aufbaus sowie die Funktionen des vaskulären Endothels näher beleuchtet (Kapitel 3.1). Dabei wird insbesondere auf den Einfluss der hämodynamischen Kräfte auf die Funktionalität des Endothels eingegangen. Weiter wird ein Überblick über den derzeitigen Stand der Technik des vaskulären *Tissue Engineerings* gegeben (Kapitel 3.2) und schließlich auf die besondere Rolle der endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) im *Tissue Engineering* (Kapitel 3.3) hingewiesen. Dabei wird auf die Isolationsmethode der EPCs im Allgemeinen eingegangen. Zusätzlich werden die Marker zur Charakterisierung der EPCs vorgestellt.

3.1 Das vaskuläre System

Die Entwicklung des menschlichen Blutgefäßsystems basiert auf den Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese (Joussen et al., 2003). Dabei beschreibt die Vaskulogenese die embryonale Gefäßneubildung (Kalka et al., 2000), während die Angiogenese die Entstehung und das Wachstum neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen im adulten Organismus kennzeichnet (Joussen et al., 2003). Das Blutgefäßsystem setzt sich aus einem vaskulären Netzwerk zusammen, das Arterien, Arteriolen, Kapillaren sowie Venolen und Venen umfasst.

Arterielle und venöse Blutgefäße sind in konzentrischen Schichten aufgebaut und werden von innen nach außen in Intima (*lat. Tunica intima*), Media (*lat. Tunica media*) und Adventitia (*lat. Tunica externa*) unterteilt (Abbildung 1) (Stegemann et al., 2007).

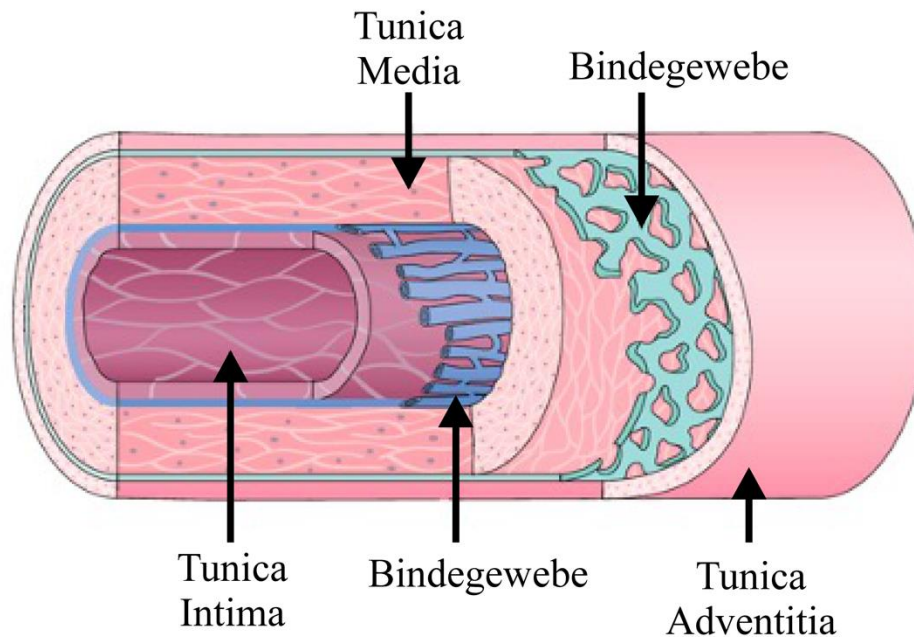


Abbildung 1: Darstellung der konzentrischen Schichten einer Arterie und Vene (modifiziert nach Sorrentino und Haller, 2011).

Die innerste Gefäßschicht (Intima) besteht aus einem einschichtigen Endothel, das auf einer Basalmembran aufliegt. Sie fungiert als Barriere zwischen Blut und Interstitium (Zilles und Tillmann, 2011). Direkt an die Endothelschicht grenzt das *Stratum subendotheliale*, bestehend aus lockerem Bindegewebe und Gefäßmuskelzellen, welches in Arterien zusätzlich von einer *Membrana elastica interna* umfasst ist. Die Media bezeichnet eine ringförmig angeordnete Muskelschicht aus glatten Gefäßmuskelzellen, die von einer Extrazellulärschicht aus proteoglykanreicher Grundsubstanz mit elastischen und kollagenen Fasern vom Typ I und III umgeben sind. Die Adventitia setzt sich überwiegend aus lockerem Bindegewebe und Fibroblasten zusammen und wird in großen Gefäßen durch das *vasa vasorum*, einem Netzwerk aus kleinsten Arterien und Venen, mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. (Stegemann et al., 2007).

3.1.1 Aufbau und Funktion des Endothels

Das auf der Basalmembran aufliegende Endothel nimmt wichtige Funktionen innerhalb der Gefäßwand ein (Zilles und Tillmann, 2011). Zum einen bildet es die Barriere zwischen Blut und dem Gefäßlumen (Rösen, 2008). Dies ist insbesondere bei Diffusions- und Transportvorgängen entscheidend, da dabei der Austausch von Sauerstoff und Metaboliten über die Gefäßwand reguliert wird. Über das Endothel wird außerdem die Adhäsion von

Blutbestandteilen wie Thrombozyten und Leukozyten sowie die Blutgerinnung kontrolliert. (Aird, 2012; Aird, 2007)

Dabei wird zwischen drei Endothelarten unterschieden (Abbildung 2) (Risau, 1998). Arterien und Venen besitzen ein kontinuierliches Endothel, welches durch dichte Zell-Zell-Kontakte gekennzeichnet ist (Aird, 2007). Das fenestrierte Endothel befindet sich unter anderem in der Niere und besitzt 20-100 nm große intrazelluläre Lücken, welche eine semipermeable Durchlässigkeit und Filtration bestimmter Moleküle erlauben (Jourde-Chiche et al., 2019). Daneben weist das diskontinuierliche Endothel, wie es im Knochenmark oder der Leber vorhanden ist, große Poren auf, wodurch parazelluläre Stoffe transportiert werden können (Racanelli und Rehermann, 2006; Risau und Flamme, 1995).

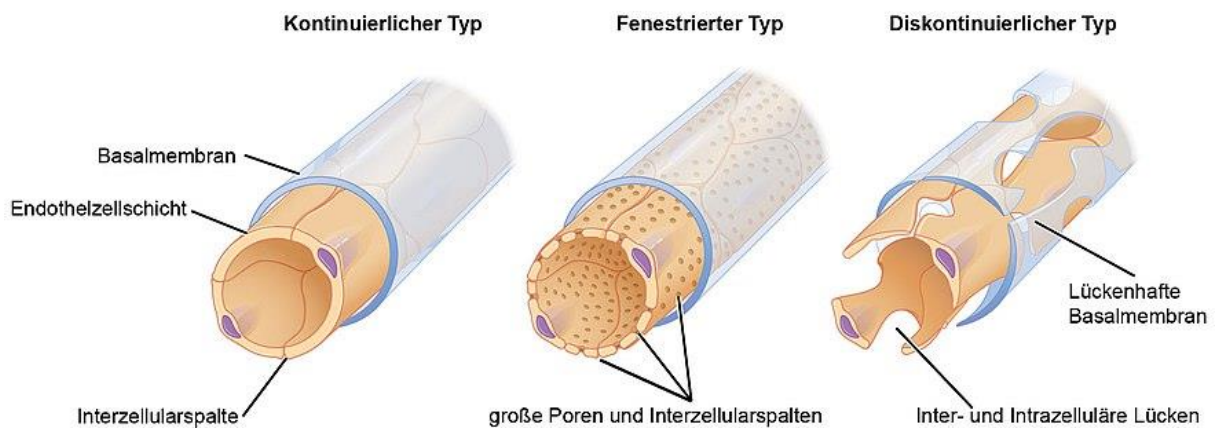


Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Endothelarten. Kontinuierliches, fenestriertes und diskontinuierliches Endothel (modifiziert nach Alabi et al., 2018).

Die im vaskulären System vorhandenen Endothelzellen weisen eine flache und polygonale in Richtung des Blutflusses ausgerichtete Morphologie auf (Heo et al., 2014). Sie sind untereinander durch *Gap* und *Tight Junctions* verbunden und durch einen Stressfaserkomplex aus Aktin-Filamenten vor der Ablösung durch Scherkräfte der Blutströmung geschützt (Wallez und Huber, 2008; Tzima et al., 2005; Zilles und Tillmann, 2011).

Über das Endothel werden vasodilatatorische (gefäßweitend) und vasokonstriktorische (gefäßverengend) Stoffe sezerniert, wodurch der Gefäßtonus und Blutdruck kontrolliert werden (Risau und Flamme, 1995). Als Schlüsselrolle kommt den Endothelzellen die Regulation der Blutgerinnung sowie das Aufrechterhalten des Gleichgewichts zwischen pro- und antithrombotischen Faktoren zu (Steffel und Lüscher, 2010). Im physiologischen Zustand stellt das Endothel eine geschlossene, nicht-thrombogene Oberfläche dar - die Entwicklung von Thromben wird verhindert. Das unverletzte Endothel sezerniert (freisetzen) vasoaktive (die Gefäßmuskulatur beeinflussend) Substanzen, die die Interaktion von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskulaturzellen und zirkulierenden Zellen steuern und inflammatorische (entzündliche) und

thrombogene Prozesse regulieren (Zilles und Tillmann, 2011). Das Stickstoffmonoxid (NO) stellt dabei einen wichtigen Bestandteil in der Regulation der Thrombogenese dar (Watson et al., 2009). Das freie Radikal NO wird in Endothelzellen durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin produziert. Durch die Ausschüttung von NO kommt es zur Relaxation (Entspannung) der Gefäßmuskelzellen und damit zur Gefäßerweiterung. NO wirkt außerdem der Adhäsion von Thrombozyten an der Gefäßoberfläche entgegen. Die Wechselwirkung zwischen Endothel und zirkulierenden Thrombozyten wird durch einen weiteren Faktor beeinflusst. Endothelzellen synthetisieren Prostazyklin, ein Produkt des Arachidonsäurestoffwechsels. Prostazyklin wirkt vasodilatatorisch und der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten entgegen. Im Gegensatz dazu sezernieren Thrombozyten vasokonstriktorische Mediatoren wie Thromboxan und Serotonin, die die Aggregation von Blutplättchen aktivieren. (Rösen, 2008; Quaschnig et al., 2000; Cines et al., 1998)

Im Falle einer Endothelschädigung wird eine hämostatische (blutstillende) Reaktionskaskade ausgelöst. Zunächst sorgt die durch die Vasokonstriktion induzierte verminderte Durchblutung des Gefäßes zu einem Anstieg an Gerinnungsfaktoren (Galley und Webster, 2004). Durch die Adhäsion von Thrombozyten und weiteren Blutplättchen entwickelt sich das „primäre Gerinnsel“ (Rösen, 2008). Der Koagulationsfaktor Thrombin wird durch die Expression von *Tissue Factor* (TF) und im Blut zirkulierendem Faktor VIIa gebildet (Cines et al., 1998). Thrombin aktiviert daraufhin Fibrinogen zu Fibrin, wodurch ein stabiles Netz aus fibrinhaltigem Thrombozytenaggregat - das „sekundäre Gerinnsel“ entsteht (Scheraga, 2004; Rösen, 2008). TF ist ein Membranglykoprotein, das hauptsächlich von Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird (Iaizzo, 2010). Eine Wechselwirkung zwischen TF und Faktor VIIa tritt nur im Falle einer endothelialen Dysfunktion auf, welche nicht nur bei Schädigung des Endothels, sondern auch in einem morphologisch intakten Endothel durch Stressfaktoren ausgelöst werden kann (Esper et al., 2006; Rösen, 2002). Dazu zählen Infektionen, turbulenter Scherstress, Proteine der Gerinnungskaskade sowie proinflammatorische Stimuli wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) (Vallance und Collier, 1997; Fitts et al. 2014; Belhassen et al., 2001; Rösen, 2008). Die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β sowie IL-6 erfolgt insbesondere nach kardiochirurgischen Eingriffen, in denen beispielsweise eine Herzlungenmaschine zur Aufrechterhaltung der Blutzirkulation eingesetzt wird (Meierin, 2013; Schröpfer, 2005). Eine Mikroinflammation der Plaques mit TNF- α als Prognosefaktor für die Progression wird aber auch grundsätzlich für die Prognose der Atherosklerose mit konsekutiver Gefäßsklerose und – thrombose diskutiert. Daher sind Modelle, die TNF- α zur Simulation

atherosklerosefördernder Endothelveränderungen einsetzen, wichtig zur Beurteilung antithrombogener Faktoren (Wolf und Ley, 2019).

Dem Gerinnungsaktivator TF stehen die gerinnungsaflösenden Proteine Thrombomodulin und Gewebefibrinogenaktivator (tPA) entgegen (Cines et al., 1998). Thrombomodulin bindet als membranbeständiger Rezeptor an Thrombin und aktiviert damit das Thrombomodulin-Protein-C-System (Lin et al., 2005). Das im Endothel exprimierte tPA aktiviert die Bildung von Plasmin, wodurch die Auflösung der Fibrin-vernetzten Thromben durch die Fibrinolyse hervorgerufen wird (Zilles und Tillmann, 2011; Cines et al., 1998).

Das intakte vaskuläre Endothel nimmt demnach entscheidende Funktionen in der Aufrechterhaltung der Hämostase sowie in der Regulation der Thrombogenese ein. Die auf der Basalmembran liegenden Endothelzellen beeinflussen durch ihre vasodilatatorischen Eigenschaften die Hämodynamik und weisen eine Mediatorfunktion auf, wodurch auch Gefäßprozesse wie die Angiogenese gezielt gesteuert werden. (Zilles und Tillmann, 2011; Steffel und Lüscher, 2010). Sie sind in dieser Weise der Pathologie der Atherosklerose und Thrombose besonders ausgesetzt.

3.1.2 Hämodynamische Kräfte

Endothelzellen sind durch den kontinuierlichen, pulsatilen Blutstrom hämodynamischen Kräften ausgesetzt. Das Blutstromprofil ist abhängig von der Blutflussgeschwindigkeit und der geometrischen Blutgefäßbeschaffenheit. Die im Blutgefäß wirkenden hämodynamischen Kräfte lassen sich durch die Gesetze der Hydrodynamik beschreiben. Das Ohm'sche Gesetz der Elektrizitätslehre kann dafür auf strömende Flüssigkeiten übertragen werden (Müller et al., 2009). Es beschreibt den Zusammenhang zwischen Stromstärke, Widerstand und Spannung. Das Blut fließt mit einer Volumenstromstärke nur in Anwesenheit eines Druckgefälles im Blutgefäß, welches zur Überwindung des Strömungswiderstandes dient. Die Volumenstromstärke I ist direkt proportional zur Druckdifferenz ΔP und indirekt proportional zum Strömungswiderstand R (Formel 1). (Schmidt et al., 2011)

$$I = \frac{\partial V}{\partial t} = \frac{\Delta P}{R} \quad (1)$$

Der mittlere arterielle Druck und der zentrale Venendruck geben dabei die Druckdifferenz vor. Der Strömungswiderstand setzt sich aus der Wandreibung und der inneren Reibung des Blutes zusammen, welche wiederum von der Viskosität des Blutes abhängig ist. (Rein et al., 2013)
Als weiteres physikalisches Gesetz beschreibt die Formel nach Hagen Poiseuille das Verhältnis von Druckdifferenz und Viskosität μ des Blutes in Abhängigkeit vom Gefäßradius r und der Gefäßlänge l (Oertel et al., 2015; Ramm, 2013):

$$I = \frac{r_i^4 \cdot \pi \cdot \Delta P}{8 \cdot \mu \cdot l} \quad (2)$$

Unter Betrachtung des Ohm'schen Gesetzes (Formel 1) kann der Strömungswiderstand R wie folgend beschrieben werden (Müller et al., 2009):

$$R = \frac{8 \cdot \mu \cdot l}{r_i^4 \cdot \pi} \quad (3)$$

Eine Erhöhung des Gefäßradius verringert dabei den Strömungswiderstand und bewirkt gleichzeitig eine Zunahme der Volumenstromstärke (Schmidt et al., 2011).

Unter Berücksichtigung der Hagen-Poiseuille-Gleichung (Formel 2) kann zudem die auf die Gefäßinnenwand wirkende Kraft, der sogenannte Scherstress gleichbedeutend mit der Wandschubspannung, beschrieben werden. Der durch den tangentialen Blutfluss verursachte Scherstress bezeichnet die Kraft pro Flächeneinheit, welche auf die luminale Endothelzelloberfläche wirkt und wird in Pascal (Pa), Newton pro Quadratmeter (N/m^2) oder dyn/cm^2 angegeben (Secomb, 2016).

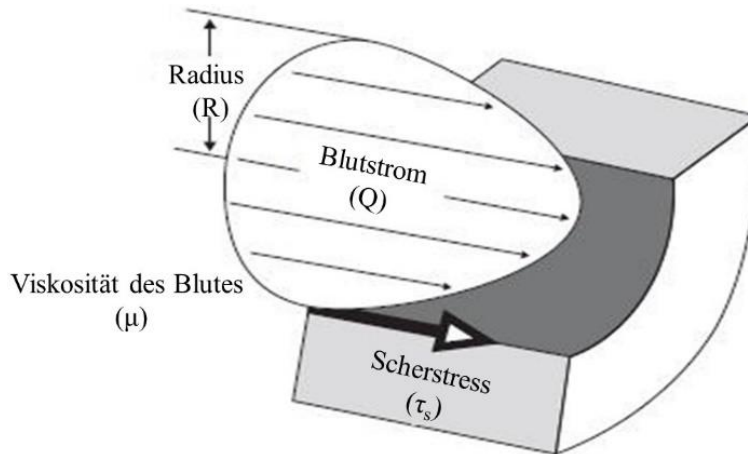


Abbildung 3: Schematische Darstellung des durch den tangentialen Blutfluss verursachten Scherstress (Modifiziert nach Malek et al., 1999).

Der Scherstress τ ist direkt proportional zur Geschwindigkeit Q sowie der Viskosität μ des Blutes und umgekehrt proportional zum luminalen Gefäßradius R (Schmidt et al., 2011). Er lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$\tau = \frac{4 \cdot \mu \cdot Q}{\pi R^3} \quad (4)$$

Voraussetzung für Formel 4 ist ein konstanter Lumendurchmesser und ein laminares Strömungsprofil. Der vom tangentialen Blutfluss ausgelöste Scherstress entspricht in arteriellen Blutgefäßen Werten von 10 bis 70 dyn/cm², im venösen Gefäßsystem 1 bis 6 dyn/cm² (Aird, 2007).

3.1.3 Einfluss von Scherstress

Der durch den Blutfluss induzierte Scherstress kann je nach Blutstromprofil (laminar, oszillierend, turbulent) die Endothelzellfunktion regulieren (Peters, 2018). In geraden Gefäßabschnitten ist der durch den tangentialen Blutfluss ausgelöste Scherstress unidirektional und laminar pulsatil (Kutikhin et al., 2018). Mechanosensoren auf der endothelialen Oberfläche lösen in Folge von Scherstress intrazelluläre biochemische Reaktionen aus (Tzima et al., 2005). Der als Mechanotransduktion bezeichnete Übersetzungsprozess eines mechanischen Stimulus in intrazelluläre Signale führt zur Mechanotransmission – der physikalischen Weiterleitung der Signale in das darunter liegende Gewebe (Davies et al., 2013; Chistiakov et al., 2017). Dieser mechanosensorische Komplex setzt sich zusammen aus dem vaskulären

endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (VEGFR-2), dem Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1), Integrinen, Zellverbindungsproteinen, der Glykokalyx und dem Aktgerüst (Tzima et al., 2005; Culver und Dickinson, 2010; Charbonier et al., 2019; Obi et al., 2012).

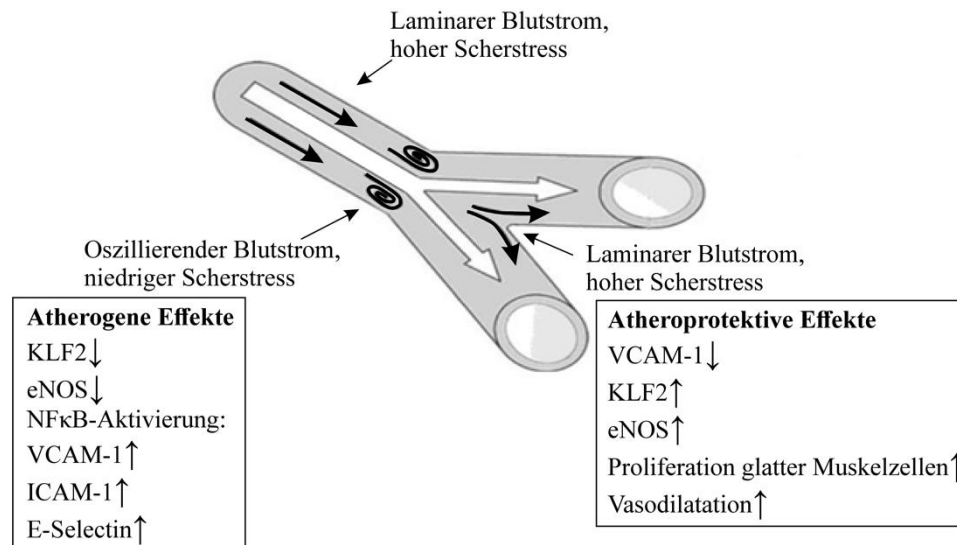


Abbildung 4: Oszillierende versus laminare Strömung und deren atherogene bzw. atheroprotektive Wirkung (modifiziert nach Kuhlmann et al., 2014).

Ein laminares und pulsatile Strömungsprofil wirkt anti-apoptotisch (den programmierten Zelltod verhindernd) und induziert eine anti-inflammatorische Endothelzellfunktion, die durch die Hochregulierung des Enzyms eNOS sowie des Transkriptionsfaktors *Krüppel-like-factor-2* (KLF2) gekennzeichnet ist (Abbildung 4) (Ishibazawa et al., 2011; Rossi et al., 2010; Dekker et al., 2002). Die Expression des Zinkfingerproteins KLF2 wird in Abhängigkeit vom Scherstress reguliert und wirkt atheroprotektiv, indem die Expression entzündungsfördernder Mediatoren und Adhäsionsmoleküle verhindert wird (SenBanerjee et al., 2004; Wang et al., 2006).

Scherstress führt zur Deformation der Zellmembran, wodurch das an den Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisierte PECAM-1 aktiviert wird (Davies, 2009). PECAM-1 agiert als Mechanotransducer und überträgt über die Phosphorylierung von Tyrosin- und Serinresten Signale ins Zytoplasma (Conway und Schwartz, 2015; Chiu et al., 2008). In Folge der mechanischen Belastung werden Signale über PECAM-1 in einen Komplex aus VEGFR-2 und vaskulär-endotheliale (VE)-Cadherin eingeleitet (Pahakis et al., 2007; Culver und Dickinson, 2010; Conway et al., 2013). Die Aktivierung von VEGFR-2 führt daraufhin zur Phosphorylierung von eNOS und der Freisetzung von NO (Kutikhin et al., 2018).

Unter physiologischem Scherstress wird außerdem vermehrt Thrombomodulin produziert und TF herunterreguliert (Ishibazawa et al., 2011; Rossi et al., 2010).

In verzweigten und unregelmäßigen Gefäßabschnitten entstehen turbulente und oszillierende Strömungen. Dadurch wird im Gefäßendothel ein atherogener Phänotyp hervorgerufen, der durch ein proinflammatorisches Genexpressionsprofil charakterisiert ist (Abbildung 4) (Johnson et al., 2011). Der proinflammatorische Transkriptionsfaktor „*Nuclear kappa-light-chain-enhancer*“ of *activated B-cells* (NF- κ B) aktiviert endotheliale Adhäsionsmoleküle wie *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM1), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM1) und E-Selektin, die zur erhöhten Aggregation von Leukozyten und einer endothelialen Dysfunktion beitragen (Baskurt et al., 2007; Malek und Izumo, 1995; Ando und Kamiya, 1996). Das Adhäsionsmolekül VCAM1 fördert die Adhäsion zirkulierender Monozyten und T-Lymphozyten (Davies et al., 1993). Diese Zellen können Matrixmetalloproteasen und Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sekretieren und somit die Expression entzündungsfördernder Faktoren anregen, wodurch die Bildung atherosklerotischer Plaques initiiert wird (Walpoth et al., 2020).

3.2 Vaskuläres *Tissue Engineering*

Atherosklerotische Plaques können eine Verengung (Stenose) der Gefäße und damit eine Beeinträchtigung der Gefäßdurchblutung verursachen. Insbesondere im Bereich der Koronararterien kann eine Stenose der Herzkranzgefäße zur Schädigung des Herzmuskels bis zum Herzinfarkt führen. Koronare Herzkrankheiten zählen weltweit zu den häufigsten Krankheits- und Todesursachen. (Siewert und Brauer, 2007) Kann ein verengtes Gefäß nicht medikamentös oder durch den Einsatz von Ballondilatationen und Stentimplantationen behandelt werden, wird die Durchblutung des Herzens durch eine Überbrückung der Stenose mithilfe einer körpereigenen (autologen) beziehungsweise alloplastischen Gefäßprothese wiederhergestellt. Mit über 70.000 Operationen pro Jahr zählen die sogenannten Bypassoperationen in Deutschland zu den häufigsten Eingriffen am Herzen. (Bergmeister et al., 2013; UKSH, 2022). Darüber hinaus tragen aortale Carotis-Stenosen zu häufigen Schlaganfällen mit fatalem Ausgang bei. Auch die periphere arterielle Verschlusskrankheit muss u. a. durch gefäßweitende oder durch Bypasstherapien häufig behandelt werden, um einen Erhalt der funktionellen Extremität zu sichern.

3.2.1 Klinischer Gefäßersatz

Als übliche autologe Bypassgefäße werden die *vena saphena (Beinvene)*, die *arteria mammaria interna* (innere Brustkorbarterie) sowie die *arteria radialis* (Speichenarterie) verwendet (Siewert und Brauer, 2007). Dabei ist zu beachten, dass arterielle Bypässe eine höhere Durchgängigkeitsrate (90 % nach zehn Jahren) im Vergleich zu venösen Bypässen (60 % nach zehn Jahren) aufweisen (Sabik III et al., 2005). Neben dem Risiko der Re-Stenosierung durch die Bildung atherosklerotischer Plaques, zählen Vorerkrankungen und die limitierte Verfügbarkeit zu den Einschränkungen der Verwendung autologer (transplantiertes Material desselben Spenders) Gefäßprothesen (Aper et al., 2015; Isenberg et al., 2006). Dabei ist zu beachten, dass zusätzlich zu autologen Bypassgefäßen ebenfalls allogene (transplantiertes Material aus fremdem Spender) und xenogene (transplantiertes Material aus fremder Spezies) Gefäße venösen und arteriellen Ursprungs Verwendung finden. Da diese allerdings ein erhöhtes Risiko unerwünschter Infektionen und Abstoßungsreaktionen nach dem Implantieren bergen, ist eine entsprechende medikamentöse Therapie in Form von Immunsuppressiva und Antibiotika vorausgesetzt. (Settmacher et al., 2020)

Synthetische Gefäßprothesen stellen daher eine vielversprechende Alternative dar. Sie sind gleichmäßig reproduzierbar, in hoher Stückzahl verfügbar und weisen besonders für den Einsatz größerer Gefäße (Durchmesser >6mm) ein geringes Risiko für turbulente Strömungen auf (Fioretta et al., 2012). Dabei werden im klinischen Einsatz aufgrund ihrer guten Blutverträglichkeit und hohen Hydrophobizität hauptsächlich Polymere wie Polyethylenterephthalat (PET, Dacron®) und expandiertes Polytetrafluoroethylen (ePTFE, Goretex®) verwendet (Xue und Greisler, 2003; Siewert und Brauer, 2007). Allerdings zeigen synthetische Prothesen im kleinkalibrigen Bereich (Durchmesser <6mm) aufgrund der verminderten Durchgängigkeit ein erhöhtes Risiko für Gefäßverschlüsse (Bergmeister et al., 2013). Desweiteren können synthetische Materialien Infektionen, Entzündungsreaktionen und damit Re-Stenosen hervorrufen (Aper et al., 2015).

3.2.2 Bioartifizielle Gefäßprothesen

Um geeignete Alternativen für kleinumige autologe Gefäße zu finden, wird besonders im Bereich des *Tissue Engineerings* an bioartifiziellen Gefäßprothesen geforscht. Das *Tissue Engineering* bildet ein interdisziplinäres Forschungsfeld für Bio- und Ingenieurwissenschaften ab, dessen Grundprinzip aus der Gewebeneubildung durch die Ansiedlung autologer Zellen auf einer Trägerstruktur (*Scaffold*) besteht. (Aper et al., 2015) Das *Scaffold* dient als extrazelluläre

Matrix und wird durch körpereigene Remodelling-Mechanismen sukzessive abgebaut und ersetzt (Pallua und Suschek, 2010; Krenning et al., 2008). In der *Scaffold*-Materialauswahl werden zwei Arten von Polymeren erforscht: natürliche Biopolymere und resorbierbare synthetische Polymere (Walpoth et al., 2020). Biopolymere sind organischen Ursprungs, werden aus humanen, tierischen oder pflanzlichen Quellen gewonnen und können durch körpereigene Enzyme abgebaut werden. Dazu zählen unter anderem Polysaccharide (Alginat und Chitin), Glykosaminoglykane (Hyaluronsäure) und Bestandteile der extrazellulären Matrix (Kollagen) sowie des Blutplasmas (Fibrinogen) (Paulo et al., 2020; Pashneh-Tala et al., 2016; Aper et al., 2015; Wenger und Giraud, 2018).

Im Bereich der resorbierbaren synthetischen Polymere finden hauptsächlich milchsäure- oder erdölbasierte Kunststoffe eine Verwendung. Dazu zählen unter anderem Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA) und Polycaprolacton (PCL). Diese werden im Körper durch hydrolytische Spaltungen der Polymerketten durch Mechanismen des Citratzyklus zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut. (Pashneh-Tala et al., 2016; Walpoth et al., 2020)

3.2.3 Endothelialisierung von Gefäßprothesen

Um die Biokompatibilität der bioartifiziellen Gefäßprothesen zu verbessern und die Risiken einer Re-Stenose bzw. Thrombose zu minimieren, sollte eine vollständige Endothelialisierung des Gefäßersatzes gewährleistet werden (Cheng et al., 2013). Für die Besiedlung des Gefäßlumens mit autologen Endothelzellen gibt es zwei Strategien. Die *in situ* Endothelialisierung bezeichnet das spontane Einwachsen und Anhaften von im Blut zirkulierenden sowie aus umliegendem Gewebe mobilisierten Endothelzellen (Pang et al., 2015). Dieser Mechanismus erfolgt post-operativ und kann durch physikalische und chemische Modifikationen der Polymeroberfläche verstärkt werden (Dong et al., 2018). Dazu zählen beispielsweise mechanische Oberflächenmodifikationen, Säurebehandlungen, Antikörper-Funktionalisierungen sowie Peptid- und Kollagenbeschichtungen (Wu et al., 2020; Kuang et al., 2018; Duan et al., 2019; Shafiq et al., 2018; Yu et al., 2019).

Bei der *in vitro* Endothelialisierung dagegen wird die Gefäßoberfläche prä-operativ mit patienteneigenen Endothelzellen in einer Zellkultur vorbesiedelt. Diese Strategie beinhaltet die Entnahme und Vermehrung autologer Zellen und die darauffolgende Besiedlung und Kultivierung der Scaffolds in einem perfundierten Bioreaktorsystem (Abbildung 5) (Aper et al., 2015).

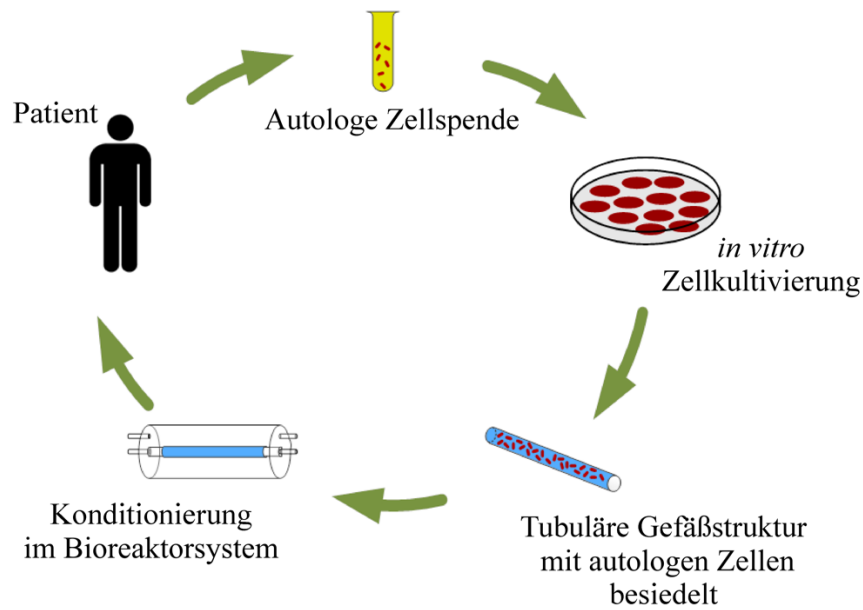


Abbildung 5: Entwicklungsschritte einer bioartificialen Gefäßprothese (modifiziert nach Stanislawski et al., 2020).

3.2.4 Bioreaktorentwicklung

Das Bioreaktorsystem bietet dabei physiologische Bedingungen, die der optimalen Nähr- und Sauerstoffversorgung sowie der mechanischen Konditionierung der Gefäßprothese vor dem Implantieren dienen. Die sich im Inneren der Gefäßprothese befindende Endothelschicht sollte hohen Blutflussraten standhalten und kann durch die im Reaktorsystem initiierten hämodynamischen Kräfte, wie dem luminalen Druck, Scherstress und einer zyklischen Umfangsspannung optimal auf die im Körper herrschenden Bedingungen vorbereitet werden. Studien zeigen, dass sich mechanischer Stress positiv auf die Gewebeentwicklung auswirkt, wodurch eine höhere mechanische Beanspruchbarkeit und Zugfestigkeit des Gewebes erreicht werden kann. (Melchiorri et al., 2016; Zang et al., 2009; Hahn et al., 2007)

Das am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover in unserer Arbeitsgruppe von Maschoff et al. entwickelte und von Stanislawski et al. optimierte Bioreaktorsystem bietet eine dynamische und pulsatile Kultivierung der Zellen auf einem *Scaffold* unter Überwachung der biochemischen (pH, Sauerstoff, Glukose, Laktat) und physikalischen Parameter (Flussrate, Druck, Scherstress). Mithilfe von Ultraschallmessungen erlaubt das Reaktorsystem eine kontinuierliche Kontrolle der Gefäßprothese hinsichtlich der Gefäßdicke und Oberflächenhomogenität. (Maschoff et al., 2017; Stanislawski et al., 2020)

Bevor die Gefäßprothese allerdings in einem Bioreaktorsystem konditioniert werden kann, muss die Gefäßoberfläche mit Endothelzellen ausgekleidet werden. Dies setzt eine Zellisolation aus dem vom Patienten entnommenen Gewebe sowie eine Zellexpansion *in vitro* voraus. Die

Zellen sollten leicht isolierbar und nicht immunogen sein sowie eine hohe Proliferationskapazität aufweisen. Um Krankheitsübertragungen und Abstoßungsreaktionen nach dem Implantieren zu verhindern, sollten autologe Zellen allogenen und xenogenen vorgezogen werden. Dafür können Zellen verschiedensten Ursprungs in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise aus Arterien und Venen entnommene Endothelzellen und endotheliale Vorläuferzellen (EPCs). Da ausdifferenzierte arterielle und venöse Endothelzellen ein vermindertes Proliferationspotenzial aufweisen, lag der Fokus in den vergangenen Jahren verstärkt auf der Entwicklung von Isolationsmöglichkeiten endothelialer Vorläuferzellen aus dem adulten (erwachsenen) Körper. (Bompais et al., 2004; Shah et al., 2018; Hofmann et al., 2009)

3.3 Endotheliale Vorläuferzellen

Während der Embryogenese wird das Blutgefäßnetz aus mesodermalen Zellen des extraembryonalen Dottersacks, dem Hämangioblasten ausgebildet. Die Blutinseln der Hämangioblasten bilden sich im Zentrum zu hämatopoetischen Stammzellen aus, während Angioblasten, die Vorläufer von Endothelzellen, aus den äußeren Bereichen der Blutinseln hervorgehen. (Carmeliet, 2000; Zilles und Tillmann, 2011)

Im adulten Mechanismus entstehen EPCs im Knochenmark und werden durch verschiedene endogene (im Körperinneren entstehend) und exogene (außerhalb des Organismus entstehend) Substanzen mobilisiert, wodurch sie in den peripheren Blutkreislauf gelangen (Du et al., 2012). Zu den endogenen Stimuli gehören Zytokine, die durch Entzündungen sezerniert oder von ischämischem Gewebe freigesetzt werden, wie der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) (Takahashi et al., 1999) oder der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) (Cheng und Qin, 2012). Daneben werden Wachstumsfaktoren, wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) (Lee et al., 2008) oder Angiopoetin-2 (Ang-2) (Gill und Brindle, 2005) zu den endogenen Stimuli gezählt. Eine Studie von Laufs et al. konnte zeigen, dass eine Erhöhung von VEGF und NO zur Steigerung der zirkulierenden EPCs führte (Laufs et al., 2004). Auch Hormone, wie Erythropoetin (EPO) (Bloch und Brixius, 2006) und Östrogen (Masuda et al., 2007) führen zur Mobilisierung zirkulierender EPCs. Dabei konnte beobachtet werden, dass der zu- und abnehmende Östrogenspiegel innerhalb des Menstruationszyklus einer Frau eine stark schwankende EPC-Dichte verursachte (Robb et al., 2009). Während es keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und deren Anzahl mobilisierter EPCs im peripheren Blut gibt

(Wang et al., 2011), zeigen Studien, dass auch Faktoren wie Rauchen (Kondo et al., 2004; Ludwig et al., 2010), kardiovaskuläre Vorerkrankungen (Güven et al., 2006; Wang et al., 2011) oder ein Diabetes Typ 2 (Lombardo et al., 2012) einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der mobilisierten EPCs aufweisen.

Eine vermehrte EPC-Mobilisierung wird auch auf exogene Stimuli wie sportliche Betätigung oder die Einnahme von Statinen zurückgeführt (Steiner et al., 2005; Walter et al., 2002).

3.3.1 Identifizierung und Charakterisierung

Asahara et al. berichteten 1997 erstmals von im Blut zirkulierenden endothelzellähnlichen Zellen, die aufgrund ihrer Oberflächenmarker und Morphologie sowie ihrer Fähigkeit sich in verletztes Gewebe zu integrieren, als EPCs bezeichnet wurden (Asahara et al., 1997). EPCs stellen eine heterogene Zellpopulation unterschiedlicher Differenzierungsstufen dar und weisen kein einheitliches spezifisches Oberflächenexpressionsprofil auf (Paschalaki und Randi, 2018). Innerhalb der heterogenen Gruppe der EPCs gibt es zwei Arten von Subpopulationen, die unterschieden werden (Banno und Yoder 2018). Dazu zählen die zirkulierenden angiogenen Zellen (CAC) hämatopoetischen Ursprungs und die endothelialen koloniebildenden Zellen (ECFC) nicht-hämatopoetischen Ursprungs (Kuthikin et al., 2018). CACs und ECFCs können durch ihre unterschiedlichen Oberflächenmarker differenziert werden (Tabelle 1) (Banno und Yoder, 2018). CACs sekretieren Zytokine und Wachstumsfaktoren und stimulieren dadurch die angiogene Aktivität endothelialer Zellen (Paschalaki und Randi, 2018; Rehman et al., 2003).

Tabelle 1: Unterscheidung der CACs und ECFCs anhand ihrer Eigenschaften.

Eigenschaften der EPCs	CACs	ECFCs
Zellulärer Ursprung	Knochenmark	Gefäßwand
CD45	+	-
CD14	+	-
CD133	+	-
CD146	gering	hoch
vWF	-	+
VE-Cadherin	-	+
CD31 (PECAM-1)	+	+
CD34	+/-	+/-
VEGFR2	+	+
AcLDL Aufnahme	+	+
Angiogene Aktivität	indirekt	direkt
Parakrine Kapazität	+	+
<i>In vivo</i> Gefäßbildung	-	+
<i>In vivo</i> Anstreben von ischämischem Gewebe	-	+

ECFCs weisen im Gegensatz zu CACs ein hohes Proliferationspotential auf und besitzen die Fähigkeit in reife Endothelzellen zu differenzieren (Basile et al., 2018). Zusätzlich sind ECFCs in der Lage parakrine Faktoren zu sezernieren und andere Zellen durch ihr vaskulogenetisches Potenzial zu unterstützen (Medina et al., 2010).

3.3.2 Endotheliale koloniebildende Zellen

Die Subpopulation der ECFCs wurde erstmals von Ingram et al., definiert (Ingram et al., 2004). ECFCs können aus adultem peripheren Blut (Hofmann et al., 2012), aus Nabelschnurblut (Hess et al., 2014), dem weißen Fettgewebe (Lin et al., 2013) und dem Knochenmark (Capiod et al., 2009) gewonnen werden. Die Anzahl der ECFC-Kolonien ist allerdings im peripheren Blut geringer als in der Nabelschnur. So lässt sich nur eine Kolonie aus 20 mL Blut isolieren, wohingegen im Nabelschnurblut die achtfache Menge vorliegt (Testa et al., 2020). Die aus dem Nabelschnurblut stammenden ECFCs besitzen verglichen zu den aus dem adulten peripheren Blut stammenden Zellen ein hohes Proliferationspotenzial (engl.: *high proliferative*

potential: HPP). Diese HPP-ECFCs können während der Kultivierung *in vitro* über 100 Zellteilungen generieren, während LPP (engl.: *low proliferative potential*)-ECFCs nur 20 Zellteilungen aufbringen. (Marchetti, 2015)

In der *in vitro* Zellkultur werden ECFCs genau wie CACs aus humanen, mononukleären Zellen (MNCs) gewonnen (Paschalaki und Randi, 2018).

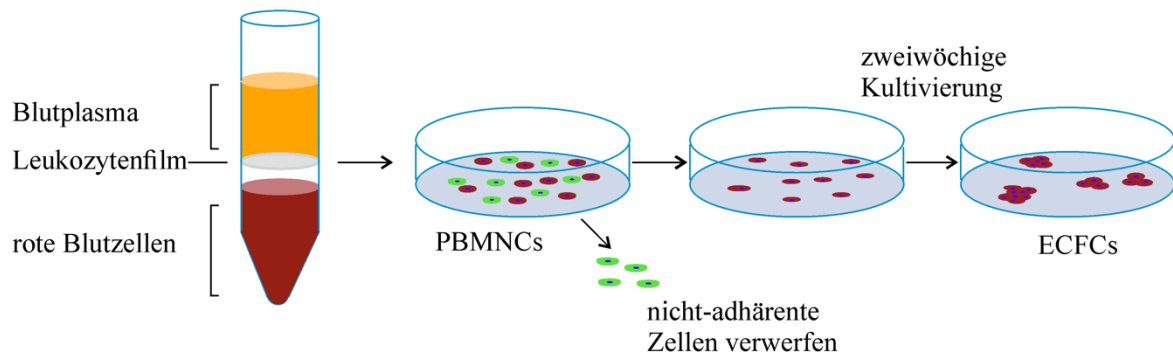


Abbildung 6: PBMC-Gewinnung nach Dichtegradientenzentrifugation und Kultivierung zur Generierung von ECFCs (modifiziert nach Miller, 2020).

ECFCs bilden im Gegensatz zu CACs nach sieben bis 21 Tagen Kolonien, welche eine für Endothelzellen charakteristische pflastersteinartige Morphologie aufweisen (Ingram et al., 2004).

Ferner können ECFCs über die Endothelmarker $CD31^+$, $CD146^+$, $VEGFR2^+$, vWF^+ , und $VE\text{-Cadherin}^+$ und die fehlenden hämatopoetischen Marker $CD14^-$, $CD133^-$ und $CD45^-$ charakterisiert werden (O'Neill et al., 2018; Paschalaki und Randi, 2018; Smadja et al., 2019). Der Marker $CD34$ wird sowohl von CACs als auch von ECFCs exprimiert (Sidney et al., 2014). $CD34$ ist ein stammzellspezifisches Phosphoglykoprotein, dessen Expression im Verlauf der endothelialen Zelldifferenzierung bei ECFCs kontinuierlich abnimmt und schließlich vollständig verloren geht (Tasev et al., 2016). Neben der Oberflächenantigenexpression ist die Untersuchung der *in vitro* Gefäßneubildung eine weitere standardisierte Methode zur Charakterisierung von ECFCs (Patel et al. 2016). Dabei wird mithilfe des Angiogenese-Assays die Bildung netzwerkartiger Strukturen auf einer dreidimensionalen gelatinösen Proteinmischung untersucht (Kutikhin et al., 2018).

In einer Studie um Kutikhin et al. wurde gezeigt, dass aus dem peripheren Blut stammende ECFCs phänotypische Merkmale sowohl von arteriellen als auch venösen reifen Endothelzellen aufzeigten (Kutikhin et al., 2020). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass eine Kultivierung von ECFCs unter unidirektionalem laminarem Scherstress eine arteriovenöse Differenzierung der ECFCs begünstigt (Obi et al., 2012). Eine arteriovenöse Differenzierung kann dabei durch die

Expression der arteriellen Marker Notch Rezeptor 4 (NOTCH4), Delta-like 4 und Ephrin-B2 bzw. venösen Marker Ephrin-B4 und *Fms-like tyrosine kinase-4* (Flt-4) festgestellt werden (Kim et al. 2015).

Tabelle 2: Charakteristische Merkmale von Arterien und Venen.

	Durchmesser	Richtung des Blutflusses	Höhe des Scherstress	Charakteristische Endothelzellmarker
Arterien	1-3 mm	vom Herzen wegführend	10-70 dyn/cm ²	NOTCH4 Delta-like 4 Ephrin-B2
Venen	1-6 mm	zum Herzen hinführend	1-6 dyn/cm ²	Ephrin-B4 Flt-4

Gleichzeitig weisen arterielle Endothelzellen im Vergleich zu venösen Endothelzellen morphologische Unterschiede auf. In nativen Arterien sind Endothelzellen lang und schmal und orientieren sich entlang der Längsachse des Blutflusses, während venöse Endothelzellen kurz und breit sind und keine eindeutige Ausrichtung aufzeigen (Aird, 2007; Paz und D'Amore, 2009).

In dieser Arbeit werden arterielle und venöse Modellzellen der *in vitro* Zellkultur als Referenzendothelzellen verwendet. Dabei werden arterielle Endothelzellen aus der Aorta (engl.: *human aortical endothel cells* (HAECs)) sowie venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur (engl.: *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs)) eingesetzt, welche die in Tabelle 2 aufgelisteten Charakteristika aufweisen.

Neben der Fähigkeit in reife endotheliale Zellen auszdifferenzieren, wurde ebenfalls gezeigt, dass EPCs auch über ihre Differenzierungslinien hinaus in Kardiomyozyten (Badorff et al., 2003), mesenchymale Zellen (Ravishankar et al., 2022) und glatte Gefäßmuskelzellen (Simper et al., 2002; Guo et al., 2010) transdifferenziert werden.

3.3.3 Gefäßmuskelzellen

Gefäßmuskelzellen (engl.: *vascular smooth muscle cells*: VSMCs) spielen insbesondere bei der Entwicklung einer mehrschichtigen bioartifiziellen Gefäßprothese eine Rolle. VSMCs ermöglichen aufgrund ihrer kontraktile Eigenschaften die Aufrechterhaltung des

physiologischen Gefäßtonus und somit die Regulation kardiovaskulärer Funktionen (Offermanns, 2012). Da adulte VSMCs ein vermindertes Proliferationspotential aufweisen (Burton et al., 2009), wird nach Alternativen zur Gewinnung autologer VSMCs gesucht. Aus diesem Grund wurde in den vergangenen Jahrzehnten die Differenzierung unterschiedlicher Zellquellen in VSMCs analysiert. Dabei werden insbesondere Stammzellen aus dem Knochenmark (Kawamura et al., 2017; Gong und Niklason, 2008), Fettgewebe (Helms et al., 2021) sowie pluripotente Stammzellen (Gasser et al., 2018) durch die Zugabe des transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), des Wachstumsfaktors aus Thrombozyten (PDGF-BB) und des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF) in VSMCs differenziert. Da Knochenmarks- und Fettgewebeprobe eine invasive Isolationsmethode voraussetzen und pluripotente Stammzellen aufgrund ihrer genetischen Veränderung ein potenzielles karzinogenes Risiko bergen, wird vermehrt die Differenzierbarkeit von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMNCs) untersucht. Diese wurden erstmals von Simper et al. durch die Kultivierung mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB in VSMCs differenziert (Simper et al., 2002). Auch die Kultivierung von PBMNCs mit TGF- $\beta 1$, bFGF und PDGF-BB führte erfolgreich zur Generierung von VSMCs (Sugiyama et al., 2006; Ahmetaj-Shala et al., 2019). Daneben zeigte eine Arbeit von Moonen et al., dass auch ECFCs aus dem peripheren Blut mithilfe der Wachstumsfaktoren TGF- $\beta 1$ und PDGF-BB in VSMCs transdifferenziert werden konnten (Moonen et al., 2010). Die erfolgreiche Differenzierung zu VSMCs wurde anhand der Expression der muskelspezifischen Marker *α -smooth muscle actin* (α -SMA), Calponin und *smooth muscle myosin heavy chain* nachgewiesen (Blume et al., 2022).

Durch die Verwendung von PBMNCs und ECFCs aus dem peripheren Blut bestünde demnach eine nicht-invasive Möglichkeit zur Generierung autologer Gefäßmuskelzellen für die Entwicklung einer mehrschichtigen bioartificialen Gefäßprothese.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Kultivierungskonzept zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen. Um die klinischen Anforderungen für endothelialisierte Gefäßprothesen zu erfüllen, müssen die eingesetzten Endothelzellen bestimmte Eigenschaften erfüllen: Sie sollten einer leicht zugänglichen Quelle entstammen und eine hohe Proliferationskapazität aufweisen. Außerdem sollten die eingesetzten Endothelzellen autologen Ursprungs sein, um immunologische Nebenwirkungen zu vermeiden. Daher sollen in Kapitel 4.1 endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) als mögliche autologe Zellquelle zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen untersucht werden. Dabei soll evaluiert werden, ob diese Zellen spenderunabhängig isoliert und für weitere Versuche expandiert werden können. Für eine erfolgreiche Translation endothelialisierter Gefäßprothesen in die klinische Anwendung müssen die Zellen zudem ihre adhäsiven und antithrombogenen Eigenschaften auch unter physiologischen Blutflussbedingungen beibehalten. Aus diesem Grund wird in Kapitel 4.2 der Einfluss unterschiedlicher Scherstressraten auf die Funktion und Mechanosensitivität der isolierten ECFCs analysiert. In Kapitel 4.3 erfolgt eine vertiefte Analyse der antithrombogenen Wirkung des physiologischen arteriellen Scherstress unter Entzündungsbedingungen. Gleichzeitig wird die arteriovenöse Differenzierung der ECFCs aufgrund der Scherstresskultivierung im Vergleich zu reifen arteriellen und venösen Endothelzellen untersucht. Im letzten Ergebniskapitel (Kapitel 4.4) der vorliegenden Arbeit wird das Differenzierungspotential der unreifen ECFCs in Richtung eines Gefäßmuskelzellähnlichen Phänotyps durch die Kultivierung mit dem Wachstumsfaktor *platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) erforscht. Dadurch soll eine potenzielle Gefäßmuskelzellquelle zur Kultivierung der kontraktiven mittleren Schicht der bioartifiziellen Gefäßprothese gefunden werden.

4.1 Isolation und Charakterisierung von endothelialen koloniebildenden Zellen

Bei der Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese konnte festgestellt werden, dass eine Prä-Endothelialisierung der Gefäßoberfläche die Hämokompatibilität durch die antithrombogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften der eingesetzten Endothelzellen unterstützt (Hess et al., 2014; Zwirner et al., 2018). Die dafür verwendeten Endothelzellen müssen bestimmte Eigenschaften aufweisen, um klinische Bedingungen zu erfüllen (Brown et al., 2009). Dazu zählt, dass die eingesetzten Endothelzellen einer leicht zugänglichen autologen Zellquelle entspringen und ein hohes Proliferationspotenzial aufzeigen.

Im folgenden Kapitel werden daher endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) aus dem peripheren Blut als mögliche autologe Zellquelle zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen untersucht. Die statistischen Auswertungen erfolgten mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Ein Teil der in diesem Kapitel untersuchten Daten wurde im Rahmen der Masterarbeiten von Lale Zerdali und Gresa Hasani erarbeitet (Zerdali, 2019; Hasani, 2019).

4.1.1 Vorarbeiten zur Validierung und Standardisierung des Isolationsprozesses

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Vorarbeiten zur Gewinnung von ECFCs erläutert. Es wurde analysiert, welche durchschnittliche Ausbeute an mononukleären Zellen (MNCs) aus den durch Thrombozytenapheresespenden erhaltenen *buffy coats* verschiedener Spender gewonnen werden kann. Dabei wurde auf das Geschlecht sowie das Alter der Spender eingegangen und der Einfluss dieser beiden Faktoren auf den MNC-Gehalt untersucht. Anschließend wurden Daten gesammelt, um eine Auskunft über den zeitlichen Verlauf der Kolonieentstehung und deren Entwicklung aufzuzeigen. Außerdem wurde in diesen Vorarbeiten untersucht, wie viele ECFCs durchschnittlich pro Spender gewonnen werden können. Mit diesen Analysen wurde die Durchführbarkeit der Isolations- sowie Kultivierungsmethode validiert und standardisiert.

4.1.1.1 MNC pro buffy coat

Die Daten der jeweiligen Spender sind in Tabelle 3 aufgeführt. Das Alter der zwölf gesunden Spender (sechs weiblich, sechs männlich) lag zwischen 22 und 57 Jahren (Mittelwert: $39,3 \pm 11,8$ Jahre; Median: 37,5 Jahre). Das Durchschnittsalter der weiblichen

Spender betrug $40 \pm 12,3$ Jahre, das der männlichen Spender $38,7 \pm 12,4$ Jahre. Die aus den Thrombozytenapheresespenden gewonnenen *buffy coats* wurden jeweils mithilfe der Dichtegradientenzentrifugationsmethode in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt (Abbildung 7).

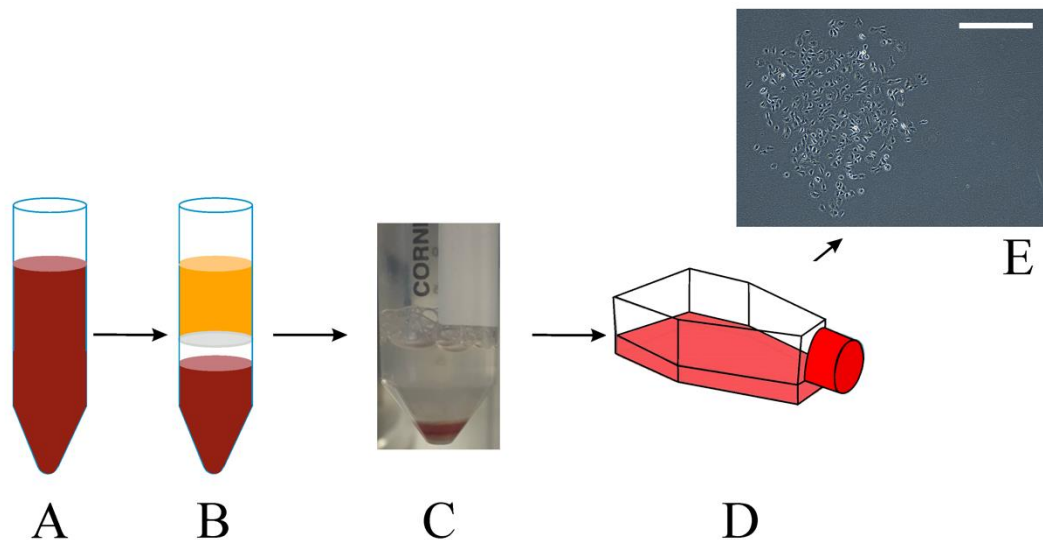


Abbildung 7: Schematische Darstellung der PB-MNC-Kultivierung. A: *buffy coat*. B: Auftrennung des *buffy coats* mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation. C: Sedimentiertes MNC-Pellet. D: Kultivierung in mit Endothelzellmedium vorgelegten T75-Flasche. E: Kolonieentstehung nach zweiwöchiger Kultivierung. Maßstab beträgt 500 μm . Abbildung C entnommen aus Masterarbeit von Gresa Hasani (Hasani, 2019).

Die durchschnittliche Anzahl der gewonnenen MNCs aller Spender betrug $110,6 \pm 73,7 \cdot 10^6$ Zellen pro mL *buffy coat*. Die Zellanzahl der männlichen Spender ergab $123,2 \pm 82,4 \cdot 10^6$ Zellen pro mL *buffy coat* und war damit größer, jedoch nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Zellanzahl der weiblichen Spender mit einer Durchschnittsmenge von $98,0 \pm 69,1 \cdot 10^6$ Zellen pro mL *buffy coat*. Demnach konnte festgestellt werden, dass innerhalb der untersuchten zwölf Spender das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute an MNC pro Spender nimmt.

Tabelle 3: Angaben der für die Vorarbeiten untersuchten Spender.

Spenderset	Geschlecht	Alter [Jahre]	Koloniebildung	MNC (*10 ⁶) pro mL <i>buffy coat</i>
LZ01	männlich	47	Ja	46,8
LZ02	männlich	41	Ja	113,4
LZ03	weiblich	32	Ja	39,1
LZ04	weiblich	33	Ja	149,7
LZ05	weiblich	52	Nein	53,6
LZ06	männlich	34	Nein	137,6
LZ07	weiblich	25	Nein	117,3
LZ08	männlich	31	Ja	70,9
LZ09	weiblich	49	Ja	200,3
LZ10	männlich	22	Nein	278,4
LZ11	weiblich	43	Ja	27,8
LZ12	männlich	57	Ja	92,5
MW ± SD		47,9 ± 6,7		110,6 ± 73,7

4.1.1.2 Kolonieentwicklung

Anschließend wurde die MNC-Fraktion in unbeschichtete mit Endothelzellmedium vorbereitete Kulturflaschen in einer Dichte von $21,3 \pm 15,3 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^2 ausplattiert. Die Auswertung der ECFC-Koloniebildungsrate ergab, dass nur acht der insgesamt 12 Spender in einem Zeitraum von 21 Tagen ECFC-charakteristische Kolonien ausbildeten (siehe Tabelle 3). Damit betrug die Wahrscheinlichkeit, dass sich Kolonien aus PB-MNC bilden, 66,7 %.

Erste ECFC-Kolonien entstanden im Durchschnitt nach $15,3 \pm 3,0$ Tagen mit einer Kolonie-Anzahl von $7,5 \pm 8,1$ Kolonien pro Spender. Um bereits frühzeitig Prognosen über das Proliferationspotenzial der isolierten ECFCs geben zu können, wurden die ECFC-Kolonien mithilfe der *ImageJ*-Software ausgezählt und in drei Kategorien nach Coldwell et al. unterteilt. Coldwell et al. definieren nach einem Kultivierungszeitraum von 14 Tagen Kolonien mit einer Zellzahl von mehr als 2000 Zellen pro Kolonie als hoch proliferierend (engl.: *high proliferative potential: HPP*), Kolonien mit Zellzahlen zwischen 50 und 2000 Zellen als niedrig

proliferierend (engl.: *low proliferative potential*: LPP) und Kolonien mit weniger als 50 Zellen als nicht proliferierend (engl.: *non proliferative potential*: NPP) (siehe Abbildung 8) (Coldwell et al., 2011).

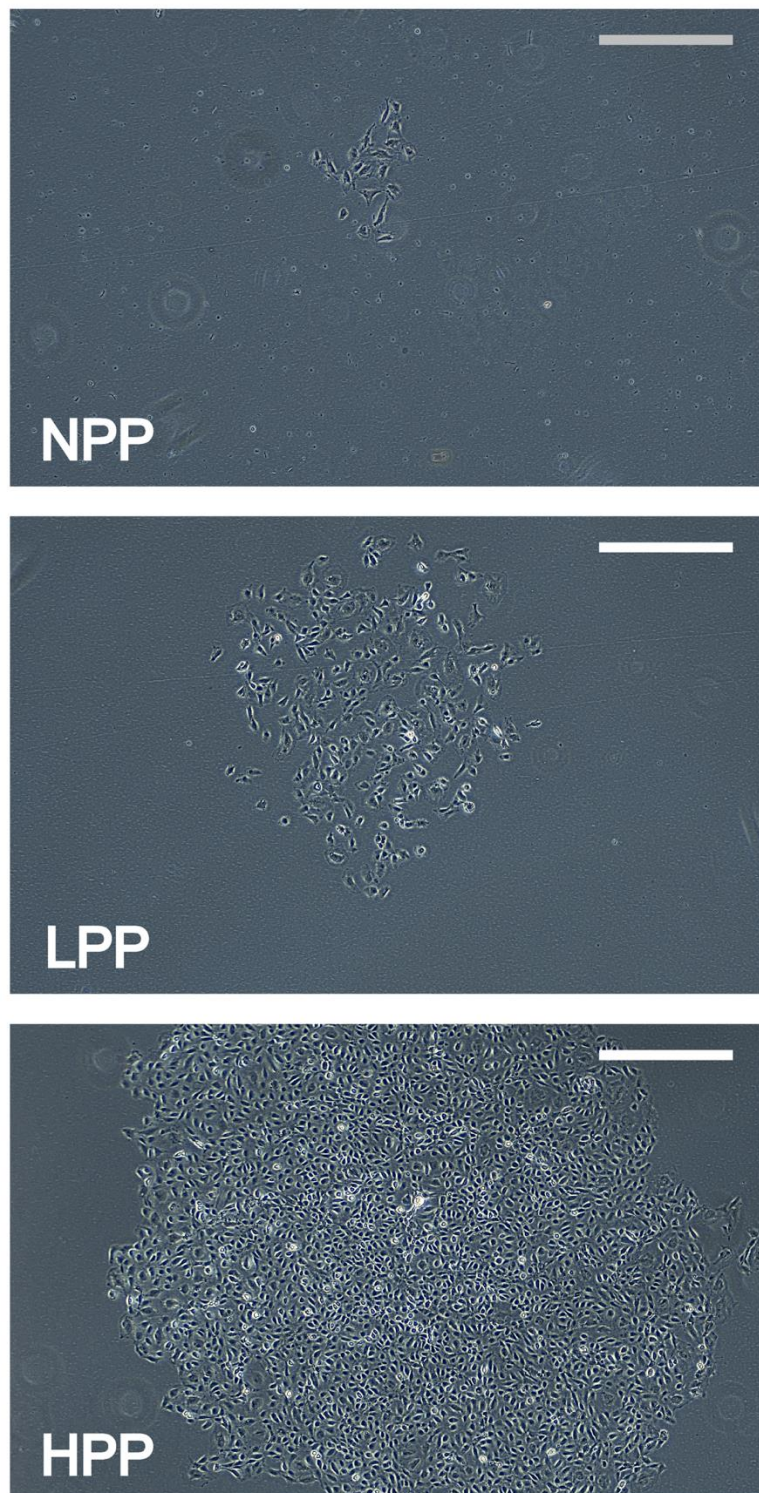


Abbildung 8: Phasenkontrastaufnahmen unterschiedlicher Koloniearten. Oben: NPP-Kolonie mit weniger als 50 Zellen. Mitte: LPP-Kolonie mit einer Zellmenge von 50-2000 Zellen. Unten: HPP-Kolonie mit einer Zellzahl von mehr als 2000 Zellen. Der Maßstab in allen Abbildungen entspricht 500 μm . (NPP: *non proliferative potential*; LPP: *low proliferative potential*; HPP: *high proliferative potential*).

Die einzelnen Kolonien der vorliegenden Arbeit wurden zum Zeitpunkt des Passagierens (t=21 Tage) in die jeweiligen Kategorien eingeteilt und sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Kolonieanzahl sowie Anteil der NPP-, LPP- und HPP-Kolonien je Spender. Einteilung erfolgte nach Coldwell et al. (Coldwell et al., 2011). (NPP: *non proliferative potential*; LPP: *low proliferative potential*; HPP: *high proliferative potential*).

Spenderset	Kolonieanzahl	NPP-Anteil [%]	LPP-Anteil [%]	HPP-Anteil [%]
LZ01	6	0	83,3	16,8
LZ02	1	0	100	0
LZ03	4	0	100	0
LZ04	2	0	50	50
LZ08	6	66,7	0	33,3
LZ09	23	43,5	43,5	13,0
LZ11	17	41,2	52,9	5,9
LZ12	1	0	100	0
MW ± SD	7,5 ± 8,1	18,9 ± 27,2	66,2 ± 36,0	14,9 ± 18,2

Demnach wiesen die Spender durchschnittlich $14,9 \pm 18,2$ % HPP-Kolonien, $66,2 \pm 36,0$ % LPP-Kolonien und $18,9 \pm 27,2$ % NPP-Kolonien auf. Da die einzelnen Kolonien jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Kultivierung entstanden, kann die Einteilung in die oben genannten Kategorien nicht pauschal auf alle entstandenen Kolonien angewendet werden. Ein wichtiges Charakteristikum der Kolonien ist deren durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt des Passagierens. Je älter eine Kolonie, desto aussagekräftiger ist deren Beurteilung zur Proliferationskapazität. Bei Untersuchung des Alters wurde deutlich, dass NPP-Kolonien ein signifikant geringeres Alter ($4,3 \pm 3,3$ Tage) aufwiesen als LPP-Kolonien ($6,0 \pm 2,6$ Tage) und HPP-Kolonien ($8,1 \pm 1,9$ Tage). Aus diesem Grund sollte eine Einteilung in die NPP-Kategorie unter Beachtung des Alters erfolgen. Dabei wurde ein Mindestalter der Kolonien bestimmt, ab dem eine Einteilung in die jeweilige Kategorie vollzogen werden konnte. Als Mindestalter sollte der Median der Altersdaten gewählt werden, welcher für alle Kolonien bei sieben Tagen lag. Berücksichtigt man nun dieses Mindestalter, ließen sich die NPP-Kolonien in zwei unterschiedliche Kategorien unterteilen: Kolonien mit einer Zellzahl von weniger als 50 Zellen und einem Alter von weniger als sieben Tagen wurden als möglicherweise proliferierende (engl.: *potentially proliferative potential*: PPP) Kolonien bezeichnet. Kolonien, die bis zum Zeitpunkt des Passagierens ein Mindestalter von sieben Tagen aufwiesen und die kritische Zellzahl von 50 nicht überschritten, wurden als

ungenügend proliferierende (engl.: *deficient proliferative potential*: DPP) Kolonien bezeichnet. Nach erneuter Einteilung wiesen die untersuchten Spender $10,6 \pm 17,8$ % PPP-Kolonien und $8,3 \pm 11,7$ % DPP-Kolonien auf (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kolonierepartitionierung in DPP-, PPP-, LPP- und HPP-Kategorien je Spender. (DPP: *deficient proliferative potential*; PPP: *potentially proliferative potential*; LPP: *low proliferative potential*; HPP: *high proliferative potential*).

Spenderset	DPP-Anteil [%]	PPP-Anteil [%]	LPP-Anteil [%]	HPP-Anteil [%]
LZ01	0	0	83,3	16,8
LZ02	0	0	100	0
LZ03	0	0	100	0
LZ04	0	0	50	50
LZ08	16,7	50	0	33,3
LZ09	26,1	17,4	43,5	13,0
LZ11	23,5	17,7	52,9	5,9
LZ12	0	0	100	0
MW \pm SD	$8,3 \pm 11,7$	$10,6 \pm 17,8$	$66,2 \pm 36,0$	$14,9 \pm 18,2$

Des Weiteren konnte die Analyse der Verdopplungszeiten (engl.: *Population Doubling Time* (PDT)) der einzelnen Kolonien schon frühzeitig einen Einblick auf das Proliferationspotenzial geben. Je niedriger die PDT, desto wahrscheinlicher ist deren Wachstumskapazität in späteren Passagen. Die charakteristischen PDTs der Koloniearten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verdopplungszeiten (PDTs) der unterschiedlichen Koloniearten. +p<0,05 zeigt signifikante Unterschiede verglichen zur PDT der DPP-Kolonie.

	DPP-Kolonie	PPP-Kolonie	LPP-Kolonie	HPP-Kolonie
PDT (Tage)	$2,9 \pm 1,0$	$1,6 \pm 0,4^+$	$1,6 \pm 0,8^+$	$1,6 \pm 0,4^+$

Demzufolge wiesen HPP-, LPP- und PPP-Kolonien signifikant niedrigere PDTs verglichen zur PDT der DPP-Kolonie auf. Innerhalb der proliferierenden (PPP, LPP, HPP) Kolonien konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Nach Ablösen der ECFC-Kolonien wurde eine durchschnittliche Zellzahl von 48 ± 62 Zellen/ 10^6 *MNCs festgestellt, wobei die Anzahl der Zellen pro 10^6 *MNCs für weibliche Spender (52 ± 79 Zellen/ 10^6 *MNCs) nicht signifikant unterschiedlich zu der Anzahl der männlichen Spender (44 ± 52 Zellen/ 10^6 *MNCs) war.

4.1.2 Isolation und Kultivierung der ECFC

Nach Abschluss der Voruntersuchungen, wurden ECFCs elf verschiedener Spender (fünf weiblich, sechs männlich) im Alter von 37 bis 58 Jahren (Mittelwert: $47,9 \pm 6,6$ Jahren; Median: 49 Jahre) für weitere Analysen verwendet. Diese wurden nach dem oben beschriebenen Kultivierungsprotokoll aufgearbeitet. Dabei wurden die durch die Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen MNCs jeweils in einzelner sowie in gepoolter Form ausplattiert. Durch die Untersuchung gepoolter Proben wurde eine höhere statistische Relevanz sowie eine niedrigere phänotypische Varianz geboten, während die Verwendung von Einzelproben die Durchführbarkeit sowie die Allgemeingültigkeit der etablierten Methode beweisen sollte. Die Daten der einzelnen Spender sind in Tabelle 7 aufgezeigt.

Tabelle 7: Spenderdetails der gepoolten und einzelnen Spender.

Spender-Pool-1 (4SA)		
Spenderset	Geschlecht	Alter [Jahre]
4SA-1	männlich	49
4SA-2	weiblich	42
4SA-3	weiblich	56
4SA-4	männlich	58
Mittelwert \pm SD		$51,3 \pm 7,7$
Spender-Pool-2 (4SF)		
Spenderset	Geschlecht	Alter [Jahre]
4SF-1	weiblich	53
4SF-2	männlich	44
4SF-3	weiblich	53
4SF-4	männlich	44
Mittelwert \pm SD		$48,5 \pm 5,2$
Einzelspender		
Spenderset	Geschlecht	Alter [Jahre]
EC06	männlich	49
EC08	männlich	37
EC09	weiblich	42
Mittelwert \pm SD		$42,7 \pm 6,0$

Die gepoolten Proben bestanden jeweils aus einem ECFC-Pool vier verschiedener Spender (zwei weiblich, zwei männlich). Die Spender des ECFC-Pool-1 (4SA) waren im Alter von 42 bis 58 Jahren (Mittelwert: $51,3 \pm 7,7$ Jahre; Median: 52,5 Jahre). Das Alter der Spender des ECFC-Pool-2 (4SF) lag zwischen 44 und 53 Jahren (Mittelwert: $48,5 \pm 5,2$ Jahre; Median: 48,5 Jahre). Die Einzelspender (eine weiblich, zwei männlich) hatten ein Alter zwischen 37 und 49 Jahren (Mittelwert: $42,7 \pm 6,0$ Jahre; Median: 42 Jahre).

Nach Auszählung der MNC-Fraktionen ergab der MNC-Anteil der Einzelspender $100,3 \pm 11,1 \cdot 10^6$ Zellen pro mL *buffy coat*. Die durchschnittliche MNC-Anzahl der gepoolten Spender lag bei $142,5 \pm 91,9 \cdot 10^6$ Zellen pro mL *buffy coat* und war damit nicht signifikant unterschiedlich zu den Daten der Einzelspender. Die MNC-Fraktionen der jeweiligen Spendersets wurden anschließend in einer Zelldichte von $22,1 \pm 7,2 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^2 ausplattiert.

Die Einzelspender wiesen erste endothelzellförmige Kolonien neun bis 14 Tage nach Kultivierungsbeginn und eine Gesamtkolonieanzahl von vier bis zehn Kolonien je Spender auf (Mittelwert: $6,7 \pm 3,1$ Kolonien; Median: sechs Kolonien).

In den gepoolten Proben wurden ECFC-typische Kolonien nach 12 bis 14 Tagen beobachtet. Die Analyse des Proliferationspotenzials ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Insgesamt konnte eine durchschnittliche Kolonieanzahl von $0,5 \pm 0,2$ Kolonien/MNC ($\cdot 10^8$) und $0,7 \pm 0,3$ Kolonien pro mL *buffy coat* festgestellt werden.

Tabelle 8: Kolonieeinteilung in DPP-, PPP-, LPP- und HPP-Kategorien für Einzelspender und gepoolte Spender. (DPP: *deficient proliferative potential*; PPP: *potentially proliferative potential*; LPP: *low proliferative potential*; HPP: *high proliferative potential*).

Spender-Set	DPP-Anteil [%]	PPP-Anteil [%]	LPP-Anteil [%]	HPP-Anteil [%]
Einzelspender	$3,3 \pm 5,8$	$48,3 \pm 22,6$	$27,8 \pm 25,5$	$20,6 \pm 4,2$
Gepoolte Spender	-	$8,0 \pm 17,9$	$54,7 \pm 44,1$	$37,3 \pm 44,4$

Dabei wurden für die Einzelspender $3,3 \pm 5,8$ % DPP-Kolonien, $48,3 \pm 22,6$ % PPP-Kolonien, $27,8 \pm 25,5$ % LPP-Kolonien und $20,5 \pm 4,2$ % HPP-Kolonien festgestellt. In den gepoolten Proben konnten 0 % DPP-Kolonien, $8,0 \pm 17,8$ % PPP-Kolonien, $54,6 \pm 44,1$ % LPP-Kolonien und $37,3 \pm 44,4$ % HPP-Kolonien erfasst werden. Die Entwicklung einer PPP-Kolonie zu einer HPP-Kolonie ist exemplarisch in Abbildung 9 gezeigt. In Abbildung 9-A ist eine neuentstehende Kolonieformation aus zunächst sieben Zellen zu sehen. Diese PPP-Kolonie wurde neun Tage nach Kultivierungsbeginn entdeckt (Abbildung 9-A) und erreichte bereits nach 14 Tagen eine Zellzahl zwischen 50 und 1000 Zellen (siehe Abbildung 9-B). Nach

insgesamt 21 Tagen in Kultur wies die erfasste Kolonie eine Zellzahl von mehr als 2000 Zellen mit einer Verdopplungszeit von 1,4 Tagen auf und konnte damit als HPP-Kolonie gekennzeichnet werden (Abbildung 9-D).

Insgesamt lagen die Verdopplungszeiten für alle Spender zwischen $0,8 \pm 0,5$ Tagen und $1,6 \pm 0,2$ Tagen und waren damit im Rahmen der in 4.1.1.2 gezeigten Vorarbeiten.

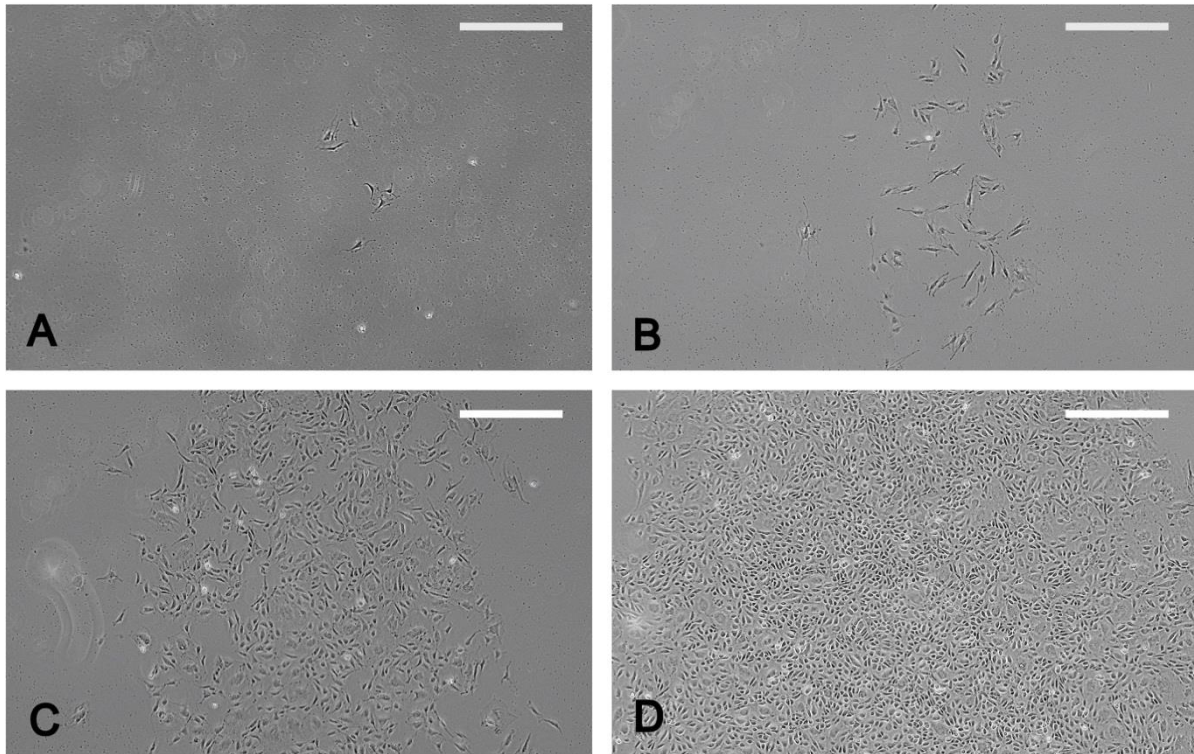


Abbildung 9: Phasenkontrastaufnahmen einer HPP-Kolonieentwicklung. A: PPP-Kolonieformation aus sieben Zellen nach neun Tagen in Kultur entdeckt. B, C: Nach 14 (B) bzw. 18 (C) Tagen Kultivierung weist die Kolonie einen LPP-Charakter auf. D: Nach insgesamt 21 Tagen in Kultur erreicht die Kolonie eine Zellzahl von mehr als 2000 Zellen und kann damit als HPP-Kolonie bezeichnet werden. (DPP: *deficient proliferative potential*; PPP: *potentially proliferative potential*; LPP: *low proliferative potential*; HPP: *high proliferative potential*). Maßstab in allen Abbildungen beträgt 500 μm .

Zum Zeitpunkt des Passagierens nach 17 bis 21 Tagen ergab die Auszählung des ECFC-Anteils pro eine Million MNCs in den Einzelspender-Proben $11,5 \pm 4,4$ Zellen/ 10^6 *MNCs. Der Anteil an ECFC-charakteristischen Zellen je mL *buffy coat* ergab einen Median von 1098 Zellen. In der Gruppe der gepoolten Proben lag der durchschnittliche ECFC-Anteil bei $47,7 \pm 46,4$ Zellen/ 10^6 *MNCs und der Median je mL *buffy coat* lag bei 3449 Zellen.

Nach Ablösen der Zellen wurden diese in einer Zelldichte von 8000 Zellen/ cm^2 in neue Zellkulturgefäße ausplattiert und für weitere Versuche expandiert.

4.1.1 Charakterisierung der ECFC

Nach erfolgreicher Isolation wurden die Zellen im Folgenden anhand verschiedener Merkmale charakterisiert. Dazu zählte zum einen das Proliferationsverhalten, welches durch die Erfassung der Verdopplungszeiten (PDT) analysiert wurde. Zum anderen wurden die Zellen auf das Vorhandensein bestimmter endothelialer Oberflächenproteine untersucht, um nachzuweisen, dass es sich um ECFCs handelte. Dieses erfolgte mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung sowie der Durchflusszytometrie. Als weitere ECFC-typische Eigenschaft gilt die Fähigkeit *in vitro* kapillarähnliche Strukturen auf einer extrazellulären Matrix auszubilden. Das sogenannte Angiogenese-Assay wurde ebenfalls für die jeweiligen Spendersets durchgeführt.

4.1.1.1 Verdopplungszeiten

Die Verdopplungszeiten (PDT) der jeweiligen Spendersets wurden über vier Passagen ermittelt. Die Auswertung ist in Tabelle 9 zusammengefasst. Demnach zeigten sowohl die Einzelspender als auch die gepoolten Spendersets nicht signifikant unterschiedliche Werte über alle Passagen hinweg. Die PDT ergaben in Passage 1 einen mittleren Wert von $1,7 \pm 0,7$ Tagen für Einzelspender, sowie $2,7 \pm 0,7$ Tage für gepoolte Proben. Insgesamt zeigten die gepoolten Proben im Vergleich zu Einzelspenderproben in allen Passagen erhöhte jedoch nicht signifikant unterschiedliche PDT. Damit ergab sich für alle Proben und Passagen gemittelt eine PDT von $2,7 \pm 1,6$ Tagen. Weiterhin konnte während des untersuchten Zeitraumes keine signifikante Zunahme der PDT mit steigender Passagenzahl festgestellt werden. Für die weiteren Versuche dieser Arbeit wurden daher Zellen der Passage 4-7 verwendet.

Tabelle 9: Verdopplungszeiten der jeweiligen Spendersets über vier Passagen.

Verdopplungszeit [Tage]				
Spender	T _d (P1)	T _d (P2)	T _d (P3)	T _d (P4)
Einzelspender	$1,7 \pm 0,7$	$2,2 \pm 2,4$	$1,5 \pm 0,5$	$2,4 \pm 1,5$
Gepoolte Spender	$2,7 \pm 0,7$	$3,3 \pm 1,7$	$2,7 \pm 0,9$	$3,6 \pm 0,5$
Alle Spender	$2,1 \pm 0,9$	$2,7 \pm 2,0$	$2,0 \pm 0,9$	$2,9 \pm 1,3$

4.1.1.2 Nachweis endothelialer Marker

Neben der Erfassung des Wachstumsverhaltens, wurden die isolierten Zellen ebenfalls anhand ihrer Oberflächenmarker charakterisiert. Um ECFCs eindeutig von CACs abzugrenzen, mussten die isolierten Zellen die in 3.3.2 genannten Oberflächenantigene aufweisen. Als gängige Methoden, diese nachzuweisen, gelten die Durchflusszytometrie sowie die

Immunfluoreszenzfärbung. Im Folgenden sind die Ergebnisse der jeweiligen Analysemethoden dargestellt.

4.1.1.2.1 Durchflusszytometrie

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zelloberflächenantigene durch die spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper CD14, CD45, CD31, CD133, CD34 und CD146 gebunden und anschließend das Fluoreszenzsignal gemessen. Die resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 10 sowie Abbildung 10 dargestellt und präsentieren für alle Spender einen ECFC-Phänotyp. Die isolierten Zellen aller Spender zeigten hohe Expressionslevel (>98,9 %) der Endothelzellmarker CD31 und CD146, sowie kein Expressionssignal (<1 %) für die hämatopoetischen Oberflächenproteine CD45, CD14 und CD133. Außerdem wurde für alle Spendersets ein positives Signal ($27,4 \pm 11,2$ %) für den stammzellcharakteristischen Oberflächenmarker CD34 nachgewiesen, welcher damit auf den undifferenzierten Phänotypen der Zellen hinweist.

Tabelle 10: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der endothelzellcharakteristischen (CD31, CD146), hämatopoetischen (CD45, CD14, CD133) und stammzellspezifischen (CD34) Marker der jeweiligen Spendersets.

Antigenexpression je Marker [%]						
Spenderset	CD14	CD45	CD31	CD133	CD34	CD146
4SA	0,5	0,5	99,5	0,5	10,6	99,0
4SF	0,3	0,3	99,7	0,3	41,2	99,9
EC06	0,2	0,4	99,8	0,5	27,9	99,7
EC08	0,4	0,2	98,9	0,5	32,3	99,8
EC09	0,4	0,3	99,0	1,0	24,9	99,8
MW \pm SD	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$99,4 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,2$	$27,4 \pm 11,2$	$99,7 \pm 0,4$

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in Abbildung 10 exemplarisch für den Spender EC08 dargestellt. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der anderen Spender sind im Anhang aufgeführt.

EC08

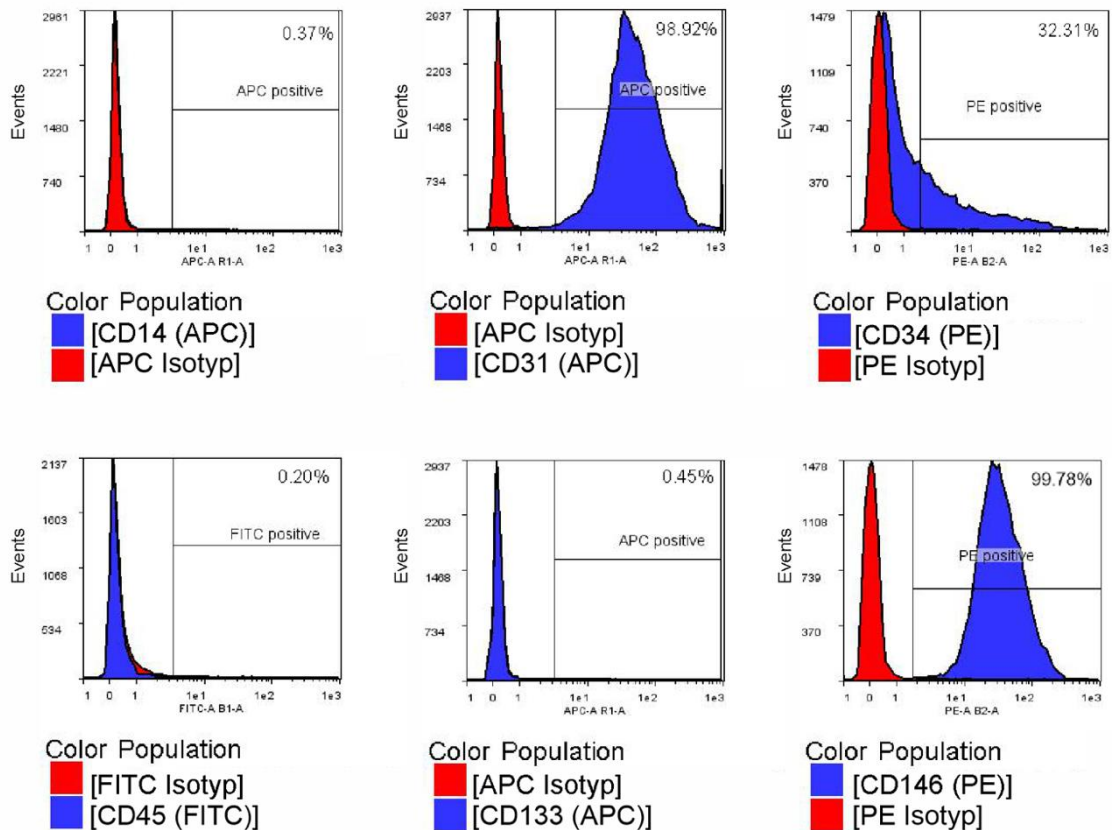


Abbildung 10: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des Spenders EC08.

4.1.1.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Weiterhin wurde die Expression der Endothelzellmarker CD31, von-Willebrand-Faktor (vWF) und vaskulär-endotheliales (VE)-Cadherin durch die Immunfluoreszenzfärbung nach Fixierung der Zellen nachgewiesen und ist repräsentativ für das gepoolte Spenderset 4SA in Abbildung 11 dargestellt. Dabei wurde eine positive Färbung von CD31 an den Zellrändern (Abbildung 11-A) sowie das Vorhandensein von VE-Cadherin an den Zell-Zell-Kontaktstellen festgestellt (Abbildung 11-B). Außerdem lässt sich in Abbildung 11-C eine deutliche Färbung des vWF im Zytoplasma der isolierten Zellen erkennen.

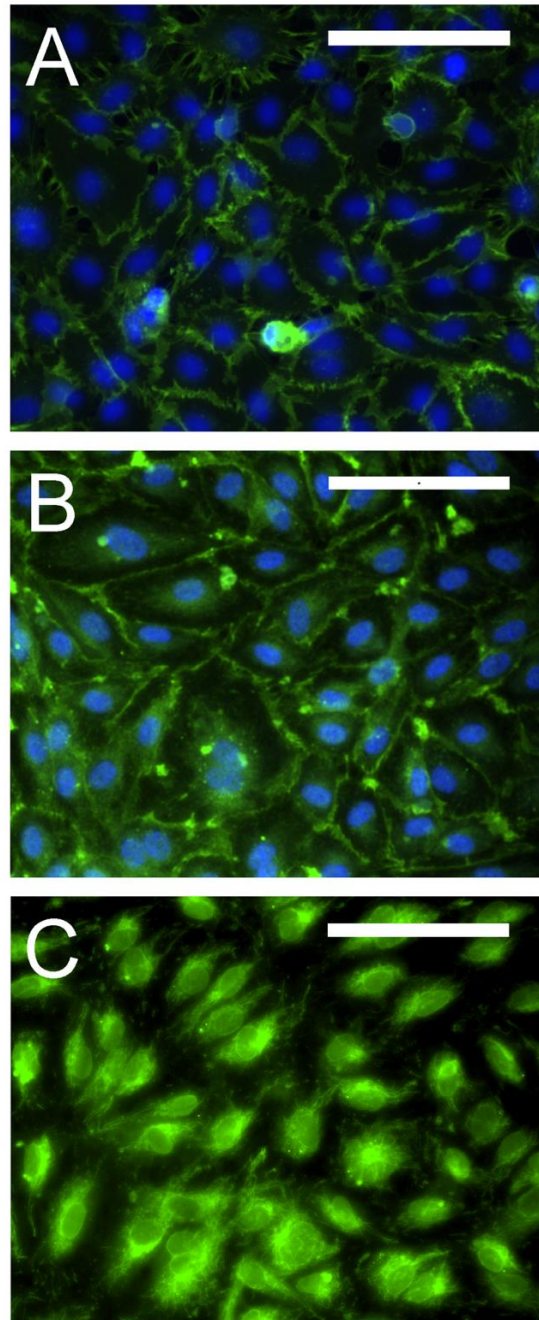


Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung endothelzellspezifischer Marker. Exemplarische Abbildungen des Spendersets 4SA. A: CD31-Färbung in grün mit Zellkernfärbung dargestellt in blau. B: VE-Cadherin-Färbung in grün und Zellkernfärbung in blau. C: vWF-Färbung in grün. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 100 μm .

4.1.1.3 Angiogenese-Assay

Als weiteres ECFC-Merkmal zählt die Fähigkeit, *in vitro* netzwerkartige Strukturen auf einer dreidimensionalen basalmembranartigen Matrix auszubilden (Fuchs und Hermanns, 2006). Dafür wurden die Zellen auf einer extrazellulären Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumors der Maus (Cultrex[®]) kultiviert und nach 24 h mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops auf ihre Netzwerkbildung analysiert. Repräsentativ für alle Spendersets ist in Abbildung 12 die Formation kapillarähnlicher Strukturen des Spenders EC08 abgebildet. In Abbildung 12-a

konnten bereits nach einer Inkubationsdauer von 6 h erste Netzwerkstrukturen detektiert werden. Diese bildeten sich über einen Zeitraum von 24 h zu feingliedrigen und tubulärartigen, zusammenhängenden Netzwerken aus (Abbildung 12-b). Damit wurde die angiogene Kapazität als wichtiges Merkmal für ECFCs bestätigt.

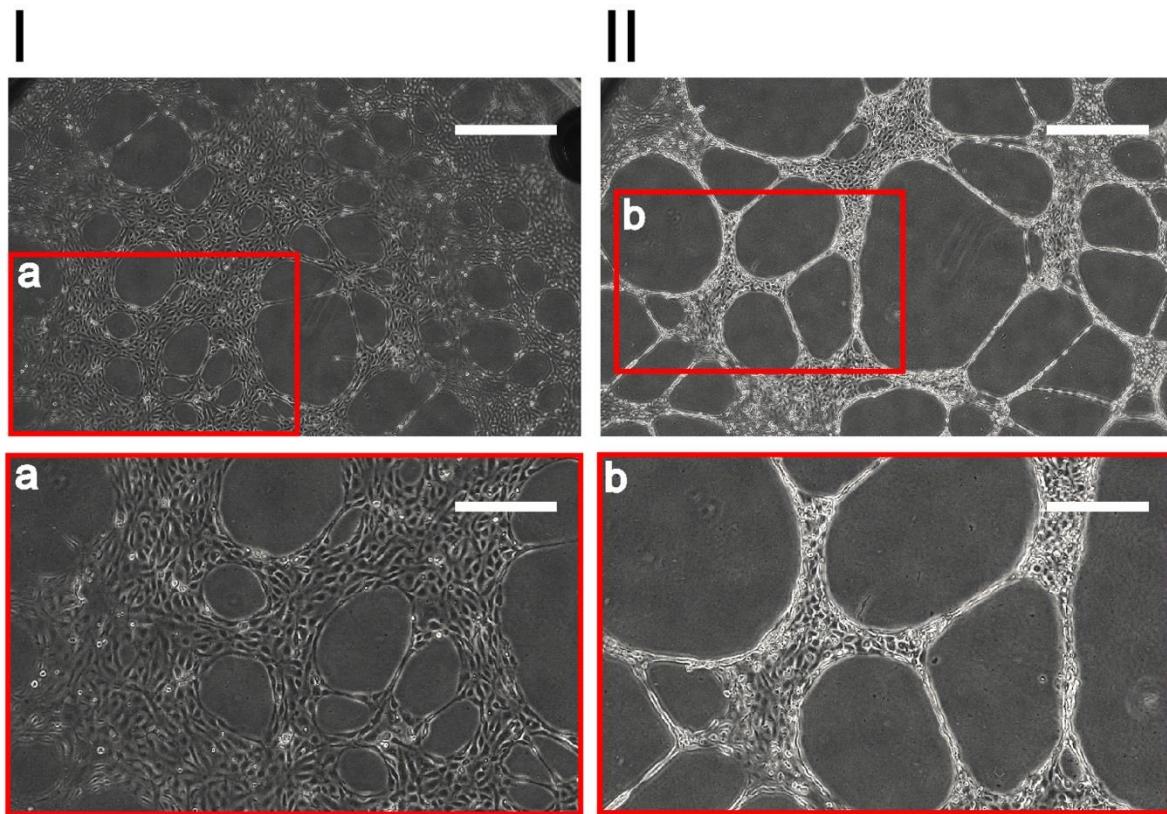


Abbildung 12: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC08 nach 6 h (I) und 24 h (II) Inkubation in einem Angiogenese-Assay. I: ECFCs weisen nach 6 h vereinzelt netzwerkartige Strukturen auf. II: ECFCs zeigen feingliedrige und tubulärartige Formationen 24 h nach Beginn des Assays auf. a,b stellen vergrößerte Aufnahmen dar. Der Maßstab zeigt oben 500 µm und unten 250 µm.

Die oben dargestellten Ergebnisse belegen, dass die isolierten MNCs aller Spender die erforderlichen Merkmale aufweisen, um eindeutig als ECFCs charakterisiert werden zu können.

4.1.2 Schlussfolgerung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) aus dem peripheren Blut ohne den Einsatz zusätzlicher Beschichtungen isoliert und vermehrt werden konnten. Die aus *buffy coats* gewonnenen mononukleären Zellen (MNCs) entwickelten ECFC-charakteristische Kolonien nach neun bis 14 Tagen in Kultur und konnten erfolgreich über mehrere Passagen expandiert werden. Die isolierten Zellen wurden eindeutig anhand der positiven Expression der endothelzellcharakteristischen Marker CD31, vWF, VE-Cadherin und

CD146 sowie der Fähigkeit, netzwerkartige Strukturen auf einer dreidimensionalen Matrix auszubilden, als ECFCs charakterisiert. Die in diesem Kapitel isolierten ECFCs stellen eine leicht zugängliche, immunologisch neutrale und autologe Zellquelle zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen dar.

4.2 Auswirkungen von Scherstress auf ECFCs im Vergleich zu HUVECs

Im vorherigen Kapitel wurden endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) aus dem peripheren Blut als mögliche autologe Quelle zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen untersucht. Neben der immunologischen Neutralität der Zellen müssen die angesiedelten Endothelzellen auch ihre funktionellen und adhäsiven Eigenschaften unter *in vivo* Strömungsbedingungen beibehalten (Pang et al., 2015). Eine Konditionierung unter physiologischen Scherstressbedingungen vor der Implantation führte in anderen Studien zu einer verbesserten Zelladhäsion und konnte die atheroprotektiven Eigenschaften der Endothelzellen erhöhen (Tsioufis et al., 2017; Yazdani et al., 2010).

Daher ist es das Ziel des folgenden Kapitels, die Auswirkung verschiedener Scherstressprofile auf die Funktion sowie Mechanosensitivität der isolierten ECFCs im Vergleich zu klassischen endothelialen Modellzellen aus der Literatur, den humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs), zu untersuchen. Dafür wurden die Wirkung verschiedener Flussstärken sowie der Einfluss eines physiologischen Pulses auf die Zellmorphologie, Zellausrichtung und Zell-Zell-Verbindungen analysiert. Weiterhin wurde die antithrombogene Wirkung hoher Scherstressraten anhand der Auswertung des Genexpressionsprofils des Markers Thrombomodulin bestimmt. Gleichzeitig wurde die metabolische Aktivität der Zellen während der dynamischen Kultivierung durch Messung des Glukoseverbrauchs überwacht. Dies sollte als Basis für die Kultivierung in einem dreidimensionalen Reaktorsystem dienen. Für die in diesem Kapitel durchgeführten Versuche wurden ECFCs des Spenderpools 4SA sowie HUVECs von Passage 5 bis Passage 6 verwendet. Die statistischen Auswertungen erfolgten mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Dieses Kapitel wurde teilweise veröffentlicht in: Kraus et al. (2021). *A pre-conditioning protocol of peripheral blood derived endothelial colony forming cells for endothelialization of tissue engineered constructs. Microvascular Research, 134, 104107.*

4.2.1 Auswirkung verschiedener Scherstressprofile auf Mechanosensitivität der Zellen

Die Auswirkungen dynamischer Kultivierungsbedingungen auf ECFCs und HUVECs wurden miteinander verglichen. Dafür wurden die Zellen in mit Fibrinogen (10 mg/mL) beschichteten Durchflussskammern über einen Zeitraum von 72 h unter dem Einfluss unterschiedlicher Scherstressprofile kultiviert. Nach einer initialen Adhäsionsphase von 4 h unter statischen Bedingungen wurden die Zellen stufenweise dem jeweiligen Scherstresslevel ausgesetzt. Dabei wurden drei unterschiedliche Flussbedingungen miteinander verglichen. Zum einen sollte ein

Scherstress von $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ quasi-statische Bedingungen (SC) repräsentieren. Ferner wurde ein Fluss von 5 dyn/cm^2 als mittlerer Scherstress (MSS), einem mittleren venösen Blutfluss angenähert (Malek et al., 1999), eingestellt. Schließlich sollte ein Scherstress in Höhe von 20 dyn/cm^2 einen mittleren arteriellen Blutfluss simulieren (Diamond et al., 1989) und wurde als hoher Scherstress (HSS) bezeichnet. Des Weiteren wurde ein pulsatiler Fluss mit einem durchschnittlichen Puls in Höhe von 1 Hz angelegt. Dabei wurde der Einfluss des physiologischen Herzschlages auf die Mechanosensitivität der Zellen sowie der direkte Unterschied zwischen laminarem und pulsatilem Fluss untersucht.

4.2.1.1 Analyse der Zellmorphologie

Die morphologischen Veränderungen wurden mithilfe von Phasenkontrastaufnahmen nach Abschluss der Flusskonditionierung analysiert. In Abbildung 13-A und Abbildung 14-A sind die ECFCs und HUVECs nach einer quasi-statischen Kultivierung (SC) dargestellt. Beide Zelltypen zeigten eine endothelzelltypische Kopfsteinpflasterformation in unregelmäßiger Anordnung sowie ohne definierte Orientierung. Verglichen dazu wurde nach Anlegen eines mittleren Scherstress von 5 dyn/cm^2 (MSS) deutlich, dass im Vergleich zu den HUVECs (Abbildung 14-B) nur die ECFCs sich in Flussrichtung (von links nach rechts) orientierten (Abbildung 13-B). Dieser Effekt wurde mit zunehmendem Scherstress (20 dyn/cm^2 =HSS) verstärkt (Abbildung 13-C). Die ECFCs wurden deutlich gestreckt und ihre lange Achse orientierte sich in Flussrichtung.

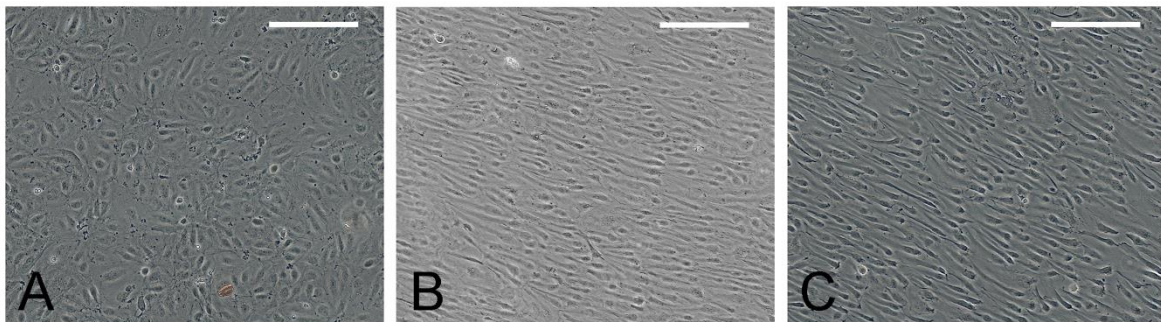


Abbildung 13: Phasenkontrastaufnahmen der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten ECFCs. A: ECFCs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit in Flussrichtung ausgerichteten und elongierten Zellen nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit langgestreckten in Flussrichtung orientierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

Die HUVECs hingegen wiesen unter MSS weiterhin eine ungeordnete Orientierung auf (Abbildung 14-B) und zeigten erst unter HSS in Flussrichtung ausgerichtete Zellen (Abbildung 14-C).

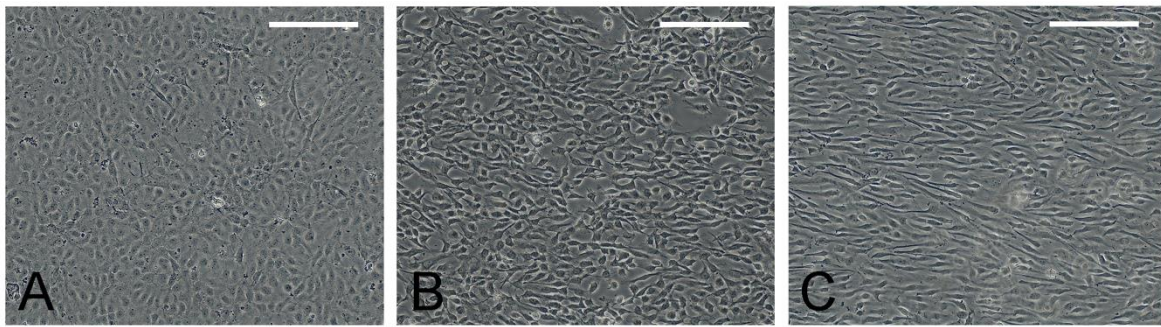


Abbildung 14: Phasenkontrastaufnahmen der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten HUVECs. A: HUVECs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: HUVECs mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: HUVECs mit in Flussrichtung orientierten, elongierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

Die Zellorientierung in Flussrichtung konnte sowohl unter laminaren als auch unter pulsatilen Flussbedingungen beobachtet werden. Der Einsatz eines physiologischen Pulses zeigte eine ähnliche Wirkung in Bezug auf die Ausrichtung und Orientierung der ECFCs und HUVECs verglichen mit laminaren Bedingungen (Abbildung 15 und Abbildung 16). *In situ* Mikroskopieaufnahmen zeigen, dass die Zellorientierung der ECFCs unter MSS nach 35 h begann, wohingegen unter HSS bereits nach 24 h in Flussrichtung ausgerichtete, parallele Zellstrukturen zu beobachten waren (siehe Kraus et al., 2021-Supplementary Data: Video 1-3).

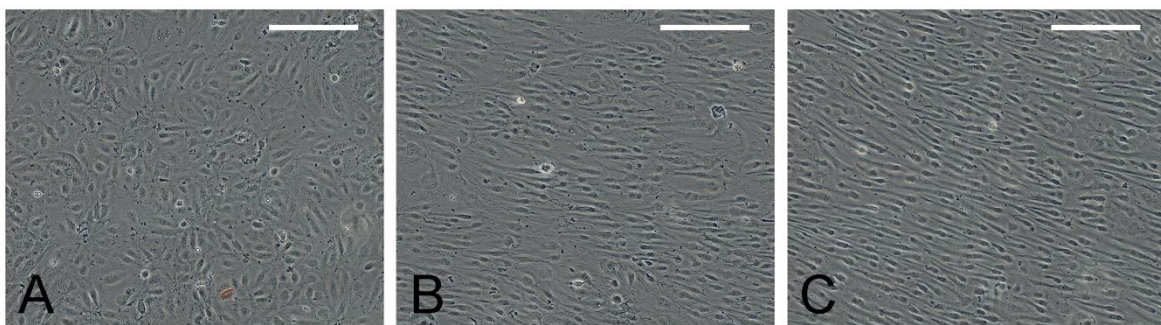


Abbildung 15: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen (1 Hz) Flussbedingungen kultivierten ECFCs. A: ECFCs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit in Flussrichtung ausgerichteten und elongierten Zellen nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit langgestreckten in Flussrichtung orientierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

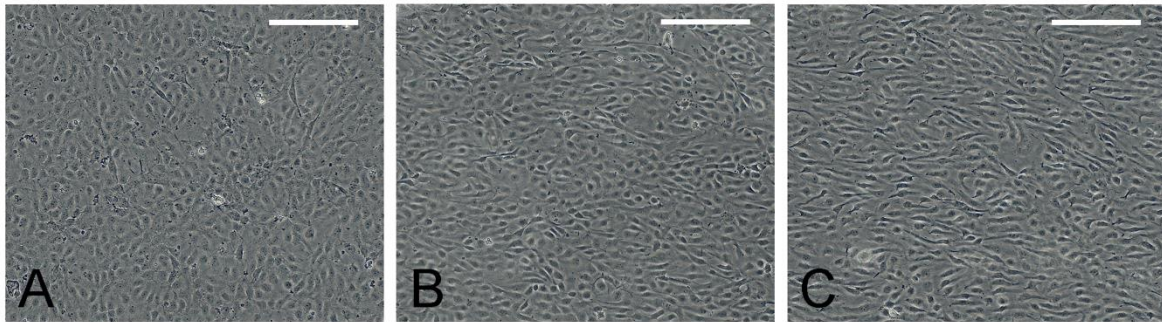


Abbildung 16: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen (1 Hz) Flussbedingungen kultivierten HUVECs. A: HUVECs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: HUVECs mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: HUVECs mit in Flussrichtung orientierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

4.2.1.2 Untersuchung der Zell-Zell-Verbindungen

Zusätzlich wurde der Einfluss der verschiedenen Scherstressbedingungen auf die Zell-Zell-Verbindungen sowohl für ECFCs als auch für HUVECs untersucht. Dafür wurden die Zellen nach der jeweiligen Flusskultivierung fixiert und anschließend ihre Monolayerintegrität mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen von VE-Cadherin sichtbar gemacht. In Abbildung 17 ist VE-Cadherin grün angefärbt und in beiden Zelltypen unter allen Bedingungen deutlich erkennbar. Durch die Anfärbung von VE-Cadherin wurden die Zell-Zell-Kontaktstellen stark hervorgehoben, wodurch sich die einzelnen Zellen anhand ihrer Form und Ausrichtung gut voneinander unterscheiden ließen. Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung konnten somit die Ergebnisse der Phasenkontrastaufnahmen sowohl für laminare (Abbildung 17) als auch pulsatile (Abbildung 18) Bedingungen bestätigt werden. Die ECFCs zeigten mit zunehmendem Scherstress in Flussrichtung ausgerichtete und verlängerte Zellformen auf. Im Gegensatz dazu wiesen HUVECs unter allen dynamischen Bedingungen eine ungeordnete polygonale Morphologie auf, welche sich nicht von den quasi-statischen Bedingungen abgrenzte.

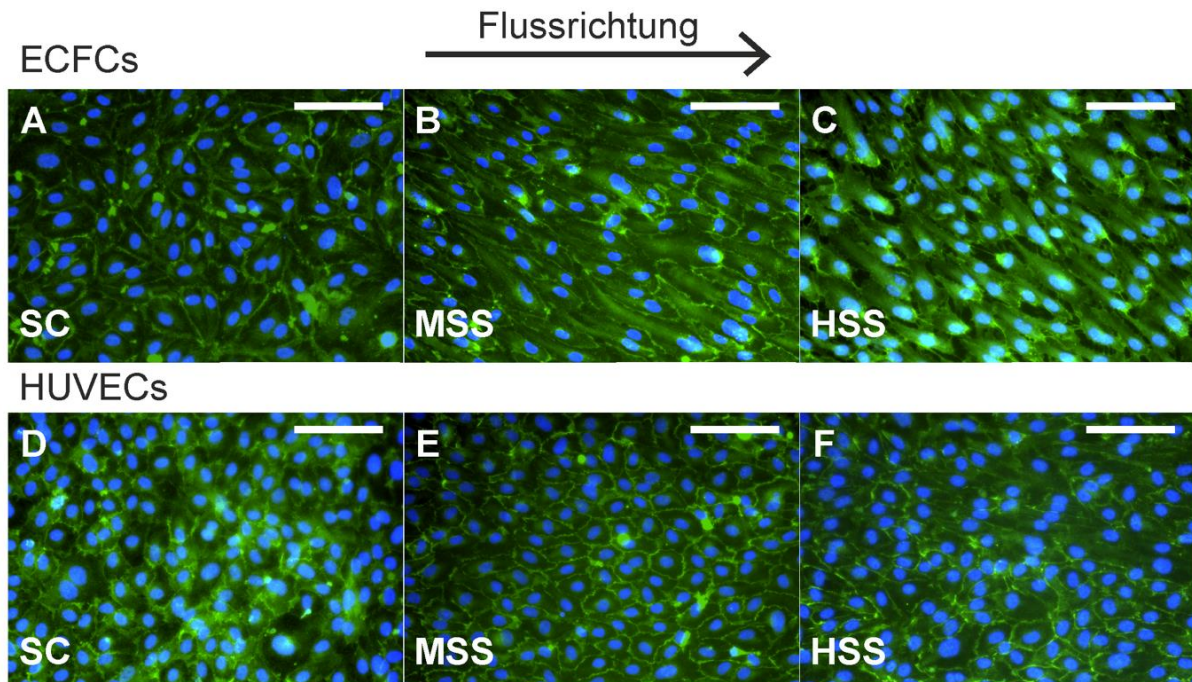


Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahmen der VE-Cadherine der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach quasi-statischen Bedingungen (SC = 0,5 dyn/cm²). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneter langgestreckter Morphologie und hoher Monolayerintegrität nach mittlerem Scherstress (MSS = 5 dyn/cm²). E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten Zellen nach mittlerem Scherstress (MSS = 5 dyn/cm²). C: In Flussrichtung orientierte ECFCs mit unregelmäßiger Monolayerintegrität und lückenhaften Zell-Zell-Verbindungen nach hohem Scherstress (HSS = 20 dyn/cm²). F: HUVECs mit ungeordneter polygonaler Morphologie nach hohem Scherstress (HSS = 20 dyn/cm²). Die VE-Cadherine sind mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung nach Fixierung der Zellen in grün angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 µm.

Die Anfärbung der Zell-Zell-Kontakte ermöglichte ebenfalls eine Analyse der Monolayerintegrität. Eine unzusammenhängende Endothelschicht mit einer niedrigen Monolayerintegrität bedeutet einen möglichen thrombogenen Risikofaktor für spätere Blutkontaktstellen auf dem Implantat. In vorhandenen Lücken zwischen den Zellen können Blutplättchen vereinfacht anhaften und aggregieren, wodurch eine Thromboseentstehung begünstigt wird (Dong et al., 2019). Eine erhöhte Monolayerintegrität ist für ECFCs unter laminaren Bedingungen nur unter mittlerem Scherstress erkennbar. Unter hohen laminaren Scherstressbedingungen weisen die Zellen eine unzusammenhängende Zellschicht auf (Abbildung 17-C). Im Gegensatz dazu sind diese Lücken unter pulsatilem Fluss geschlossen und die Zellen behalten ihre stabilen Zell-Zell-Kontakte auch unter erhöhten Scherstressbedingungen bei (Abbildung 18-C).

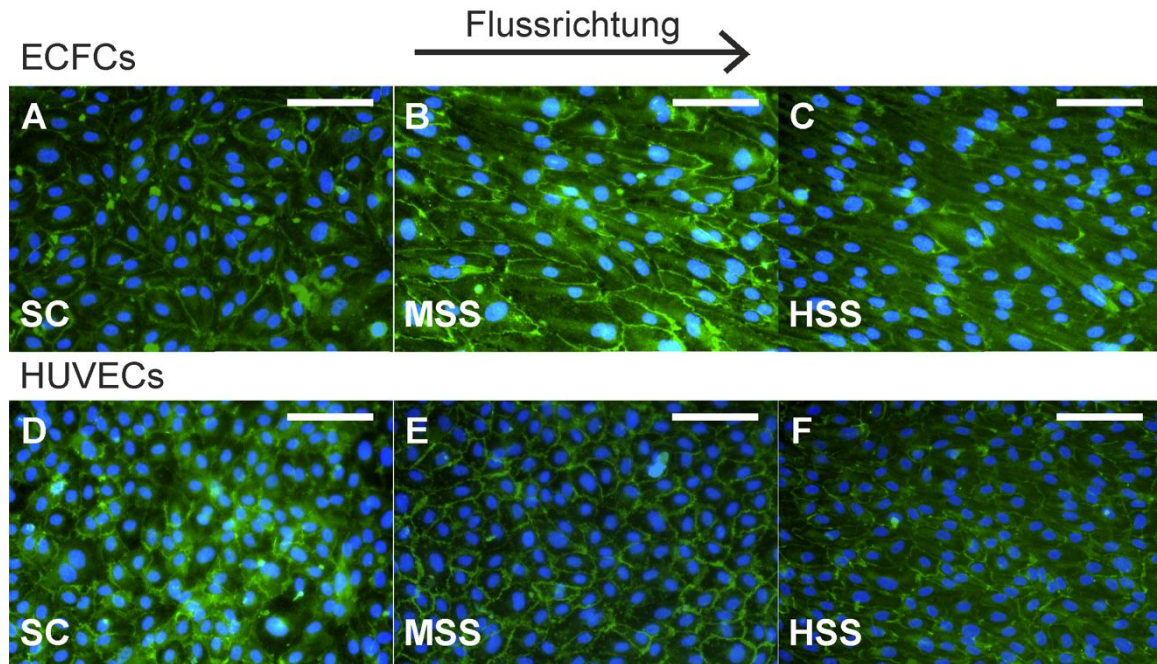


Abbildung 18: Immunfluoreszenzaufnahmen der VE-Cadherine der unter pulsatilen Flussbedingungen (1 Hz) kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach quasi-statischen Bedingungen ($SC = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneter langgestreckter Morphologie und hoher Monolayerintegrität nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten Zellen nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). C: In Flussrichtung orientierte ECFCs mit regelmäßiger Monolayerintegrität und starken Zell-Zell-Verbindungen nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). F: HUVECs mit ungeordneter polygonaler Morphologie nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). Die VE-Cadherine sind mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung nach Fixierung der Zellen in grün angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

4.2.1.3 Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts

Zur Veranschaulichung der zytoskelettalen Veränderungen wurden die F-Aktin-Mikrofilamente (FAM) mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung nach Fixierung der Zellen sichtbar gemacht. Unter quasi-statischen Bedingungen zeigten sich sowohl in den ECFCs als auch in den HUVECs ungeordnete und zufällig im Zytoplasma bzw. in der Zellperipherie verteilte Filamentstrukturen (Abbildung 19-A,-D). Mit zunehmendem Scherstress wiesen die ECFCs in Flussrichtung organisierte und ausgerichtete FAM auf. Im Zytoskelett konnten dicht organisierte Aktinbündel verstärkt an den Zellmembranen beobachtet werden (Abbildung 19-B,-C). Diese Beobachtungen konnten sowohl unter laminaren als auch pulsatilen Bedingungen getroffen werden (Abbildung 20).

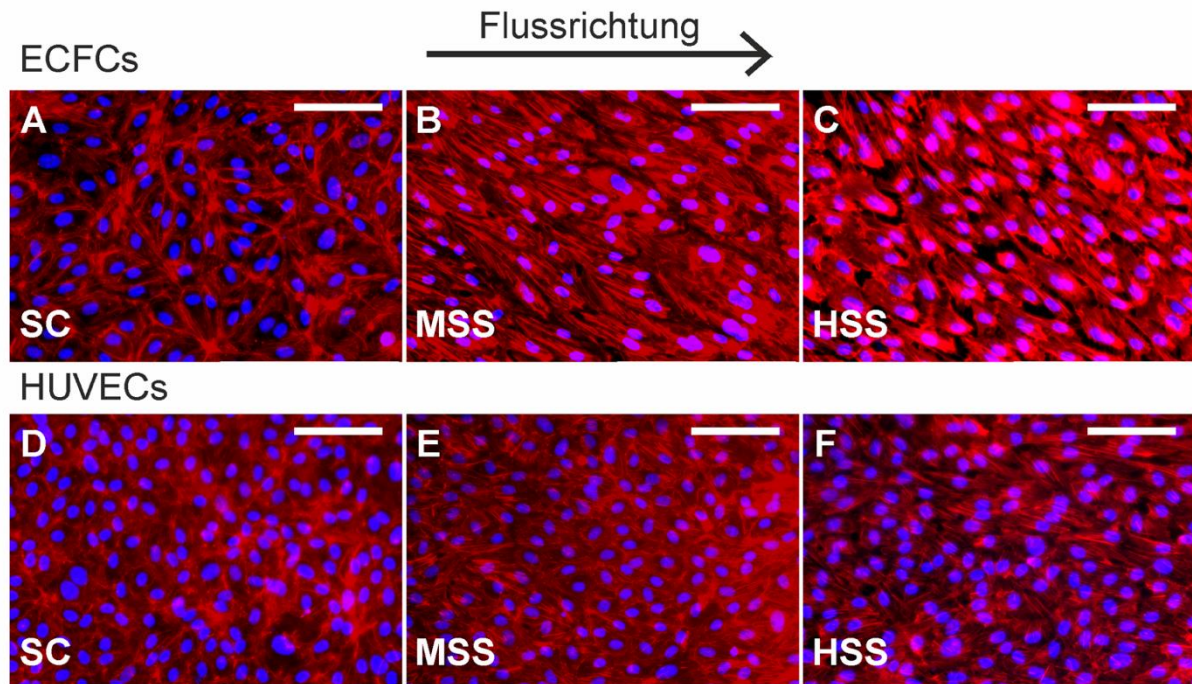


Abbildung 19: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfilamente der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneten F-Aktin-Mikrofilamenten (FAM) nach quasi-statischen Bedingungen ($SC = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneten langgestreckten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit in Flussrichtung orientierten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). F: HUVECs mit ungeordneten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). Die FAM sind nach Fixierung der Zellen mit Phalloidin rot angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

Im Gegensatz dazu, zeigten sich in laminar kultivierten HUVECs unter allen dynamischen Bedingungen ungeordnete und zufällig in der Zellperipherie angeordnete FAM-Strukturen. Es konnten weder unter mittlerem noch unter hohem Scherstress in Flussrichtung ausgerichtete Aktinbündel beobachtet werden (Abbildung 19-E,-F). Nach pulsatilen Scherstressbedingungen präsentierte sich in den HUVECs nur nach 20 dyn/cm^2 eine zunehmende Organisation der Aktinfilamente (Abbildung 20). Diese lag jedoch ohne spezifische Ausrichtung der Zellen vor.

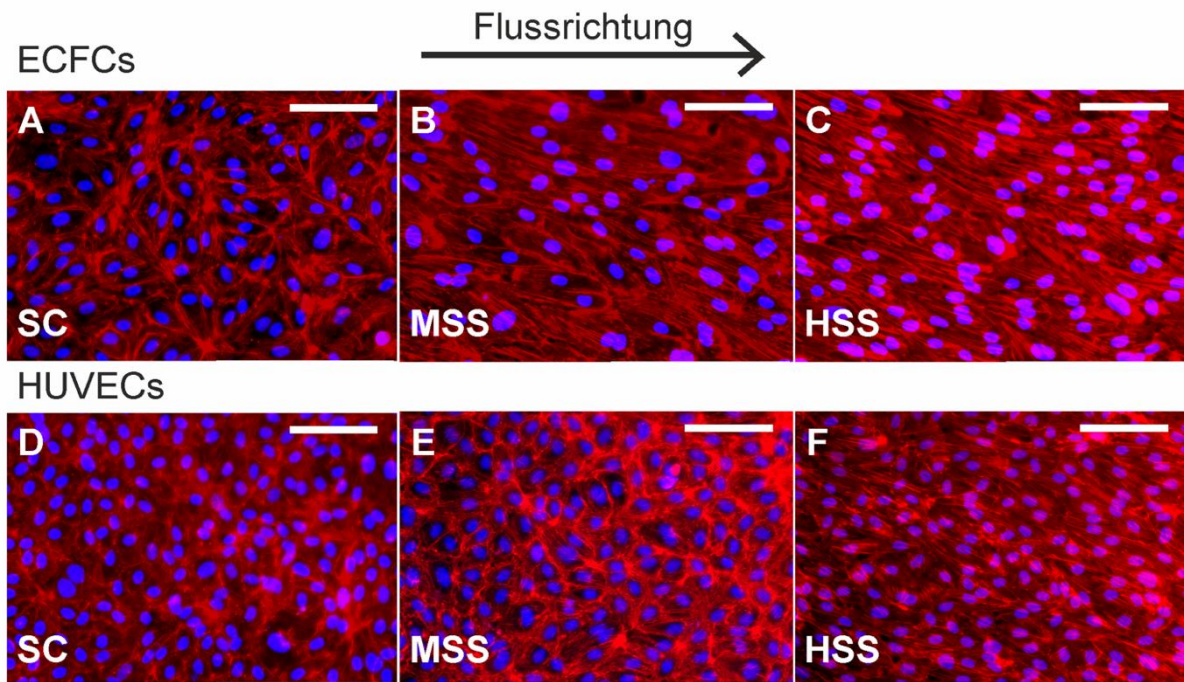


Abbildung 20: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfilamente der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneten F-Aktin-Mikrofilamenten (FAM) nach quasi-statischen Bedingungen ($SC = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneten langgestreckten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit in Flussrichtung orientierten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). F: HUVECs mit zum Teil in Flussrichtung orientierten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). Die FAM sind nach Fixierung der Zellen mit Phalloidin rot angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

4.2.1.4 Rundheit der Zellen und Zellausrichtung

Zur Quantifizierung der morphologischen Veränderungen wurden die Zellformen mithilfe der VE-Cadherin-Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Da VE-Cadherin an den Zell-Zell-Kontaktstellen exprimiert wird (Hordijk et al., 1999) (Abbildung 21-A), ist eine Flächenabgrenzung der Zellen durch Markierung der Zellränder möglich (Abbildung 21-B). Dadurch konnten sowohl die Fläche als auch die minimale und maximale Achsenlänge der einzelnen Zellen gemessen werden. Das Verhältnis von maximaler zu minimaler Achse gibt Auskunft über die Elongation der Zellen nach der Scherstressbehandlung. Je größer das Verhältnis, desto mehr wurden die Zellen gestreckt. In Abbildung 21-C ist das Achsenverhältnis für beide Zelltypen nach statischer sowie dynamischer Kultivierung dargestellt. Es wird ersichtlich, dass sich für ECFCs verglichen mit statisch kultivierten Zellen ein zunehmender Scherstress signifikant auf das Achsenverhältnis auswirkte. Ein mittlerer Fluss von 5 dyn/cm^2 führte sowohl unter laminaren als auch pulsatilen Bedingungen zu signifikanten Veränderungen des Achsenverhältnisses. Dabei ist zu beobachten, dass der

Einfluss des Pulses ebenfalls signifikante Auswirkungen auf das Achsenverhältnis nahm. Die ECFCs elongierten signifikant stärker nach einem pulsatilen mittleren Fluss im Gegensatz zu laminar kultivierten Zellen (p-Wert kleiner 0,01). Unter hohen Scherstressbedingungen von 20 dyn/cm^2 spielte der Puls nur eine untergeordnete Rolle, da zwischen laminaren und pulsatilen Flussbedingungen kein signifikanter Unterschied bestand. Ebenfalls ist zu beobachten, dass unter pulsatilen Bedingungen die Scherstresshöhe sich nicht signifikant auf das Achsenverhältnis der ECFCs auswirkte. Im Gegensatz dazu hat ein hoher laminarer Scherstress signifikante Auswirkungen verglichen mit mittleren laminaren Scherstressraten (p-Wert kleiner 0,01). Daraus lässt sich schließen, dass ein hoher Scherstress von 20 dyn/cm^2 sowie ein pulsatiler Fluss von 1 Hz sich stark auf die Elongation der ECFCs und somit auf ihre Ausrichtung auswirkte.

Verglichen dazu, zeigten HUVECs nur unter pulsatilen Kultivierungsbedingungen signifikant erhöhte Achsenverhältnisse.

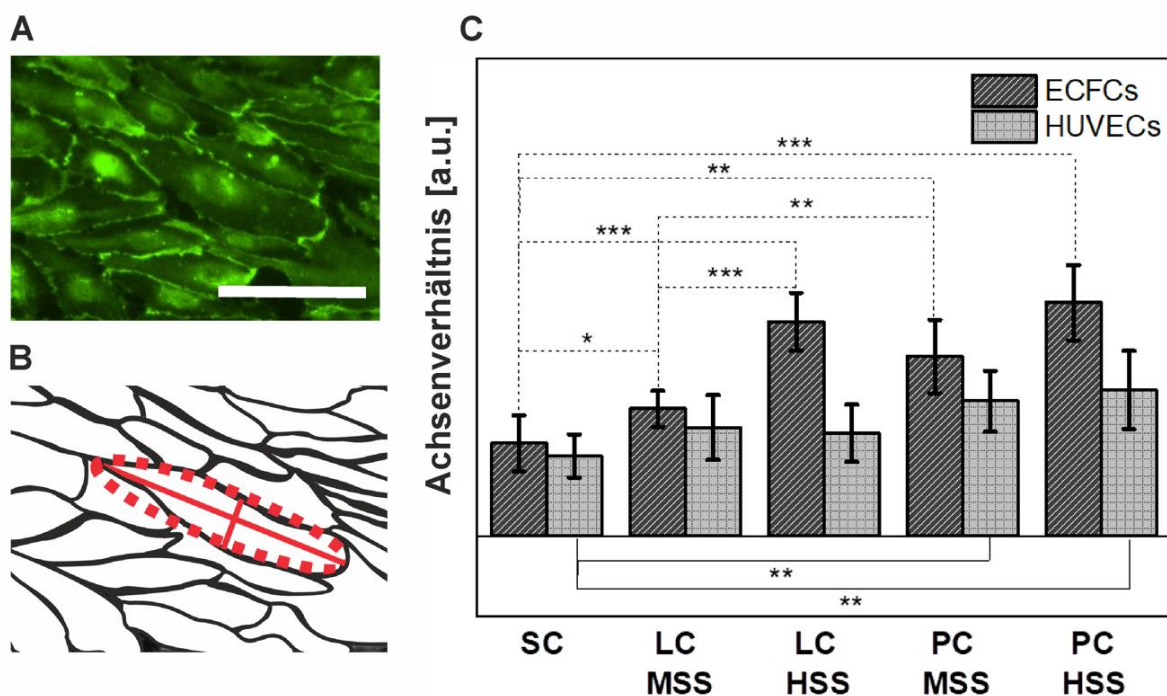


Abbildung 21: Analyse des Achsenverhältnisses der flusskultivierten ECFCs und HUVECs. A: Repräsentative VE-Cadherin-Färbung der unter mittlerem laminarem Scherstress kultivierten ECFCs. Maßstab beträgt $100 \mu\text{m}$. B: Die Bildverarbeitung der VE-Cadherin-angefärbten Zellen wurde mithilfe der ImageJ- und CorelDraw-Software durchgeführt. Zellränder sind schwarz hervorgehoben, um Zellformen und maximale und minimale Zellachsen zu analysieren. C: Achsenverhältnisse der unter verschiedenen Scherstressbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. SC = quasi-statisch kultivierte Zellen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), LC = laminarer Fluss, PC = pulsatiler Fluss (1 Hz). MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm^2), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm^2). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N = 10$ verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen.

Um diese Ergebnisse zu bekräftigen und Unterschiede zwischen ECFCs und HUVECs hervorzuheben wurde die Rundheit der Zellen ermittelt. Dabei wurde die Fläche der Zellen (A) sowie die maximale Sehnenlänge (l_{max}) gemessen und die Rundheit anschließend anhand der Formel nach Brown et al. berechnet (Brown et al., 2009):

$$Rundheit = \frac{4A}{\pi l_{max}^2}$$

Die Rundheitswerte wurden zwischen 0 und 1 festgelegt. Je mehr sich die Werte in Richtung 0 orientierten, desto elongierter lagen die Zellen vor.

Die Analyse der Rundheit wurde sowohl für laminare als auch pulsatile Bedingungen durchgeführt und ist in Abbildung 22 dargestellt. Es lässt sich beobachten, dass die Rundheit der Zellen unter statischen Kultivierungsbedingungen (SC) nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Zelltypen ausfiel (ECFCs: $0,8 \pm 0,3$; HUVECs: $0,9 \pm 0,2$). Dieses Ergebnis belegt die mikroskopischen Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzauswertungen aus den Kapiteln 4.2.1.1, 4.2.1.2 und 4.2.1.3. Die Zellen beider Zelltypen zeigten eine polygonale pflastersteinförmige Morphologie mit Rundheitswerten nahe 1 auf (Abbildung 13-A; Abbildung 14-A; Abbildung 17-A.-D; Abbildung 19-A,-D). Mit zunehmendem Scherstress verminderten beide Zelltypen ihre Rundheit. Dabei ist hervorzuheben, dass sowohl unter laminaren als auch pulsatilen Flussbedingungen die Rundheit der ECFCs signifikant niedriger ausfiel im Vergleich zur Rundheit der HUVECs. Unter mittlerem laminarem Fluss (MSS) erreichten die ECFCs eine mittlere Rundheit von $0,4 \pm 0,1$, während die HUVECs Rundheitswerte von $0,7 \pm 0,3$ aufwiesen. Durch Erhöhung der Scherstressrate auf 20 dyn/cm^2 (HSS) verminderten die ECFCs ihre Rundheit auf $0,3 \pm 0,1$, welche signifikant niedriger ausfiel als die Rundheit der HUVECs ($0,6 \pm 0,2$). Durch die Zugabe eines Pulses wurde dieser Effekt zusätzlich verstärkt. Unter mittlerem pulsatilem Scherstress verminderten die ECFCs signifikant stärker ($0,2 \pm 0,1$) ihre Rundheit verglichen zu den HUVECs ($0,5 \pm 0,2$). Dies konnte ebenfalls unter einem hohen pulsatilem Fluss beobachtet werden. ECFCs wiesen dabei Rundheitswerte von $0,2 \pm 0,0$ und HUVECs Werte um $0,5 \pm 0,3$ auf. Vergleicht man nun die Werte innerhalb der Zellgruppen, fällt auf, dass ein hoher Scherstress nur für ECFCs signifikante Auswirkungen auf die Rundheit der Zellen hat. Demnach ist der p-Wert für ECFCs sowohl zwischen MSS laminar und HSS laminar als auch zwischen MSS pulsatil und HSS pulsatil kleiner 0,001. Dagegen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zellgruppe der HUVECs nachgewiesen werden.

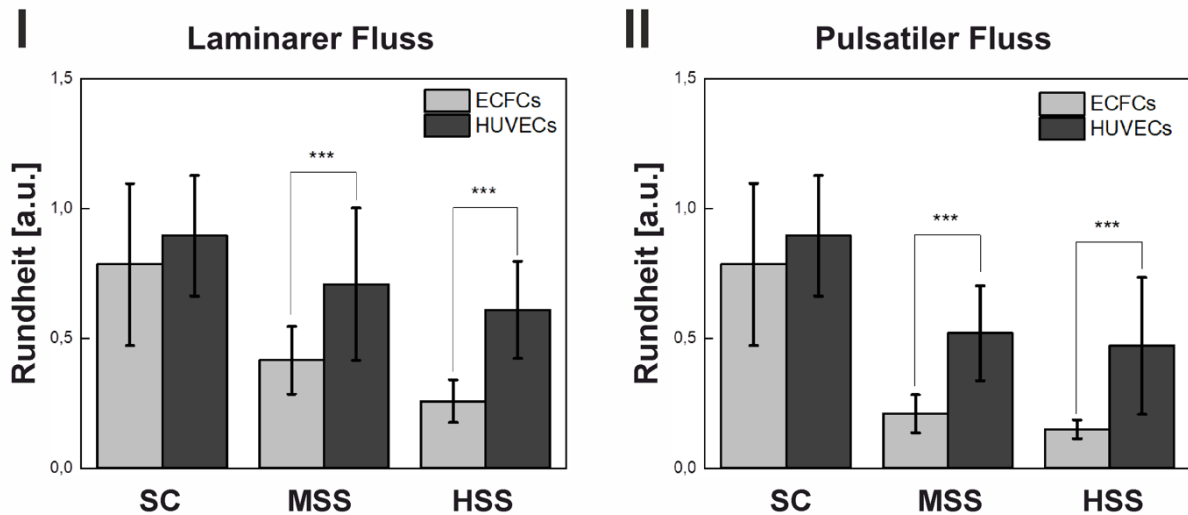


Abbildung 22: Analyse der Rundheit der flusskultivierten ECFCs und HUVECs. I: Rundheit der unter laminaren Scherstressbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. II: Rundheit der unter pulsatilem (1 Hz) Scherstressbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. SC = quasi-statisch kultivierte Zellen (0,5 dyn/cm²), MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm²), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm²). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 10 verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. *** = p<0,001 definiert signifikante Änderungen.

Wird nun der Einfluss des Pulses untersucht, ergeben sich signifikante Unterschiede für beide Zellgruppen zwischen MSS laminar und MSS pulsatil (HUVECs: p-Wert kleiner 0,01; ECFCs: p-Wert kleiner 0,001) sowie zwischen HSS laminar und HSS pulsatil (HUVECs: p-Wert kleiner 0,05; ECFCs: p-Wert kleiner 0,001). Die stärker ausfallenden Signifikanzen deuten demnach auf eine höhere Sensibilität der ECFCs aufgrund der Scherstresskultivierung hin.

4.2.2 Auswirkung von Scherstress auf Thrombogenität der Zellen

In dieser Arbeit wurde die Genexpression des Markers Thrombomodulin mithilfe der quantitativen Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) für beide Zelltypen, ECFCs und HUVECs, nach dynamischer und statischer Kultivierung bestimmt. Für die Durchführung der qRT-PCR wurde die zelluläre RNA der unter verschiedenen Flussbedingungen kultivierten Zellen isoliert und in cDNA transkribiert. In Tabelle 11 ist eine Übersicht der verwendeten Primerpaare aufgezeigt. Als Referenzgen wurde β -Actin verwendet. Die Thrombomodulin-Transkriptionsniveaus wurden mit der Δ Ct-Methode berechnet und sind in Abbildung 23 dargestellt.

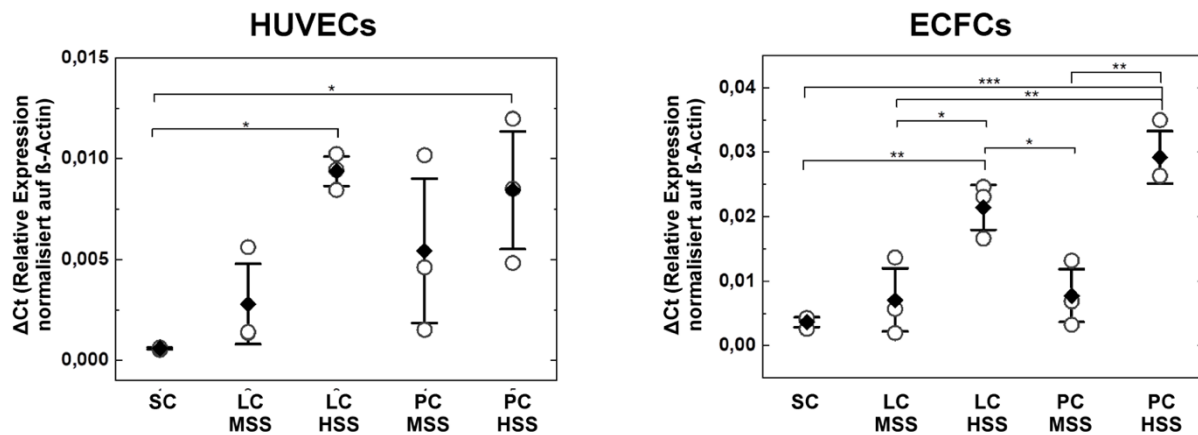


Abbildung 23: Normierte Darstellung der Transkriptionslevel des antithrombogenen Markers Thrombomodulin relativ zur β -Actin-Genexpression für flusskultivierte HUVECs und ECFCs. SC = quasi-statisch kultivierte Zellen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), LC = laminarer Fluss, PC = pulsatiler Fluss (1 Hz), MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm^2), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm^2). Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus $N = 3$ unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die schwarzen Rauten symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen.

Es wird ersichtlich, dass ein hoher Scherstress (HSS) in HUVECs eine signifikant erhöhte Thrombomodulinexpression im Vergleich zu quasi-statisch kultivierten Zellen bewirkte (Abbildung 23, linke Abbildung). Dieser Effekt ist sowohl unter laminaren als auch pulsatilem Bedingungen zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte innerhalb der Zellgruppe der ECFCs festgestellt werden, dass unter laminaren und pulsatilem Flussbedingungen zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen mittlerem und hohem Scherstress auftraten (Abbildung 23, rechte Abbildung). Außerdem lagen die Signifikanzniveaus deutlich ausgeprägter vor. Demnach ist der p -Wert für ECFCs zwischen quasi-statisch kultivierten Zellen und unter hohem Scherstress kultivierten Zellen bei laminarem Fluss kleiner $0,01$ sowie bei pulsatilem Fluss kleiner $0,001$, wohingegen er bei HUVECs nur kleiner $0,05$ misst. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein hoher Scherstress die Thrombomodulinexpression in beiden Zelltypen hochregulierte, die Genexpression in ECFCs jedoch verstärkt ausgeprägt war.

4.2.3 Analyse des Glukoseverbrauchs nach dynamischer Kultivierung

Für eine zukünftige Kultivierung in einem Bioreaktorsystem ist eine Überwachung der biochemischen Parameter wie Sauerstoff, Glukose und Laktat, zur Gewährleistung der Zellvitalität entscheidend (Maschhoff et al., 2017). Daher sollte im folgenden Abschnitt der Einfluss von Scherstress auf die metabolische Aktivität der Zellen untersucht werden. Dafür wurde der Glukosegehalt im Medium-Überstand nach Abschluss der Kultivierung ($t=72 \text{ h}$) für jede Bedingung mithilfe eines Bioprozessanalysegeräts photometrisch gemessen. Die

Messauswertungen sind in Abbildung 24 für beide Zelltypen dargestellt. Mit zunehmendem Scherstress konnte eine Abnahme der Glukosekonzentration im Medium für ECFCs festgestellt werden (Abbildung 24, rechte Abbildung). Dabei zeigten die ECFCs unter einem pulsatilen hohen Scherstress (PC HSS) einen signifikant höheren Glukoseverbrauch im Vergleich zu quasi-statisch kultivierten Zellen (SC, p-Wert kleiner 0,01). Unter PC HSS Bedingungen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu ECFCs unter laminarem hohen Scherstress (LC HSS) und pulsatilem mittlerem Scherstress (PC MSS). Gleichzeitig konnte ein signifikanter Unterschied zwischen mittlerem laminarem Scherstress (LC MSS) und PC MSS beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die HUVECs keinen signifikanten Unterschied (p-Werte größer 0,05) innerhalb der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (Abbildung 24, linke Abbildung).

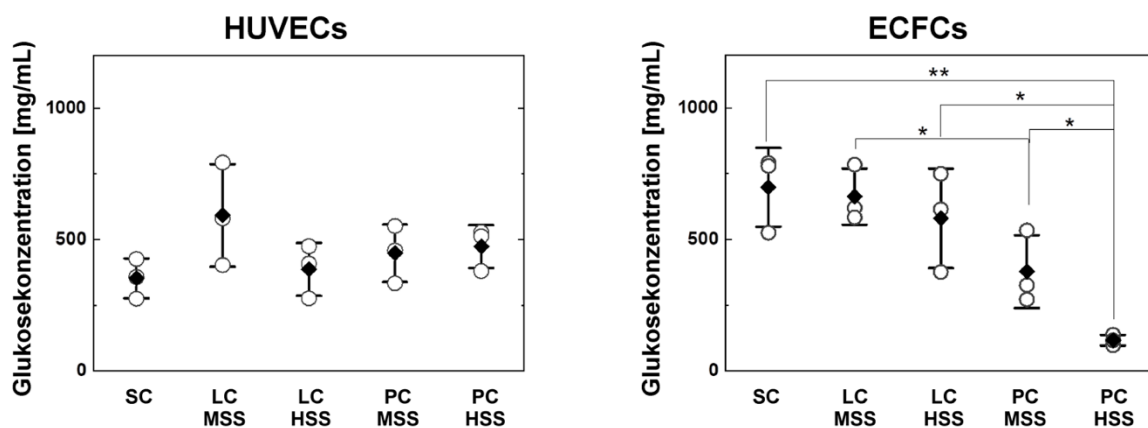


Abbildung 24: Glukoseverbrauch der flusskultivierten HUVECs und ECFCs nach 72 h Kultivierung. SC = quasi-statisch kultivierte Zellen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), LC = laminarer Fluss, PC = pulsatiler Fluss (1 Hz), MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm^2), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm^2). Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus $N = 3$ unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die schwarzen Raute symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ definieren signifikante Änderungen.

4.2.4 Schlussfolgerung

In diesem Kapitel wurde erfolgreich ein dynamisches Konditionierungsprotokoll entwickelt, um eine verbesserte Zelladhäsion, Monolayerintegrität sowie antithrombogene Wirkung in endothelialen koloniebildenden Zellen (ECFCs) zu induzieren. Dafür wurden ECFCs im Vergleich zu Modell-Endothelzellen aus der Literatur, den humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) unter verschiedenen Scherstressraten über einen Zeitraum von 72 h laminar und pulsatil (1 Hz) kultiviert. Dabei erwies sich ein hoher Scherstress (20 dyn/cm^2) im Vergleich zu einem mittlerem Scherstress (5 dyn/cm^2) als erforderlich, um in ECFCs eine Ausrichtung und Anordnung der Aktinfilamente und

VE-Cadherine in Flussrichtung hervorzurufen. Zudem wurde anhand dichter Zell-Zell-Verbindungen gezeigt, dass ein pulsatiler hoher Scherstress (PC-HSS = 20 dyn/cm²; 1 Hz) eine höhere Monolayerintegrität in ECFCs hervorrief als laminare Scherstressbedingungen.

Dabei zeigten sich ECFCs im Vergleich zu HUVECs sensitiver gegenüber dynamischen Kultivierungsbedingungen. Ferner führte die Kultivierung unter PC HSS zu einer signifikant erhöhten Genexpression des atheroprotektiven Markers Thrombomodulin sowohl in ECFCs als auch in HUVECs.

4.3 Arteriovenöse Differenzierungsanalyse der isolierten ECFCs

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) eine höhere Sensitivität gegenüber Strömungsbedingungen als humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs) zeigten und damit eine favorisierte Zellquelle zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßimplantate darstellen. Dennoch weist eine Auswertung von Wang et al. darauf hin, dass 59 % der zwischen 2013 und 2018 veröffentlichten Studien, die das vaskuläre *Tissue Engineering* thematisierten, HUVECs als bevorzugte Zellquelle einsetzten (Wang et al., 2019). Die Verwendung von HUVECs in klinischen Anwendungen würde jedoch aufgrund ihres allogenen Ursprungs immunsuppressive Behandlungen erfordern (Hendrickx et al., 2011). Es konnte zudem gezeigt werden, dass insbesondere für die Endothelialisierung von arteriellen Bypasskonstrukten ein arterieller Phänotyp der verwendeten Endothelzellen zu einer höheren Durchgängigkeitsrate nach Implantierung der Gefäßprothese führt (Jannati et al., 2019; Riess et al., 2017).

Aus diesem Grund soll im folgenden Kapitel untersucht werden, inwieweit eine Vorkonditionierung unter einem hohen Scherstress zur arteriellen Differenzierung des unreifen endothelialen Vorläuferzelltyps ECFCs führt.

Dafür werden die ECFCs unter statischen sowie dynamischen Bedingungen kultiviert und anschließend anhand ihrer Morphologie, sowie zytoskelettalen Veränderungen mit adulten venösen und arteriellen Endothelzellen verglichen. Ferner werden die Zellen auf mRNA-Ebene näher charakterisiert, um den Differenzierungs- und Thrombogenitätszustand der Zellen unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen zu analysieren. Um eine Entzündungsreaktion nach Implantierung *in vitro* zu simulieren, wurden die Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) inkubiert, um einen Verlust der anti-inflammatorischen und anti-thrombogenen Eigenschaften der Zellen auszulösen. Da im vorherigen Versuch ECFCs besonders unter hohen pulsatilen Scherstressbedingungen (20 dyn/cm^2 ; 1 Hz) eine verbesserte Monolayerintegrität und verstärkte Zellausrichtung in Flussrichtung aufwiesen, wurde dieser dynamische Kultivierungszustand als optimale Konditionierungsbedingung gewählt. Für die in diesem Kapitel durchgeführten Versuche wurden ECFCs aller Spender sowie HUVECs und humane Endothelzellen der Aorta (HAECs) von Passage 4 bis Passage 6 verwendet. Die statistischen Auswertungen erfolgten mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Dieses Kapitel wurde teilweise veröffentlicht in: Kraus et al., 2022 (akzeptiert 15.06.2022), *Peripheral blood derived endothelial colony*

forming cells as suitable cell source for pre-endothelialization of arterial vascular grafts under dynamic flow conditions, Microvascular Research.

4.3.1 Analyse der Verdopplungszeit

Zur Vorbereitung der dynamischen Konditionierung wurden die Zellen in einer Zelldichte von 6667 Zellen/cm² ausplattiert und bis zum Erreichen einer 90 %igen Konfluenz kultiviert. Dabei zeigten sich für die jeweiligen Zelltypen unterschiedliche Verdopplungszeiten (Abbildung 25). Zwischen HAECs ($2,7 \pm 0,6$ Tage) und HUVECs ($1,0 \pm 0,1$ Tage) wurde ein signifikanter Unterschied deutlich. Die ECFCs wiesen eine mittlere Verdopplungszeit von $2,4 \pm 1,5$ Tagen auf und unterschieden sich somit ebenfalls signifikant von den HUVECs. Im Gegensatz dazu konnte unter den verwendeten statischen Kultivierungsbedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen ECFCs und arteriellen HAECs festgestellt werden.

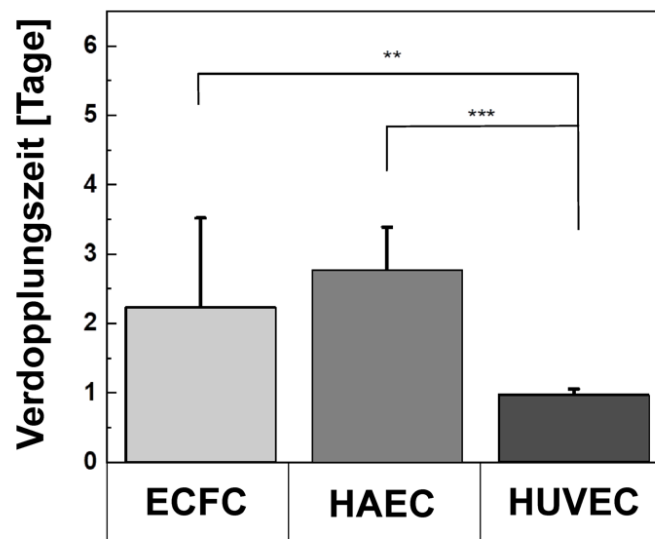


Abbildung 25: Analyse der Verdopplungszeiten der *in vitro* kultivierten ECFCs, HAECs und HUVECs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 5 verschiedenen Passagen. ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen.

4.3.2 Statische versus pulsatile Kultivierung

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss der Scherstresskonditionierung auf den Differenzierungsstatus der isolierten ECFCs bestimmt. Dafür wurden ECFCs, HAECs und HUVECs sowohl unter quasi-statischen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$) als auch dynamischen, pulsatilen Bedingungen (20 dyn/cm^2 ; 1 Hz) in mit Fibrinogen (10 mg/mL) beschichteten

Durchflusskammern über einen Zeitraum von 24 h kultiviert. Nach einer initialen Adhäsionsphase von 4 h, wurde der Scherstress stufenweise erhöht und an das entsprechende Scherstressniveau angepasst. Nach Ende der Konditionierung wurden die Zellen mikroskopisch und auf mRNA-Ebene näher untersucht. Zur inflammatorischen Aktivierung wurde ein Teil der Zellen 6 h vor Versuchsende mit 10 ng/mL TNF- α behandelt.

Zur mikroskopischen Beurteilung wurden die Zellen in den Durchflusskammern fixiert und die Morphologie mithilfe von Phasenkontrastaufnahmen sowie die Anordnung der VE-Cadherine und Aktin-Filamente mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Dabei wurden der Einfluss eines definierten Scherstress auf die Zellmorphologie, Zellausrichtung und die Zell-Zell-Kontakte in den drei Zelltypen miteinander verglichen.

4.3.2.1 Analyse der Zellmorphologie

Die morphologischen Untersuchungen nach quasi-statischer Kultivierung ergaben für ECFCs eine unregelmäßig angeordnete kopfsteinpflasterförmige Zellstruktur (Abbildung 26). Die unter quasi-statischen Bedingungen mit TNF- α behandelten ECFCs zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu verursachte eine Kultivierung unter hohem pulsatilem Scherstress eine in Flussrichtung ausgerichtete Zellorientierung. Die ECFCs waren verlängert und parallel zum Fluss angeordnet. Die TNF- α -Stimulierung unter hohem Scherstress wies keine morphologischen Unterschiede verglichen mit unbehandelten ECFCs auf.

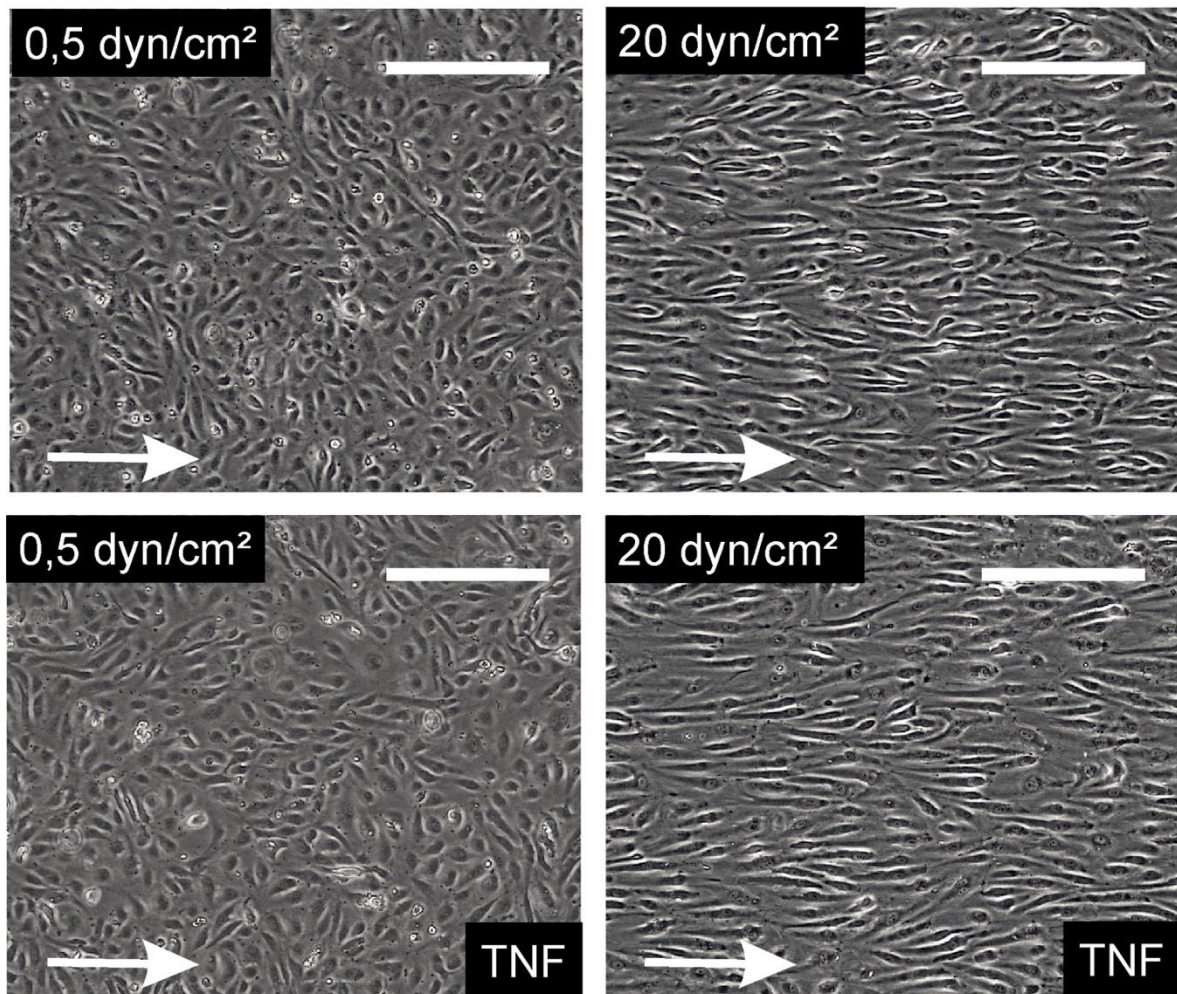


Abbildung 26: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten ECFCs. Links oben: ECFCs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Links unten: ECFCs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Rechts oben: ECFCs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Rechts unten: ECFCs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil dargestellt. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 μm .

Verglichen mit ECFCs wiesen auch HAECs unter einem Scherstress von $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ die für Endothelzellen typische runde Kopfsteinpflaster-Morphologie auf (Abbildung 27). Nach Zugabe von TNF- α ist in HAECs allerdings eine veränderte Morphologie zu beobachten. Die Zellen zeigten zwar weiterhin eine unregelmäßige Anordnung, die Zellform veränderte sich allerdings von rundoval zu spindelförmig. Mit zunehmendem Scherstress zeigten auch HAECs teilweise in Flussrichtung angeordnete Zellstrukturen. Dabei ließ sich beobachten, dass eine Inkubation mit TNF- α nach einem hohen Scherstress zu mehr ausgerichteten Zellen führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Im Gegensatz zu ECFCs konnte bei HAECs allerdings keine parallel zur Flussrichtung angeordnete Zellstrukturierung festgestellt werden.

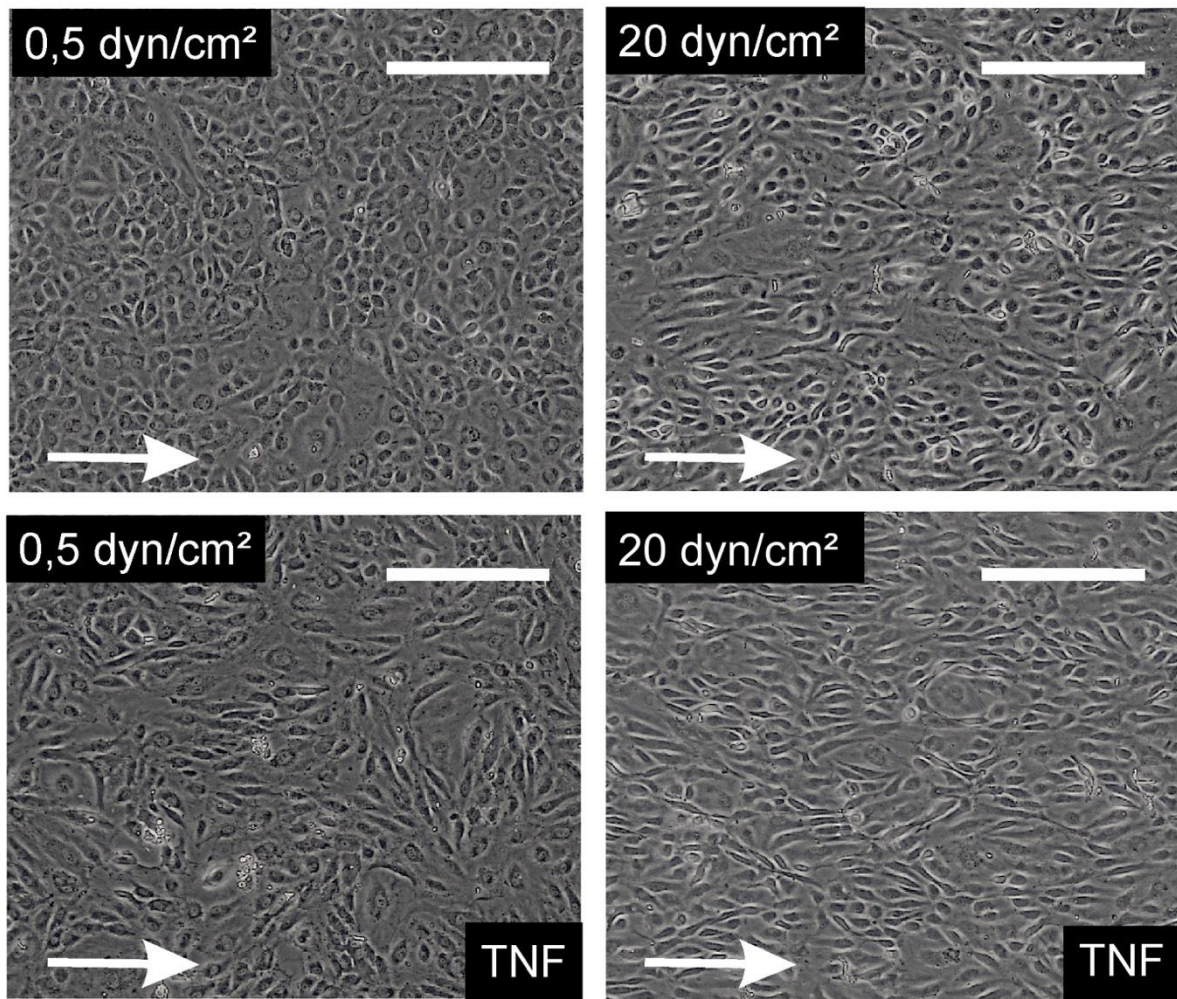


Abbildung 27: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten HAECs. Links oben: HAECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Links unten: HAECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Rechts oben: HAECs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Rechts unten: HAECs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil dargestellt. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

HUVECs wiesen unter quasi-statischen Scherstressbedingungen ebenfalls eine ungeordnete polygonale Morphologie auf (Abbildung 28). Durch die Zugabe von TNF- α konnte jedoch bei ihnen keine veränderte Zellstrukturierung beobachtet werden. Auch nach dynamischer Scherstresskultivierung wiesen die Zellen sowohl unter Einfluss von TNF- α als auch ohne Zugabe des Zytokins weiterhin eine größtenteils unregelmäßig angeordnete Morphologie auf.

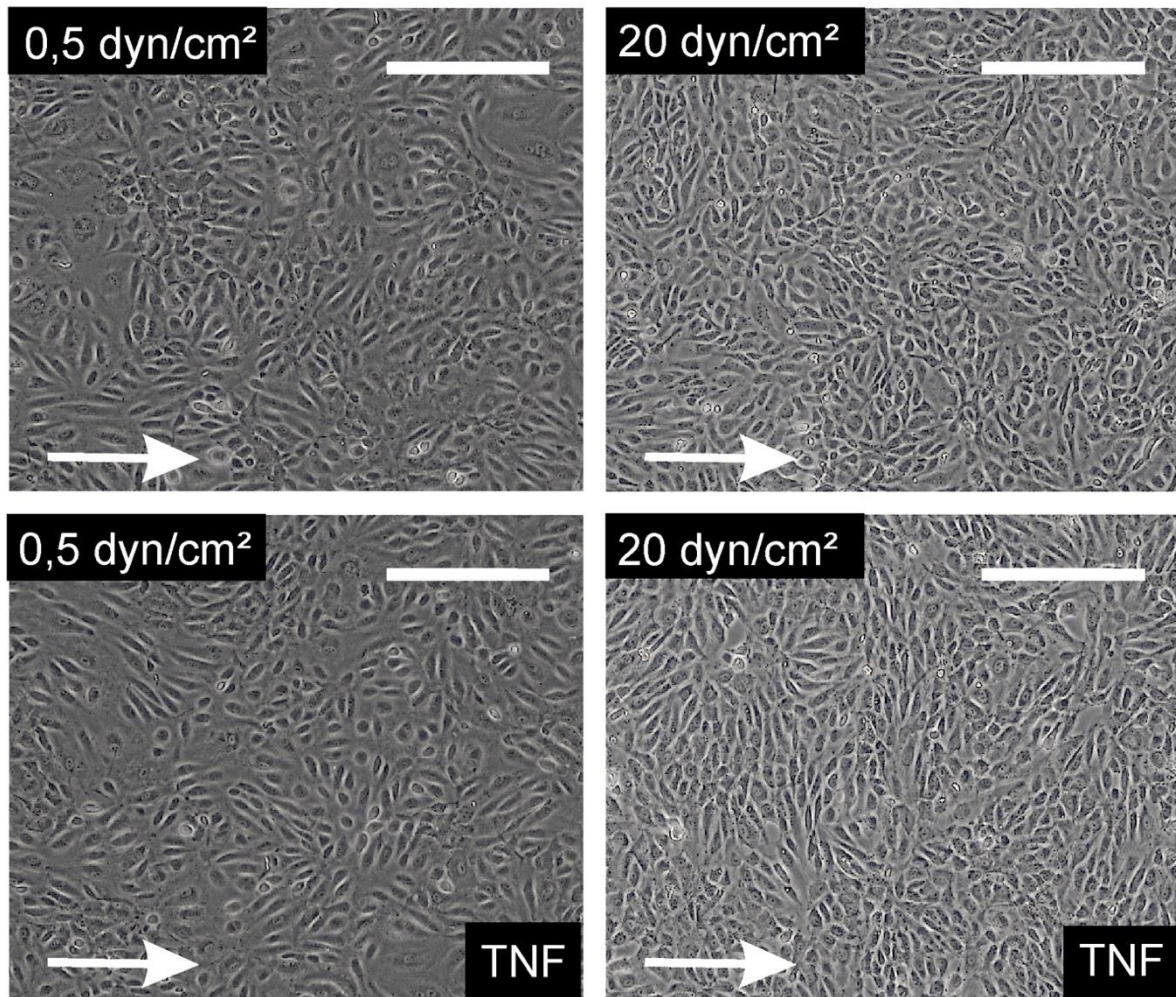


Abbildung 28: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten HUVECs. Links oben: HUVECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Links unten: HUVECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Rechts oben: HUVECs nach hohem pulsatilem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Rechts unten: HUVECs nach hohem pulsatilem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil dargestellt. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 μm .

4.3.2.2 Untersuchung der Zell-Zell-Verbindungen

Weiterhin sollten Unterschiede zwischen ECFCs, HAECs und HUVECs in Bezug auf die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts sowie die Monolayerintegrität nach dynamischer Kultivierung untersucht werden. Dafür wurden die F-Aktinfilamente sowie die VE-Cadherine der einzelnen Zelltypen nach Fixierung der Zellen angefärbt und anschließend mikroskopisch visualisiert (Abbildung 29). Mithilfe der grün dargestellten VE-Cadherin-Färbung konnten die Zell-Zell-Kontakte und die Zellformen graphisch ermittelt werden. Dabei konnte in allen drei Zelltypen eine gleichmäßige Monolayerintegrität und eine zusammenhängende Endothelschicht mit stabilen Zell-Zell-Kontakten festgestellt werden. Weiterhin wurden die

Aktinfilamente der jeweiligen Zelltypen durch die Phalloidin-färbung rot hervorgehoben. ECFCs zeigten an den Zellmembranen dicht organisierte Aktinbündel. Die Aktinfilamente der ECFCs richteten sich durch den hohen pulsatischen Scherstress parallel in Flussrichtung aus. Im Vergleich dazu zeigten auch HAECs und HUVECs an den Zellrändern verdichtete Aktinfilamentstrukturen auf. Es wurde jedoch nur in HAECs eine Ausrichtung der Filamente in Flussrichtung festgestellt. HUVECs hingegen wiesen teilweise in Flussrichtung ausgerichtete jedoch nicht vollständig parallelisierte Aktinfilamente auf.

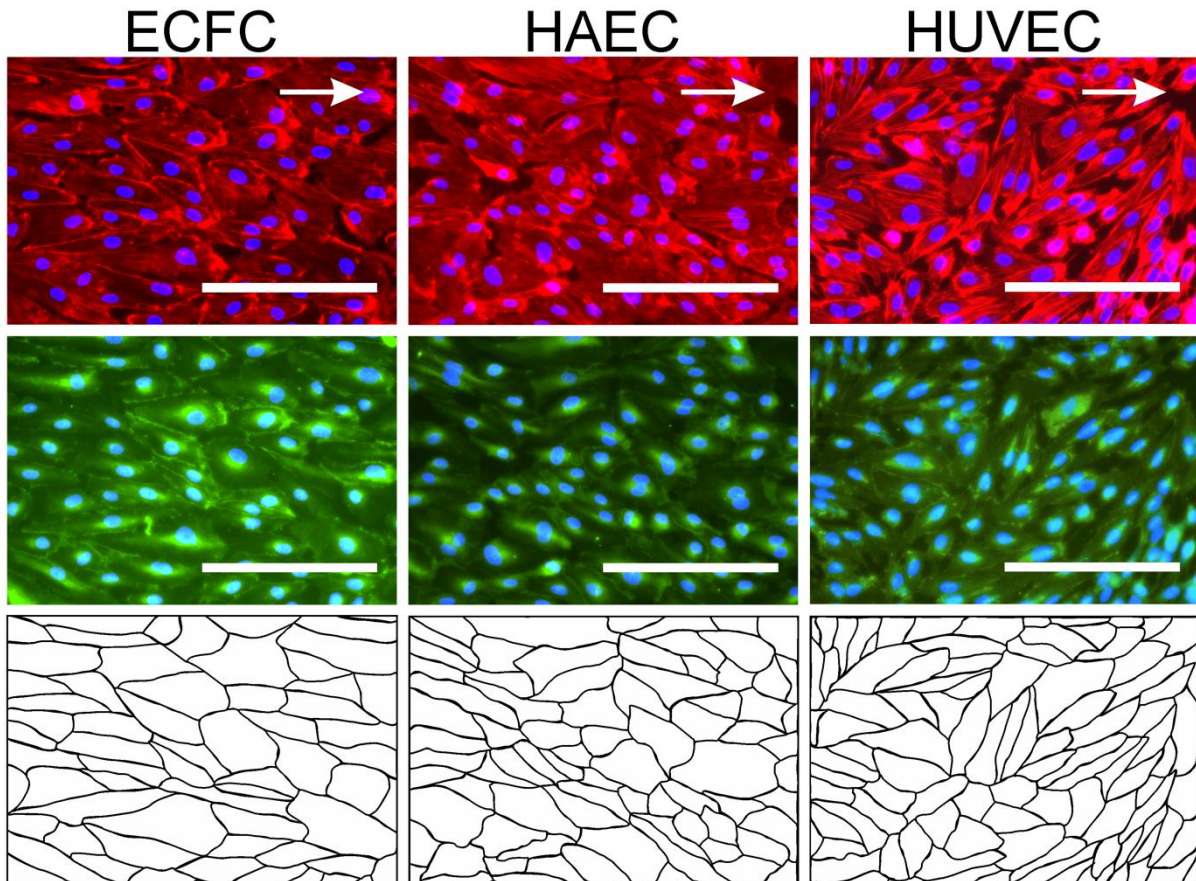


Abbildung 29: Immunfluoreszenzaufnahmen der unter pulsatischen Flussbedingungen kultivierten ECFCs, HAECs und HUVECs. Oben: Immunfluoreszenzfärbungen der F-Aktinfilamente (FAM) nach hohem pulsatischen Scherstress ($\approx 20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Mitte: Immunfluoreszenzfärbungen der VE-Cadherine zur Visualisierung der Monolayerintegrität nach hohem pulsatischen Scherstress ($\approx 20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Unten: Die Bildverarbeitung der VE-Cadherin-angefärbten Zellen wurde mithilfe der ImageJ- und CorelDraw-Software durchgeführt. Zellränder sind schwarz hervorgehoben, um Zellformen sowie maximale sowie minimale Zellachsen zu analysieren. Die FAM wurden mit Phalloidin rot angefärbt. Die VE-Cadherine sind in grün und die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil symbolisiert. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$.

4.3.2.3 Rundheit und Ausrichtung der Zellen

Im vorherigen Kapitel hat sich ein hoher pulsatiler Scherstress von 20 dyn/cm^2 als optimal für die Zelldehnung und -ausrichtung der ECFCs herausgestellt. In diesem Versuch wurde die Zelldehnung, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, mithilfe der Rundheit der Zellen ermittelt. Alle Zelltypen präsentierten elongierte Zellformen mit signifikant geringerer Rundheit unter Strömungsbedingungen verglichen zu statisch kultivierten Zellen (Abbildung 30). Die Rundheitswerte der dynamisch kultivierten ECFCs ($0,4 \pm 0,0$) und HAECs ($0,4 \pm 0,0$) waren signifikant höher verglichen zu dynamisch kultivierten HUVECs ($0,3 \pm 0,0$). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen ECFCs und HAECs, weder nach statischen noch dynamischen Kultivierungsbedingungen. Bereits Kapitel 4.2 wurden signifikante Unterschiede zwischen HUVECs und ECFCs anhand ihrer Rundheitswerte festgestellt. Während in dem hier beschriebenen Versuch die Rundheit der ECFCs nach 24 h dynamischer Kultivierung signifikant größer ausfiel als bei HUVECs, zeigte sich im vorherigen Versuch nach 72 h ein umgekehrtes Verhältnis (Abbildung 22).

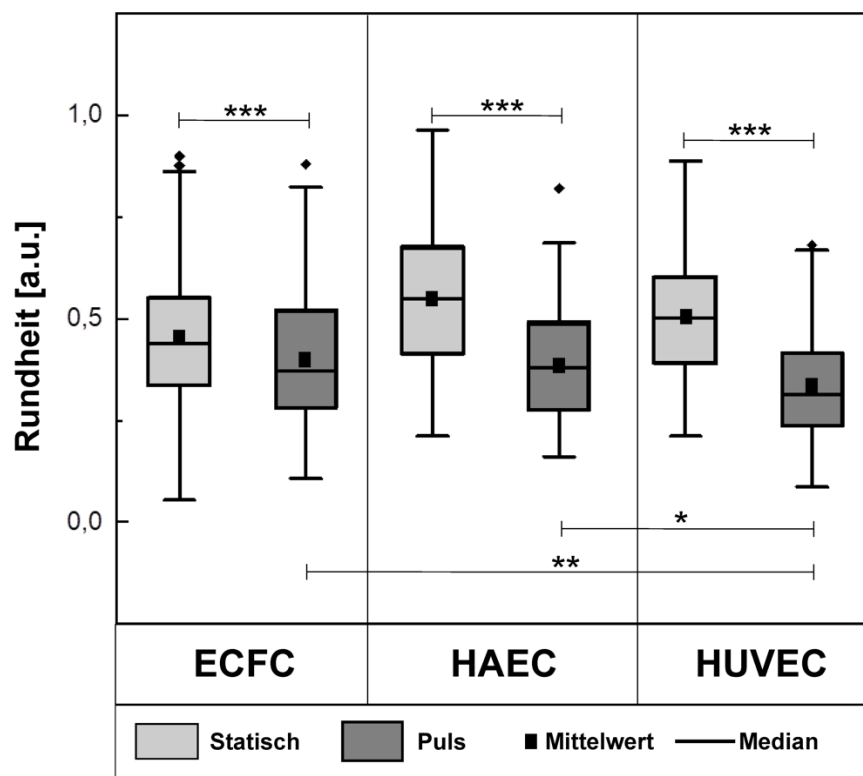


Abbildung 30: Analyse der Rundheit der flusskultivierten ECFCs, HAECs und HUVECs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N = 10$ verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen.

Weiterhin sollte die Auswertung der Zellausrichtung nach Flussexposition einen Rückschluss über die Strömungsempfindlichkeit der jeweiligen Zelltypen geben. Die Ausrichtung der Zellen wurde anhand der Messung des Winkels der Längsachse relativ zur Flussrichtung ermittelt. Dabei konnte beobachtet werden, dass ECFCs nach dynamischer Kultivierung eine signifikant stärkere Ausrichtung in Flussrichtung ($20,2^\circ \pm 1,1^\circ$) aufzeigten als statisch kultivierte ECFCs ($50,4^\circ \pm 1,4^\circ$). Auch HAECs änderten ihre Zellausrichtung signifikant stärker unter pulsatilem Fluss ($25,6^\circ \pm 2,0^\circ$) im Vergleich zu statischen Kultivierungsbedingungen ($48,0^\circ \pm 2,8^\circ$). Im Vergleich dazu zeigten HUVECs keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kultivierungsformen (statisch: $41,5^\circ \pm 2,7^\circ$; dynamisch: $41,1^\circ \pm 3,1^\circ$). Ferner ließen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den jeweiligen Zelltypen nach Flusskultivierung detektieren. Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen ECFCs, HAECs und HUVECs deutlich. Demnach wiesen besonders scherstresskultivierte ECFCs eine signifikant stärkere Ausrichtung in Flussrichtung im Vergleich zu HAECs (p-Wert kleiner 0,05) und HUVECs (p-Wert kleiner 0,001) auf. Zusätzlich wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen HAECs und HUVECs festgestellt (p-Wert kleiner 0,05).

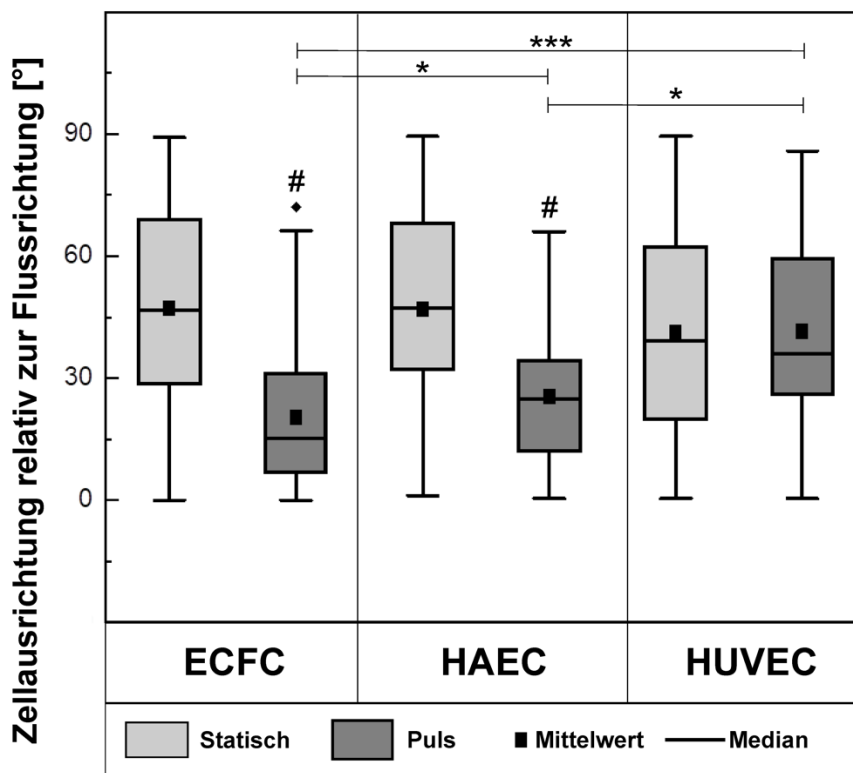


Abbildung 31: Analyse der Zellausrichtung in Relation zur Flussrichtung. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 10 verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. # = p<0.05 definiert eine signifikante Änderung verglichen mit der quasi-statischen Kontrolle. * = p<0,05, ** = p<0,01 und *** = p<0,001 definieren signifikante Änderungen wie angegeben.

4.3.3 TNF- α Stimulierung und Einfluss von Puls

Um den Einfluss der dynamischen Kultivierung auf die Transkriptionslevel der arteriovenösen Differenzierungs- und inflammatorischen Thrombogenitätsmarker zu untersuchen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Dafür wurde die zelluläre RNA der statisch und dynamisch konditionierten Zellen isoliert und in cDNA transkribiert. Daraufhin erfolgte anhand einer Gradienten-PCR die Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur der designten Primerpaare. In Tabelle 11 sind die jeweiligen Primerpaare aufgelistet. Als Referenzgene wurden β -Actin und GAPDH ausgewählt. Die Transkriptionsniveaus der untersuchten Gene wurden mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet und werden im Folgenden diskutiert.

4.3.3.1 Arteriovenöse Differenzierungsanalyse

Da für die Endothelialisierung von arteriellen Bypasskonstrukten ein arterieller Phänotyp der verwendeten Endothelzellen favorisiert wird, wurde in dem folgenden Abschnitt untersucht, inwieweit eine dynamische Kultivierung die arteriovenöse Differenzierung der isolierten ECFCs hervorruft. Dafür wurden die Genexpressionslevel der endothelzellcharakteristischen Marker CD31 und KDR sowie des stammzellspezifischen Markers CD34 und des arteriellen Markers NOTCH4 für alle drei Zelltypen nach statischer und dynamischer Kultivierung untersucht. Dabei wurde festgestellt, inwiefern eine dynamische Kultivierung die Genexpression der oben genannten Endothelzellmarker in ECFCs beeinflusst. Zudem wurden Unterschiede zwischen ECFCs, venösen HUVECs und arteriellen HAECs analysiert. Gleichzeitig sollte durch die Zugabe des Zytokins TNF- α eine Entzündungsreaktion *in vitro* induziert werden. In Abbildung 32 sind die Transkriptionslevel der charakteristischen endothelialen Marker CD31, KDR, des stammzellspezifischen Markers CD34 sowie des arteriellen Markers NOTCH4 für alle drei Zelltypen dargestellt. Die Untersuchung der relativen Expression des an der Oberfläche von Endothelzellen exprimierten Adhäsionsmarkers CD31 nach dynamischer und statischer Kultivierung zeigte für ECFCs und HAECs signifikant erhöhte Expressionslevel im Vergleich zu HUVECs. Gleichzeitig präsentierten HAECs und ECFCs verglichen miteinander keine signifikant unterschiedlichen Transkriptionsniveaus (p-Wert größer 0,05). Durch die Zugabe von TNF- α konnte eine Abnahme der CD31-Expressionslevel in allen Zelltypen beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass für ECFCs und HAECs ein pulsatile Scherstress in Höhe von 20 dyn/cm² eine signifikant stärkere CD31-Expression unter TNF- α hervorrief, während HUVECs keine signifikanten Unterschiede nach TNF- α -Zugabe und Scherstress aufwiesen.

Auch die Analyse des am mechanosensorischen Komplex beteiligten Markers KDR offenbarte signifikante Unterschiede zwischen HUVECs und HAECs unter allen Kultivierungsbedingungen. Während die Transkriptionslevel zwischen ECFCs und HUVECs nicht signifikant unterschiedlich vorlagen, zeigten HAECs unter allen Bedingungen höhere Expressionslevel als ECFCs. Unter Einfluss von TNF- α wurde für alle Zelltypen ein verringertes KDR-Transkriptionslevel festgestellt. Dabei konnte insbesondere unter statischen Kultivierungsbedingungen beobachtet werden, dass TNF- α einen signifikanten Einfluss auf die KDR-Expression ausübte. Gleichzeitig ließ sich erkennen, dass die Kultivierung unter einem hohen pulsatilen Scherstress für alle Zelltypen zu einer signifikanten Hochregulierung von KDR führte.

Neben CD31 und KDR wurde die Genexpression des stammzellspezifischen Markers CD34 untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen HAECs und ECFCs detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten ECFCs höhere CD34-Expressionslevel im Vergleich zu HUVECs nach statischer (p-Wert kleiner 0,05) und dynamischer (p-Wert größer 0,05) Kultivierung sowohl unter dem Einfluss von TNF- α als auch ohne. Auch HAECs wiesen unter allen Bedingungen eine signifikant höhere CD34-Genexpression auf als HUVECs. Die Analyse des arteriellen Markers NOTCH4 ergab für ECFCs unter allen Kultivierungsbedingungen signifikant höhere Transkriptionslevel im Vergleich zu HUVECs. Die NOTCH4-Genexpression in ECFCs war nach statischer Kultivierung signifikant höher ausgeprägt als bei HAECs. Nach dynamischer Scherstresskultivierung konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen HAECs und ECFCs mehr beobachtet werden. Es ließ sich ebenfalls beobachten, dass nur in ECFCs und HAECs der Einfluss von TNF- α zu einer signifikant niedrigeren NOTCH4-Expression nach statischer Kultivierung führte. HUVECs hingegen wiesen keine signifikanten Unterschiede je nach Kultivierungsform und TNF- α Stimulierung auf.

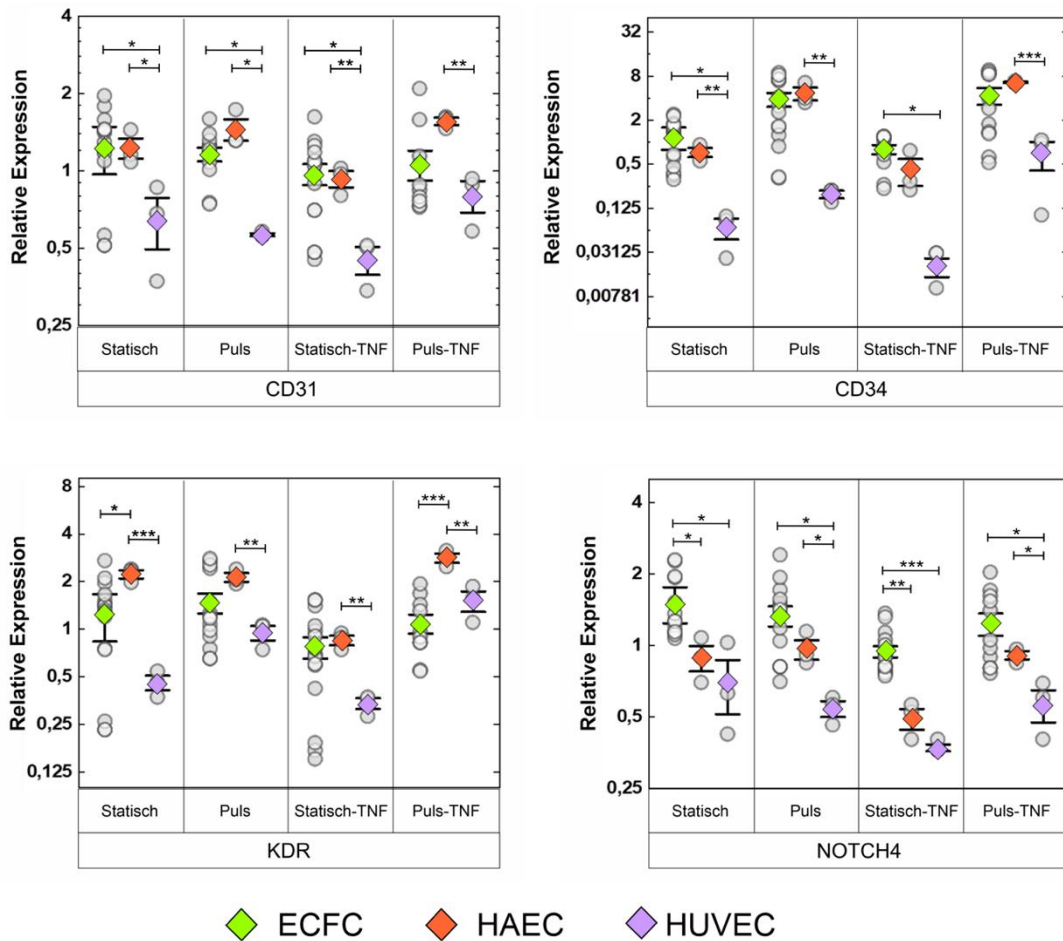


Abbildung 32: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse endothelzellspezifischer Marker für scherstresskultivierte ECFCs (grün), HAECs (rot) und HUVECs (lila). Die Expression der Marker CD31, CD34, KDR und NOTCH4 wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die jeweiligen zellspezifischen Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen.

4.3.3.2 Thrombogenitätsanalyse

Zudem wurde im folgenden Abschnitt der Einfluss eines hohen pulsatilen Scherstresses sowie die Wirkung des inflammatorischen Zytokins TNF- α auf die Expression atheroprotektiver Gene untersucht. Dazu wurden die Transkriptionslevel der anti-inflammatorischen Gene KLF2, eNOS, Thrombomodulin und Tie2 sowie der atherogenen Marker *Tissue Factor* (TF) und VCAM1 relativ zur statischen nicht aktivierten Kontrolle für alle drei Zelltypen ermittelt. In Abbildung 33 sind die Genexpressionsdaten der einzelnen Marker im normierten Zustand dargestellt.

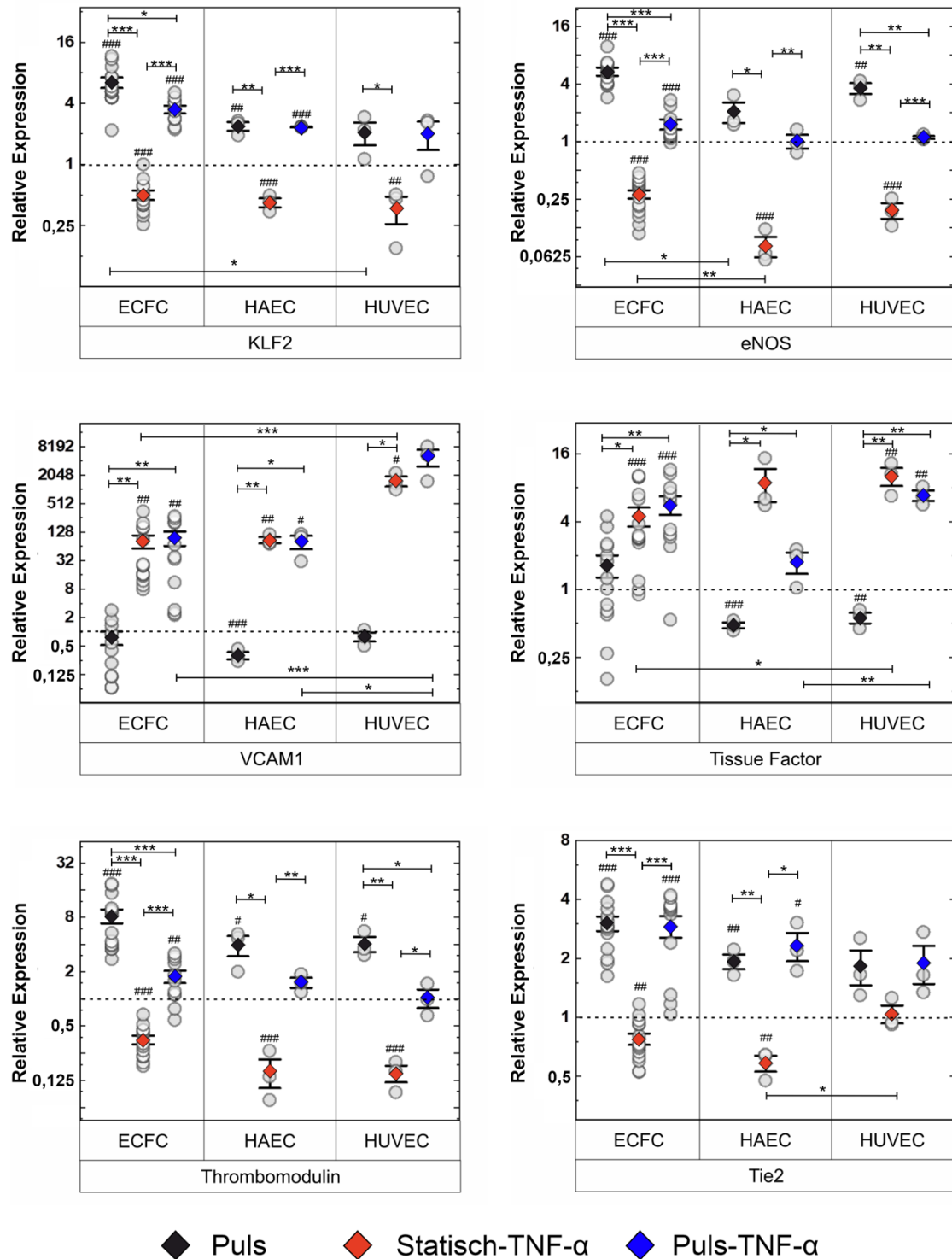


Abbildung 33: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse der thrombogenen und antithrombogenen Marker für scherstresskultivierte ECFCs, HAECs und HUVECs. Die Expression der Marker KLF2, eNOS, VCAM1, Tissue Factor, Thrombomodulin und Tie2 wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet und auf die statische Kontrolle normiert. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die jeweiligen zellspezifischen Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. #, * = $p < 0,05$, ##, ** = $p < 0,01$ und ###, *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung bezogen auf die statische Kontrolle.

Die Untersuchung des antithrombogenen Markers KLF2 ergab für ECFCs und HAECs signifikant erhöhte Transkriptionslevel nach dynamischer Kultivierung im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen. In ECFCs zeigte sich unter dynamischen Bedingungen eine um den Faktor $6,4 \pm 0,8$ erhöhte KLF2-Expression relativ zur statischen Kontrolle. Diese lag um den Faktor 2,7 höher verglichen zur KLF2-Expression von HAECs und um das 3,1fache signifikant höher als in dynamisch kultivierten HUVECs (p-Wert kleiner 0,05). Gleichzeitig konnte auch beobachtet werden, dass in TNF- α -aktivierten ECFCs und HAECs der Einfluss eines hohen pulsatilen Scherstress signifikant höhere KLF2-Expressionswerte bewirkte (p-Wert kleiner 0,001). Außerdem wurde deutlich, dass in allen drei Zelltypen die Stimulierung von TNF- α unter statischen Bedingungen die KLF2-Transkriptionswerte signifikant herunterregulierte.

Die Genexpressionsanalyse des atheroprotektiven Markers eNOS zeigte, dass ein hoher pulsatiler Scherstress signifikant erhöhte Transkriptionslevel nur in ECFCs und HUVECs verursachte. HAECs dagegen präsentierten eine signifikant niedrigere Genexpression im Vergleich zu ECFCs (p-Wert kleiner 0,05). Unter dem Einfluss von TNF- α wurde in allen drei Zelltypen eine signifikante Herunterregulierung von eNOS relativ zur statischen Kontrolle deutlich. Außerdem konnte festgestellt werden, dass alle Zelltypen nach inflammatorischer Stimulierung eine signifikant höhere eNOS-Expression aufwiesen verglichen zur statischen Kontrolle.

Die Zugabe des inflammatorischen Zytokins TNF- α bewirkte für ECFCs, HAECs und HUVECs eine signifikant erhöhte Genexpression des proinflammatorischen Markers VCAM1 unter dynamischen und statischen Bedingungen. Demnach konnte ein hoher pulsatiler Scherstress keinen signifikanten Einfluss auf die Herunterregulierung von VCAM1 ausüben. Zusätzlich war zu beobachten, dass die VCAM1-Transkriptionswerte in HUVECs nach dynamischer Kultivierung signifikant höher ausgeprägt vorlagen als in ECFCs (Faktor 51,3) und HAECs (Faktor 62,0). Auch unter statischen Bedingungen wiesen HUVECs deutlich höhere VCAM1-Level auf. In einem nicht-aktivierten Zustand zeigten dagegen nur flusskultivierte HAECs eine signifikant niedrigere VCAM1-Expression im Vergleich zu statischen Bedingungen. In ECFCs und HUVECs konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen statischen und dynamischen Bedingungen detektiert werden.

Ein ähnliches Expressionsmuster konnte auch bei Betrachtung des prothrombogenen Markers TF beobachtet werden. Auch hier zeigte sich, dass eine statische und dynamische Kultivierung unter TNF- α eine signifikant höhere Genexpression in ECFCs (p-Werte kleiner 0,001) und HUVECs (p-Werte kleiner 0,01) relativ zum statischen nicht-aktivierten Zustand hervorrief.

Auch in HAECs konnte eine erhöhte TF-Expression nach TNF- α -Stimulierung gemessen werden. Diese wurde allerdings nach dynamischer Kultivierung herunterreguliert und erreichte ein signifikant niedrigeres Transkriptionsniveau verglichen zu HUVECs. In ECFCs dagegen konnte kein signifikanter Einfluss der dynamischen Scherstresskultivierung auf die TF-Expression festgestellt werden. Die gemessenen Transkriptionslevel zeigten unter Fluss eine breite Streuung an Datenpunkten und ließen keine eindeutige Analyse der Genexpression zu.

Weiterhin wurden die Transkriptionslevel des antithrombogenen Markers Thrombomodulin untersucht. Während eine statische Kultivierung unter TNF- α -Stimulation in allen drei Zelltypen eine signifikante Abnahme verursachte (p-Werte kleiner 0,001), wirkte sich der Einfluss der dynamischen Flussbedingungen mit und ohne TNF- α signifikant auf die Thrombomodulin-Expression aus. Dabei konnte in ECFCs die höchste Thrombomodulin-Expression festgestellt werden.

Die Analyse des anti-inflammatorischen Markers Tie2 zeigte, dass ein hoher pulsatiler Scherstress in ECFCs und HAECs zu signifikant höheren Transkriptionsleveln führte. Während die Tie2-Genexpression durch den Einfluss von TNF- α signifikant herunterreguliert wurde, zeigte sich in flusskultivierten ECFCs und HAECs auch nach TNF- α -Zugabe eine signifikant höhere Tie2-Expression. HUVECs dagegen wiesen keine signifikanten Änderungen je nach Kultivierungsbedingung auf.

4.3.4 Schlussfolgerung

In diesem Kapitel wurde untersucht, inwieweit eine Vorkonditionierung unter einem hohen pulsatilen Scherstress (20 dyn/cm²; 1 Hz) zur arteriellen Differenzierung der unreifen endothelialen koloniebildenden Zellen (ECFCs) führt. Dafür wurden die isolierten ECFCs im Vergleich zu reifen arteriellen Zellen, den humanen Aortenendothelzellen (HAECs) und reifen venösen Zellen, den humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs) unter statischen und dynamischen Bedingungen kultiviert. Um eine Entzündungsreaktion nach Implantierung der endothelialisierten Gefäßprothese zu simulieren, wurden die Zellen zusätzlich mit dem inflammatorischen Zytokin TNF- α inkubiert. Dabei wurden morphologische Ähnlichkeiten zwischen ECFCs und HAECs nach der Flusskultivierung detektiert. Gleichzeitig konnten signifikante Unterschiede zwischen dynamisch kultivierten ECFCs und HUVECs in Bezug auf die Orientierung und Ausrichtung der Zellen festgestellt werden. Die oben diskutierten Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass die Vorkonditionierung von ECFCs unter Fluss eine Unterdrückung der atherogenen Marker *Tissue Factor* und VCAM1 induziert sowie eine

Hochregulierung der antithrombotischen Gene wie KLF2, eNOS, Tie2 und Thrombomodulin selbst unter dem Einfluss eines inflammatorischen Stimulus wie TNF- α auslöst und gleichzeitig ein Genprofil induziert, das mehr Ähnlichkeiten zu einem arteriellen als einem venösen Phänotyp aufweist.

4.4 Kultivierung unter verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen zur Gefäßmuskelzellähnlichen Differenzierung

Für die Generierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese werden neben Endothelzellen im Gefäßinneren auch glatte Gefäßmuskelzellen in der Media benötigt. Da reife Gefäßmuskelzellen gegenüber Vorläuferzellen ein vermindertes Proliferationspotential aufweisen, werden Alternativen zur Gewinnung autologer glatter Gefäßmuskelzellen gesucht. In diesem Zusammenhang konnten Simper et al. zeigen, dass endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) durch den Einfluss des Wachstumsfaktors *platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) über ihre Differenzierungslinien hinaus in Gefäßmuskelzellen transdifferenziert werden können (Simper et al., 2002). Daneben zeigte eine Arbeit von Moonen et al., dass auch ECFCs aus dem peripheren Blut mithilfe der Wachstumsfaktoren Transformierender Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1) und PDGF-BB in glatte Gefäßmuskelzellen transdifferenziert werden konnten (Moonen et al., 2010).

Daher wurde in einem weiteren Versuch untersucht, inwieweit die isolierten ECFCs die Fähigkeit besitzen durch die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB in Gefäßmuskelzellähnliche Zellen zu differenzieren. Dafür wurde der Einfluss verschiedener PDGF-BB-Konzentrationen auf die Wachstumsfähigkeit und das Ausbilden Gefäßmuskelzellspezifischer Marker untersucht. Außerdem sollte eine Funktionsanalyse das Kontraktionspotenzial der konditionierten ECFCs ermitteln. Für die vorliegenden Versuche wurden die ECFCs der Einzelspender EC08 und EC09 ab Passage 4 (P4) (siehe Tabelle 7) verwendet. Die statistischen Auswertungen erfolgten mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Lea Finkbeiner gewonnen (Finkbeiner, 2021).

4.4.1 Analyse der Verdopplungszeit

Zunächst wurde der Effekt von mit PDGF-BB angereichertem Medium auf das Wachstumsverhalten der ECFCs untersucht. Dabei wurden die Zellen über vier Passagen (P4, P5, P6, P7) in verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen kultiviert. Dem ECFC-Überstand wurde 50 ng/mL, 100 ng/mL bzw. 200 ng/mL PDGF-BB hinzugefügt. Nach Erreichen einer 90 %igen Konfluenz wurden die ECFCs abgelöst und ihre Verdopplungszeit ermittelt. Dadurch sollte untersucht werden, inwieweit eine Kultivierung unter verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen die Proliferationskapazität der Zellen beeinflusste. Die Ergebnisse

der Analyse sind in Abbildung 34 dargestellt. In P5 zeigten die ECFCs unter allen PDGF-BB-Bedingungen signifikant höhere Verdopplungszeiten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (1,3 Tage). Eine Kultivierung unter 50 ng/mL PDGF-BB zeigte nur in P5 eine signifikant höhere Verdopplungszeit ($2,3 \pm 0,1$ Tage), während in P7 eine Verdopplungszeit von $2,0 \pm 0,2$ Tagen nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ($1,8 \pm 0,3$ Tage) war. Die Zugabe von 100 ng/mL PDGF-BB verursachte in ECFCs eine Verdopplungszeit von $2,8 \pm 0,5$ Tagen in P5 sowie $3,6 \pm 0,5$ Tage in P7. Nach einer Kultivierung unter 200 ng/mL PDGF-BB erreichten die ECFCs Verdopplungszeiten von $2,8 \pm 0,3$ Tagen in P5 und $3,8 \pm 0,4$ Tagen in P7. Diese lagen signifikant höher verglichen zur Konditionierung unter 50 ng/mL. Damit zeigte sich mit zunehmender PDGF-BB-Konzentration ein signifikant langsames Wachstumsverhalten.

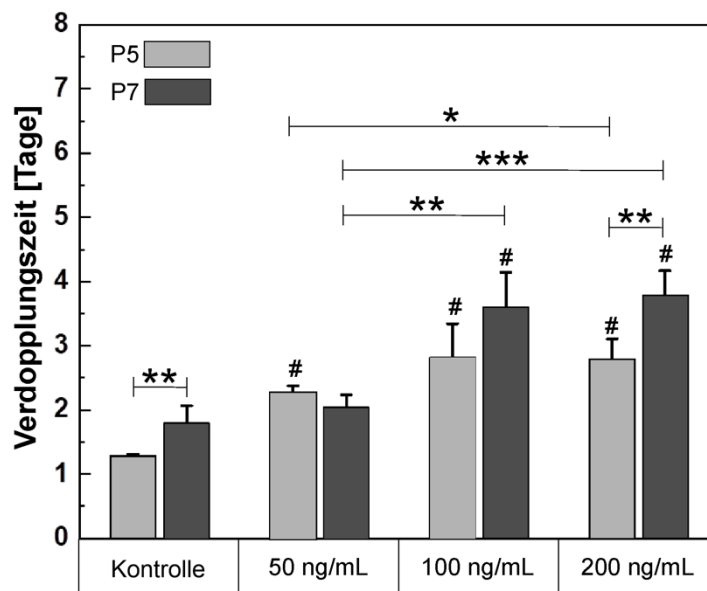


Abbildung 34: Analyse der Verdopplungszeiten der in vitro kultivierten ECFCs unter verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 verschiedenen Kultivierungen. #, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung signifikant bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

4.4.2 Nachweis Gefäßmuskelzellspezifischer Marker

Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener PDGF-BB-Konzentrationen auf die Ausbildung Gefäßmuskelzellspezifischer Marker analysiert. Dafür wurde durch die Immunfluoreszenzfärbung das Vorhandensein des Markers α -SMA sowie mithilfe der qRT-PCR die Regulierung der Gene α -SMA und Calponin ermittelt.

4.4.2.1 Immunfluoreszenzanalyse

Nach Kultivierung mit 50 ng/mL PDGF-BB über zwei Passagen (P4, P5) konnte in den ECFCs eine hohe Expression des Markers α -SMA vermehrt in der Zellperipherie nachgewiesen werden, hier zeigte sich eine deutliche Färbung (Abbildung 35-B). Verglichen dazu konnte kein α -SMA-Signal in der unbehandelten Kontrolle detektiert werden (Abbildung 35-A). Es zeigten sich lediglich vereinzelt rötliche Strukturen, welche jedoch signifikant schwächer waren.

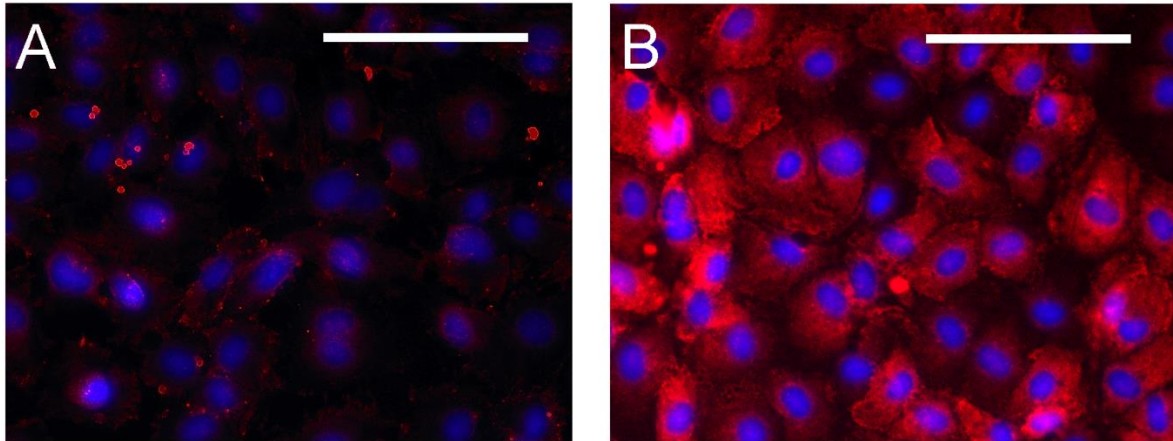


Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α -SMA. A: Unbehandelte ECFCs in Passage 5 (P5). B: Mit PDGF-BB kultivierte (50 ng/mL) ECFCs in P5. Maßstab repräsentiert 100 μ m.

Außerdem wurde analysiert, inwieweit eine längere Dauer der PDGF-BB-Inkubation eine stärkere α -SMA-Expression hervorruft. Dafür wurden die ECFCs über vier Passagen (P4, P5, P6, P7) mit jeweils 50 ng/mL, 100 ng/mL bzw. 200 ng/mL PDGF-BB inkubiert und die Expression des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α -SMA nach jeder Passage mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Kultivierung über vier Passagen (P4, P5, P6, P7) unter einer Konzentration von 200 ng/mL PDGF-BB keine signifikant unterschiedliche α -SMA-Expression im Vergleich zur Kultivierung über zwei Passagen (P4, P5) hervorrief (Abbildung 36). Beide Abbildungen zeigen eine verstärkte α -SMA-Expression in den Zellrändern der ECFCs. Mit zunehmender Passage wiesen die Zellen jedoch eine veränderte Zellmorphologie auf. Während in P5 eine dicht zusammenhängende Zellstruktur mit kopfsteinpflasterartigen Zellmorphologie zu erkennen ist (Abbildung 36-A), zeigten die ECFCs in P7 eine unzusammenhängende und länglichere Zellmorphologie auf (Abbildung 36-B).

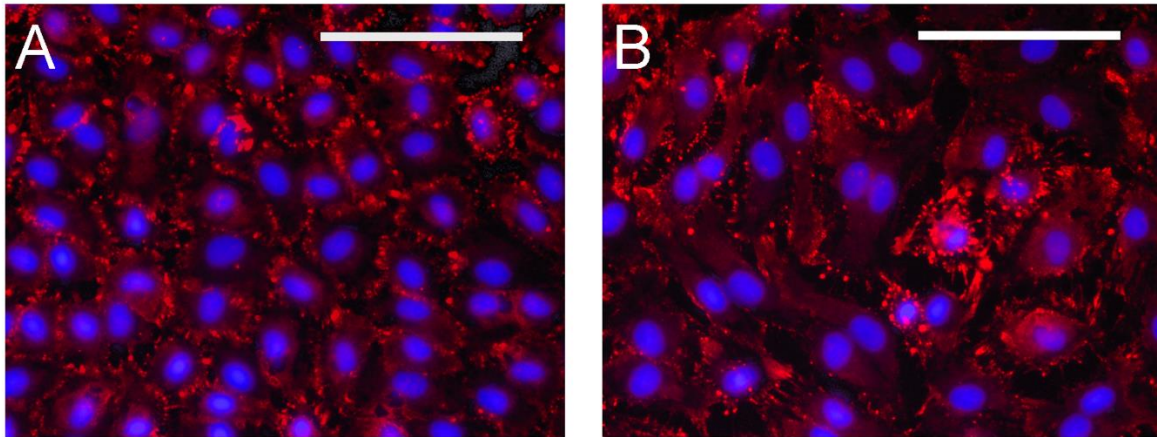


Abbildung 36: Immunfluoreszenzfärbung des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α -SMA. A: Mit PDGF-BB kultivierte (200 ng/mL) ECFCs in Passage 5. B: Mit PDGF-BB kultivierte (200 ng/mL) ECFCs in Passage 7. Maßstab repräsentiert 100 μ m.

4.4.2.2 Genexpressionsanalyse

Daneben sollte die Analyse der Transkriptionslevel der Gene α -SMA und Calponin Auskunft über den Differenzierungszustand der ECFCs durch die jeweilige PDGF-BB-Kultivierung (50 ng/mL, 100 ng/mL bzw. 200 ng/mL PDGF-BB) über insgesamt vier Passagen (P4, P5, P6, P7) geben. Dafür wurde die RNA der konditionierten Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur der designten Primerpaare für Calponin und α -SMA. Als Referenzgene wurden GAPDH und β -Actin verwendet. Die Transkriptionslevel der verwendeten Marker wurden mithilfe der $\Delta\Delta$ Ct-Methode berechnet und sind in Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt.

Die Genexpressionsanalyse des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α -SMA ergab für eine PDGF-BB-Konzentration in Höhe von 200 ng/mL signifikant höhere Transkriptionslevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p-Wert kleiner 0,01 in P5 und kleiner 0,001 in P7) (Abbildung 37). Außerdem konnten signifikante Unterschiede je nach Konzentration festgestellt werden. Demnach zeigte eine Behandlung der Zellen mit 200 ng/mL PDGF-BB signifikant höhere α -SMA-Level verglichen zur Konditionierung unter 50 ng/mL in P7. Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe der 200 ng/mL Konzentration festgestellt werden. Demzufolge führte eine längere Inkubation über mehrere Passagen zu einer signifikant stärkeren α -SMA-Expression. Dieses Erkenntnis konnte auch für ECFCs unter 100 ng/mL PDGF-BB-Bedingungen getroffen werden. Ferner ist hervorzuheben, dass kein signifikanter Unterschied zwischen 100 ng/mL und 200 ng/mL PDGF-BB in Bezug auf die α -SMA-Expression festzustellen war.

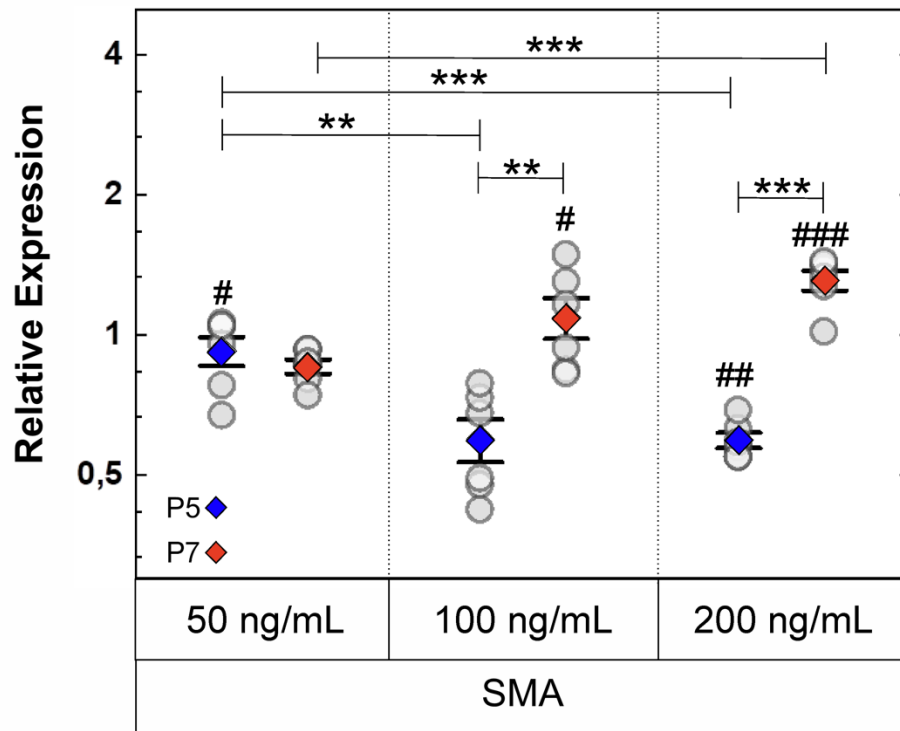


Abbildung 37: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α -SMA der PDGF-BB-behandelten ECFCs. Die Expression des Markers α -SMA wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. #,* = $p < 0,05$, ##,** = $p < 0,01$ und ###,*** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Die Genexpressionsanalyse des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers Calponin ergab eine ähnliche Tendenz (Abbildung 38). Demnach zeigten die ECFCs unter allen PDGF-BB-Bedingungen in P5 keine signifikant höheren Transkriptionslevel verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Erst mit zunehmender Passage und unter dem Einfluss von 100 ng/mL bzw. 200 ng/mL PDGF-BB konnten signifikant erhöhte Calponinlevel festgestellt werden. Eine Inkubation in P7 mit 200 ng/mL ergab außerdem signifikant höhere Calponinwerte verglichen zur Inkubation mit 50 ng/mL und 100 ng/mL PDGF-BB. Folglich führte auf DNA-Ebene eine Konditionierung mit 200 ng/mL zu am stärksten ausgeprägten Expressionen der Marker α -SMA und Calponin.

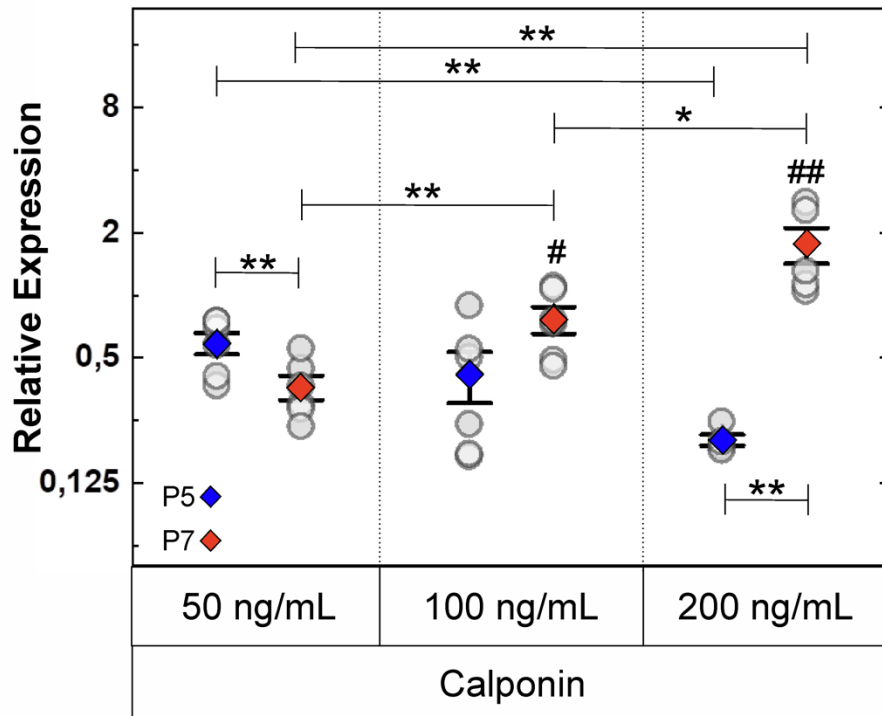


Abbildung 38: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers Calponin der PDGF-BB-behandelten ECFCs. Die Expression des Markers Calponins wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. #, * = $p < 0,05$, ##, ** = $p < 0,01$ und ###, *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

4.4.3 Analyse der Kontraktionsfähigkeit

Abschließend wurde in einem Funktionstest die Kontraktionsfähigkeit der konditionierten ECFCs untersucht. Auf Basis der erhöhten Genexpressionslevel der Marker α -SMA und Calponin unter 100 ng/mL und 200 ng/mL PDGF-BB in Passage 7, wurden die ECFCs unter diesen beiden Konzentrationsbedingungen für die Funktionsanalyse kultiviert und verwendet. Die Kontraktionsfähigkeit wurde durch Zugabe von 10^{-5} mol/L Carbachol nachgewiesen. Durch die Zugabe des Agonisten Carbachol sollte eine Kontraktion der Zellen induziert werden. Als Kontrollzellen wurden glatte Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells* = SMCs) verwendet. Dabei sollte das Verhältnis der Zellfläche vor und nach Zugabe des Carbachols eine Aussage über die Kontraktionsfähigkeit der konditionierten Zellen geben. Wie in Abbildung 39 dargestellt, wurde 30 min nach Zugabe des Carbachols kein signifikanter Unterschied zwischen SMCs und ECFCs unter 200 ng/mL PDGF-BB festgestellt. Im Gegensatz dazu, zeigte eine Inkubation mit 100 ng/mL PDGF-BB für ECFCs ein signifikant höheres Zellflächenverhältnis

im Vergleich zu SMCs. Demnach führte eine Kultivierung mit 200 ng/mL zu SMC-ähnlichen Eigenschaften der ECFCs.

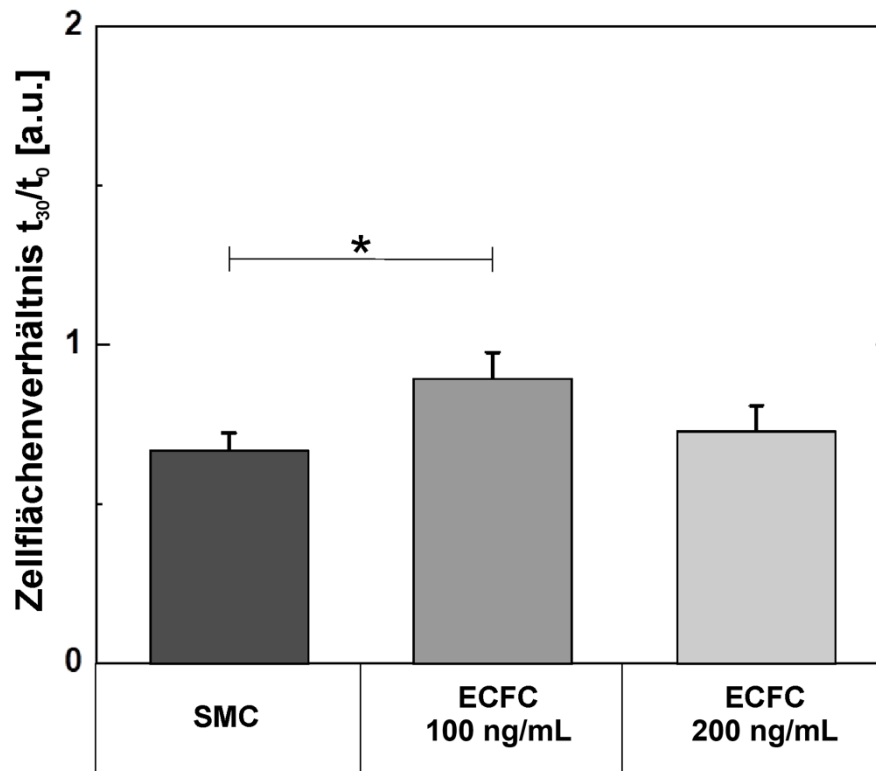


Abbildung 39: Ergebnisse des Contraction Assays für SMCs und PDGF-BB-behandelte ECFCs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 10 verschiedenen Zellen. * = $p < 0,05$ definiert signifikante Änderungen.

4.4.4 Schlussfolgerung

In diesem Kapitel wurde untersucht, inwieweit die isolierten ECFCs die Fähigkeit besitzen durch die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB in Gefäßmuskelzellähnliche Zellen zu differenzieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende PDGF-BB-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Verdopplungszeit der ECFCs ausübte. Weiterhin zeigte sich, dass eine Kultivierung über vier Passagen mit 200 ng/mL PDGF-BB eine signifikant höhere Genexpression der Gefäßmuskelzellähnlichen Marker α -SMA und Calponin hervorrief. Zudem zeigte die Analyse der Kontraktionsfähigkeit, dass ECFCs unter 200 ng/mL PDGF-BB sich nicht signifikant von glatten Gefäßmuskelzellen unterschieden. Die in diesem Kapitel untersuchten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kultivierung unter 200 ng/mL PDGF-BB eine Transdifferenzierung der isolierten ECFCs in Gefäßmuskelzellähnliche Zellen induziert. Damit wäre die Generierung autologer Gefäßmuskelzellen möglich, welche insbesondere bei der Entwicklung einer mehrschichtigen bioartifiziellen Gefäßprothese eine entscheidende Rolle spielen.

5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte ein Kultivierungskonzept zur Endothelialisierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese entwickelt werden. Dabei sollte zunächst eine passende Endothelzellquelle gefunden werden, die später unter physiologischen Blutflussbedingungen ihre Funktionalität beibehält und antithrombogene Eigenschaften auch unter Entzündungsbedingungen aufweist. Aus diesem Grund sollten endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) aus dem peripheren Blut isoliert und für weitere Versuche expandiert werden. Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einzeln diskutiert und in den Kontext aktueller Literatur eingeordnet. Dabei werden die Ergebnisse der Isolation und Charakterisierung der ECFCs in Kapitel 5.1 näher diskutiert. Weiterhin wird untersucht, inwieweit die isolierten ECFCs unter verschiedenen dynamischen Bedingungen in Bezug auf ihre Mechanosensitivität und Thrombogenität im Vergleich zu endothelialen Modellzellen konditioniert werden konnten (Kapitel 5.2). Außerdem wird das arteriovenöse Differenzierungspotential der ECFCs unter physiologischen arteriellen Flussbedingungen näher beleuchtet (Kapitel 5.3). Zuletzt sollte analysiert werden, inwiefern die ECFCs über ihre Differenzierungslinien hinaus in Gefäßmuskulzellen transdifferenziert werden können (Kapitel 5.4).

5.1 Isolation und Charakterisierung von endothelialen koloniebildenden Zellen

Das Ziel des ersten Kapitels der Dissertation lag in der Isolation und Expansion einer passenden endothelialen Zellquelle zur Endothelialisierung der bioartifiziellen Gefäßprothese. Um klinische Anforderungen zu erfüllen, sollten die eingesetzten Zellen einer leicht zugänglichen autologen Zellquelle entspringen und ein hohes Proliferationspotential aufweisen. Aus diesem Grund wurden endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) aus dem peripheren Blut isoliert, charakterisiert und für weitere Versuche expandiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

5.1.1 Abgrenzung von bisherigen Isolationsprotokollen

In der Literatur werden ECFCs als Subtyp der endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) bezeichnet, welche phänotypisch nicht von adulten Endothelzellen zu unterscheiden sind (Yoder et al., 2006). ECFCs können im adulten Mechanismus mit nicht-invasiven Methoden

dem peripheren Blutstrom entnommen werden und ihre mittlere Konzentration wird auf 5-20 Zellen pro 100 mL Blut geschätzt (Hirschi et al., 2008; Prater et al., 2007). Da für die Endothelialisierung blutberührender Implantatoberflächen eine große Anzahl an Zellen erforderlich ist, werden ECFCs zur vermehrten Proliferation häufig auf wachstumsfördernden Substanzen wie Kollagen und Fibronectin kultiviert (Fuchs und Hermanns et al., 2006; Asahara et al., 1997; Lin et al., 2013). Eine bioartifizielle Gefäßprothese stellt allerdings ein Arzneimittel für neuartige Therapien (engl.: *advanced therapy medicinal product*: ATMP) dar, wodurch bestimmte Vorgaben für die Zulassung berücksichtigt werden müssen. Diese Richtlinien für ATMPs werden durch das Paul-Ehrlich-Institut vorgegeben und beinhalten, dass ein ATMP mit möglichst nur geringen Mengen unphysiologischer Faktoren hergestellt werden darf, um nach Implantierung im lebenden Organismus keine Wechselwirkung auszulösen (Funk et al., 2015). Daher sollte der Einsatz zusätzlicher allogener Materialien, wie Kollagen und Fibronectin zur Wachstumsförderung der ECFCs vermieden werden (Siegel et al., 2018). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die ECFCs ohne die Verwendung von unterstützenden allogenen Materialien kultiviert. Dafür wurden Kultivierungsprotokolle der Arbeiten um Hofmann et al. und Siegel et al. adaptiert. Zur Gewinnung von mononukleären Zellen (MNCs) wurden in dieser Arbeit Thrombozytenapheresespenden (*buffy coats*) verwendet. Im Vergleich zum Isolationsprotokoll von Hofmann et al. wurde in dieser Arbeit jedoch kein Vollblut eingesetzt, da eine mögliche unspezifische Kontamination mit anderen heterogenen Bestandteilen des Blutes vermieden werden sollte (Hofmann et al., 2012). Die MNCs dieser Arbeit wurden im Gegensatz zum Protokoll von Siegel et al. nicht mithilfe eines Zellseparators, sondern durch den Einsatz der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Siegel et al., 2018). In diesem physikalischen Trennverfahren wurden die einzelnen Bestandteile der *buffy coats* anhand ihrer Dichte sortiert und anschließend einzeln isoliert. Dieses Verfahren wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Isolation von MNCs angewandt (Hess et al., 2014; Patry et al., 2018; Egorova et al., 2012).

5.1.2 Isolation und Kultivierung der ECFC

Die MNC-Fraktionen der jeweiligen Spendersets wurden in einer Zelldichte von $22,1 \pm 7,2 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^2 ausplattiert. Diese Zellzahl lag deutlich über der in anderen Arbeiten veröffentlichten Zelldichten. Reed et al. beispielsweise kultivierten die gewonnenen MNCs in einer Zelldichte von $3,4 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^2 (Reed et al., 2015). Auch die Arbeitsgruppe um Fuchs et al. plattierten ihre Zellen in einer vergleichsweise geringen Zelldichte von $2,7 \cdot 10^6$ Zellen pro cm^2 aus (Fuchs und Motta et al., 2006). Die in dieser Arbeit höher gewählte

Zelldichte wird damit begründet, dass im Vergleich zu Reed und Fuchs auf zusätzliche Beschichtungen der Zellkulturgefäße wie Kollagen oder Fibronectin verzichtet wurde. Dadurch sollte ohne adhäsionsfördernde Beschichtungen eine bessere Kolonieentstehung mithilfe einer erhöhten Zelldichte begünstigt werden. Diese These wird ebenfalls durch Ergebnisse einer Studie um Mauge et al. unterstützt, in der gezeigt wird, dass eine höhere Anzahl an ausplattierten MNCs eine größere Wahrscheinlichkeit für eine Koloniebildung bedeutet (Mauge et al., 2014). Samdja et al. allerdings widerlegten die Behauptung von Mauge et al., indem sie festhielten, dass unterschiedliche MNC-Dichten die Anzahl der ECFC-Kolonien nicht beeinflussten und ECFC-Kolonien unabhängig der anfänglichen MNC-Dichte nur mit einer 70-75 %igen Wahrscheinlichkeit entstehen (Smadja et al., 2019). Hinweise, wovon die Koloniebildungsrate eines Spenders abhängt, konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Die Koloniebildungsrate in dieser Arbeit lag bei 66,7 % und war damit vergleichbar mit den Angaben in der Literatur.

Um die Koloniebildungsrate in zukünftigen Studien zu erhöhen, könnten exogene Stimuli zu einer größeren Anzahl mobilisierter ECFCs im peripheren Blutkreislauf führen. Eine Studie um Laufs et al. fand heraus, dass physisches Training die Anzahl der im Blut zirkulierenden EPCs signifikant erhöhte. Dabei wurde beobachtet, dass eine Erhöhung von NO nötig ist, um die Anzahl der zirkulierenden EPCs zu steigern (Laufs et al., 2004). Da das aus eNOS katalysierte NO als kritischer Faktor für die Funktionalität von ECFCs zählt (Sen et al., 2022), könnte eine frühzeitige Messung von eNOS in den isolierten ECFCs eine Aussage über deren Zellviabilität und Proliferationskapazität geben.

Ferner konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass das Spendergeschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute der MNCs je *buffy coat* ausübte. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls in der Arbeit um Wang et al. beobachtet. Demnach besaßen die männlichen Spender eine nicht signifikant unterschiedliche Menge an ECFCs im Vergleich zu den weiblichen Spendern (Wang et al., 2011). Wang et al. zeigten auch, dass das Alter der Spender sich nicht signifikant auf die ECFC-Entwicklung auswirkte (Wang et al., 2011). Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Smadja et al. gemacht. Dort wurde gezeigt, dass die Spender im Alter zwischen 20 und 73 Jahren keine signifikanten Unterschiede auf die ECFC-Ausbeute aufzeigten (Smadja et al., 2019). Auch Pelliccia et al. konnten feststellen, dass das Spenderalter nicht mit einer Abnahme an endothelialen Vorläuferzellen zusammenhing (Pelliccia et al., 2009). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit männliche und weibliche Spender im Alter zwischen 20 und 58 Jahren ausgewählt und als gleichwertig angesehen.

Weiterhin wurde die Koloniezahl je Spender untersucht. Dabei konnte eine Gesamtkoloniezahl von $6,7 \pm 3,1$ Kolonien je Spender bei einer mittleren Koloniezahl von $0,7 \pm 0,3$ Kolonien pro mL *buffy coat* ermittelt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Angaben einer Studie um Reinisch und Strunk. (Reinisch und Strunk, 2009). Dort wurde ebenfalls weniger als eine Kolonie je mL Blut angegeben. Auch Yoder et al. und Ingram et al. gaben eine Koloniezahl von weniger als einer Kolonie je mL Blut an (Yoder und Ingram, 2005; Ingram et al., 2004). Zudem deckt sich der Zeitpunkt der Kolonieentstehung mit Angaben aus der Literatur (Siegel et al., 2018; Reinisch und Strunk, 2009; Yoder und Ingram, 2005; Ingram et al., 2004). Während Yoder et al. einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen bis zur Kolonieentstehung angeben (Yoder und Ingram, 2005), verweisen Reinisch und Strunk auf $8,6 \pm 0,5$ Tage bis zur ersten Kolonieentwicklung (Reinisch und Strunk, 2009). Erste ECFC-Kolonien in dieser Arbeit wurden nach neun bis 14 Tagen detektiert und lagen damit in einem vergleichbaren Zeitraum.

5.1.3 Charakterisierung der ECFC

Die Verdopplungszeiten der jeweiligen Spendersets wurden über vier Passagen ermittelt. Für alle Proben und Passagen gemittelt konnte eine Verdopplungszeit von $2,7 \pm 1,6$ Tagen festgestellt werden. Die ermittelten Verdopplungszeiten deckten sich mit Angaben in der Literatur zu ECFCs aus dem peripheren Blut (Brittan et al., 2013; Ingram et al., 2004; Siegel et al., 2018). Ingram et al. ermittelten für ECFCs aus dem peripheren Blut Verdopplungszeiten zwischen 3-4 Tagen, während für ECFCs aus dem Nabelschnurblut 1-2 Tage angegeben wurden (Ingram et al., 2004; Sipos et al., 2013; Yoder und Ingram, 2005). Im Vergleich dazu konnten Siegel et al. für ECFCs aus dem peripheren Blut eine Zunahme der Verdopplungszeiten mit ansteigender Passage feststellen (Siegel et al., 2018). Dabei erreichten ECFCs in Passage 1 eine Verdopplungszeit von $3,7 \pm 0,7$ Tagen, welche in Passage 7 auf $10,4 \pm 4,5$ Tage anstieg. Die in dieser Arbeit isolierten ECFCs zeigten bis in Passage 6 eine mittlere Verdopplungszeit von $2,4 \pm 1,5$ Tagen. Somit konnte keine Zunahme der Verdopplungszeit mit ansteigender Passage festgestellt werden.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse aller Spender deckten sich mit den Angaben aus der Literatur zur eindeutigen Bestimmung von ECFCs: positiv für die endothelzellspezifischen Marker CD31, CD34 und CD146, sowie negativ für die hämatopoetischen Marker CD45, CD133 und CD14 (Basile et al., 2018; Fuchs und Hermanns et al., 2006; Ingram et al., 2004; Siegel et al., 2018). Das positive Signal für das Endothelzelladhäsionsmolekül CD146 weist auf eine verstärkte endotheliale

Monolayerintegrität hin und ist bei undifferenzierten EPCs nicht detektierbar (Bardin et al., 2009; Fuchs und Hermanns et al., 2006). Die Expression des stammzellspezifischen transmembranen Phosphoglykoproteins CD34 gilt als Indikator für undifferenzierte Zellen, der mit zunehmender Reifung verloren geht (Sidney et al., 2014; Kutikhin et al., 2018). Die mittlere positive Expression aller Spender ($27,4 \pm 11,2$ %) beweist, dass eine Untergruppe der isolierten ECFCs zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht vollständig ausdifferenziert vorlag.

Ferner wurden mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung die endothelzellspezifischen Marker VE-Cadherin, vWF und CD31 detektiert und damit der eindeutige ECFC-Charakter bestätigt (Brown et al., 2009; Peters, 2018). Die positive Färbung der Transmembranadhäsionsmoleküle VE-Cadherin und CD31 weist auf eine hohe Stabilität der Endothelbarriere hin (Heupel et al., 2009). Auch das Vorhandensein des Glykoproteins vWF gibt eine intakte Endothelfunktion der isolierten ECFCs an (de Jong et al. 2019).

Als weiteres ECFC-Merkmal zählt die Fähigkeit, *in vitro* netzwerkartige Strukturen auf einer dreidimensionalen basalmembranartigen Matrix auszubilden (Yoder und Ingram, 2005; Smadja et al., 2019). Die Kultivierung der ECFCs auf der Cultrex[®]-Membran zeigte nach einem Zeitraum von 24 h feingliedrige und tubulärartige Netzwerkstrukturen auf. Damit konnte die angiogenetische Kapazität als wichtiges Merkmal für ECFCs bestätigt werden (Fuchs und Hermanns et al., 2006). Mit den oben genannten Ergebnissen wurde somit festgestellt, dass die isolierten Zellen eindeutig als ECFCs charakterisiert werden konnten.

In diesem Kapitel konnte demnach gezeigt werden, dass ECFCs aus dem peripheren Blut ohne den Einsatz zusätzlicher Oberflächenbeschichtungen der Kulturgefäße in einer ausreichenden Zell- und Koloniezahl kultiviert werden konnten. Dadurch wurde erfolgreich eine Isolations- und Kultivierungsmethode zur Generierung autologer Endothelzellen zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen etabliert.

5.2 Auswirkung von Scherstress auf ECFCs im Vergleich zu HUVECs

Die Ausbildung einer geschlossenen Endothelschicht im Inneren der Gefäßprothese ist essenziell, um eine thrombogene und inflammatorische Reaktion nach dem Implantieren zu verhindern (Hess et al., 2014). Die auf der Gefäßprothesenoberfläche angesiedelten Endothelzellen müssen ihre funktionellen sowie adhäsiven Eigenschaften unter *in vivo* Flussbedingungen aufrechterhalten (Pang et al., 2015). In Studien um Tsioufis et al. und Yazdani et al. konnte gezeigt werden, dass eine Konditionierung unter physiologischen

Scherstressbedingungen vor dem Implantieren die Zelladhärenz und die atheroprotektiven Eigenschaften der Endothelzellen verstärkt (Tsioufis et al., 2017; Yazdani et al., 2010). Dabei erwies sich ein unidirektionaler hoher Scherstress als besonders günstig, um antithrombogene Effekte, wie eine verminderte Plättchenaggregation und Thrombenbildung, hervorzurufen (Chistiakov et al., 2017; Heo et al., 2014). Daher war ein Teilziel dieser Arbeit, die Auswirkung verschiedener Scherstressprofile auf die Funktion sowie Mechanosensitivität der isolierten ECFCs im Vergleich zu klassischen Modellendothelzellen aus der Literatur, den humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs), zu untersuchen.

5.2.1 Analyse verschiedener Scherstressprofile auf Mechanosensitivität der Zellen

Unter quasi-statischen Bedingungen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$) unterschieden sich ECFCs und HUVECs phänotypisch nicht voneinander. Beide Zelltypen zeigten die für *in vitro* Endothelzellkulturen typische ungeordnete Kopfsteinpflasterformation auf (Haudenschild, 1984). Mit zunehmendem Scherstress veränderten nur ECFCs ihre Morphologie, Zellanordnung und -orientierung. Die ECFCs zeigten die für arterielle Gefäßsegmente charakteristischen lang gestreckten und in Flussrichtung orientierten Zellstrukturen auf (Aird, 2007). Diese morphologischen Veränderungen wurden sowohl unter mittlerem (5 dyn/cm^2) als auch hohem Scherstress (20 dyn/cm^2) beobachtet. Dabei konnte zudem gezeigt werden, dass eine Kultivierung unter hohem Scherstress, sowohl unter laminaren als auch unter pulsatilen Bedingungen, zu einer schnelleren Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung führte. Bereits nach 24 h zeigten ECFCs unter 20 dyn/cm^2 eine gestreckte und parallel zur Flussrichtung angeordnete Morphologie, während unter einem mittleren Scherstress in Höhe von 5 dyn/cm^2 erst nach 35 h Kultivierung eine Ausrichtung der Zellen zu beobachten war. Die schnelle Ausrichtung der ausplattierten ECFCs ist insbesondere für zukünftige Bioreaktorkultivierungen einer bioartifiziellen Gefäßprothese von Bedeutung, da dadurch eine zügige und ressourcenschonende Durchführung der Endothelialisierung ermöglicht wird. Zudem wird durch eine kürzere Kultivierungsdauer das Kontaminationsrisiko gesenkt.

Im Vergleich zu ECFCs, konnte in HUVECs nur unter hohem laminaren Scherstress eine strukturelle Veränderung und Anordnung der Morphologie in Flussrichtung beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Scherstresskultivierung die endotheliale Monolayerintegrität der ECFCs verstärkte. Dies wurde anhand von VE-Cadherin-Färbungen der flusskultivierten ECFCs nachgewiesen. Ein pulsatiler hoher Scherstress (20 dyn/cm^2 , 1 Hz) unterstützte dabei die Adhäsionsverbindungen zwischen den ECFCs, während unter einem laminaren hohen Scherstress eine unzusammenhängende Monolayerintegrität erkennbar war.

In vivo führt der auf die apikale Oberfläche der Intima (Gefäßinnenwand) wirkende Scherstress infolge des pulsatilen Blutflusses zu Mechanotransduktionsreaktionen (Chistiakov et al., 2017). Diese beeinflussen neben dem Zytoskelett auch die Zell-Zell-Verbindungen. Mit zunehmendem Scherstress wurde in der Literatur gezeigt, dass Endothelzellen ihre Barriere-Funktion und somit ihre Zell-Zell-Kontakte verstärken (Seebach et al., 2000; Dorland et al., 2017). Eine verminderte Monolayerintegrität dagegen könnte eine Plättchenaggregation begünstigen und damit eine endotheliale Dysfunktion verursachen (Dong et al., 2018; Claesson-Welsh et al., 2021). Demnach erwies sich ein pulsatiler Fluss als entscheidend zur Aufrechterhaltung und Ausbildung eines funktionalen Endothels.

Weiterhin wurde mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung die Auswirkung der Scherstresskultivierung auf das Aktin-Zytoskelett untersucht. Die Ausrichtung von Aktinbündeln im Zytoskelett ist für eine erfolgreiche Endothelialisierung von großer Bedeutung, da sie die mechanische Stabilität von Endothelzellen unter Fluss widerspiegelt und für die Entzündungsreaktion der Zellen relevant ist (Gong et al., 2014; Wang et al., 2013). Beide Endothelzelltypen zeigten unter statischen Bedingungen typische in der Zellperipherie verteilte, ungeordnete Aktinfilamentstrukturen (Ensley et al., 2012; Abaci et al., 2012). Die in Kapitel 4.2.1.3 gezeigten Ergebnisse bestätigen eine schnelle Zellausrichtung und Parallelisierung von Aktinbündeln unter dem Einfluss von hohem Scherstress (20 dyn/cm²). Dieser Effekt ist ausschließlich bei ECFCs beobachtbar und deutet auf eine erhöhte Empfindlichkeit der ECFCs gegenüber Scherstress im Gegensatz zu HUVECs hin (Yamamoto et al., 2003). Durch die Anpassung ihrer Zellform an den Fluss widersetzen sich nur die ECFCs der Scherbeanspruchung und erzeugten somit eine Schutzwirkung gegen Verletzungen (Gong et al., 2014).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Elongationsfähigkeit der Zellen mit der Höhe der Scherbeanspruchung korreliert, der die Zellen ausgesetzt sind. Diese Beobachtungen stimmen mit Studien anderer Arbeitsgruppen überein (Deb et al., 2021; Abaci et al., 2012; Ensley et al., 2012; Brown et al., 2009). Die hier aufgeführten Ergebnisse beschreiben, dass ein hoher Scherstress eine Ausrichtung der ECFCs in Flussrichtung provozierte.

Dabei wird die zytoskelettale Verlängerung als ein wichtiger Faktor gegen Atherosklerose angesehen (Heo et al. 2014; Levesque und Nerem, 1985). Aus diesem Grund könnte eine Vorkonditionierung von ECFCs mit laminarem und pulsatilem Fluss vor dem Implantieren vorteilhaft sein, um eine antithrombogene Implantatoberfläche zu gewährleisten (Thilo et al., 2012; Heo et al., 2014; Yoshizumi et al., 2003).

5.2.2 Auswirkung von Scherstress auf Thrombogenität der Zellen

Die mechanische Belastung des Scherstress induziert einerseits die physikalische Verformung der Zelloberfläche. Andererseits werden auch die intrazelluläre Übertragung von Stress und die Umwandlung in chemische Prozesse und biochemische Signale hervorgerufen, welche durch die Untersuchung von Genexpressionsprofilen der Zellen analysierbar sind (Davies, 2009).

Die flussinduzierte Mechanotransduktion fördert neben der Zellausrichtung, auch einen antithrombogenen Phänotyp (Radke et al., 2018; Kutikhin et al., 2018). Aufgrund von Scherstressbedingungen aktivieren Endothelzellen Faktoren, die die Gerinnungskaskade auslösen (Paszkowiak und Dardik, 2003). In dieser Arbeit sollte daher die Wirkung unterschiedlicher Scherstressraten auf die Thrombogenität der Zellen analysiert werden. Diese kann anhand der Hochregulierung bestimmter Marker entweder auf Protein- oder Genebene gemessen werden. Dazu zählen Marker wie *Tissue Factor* (TF), Thrombomodulin oder Gewebeplasminogenaktivator (tPA) (Brown et al., 2009; Malek et al., 1994).

Thrombomodulin gilt als Schlüsselindikator zur Feststellung des thrombogenen Status endothelialer Zellen und ist ein Membranprotein, das Protein C stimuliert, Thrombin bindet und zur Antikoagulation beiträgt (Malek et al., 1994; Dahlbäck, 2000). Eine hohe Thrombomodulin-Expression symbolisiert demzufolge eine hohe Antithrombogenität der Zellen, ist in dieser Arbeit somit gewünscht, und wurde bereits in früheren Studien in Zusammenhang mit dynamischen Flussbedingungen beschrieben (Martin et al., 2014; Ishibazawa et al., 2011, Takada et al., 1994; Rossi et al., 2010). Die Ergebnisse in Kapitel 4.2.2 zeigen, dass ein hoher Scherstress die Thrombomodulinexpression in ECFCs und HUVECs hochregulierte, die Genexpression in ECFCs sogar verstärkt ausgeprägt vorlag. Dadurch lässt sich die Annahme treffen, dass ECFCs durch eine dynamische Kultivierung eine stärkere antithrombogene Wirkung entwickelten als ausgereifte Endothelzellen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie um Brown et al., in der ECFCs aus dem humanen Nabelschnurblut im Vergleich zu humanen Aortenendothelzellen (HAECs) unter Fluss (15 dyn/cm² für 48 h) kultiviert wurden. Dabei wurde sowohl in den ECFCs als auch in den HAECs eine signifikant erhöhte Thrombomodulinexpression nach Flusseexposition im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen gemessen. Auch bei Brown et al. zeigten die ECFCs einen p-Wert kleiner 0,01, während der signifikante Unterschied bei HAECs einen p-Wert kleiner 0,05 besaß (Brown et al., 2009). Dies lässt auf eine stärkere antithrombogene Genantwort der ECFCs schließen. Die Arbeitsgruppe um Ensley et al. zeigte in ihrer Arbeit ähnliche Ergebnisse. Dabei wurden ECFCs aus dem peripheren Blut eines Pavians, welche in

der Arbeit als EOCs (*endothelial outgrowth cells*), gleichbedeutend mit ECFCs, bezeichnet sind, mit arteriellen Endothelzellen aus dem Pavian verglichen (Ensley et al., 2012). Die Zellen wurden für 24 h einem Scherstress von 15 dyn/cm^2 ausgesetzt, um anschließend die Thrombomodulingenexpression mithilfe der qRT-PCR-Methode zu analysieren. Auch Ensley et al. konnte einen signifikanten Anstieg der Thrombomodulinexpression nach dynamischer Kultivierung im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen beobachten. Verglichen dazu zeigten die arteriellen Endothelzellen eine erhöhte jedoch nicht signifikant veränderte Genexpression. Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ECFCs stärker antithrombogen als adulte Endothelzellen auf dynamische Kultivierungsbedingungen reagieren.

5.2.3 Analyse des Glukoseverbrauchs nach dynamischer Kultivierung

Für eine zukünftige Kultivierung in einem dreidimensionalen Bioreaktorsystem ist eine Überwachung der biochemischen Parameter wie Sauerstoff, Glukose und Laktat, zur Gewährleistung der Zellvitalität entscheidend (Maschhoff et al., 2017). Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Scherstress auf die metabolische Aktivität der Zellen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sich ein hoher pulsatiler Scherstress signifikant auf den Glukoseverbrauch und damit auf die metabolische Aktivität der ECFCs auswirkte, während für HUVECs keine signifikant unterschiedliche Glukosekonzentration nach Abschluss der verschiedenen Kultivierungen beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie um Han et al., dass ein pulsatiler Scherstress ($12 \pm 4 \text{ dyn/cm}^2$ für 24 h) die metabolische Aktivität von HUVECs reduzierte. Dabei wurde festgestellt, dass ein pulsatiler Scherstress die Expression des Glykolyseenzym Hexokinase unterdrückte und somit der Glukoseverbrauch der HUVECs mit zunehmendem Scherstress sank (Han et al., 2021). Auch Doddaballapur et al. beobachteten, dass der Glukoseverbrauch für HUVECs unter laminarem Scherstress (20 dyn/cm^2 für 72 h) abnahm (Doddaballapur et al., 2015). Abaci et al. wiesen allerdings darauf hin, dass undifferenzierte humane embryonale Stammzellen (hESC) einen höheren Glukoseverbrauch als ausdifferenzierte HUVECs aufwiesen (Abaci et al., 2012). Damit wurde behauptet, dass der Differenzierungsstatus der Zellen in Zusammenhang mit einem erhöhtem Glukoseverbrauch stand. Auch ECFCs liegen als undifferenzierte endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) vor, welche unter Scherstress zu reifen Endothelzellen differenzieren können (Obi et al., 2012; Cheng et al., 2013). Demnach könnte der signifikant höhere Verbrauch an Glukose, der in dieser Arbeit festgestellt wurde, mit dem Differenzierungsprozess der ECFCs einhergehen.

5.3 Arteriovenöse Differenzierungsanalyse der isolierten ECFCs

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass ECFCs eine höhere Sensitivität gegenüber Strömungsbedingungen als HUVECs präsentierten und damit eine bevorzugte Zellquelle zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßimplantate darstellen. Dennoch weist eine Auswertung von Wang et al. darauf hin, dass 59 % der zwischen 2013 und 2018 veröffentlichten Studien, die das vaskuläre *Tissue Engineering* thematisierten, HUVECs als bevorzugte Zellquelle einsetzten (Wang et al., 2019). Die Verwendung von HUVECs in klinischen Anwendungen würde jedoch aufgrund ihres allogenen Ursprungs immunsuppressive Behandlungen erfordern (Hendrickx et al., 2011). Es konnte zudem gezeigt werden, dass insbesondere für die Endothelialisierung von arteriellen Bypasskonstrukten ein arterieller Phänotyp der verwendeten Endothelzellen zu einer höheren Durchgängigkeitsrate nach dem Implantieren führt (Jannati et al., 2019; Riess et al., 2017).

Da zudem der zuvor festgestellte signifikant erhöhte Glukoseverbrauch der ECFCs nur auf einen möglichen Differenzierungsprozess der Zellen hinweist, wurde im folgenden Kapitel dieser Arbeit untersucht, inwieweit eine Vorkonditionierung unter einem hohem Scherstress zur arteriellen Differenzierung der ECFCs führt. Hierfür wurden ECFCs, HUVECs und HAECs unter verschiedenen Bedingungen kultiviert, stimuliert und miteinander verglichen.

5.3.1 Phänotypische Unterschiede nach TNF- α Stimulierung und dynamischer Kultivierung mit Puls

Die Analyse der Verdopplungszeiten nach einer statischen Kultivierung ergab, dass ECFCs eine ähnliche Verdopplungsrate aufwiesen wie HAECs und sich signifikant von HUVECs unterschieden. Außerdem ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen HAECs und HUVECs feststellen. Diese Auswertung gab erste Hinweise darauf, dass unter statischen *in vitro* Bedingungen charakteristische Ähnlichkeiten zwischen ECFCs und HAECs bestanden.

Diese sollten durch eine Kultivierung unter dynamischen Bedingungen weiter untersucht werden. Dafür wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer 24-stündigen Scherstresskultivierung auf den Differenzierungsstatus der isolierten ECFCs bestimmt. Zunächst erfolgte ein morphologischer Vergleich nach Flusskultivierung, um phänotypische Gemeinsamkeiten und Unterschiede durch Phasenkontrastaufnahmen hervorzuheben. Dabei ergab sich für ECFCs im Vergleich zu HAECs und HUVECs eine am stärksten ausgerichtete und parallel zum Fluss angeordnete Morphologie. Die morphologischen Veränderungen wurden auch unter dem Einfluss des Zytokins TNF- α untersucht. Dabei sollte eine Entzündungsreaktion nach dem

Implantieren der Gefäßprothese simuliert werden. Studien weisen darauf hin, dass insbesondere nach kardiochirurgischen Eingriffen, wie einer Bypass-Operation, erhöhte Level des inflammatorischen Zytokins TNF- α im Blutplasma detektiert werden konnten (Meierin, 2013; Schröpfer, 2005) und TNF- α als prognostischer Marker für die Progression der Atherosklerose in atherosklerotischen Plaques mit Tendenz zur Gefäßsklerose und -thrombose gefunden wurde. Daher sollte der Einfluss von dynamischer Kultivierung auf das antithrombogene Profil der Endothelzellen auch unter TNF- α untersucht werden (Böse et al., 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausrichtung in Flussrichtung und parallele Anordnung der ECFCs unabhängig der TNF- α -Stimulierung stark ausgeprägt vorlag. Verglichen dazu, zeigten HUVECs und HAECs unter Flussbedingungen weniger stark ausgerichtete Zellen, auch unter dem Einfluss von TNF- α . In HAECs konnte allerdings eine deutlich größere Ausrichtung verglichen zu HUVECs festgestellt werden.

Die Erkenntnisse der Phasenkontrastaufnahmen wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen der Zell-Zell-Kontakte und Aktinfilamente bestätigt. ECFCs zeigten eine lang gestreckte und in Flussrichtung orientierte Morphologie. Auch die Aktinbündel der ECFCs orientierten sich vermehrt in Flussrichtung, was für eine hohe mechanische Stabilität der ECFCs gegen die Flusströmung spricht. Gleichzeitig wiesen die HAECs im Vergleich zu HUVECs deutlich stärker ausgerichtete Aktinfilamente auf. Dies deckt sich mit Angaben um Dessalles et al. Dort wird darauf hingewiesen, dass Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen in Bezug auf die zytoskeletalen Veränderungen nach einer *in vitro* Scherstresskultivierung festgestellt werden konnten. Demnach wurde in arteriellen Endothelzellen eine verstärkt polarisierte Zellform mit stärker in Flussrichtung ausgerichteten Aktinfilamenten nachgewiesen, während venöse Endothelzellen weniger ausgerichtete Zellstrukturen aufwiesen (Dessalles et al., 2021).

Außerdem wurde die Ausrichtung und Rundheit der Zellen anhand der VE-Cadherin-Färbung ausgewertet. Die Zellausrichtung gilt als wichtiger atheroprotektiver Prozess, der die entzündliche Signalübertragung in Endothelzellen verringert (Wang et al., 2013). In nativen Arterien sind Endothelzellen lang und schmal und orientieren sich entlang der Längsachse des Blutflusses, während venöse Endothelzellen kurz und breit sind und keine eindeutige Ausrichtung aufzeigen (Aird, 2007; Paz und D'Amore, 2009). Die in dieser Arbeit festgestellten signifikanten Unterschiede der ECFCs in Bezug auf ihre Ausrichtung im Vergleich zu HUVECs sowie die nicht-signifikant unterschiedliche Rundheit und Ausrichtung der ECFCs im Vergleich zu HAECs deuten darauf hin, dass sich die isolierten ECFCs unter dynamischer Kultivierung eher zu einem arteriellen als zu einem venösen Phänotyp

entwickelten. Die ECFCs werden zudem als strömungsempfindlicher als HAECs und HUVECs angesehen, da die Ausrichtung in Flussrichtung deutlich stärker vorlag.

5.3.2 Unterschiede der Genexpression nach TNF- α Stimulierung und dynamischer Kultivierung mit Puls

Weiterhin wurden die Transkriptionslevel charakteristischer endothelialer, mechanosensorischer Marker der flusskultivierten Zellen analysiert, um Auskunft über den Differenzierungsstatus der ECFCs zu geben. Die Analyse der relativen Expression von CD31 ergab, dass sich ECFCs von HUVECs unterschieden, während zwischen ECFCs und HAECs kein signifikanter Unterschied vorzufinden war. Gleichzeitig konnte durch die Zugabe des Zytokins TNF- α eine Abnahme der CD31-Expressionslevel in allen Zelltypen beobachtet werden. Eine geringere Expression von CD31 durch die Zugabe von TNF- α wurde auch in anderen Studien festgestellt (Zhou et al., 2020; Moriconi et al., 2012). Das Adhäsionsmolekül CD31 wird an der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert und dient unter Scherstress als Mechanosensor, der die Umwandlung eines mechanischen Signals in ein biochemisches Signal stimuliert (Chistiakov et al., 2017). Als weitere wichtige Funktion von CD31 gilt die Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität (Privratsky und Newman, 2014). Demnach könnte eine niedrigere CD31-Expression in HUVECs als Hinweis für eine endotheliale Dysfunktion stehen.

Neben CD31 ist auch KDR am mechanosensorischen Komplex beteiligt (Kutikhin et al., 2018). Die Analyse der KDR-Expressionslevel zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen HUVECs und HAECs unter allen Kultivierungsbedingungen. Während die Transkriptionslevel von KDR zwischen ECFCs und HUVECs nicht signifikant unterschiedlich waren, zeigten HAECs unter allen Bedingungen höhere Expressionslevel als ECFCs. Unter Einfluss von TNF- α wurde für alle Zelltypen ein verringertes KDR-Transkriptionslevel festgestellt. Dies deckte sich mit Studien anderer Arbeitsgruppen (Patterson et al., 1996; Sainson et al., 2008). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung unter einem hohen pulsatilen Scherstress eine Hochregulierung von KDR in ECFCs begünstigt. Auch Yamamoto et al. beobachteten, dass Scherstress eine KDR-induzierende Wirkung auf Endothelzellen aufweist (Yamamoto et al., 2003).

Weiterhin wurde die Genexpression des Markers CD34 untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen HAECs und ECFCs detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten ECFCs höhere CD34-Expressionslevel im Vergleich zu HUVECs nach statischer und dynamischer Kultivierung sowohl unter dem Einfluss von TNF- α als auch ohne. Auch HAECs

wiesen unter allen Bedingungen eine signifikant höhere CD34-Genexpression auf als HUVECs. Das Phosphoglykoprotein CD34 wird auf unreifen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert (Gratama et al., 1998). Zusätzlich wurde CD34 allerdings auch in ausdifferenzierten vaskulären Nabelschnurendothelzellen nachgewiesen (Fina et al., 1990). Egorova et al. untersuchten ebenfalls Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Zellen in Bezug auf ihre CD34-Expression nach dynamischer Flusskultivierung. Dabei konnten sie beobachten, dass HUVECs sowohl unter statischen als auch dynamischen (25 dyn/cm^2) Bedingungen im Vergleich zu arteriellen Nabelschnurendothelzellen signifikant niedrigere CD34-Transkriptionslevel aufwiesen (Egorova et al., 2012).

Weiterhin weist die hohe Genexpression von NOTCH4 in ECFCs auf einen arteriellen Phänotyp der ECFCs hin, da NOTCH4 als wichtiger arteriovenöser Differenzierungsmarker gilt, der ausschließlich im arteriellen Endothel exprimiert wird (Kim et al., 2015; Lehoux und Jones, 2016). Der signifikante Unterschied in der NOTCH4-Genexpression zwischen ECFCs und HUVECs und die ähnlich stark ausgeprägten NOTCH4-Expressionslevel von ECFCs und HAECs nach Flusskultivierung deuten auf einen arteriellen Phänotyp der isolierten ECFCs hin. Zusätzlich verweist die stark ausgeprägte NOTCH4-Proteinexpression von flusskultivierten ECFCs auf einen arteriellen Phänotyp (Kraus et al., 2022).

Darüber hinaus ist auch die Analyse des Tyrosinkinase-Rezeptors Tie2 von Bedeutung, da Tie2 für die Aufrechterhaltung der Funktionalität sowie Integrität des Endothels unter Strömungsbedingungen entscheidend ist. Tie2 gilt außerdem als Schlüsselfaktor für die Homöostase des Endothels (Chlench et al., 2007; Lee und Koh, 2003). Higgins et al. zeigten, dass Tie2 eine wichtige Rolle bei der Thrombushemmung im Falle einer systemischen Inflammation spielt (Higgins et al., 2018). In Studien von Obi et al. und Mecha Disassa et al. wurde gezeigt, dass die Genexpression von Tie2 von der Höhe des applizierten Scherstress abhängt (Obi et al., 2012) und in Arterien doppelt so hoch vorliegt wie in Venen (Mecha Disassa et al., 2009). Unsere Ergebnisse geben an, dass nur ECFCs und HAECs unter Scherstress im Vergleich zur statischen Kultivierung signifikant hochregulierte Tie2-Expressionsniveaus zeigten. Dieses Ergebnis könnte auf ein vergleichbares zellbiologisches Verhalten zwischen ECFCs und HAECs hindeuten. Dieser Effekt war ebenfalls unter dem Einfluss von $\text{TNF-}\alpha$ zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten HUVECs keine signifikanten Unterschiede in den Tie2-Expressionsniveaus unter allen Kultivierungsbedingungen.

Für eine langfristige Durchlässigkeit einer bioartifiziellen Gefäßprothese müssen die ausplattierten Endothelzellen einen antithrombotischen und antiinflammatorischen Phänotyp

aufweisen. Dimitirevska et al. weisen darauf hin, dass eine Vorendothelialisierung unter statischen Kultivierungsbedingungen ein pro-inflammatorisches Genexpressionsprofil der Endothelzellen hervorruft (Dimitrievska und Niklason, 2018). Daher wurde in dieser Arbeit eine dynamische Vorkonditionierung der Zellen als vorteilhaft angesehen, um flussemphindliche atheroprotektive Gene zu aktivieren. Außerdem wurde in einer Arbeit um Brown et al. bereits gezeigt, dass die pro- und antiinflammatorischen sowie thrombotischen Eigenschaften von Endothelzellen von dem auf die Zellen einwirkenden Scherstress abhängen (Brown et al. 2009). Weiterhin ist bekannt, dass in Endothelzellen unter niedrigen Scherstressraten atherogene Marker hochreguliert werden, während ein hohes Scherstressprofil die Expression atheroprotektiver Gene induziert (Kutikhin et al., 2018).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein hoher pulsatiler Scherstress in Höhe von 20 dyn/cm^2 zur Konditionierung der Zellen gewählt, um einen antithrombotischen Phänotyp zu erreichen. Die gewählte Scherstressrate sollte dabei physiologischen arteriellen Strömungsverhältnissen nahekommen (Malek et al., 1994). Dabei zeigten sich in den isolierten ECFCs signifikant höhere Genexpressionsniveaus der antithrombotischen Gene KLF2, eNOS und Thrombomodulin unter Scherstresskultivierung im Vergleich zu statischen Bedingungen. KLF2 ist ein endothelialer vaskuloprotektiver Transkriptionsfaktor, der *in vivo* durch unidirektionalen laminaren Scherstress induziert wird (Davies et al., 2013). KLF2 wird ebenfalls als Schlüsselfigur bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase angesehen (Chistiakov et al., 2017). Über die Stimulation von KLF2 werden sowohl eNOS als auch Thrombomodulin aktiviert. Ein hoher laminarer Scherstress führt zur Hochregulierung von eNOS, wodurch vasodilatatorische und entzündungshemmende Effekte ausgelöst werden (van Thienen et al., 2006). Die in dieser Arbeit analysierten signifikant erhöhten Expressionsniveaus von KLF2 und eNOS in ECFCs im Vergleich zu HAECs und HUVECS weisen auf einen stark ausgeprägten antithrombotischen und entzündungshemmenden Charakter der ECFCs unter hohen Scherstressbedingungen hin.

Die Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$ führte in allen untersuchten Zelltypen zu einer Hemmung der KLF2-, eNOS- und Thrombomodulin-Genexpression unter statischen Kulturbedingungen. Diese Ergebnisse decken sich mit Studien um Lin et al. (Lin et al., 2005). Allerdings wurde gezeigt, dass die Exposition unter einem hohen pulsatilen Scherstress eine signifikant erhöhte Genexpression von KLF2, eNOS und Thrombomodulin trotz $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation hervorrief. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Vorendothelialisierung der Gefäßprothese unter hohen Scherstressbedingungen eine entzündungshemmende Wirkung nach dem Implantieren bewirken könnte.

Die oben genannten Ergebnisse zeigten auch, dass die Stimulation durch TNF- α eine signifikant erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM1 induzierte, wodurch die Adhäsion, Migration und Rekrutierung von Leukozyten begünstigt werden könnte (Chistiakov et al., 2017). Dabei lagen die Expressionsniveaus von VCAM1 in allen Zelltypen sowohl unter statischen als auch dynamischen Bedingungen in einem vergleichbaren Rahmen und waren signifikant höher im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Jedoch konnte ein hoher Scherstress keine Hemmung der VCAM1-Expression hervorrufen. In diesem Zusammenhang muss dennoch darauf hingewiesen werden, dass die Genexpression von VCAM1 in TNF- α -stimulierten ECFCs signifikant niedriger war, verglichen zu TNF- α -stimulierten HUVECs. Damit konnte gezeigt werden, dass ECFCs einen höheren antithrombotischen Charakter als HUVECs aufwiesen.

Die Analyse des Transmembranglykoproteins *Tissue Factor* (TF) zeigte ähnliche Expressionsmuster im Hinblick auf eine TNF- α -Stimulierung und Flusskultivierung der jeweiligen Zelltypen. TF gilt als Hauptakteur in der Initiierung der Blutgerinnung (Cuccuini et al., 2010) und kann durch TNF- α , Endotoxin oder ein oszillierendes Strömungsprofil stimuliert werden (She et al., 2007). Unter physiologischen Bedingungen können *in vivo* nur sehr geringe TF-Transkriptionsniveaus in den Gefäßwandendothelzellen festgestellt werden (Mazzolai et al. 2002). In dieser Arbeit induzierte TNF- α eine signifikante Hochregulierung der TF-Genexpression in allen Zelltypen, sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen. Dabei ließen sich in nicht TNF- α -stimulierten und flusskonditionierten HAECs niedrigere TF-Expressionslevel im Vergleich zu ECFCs und HUVECs beobachten. Dies weist auf einen stark entzündungshemmenden und antithrombotischen Charakter von arteriellen Endothelzellen hin.

Sowohl TF als auch VCAM1 gelten in Bezug auf die Thrombogenität als Gegenspieler zu KLF2, eNOS und Thrombomodulin. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Genexpression der ECFCs, HAECs und HUVECs bestätigt werden. Die oben diskutierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Vorkonditionierung von ECFCs unter Fluss eine Unterdrückung der atherogenen Marker TF und VCAM1 induziert sowie eine Hochregulierung der antithrombotischen Gene wie KLF2, eNOS und Thrombomodulin selbst unter dem Einfluss eines inflammatorischen Stimulus wie TNF- α auslöst und gleichzeitig ein Genprofil induziert, das mehr Ähnlichkeiten zu einem arteriellen als einem venösen Phänotyp aufweist. Dies könnte für die klinische Anwendung von mit ECFCs endothelialisierten bioartifiziellen Gefäßprothesen von Vorteil sein.

5.4 Kultivierung unter verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen zur Gefäßmuskelzellähnlichen Differenzierung

Da arterielle und venöse Blutgefäße in konzentrischen Schichten aufgebaut sind, werden für die Generierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese neben Endothelzellen im Gefäßinneren auch glatte Gefäßmuskelzellen als mittlere Schicht benötigt. Ihre kontraktile Eigenschaften ermöglichen die Aufrechterhaltung des physiologischen Gefäßtonus und somit die Regulation kardiovaskulärer Funktionen (Offermanns, 2012). Reife Gefäßmuskelzellen weisen gegenüber Vorläuferzellen ein vermindertes Proliferationspotential auf. Aus diesem Grund werden Alternativen zur Gewinnung autologer glatter Gefäßmuskelzellen gesucht. In diesem Zusammenhang wurde von Simper et al. gezeigt, dass endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren über ihre Differenzierungslinien hinaus transdifferenziert werden können (Simper et al., 2002). Dabei zeigten die bereits prädifferentiierten vaskulären Progenitorzellen das gleiche Differenzierungspotenzial wie primitive Stammzellen. Studien von Badorff et al. und Ravishankar et al. belegen, dass EPCs das Potenzial besitzen, in Kardiomyozyten und mesenchymale Zellen zu transdifferenzieren (Badorff et al., 2003; Ravishankar et al., 2022). Simper et al. haben erstmals gezeigt, dass zirkulierende Progenitorzellen durch die Kultivierung mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB auch in glatte Gefäßmuskelzellen differenziert werden können (Simper et al., 2002).

Aus diesem Grund sollte zum Abschluss dieser Arbeit untersucht werden, unter welchen PDGF-BB-Bedingungen sich ECFCs in glatte Gefäßmuskelzellen differenzieren können. Dafür wurden die isolierten ECFCs über mehrere Passagen in verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen (50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL) kultiviert und anschließend die Expression der Gefäßmuskelzelltypischen Marker α -SMA und Calponin analysiert.

Dabei zeigte sich, dass eine Kultivierung unter höheren PDGF-BB-Konzentrationen zu signifikanten Unterschieden der Verdopplungszeiten führte. Mit zunehmender PDGF-BB-Konzentration im Medium konnte eine Zunahme der Verdopplungszeit beobachtet werden.

Weiterhin verursachte bereits eine Kultivierung mit 50 ng/mL PDGF-BB ein verstärktes Vorhandensein des Gefäßmuskelzelltypischen Markers α -SMA. Dies konnte mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden. Auch unter 200 ng/mL wurde ein positives α -SMA-Signal festgestellt. Die Genexpressionsanalyse von α -SMA ergab eine signifikant stärkere Expression unter allen Kultivierungsbedingungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wies jedoch innerhalb der PDGF-BB-Gruppe auf eine signifikant erhöhte α -SMA-Expression nach Inkubation mit 200 ng/mL PDGF-BB hin. Dies konnte sowohl in

Passage 5 als auch in Passage 7 festgestellt werden. Demnach verursachte eine relativ kurze Kultivierung unter 200 ng/mL eine verstärkte Gefäßmuskelzellähnliche Differenzierung. Dieses Ergebnis konnte auch durch die signifikant verstärkte Genexpression des Markers Calponin sowie die Gefäßmuskelzellähnliche Kontraktionsfähigkeit nach Inkubation mit Carbachol unter 200 ng/mL belegt werden.

Der Wachstumsfaktor PDGF-BB wurde ebenfalls in mehreren anderen Arbeiten eingesetzt, um eine Transdifferenzierung endothelialer Vorläuferzellen zu induzieren. Ahmetaj-Shala et al. beispielsweise zeigten, dass aus peripherem Blut gewonnene mononukleäre Zellen (PBMNCs) durch die Inkubation mit 50 ng/mL PDGF-BB eine positive α -SMA-Expression und gleichzeitig eine negative endothelzellspezifische CD31-Expression entwickelten (Ahmetaj-Shala et al., 2019). Diese erstmals von Simper et al. veröffentlichte Methode konnte auch von Joo et al. bestätigt werden (Simper et al., 2002; Joo et al., 2014). Andere Studien zeigten, dass eine Kultivierung mit 5 ng/mL PDGF-BB ausreichte, um eine Differenzierung der PBMNCs in Richtung Gefäßmuskelzellen hervorzurufen (Kang et al., 2014; Seong et al., 2020; Sugiyama et al., 2006). Während in der hier vorliegenden Arbeit eine verstärkte Differenzierung der ECFCs auf eine zunehmende PDGF-BB-Konzentration zurückzuführen war, weisen die oben genannten Studien auf gegenteilige Ergebnisse hin. Ein wesentlicher Unterschied besteht allerdings im Ausgangsstadium der Zellen. Während die Studien um Simper et al. und Joo et al. frisch isolierte PBMNCs verwendeten (Simper et al., 2002; Joo et al., 2014), wurden in dieser Arbeit ECFCs mit eindeutig endothelzellcharakteristischen Markern in Passage 5 untersucht. Allerdings deutete die durch die Durchflusszytometrie detektierte Expression des Markers CD34 auf einen undifferenzierten Anteil der isolierten ECFCs hin. Damit könnte erklärt werden, wieso eine Transdifferenzierung in einer höheren Passage im Vergleich zu frisch isolierten PBMNCs dennoch erfolgreich verlief. Auch Heß zeigte in ihrer Arbeit, dass ECFCs das Potential besitzen, sich in funktionelle glatte Gefäßmuskelzellen zu transdifferenzieren. Dafür wurden die Zellen über sieben Tage mit vaskulären SMCs kokultiviert und anschließend die Expression Gefäßmuskelzelltypischer Marker auf Genebene analysiert (Heß, 2008).

Sowohl die Beobachtungen früherer Studien als auch die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass eine Transdifferenzierung von ECFCs in Gefäßmuskelzellähnliche Zellen *in vitro* zu beobachten ist. und dadurch eine Möglichkeit der Generierung autologer Gefäßmuskelzellen besteht. Dies ist insbesondere für die zukünftige Entwicklung einer mehrschichtigen bioartifiziellen Gefäßprothese von Bedeutung, da durch die

Integration einer Muskelzellsschicht in der Gefäßmitte eine höhere mechanische Stabilität und Reißfestigkeit der Gefäßprothese gewährleistet wäre (Gasser et al., 2018; Blume et al., 2022).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Kultivierungskonzepts zur Endothelialisierung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. Dazu wurde zunächst eine passende autologe Endothelzellquelle gesucht, die den klinischen Anforderungen einer endothelialisierten Gefäßprothese entsprachen. Dazu zählt, dass die verwendeten Endothelzellen einer leicht zugänglichen Quelle entstammen und immunologisch neutral eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass endotheliale koloniebildende Zellen (ECFCs) aus dem peripheren Blut ohne den Einsatz zusätzlicher Beschichtungen isoliert und vermehrt werden konnten. Dafür wurden die aus Thrombozytenapheresespenden gewonnenen mononukleären Zellen (MNCs) mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert und über mehrere Wochen kultiviert. Da eine bioartifizielle Gefäßprothese ein Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP) darstellt, gelten für die Endothelialisierung der Gefäßprothese die durch das Paul-Ehrlich-Institut vorgegebenen Richtlinien für ATMPs. Dazu zählt, dass der Einsatz zusätzlicher allogener Substanzen wie Kollagen und Fibronectin zur Wachstumsförderung der ECFCs vermieden werden sollen. Aus diesem Grund wurden die Zellen in unbeschichteten Zellkulturplatten ausplattiert. Die Auswertung der Koloniebildungsrate ergab, dass acht von zwölf untersuchten Spendern nach neun bis 14 Tagen in Kultur ECFC-charakteristische Kolonien entwickelten, die über mehrere Passagen expandiert werden konnten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die isolierten Zellen eine endothelzelltypische kopfsteinpflasterförmige Morphologie aufwiesen. Mithilfe von immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Analysen wurde die positive Expression der endothelzellcharakteristischen Marker VE-Cadherin, vWF, CD31 und CD146 sowie des stammzelltypischen Markers CD34 festgestellt. Gleichzeitig konnten die hämatopoetischen Marker CD45, CD133 und CD14 im Durchflusszytometer nicht nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte die Analyse des Angiogenese-Assays, dass die isolierten Zellen netzwerkartige Strukturen auf einer dreidimensionalen Matrix ausbildeten, wodurch das angiogene Potential der Zellen bewiesen wurde. Anhand der oben genannten Eigenschaften konnten die isolierten Zellen eindeutig als ECFCs charakterisiert werden. Die in dieser Arbeit isolierten ECFCs stellen demnach eine leicht zugängliche, immunologisch neutrale und autologe Zellquelle zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen dar.

Neben der immunologischen Neutralität der Zellen müssen die angesiedelten Endothelzellen auch ihre funktionellen und adhäsiven Eigenschaften unter *in vivo* Strömungsbedingungen beibehalten. Daher wurde die Auswirkung verschiedener Scherstressprofile auf die Funktion

sowie Mechanosensitivität der isolierten ECFCs im Vergleich zu klassischen endothelialen Modellzellen aus der Literatur, den humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs), untersucht. Die ECFCs und HUVECs wurden über einen Zeitraum von 72 h unter quasi-statischen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), mittleren (5 dyn/cm^2) und hohen (20 dyn/cm^2) laminaren bzw. pulsatilen (1 Hz) Scherstressbedingungen kultiviert. Es sollte die Wirkung der verschiedenen Flusstärken sowie der Einfluss des physiologischen Pulses (1 Hz) auf die Zellmorphologie, Zellausrichtung und Zell-Zell-Verbindungen analysiert werden. Dabei erwies sich ein hoher Scherstress (20 dyn/cm^2) im Vergleich zu einem mittleren Scherstress (5 dyn/cm^2) als erforderlich, um in ECFCs eine Ausrichtung und Anordnung der Aktinfilamente und VE-Cadherine in Flussrichtung hervorzurufen. Zudem wurde anhand dichter Zell-Zell-Verbindungen gezeigt, dass ein pulsatiler hoher Scherstress (PC-HSS = 20 dyn/cm^2 ; 1 Hz) eine höhere Monolayerintegrität in ECFCs hervorrief als laminare Scherstressbedingungen. Weiterhin wurde in den isolierten ECFCs eine höhere Sensitivität gegenüber dynamischen Kultivierungsbedingungen im Vergleich zu HUVECs detektiert. Die Kultivierung unter PC HSS führte sowohl in ECFCs als auch in HUVECs zu einer signifikant erhöhten Genexpression des atheroprotektiven Markers Thrombomodulin. Da die Genexpression in ECFCs verstärkt ausgeprägt vorlag, wird die Annahme getroffen, dass ECFCs durch eine dynamische Kultivierung eine stärkere antithrombogene Wirkung entwickelten als ausgereifte Endothelzellen. Außerdem wurde die metabolische Aktivität der Zellen während der dynamischen Kultivierung durch Messung des Glukoseverbrauchs überwacht. Dabei zeigten ECFCs verglichen zu HUVECs mit zunehmendem Scherstress einen signifikant höheren Glukoseverbrauch. Dieser könnte auf den Einfluss des hohen Scherstress auf den Differenzierungszustand der unreifen ECFCs zurückzuführen sein.

Für die Endothelialisierung von arteriellen Bypasskonstrukten wird ein arterieller Phänotyp der verwendeten Endothelzellen bevorzugt eingesetzt, da dieser zu einer höheren Durchgängigkeitsrate nach Implantierung der Gefäßprothese führt (Jannati et al., 2019; Riess et al., 2017). Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit eine Vorkonditionierung unter einem hohen Scherstress zur arteriellen Differenzierung der unreifen ECFCs führte. Dafür wurden die ECFCs unter quasi-statischen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und dynamisch pulsatilen (20 dyn/cm^2 ; 1 Hz) Flussbedingungen kultiviert und anschließend anhand ihrer Morphologie, sowie zytoskelettalen Veränderungen mit adulten venösen Endothelzellen, humanen Nabelschnurveneendothelzellen (HUVECs), und adulten arteriellen Endothelzellen, humanen Aortenendothelzellen (HAECs) verglichen. Ferner wurden die Zellen auf mRNA-Ebene näher charakterisiert, um den Differenzierungs- und Thrombogenitätszustand unter den

verschiedenen Kultivierungsbedingungen zu bestimmen. Um eine Entzündungsreaktion nach Implantierung *in vitro* zu simulieren, wurden die Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) inkubiert. Dadurch sollte ein Verlust der antiinflammatorischen und antithrombogenen Eigenschaften der Zellen ausgelöst werden. Im Rahmen dieses Versuches wurden morphologische Ähnlichkeiten zwischen ECFCs und HAECs nach der Flusskultivierung detektiert. Gleichzeitig konnten signifikante Unterschiede zwischen dynamisch kultivierten ECFCs und HUVECs in Bezug auf die Orientierung und Ausrichtung der Zellen festgestellt werden. Während alle untersuchten Zelltypen ihre Rundheit nach der Flusskultivierung signifikant verringerten, zeigten nur HAECs und ECFCs signifikant in Flussrichtung ausgerichtete Zellen auf. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Vorkonditionierung von ECFCs unter Fluss eine Unterdrückung der atherogenen Marker *Tissue Factor* und VCAM1 induzierte. Gleichzeitig wurde eine Hochregulierung der antithrombotischen Gene KLF2, eNOS, Tie2 und Thrombomodulin selbst unter dem Einfluss des inflammatorischen Zytokins TNF- α ausgelöst. Zusammenfassend wurde in den ECFCs ein Genprofil induziert, das mehr Ähnlichkeiten zu einem arteriellen als einem venösen Phänotyp aufweist.

Im letzten Teil der Arbeit wurde eine Strategie zur Generierung autologer glatter Gefäßmuskelzellen entwickelt. Glatte Gefäßmuskelzellen befinden sich in der mittleren Schicht der bioartifizialen Gefäßprothese und sind aufgrund ihrer kontraktiven Eigenschaften für die Aufrechterhaltung des physiologischen Gefäßtonus sowie die Regulation kardiovaskulärer Funktionen verantwortlich. Reife Gefäßmuskelzellen weisen im Vergleich zu Vorläuferzellen allerdings ein vermindertes Proliferationsverhalten auf. Simper et al. zeigten, dass endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) durch den Einfluss des Wachstumsfaktors *platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) über ihre Differenzierungslinien hinaus in Gefäßmuskelzellen transdifferenziert werden können (Simper et al., 2002). Auf Basis der Studien von Simper et al. sollte untersucht werden, inwieweit die isolierten ECFCs die Fähigkeit besitzen, durch die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB in Gefäßmuskelzellähnliche Zellen zu transdifferenzieren. Dafür wurde der Einfluss verschiedener PDGF-BB-Konzentrationen (50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL) auf die Wachstumsfähigkeit und das Ausbilden Gefäßmuskelzellspezifischer Marker untersucht. Außerdem sollte eine Funktionsanalyse das Kontraktionspotenzial der konditionierten ECFCs ermitteln. Die Ergebnisse des letzten Kapitels deuten darauf hin, dass eine zunehmende PDGF-BB-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Verdopplungszeit der ECFCs ausübte. Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Kultivierung über vier Passagen mit 200 ng/mL PDGF-BB eine

signifikant höhere Genexpression der Gefäßmuskelzellähnlichen Marker α -SMA und Calponin hervorrief. Zudem zeigte die Analyse der Kontraktionsfähigkeit, dass ECFCs unter 200 ng/mL PDGF-BB sich nicht signifikant von glatten Gefäßmuskelzellen unterschieden. Durch die in diesem Kapitel untersuchten Ergebnisse wird angenommen, dass die Kultivierung unter 200 ng/mL PDGF-BB eine Transdifferenzierung der isolierten ECFCs in Gefäßmuskelzellähnliche Zellen induzierte. Dadurch ermöglicht sich ist eine nicht-invasive Generierung autologer Gefäßmuskelzellen zur Entwicklung einer mehrschichtigen bioartifiziellen Gefäßprothese.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich ein Konditionierungskonzept zur Endothelialisierung bioartifizieller Gefäßprothesen entwickelt werden. Dennoch sind weitere Versuche notwendig, um die Wechselwirkung der isolierten ECFCs auf einer dreidimensionalen Gerüststruktur zu untersuchen. In einer weiteren Promotionsarbeit wurde patienteneigenes Fibrinogen zur Beschichtung der künstlichen Gefäßstruktur isoliert (Heene, 2022), welches durch die enzymatische Reaktion mit Thrombin zu Fibrin ausgebildet wird. Dadurch soll die Adhäsion der Endothelzellen im Inneren der Gefäßprothese unterstützt werden (Blume et al., 2022). Zudem konnte der *Scaffold*-Fibrinkomplex bereits erfolgreich als Basisstruktur zur Vaskularisierung der äußeren Schicht der Gerüststruktur verwendet werden (Heene et al., 2021). Die in dieser Arbeit untersuchten dynamischen Bedingungen müssen in zukünftigen Arbeiten auf das am Institut für Technische Chemie sowie am Institut für Mikoelektronische Systeme der Leibniz Universität Hannover von Maschoff et al. entwickelte und von Stanislawski et al. optimierte Bioreaktorsystem übertragen werden (Maschoff et al., 2017; Stanislawski et al., 2020). Dabei dienen die in den Durchfluskkammern durchgeführten dynamischen Versuche als Basis für die Kultivierung auf einer dreidimensionalen *Scaffold*-Struktur (Blume et al., 2022; Kraus et al., 2022).

7 Anhang

In den folgenden Abschnitten werden alle zusätzlichen Daten und Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt sowie alle während dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden dokumentiert.

7.1 Zusätzliche Daten und Ergebnisse

7.1.1 Durchflusszytometrischer Nachweis endothelialer Marker

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der jeweiligen Spender sind in Abbildung 40, Abbildung 41, Abbildung 42 und Abbildung 43 dargestellt.

4SA

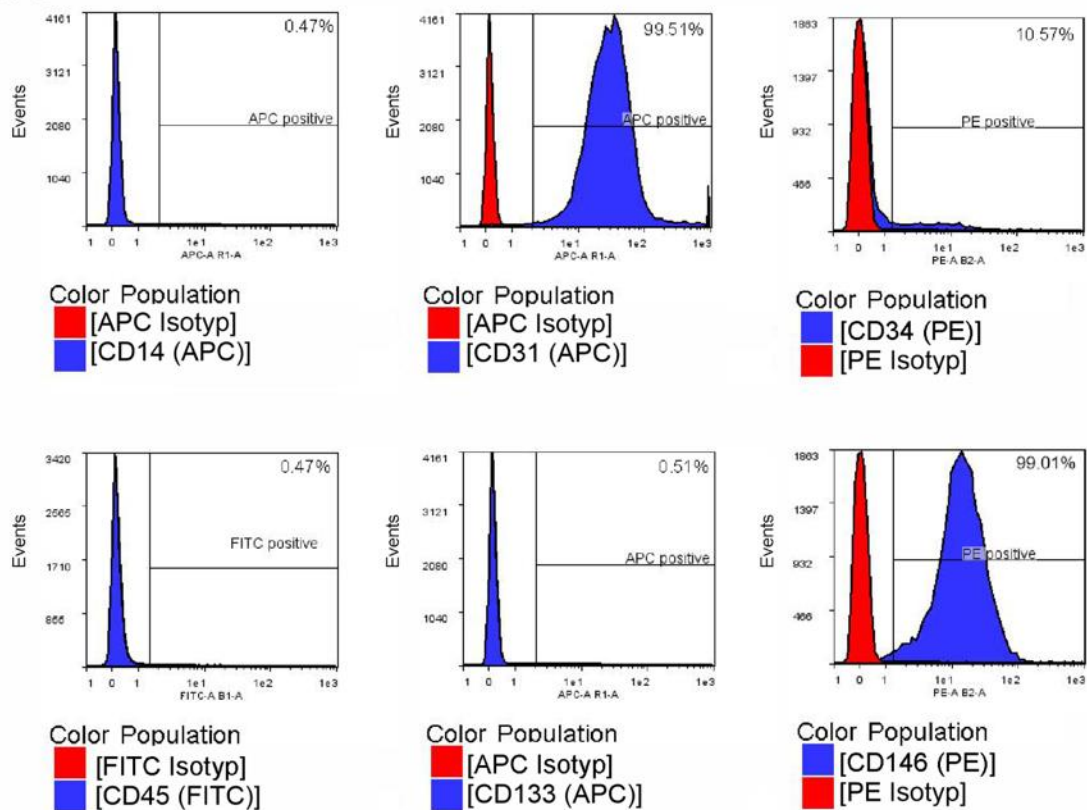


Abbildung 40: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des gepoolten Spendersets 4SA.

4SF

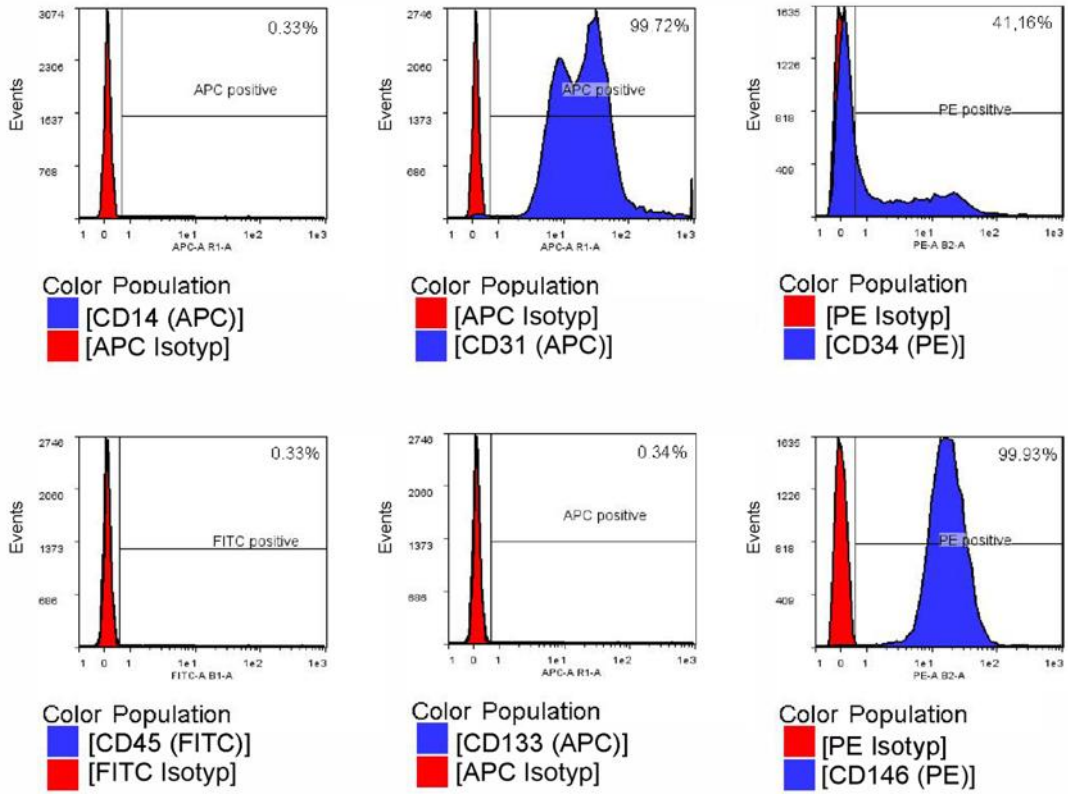


Abbildung 41: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des gepoolten Spendersets 4SF.

EC06

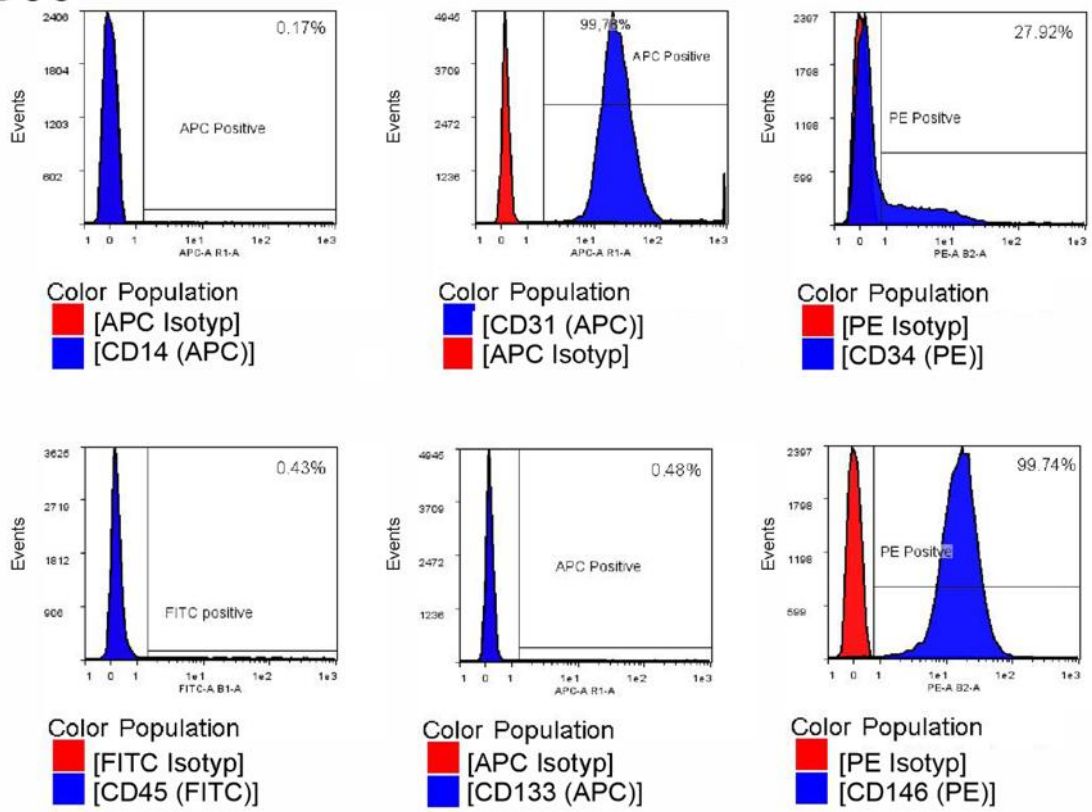


Abbildung 42: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des Spenders EC06.

EC09

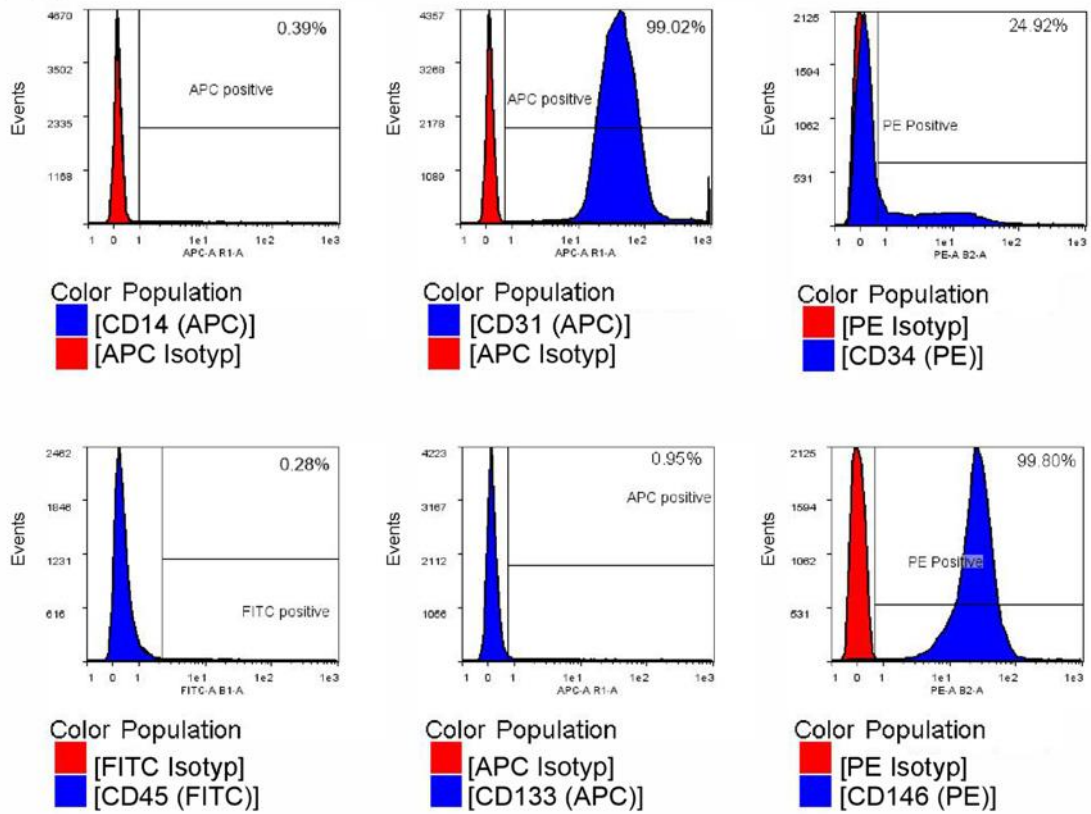


Abbildung 43: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des Spenders EC09.

7.1.2 Angiogenese-Assay

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Angiogenese-Assays der jeweiligen Spender in Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 47 und Abbildung 48 dargestellt.

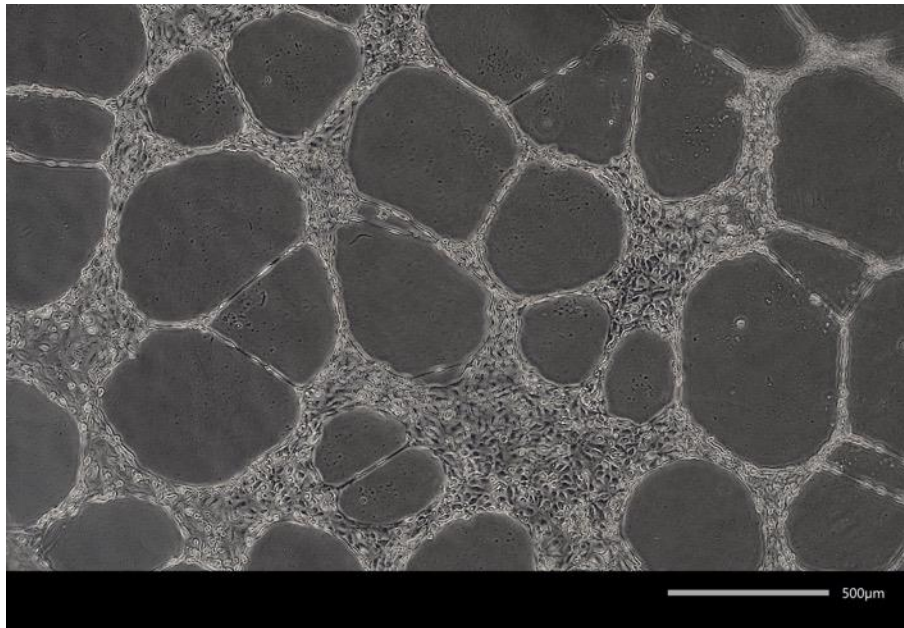


Abbildung 44: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spendersets 4SA nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.

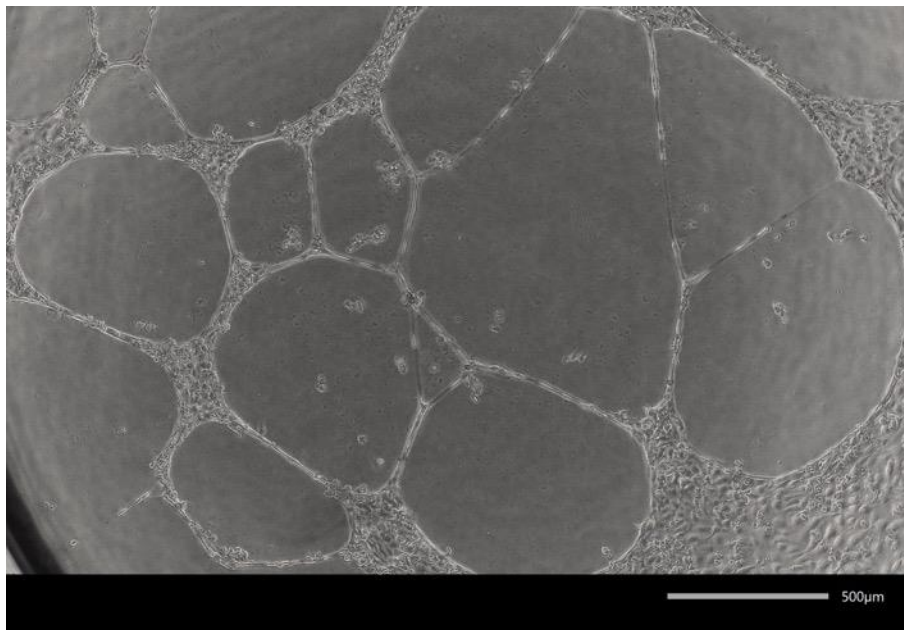


Abbildung 45: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spendersets 4SF nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.

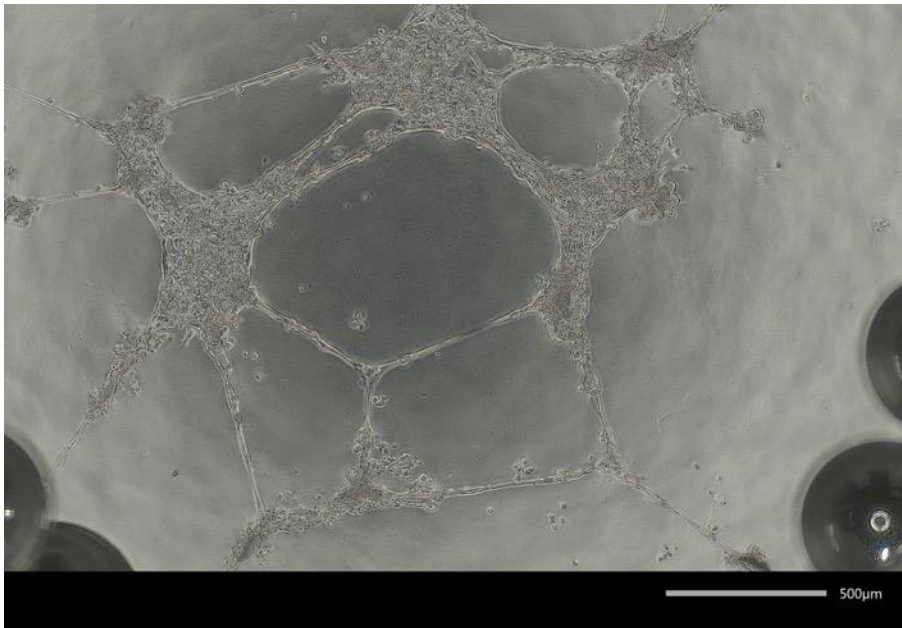


Abbildung 46: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC06 nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.

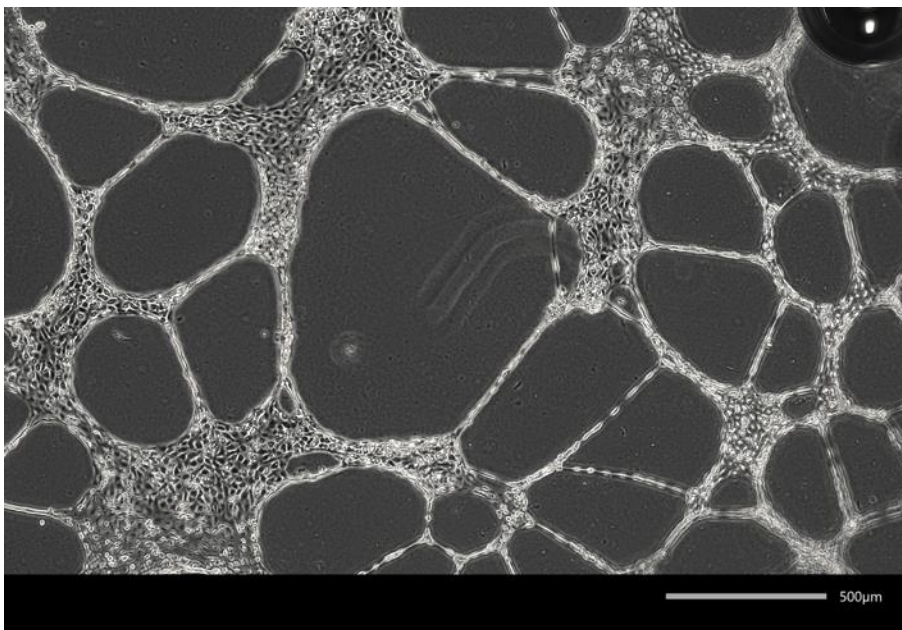


Abbildung 47: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC08 nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.

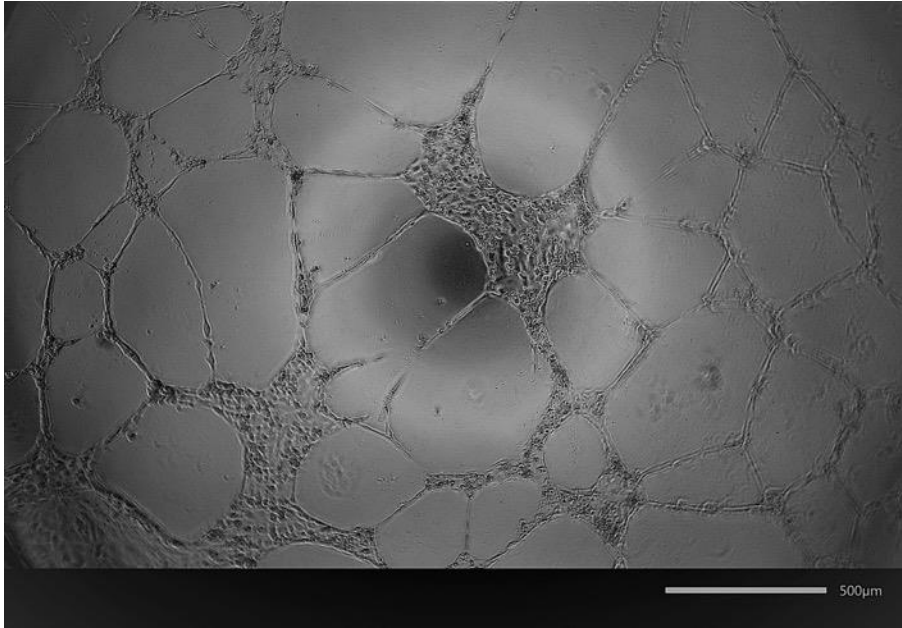


Abbildung 48: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC09 nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.

7.2 Material

In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Chemikalien, Puffer, Medien, Analysekits, Antikörper, Primer aufgelistet. Zudem wird eine Übersicht über alle eingesetzten Geräte und Verbrauchsmaterialien gegeben.

7.2.1 Chemikalien

5x Green GoTaq Reaktionspuffer	Promega GmbH,
Accutase	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Biocoll Trennlösung (1,077 g/mL)	Biochrom GmbH, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Carbachol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Cultrex® Basement Membrane Extract	AMS Biotechnology, Abingdon, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure (100 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol (99,8 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fibrinogen	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Fetales Kälberserum (FKS)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
GeneRule™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gentamycin	Biochrom GmbH, Berlin
Isopropanol 70 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lymphosep Trennlösung	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Platelet Derived Growth Factor BB</i> (PDGF-BB)	R&D Systems®, Minneapolis, USA
PowerUp™ SYBR® Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti-Safe GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS (99,9 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Trypan Blue	VWR International GmbH, Darmstadt

7.2.2 Puffer

FACS Puffer:	995 mL/L PBS, 2 mL/L EDTA, 5 g/L BSA
TAE-Puffer x 50:	242 g/L TRIS 57,1 mL/L Essigsäure (100 %), 100 mL/L 0,5 M EDTA, pH 8
Kyrokonservierungs-Endothelzellmedium:	70 % Endothelzellbasalmedium 20 % FKS 10 % DMSO
Kyrokonservierungs-Gefäßmuskelzellmedium:	70 % Gefäßmuskelzellbasalmedium 20 % FKS 10 % DMSO

7.2.3 Zellsysteme

Humane Nabelschnurvenenendothelzellen	Gibco, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Humane Aortenendothelzellen	Lonza, Köln
Humane glatte Gefäßmuskelzellen	Promocell, Heidelberg

7.2.4 Medien

Endothelzellmedium 2 (<i>Ready-to-use</i>)	Promocell, Heidelberg
Gefäßmuskelzellmedium 2 (<i>Ready-to-use</i>)	Promocell, Heidelberg

7.2.5 Analyse-Kits

NucleoSpin® RNA, Mini kit for RNA purification	Machery Nagel, Düren
Revert AidHMinus cDNA Synthesis	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

7.2.6 Antikörper

Anti- α -SMA-Antikörper (Maus)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD31-Antikörper (Kaninchen)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-VE-Cadherin-Antikörper (Kaninchen)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-vWF-Antikörper (Kaninchen)	Abcam, Cambridge, UK
APC-Isotyp-IgG	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD14-APC	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD31-APC	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD34-PE	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD45-FITC	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD133-APC	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD146-PE	Miltenyi, Bergisch Gladbach
FITC-Isotyp-IgG	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ziege Anti-Kaninchen IgG H&L Alexa Fluor 488	Abcam, Cambridge, UK
Ziege Anti-Kaninchen IgG H&L Alexa Fluor 555	Abcam, Cambridge, UK
Ziege Anti-Maus IgG H&L Alexa Fluor 555i	Abcam, Cambridge, UK
Phalloidin-iFluor 555 Reagent	Abcam, Cambridge, UK

7.2.7 Primer

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Primer.

Gen	Primersequenz	Hybridisierungstemperatur (°C)	Produktlänge (bp)
α -SMA	for: GAT GGT GGG AAT GGG ACA AA rev: GCC ATG TTC TAT CGG GTA CTT C	55,6	94
β -Actin	for: ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA rev: GGG CCG GAC TCG TCA TAC TC	61,6	176
Calponin	for: GTT TGA GAA CAC CAA CCA TAC AC rev: CAC GTT CAC CTT GTT TCC TTT C	59,4	88
CD31	for: CCC ACT GAA GAC GTC GAA TAC rev: CAC CCT CAG AAC CTC ACT TAAC	59,4	81
CD34	for: GCG CTT TGC TTG GTG AGT TTG rev: GCC TCA TTG CCA TGT TGA GAC AC	61,6	191
eNOS	for: CAG CAA CGC TAC CAC GAA GA rev: TGC GTA TGC GGC TTG TCA	61,6	70

GAPDH	for: GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA rev: GTG GTC GTT GAG GGC AAT G	63,7	79
KDR	for: TGG GAA CCG GAA CCT CAC TAT C rev: GTC TTT TCC TGG GCA CCT TCT ATT	62,7	132
KLF2	for: GCA AGA CCT ACA CCA AGA GTT CG rev: CAT GTG CCG TTT CAT GTG C	61,6	227
NOTCH4	for: AGC TCT GGA AAG AGG GTT TAA G rev: CTC CTG TGG CCT GTC TTA TTT	59,4	78
Thrombomodulin	for: GCC CAT GGG AGC TGG TTA GA rev: GGC CTG ACT TGG CCT GCT AC	60,7	190
Tie2	for: TCC GCT AGT TAC TCA AGA rev: GAA CTC GCC CTT CAC AGA AAT AA	60,5	110
Tissue Factor	for: CCC GAA CAG TTA ACC GGA AGA rev: GGA GTT CTC CTT CCA GCT CTG C	61,6	191
VCAM1	for: GGC GCC TAT TAC CAT CCG AAA rev: GAG CAC GAG AAG CTC AGG AGA A	61,6	157

7.2.8 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG
Angiogenesis μ -slide	ibidi GmbH, München
Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH + Co. KG
Einmal-Injektions-Kanülen	B. Braun Melsungen AG
Einmalpipetten (2, 5, 10, 35, 50 mL)	Sarstedt AG + Co. KG
Filter-Reservoir-Set (10, 50 mL)	ibidi GmbH, München
Glaspasteurpipetten (145 mm, 230 mm)	Brand GmbH + Co. KG
Leucosep-Röhrchen (50 mL)	Greiner Bio-One GmbH
μ -slide ^{0,4} I Luer (uncoated)	ibidi GmbH, München
Mikrotiterplatten (96-Well, Vollrand)	Sarstedt AG + Co. KG
Pipettenspitzen (10, 200, 100 μ L)	Brand GmbH + Co. KG
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt AG + Co. KG
Reaktionsgefäße (5 mL)	Eppendorf
Spritzen (10 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt AG + Co. KG
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Sarstedt AG + Co. KG
Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL)	Sarstedt AG + Co. KG

7.2.9 Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Abzug	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH + Co. KG	
Agarosegel-Elektrophorese-System	Thermo Scientific	
Autoklav	Systec GmbH	DX150 DX65
Brutschrank	Thermo Scientific	Fisher HERAcell™ 150i
Elektronische Pipettierhilfe	Fisher Scientific AG	
Feinwaage	Sartorius AG	Entris®
Gefrierbehälter	Nalgene™	Cryo
Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH	LGex 3410 MediLine
Geschirrspüler	Miele + Cie. KG	G 7883 CD
ibidi Pump System Qud mit Perfusion Set (grün-gelb, rot)		ibidi GmbH, München
Inkubator-Mikroskop	Etaluma™	Lumascop 560
Invers-Mikroskop	Olympus	CKX53
Invers-Mikroskop	Olympus	IX83
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH	LKexv 3910 MediLine
Mikroplatten-Leser	Molecular Devices, LLC	SpectraMax® i3x
Pipetten: 10, 20, 100, 200, 1000 µL	Brand GmbH + Co. KG	Mikroliterpipetten
Pipettierroboter	Eppendorf	epMotion 5073
Pumpe	Faust Laborbedarf AG	Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control G
Pumpe	Integra	Vacusafer

qPCR Cycler	BIO RAD	CFX384 TM	Real-Time Systeme
		C1000 Touch TM	Thermal Cycler
qPCR Cycler	Roche	Light Cycler 480	
Reinstwasser-Entnahmeeinheit	Merck KGaA	Q-POD Milli-Q	
Schüttelgerät	Heidolph	Rotamax 120	
Sterilbank	Thermo Scientific Inc.	Fisher Safe 2020	
Thermal Cycler	Bioer Technology	Life ECO	
Vortex	Velp [®] Scientifica	ZX4	
Waage	Scout Pro	Ohaus TM	
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG	WNB 22	
Zählkammer	Brand GmbH + Co. KG	BLAUBRAND Neubauer	
Zentrifuge	Thermo Scientific Inc-	Fisher Heraeus TM Megafuge TM 8	
Zentrifuge	VWR GmbH	International Micro Star 17R	
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5804 R	

7.3 Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die angewandten Methoden näher beschrieben. Dabei werden zunächst die Grundlagen der Zellkultivierung (7.3.1) erklärt. Anschließend erfolgt die Beschreibung der in dieser Arbeit vorgestellten Versuche. Dazu zählen die Isolation und Charakterisierung von koloniebildenden Endothelzellen (ECFCs) (7.3.2). Ferner folgt die Beschreibung der dynamischen Kultivierungsversuche in Durchflusskammern (7.3.3) sowie der Gefäßmuskelzell-Differenzierungsversuche (7.3.4). Abschließend werden die Methoden der Zellfärbung (7.3.5) und statistischen Auswertung (7.3.6) beschrieben.

7.3.1 Grundlagen der Zellkulturtechnik

7.3.1.1 Revitalisierung der Primärzellen

Die in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagerten Primärzellen (ECFCs, HUVECs, HAECs, SMCs) werden nach Entnahme aus dem Kryotank auf Eis transportiert und sofort in einem Wasserbad bei 37°C für einige min durch leichtes Schwenken des Kryoröhrchens aufgetaut. Die jeweilige Zellsuspension wird anschließend in eine Zellkulturflasche mit bereits vorgelegtem 37°C-warmen Medium (12 mL je T75-Flasche bzw. 25 mL je T175-Flasche) überführt. Durch leichtes Schwenken der Zellkulturflasche wird dabei die Zellsuspension gleichmäßig auf der Wachstumsoberfläche verteilt. Die Zellen werden im Anschluss bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 48 h, in dem das Medium vorsichtig aus der Zellkulturflasche abgesaugt und durch die gleiche Menge an neuem 37°C warmen Medium ausgetauscht wird. Bei Erreichen einer 80-90 prozentigen Konfluenz werden die Zellen von der Wachstumsoberfläche abgelöst, um anschließend in eine neue Zellkulturflasche überführt zu werden. Alle Endothelzelltypen werden in *Endothelial Cell Growth Medium 2* (EGM-2) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 0,5 % Gentamycin kultiviert. Die glatten Gefäßmuskelzellen aus Kapitel 4.4 werden in Gefäßmuskelzellmedium (*Smooth Muscle Cell Growth Medium 2*) mit 10 % FKS und 0,5 % Gentamycin kultiviert.

7.3.1.2 Passagieren der Primärzellen

Das Ablösen der Zellen, auch Passagieren genannt, erfolgt nach circa 4-7 Tagen in Kultur mit Hilfe einer Lösung aus proteolytischen Enzymen (Accutase). Zunächst werden die Zellen mit warmem 1 x PBS gewaschen, um lösliche Proteine der Zelloberfläche zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit Accutase (3 mL je T75-Flasche bzw. 4 mL je T175-Flasche) für 5 min inkubiert um die Peptidbindungen der Zell-Zell- und Zell-Oberflächenkontakte zu hydrolisieren. Die Ablösung der Zellen wird eine phasenkontrastmikroskopische Kontrolle überprüft. Die enzymatische Reaktion wird daraufhin durch die Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium gestoppt (4 mL je T75-Flasche und 6 mL je T175-Flasche). Die Zellsuspension wird in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen und das zentrifugierte Zellpellet in einer definierten Menge an Kulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zelldichte werden 20 µL Zellsuspension mit 20 µL Trypanblau vermischt und in eine Neubauer Zählkammer überführt. Dabei werden 10 µL des Zell-Trypanblau-Gemischs

auf den Mittelsteg der Kammer pipettiert und die Zellen in den 4 Großquadraten ausgezählt, um mithilfe des Mittelwerts die Gesamtzellzahl der Zellsuspension zu berechnen. Dafür wird der Zellzahl-Mittelwert aufgrund der Trypanblau-Verdünnung mit dem Faktor 2 und Faktor 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu bestimmen.

7.3.1.3 Kryokonservierung der Primärzellen

Zur Kryokonservierung der jeweiligen Endothelzelltypen werden die Zellen wie oben beschrieben aus der Zellkulturflasche abgelöst, die Zellzahl bestimmt und anschließend in vorbereitetem gekühltem (4°C) DMSO-haltigem Kryomedium resuspendiert und in einer Zelldichte von 10^6 Zellen pro mL Kryomedium je Kryoröhrchen pipettiert. Anschließend werden die Kryoröhrchen in ein Kryo-Einfriergerät (*Mr. Frosty*) positioniert und für 24 h bei -80°C eingefroren. Darauf folgt die Langzeitlagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

7.3.2 Isolation und Charakterisierung von endothelialen koloniebildenden Zellen

7.3.2.1 Isolierung und Kultivierung von ECFCs

Zur Vorbereitung der Isolation werden pro Spender zwei 50 ml Reaktionsgefäße (Falcons) und zwei Leucosep-Röhrchen (50 ml) bereitgestellt. Es wird pro Spender ein Restblutring (bereitgestellt vom Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover) aufgearbeitet. Der Restblutring wird am unteren Ende des Trichters (Abbildung 49-(1)) durch einen Schnitt im Röhrchen geöffnet (Abbildung 49-a) und der Trichter anschließend auf dem Falcon befestigt, um darin das Blut aufzufangen.

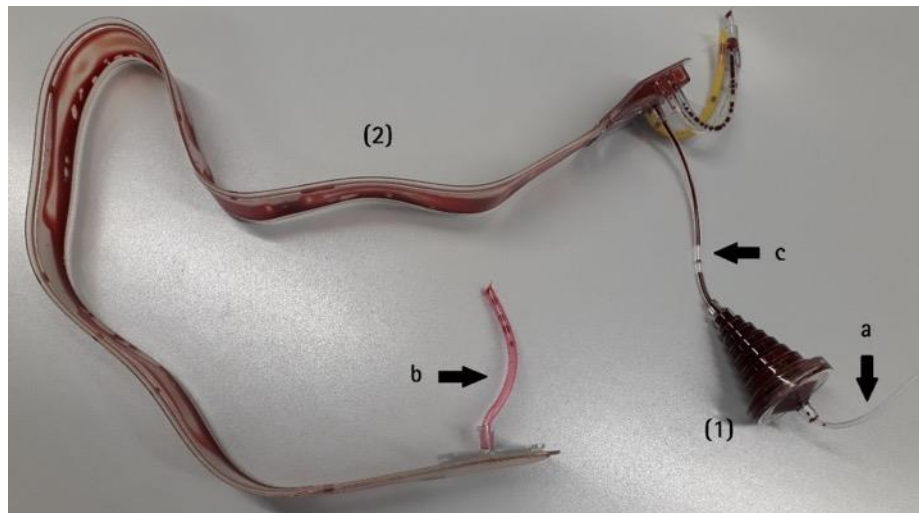


Abbildung 49: Schematische Darstellung eines Restblutrings. (1): Trichter; (2): Schlauch; a, b und c: Schnittpositionen; (entnommen aus Zerdali, 2019).

Gleichzeitig wird das untere Schlauchende des Restblutrings angeschnitten (Abbildung 49-b), um die Entleerung durch Ausstreichen und -drücken des Restblutrings (Abbildung 49-2) zu vereinfachen. Anschließend wird das obere Schlauchende des Trichters (Abbildung 49-c) vom Restblutrings getrennt und mit Hilfe einer Einmal-Injektionskanüle und Spritze mit 20 mL PBS durchspült. Das Blut-PBS-Gemisch wird mit PBS auf 45 mL aufgefüllt. Parallel werden die beiden 50 mL-Leucosep-Röhrchen mit je 16 mL Dichtegradientenmedium vorgelegt und für 1 min bei 1000 g zentrifugiert, so dass das Dichtegradientenmedium unterhalb der Filter-Trennscheibe vorliegt. Überschüssiges Medium wird anschließend verworfen. Daraufhin werden je Leucosep-Röhrchen 20-25 mL Blut-PBS-Gemisch auf die Filter-Trennscheibe pipettiert und für 10 min bei 1000 g (ohne Bremse) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wird das Blut in verschiedene Phasen aufgetrennt. Die mononukleären Zellen (MNCs) befinden sich in der Interphase, die durch den schwarzen Pfeil in Abbildung 50 gekennzeichnet ist. Daraufhin wird die Interphase je Leucosep-Röhrchen vorsichtig pipettiert und gemeinsam in 20 mL PBS, vorgelegt in einem neuen 50-mL-Falcon, überführt. Darauf folgt ein Zentrifugieren des Falcons für 10 min bei 250 g. Danach wird der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet zur Erythrozyten-Lyse zweimal hintereinander in je 7 mL 1,3 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und wieder bei 250 g für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird daraufhin dreimal hintereinander durch Resuspendieren in neuem PBS (20 mL) und anschließender Zentrifugation (10 min bei 250 g) gewaschen.

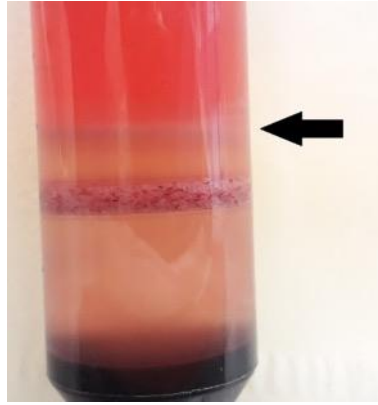


Abbildung 50: Lokalisation der Interphase im Leucosep-Röhrchen nach der Zentrifugation. (entnommen aus Zerdali, 2019).

Anschließend wird das Zellpellet in 10 mL 37 °C warmem EGM-2 resuspendiert und mithilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Zum Poolen der Spender werden die Zellpellets von 4 Spendern jeweils in 2,5 mL vorgewärmtem EGM-2 resuspendiert und gemeinsam in ein neues 50 mL Falcon überführt. Die Auszählung der Gesamtzellzahl erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie für Einzelspender unter der Anwendung der Neubauer-Zählkammer. Die Zellen der jeweiligen Spendersets werden in einer Zelldichte von $22,1 \pm 7,2 \cdot 10^6$ Zellen/cm² in vorbereiteten T75-Flaschen ausplattiert. Zur Kultivierung eines einzelnen Spenders werden 5 mL 37 °C warmes EGM-2 in eine T75-Flasche vorgelegt und die Einzelspender-Zellsuspension hinzugefügt. Die Kultivierung der gepoolten Spendersets erfolgt in vier gesonderten T75-Flaschen. Dafür werden 12,5 mL vorgewärmtes EGM-2 je T75-Flasche vorgelegt und mit 2,5 mL der gepoolten Zellsuspension versehen.

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert und alle 48 h mit frischem EGM-2 versorgt. Dafür wird das Medium mithilfe einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 10 mL warmem PBS gewaschen. Anschließend werden 12 mL frisches EGM-2 je T75-Flasche hinzugefügt. Nach 7-9 Tagen werden die T75-Flaschen mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops auf das Vorhandensein endothelzellförmiger Kolonien untersucht und dokumentiert. Erreicht eine Kolonie eine Zellzahl von mehr als 2000 Zellen werden die Zellen der gesamten T75-Flasche wie in Kapitel 7.3.1.2 beschrieben passagiert. Die Zellen werden ab Passage 1 gemäß Tabelle 12 in neue Zellkulturgefäße in frischem EGM-2 ausplattiert und bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ im Brutschrank inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgt alle 48 h.

Die Zellen werden bis zum Erreichen einer Zellzahl von mindestens 10⁶ Zellen weiterkultiviert und anschließend für weitere Versuche kryokonserviert.

Tabelle 12: Ausplattierte Zellzahl je Passage.

Passage	Zellzahl/cm ²
1	8000
2	10000
≥3	6666,67

7.3.2.2 Charakterisierung der ECFCs

7.3.2.2.1 Bestimmung der Verdopplungszeit

Für die Berechnung der Verdopplungszeit (engl.: *Population Doubling Time (PDT)*) werden die Zellen nach 7.3.1.1 und 7.3.1.2 ausgesät und passagiert. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgt die Berechnung der PDT mit Hilfe der folgenden Formeln:

$$N_d = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{\ln 2}$$

$$T_d = \frac{\Delta t}{N_d}$$

N_d Verdopplungsanzahl über einen bestimmten Zeitraum

X_0 Zellzahl an t_0

X Zellzahl nach Δt

T_d *PDT*

Δt Zeitraum der Kultivierung

7.3.2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die Expression charakteristischer endothelialer Marker wird mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Durch die durchflusszytometrische Analyse können die Proteinexpressionen einzelner Zellen quantitativ bestimmt werden, nachdem diese mit einem fluorochrom-markierten, Antigen-spezifischen Antikörper gefärbt wurden.

Die Zellen werden nach der in 7.3.1.2 beschriebenen Methode abgelöst und anschließend die Zellzahl bestimmt. Je 200.000 Zellen werden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben, zentrifugiert und in kaltem Inkubationspuffer suspendiert und anschließend mit dem jeweiligen spezifisch-bindenden Antikörper nach Herstellangaben (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) vermengt. Die Inkubationspuffer- und Antikörpervolumen entsprechen den von den Herstellern empfohlenen Antikörpermengen und sind in Tabelle 13 angegeben. Als Fluorochrome werden Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) eingesetzt. Als Negativkontrollen werden *mouse* IgG Isotypkontrollen verwendet. Die Zellen werden für 10 min bei 4 °C inkubiert, zweimal mit jeweils 500 µL Inkubationspuffer gewaschen und abschließend in 300 µL Inkubationspuffer suspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension auf ein Zellsieb gegeben und die gefärbten Zellen mit dem *MACSQuant*[®]-Analyser vermessen.

Tabelle 13: Herstellerangaben zu Antikörper- und Inkubationspuffervolumen je Färbung.

Antikörper	Fluorochrom	Antikörpervolumen (µL)	Inkubationspuffervolumen (µL)
Isotyp IgG	PE	2	98
Isotyp IgG	APC	2	98
Isotyp IgG	FITC	2	98
CD31	APC	10	100
CD34	PE	2	98
CD133	APC	2	98
CD45	FITC	2	98
CD14	APC	2	98
CD146	PE	2	98

Die Signale der Vorwärtsstreuung (*forward scatter*: FSC; Zellgröße) werden gegen die Signale der Seitwärtsstreuung (*side scatter*: SSC; Granularität) in einem Dotplot-Diagramm dargestellt. Jede Zelle ist durch einen Punkt in dem Diagramm gekennzeichnet. Die Achseneinstellungen werden so gewählt, dass die Mehrheit der Zellen im rechten oberen Bereich des Dotplots sichtbar wird. Für diese Einstellung werden ungefärbte Zellen verwendet. Parallel wird die Zellzahl (*Events*) gegen die logarithmische Fluoreszenzintensität in einem Histogramm aufgetragen. Hierbei steigt die detektierte Signalintensität mit zunehmender gebundener Antikörpermenge an. Als Negativkontrollen werden zunächst die mit der Isotypkontrolle inkubierten Zellen und anschließend die Antikörper-gefärbten Zellen vermessen. Die Flussrate wird dabei so eingestellt, dass 50.000 Zellen detektiert werden. Die gemessenen Daten werden daraufhin mit der FlowLogic-Software ausgewertet.

7.3.2.2.3 Angiogenese Assay

Als weiteres Charakteristikum der ECFCs zählt die Fähigkeit, netzwerkartige Strukturen auf einer dreidimensionalen Matrix auszubilden. Dafür wird ein Angiogenese-Assay gemäß des Herstellerprotokolls (ibidi, München, Deutschland) durchgeführt. Als dreidimensionale Matrix

wird das bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte *Cultrex*[®] *Basalemembran Extrakt* (BME) aus der *Engelbreth-Holm-Swarm* Zelllinie auf Eis aufgetaut und anschließend je $10\text{ }\mu\text{L}$ des Extrakts in die Vertiefungen des gekühlten *ibidi* μ -slides *Angionesis* pipettiert. Zur Polymerisation des Extraktes werden die μ -slides für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Danach werden je Vertiefung $1\cdot 10^5$ ECFCs in je $50\text{ }\mu\text{L}$ EGM-2 auf das auspolymerisierte Extrakt gegeben. Die μ slides werden für 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach 6 h und 24 h wird die Ausbildung netzwerkartiger Strukturen mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahmen an einem Phasenkontrastmikroskop analysiert. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgt mit der *ImageJ*-Software.

7.3.3 Dynamische Kultivierung der Zellen in Durchfluskkammern

7.3.3.1 Beschichtung, Besiedlung und Kultivierung in μ -slides

Für die dynamische Kultivierung der Zellen werden unbeschichtete Durchfluskkammern, μ slides^{0,4} *I Luer* mit einer Kanalhöhe von 0,4 mm, verwendet. Die Besiedlung der Durchfluskkammern erfolgt nach Herstellerangaben (*ibidi*, München, Deutschland). Um eine optimale Zelladhäsion zu begünstigen, werden die Durchfluskkammern zunächst mit je $100\text{ }\mu\text{L}$ Fibrinogenlösung ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$ in $0,15\text{ M NaCl}$) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Durchfluskkammern dreimal mit $200\text{ }\mu\text{L}$ $0,15\text{ M NaCl}$ und dreimal $200\text{ }\mu\text{L}$ EGM-2 gespült. Daraufhin werden je $100\text{ }\mu\text{L}$ einer Zellsuspension aus $1\cdot 10^6$ Zellen/mL EGM-2 in den Kanal gegeben und für 4 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und 21 % O_2 im Brutschrank inkubiert. Nach dieser primären Adhäsionsphase unter statischen Bedingungen wird das Medium in den Durchfluskkammern gewechselt und die Kanäle mit je $60\text{ }\mu\text{L}$ EGM-2 gefüllt, bevor die Durchfluskkammern an das *ibidi*-Schlauchsystem angeschlossen werden. Die ECFCs und HUVECs werden für die Analysen aus Kapitel 4.2 für 72 h unter drei verschiedenen Scherstressbedingungen kultiviert: $0,5\text{ dyn/cm}^2$, 5 dyn/cm^2 und 20 dyn/cm^2 . Die Zellen werden sowohl unter laminaren als auch pulsatilen Bedingungen konditioniert. Dafür wird ein Puls in Höhe von 1 Hz eingestellt. Für die Analysen aus Kapitel 4.3 werden die ECFCs, HAECs und HUVECs für 24 h statisch und dynamisch konditioniert. Die Zellen werden sowohl mit als auch ohne $\text{TNF-}\alpha$ kultiviert. Dafür wird 6 h vor Ende des Versuchs eine Konzentration von 10 ng/mL $\text{TNF-}\alpha$ in die Mediumreservoirs des Pumpsystem gegeben.

Die folgenden Angaben gelten sowohl für die Versuche aus Kapitel 4.2 als auch aus Kapitel 4.3. Für die Untersuchungen aus beiden Kapiteln (4.2 und 4.3) wurde die gleiche zeitliche

Abfolge zur Erhöhung der Scherspannungen angewandt (Tabelle 14). Es werden je Kultivierung 5 Durchflusskammern hintereinandergeschaltet. Vier Durchflusskammern werden für Genexpressionsanalysen und eine Durchflusskammer für Fluoreszenzfärbungen verwendet. Dafür werden die Zellen in den Durchflusskammern nach Kultivierung fixiert. Über den gesamten Verlauf der Kultivierung werden *in situ* Mikroskopie-Aufnahmen mittels LumaScope-Mikroskop gemacht.

Tabelle 14: Schrittweise Scherstresssteigerung.

Scherstress (dyn/cm ²)	Dauer (min)
0,5	45
1,5	45
2,5	45
3,5	45
5	45
7,5	30
10	30
12,5	30
15	30
17,5	30
20	bis Versuchsende

7.3.3.2 Analyse der Rundheit und des Achsenverhältnisses

Zur Auswertung der Rundheit und Achsenverhältnisse der flusskultivierten Zellen werden die Immunfluoreszenzaufnahmen der VE-Cadherin-gefärbten Zellen verwendet. Die grün hervorgehobenen Zell-Zell-Kontakte werden mithilfe der CorelDraw-Software nach Kontrast- und Helligkeitsanpassungen markiert und der Hintergrund entfernt. Anschließend werden die Zellfläche (A), längste (l_{max}) und kürzeste (l_{min}) Sehnenlänge der einzelnen Zellen mithilfe der *ImageJ*-Software berechnet. Die Ausrichtung der Zellen wird anhand der Ausrichtung der längsten Sehnenlänge relativ zur Flussrichtung (von links nach rechts) mittels *ImageJ*-Software analysiert. Unter Anwendung der Formel nach Brown et al. wird die Rundheit wie folgt bestimmt:

$$Rundheit = \frac{4A}{\pi l_{max}^2}$$

Das Achsenverhältnis gibt Auskunft über die Elongation der Zellen nach Flusskultivierung. Sie wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Achsenverhältnis} = \frac{l_{max}}{l_{min}}$$

7.3.3.3 Metabolismus und Expressionsverhalten der konditionierten Zellen

7.3.3.3.1 Glukose-Verbrauch

Für die Analyse des Glukoseverbrauchs der Zellen werden 1 mL Medium nach der quasi-statischen bzw. dynamischen Kultivierung aus den Mediumreservoirs entnommen und mit Hilfe des *Bioprocess Analyzers* vermessen. Gleichzeitig wird die Glukosekonzentration vor Beginn der Kultivierung als Referenz analysiert. Für die Glukosekonzentrationsbestimmung werden je 2 µL der Proben nach Herstellerangaben mit den GLC2B-Angaben vermessen.

7.3.3.3.2 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wird das Medium aus den Durchflusskammern abgesaugt und anschließend dreimal mit je 200 µL warmem PBS gewaschen. Danach werden je Durchflusskammer 400 µL Accutase in den Kanal gegeben und die Zellen für 2-3 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂) inkubiert und anschließend die Enzymreaktion mit 400 µL Medium gestoppt. Die Zellsuspension wird aus den Durchflusskammern für 10 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA-Isolierung erfolgt mittels NucleoSpin RNA Mini Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) und wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA-Pellets werden in 40 µL RNase-freiem H₂O suspendiert und die RNA-Konzentration mit Hilfe des Mikroplatten-Lesegeräts SpectraMac[®] i3x (Molecular Devices, San José, USA) bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung werden die RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

7.3.3.3.3 cDNA-Synthese

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) müssen die RNA-Proben in cDNA transkribiert werden. Dafür werden 1-2 µg RNA (das zu verwendende Volumen wird anhand der RNA-Konzentration je Probe bestimmt) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mittels RevertAid H Minus First strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die synthetisierten cDNA-Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.3.3.3.4 Primerdesign

Die für die q-RT-PCR verwendeten Primerpaare (*forward und reverse*) werden mit dem *PrimerQuestTool* (Integrated DNA Technologies (IDT), USA) und den Optionen *qPCR*, *2 Primer*, *Intercalating DNA* designt. Die designten Primer werden durch Thermo Fischer Scientific Inc. (UK) synthetisiert. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 11 aufgelistet.

7.3.3.3.5 Gradienten Polymerase Chain Reaction

Um die Hybridisierungstemperaturen der designten Primer zu optimieren, wird eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dafür werden die cDNA-Proben einer Mischprobe (quasi-statisch und dynamisch kultivierte ECFCs, HAECs und HUVECs sowie statisch kultivierte SMCs wie in 7.3.3.1 beschrieben) verwendet. Die lyophilisierten Primer werden in RNase-freiem H₂O in einer Konzentration von 100 pmol/μL gelöst. Je 10 μL *forward* und *reverse* Primer werden mit 80 μL H₂O vermischt. Für die Gradienten-PCR werden 5 μL PowerUp SYBR Master Mix, 0,2 μL Primer-Mix, 2,8 μL RNase-freies H₂O und 2 μL cDNA vermischt. Daraufhin wird ein Temperatur-Gradient von 5 °C zwischen der ersten und letzten Probe (60 °C-65 °C) in einem Gradienten-Thermocycler eingestellt. Anschließend erfolgt die Gradienten-PCR unter Abfolge der folgenden Angaben. Zunächst erfolgt die Denaturierung der Proben bei 95 °C für 2 min. Anschließend folgen 40 Zyklen aus drei Temperaturschritten: die Denaturierung bei 95 °C für 20 sec, die Hybridisierung bei den zuvor definierten Temperaturen für 30 sec und zuletzt die Bildung des komplementären Strangs bei 70 °C für 10 sec. Abschließend wird eine Temperatur von 70 °C für 2 min zur Vervollständigung der Stränge eingestellt. Die Proben werden daraufhin auf 4 °C heruntergekühlt. Die optimale Hybridisierungstemperatur wird durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein Agarosegel mittels Gelelektrophorese überprüft.

7.3.3.3.6 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden die PCR-Produkte in einem elektrischen Feld nach Ladung und Größe aufgetrennt. Das 1 %ige Agarosegel wird durch Vermischung von 1 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer für 2 min bei 600 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht. Die abgekühlte Lösung wird mit 5 μL Roti-Safe GelStain vermischt und in eine mit 12 Taschen vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach 30minütiger Polymerisation wird die Agaroselösung in die Gelelektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer aufgefüllt. Es werden je 2 μL 5x GoTag Green Puffer mit je 10 μL Probe vermennt und in die Taschen der Kammer aufgetragen. Als Größenstandards werden 4 μL eines 100 bp DNA *Ladders* mit 4 μL 5x GoTaq Green Puffer auf das Gel gegeben. Die Elektrophorese wird für 45 min bei 100 V durchgeführt.

Darauf folgt eine Analyse der DNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht sowie anschließende Bildaufnahmen.

7.3.3.3.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase Chain Reaction

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) werden die DNA-Konzentrationen in Echtzeit quantifiziert. Dabei lagert sich während der PCR der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]Green in die vervielfältigten DNA-Doppelstränge ein und nimmt proportional zur DNA-Menge zu. Mit Hilfe der Fluoreszenzsignalmessung ist eine Quantifizierung der DNA-Menge möglich. Für die qRT-PCR werden pro Reaktionsansatz folgende Reagenzien eingesetzt: 5 µL PowerUp SYBR Master Mix, 0,2 µL Primer-Mix, 2,8 µL RNase-freies H₂O und 2 µL cDNA. Darauf folgt die Durchführung der qRT-PCR an einem qPCR *Cycler* der Firma Biorad bzw. Roche. Zunächst wird die cDNA bei 95 °C für 2 min denaturiert. Anschließend folgen 40 Zyklen aus drei Temperaturschritten: die Denaturierung der cDNA bei 95 °C für 20 sec, die Hybridisierung bei den zuvor definierten Temperaturen (siehe Tabelle 11) für 30 sec und zuletzt die Verlängerung der neuen DNA-Stränge bei 70 °C für 10 sec. Abschließend wird eine Temperatur von 70 °C für 2 min zur abschließenden Verlängerung aller DNA-Stränge durchgeführt. Als Negativkontrolle werden Proben ohne cDNA vermessen. Die relative Quantifizierung der cDNA-Menge setzt die Verwendung von Referenzgenen voraus. GAPDH und β-Actin werden in dieser Arbeit als Referenzgene verwendet. Nach abgeschlossener qRT-PCR-Messung werden die Schmelzkurven mit Hilfe der qBase+-Software analysiert. Die relative Quantifikation der mRNA-Expression wird nach der durch Pfaffl et al. etablierten Methode berechnet (Pfaffl et al., 2010). Dafür werden die Transkriptionsniveaus der ausgewählten Gene mit Hilfe der ΔΔCT-Methode ermittelt:

$$\Delta C_t = C_{t(\text{Zielgen})} - C_{t(\text{Referenzgen})}$$

$$\Delta\Delta C_t = C_{t(\text{Experiment})} - C_{t(\text{Kontrolle})}$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{\Delta\Delta C_t}$$

7.3.4 Gefäßmuskelzellähnliche Differenzierung der ECFCs

7.3.4.1 PDGF-BB Kultivierung

Zur Vorbereitung wird das lyophilisierte PDGF-BB in einer Konzentration von 100 µg/mL in sterilem 4 mM HCl gelöst. Für die PDGF-BB-Konditionierung werden die ECFCs zweier Spender (EC09 und EC08) in Passage 4 gemäß 7.3.1.1 revitalisiert. Dafür werden die Zellen

mit konditioniertem Medium (50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL PDGF-BB in EGM-2) über vier Passagen kultiviert. Bei einer 80 %igen Konfluenz werden die Zellen nach 7.3.1.2 passagiert bzw. für weitere Analysen (Immunfluoreszenzfärbungen, qRT-PCR-Analyse, *Contraction Assay*) verwendet.

7.3.4.2 Funktionsanalyse der konditionierten ECFCs - Contraction Assay

Das *Contraction Assay* dient der funktionellen Analyse der konditionierten ECFCs. Dafür werden die aus 7.3.4.1 konditionierten (100 ng/mL, 200 ng/mL PDGF-BB in EGM-2) ECFCs in Passage 7, je Ansatz 60.000 Zellen je Vertiefung, in 3 Wells einer 6-Well-Platte ausgesiedelt und bis zu einer 90 %igen Konfluenz in 1,5 mL PDGF-BB angereichertem EGM-2 (100 ng/mL bzw. 200 ng/mL PDGF-BB) kultiviert. Das Medium wird in den Wells abgenommen und durch eine in Basalmedium verdünnte Carbachollösung (10^{-5} mol/L) ersetzt und für 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂) inkubiert. Dabei werden *in situ* Mikroskopieaufnahmen mithilfe des LumaScope-Mikroskops aufgenommen. Anschließend werden die aufgenommenen Mikroskopieaufnahmen mittels *ImageJ*-Software in ein VideofORMAT übertragen. Die Analyse des *Contraction Assays* erfolgt durch Messung der Zellfläche einzelner Zellen zum Zeitpunkt vor (t = 0 min) und nach der Inkubation (t = 30 min) mit Carbachol. Dadurch lässt sich die Kontraktion anhand der Analyse des Zellflächenverhältnisses quantitativ bestimmen:

$$\text{Kontraktion} = \frac{\text{Zellfläche } t_{30}}{\text{Zellfläche } t_0}$$

7.3.4.3 Expressionsverhalten der konditionierten ECFCs

Für die Analyse der Genexpression der Gefäßmuskelzellspezifischen Marker α -SMA und Calponin wird eine qRT-PCR durchgeführt. Dafür werden die gemäß 7.3.4.1 konditionierten ECFCs nach der Methode aus 7.3.1.2 abgelöst und wie in 7.3.3.3 beschrieben für die qRT-PCR-Analyse aufbereitet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgelistet. Als Referenzgene werden GAPDH und β -Actin verwendet. Die Transkriptionsniveaus der Marker α -SMA und Calponin werden gemäß 7.3.3.3 bestimmt.

7.3.5 Zellfärbung und Immunfluoreszenz

7.3.5.1 Fixierung der Zellen

Mittels Fixierung der Zellen werden die Signalkaskaden und Stoffwechselwege unter Beibehaltung der Zellstruktur durch die Denaturierung der Proteine für immunozytochemische Färbungen haltbar gemacht. Dafür wird das quervernetzende Fixativ Paraformaldehyd (PFA) eingesetzt. Die Zellen werden zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min in einer 4 %igen PFA-Lösung bei 4 °C gelagert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran werden die Zellen mit einer 0,1 %igen Triton-X-Lösung bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS können die Zellen in PBS bei 4 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

7.3.5.2 VE-Cadherin-Färbung

Die Visualisierung der Zell-Zell-Kontakte erfolgt über die Immunfluoreszenzfärbung der VE-Cadherine. Dafür werden die wie oben beschriebenen fixierten Zellen über Nacht mit einem primären Anti-VE-Cadherin Antikörper (Kaninchen, 1:500 in PBS) bei 4 °C inkubiert. Daraufhin werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Alexa-Fluor 488-markierten Sekundär-Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen, 1:500 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS können die Zellen anhand eines Fluoreszenzmikroskops (CXK53 Fluoreszenzfilterset: blaue Anregung) visualisiert werden.

7.3.5.3 CD31-Färbung

Das Glycoprotein Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1) oder auch *Cluster of Differentiation 31* (CD31) wird auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Die Färbung der CD31-Antigenexpression erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die VE-Cadherin-Färbung. Die Zellen werden über Nacht bei 4 °C mit einem aus dem Kaninchen stammenden Primär-Antikörper Anti-CD31 in einer Verdünnung von 1:100 (10 µg/mL in PBS) inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit einem Alexa-Fluor 488-markierten sekundären Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen, 1:500 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und durch die Fluoreszenzmikroskopie (CXK53 Fluoreszenzfilterset: blaue Anregung) sichtbar gemacht werden.

7.3.5.4 vWF-Färbung

Das Glykoprotein von-Willebrand-Faktor (vWF) induziert unter anderem nach einer Gefäßverletzung die Thrombozytenadhäsion und wird überwiegend von Endothelzellen exprimiert. Auch die vWF-Färbung erfolgt durch die indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Dafür werden die Zellen mit dem Primär-Antikörper Anti-vWF (Kaninchen, 1:500 in PBS) über Nacht bei 4 °C gelagert und dreimal mit PBS gewaschen. Darauf folgt die Inkubation der Zellen mit dem Alexa-Fluor 488-markierten Sekundär-Antikörper (Ziege Anti-Kaninchen, 1:2000 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie (CXK53 Fluoreszenzfilterset: blaue Anregung) analysiert.

7.3.5.5 Phalloidin-Färbung

Die Phalloidin-Färbung wird zur Visualisierung der F-Aktin-Filamente eingesetzt. Das Phalloidin wird aus dem grünen Knollenblätterpilz gewonnen und besitzt eine hohe Affinität gegenüber den F-Aktin-Filamenten des Zytoskeletts. Die primäre Immunfluoreszenzfärbung der Zellen erfolgt mit dem Phalloidin-iFluor 555 Farbstoff (1:1000 in PBS + 1 % BSA). Daraufhin werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die angefärbten F-Aktin-Filamente können durch die Fluoreszenzmikroskopie (CXK53 Fluoreszenzfilterset: grüne Anregung) visualisiert werden.

7.3.5.6 α -SMA-Färbung

Die Färbelösung des Glykoproteins α -SMA wird in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit dem primären Antikörper Anti- α -SMA (Maus) angesetzt und die Zellen über Nacht bei 4 °C mit dem verdünnten Farbstoff inkubiert. Darauf folgt ein dreimaliges Waschen mit PBS und eine einstündige Inkubation mit dem Alexa-Fluor 555i markierten Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus, 1:1000) lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die angefärbten Zellen werden anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop (CXK53 Fluoreszenzfilterset: grüne Anregung) visualisiert.

7.3.5.7 Zellkernfärbung mittels Hoechst

Die Visualisierung der Zellkerne wird durch die Färbung mittels Hoechst 33342 durchgeführt. Dafür werden die Zellen in einer 1:1000 Verdünnung (1 μ g/mL in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Darauf folgt die

Auswertung der Färbung am Fluoreszenzmikroskop (CXK53 Fluoreszenzfilterset: rote Anregung).

7.3.6 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwerte und Standardabweichung bzw. Standardfehler angegeben. Die Anzahl der durchgeführten Experimente findet sich unter den Abbildungen. Um statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte zu identifizieren, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als Signifikanzniveaus wurden p-Werte kleiner 0,05 festgelegt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der konzentrischen Schichten einer Arterie und Vene (modifiziert nach Sorrentino und Haller, 2011).	5
Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Endothelarten. Kontinuierliches, fenestriertes und diskontinuierliches Endothel (modifiziert nach Alabi et al., 2018).	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des durch den tangentialen Blutfluss verursachten Scherstress (Modifiziert nach Malek et al., 1999).	10
Abbildung 4: Oszillierende versus laminare Strömung und deren atherogene bzw. atheroprotektive Wirkung (modifiziert nach Kuhlmann et al., 2014).	11
Abbildung 5: Entwicklungsschritte einer bioartifiziellen Gefäßprothese (modifiziert nach Stanislawski et al., 2020).	15
Abbildung 6: PBMNC-Gewinnung nach Dichtegradientenzentrifugation und Kultivierung zur Generierung von ECFCs (modifiziert nach Miller, 2020).	19
Abbildung 7: Schematische Darstellung der PB-MNC-Kultivierung. A: <i>buffy coat</i> . B: Auftrennung des <i>buffy coats</i> mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation. C: Sedimentiertes MNC-Pellet. D: Kultivierung in mit Endothelzellmedium vorgelegten T75-Flasche. E: Kolonieentstehung nach zweiwöchiger Kultivierung. Maßstab beträgt 500 µm. Abbildung C entnommen aus Masterarbeit von Gresa Hasani (Hasani, 2019).	24
Abbildung 8: Phasenkontrastaufnahmen unterschiedlicher Koloniearten. Oben: NPP-Kolonie mit weniger als 50 Zellen. Mitte: LPP-Kolonie mit einer Zellmenge von 50-2000 Zellen. Unten: HPP-Kolonie mit einer Zellzahl von mehr als 2000 Zellen. Der Maßstab in allen Abbildungen entspricht 500 µm. (NPP: <i>non proliferative potential</i> ; LPP: <i>low proliferative potential</i> ; HPP: <i>high proliferative potential</i>).	26
Abbildung 9: Phasenkontrastaufnahmen einer HPP-Kolonieentwicklung. A: PPP-Kolonieformation aus sieben Zellen nach neun Tagen in Kultur entdeckt. B, C: Nach 14 (B) bzw. 18 (C) Tagen Kultivierung weist die Kolonie einen LPP-Charakter auf. D: Nach insgesamt 21 Tagen in Kultur erreicht die Kolonie eine Zellzahl von mehr als 2000 Zellen und kann damit als HPP-Kolonie bezeichnet werden. (DPP: <i>deficient proliferative potential</i> ;	

PPP: *potentially proliferative potential*; LPP: *low proliferative potential*; HPP: *high proliferative potential*). Maßstab in allen Abbildungen beträgt 500 µm. 31

Abbildung 10: Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des Spenders EC08...... 34

Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung endothelzellspezifischer Marker. Exemplarische Abbildungen des Spendersets 4SA. A: CD31-Färbung in grün mit Zellkernfärbung dargestellt in blau. B: VE-Cadherin-Färbung in grün und Zellkernfärbung in blau. C: vWF-Färbung in grün. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 100 µm. 35

Abbildung 12: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC08 nach 6 h (I) und 24 h (II) Inkubation in einem Angiogenese-Assay. I: ECFCs weisen nach 6 h vereinzelt netzwerkartige Strukturen auf. II: ECFCs zeigen feingliedrige und tubulärartige Formationen 24 h nach Beginn des Assays auf. a,b stellen vergrößerte Aufnahmen dar. Der Maßstab zeigt oben 500 µm und unten 250 µm. 36

Abbildung 13: Phasenkontrastaufnahmen der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten ECFCs. A: ECFCs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit in Flussrichtung ausgerichteten und elongierten Zellen nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit langgestreckten in Flussrichtung orientierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 µm. 39

Abbildung 14: Phasenkontrastaufnahmen der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten HUVECs. A: HUVECs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: HUVECs mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: HUVECs mit in Flussrichtung orientierten, elongierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 µm. 40

Abbildung 15: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen (1 Hz) Flussbedingungen kultivierten ECFCs. A: ECFCs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit in Flussrichtung ausgerichteten und elongierten Zellen nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit langgestreckten in Flussrichtung orientierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 µm. 40

Abbildung 16: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen (1 Hz) Flussbedingungen kultivierten HUVECs. A: HUVECs mit ungeordneter Kopfsteinpflasterformation nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: HUVECs mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach mittlerem Scherstress ($=5 \text{ dyn/cm}^2$). C: HUVECs mit in Flussrichtung orientierten Zellen nach hohem Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$). Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \text{ }\mu\text{m}$ 41

Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahmen der VE-Cadherine der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach quasi-statischen Bedingungen ($SC = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneter langgestreckter Morphologie und hoher Monolayerintegrität nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten Zellen nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). C: In Flussrichtung orientierte ECFCs mit unregelmäßiger Monolayerintegrität und lückenhaften Zell-Zell-Verbindungen nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). F: HUVECs mit ungeordneter polygonaler Morphologie nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). Die VE-Cadherine sind mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung nach Fixierung der Zellen in grün angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \text{ }\mu\text{m}$ 42

Abbildung 18: Immunfluoreszenzaufnahmen der VE-Cadherine der unter pulsatilen Flussbedingungen (1 Hz) kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneter Morphologie nach quasi-statischen Bedingungen ($SC = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneter langgestreckter Morphologie und hoher Monolayerintegrität nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten Zellen nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). C: In Flussrichtung orientierte ECFCs mit regelmäßiger Monolayerintegrität und starken Zell-Zell-Verbindungen nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). F: HUVECs mit ungeordneter polygonaler Morphologie nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). Die VE-Cadherine sind mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung nach Fixierung der Zellen in grün angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \text{ }\mu\text{m}$ 43

Abbildung 19: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfilamente der unter laminaren Flussbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneten F-Aktin-Mikrofilamenten (FAM) nach quasi-statischen Bedingungen ($SC = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneten langgestreckten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$) E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit in Flussrichtung orientierten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). F: HUVECs mit ungeordneten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). Die FAM sind nach Fixierung der Zellen mit Phalloidin rot angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$ 44

Abbildung 20: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfilamente der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. A, D: ECFCs (A) und HUVECs (D) mit unregelmäßig angeordneten F-Aktin-Mikrofilamenten (FAM) nach quasi-statischen Bedingungen ($SC = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$). B: ECFCs mit parallel zur Flussrichtung angeordneten langgestreckten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$) E: HUVECs mit unregelmäßig angeordneten FAM nach mittlerem Scherstress ($MSS = 5 \text{ dyn/cm}^2$). C: ECFCs mit in Flussrichtung orientierten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). F: HUVECs mit zum Teil in Flussrichtung orientierten FAM nach hohem Scherstress ($HSS = 20 \text{ dyn/cm}^2$). Die FAM sind nach Fixierung der Zellen mit Phalloidin rot angefärbt, die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts. Maßstab in allen Abbildungen beträgt $200 \mu\text{m}$ 45

Abbildung 21: Analyse des Achsenverhältnisses der flusskultivierten ECFCs und HUVECs. A: Repräsentative VE-Cadherin-Färbung der unter mittlerem laminarem Scherstress kultivierten ECFCs. Maßstab beträgt $100 \mu\text{m}$. B: Die Bildverarbeitung der VE-Cadherin-angefärbten Zellen wurde mithilfe der ImageJ- und CorelDraw-Software durchgeführt. Zellränder sind schwarz hervorgehoben, um Zellformen und maximale und minimale Zellachsen zu analysieren. C: Achsenverhältnisse der unter verschiedenen Scherstressbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. SC = quasi-statisch kultivierte Zellen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), LC = laminarer Fluss, PC = pulsatiler Fluss (1 Hz). MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm^2), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm^2). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N = 10$ verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen..... 46

Abbildung 22: Analyse der Rundheit der flusskultivierten ECFCs und HUVECs.

I: Rundheit der unter laminaren Scherstressbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs.
II: Rundheit der unter pulsatilen (1 Hz) Scherstressbedingungen kultivierten ECFCs und HUVECs. SC = quasi-statisch kultivierte Zellen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm^2), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm^2). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N = 10$ verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. *** = $p < 0,001$ definiert signifikante Änderungen. 48

Abbildung 23: Normierte Darstellung der Transkriptionslevel des antithrombogenen Markers Thrombomodulin relativ zur β -Actin-Genexpression für flusskultivierte HUVECs und ECFCs.

SC = quasi-statisch kultivierte Zellen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), LC = laminarer Fluss, PC = pulsatiler Fluss (1 Hz), MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm^2), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm^2). Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus $N = 3$ unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die schwarzen Rauten symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen..... 49

Abbildung 24: Glukoseverbrauch der flusskultivierten HUVECs und ECFCs nach 72 h Kultivierung.

SC = quasi-statisch kultivierte Zellen ($0,5 \text{ dyn/cm}^2$), LC = laminarer Fluss, PC = pulsatiler Fluss (1 Hz), MSS = mittlerer Scherstress (5 dyn/cm^2), HSS = hoher Scherstress (20 dyn/cm^2). Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus $N = 3$ unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die schwarzen Rauten symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ definieren signifikante Änderungen. 50

Abbildung 25: Analyse der Verdopplungszeiten der in vitro kultivierten ECFCs, HAECs und HUVECs.

Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N = 5$ verschiedenen Passagen. ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. 53

Abbildung 26: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten ECFCs.

Links oben: ECFCs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Links unten: ECFCs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Rechts oben: ECFCs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Rechts unten: ECFCs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$;

1 Hz) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil dargestellt. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 μm 55

Abbildung 27: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten HAECs. Links oben: HAECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Links unten: HAECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Rechts oben: HAECs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Rechts unten: HAECs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil dargestellt. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 μm 56

Abbildung 28: Phasenkontrastaufnahmen der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten HUVECs. Links oben: HUVECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$). Links unten: HUVECs nach quasi-statischen Bedingungen ($=0,5 \text{ dyn/cm}^2$) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Rechts oben: HUVECs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Rechts unten: HUVECs nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz) und TNF- α -Stimulierung (10 ng/mL). Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil dargestellt. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 μm 57

Abbildung 29: Immunfluoreszenzaufnahmen der unter pulsatilen Flussbedingungen kultivierten ECFCs, HAECs und HUVECs. Oben: Immunfluoreszenzfärbungen der F-Aktinfilamente (FAM) nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Mitte: Immunfluoreszenzfärbungen der VE-Cadherine zur Visualisierung der Monolayerintegrität nach hohem pulsatilen Scherstress ($=20 \text{ dyn/cm}^2$; 1 Hz). Unten: Die Bildverarbeitung der VE-Cadherin-angefärbten Zellen wurde mithilfe der ImageJ- und CorelDraw-Software durchgeführt. Zellränder sind schwarz hervorgehoben, um Zellformen sowie maximale sowie minimale Zellachsen zu analysieren. Die FAM wurden mit Phalloidin rot angefärbt. Die VE-Cadherine sind in grün und die Zellkerne mittels Höchst-Färbung in blau dargestellt. Flussrichtung von links nach rechts durch weißen Pfeil symbolisiert. Maßstab in allen Abbildungen beträgt 200 μm 58

Abbildung 30: Analyse der Rundheit der flusskultivierten ECFCs, HAECs und HUVECs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 10 verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. 59

- Abbildung 31: Analyse der Zellausrichtung in Relation zur Flussrichtung.** Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 10 verschiedenen Zellen in Dreifachbestimmung. # = $p < 0.05$ definiert eine signifikante Änderung verglichen mit der quasi-statischen Kontrolle. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen wie angegeben. 60
- Abbildung 32: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse endothelzellspezifischer Marker für scherstresskultivierte ECFCs (grün), HAECs (rot) und HUVECs (lila).** Die Expression der Marker CD31, CD34, KDR und NOTCH4 wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die jeweiligen zellspezifischen Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. 63
- Abbildung 33: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse der thrombogenen und antithrombogenen Marker für scherstresskultivierte ECFCs, HAECs und HUVECs.** Die Expression der Marker KLF2, eNOS, VCAM1, Tissue Factor, Thrombomodulin und Tie2 wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet und auf die statische Kontrolle normiert. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die jeweiligen zellspezifischen Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. #,* = $p < 0,05$, ##,** = $p < 0,01$ und ###,*** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung bezogen auf die statische Kontrolle..... 64
- Abbildung 34: Analyse der Verdopplungszeiten der in vitro kultivierten ECFCs unter verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen.** Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 verschiedenen Kultivierungen. #,* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung signifikant bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. 69
- Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α -SMA.** A: Unbehandelte ECFCs in Passage 5 (P5). B: Mit PDGF-BB kultivierte (50 ng/mL) ECFCs in P5. Maßstab repräsentiert 100 μ m. 70

Abbildung 36: Immunfluoreszenzfärbung des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α-SMA. A: Mit PDGF-BB kultivierte (200 ng/mL) ECFCs in Passage 5. B: Mit PDGF-BB kultivierte (200 ng/mL) ECFCs in Passage 7. Maßstab repräsentiert 100 μ m.....	71
Abbildung 37: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers α-SMA der PDGF-BB-behandelten ECFCs. Die Expression des Markers α -SMA wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. #,* = p<0,05, ##,** = p<0,01 und ###,*** = p<0,001 definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.	72
Abbildung 38: Normierte Darstellung der Genexpressionsanalyse des Gefäßmuskelzellspezifischen Markers Calponin der PDGF-BB-behandelten ECFCs. Die Expression des Markers Calponins wurde relativ zur GAPDH- und β -Actin-Expression ausgewertet. Die weißen Kreise stellen die einzelnen Werte aus N = 3 unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung dar. Die Rauten symbolisieren die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. #,* = p<0,05, ##,** = p<0,01 und ###,*** = p<0,001 definieren signifikante Änderungen. #-Kennzeichnung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.	73
Abbildung 39: Ergebnisse des Contraction Assays für SMCs und PDGF-BB-behandelte ECFCs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 10 verschiedenen Zellen. * = p<0,05 definiert signifikante Änderungen.	74
Abbildung 40:Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des gepoolten Spendersets 4SA.	97
Abbildung 41:Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des gepoolten Spendersets 4SF.	98
Abbildung 42:Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des Spenders EC06.	99
Abbildung 43:Exemplarische durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen des Spenders EC09.	100

Abbildung 44: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spendersets 4SA nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.	101
Abbildung 45: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spendersets 4SF nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.	101
Abbildung 46: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC06 nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.	102
Abbildung 47: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC08 nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.	102
Abbildung 48: Phasenkontrastaufnahmen isolierter Zellen des Spenders EC09 nach 24 h Inkubation in einem Angiogenese Assay.	103
Abbildung 49: Schematische Darstellung eines Restblutrings. (1): Trichter; (2): Schlauch; a, b und c: Schnittpositionen; (entnommen aus Zerdali, 2019)......	112
Abbildung 50: Lokalisation der Interphase im Leucosep-Röhrchen nach der Zentrifugation. (entnommen aus Zerdali, 2019).	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterscheidung der CACs und ECFCs anhand ihrer Eigenschaften.	18
Tabelle 2: Charakteristische Merkmale von Arterien und Venen.	20
Tabelle 3: Angaben der für die Vorarbeiten untersuchten Spender.	25
Tabelle 4: Koloniezahl sowie Anteil der NPP-, LPP- und HPP-Kolonien je Spender. Einteilung erfolgte nach Coldwell et al. (Coldwell et al., 2011). (NPP: <i>non proliferative potential</i> ; LPP: <i>low proliferative potential</i> ; HPP: <i>high proliferative potential</i>).	27
Tabelle 5: Kolonieeinteilung in DPP-, PPP-, LPP- und HPP-Kategorien je Spender. (DPP: <i>deficient proliferative potential</i> ; PPP: <i>potentially proliferative potential</i> ; LPP: <i>low proliferative potential</i> ; HPP: <i>high proliferative potential</i>).	28
Tabelle 6: Verdopplungszeiten (PDTs) der unterschiedlichen Koloniearten. +p<0,05 zeigt signifikante Unterschiede verglichen zur PDT der DPP-Kolonie.....	28
Tabelle 7: Spenderdetails der gepoolten und einzelnen Spender.	29
Tabelle 8: Kolonieeinteilung in DPP-, PPP-, LPP- und HPP-Kategorien für Einzelspender und gepoolte Spender. (DPP: <i>deficient proliferative potential</i> ; PPP: <i>potentially proliferative potential</i> ; LPP: <i>low proliferative potential</i> ; HPP: <i>high proliferative potential</i>).	30
Tabelle 9: Verdopplungszeiten der jeweiligen Spendersets über vier Passagen.	32
Tabelle 10: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der endothelzellcharakteristischen (CD31, CD146), hämatopoetischen (CD45, CD14, CD133) und stammzellspezifischen (CD34) Marker der jeweiligen Spendersets.	33
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Primer.	106
Tabelle 12: Ausplattierte Zellzahl je Passage.	114
Tabelle 13: Herstellerangaben zu Antikörper- und Inkubationspuffervolumen je Färbung.	115
Tabelle 14: Schrittweise Scherstresssteigerung.	117

Literaturverzeichnis

Abaci, H. E., Devendra, R., Soman, R., Drazer, G., & Gerecht, S. (2012). Microbioreactors to manipulate oxygen tension and shear stress in the microenvironment of vascular stem and progenitor cells. *Biotechnology and applied biochemistry*, 59(2), 97-105.

Ahmetaj-Shala, B., Kawai, R., Marei, I., Nikolakopoulou, Z., Shih, C. C., Konain, B., ... & Mitchell, J. A. (2020). A bioassay system of autologous human endothelial, smooth muscle cells, and leukocytes for use in drug discovery, phenotyping, and tissue engineering. *The FASEB Journal*, 34(1), 1745-1754.

Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research*, 100(2), 158-173.

Aird, W. C. (2012). Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(1), a006429.

Alabi, R. O., Farber, G., & Blobel, C. P. (2018). Intriguing roles for endothelial ADAM10/Notch signaling in the development of organ-specific vascular beds. *Physiological reviews*, 98(4), 2025-2061.)

Ando, J., & Kamiya, A. (1996). Flow-dependent regulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Japanese heart journal*, 37(1), 19-32.

Angelo et al., 2015 (Onlinequelle). <https://lpi.oregonstate.edu/mic/health-disease/atherosclerosis>. (Aufgerufen: 04. April 2022)

Aper, T. (2015). Maßgeschneiderte autologe bioartifizielle Gefäßprothesen. *Zeitschrift für Herz-, Thorax-und Gefäßchirurgie*, 29(5), 342-348.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., ... & Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302), 964-966.

Badorff, C., Brandes, R. P., Popp, R., Rupp, S., Urbich, C., Aicher, A., ... & Dimmeler, S. (2003). Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, 107(7), 1024-1032.

Banno, K., & Yoder, M. C. (2018). Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatric research*, 83(1), 283-290.

Basile, D. P., Collett, J. A., & Yoder, M. C. (2018). Endothelial colony-forming cells and pro-angiogenic cells: clarifying definitions and their potential role in mitigating acute kidney injury. *Acta Physiologica*, 222(2), e12914.

Baskurt, O. K., Hardeman, M. R., & Rampling, M. W. (Eds.). (2007). *Handbook of hemorheology and hemodynamics* (Vol. 69). IOS press.

- Bardin, N., Blot-Chabaud, M., Despoix, N., Kebir, A., Harhour, K., Arsanto, J. P., ... & Sabatier, F. (2009). CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(5), 746-753.
- Belhassen, L., Pelle, G., Sediame, S., Bachir, D., Carville, C., Bucherer, C., ... & Adnot, S. (2001). Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97(6), 1584-1589.
- Bergmeister, H., Strobl, M., Grasl, C., Liska, R., & Schima, H. J. E. S. (2013). Tissue engineering of vascular grafts. *European Surgery*, 45(4), 187-193.
- Bloch, W., & Brixius, K. (2006). Sport und Stammzellen. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 57(3).
- Blume, C., Kraus, X., Heene, S., Loewner, S., Stanislawski, N., Cholewa, F., & Blume, H. (2022). Vascular implants—new aspects for in situ tissue engineering. *Engineering in Life Sciences*, 22(3-4), 344-360.
- Böse D, Leineweber K, Konorza T, Zahn A, Bröcker-Preuss M, Mann K, Haude M, Erbel R, Heusch G. Release of TNF-alpha during stent implantation into saphenous vein aortocoronary bypass grafts and its relation to plaque extrusion and restenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2295-9. doi: 10.1152/ajpheart.01116.2006. Epub 2007 Jan 5. PMID: 17208993.
- Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X. H., Anjo, A., ... & Uzan, G. (2004). Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, 103(7), 2577-2584.
- Brittan, M., Gallogly, S., & Mills, N. L. (2013). Isolation and characterisation of endothelial outgrowth from coronary arteries in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal*, 34(suppl_1).
- Brown, M. A., Wallace, C. S., Angelos, M., & Truskey, G. A. (2009). Characterization of umbilical cord blood-derived late outgrowth endothelial progenitor cells exposed to laminar shear stress. *Tissue Engineering Part A*, 15(11), 3575-3587.
- Burton, D. G., Giles, P. J., Sheerin, A. N., Smith, S. K., Lawton, J. J., Ostler, E. L., ... & Faragher, R. G. (2009). Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification. *Experimental gerontology*, 44(10), 659-665.
- Capiod, J. C., Tournois, C., Vitry, F., Sevestre, M. A., Daliphard, S., Reix, T., ... & Pignon, B. (2009). Characterization and comparison of bone marrow and peripheral blood mononuclear cells used for cellular therapy in critical leg ischaemia: towards a new cellular product. *Vox sanguinis*, 96(3), 256-265.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389-395.
- Charbonier, F. W., Zamani, M., & Huang, N. F. (2019). Endothelial cell mechanotransduction in the dynamic vascular environment. *Advanced biosystems*, 3(2), 1800252.

- Cheng, M., & Qin, G. (2012). Progenitor cell mobilization and recruitment: SDF-1, CXCR4, α 4-integrin, and c-kit. *Progress in molecular biology and translational science*, 111, 243-264.)
- Cheng, M., Guan, X., Li, H., Cui, X., Zhang, X., Li, X., ... & Avsar, E. (2013). Shear stress regulates late EPC differentiation via mechanosensitive molecule-mediated cytoskeletal rearrangement. *PLoS One*, 8(7), e67675.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta physiologica*, 219(2), 382-408.
- Chiu, Y. J., McBeath, E., & Fujiwara, K. (2008). Mechanotransduction in an extracted cell model: Fyn drives stretch-and flow-elicited PECAM-1 phosphorylation. *The Journal of cell biology*, 182(4), 753-763.
- Chlench, S., Disassa, N. M., Hohberg, M., Hoffmann, C., Pohlkamp, T., Beyer, G., ... & Zakrzewicz, A. (2007). Regulation of Foxo-1 and the angiopoietin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS letters*, 581(4), 673-680.
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., ... & Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 91(10), 3527-3561.
- Claesson-Welsh, L., Dejana, E., & McDonald, D. M. (2021). Permeability of the endothelial barrier: identifying and reconciling controversies. *Trends in molecular medicine*, 27(4), 314-331.
- Coldwell, K. E., Lee, S. J., Kean, J., Khoo, C. P., Tsaknakis, G., Smythe, J., & Watt, S. M. (2011). Effects of obstetric factors and storage temperatures on the yield of endothelial colony forming cells from umbilical cord blood. *Angiogenesis*, 14(3), 381.
- Conway, D. E., Breckenridge, M. T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C. S., & Schwartz, M. A. (2013). Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology*, 23(11), 1024-1030.
- Conway, D. E., & Schwartz, M. A. (2015). Mechanotransduction of shear stress occurs through changes in VE-cadherin and PECAM-1 tension: implications for cell migration. *Cell adhesion & migration*, 9(5), 335-339.
- Cuccuini, W., Poitevin, S., Poitevin, G., Dignat-George, F., Cornillet-Lefebvre, P., Sabatier, F., & Nguyen, P. (2010). Tissue factor up-regulation in proinflammatory conditions confers thrombin generation capacity to endothelial colony-forming cells without influencing non-coagulant properties in vitro. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(9), 2042-2052.
- Culver, J. C., & Dickinson, M. E. (2010). The effects of hemodynamic force on embryonic development. *Microcirculation*, 17(3), 164-178.
- Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *The Lancet*, 355(9215), 1627-1632.

- Davies, M. J., Gordon, J. L., Gearing, A. J. H., Pigott, R., Woolf, N., Katz, D., & Kyriakopoulos, A. (1993). The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *The Journal of pathology*, *171*(3), 223-229.
- Davies, P. F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nature Reviews Cardiology*, *6*(1), 16.
- Davies, P. F., Civelek, M., Fang, Y., & Fleming, I. (2013). The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovascular research*, *99*(2), 315-327.
- Deb, N., Ali, M. S., Mathews, A., Chang, Y. W., & Lacerda, C. M. (2021). Shear type and magnitude affect aortic valve endothelial cell morphology, orientation, and differentiation. *Experimental Biology and Medicine*, *246*(21), 2278-2289.
- de Jong, A., Weijers, E., Dirven, R., de Boer, S., Streur, J., & Eikenboom, J. (2019). Variability of von Willebrand factor-related parameters in endothelial colony forming cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *17*(9), 1544-1554.
- Dekker, R. J., Van Soest, S., Fontijn, R. D., Salamanca, S., De Groot, P. G., VanBavel, E., ... & Horrevoets, A. J. (2002). Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *100*(5), 1689-1698.
- Dessalles, C. A., Leclech, C., Castagnino, A., & Barakat, A. I. (2021). Integration of substrate- and flow-derived stresses in endothelial cell mechanobiology. *Communications Biology*, *4*(1), 1-15.
- Diamond, S. L., Eskin, S. G., & McIntire, L. V. (1989). Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science*, *243*(4897), 1483-1485.
- Dimitrievska, S., & Niklason, L. E. (2018). Historical perspective and future direction of blood vessel developments. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *8*(2), a025742.
- Doddaballapur, A., Michalik, K. M., Manavski, Y., Lucas, T., Houtkooper, R. H., You, X., ... & Boon, R. A. (2015). Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *35*(1), 137-145.
- Dong, X., Yuan, X., Wang, L., Liu, J., Midgley, A. C., Wang, Z., ... & Kong, D. (2018). Construction of a bilayered vascular graft with smooth internal surface for improved hemocompatibility and endothelial cell monolayer formation. *Biomaterials*, *181*, 1-14.
- Dorland, Y. L., & Huvneers, S. (2017). Cell–cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(2), 279-292.
- Du, F., Zhou, J., Gong, R., Huang, X., Pansuria, M., Virtue, A., ... & Yang, X. F. (2012). Endothelial progenitor cells in atherosclerosis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, *17*, 2327.

- Duan, Y., Yu, S., Xu, P., Wang, X., Feng, X., Mao, Z., & Gao, C. (2019). Co-immobilization of CD133 antibodies, vascular endothelial growth factors, and REDV peptide promotes capture, proliferation, and differentiation of endothelial progenitor cells. *Acta biomaterialia*, 96, 137-148.
- Egorova, A. D., DeRuiter, M. C., de Boer, H. C., van de Pas, S., Gittenberger-de Groot, A. C., van Zonneveld, A. J., ... & Hierck, B. P. (2012). Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 48(1), 21-29.
- Ensley, A. E., Nerem, R. M., Anderson, D. E., Hanson, S. R., & Hinds, M. T. (2012). Fluid shear stress alters the hemostatic properties of endothelial outgrowth cells. *Tissue Engineering Part A*, 18(1-2), 127-136.
- Esper, R. J., Nordaby, R. A., Vilariño, J. O., Paragano, A., Cacharrón, J. L., & Machado, R. A. (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular diabetology*, 5(1), 1-18.
- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., ... & Greaves, M. F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells.
- Finkbeiner, L., 2021 (Betreute Masterarbeit: *In vitro* Differenzierung von *smooth muscle outgrowth cells* aus dem peripheren Blut. Masterarbeit im Fach Life Science, Januar – September 2021)
- Fioretta, E. S., Fledderus, J. O., Burakowska-Meise, E. A., Baaijens, F. P., Verhaar, M. C., & Bouten, C. V. (2012). Polymer-based scaffold designs for in situ vascular tissue engineering: controlling recruitment and differentiation behavior of endothelial colony forming cells. *Macromolecular bioscience*, 12(5), 577-590.
- Fitts, M. K., Pike, D. B., Anderson, K., & Shiu, Y. T. (2014). Hemodynamic shear stress and endothelial dysfunction in hemodialysis access. *The open urology & nephrology journal*, 7(Suppl 1 M5), 33.
- Fuchs, S., Hermanns, M. I., & Kirkpatrick, C. J. (2006). Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell and tissue research*, 326(1), 79-92.
- Fuchs, S., Motta, A., Migliaresi, C., & Kirkpatrick, C. J. (2006). Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials*, 27(31), 5399-5408.
- Funk, M. B., Frech, M., Spranger, R., & Keller-Stanislawski, B. (2015). Überwachung der Sicherheit von Zelltherapeutika (CBMPs). *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 58(11), 1239-1246.
- Galley, H. F., & Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia*, 93(1), 105-113.

- Gasser, M., Frank, M. H., & Waaga-Gasser, A. M. (2018). Stammzell-basierter biologischer Gefäßersatz. *Gefäßchirurgie*, 23(1), 28-33.
- Gill, K. A., & Brindle, N. P. (2005). Angiopoietin-2 stimulates migration of endothelial progenitors and their interaction with endothelium. *Biochemical and biophysical research communications*, 336(2), 392-396.
- Gong, Z., & Niklason, L. E. (2008). Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *The FASEB Journal*, 22(6), 1635-1648.
- Gong, X., Liu, H., Ding, X., Liu, M., Li, X., Zheng, L., ... & Huang, X. (2014). Physiological pulsatile flow culture conditions to generate functional endothelium on a sulfated silk fibroin nanofibrous scaffold. *Biomaterials*, 35(17), 4782-4791.
- Gratama, J. W., Orfao, A., Barnett, D., Brando, B., Huber, A., Janossy, G., ... & Papa, S. (1998). Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 34(3), 128-142.
- Güven, H., Shepherd, R. M., Bach, R. G., Capoccia, B. J., & Link, D. C. (2006). The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(8), 1579-1587.
- Guo, S., Cheng, Y., Ma, Y., & Yang, X. (2010). Endothelial progenitor cells derived from CD34+ cells form cooperative vascular networks. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(4-5), 679-688.
- Hahn, M. S., McHale, M. K., Wang, E., Schmedlen, R. H., & West, J. L. (2007). Physiologic pulsatile flow bioreactor conditioning of poly (ethylene glycol)-based tissue engineered vascular grafts. *Annals of biomedical engineering*, 35(2), 190-200.
- Han, Y., He, M., Marin, T., Shen, H., Wang, W. T., Lee, T. Y., ... & Chien, S. (2021). Roles of KLF4 and AMPK in the inhibition of glycolysis by pulsatile shear stress in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(21), e2103982118.
- Hasani, 2019 (Betreute Masterarbeit: Auswirkungen dynamischer Kultivierung von endothelialen Vorläufer-Zellen im Vergleich zu HUVECs auf EZM-Protein. Masterarbeit im Fach Life Science. Juli 2018 – Januar 2019.)
- Haudenschild, C. C. (1984). Morphology of vascular endothelial cells in culture. In *Biology of endothelial cells* (pp. 129-140). Springer, Boston, MA.
- Heene, S. (2022). *Herstellung einer bioartifiziellen Gefäßprothese und Kultivierung in einem speziell entwickelten Bioreaktorsystem* (Doctoral dissertation, Hannover: Institutionelles Repositorium der Leibniz Universität Hannover).
- Heene, S., Thoms, S., Kalies, S., Wegner, N., Peppermüller, P., Born, N., ... & Blume, C. A. (2021). Vascular network formation on macroporous polydioxanone scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 27(19-20), 1239-1249.

- Helms, F., Lau, S., Aper, T., Zippusch, S., Klingenberg, M., Haverich, A., ... & Böer, U. (2021). A 3-layered bioartificial blood vessel with physiological wall architecture generated by mechanical stimulation. *Annals of Biomedical Engineering*, 49(9), 2066-2079.
- Hendrickx, B., Vranckx, J. J., & Lutun, A. (2011). Cell-based vascularization strategies for skin tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(1), 13-24.
- Heo, K. S., Fujiwara, K., & Abe, J. I. (2014). Shear stress and atherosclerosis. *Molecules and cells*, 37(6), 435.
- Hess, C., Schwenke, A., Wagener, P., Franzka, S., Laszlo Sajti, C., Pflaum, M., ... & Barcikowski, S. (2014). Dose-dependent surface endothelialization and biocompatibility of polyurethane noble metal nanocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(6), 1909-1920.
- Heß, D. (2008). *Mechanismen der Transdifferenzierung endothelialer Progenitorzellen in glatte Gefäßmuskulzellen*(Doctoral dissertation, Gießen, Univ., Diss., 2009).
- Heupel, W. M., Efthymiadis, A., Schlegel, N., Müller, T., Baumer, Y., Baumgartner, W., ... & Waschke, J. (2009). Endothelial barrier stabilization by a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction in vitro and in vivo. *Journal of cell science*, 122(10), 1616-1625.
- Higgins, S. J., De Ceunynck, K., Kellum, J. A., Chen, X., Gu, X., Chaudhry, S. A., ... & Parikh, S. M. (2018). Tie2 protects the vasculature against thrombus formation in systemic inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1471-1484.
- Hirschi, K. K., Ingram, D. A., & Yoder, M. C. (2008). Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(9), 1584-1595.
- Hofmann, N. A., Reinisch, A., & Strunk, D. (2009). Isolation and large scale expansion of adult human endothelial colony forming progenitor cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (32), e1524.
- Hofmann, N. A., Reinisch, A., & Strunk, D. (2012). Endothelial colony-forming progenitor cell isolation and expansion. In *Somatic Stem Cells* (pp. 381-387). Humana Press, Totowa, NJ.
- Hordijk, P. L., Anthony, E., Mul, F. P., Rientsma, R., Oomen, L. C., & Roos, D. (1999). Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *Journal of Cell Science*, 112(12), 1915-1923.
- Iaizzo, P. A. (Ed.). (2010). *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices*. Springer Science & Business Media.
- Ingram, D. A., Mead, L. E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., ... & Yoder, M. C. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 104(9), 2752-2760.
- Isenberg, B. C., Williams, C., & Tranquillo, R. T. (2006). Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circulation research*, 98(1), 25-35.

- Ishibazawa, A., Nagaoka, T., Takahashi, T., Yamamoto, K., Kamiya, A., Ando, J., & Yoshida, A. (2011). Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(11), 8496-8504.
- Jannati, M., Navaei, M. R., & Ronizi, L. G. (2019). A comparative review of the outcomes of using arterial versus venous conduits in coronary artery bypass graft (CABG). *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(9), 2768.
- Johnson, B. D., Mather, K. J., & Wallace, J. P. (2011). Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. *Vascular medicine*, 16(5), 365-377.
- Joo, H. J., Seo, H. R., Jeong, H. E., Choi, S. C., Park, J. H., Yu, C. W., ... & Lim, D. S. (2014). Smooth muscle progenitor cells from peripheral blood promote the neovascularization of endothelial colony-forming cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 449(4), 405-411.
- Jourde-Chiche, N., Fakhouri, F., Dou, L., Bellien, J., Burtsey, S., Frimat, M., ... & Roumenina, L. T. (2019). Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(2), 87-108.
- Joussen, A. M., Kirchhof, B., & Gottstein, C. (2003). Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Der Ophthalmologe*, 100(4), 284-291.
- Kalka, C., Asahara, T., Krone, W., & Isner, J. M. (2000). Angiogenese und Vaskulogenese Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation. *Herz*, 25(6), 611-622.
- Kang, H. S., Moon, Y. J., Kim, Y. Y., Park, W. Y., Park, A. K., Wang, K. C., ... & Kim, S. K. (2014). Smooth-muscle progenitor cells isolated from patients with moyamoya disease: novel experimental cell model. *Journal of neurosurgery*, 120(2), 415-425.
- Kawamura, M., Paulsen, M. J., Goldstone, A. B., Shudo, Y., Wang, H., Steele, A. N., ... & Woo, Y. J. (2017). Tissue-engineered smooth muscle cell and endothelial progenitor cell bi-level cell sheets prevent progression of cardiac dysfunction, microvascular dysfunction, and interstitial fibrosis in a rodent model of type 1 diabetes-induced cardiomyopathy. *Cardiovascular diabetology*, 16(1), 1-17.
- Kim, H., Huang, L., Critser, P. J., Yang, Z., Chan, R. J., Wang, L., ... & Yoder, M. C. (2015). Notch ligand Delta-like 1 promotes in vivo vasculogenesis in human cord blood-derived endothelial colony forming cells. *Cytotherapy*, 17(5), 579-592.
- Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., ... & Murohara, T. (2004). Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(8), 1442-1447.
- Kraus, X., Pflaum, M., Thoms, S., Jonczyk, R., Witt, M., Scheper, T., & Blume, C. (2021). A pre-conditioning protocol of peripheral blood derived endothelial colony forming cells for endothelialization of tissue engineered constructs. *Microvascular Research*, 134, 104107.

- Kraus, X., van de Flierdt, E., Renzelmann, J., Thoms, S., Witt, M., Scheper, T., & Blume, C. (2022). Peripheral Blood Derived Endothelial Colony Forming Cells as Suitable Cell Source for Pre-Endothelialization of Arterial Vascular Grafts Under Dynamic Flow Conditions. Available at SSRN 4061504.
- Krenning, G., Moonen, J. R. A., van Luyn, M. J., & Harmsen, M. C. (2008). Generating new blood flow: integrating developmental biology and tissue engineering. *Trends in cardiovascular medicine*, 18(8), 312-323.
- Kuang, H., Wang, Y., Hu, J., Wang, C., Lu, S., & Mo, X. (2018). A method for preparation of an internal layer of artificial vascular graft co-modified with Salvianolic acid B and heparin. *ACS applied materials & interfaces*, 10(23), 19365-19372.
- Kuhlmann, I., Chin, D., & Rimbach, G. (2014). Molekulare Mechanismen der Atherosklerose. In *Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und Atherosklerose* (pp. 3-14). Springer Spektrum, Wiesbaden.
- Kutikhin, A. G., Sinitsky, M. Y., Yuzhalin, A. E., & Velikanova, E. A. (2018). Shear stress: An essential driver of endothelial progenitor cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 118, 46-69.
- Kutikhin, A. G., Tupikin, A. E., Matveeva, V. G., Shishkova, D. K., Antonova, L. V., Kabilov, M. R., & Velikanova, E. A. (2020). Human peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells are highly similar to mature vascular endothelial cells yet demonstrate a transitional transcriptomic signature. *Cells*, 9(4), 876.
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., ... & Nickenig, G. (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 109(2), 220-226.
- Lee, H. J., & Koh, G. Y. (2003). Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(2), 399-404.
- Lee, D. Y., Cho, T. J., Kim, J. A., Lee, H. R., Yoo, W. J., Chung, C. Y., & Choi, I. H. (2008). Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone*, 42(5), 932-941.
- Lehoux, S., & Jones, E. A. (2016). Shear stress, arterial identity and atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*, 115(03), 467-473.
- Levesque, M. J., & Nerem, R. M. (1985). The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress.
- Lin, Z., Kumar, A., SenBanerjee, S., Staniszewski, K., Parmar, K., Vaughan, D. E., ... & Jain, M. K. (2005). Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. *Circulation research*, 96(5), e48-e57.
- Lin, R. Z., Moreno-Luna, R., Muñoz-Hernandez, R., Li, D., Jaminet, S. C. S., Greene, A. K., & Melero-Martin, J. M. (2013). Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis*, 16(4), 735-744.

- Lombardo, M. F., Iacopino, P., Cuzzola, M., Spiniello, E., Garreffa, C., Ferrelli, F., ... & Irrera, G. (2012). Type 2 diabetes mellitus impairs the maturation of endothelial progenitor cells and increases the number of circulating endothelial cells in peripheral blood. *Cytometry Part A*, *81*(10), 856-864.
- Ludwig, A., Jochmann, N., Kertesz, A., Kuhn, C., Mueller, S., Gericke, C., ... & Stangl, V. (2010). Smoking decreases the level of circulating CD34+ progenitor cells in young healthy women—a pilot study. *BMC women's health*, *10*(1), 1-8.
- Malek, A. M., Jackman, R., Rosenberg, R. D., & Izumo, S. (1994). Endothelial expression of thrombomodulin is reversibly regulated by fluid shear stress. *Circulation research*, *74*(5), 852-860.
- Malek, A. M., & Izumo, S. (1995). Control of endothelial cell gene expression by flow. *Journal of biomechanics*, *28*(12), 1515-1528.
- Malek, A. M., Alper, S. L., & Izumo, S. (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama*, *282*(21), 2035-2042.
- Marchetti, 2015: https://cdn.stemcell.com/media/files/minireview/MRDX20360-Endothelial_Progenitor_Cells_Endothelial_Cells.pdf (zuletzt aufgerufen: 20.06.2022)
- Martin, F. A., McLoughlin, A., Rochfort, K. D., Davenport, C., Murphy, R. P., & Cummins, P. M. (2014). Regulation of thrombomodulin expression and release in human aortic endothelial cells by cyclic strain. *PLoS one*, *9*(9), e108254.
- Maschhoff, P., Heene, S., Lavrentieva, A., Hentrop, T., Leibold, C., Wahalla, M. N., ... & Blume, C. (2017). An intelligent bioreactor system for the cultivation of a bioartificial vascular graft. *Engineering in Life Sciences*, *17*(5), 567-578.
- Masuda, H., Kalka, C., Takahashi, T., Yoshida, M., Wada, M., Kobori, M., ... & Asahara, T. (2007). Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circulation research*, *101*(6), 598-606.
- Mauge, L., Sabatier, F., Boutouyrie, P., D'Audigier, C., Peyrard, S., Bozec, E., ... & Smadja, D. M. (2014). Forearm ischemia decreases endothelial colony-forming cell angiogenic potential. *Cytotherapy*, *16*(2), 213-224.
- Mazzolai, L., Silacci, P., Bouzourene, K., Daniel, F., Brunner, H., & Hayoz, D. (2002). Tissue factor activity is upregulated in human endothelial cells exposed to oscillatory shear stress. *Thrombosis and haemostasis*, *87*(06), 1062-1068.
- Mecha Disassa, N., Styp-Rekowska, B., Hinz, B., Silva-Azevedo, D., Pries, A. R., & Zakrzewicz, A. (2009). Differential expression of VEGFA, TIE2, and ANG2 but not ADAMTS1 in rat mesenteric microvascular arteries and veins. *Physiological research*, *58*(2).
- Medina, R. J., O'Neill, C. L., Humphreys, M. W., Gardiner, T. A., & Stitt, A. W. (2010). Outgrowth endothelial cells: characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, *51*(11), 5906-5913.

- Meierin, W. (2013). *Vergleich der partiellen unteren Ministernotomie mit der konventionellen kompletten Sternotomie bei der operativen Revaskularisation der vorderen Herzkranzarterie am schlagenden Herzen anhand einer Langzeitbeobachtung* (Doctoral dissertation, lmu).
- Melchiorri, A. J., Bracaglia, L. G., Kimerer, L. K., Hibino, N., & Fisher, J. P. (2016). In vitro endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system bioreactor. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22(7), 663-670.
- Miller, K., 2020 (Betreute Bachelorarbeit: Einfluss von Scherstress auf die Differenzierung von endothelialen koloniebildenden Zellen (ECFCs) und die atheroprotektive Wirkung von Scherstress auf ECFCs. Bachelorarbeit im Fach Life Science. Juni – August 2020)
- Moonen, J. R. A., Krenning, G., Brinker, M. G., Koerts, J. A., Van Luyn, M. J., & Harmsen, M. C. (2010). Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny. *Cardiovascular research*, 86(3), 506-515.
- Moriconi, F., Amanzada, A., Malik, I., & Ramadori, G. (2012). PECAM-1 (CD31)-gene expression is downregulated by TNF- α or Interferon (IFN-) but upregulated by TGF-1 in peripheral blood leukocytes. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 50(01), P3_22.
- Müller, W. A., Frings, S., & Möhrlein, F. (2009). *Tier-und humanphysiologie: Eine einföhrung*. Heidelberg: Springer.
- Obi, S., Masuda, H., Shizuno, T., Sato, A., Yamamoto, K., Ando, J., ... & Asahara, T. (2012). Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(6), C595-C606.
- Oertel jr, H., Böhle, M., & Reviol, T. (2015). *Strömungsmechanik: Für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. Springer-Verlag.
- Offermanns, S. (2012). Pharmakologische Beeinflussung der glatten Muskulatur. In *Pharmakologie & Toxikologie* (pp. 388-408). Springer, Berlin, Heidelberg.)
- O'Neill, C. L., McLoughlin, K. J., Chambers, S. E., Guduric-Fuchs, J., Stitt, A. W., & Medina, R. J. (2018). The vasoreparative potential of endothelial colony forming cells: a journey through pre-clinical studies. *Frontiers in Medicine*, 5, 273.
- Pahakis, M. Y., Kosky, J. R., Dull, R. O., & Tarbell, J. M. (2007). The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(1), 228-233.
- Pallua, N., & Suschek, C. V. (Eds.). (2010). *Tissue engineering: from Lab to Clinic*. Springer Science & Business Media.
- Pang, J. H., Farhatnia, Y., Godarzi, F., Tan, A., Rajadas, J., Cousins, B. G., & Seifalian, A. M. (2015). In situ endothelialization: bioengineering considerations to translation. *Small*, 11(47), 6248-6264.
- Paschalaki, K. E., & Randi, A. M. (2018). Recent advances in endothelial colony forming cells toward their use in clinical translation. *Frontiers in medicine*, 5, 295.

Pashneh-Tala, S., MacNeil, S., & Claeysens, F. (2016). The tissue-engineered vascular graft—past, present, and future. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 22(1), 68-100.

Paszkowiak, J. J., & Dardik, A. (2003). Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vascular and endovascular surgery*, 37(1), 47-57

Patel, J., Donovan, P., & Khosrotehrani, K. (2016). Concise review: functional definition of endothelial progenitor cells: a molecular perspective. *Stem cells translational medicine*, 5(10), 1302-1306.

Patry, C., Betzen, C., Fathalizadeh, F., Fichtner, A., Westhoff, J. H., Fleming, T., ... & Rafat, N. (2018). Endothelial progenitor cells accelerate endothelial regeneration in an in vitro model of Shigatoxin-2a-induced injury via soluble growth factors. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 315(4), F861-F869.

Patterson, C., Perrella, M. A., Endege, W. O., Yoshizumi, M., Lee, M. E., & Haber, E. (1996). Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 98(2), 490-496.

Paulo, M., McKittrick, C., Askiak, L., & McCormick, C. (2020). Manufacturing of an Artificial Artery Graft and In-Vitro Testing Model for Cardiovascular Disease (2019). *Journal of Evolutionary Medicine*, 8(2), 1-3.

Paz, N. G., & D'Amore, P. A. (2009). Arterial versus venous endothelial cells. *Cell and Tissue Research*, 1(335), 5-16.

Pelliccia, F., Pasceri, V., Meoni, G., Pristipino, C., Cianfrocca, C., Li, X., ... & Richichi, G. (2009). Numbers of endothelial progenitor cells in peripheral blood are similar in younger and older patients with coronary artery disease. *International journal of cardiology*, 133(2), 277-279.

Peters, E. B. (2018). Endothelial progenitor cells for the vascularization of engineered tissues. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 24(1), 1-24.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Prater, D. N., Case, J., Ingram, D. A., & Yoder, M. C. (2007). Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*, 21(6), 1141.

Privratsky, J. R., & Newman, P. J. (2014). PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research*, 355(3), 607-619.

Quaschnig, T., Ruschitzka, F. T., Maier, W., & Lüscher, T. F. (2000). Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßerkrankungen. *Der Internist*, 41(4), 355-362.

Racanelli, V., & Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43(S1), S54-S62.

- Radke, D., Jia, W., Sharma, D., Fena, K., Wang, G., Goldman, J., & Zhao, F. (2018). Tissue engineering at the blood-contacting surface: A review of challenges and strategies in vascular graft development. *Advanced healthcare materials*, 7(15), 1701461.
- Ramm, B. (2013). *Physik und Physikalisches Praktikum: Mit Fehlerrechnung und Statistik Ein Lehrbuch speziell für MTA*. Springer-Verlag.
- Ravishankar, P., Tandon, I., & Balachandran, K. (2022). Effect of Cyclic Uniaxial Mechanical Strain on Endothelial Progenitor Cell Differentiation. *Cardiovascular Engineering and Technology*, 1-14.
- Reed, D. M., Paschalaki, K. E., Starke, R. D., Mohamed, N. A., Sharp, G., Fox, B., ... & Mitchell, J. A. (2015). An autologous endothelial cell: peripheral blood mononuclear cell assay that detects cytokine storm responses to biologics. *The FASEB Journal*, 29(6), 2595-2602.
- Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M., & March, K. L. (2003). Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 107(8), 1164-1169.
- Rein, H. (2013). *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag.
- Reinisch, A., & Strunk, D. (2009). Isolation and animal serum free expansion of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and endothelial colony forming progenitor cells (ECFCs). *Journal of visualized experiments: JoVE*, (32).
- Riess, F. C., Heller, S., Cramer, E., Awwad, N., Amin, W., Hansen, L., ... & Kremer, P. (2017). On-pump versus off-pump complete arterial revascularization using bilateral internal mammary arteries and the T-graft technique: clinical and angiographic results for 3,445 patients in 13 years of follow-up. *Cardiology*, 136(3), 170-179.
- Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 11(1), 73-91.
- Risau, W. (1998). Development and differentiation of endothelium. *Kidney International*, 54, S3-S6.
- Robb, A. O., Mills, N. L., Smith, I. B. J., Short, A., Tura-Ceide, O., Barclay, G. R., ... & Denison, F. C. (2009). Influence of menstrual cycle on circulating endothelial progenitor cells. *Human reproduction*, 24(3), 619-625.
- Rösen, P. (2002). Kardiologie. *Journal of Cardiology*, 9(12), 556-562.
- Rösen, P. (2008). Das Endothel als Thromboregulator. *Der Diabetologe*, 4(6), 416-424.
- Rossi, J., Rouleau, L., Tardif, J. C., & Leask, R. L. (2010). Effect of simvastatin on Kruppel-like factor2, endothelial nitric oxide synthase and thrombomodulin expression in endothelial cells under shear stress. *Life sciences*, 87(3-4), 92-99.
- Sabik III, J. F., Lytle, B. W., Blackstone, E. H., Houghtaling, P. L., & Cosgrove, D. M. (2005). Comparison of saphenous vein and internal thoracic artery graft patency by coronary system. *The Annals of thoracic surgery*, 79(2), 544-551.

- Sainson, R. C., Johnston, D. A., Chu, H. C., Holderfield, M. T., Nakatsu, M. N., Crampton, S. P., ... & Hughes, C. C. (2008). TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *111*(10), 4997-5007.
- Schäfer, R. (2018). Manufacture of endothelial colony-forming progenitor cells from steady-state peripheral blood leukapheresis using pooled human platelet lysate. *Transfusion*, *58*(5), 1132-1142.
- Scheraga, H. A. (2004). The thrombin–fibrinogen interaction. *Biophysical chemistry*, *112*(2-3), 117-130.
- Schmidt, R. F., Lang, F., & Heckmann, M. (Eds.). (2011). *Physiologie des menschen: mit pathophysiologie*. Springer-Verlag.
- Schnittler, H. J. (2000). Endothelial barrier function under laminar fluid shear stress. *Laboratory investigation*, *80*(12), 1819-1831.
- Schröpfer, S. (2005). *Veränderungen der mikrovaskulären Permeabilität und der inflammatorischen Reaktion nach koronarer Bypassoperation mit und ohne Verwendung der Herz-Lungen-Maschine* (Doctoral dissertation, lmu).
- Secomb, T. W. (2016). Hemodynamics. *Comprehensive physiology*, *6*(2), 975.
- Seebach, J., Dieterich, P., Luo, F., Schillers, H., Vestweber, D., Oberleithner, H., ... &
- Sen, A., Singh, A., Roy, A., Mohanty, S., Naik, N., Kalaivani, M., & Ramakrishnan, L. (2022). Role of endothelial colony forming cells (ECFCs) Tetrahydrobiopterin (BH4) in determining ECFCs functionality in coronary artery disease (CAD) patients. *Scientific Reports*, *12*(1), 1-18.
- SenBanerjee, S., Lin, Z., Atkins, G. B., Greif, D. M., Rao, R. M., Kumar, A., ... & Jain, M. K. (2004). KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *The Journal of experimental medicine*, *199*(10), 1305-1315.
- Seong, J. H., Song, Y. S., Joo, H. W., Park, I. H., Shen, G. Y., Shin, N. K., ... & Kim, K. S. (2020). Modified method for effective primary vascular smooth muscle progenitor cell culture from peripheral blood. *Cytotechnology*, *72*(5), 763-772.
- Settmacher, U., Diener, H., & Debus, E. S. (2020). Vaskuläre Transplantationschirurgie. In *Operative und interventionelle Gefäßmedizin* (pp. 1159-1167). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shafiq, M., Zhang, Q., Zhi, D., Wang, K., Kong, D., Kim, D. H., & Kim, S. H. (2018). In situ blood vessel regeneration using SP (Substance P) and SDF (Stromal Cell–Derived Factor)-1 α peptide eluting vascular grafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *38*(7), e117-e134.
- Shah, S., & Kang, K. T. (2018). Two-cell spheroid angiogenesis assay system using both endothelial Colony forming cells and Mesenchymal stem cells. *Biomolecules & therapeutics*, *26*(5), 474.

She, M., McGuigan, A. P., & Sefton, M. V. (2007). Tissue factor and thrombomodulin expression on endothelial cell-seeded collagen modules for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(2), 497-504.

Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells*, 32(6), 1380-1389.

Siegel, G., Fleck, E., Elser, S., Hermanutz-Klein, U., Waidmann, M., Northoff, H., ... & Schäfer, R. (2018). Manufacture of endothelial colony-forming progenitor cells from steady-state peripheral blood leukapheresis using pooled human platelet lysate. *Transfusion*, 58(5), 1132-1142.

Siewert, J. R., & Brauer, R. B. (2007). *Basiswissen Chirurgie*. Springer-Verlag.

Simper, D., Stalboerger, P. G., Panetta, C. J., Wang, S., & Caplice, N. M. (2002). Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 106(10), 1199-1204.

Sipos, P. I., Bourque, S. L., Hubel, C. A., Baker, P. N., Sibley, C. P., Davidge, S. T., & Crocker, I. P. (2013). Endothelial colony-forming cells derived from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction are fewer and have reduced vasculogenic capacity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(12), 4953-4960.

Smadja, D. M., Melero-Martin, J. M., Eikenboom, J., Bowman, M., Sabatier, F., & Randi, A. M. (2019). Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 17(7), 1190.

Sorrentino, S., & Haller, H. (2011). Tissue engineering of blood vessels: how to make a graft. In *Tissue engineering* (pp. 263-278). Springer, Berlin, Heidelberg.)

Stanislowski, N., Cholewa, F., Heymann, H., Kraus, X., Heene, S., Witt, M., ... & Blume, H. (2020, July). Automated bioreactor system for the cultivation of autologous tissue-engineered vascular grafts. In *2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)* (pp. 2257-2261). IEEE.

Steffel, J., & Lüscher, T. F. (2010). Endothelzellen. In *Hämostaseologie* (pp. 97-104). Springer, Berlin, Heidelberg.

Stegemann, J. P., Kaszuba, S. N., & Rowe, S. L. (2007). Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue engineering*, 13(11), 2601-2613.

Steiner, S., Niessner, A., Ziegler, S., Richter, B., Seidinger, D., Pleiner, J., ... & Kopp, C. W. (2005). Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 181(2), 305-310.

Sugiyama, S., Kugiyama, K., Nakamura, S., Kataoka, K., Aikawa, M., Shimizu, K., ... & Libby, P. (2006). Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood. *Atherosclerosis*, 187(2), 351-362.

Takada, Y., Shinkai, F., Kondo, S., Yamamoto, S., Tsuboi, H., Korenaga, R., & Ando, J. (1994). Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 205(2), 1345-1352.

Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., ... & Asahara, T. (1999). Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine*, 5(4), 434-438.)

Tasev, D., Konijnenberg, L. S., Amado-Azevedo, J., van Wijhe, M. H., Koolwijk, P., & van Hinsbergh, V. W. (2016). CD34 expression modulates tube-forming capacity and barrier properties of peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells (ECFCs). *Angiogenesis*, 19(3), 325-338.

Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2020). Role of endothelial progenitor cells in vascular development, homeostatic maintenance of blood vessels and in injury-mediated reparative response. *Stem Cell Investigation*, 7.

Thilo, F., Vorderwülbecke, B. J., Marki, A., Krueger, K., Liu, Y., Baumunk, D., ... & Tepel, M. (2012). Pulsatile atheroprone shear stress affects the expression of transient receptor potential channels in human endothelial cells. *Hypertension*, 59(6), 1232-1240.

Tsioufis, C., Mantzouranis, E., Kalos, T., Konstantinidis, D., & Tousoulis, D. (2017). Risk factors of atherosclerosis: pathophysiological mechanisms. *Coronary Artery Disease: From Biology to Clinical Practice*,

Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., ... & Schwartz, M. A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437(7057), 426-431.

UKSH, 2022 : <https://www.uksh.de/herzchirurgie-luebeck/Operationsverfahren/Koronare+Bypasschirurgie.html> (Zuletzt aufgerufen: 20. Juni 2022)

Vallance, P., & Collier, J. (1997). Infection, inflammation, and infarction: does acute endothelial dysfunction provide a link?. *The Lancet*, 349(9062), 1391-1392.

van Thienen, J. V., Fledderus, J. O., Dekker, R. J., Rohlena, J., van IJendoorn, G. A., Kootstra, N. A., ... & Horrevoets, A. J. (2006). Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovascular research*, 72(2), 231-240.

Wallez, Y., & Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(3), 794-809.

Walpoth, B. H., Bergmeister, H., Bowlin, G. L., Kong, D., Rotmans, J. I., & Zilla, P. (Eds.). (2020). *Tissue-Engineered Vascular Grafts*. Springer.

Walter, D. H., Rittig, K., Bahlmann, F. H., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T., ... & Isner, J. M. (2002). Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving

mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 105(25), 3017-3024.

Wang, N., Miao, H., Li, Y. S., Zhang, P., Haga, J. H., Hu, Y., ... & Chien, S. (2006). Shear stress regulation of Krüppel-like factor 2 expression is flow pattern-specific. *Biochemical and biophysical research communications*, 341(4), 1244-1251.

Wang, K., Lin, R. Z., & Melero-Martin, J. M. (2019). Bioengineering human vascular networks: trends and directions in endothelial and perivascular cell sources. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), 421-439

Wang, C., Baker, B. M., Chen, C. S., & Schwartz, M. A. (2013). Endothelial cell sensing of flow direction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(9), 2130-2136.

Wang, C. H., Hsieh, I. C., Su Pang, J. H., Cherng, W. J., Lin, S. J., Tung, T. H., & Mei, H. F. (2011). Factors associated with purity, biological function, and activation potential of endothelial colony-forming cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(3), R586-R594.

Watson, T., Shantsila, E., & Lip, G. Y. (2009). Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *The Lancet*, 373(9658), 155-166.

Wenger, R., & Giraud, M. N. (2018). 3D printing applied to tissue engineered vascular grafts. *Applied Sciences*, 8(12), 2631.

Wolf D, Ley K. Immunität und Entzündung bei Arteriosklerose [Immunity and inflammation in atherosclerosis]. *Herz*. 2019;44(2):107-120. doi:10.1007/s00059-019-4790-y

Wu, P., Wang, L., Li, W., Zhang, Y., Wu, Y., Zhi, D., ... & Zhu, M. (2020). Construction of vascular graft with circumferentially oriented microchannels for improving artery regeneration. *Biomaterials*, 242, 119922.

Xue, L., & Greisler, H. P. (2003). Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *Journal of vascular surgery*, 37(2), 472-480.

Yamamoto, K., Takahashi, T., Asahara, T., Ohura, N., Sokabe, T., Kamiya, A., & Ando, J. (2003). Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *Journal of Applied Physiology*, 95(5), 2081-2088.

Yazdani, S. K., Tillman, B. W., Berry, J. L., Soker, S., & Geary, R. L. (2010). The fate of an endothelium layer after preconditioning. *Journal of vascular surgery*, 51(1), 174-183.

Yoder, M. C., Mead, L. E., Prater, D., Krier, T. R., Mroueh, K. N., Li, F., ... & Ingram, D. A. (2006). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 109(5), 1801-1809.

Yoder, M., & Ingram, D. (2005). *U.S. Patent Application No. 11/055,182*.

Yoshizumi, M., Abe, J. I., Tsuchiya, K., Berk, B. C., & Tamaki, T. (2003). Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases. *Journal of pharmacological sciences*, 91(3), 172-176.

Yu, C., Xing, M., Sun, S., Guan, G., & Wang, L. (2019). In vitro evaluation of vascular endothelial cell behaviors on biomimetic vascular basement membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110381.

Zerdali, 2019 (Betreute Masterarbeit: Untersuchung spenderspezifischer Einflüsse auf die Gewinnung endothelialer Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut. Masterarbeit im Fach Life Science. April – Oktober 2019)

Zhang, X., Wang, X., Keshav, V., Wang, X., Johanas, J. T., Leisk, G. G., & Kaplan, D. L. (2009). Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. *Biomaterials*, 30(19), 3213-3223.

Zhou, D., Liu, T., Wang, S., He, W., Qian, W., & Luo, G. (2020). Effects of IL-1 β and TNF- α on the Expression of P311 in Vascular Endothelial Cells and Wound Healing in Mice. *Frontiers in Physiology*, 1162.

Zilles, K., & Tillmann, B. (Eds.). (2011). *Anatomie*. Springer-Verlag.

Zwirner, U., Höffler, K., Pflaum, M., Korossis, S., Haverich, A., & Wiegmann, B. (2018). Identifying an optimal seeding protocol and endothelial cell substrate for biohybrid lung development. *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 12(12), 2319-2330.

Betreute Abschlussarbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten von mir geplant und betreut:

Gresa Hasani: Auswirkungen dynamischer Kultivierung von endothelialen Vorläufer-Zellen im Vergleich zu HUVECs auf EZM-Protein. Masterarbeit im Fach Life Science. Juli 2018 – Januar 2019. Teilergebnisse in Kapitel 4.1

Lale Zerdali: Untersuchung spenderspezifischer Einflüsse auf die Gewinnung endothelialer Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut. Masterarbeit im Fach Life Science. April – Oktober 2019. Teilergebnisse in Kapitel 4.1.

Kristina Miller: Einfluss von Scherstress auf die Differenzierung von endothelialen koloniebildenden Zellen (ECFCs) und die atheroprotektive Wirkung von Scherstress auf ECFCs. Bachelorarbeit im Fach Life Science. Juni – August 2020. Teilergebnisse in Kapitel 3.

Lea Finkbeiner: *In vitro* Differenzierung von *smooth muscle outgrowth cells* aus dem peripheren Blut. Masterarbeit im Fach Life Science, Januar – September 2021. Teilergebnisse in Kapitel 4.4

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Xenia Sabina Maria Kraus
Geburtsdatum/-ort 23.02.1991, Augsburg

Akademischer Werdegang

Seit 05/2018 Promotionsvorhaben im Fach Chemie: Institut für Technische Chemie, Gottfried-Wilhelm Leibniz Universität Hannover

04/2015-08/2017 Masterstudium, M.Sc. im Fach Medizingenieurwesen, Technische Universität Hamburg
Thema der Masterarbeit: Herstellung einer biodegradierbaren und biokompatiblen Folie auf Sol-Gel-Basis (durchgeführt am Fraunhofer IGB, Translationszentrum ‚Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen‘ TZKME, Würzburg)

10/2010-04/2015 Bachelorstudium, B.Sc. Medizintechnik, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
Thema der Bachelorarbeit: Mechanisch-dynamische Charakterisierung von Biopolymeren für kardiovaskuläre Pflaster

2010 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium bei St. Anna, Augsburg

Berufliche Erfahrungen

05/2018-07/2021 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

11/2016-08/2017 Wissenschaftliche Hilfskraft am Translationszentrum ‚Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen‘ TZKME, Würzburg

04/2016-10/2016 Projektarbeit am Institut für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose (INIMS) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in Kooperation mit dem DESY Hamburg

04/2015-10/2016 Werkstudentin in der Abteilung Tower and Software Design, Siemens Wind Power, Hamburg

01/2015-03/2015 Werkstudentin in der Abteilung Forschung und Entwicklung von Magnetresonanztomographen Siemens Healthcare, Erlangen

Absolvierte Praktika

- | | |
|-----------------|--|
| 09/2015 | Klinisches Praktikum Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| 11/2014 | Klinisches Praktikum im Universitätsklinikum Erlangen |
| 09/2014-10/2014 | Praktikum in der Abteilung Forschung und Entwicklung von
Magnetresonanztomographen Siemens Healthcare, Erlangen |

Sonstiges

- | | |
|-----------------|---|
| 09/2017-04/2018 | Orientierungs- und Bewerbungsphase mit dem Ziel einer Promotion |
|-----------------|---|

Publikationsliste

Akzeptierte wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Kraus, X. (80 %), van de Flierdt, E., Renzelmann, J., Thoms, S., Witt, M., Scheper, T., & Blume, C. (2022): Peripheral Blood Derived Endothelial Colony Forming Cells as Suitable Cell Source for Pre-Endothelialization of Arterial Vascular Grafts Under Dynamic Flow Conditions. *Microvascular research*, accepted: 15.06.2022

Blume, C., **Kraus, X. (15 %)**, Heene, S., Loewner, S., Stanislawski, N., Cholewa, F., & Blume, H. (2022). Vascular implants—new aspects for in situ tissue engineering. *Engineering in Life Sciences*, 22(3-4), 344-360.

Kraus, X. (80 %), Pflaum, M., Thoms, S., Jonczyk, R., Witt, M., Scheper, T., & Blume, C. (2021): A pre-conditioning protocol of peripheral blood derived endothelial colony forming cells for endothelialization of tissue engineered constructs. *Microvascular research*, 134, 104107.

Stanislawski, N., Cholewa, F., Heymann, H., **Kraus, X. (10 %)**, Heene, S., Witt, M., Thoms, S., Blume C. & Blume, H. (2020, July). Automated bioreactor system for the cultivation of autologous tissue-engineered vascular grafts. In *2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)* (pp. 2257-2261). IEEE.

Eingereichte wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Heene, S.*, **Kraus, X.* (20%)**, Renzelmann, J.*, Stanislawski, N., Cholewa, F., Moosmann, P., Pissarek, JW., Blume, H., Scheper, T., & Blume, C. (2022). Controlled cultivation of seeded vascular scaffolds in an intelligent rotating bioreactor system. *Engineering in Life Science*

Konferenzbeiträge:

Vorträge:

Kraus, X., Cholewa, F.: Generation of a Biohybrid Vascular Structure, International Conference on Biomedical Technology (ICBT) Hannover (2019)

Kraus, X., Pflaum, M., Thoms, S., Jonczyk, R., Scheper, T., Blume, C.

Analyses of autologous endothelial colony forming cells under different shear stress applications. International Cell Culture Under Flow Meeting, München (2020).

Posterbeiträge:

Kraus, X., Pflaum, M., Thoms, S., Jonczyk, R., Witt, M., Scheper, T., Blume, C.: Autologous ECFCs as promising cell source for endothelialization of TEVGs. 3D Cell Culture Conference, Freiburg (2021).

Heene, S., Thoms, S., **Kraus, X.**, Jonczyk R., Scheper, T., Blume, C.: Forming of tubular structures inside porous polydioxanone and PLLA/PLGA scaffolds. 3D Cell Culture Conference, Freiburg (2018).

Heene, S., Loewner, S., Stanislawski, N., Thoms, S., **Kraus, X.**, Jonczyk R., Scheper, T., Blume, H., Blume, C.: Vascular networks for 3D printed scaffolds or microporous scaffolds generated by porogen leaching. Annual Meeting of the International Society for Biofabrication, Würzburg (2018)