

Kultivierungsstrategien zur Entwicklung bioartifizieller Gefäßprothesen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Stefanie Thoms, M. Sc.
geboren am 11.10.1987 in Greifswald

2019

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin: Apl. Prof. Dr. Cornelia A. Blume
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 21.01.2019

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Scheper für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Technische Chemie durchführen zu können sowie für das interessante Forschungsthema. Besonders herzlich danke ich auch Frau Prof. Dr. Cornelia Blume für die fachliche Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen während der Promotion sowie für die Übernahme des Koreferats.

Darüber hinaus gilt mein herzlichster Dank Dr. Rebecca Jonczyk für die fürsorgliche Betreuung und die tatkräftige Hilfestellung in allen theoretischen und praktischen Belangen während der gesamten Arbeit. Vielen Dank für deinen Optimismus sowie für die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des TCI für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Der gesamten Zellkultur und besonders Dr. Antonina Lavrentieva sowie Elsa Friehs danke ich für die angenehme Zusammenarbeit in den vielen gemeinsamen Laborstunden. Martin Witt und Martin Pähler danke ich für die Unterstützung rund um die qRT-PCR. Vielen Dank auch an Martina Weiß, Ulrike Dreschel und Cornelia Alic für ihre Hilfsbereitschaft in allen Bereichen des Institutsalltags. Michaela Dehne und Valerie Oyono Nkolo danke ich für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten.

Meinen Bürokollegen im TCI und im NIFE, Didem, Harsh, Xenia, Nina, Sebastian, Tracy, Martin und Tim möchte ich für die schöne Zeit, die tollen Gespräche und hilfreichen Ratschläge danken. Außerdem möchte ich meinen Freunden außerhalb des TCI für die gemeinsam verbrachte Zeit und ihre moralische Unterstützung danken. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet.

Mein persönlicher und besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Freund Till. Danke für eure bedingungslose Unterstützung, eure Geduld und euer Verständnis sowie das Vertrauen, dass ihr mir entgegengebracht habt.

Kurzzusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Strategien für die Erstellung und Kultivierung bioartifizieller, patientenspezifischer (autologer) Gefäßprothesen, die als Gefäßersatz benötigt werden. Zunächst wurde untersucht, ob eine immunsuppressive Therapie, die nach der Transplantation körperfremder Gefäßprothesen notwendig ist, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, einen Einfluss auf das Endothel (innere Gefäßauskleidung) eines Patienten hat. Die Ergebnisse zeigten, dass das Immunsuppressivum Tacrolimus eine dosisabhängige Toxizität auf Endothelzellen aufweist. Trotz unveränderter Zellvitalität hatte bereits eine Tacrolimuskonzentration von 18 ng/ml, die dem maximalen Talspiegel bei Standarddosierungen nach einer Organtransplantation entspricht, negative Auswirkungen auf die 3D-Sphäroidstruktur sowie die Formation kapillarähnlicher Strukturen von Endothelzellen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass patientenspezifische Gefäßprothesen benötigt werden, da nach deren Implantation auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet werden kann.

Stammzellen aus dem Fettgewebe (AD-hMSCs) sind eine gut verfügbare autologe Zellquelle für das Endothel einer bioartifiziellen Gefäßprothese, wenn diese zu Endothelzellen differenziert werden können. Die Untersuchung des Differenzierungspotentials ergab, dass eine stabile Differenzierung der AD-hMSCs in Endothelzellen nicht beobachtet werden konnte, auch wenn die AD-hMSCs Merkmale reifer Endothelzellen aufwiesen. Es konnte jedoch erfolgreich gezeigt werden, dass die AD-hMSCs aufgrund ihrer parakrinen Eigenschaften, vor allem unter dynamisch-hypoxischen Kultivierungsbedingungen, angiogene Faktoren in das Zellkulturmedium sezernieren. Die Wirkung angiogener Faktoren auf die Bildung kapillarähnlicher Strukturen wurde in einer Kokultivierung von AD-hMSCs und HUVECs untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine indirekte Kokultur, in der AD-hMSCs und HUVECs räumlich getrennt, unter Verwendung des gleichen konditionierten Mediums kultiviert wurden, *in vitro* eine signifikant erhöhte Formation kapillarähnlicher Strukturen hervorrief, im Vergleich mit der indirekten Kokultur in unkonditioniertem Medium.

Zudem wurde gezeigt, dass die dynamische Kultivierung von Endothelzellen auf Fibrinogenbeschichteten Oberflächen unter Scherspannungen von 5 dyn/cm² und 20 dyn/cm² eine erfolgreiche Ausrichtung der Zellen entlang der laminaren Strömung bewirkte, sowie physiologische Bedingungen widerspiegelte und für eine Kultivierung und Konditionierung in ein geeignetes Reaktorsystem übertragen werden kann.

Schlagworte: bioartifizielle Gefäßprothese, Tacrolimus, hMSCs, Kokultur, Scherstress

Abstract

The objective of this work was the development of strategies for the generation and cultivation of bioartificial patient-specific vascular prostheses, which are needed as vascular grafts and which can be cultivated extra-corporally in a suitable reactor system. First, it was investigated whether an immunosuppressive therapy, which is necessary after transplantation of allogenic vascular prostheses in order to prevent rejections, has an influence on the endothelium (inner vessel lining) of a patient. It has been shown, that the immunosuppressant tacrolimus has a dose-dependent toxicity towards endothelial cells. Despite of unaltered cell viability, even a tacrolimus concentration of 18 ng/ml, corresponding to the maximum trough level in the standard therapy after organ transplantation, had adverse effects on endothelial 3D-spheroid structure and formation of capillary-like structures.

Stem cells derived from adipose tissue (AD-hMSCs) are an available autologous cell source for the endothelium of a bioartificial vascular prosthesis, if they show potential for differentiation into endothelial cells. The results indicate that stable differentiation of AD-hMSCs into endothelial cells was not observed under the defined culture conditions, although the AD-hMSCs exhibited mature endothelial cell characteristics. However, it could be demonstrated successfully that AD-hMSCs secrete angiogenic factors into the cell culture medium due to their paracrine properties, especially during dynamic-hypoxic cultivation. The effect of secreted angiogenic factors on the formation of capillary-like structures was investigated in a co-cultivation of AD-hMSCs and HUVECs. The results showed, that indirect co-culture, in which AD-hMSCs and HUVECs were spatially separated but using the same conditioned medium, exhibited a significantly increased formation of capillary-like structures *in vitro* as compared with an indirect co-culture in unconditioned medium.

In addition, dynamic cultivation of endothelial cells on fibrinogen coated surfaces under shear stresses of 5 dynes/cm² and 20 dynes/cm² was shown to cause successful alignment of the cells with the laminar flow, and therefore this experimental setting reflected physiological conditions. These can be transferred in a suitable reactor system for cultivation and conditioning of the cells.

Keywords: bioartificial vascular graft, tacrolimus, hMSCs, Co-culture, shear stress

Publikationsliste

Akzeptierte wissenschaftliche Veröffentlichungen

- 2018 **Thoms, S. (90 %)**, Ali, A.I., Jonczyk, R., Scheper, T., Blume, C.: *Tacrolimus inhibits angiogenesis and induces disaggregation of endothelial cells in spheroids - Toxicity testing in a 3D cell culture approach*. *Toxicology In Vitro*, 53, 10-19
- 2016 **Thoms, S. (70 %)**, Lavrentieva, A., Jonczyk, R., Blume, C.: *Analyse des Mikromilieus künstlicher Gewebe mit Protein-Multiplex-Assay*. *Biospektrum*, 22 (5), 471-474
- 2016 Möller, K., Ostermann, A., Rund, K., **Thoms, S. (10 %)**, Blume, C., Stahl, F., Hahn, A., Schebb, N., Schuchardt, J.: *Influence of weight reduction on blood levels of C-reactive protein, tumor necrosis factor α , interleukin-6, and oxylipins in obese subjects*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 106, 39-49

Wissenschaftliche Veröffentlichungen eingereicht

- 2018 **Thoms, S. (90 %)**, Witt, M., Jonczyk, R., Scheper, T., Blume, C.: *Dynamic-hypoxic conditioning of AD-hMSCs and co-culturing with HUVECs favors endothelial network formation*. *Tissue Engineering Part A*

Konferenzbeiträge

Vorträge (internationale Konferenz)

- 2015 4th International Conference - Strategies in Tissue Engineering, Würzburg
Thoms, S., Ritter, P., Lavrentieva, A., Scheper, T., Blume, C.: *Proangiogenic markers in starved adipogenic stem cells*

Posterbeiträge

- 2018 International Conference on Biofabrication, Würzburg
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*

- 2018 Dechema 3D Cell Culture, Freiburg
Heene, S., Thoms, S., Kraus, X., Jonczyk, R., Scheper, T., Blume, C.: *Forming of tubular structures inside porous polydioxanon and PLLA/PLGA scaffolds*
- 2017 Global Biotechnology Congress, Boston
Thoms, S., Oyono, V., Jonczyk, R., Scheper, T., Blume, C.: *Tubular-like structure formation of HUVECs in a co-cultivation system with hMSCs*
- 2017 International Symposium of Biofabrication, Hannover
Thoms, S., Oyono, V., Jonczyk, R., Scheper, T., Blume, C.: *Tubular-like structure formation of HUVECs in a co-cultivation system with hMSCs*
- 2016 3rd Conference on Impedance-Based Cellular Assays, Regensburg
Thoms, S., Friehs, E., Lavrentieva, A., Scheper, T., Blume, C.: *Impedance Sensing of HUVECs after Tacrolimus Treatment*
- 2015 ATMP – Issues and Challenges from Bench to Bedside, Tutzing
Thoms, S., Ritter, P., Lavrentieva, A., Scheper, T., Blume, C.: *Influence of Starvation on Upregulation of Intracellular Proangiogenic Markers in Adipose Tissue-derived Stem Cells*
- 2015 1st International Symposium of BIOFABRICATION and the International Interdisciplinary Alliance against Implant-Related Infections (I4A), Hannover
Thoms, S., Ritter, P., Lavrentieva, A., Scheper, T., Blume, C.: *Analysis of Intracellular Proangiogenic Markers in Starved Adipose Tissue-derived Stem Cells*
- 2015 World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig
Thoms, S., Ritter, P., Lavrentieva, A., Scheper, T., Blume, C.: *Proangiogenic markers in starved adipogenic stem cells*

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzzusammenfassung	II
Abstract	III
Publikationsliste	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	2
3 Theoretischer Teil	3
3.1 Grundlagen der Vaskularisierung	3
3.1.1 Aufbau physiologischer Blutgefäße	3
3.1.2 Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese.....	5
3.1.3 Molekulare Mechanismen der Angiogenese	7
3.1.4 Vasculäres Endothel und der Einfluss von Scherstress	11
3.2 Tissue Engineering	14
3.2.1 Entwicklung von bioartifiziellen Gefäßprothesen und Anforderungen	15
3.2.1.1 Immunsuppressiva: Wirkmechanismen von Tacrolimus und Mycophenolsäure.....	19
3.2.2 Prävaskularisierung in der Gewebezüchtung	20
3.2.2.1 Kokultivierung von Endothelzellen und hMSCs.....	22
3.2.2.2 Einfluss der Kultivierungsparameter auf die Produktion angiogener Faktoren in hMSCs	23
4 Ergebnisse und Diskussion	26
4.1 Analyse der Toxizität von Immunsuppressiva auf HUVECs	27
4.1.1 Zytotoxizitätsbestimmung von Tacrolimus und Mycophenolsäure in 2D	27
4.1.2 Etablierung von HUVEC-Sphäroiden zur 3D-Toxizitätstestung von Tacrolimus	30
4.1.3 Auswirkung von Tacrolimus auf die Sphäroidmorphologie.....	35
4.1.4 Auswirkung von Tacrolimus auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen.....	39
4.1.5 Schlussfolgerung.....	42
4.2 Expressionsverhalten von AD-hMSCs unter definierten Kultivierungsbedingungen..	44
4.2.1 Metabolische Aktivität von hMSCs unter statischen, dynamischen, normoxischen und hypoxischen Bedingungen	45
4.2.2 Endotheliales Differenzierungspotential von Stammzellen aus dem Fettgewebe	47
4.2.3 Nachweis von angiogenen und inflammatorischen Biomarkern auf Proteinebene	55
4.2.4 Molekularer Nachweis von angiogenen Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen mittels qRT-PCR	64

4.2.4.1	Evaluation der potentiellen Referenzgene.....	65
4.2.4.2	Genexpressionsprofile unter dynamisch-normoxischer und dynamisch-hypoxischer Kultivierung von AD-hMSCs.....	65
4.2.5	Schlussfolgerung.....	69
4.3	Charakterisierung der Angiogenese anhand der Bildung von kapillarähnlichen Strukturen.....	70
4.3.1	Kokultivierung von HUVECs und AD-hMSCs in 2D.....	71
4.3.2	Kokultur von HUVECs und AD-hMSCs auf einer 3D-Gerüststruktur.....	79
4.3.3	Schlussfolgerung.....	82
4.4	Etablierung einer dynamischen Kultivierung von HUVECs	83
4.4.1	Ermittlung der dynamischen Viskosität des Kulturmediums	84
4.4.2	Optimierung der Oberflächenbeschichtung und der Besiedlungszellzahl	86
4.4.3	Auswirkung von definiertem Scherstress auf HUVECs.....	92
4.4.3.1	Zellmorphologie, Ausrichtung der Aktinfilamente und Einfluss auf Zell-Zell-Verbindungen	94
4.4.3.2	Impedanzanalysen mittels ECIS	100
4.4.4	Schlussfolgerung.....	108
5	Zusammenfassung und Ausblick	109
6	Anhang.....	114
6.1	Ergänzendes Material	114
6.2	Material.....	116
6.2.1	Chemikalien.....	116
6.2.2	Puffer	117
6.2.3	Analyse-Kits	118
6.2.4	Primer, Enzyme, Größenstandard und Elektrophorese.....	119
6.2.5	Antikörper.....	120
6.2.6	Verbrauchsmaterial.....	120
6.2.7	Geräte	121
7	Methoden.....	124
7.1	Zellkultur	124
7.1.1	Grundlagen der Zellkulturtechnik	124
7.1.1.1	Revitalisierung von Primärzellen.....	124
7.1.1.2	Kultivierung und passagieren von Primärzellen.....	124
7.1.1.3	Kryokonservierung von Primärzellen	125
7.1.2	Toxizitätstestung in 2D und 3D sowie Etablierung und Kultivierung von Sphäroiden ..	126
7.1.3	Angiogenese Assay.....	126
7.2	Analyse der Zellvitalität und Zellviabilität von primären Zellen	127
7.2.1	CellTiter Blue Assay (CTB).....	127

7.2.2	Nachweis von Apoptose (Caspase 3/7)	128
7.2.3	Nachweis von Nekrose (Lactatdehydrogenase).....	128
7.2.4	Zellfärbung mittels Calcein-Acetoxyethyl und Propidiumiodid.....	129
7.3	Metabolismus und Expressionsverhalten der AD-hMSCs	129
7.3.1	Konditionierung von AD-hMSCs	129
7.3.2	Glukose-Verbrauch und Laktat-Produktion	130
7.3.3	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	131
7.3.4	Primerdesign	131
7.3.5	Gradienten PCR	131
7.3.6	Agarosegelelektrophorese	132
7.3.7	qRT-PCR	132
7.3.8	Proteinisolation	134
7.3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test	134
7.3.10	BioPlex Multiplex Immunoassay	135
7.4	Kokultivierung von HUVECs und AD-hMSCs.....	135
7.4.1	Kokultivierung in einem zweidimensionalen Ansatz	136
7.4.2	Kokultivierung in einem dreidimensionalen Ansatz	136
7.5	Dynamische Kultivierung von HUVECs	137
7.5.1	Viskositätsbestimmung mittels Rheometer	137
7.5.2	Beschichtung, Besiedlung und Kultivierung in Durchflusskammern	138
7.5.3	Impedanzmessung (ECIS).....	139
7.6	Zellfärbung und Immunfluoreszenz	140
7.6.1	Fixierung der Zellen.....	140
7.6.2	Zellfärbung mittels DAPI/Hoechst.....	141
7.6.3	VE-Cadherin Färbung	141
7.6.4	Phalloidin-Färbung	142
7.6.5	vWF-Färbung.....	142
7.6.6	Kollagen-Färbung	142
7.6.7	CD31-Färbung	143
7.6.8	Statistische Auswertung.....	143
	Abbildungsverzeichnis	144
	Tabellenverzeichnis	151
	Literaturverzeichnis.....	152
	Lebenslauf	172

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
AD-hMSCs	hMSCs aus dem Fettgewebe (<i>engl.: adipose-tissue derived hMSCs</i>)
AM	Acetoxymethyl
Ang1	Angiopoetin 1
Ang2	Angiopoetin 2
α -MEM	alpha Minimum Essential Medium
AU	<i>arbitrary units</i>
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve eines Pharmakons im Blut (<i>engl.: area under the curve</i>)
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>engl.: basic Fibroblast growth factor</i>)
BME	Basalmembran-Extrakt aus der Engelbreth-Holm-Swarm Zelllinie
BM-hMSCs	hMSCs aus dem Knochenmark (<i>engl.: bone marrow-derived hMSCs</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
B2M	β 2-Mikroglobulin
C	Kapazität
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethyl
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: complementary desoxyribonucleic acid</i>)
cm	Zentimeter
CNIs	Calcineurin-Inhibitoren
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTB	CellTiter-Blue Cell Viability Assay
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DH	dynamisch-hypoxisch

DLL4	<i>delta-like protein 4</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dynamisch-normoxisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dyn	physikalische Einheit für die Kraft
ECIS	elektrische Zell-Substrat-Impedanzmessung (<i>engl.: electric cell-substrate impedance sensing</i>)
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm Zelllinie
EPCs	endotheliale Vorläuferzellen (<i>engl.: endothelial progenitor cells</i>)
EZM	extrazelluläre Matrix
<i>f</i>	Frequenz
F	Kraft
F-Aktin	filamentöse Form der Aktinfilamente
FKBP12	<i>FK506-binding protein 12</i>
FKS	fetales Kälberserum
FK506	Tacrolimus
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (<i>engl.: hepatocyte growth factor</i>)
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor (<i>engl.: hypoxia-inducible factor</i>)
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
HS	Humanserum
HUVECs	Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (<i>engl.: human umbilical vein endothelial cells</i>)
I	Wechselstrom
ICAM-1	interzelluläres Zelladhäsions-molekül-1 (<i>engl.: intercellular adhesion molecule 1</i>)
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (<i>engl.: insulin-like growth factor 1</i>)
IL-2	Interleukin-2 (<i>engl.: interleukin-2</i>)

IL-6	Interleukin-6 (<i>engl.: interleukin-6</i>)
IL-8	Interleukin-8 (<i>engl.: interleukin-8</i>)
IL-10	Interleukin-10 (<i>engl.: interleukin-10</i>)
IMPDH	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
MCP-1	Monozytenattraktionsprotein-1 (<i>engl.: monocyte chemoattractant protein 1</i>)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µ	Viskosität
mM	Millimolar
MMPs	Matrix-Metalloproteasen (<i>engl.: matrix metalloproteinases</i>)
MPA	Mycophenolsäure (<i>engl.: mycophenolic acid</i>)
mPA	Millipascal
mRNA	Boten-RNA (<i>engl.: messenger ribonucleic acid</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	nukleären Faktor von aktivierten T-Lymphozyten (<i>engl.: nuclear factor of activated T-cells</i>)
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
PDGF-bb	thrombozytären Wachstumsfaktors BB (<i>engl.: platelet derived growth factor BB</i>)
PDGFRβ	Rezeptor β des thrombozytären Wachstumsfaktors (<i>engl.: platelet derived growth factors receptor β</i>)
PECAM-1	Plättchenadhäsionsmolekül-1 (<i>engl.: platelet endothelial adhesion molecule 1</i>)

PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PGE2	Prostaglandin E2
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PLGF	Plazenta-Wachstumsfaktor (<i>engl.: Placental growth factor</i>)
PLLA	Polymilchsäure (<i>engl.: poly-L-lactic acid</i>)
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Flüssigkeitsstrom
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (<i>engl.: real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
r	Radius
R	Widerstand
RPL13A	ribosomales Protein L13a
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: rounds per minute</i>)
sec	Sekunde
SFRP2	sekretiertes <i>frizzled-related</i> Protein 2
SH	statisch-hypoxisch
SN	statisch-normoxisch
sTie-2	löslicher Angiopoetin-2 Rezeptor (<i>engl.: soluble angiopoetin 2 receptor</i>)
sVEGFR-1	Rezeptor 1 des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (<i>engl.: soluble vascular endothelial growth factor receptor 1</i>)
sVEGFR-2	Rezeptor 2 des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (<i>engl.: soluble vascular endothelial growth factor receptor 2</i>)
τ	Scherstress/Scherspannung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	TATA-bindendes Protein (<i>engl.: TATA-binding protein</i>)
TE	Tris-EDTA
TGF β	transformierender Wachstumsfaktor β (<i>engl.: transforming growth factor β</i>)
THBS-1	Thrombospondin 1

TIMPs	Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (<i>engl.: metalloproteinase inhibitor 1</i>)
UC-hMSCs	hMSCs aus der Nabelschnur (<i>engl.: umbilical cord-derived hMSCs</i>)
V	Potential
VCAM-1	vaskuläres Zell-adhäsionsmolekül-1 (<i>engl.: vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VE-Cadherin	vaskuläres endotheliales Cadherin (<i>engl.: vascular endothelial-Cadherin</i>)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>engl.: vascular endothelial growth factor</i>)
VPF	vaskulärer Permeabilitätsaktivator (<i>engl.: vascular permeability factor</i>)
vWF	von-Willbrand-Faktor
YWHAZ	Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase- Aktivierungsprotein Zeta-Polypeptid
Z	Impedanz

1 Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind laut der WHO mit 17,5 Millionen Todesfällen (31%) jährlich die häufigste Todesursache weltweit. In einer zunehmend alternden Gesellschaft treten vor allem arteriosklerotische Krankheitsbilder immer häufiger auf. Die mit Gefäßverkalkungen einhergehenden Verengungen von Arterien werden durch Aufweitung mittels Ballonkathetern und durch die Implantation von Stents therapiert, während der Verlust von Arterien operativ durch den Einsatz von synthetischen oder Venen-Bypässen behandelt wird. Dabei werden präferiert autologe, also patienteneigene venöse Gefäße für den Ersatz der geschädigten Gefäßsegmente verwendet, da diese keine Abwehrreaktion des Immunsystems hervorrufen. Stehen diese aufgrund des Alters- und Gesundheitszustandes des Patienten nicht zur Verfügung, kommen überwiegend synthetische Prothesen z. B. aus Polytetrafluoroethylen (PTFE) zum Einsatz. Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung, der mechanischen Eigenschaften und Porosität besitzen diese aber eine eingeschränkte Bioverträglichkeit. Zudem ist ihre Implantation immer mit der Notwendigkeit einer gerinnungshemmenden Therapie mit allen denkbaren Komplikationen verbunden. Vor allem beim Ersatz kleinerer Gefäße können diese Fremdmaterialien zu ausgeprägten Thrombosen und Infektionen führen, wodurch eine langfristige Integration in den Organismus und ausreichende Funktionalität der synthetischen Gefäßprothese nicht gegeben ist. Aus diesem Grund besteht ein hoher Bedarf an der Entwicklung von patientenspezifischen bioartifiziellen Gefäßprothesen die Vorteile autologer Gefäße aufweisen.

Das interdisziplinäre Forschungsgebiet des Tissue Engineering beschäftigt sich mit der Entwicklung bioartifizieller Gewebestrukturen in einem Kultivierungsprozess außerhalb des Organismus, die als funktioneller Ersatz für krankes Gewebe dienen. Die Kombination der strukturgebenden Vorteile künstlicher Materialien mit der biologischen Funktionalität autologer Zellen soll eine Anpassung der Gewebestrukturen an die individuelle Patientensituation ermöglichen. Neben der Wahl eines geeigneten Stützmaterials ist auch die Auswahl geeigneter Zellen, für die Besiedlung des Stützmaterials, eine Herausforderung, die überwunden werden muss. Die Zellen dürfen keine Reaktion des Immunsystems hervorrufen, müssen ein schnelles Wachstum sowie eine spezifische biologische Funktion innerhalb der bioartifiziellen Gefäßprothese aufweisen und zusätzlich leicht aus dem Körper zu isolieren sein. Zudem müssen die Kultivierungsbedingungen denen im Organismus entsprechen, um eine entsprechende Konditionierung der Zellen zu ermöglichen.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von Kultivierungsstrategien, welche für die Entwicklung einer bioartifiziellen, patientenspezifischen Gefäßprothese genutzt werden sollen.

Ein Hauptziel ist die Wahl einer geeigneten autologen Zellquelle. Mesenchymale Stammzellen besitzen eine pluripotente Differenzierbarkeit, auch wenn diese je nach den Subklassen dieser Zellpopulation unterschiedlich nachhaltig ausgeprägt ist. Daher soll zunächst die nachhaltige Differenzierung von Stammzellen aus dem Fettgewebe (AD-hMSCs) in Endothelzellen untersucht werden, um als autologe Zellquelle für die Besiedlung des Gefäßkonstruktes zur Verfügung zu stehen.

Als weiteres Ziel sollen für die spätere Kultivierung des Gefäßkonstruktes in einem geeigneten Reaktorsystem Strategien für die Besiedlung der Gerüststruktur mit Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVECs) und AD-hMSCs sowie die anschließende Kultivierung dieser entwickelt und etabliert werden.

Zusätzlich wird der Einfluss definierter Scherspannung auf HUVECs in einem zweidimensionalen Versuchsaufbau untersucht, um physiologische Kultivierungsbedingungen für die Übertragung auf ein geeignetes Reaktorsystem zu evaluieren und dadurch das zelluläre Wachstum auf vaskulären Implantaten zu optimieren.

3 Theoretischer Teil

3.1 Grundlagen der Vaskularisierung

Das Blutgefäßsystem, das sich während der embryonalen Phase als erstes Organsystem ausbildet, ist essenziell für die Versorgung der umliegenden Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Entwicklung des menschlichen Gefäßsystems wird maßgeblich durch zwei unterschiedliche Mechanismen gesteuert: Vaskulogenese und Angiogenese [1]. Die Vaskulogenese beschreibt die Gefäßneubildung während der Embryogenese [2]. Als Angiogenese wird die Bildung und das Wachstum neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen definiert, sowie auch die Umgestaltung des Gefäßnetzwerks [3, 4].

3.1.1 Aufbau physiologischer Blutgefäße

Die Bildung von Blutgefäßen, gesteuert durch Vaskulogenese und Angiogenese, führt im Organismus zur Ausbildung eines vaskulären Netzwerks, das Kapillaren, Arteriolen, Arterien, Venolen und Venen umfasst [5]. Die in angiogenen Prozessen neu gebildeten Kapillaren haben einen Durchmesser von $<10\ \mu\text{m}$, während Arteriolen bereits einen Durchmesser von $10\text{-}50\ \mu\text{m}$ aufweisen [5, 6]. Kapillaren und Arteriolen bestehen aus einer Einzell-Endothelschicht, die durch die Basalmembran umhüllt wird. Der Reifeprozess von Blutgefäßen wird durch die Fähigkeit der Endothelzellen, mechanische Kräfte wahrzunehmen, beeinflusst [7]. Nach der Lumenbildung (Bildung eines Hohlraums) steuern hämodynamische Faktoren wie der beginnende Blutfluss und -druck die Entwicklung der Gefäße [8]. Die entstehenden Scherkräfte werden von Mechanorezeptoren (Integrine, Plättchenadhäsionsmolekül-1 (PECAM-1) und weiteren Adhäsionsmolekülen wie Cadherinen) der Endothelzellen wahrgenommen und rekrutieren durch Expression des thrombozytären Wachstumsfaktors B (PDGFB) perivaskuläre glatte Muskelzellen [8-10]. Vaskuläre glatte Muskelzellen in der Gefäßwand bewirken die aktive Kontraktion der Gefäße [11]. Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Blutgefäßen korrelieren dabei stark mit der Stärke der Vasokonstriktion (Gefäßverengung) sowie den hämodynamischen Kräften und bestimmen die Größe des Gefäßlumens [11]. Im adulten Gefäßsystem reagieren die bereits assoziierten Muskelzellen direkt auf den Anstieg des hämodynamischen Drucks [5, 12]. Hohe Scherspannungen und Drücke aktivieren die vermehrte Rekrutierung von

glatten Muskelzellen, damit die Umfangsdehnung des Gefäßes abgedämpft wird [5]. Zudem wird in der extrazellulären Matrix (EZM) vermehrt Elastin eingelagert, um die Elastizität der Gefäße zu erhöhen, während bei kleinen Arteriolen weniger Elastin in der EZM eingelagert ist [5].

Blutgefäße haben eine konzentrische Schichtstruktur, wobei jede Schicht in ihrer Zell- und Proteinzusammensetzung verschieden ist [13]. Grundlegend bestehen größere Gefäße aus drei Schichten [14]. Diese gliedern sich von innen nach außen in *Tunica interna* oder *Intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* [14]. Die Intima besteht ihrerseits aus einer Einzell-Endothelschicht zur inneren Auskleidung der Blutgefäße [14]. Eine intakte Endothelschicht ist wichtig, um die Thrombenbildung zu verhindern, das darunterliegende Gewebe vor Infektionen und Entzündungen zu schützen und die Signalweiterleitung an die vaskulären glatten Muskelzellen zu gewährleisten [13]. Diese wird von einer Basalmembran sowie einer dünnen Bindegewebsschicht (*Stratum subendotheliale*) umgeben, welche in Arterien zusätzlich von einer *Membrana elastica interna* umgeben sind [13]. Die *Tunica interna* vermittelt hauptsächlich den Stoff- und Gasaustausch mit der Gefäßwand. Die *Tunica media* besteht überwiegend aus glatten Muskelzellen, die flach und ringförmig um die *Tunica interna* angeordnet [13] sind, sowie elastischen Fasern (Elastin) und Bindegewebe [14]. Durch die Tonizität der glatten Muskelzellen kann diese Schicht der Dehnung durch eine Gefäßerweiterung (Vasodilation) entgegenwirken [13]. Die *Tunica adventitia* besteht in Arterien ausschließlich aus Bindegewebe und wird in großen Gefäßen durch das *Vasa vasorum* versorgt [14]. Hierbei handelt es sich um kleinste Arterien und Venen, die die *Adventitia* mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen [14].

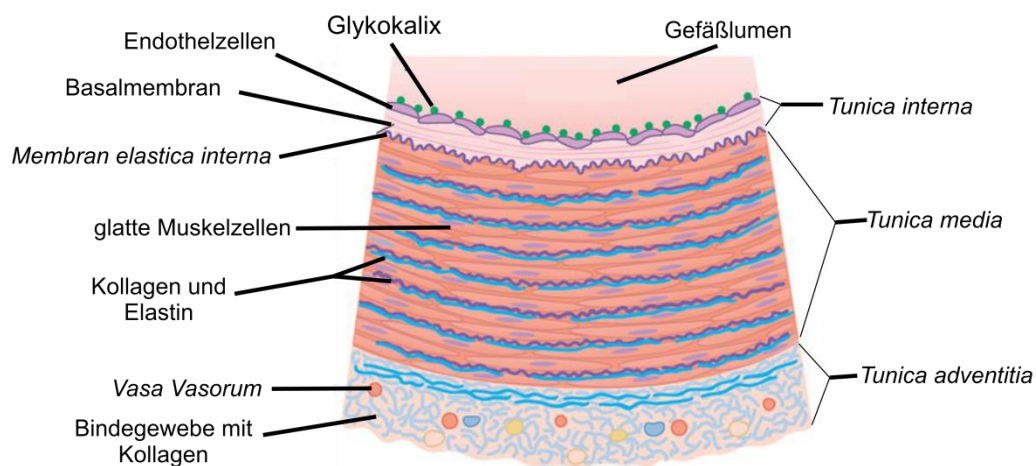


Abb. 3.1-1: Schematische Darstellung der Gefäßwand einer Arterie. Modifiziert nach [15].

3.1.2 Regulation der Vaskulogenese und Angiogenese

Während der Embryogenese entwickelt sich das primitive vaskuläre Netzwerk aus mesodermalen Zellen des extraembryonalen Dottersacks, den Hämangioblasten, die sich zu sogenannten Blutinseln formieren [1, 16]. Differenzierungsvorgänge im Zentrum der Blutinseln steuern die Entstehung hämatopoetischer Vorläuferzellen, während sich die Hämangioblasten in den äußeren Bereichen in endotheliale Vorläuferzellen, die Angioblasten, differenzieren [16]. Mesoderm-induzierte Wachstumsfaktoren aus der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Familie sind maßgeblich an diesem Vorgang beteiligt [17]. Die weitere Proliferation der Blutgefäßzellen bedingt die Fusion der Blutinseln und führt zur Ausbildung des primären vaskulären Plexus [18]. Sich zu Endothelzellen differenzierende Angioblasten organisieren sich in diesem Prozess zu einer Gefäßwand, während die hämatopoetischen Vorläuferzellen im Lumen zirkulieren [17, 19]. Neben dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) beeinflussen zudem der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) sowie der VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) die weitere Ausdifferenzierung der Angioblasten sowie die Formation der ersten vaskulären Strukturen [20, 21].

Im Rahmen der Angiogenese kommt es durch Proliferation von differenzierten Endothelzellen und Ausweitung dieser primären Gefäßstrukturen zur Ausbildung eines funktionellen Gefäßnetzes für das Wachstum und die Entwicklung der Organe [18, 22]. Die Prozesse der Angiogenese sind jedoch nicht nur auf die embryonale Phase beschränkt [19]. Auch während physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge im adulten Organismus, wie dem Ovarialzyklus, der Wundheilung sowie dem Tumorwachstum findet Angiogenese statt [18, 23, 24]. Dies ermöglicht eine stetige Anpassung an sich ändernde Umgebungsbedingungen und damit einhergehend die optimale Versorgung der umliegenden Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen [19].

Es werden drei Arten der Gefäßerweiterung unterschieden [2, 22]. Neben dem Prozess der kapillaren Aussprossung aus bereits vorhandenen Gefäßstrukturen, dem sogenannten *Sprouting* erfolgt die Umgestaltung der Gefäßnetze auch infolge von Intusseption (Einstülpung, *Non-Sprouting Angiogenesis*) sowie durch Gefäßverlängerung und -erweiterung (*Remodelling und Pruning*) [2, 22]. Die Aussprossung von Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen bildet einen Prozess aus verschiedenen aufeinanderfolgenden Schritten [2]. Zunächst erfolgt durch Vasodilatation (Erweiterung der Blutgefäße), ausgelöst durch proangiogene Faktoren, die Sezernierung von Proteinasen (Metalloproteinasen, Plasmin),

welche zur Aktivierung und Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran führen [1, 19]. Der lokale, proteolytische Abbau der Basalmembran ermöglicht die Endothelzellmigration und -proliferation durch den perivaskulären Raum in Richtung des proangiogenen Reizes und unter Ausrichtung der Endothelzellen zu einer Einzelschicht (*Monolayer*) die Formation eines Gefäßlumens [22]. Weitere Schritte sind die Bildung einer neuen Basalmembran sowie die Rekrutierung von periendothelialen Zellen wie Perizyten und glatten Muskelzellen, welche die Proliferation der Endothelzellen inhibieren und gleichzeitig für die Ausreifung und Stabilisierung der neuen Gefäßstruktur verantwortlich sind [2].

Die Intusseption findet hauptsächlich bei der Entwicklung der Lunge in der embryonalen Phase statt [22]. Dabei werden bereits existierende Gefäße durch die Bildung transkapillarer Säulen zweigeteilt [25, 26]. Die Gefäßverlängerung und -erweiterung dient der funktionalen Anpassung der Blutgefäße in wachsendem oder sich veränderndem Gewebe [2]. Die Anpassung des Gefäßnetzes an die neue metabolische Situation beinhaltet sowohl das Hinzufügen als auch die Deletion von Gefäßsegmenten wie auch die Gefäßreifung und Stabilisierung [2]. Nicht perfundierte Gefäße entwickeln sich vermutlich durch endotheliale Apoptose zurück.

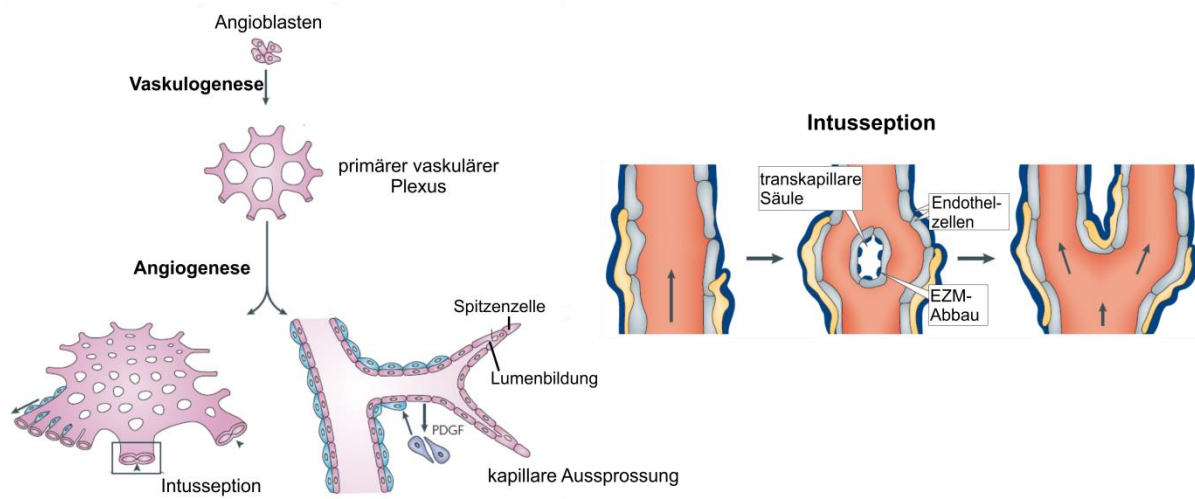


Abb. 3.1-2: Schematische Darstellung der Gefäßentwicklung. In der Vaskulogenese steuern Differenzierungsvorgänge die Entwicklung von Angioblasten aus Vorläuferzellen und die Entwicklung eines primären vaskulären Plexus aus Kapillaren, der sich während der Angiogenese durch Proliferation der Endothelzellen zu einem funktionellen Gefäßnetz entwickelt. Dabei erfolgt die Gefäßverlängerung durch die Prozesse der kapillaren Ausprossung und Intusseption. Modifiziert nach [27] [links] und [28] [rechts].

3.1.3 Molekulare Mechanismen der Angiogenese

Die Regulation der Angiogenese ist ein hochgradig geordneter und komplexer Prozess der durch das koordinierte Zusammenwirken von pro- und antiangiogenen Faktoren gesteuert und kontrolliert wird [18]. So wird in einem gesunden Organismus sowohl die Apoptose als auch die Proliferation von Endothelzellen und damit einhergehend die Regression und Entwicklung von Gefäßen durch ein abgestimmtes Verhältnis der Aktivatoren und Inhibitoren geregelt [18]. Kommt es jedoch zu physiologischen oder pathophysiologischen Veränderungen im Gewebe, erfordert dies die sukzessive Aktivierung einer ziemlich großen Anzahl von Rezeptoren und Liganden sowie ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen mehreren stimulierenden und inhibitorischen Signalen [29].

Die Aktivierung der Angiogenese erfolgt zum einen durch eine Stickstoffmonoxid-induzierte Vasodilation (Gefäßerweiterung) der Gefäße zur Anpassung der Durchblutung an sich verändernde Gewebestrukturen [19]. Zum anderen ist der Mangel an Sauerstoff, auch als Hypoxie bezeichnet, ein weiterer physiologischer Stimulus, der die Entwicklung von neuen Kapillargefäßen in wachsenden Gewebestrukturen aktiviert und gleichzeitig mit einem Mangel an Nährstoffen und vor allem Glukose einhergeht [4, 30]. Die Expression von VEGF kann sowohl durch Hypoxie als auch durch Glukosemangel induziert werden [30, 31]. Die Expression Hypoxie-induzierter Gene wie VEGF sowie den VEGF-Rezeptoren-1 (VEGFR-1) und -2 (VEGFR-2), wird durch eine Hypoxieerkennungssequenz in der Promotorregion gesteuert [32]. Ausgelöst durch einen Mangel an Sauerstoff lagern sich Untereinheiten der Hypoxie-induzierbaren Faktoren, wie HIF-1 α , HIF-1 β oder HIF-2 α , zu Heterodimeren zusammen, welche an die Erkennungssequenz binden und den Prozess der Angiogenese aktivieren [31, 32]. HIF stimuliert zudem die Produktion und Sezernierung von Proteasen, wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) oder Plasminogen-Aktivator in den Endothelzellen [33]. Zusammen mit VEGF, der auch als vaskulärer Permeabilitätsaktivator (VPA) fungiert, führen diese zur lokalen Degradation der Basalmembran sowie zum Abbau der Extrazellulären Matrix (EZM) und initiieren die Erhöhung der Gefäßpermeabilität [16, 23, 34, 35]. Hierbei kann auch die Zusammensetzung der EZM die Aussprossung der neuen Gefäßstruktur beeinflussen [28]. Gleichzeitig wird die endotheliale Permeabilität durch die Umverteilung und Reduktion von interzellulären Verbindungen (Adhäsionsfaktoren und Integrine), wie dem PECAM-1 und dem vaskulären endothelialen (VE)-Cadherin weiter gesteigert [36]. Dies ermöglicht die Extravasation (Austritt von Flüssigkeit aus einem Gefäß) von Plasmaproteinen (Fibrinogen, Fibronectin, Prothrombin) in den subendothelialen Raum. Durch Aktivierung der

Gerinnungskaskade bildet sich Fibrin, das kooperierend mit weiteren Adhäsionsfaktoren als provisorische Matrix für das sich bildende Gefäß dient [37]. Innerhalb der Kapillargefäßwand werden gleichzeitig einige Endothelzellen ausgewählt, um den Prozess der Aussprossung anzuführen [28]. Diese Endothelzellen sind als Spitzenzellen bekannt und ihre Auswahl wird durch die Transmembranliganden *Delta-like 4 Protein* (DLL4) gesteuert [38], deren Expression durch Wechselwirkung von VEGF mit den Endothelzellen aktiviert wird [39]. Die Spitzenzellen steuern die Migration und Expansion der Endothelzellen in den perivaskulären Raum [40].

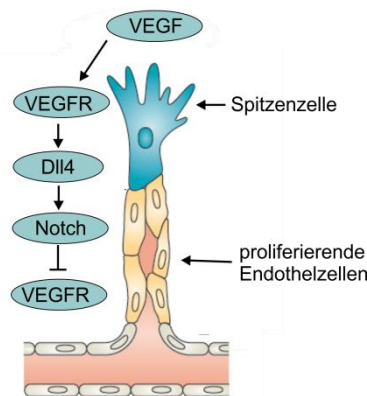


Abb. 3.1-3: Schematische Darstellung der beginnenden kapillaren Aussprossung durch Selektion der Endothelspitzenzelle. Eine Matrix-verankerte Isoform des VEGF bindet an den Rezeptor VEGFR und induziert dadurch die Expression von DLL4 (*delta-like 4 protein*). In den benachbarten Endothelzellen werden durch die erhöhte DLL4 Expression Rezeptoren der Notch-Familie aktiviert, die eine VEGFR Expression in diesen Zellen unterdrücken und eine verstärkte Proliferation der Endothelzellen induzieren. Modifiziert nach [41].

Hierbei unterstützen Integrine, wie $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, auf der Oberfläche der Endothelzellen die Anlagerung an die provisorische Matrix und zusammen mit freigesetzten proteolytisch wirkenden Enzymen die Migrationsbewegung in das umliegende Gewebe [42]. Die Proteasen setzen dabei angiogene Faktoren, wie VEGF-A, bFGF und Angiopoetin 1 (Ang1) aus der EZM frei und vermitteln so die Orientierung der Spitzenzellen in den perivaskulären Raum [42]. VEGF-A, der wichtigste Faktor für die Gefäßentwicklung gehört zu einer Familie von fünf weiteren Proteinen: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, und der Plazenta-Wachstumsfaktor (PLGF) [43]. Die Stimulation der Zellmigration in den perivaskulären Raum erfolgt sowohl durch Bindung von VEGF-A an VEGFR1 als auch VEGFR-2, während die Mitoseaktivierung, also die Proliferation, sowie die Sprossung nur durch Bindung von VEGF-A an VEGFR-2 erfolgt [28, 40]. Eine Matrix-verankerte Isoform von VEGF-A erzeugt einen räumlichen Konzentrationsgradienten und fungiert als chemoattraktives Signal, wodurch die Verlängerung/Führung der Spitzenzelle gefördert wird [28, 44]. Durch die erhöhte DLL4 Expression werden in den benachbarten Endothelzellen Rezeptoren der Notch-

Familie aktiviert, welche die VEGFR-2 Expression unterdrücken und dadurch eine verstärkte Proliferation der Zellen induzieren [38, 39]. Die Proliferation der Endothelzellen wird zudem durch eine frei diffundierbare Isoform des VEGF-A gesteuert [28]. Trotz der wichtigen Rolle von VEGF-A ist das koordinierte Zusammenwirken von weiteren Faktoren unerlässlich für die Entwicklung von intakten Gefäßstrukturen.

Angiopoetin-1 (Ang1) wird hauptsächlich in perivaskulären muralen Zellen produziert und steuert als Hauptagonist durch Phosphorylierung des Tyrosinkinase-Rezeptor 2 (Tie-2) die Stabilisierung neuer Gefäßstrukturen [45, 46]. Dabei scheint Ang1 die Interaktion von Endothelzellen mit der umliegenden Matrix sowie den Stützzellen zu unterstützen und reduziert die Gefäßdurchlässigkeit [47]. Ang1 stabilisiert reife Blutgefäße durch eine dauerhafte Bindung an den Tie-2-Rezeptor und wird daher weitestgehend in adultem Gewebe exprimiert [45]. Die Expression von Angiopoetin-2 (Ang2) wird durch hypoxische Umgebungsbedingungen induziert [48]. Ang-2 wird hauptsächlich von Endothelzellen [45] während der Umgestaltung von Gefäßen produziert und kann Tie-2 sowohl aktivieren als auch antagonisieren [47]. Die Wirkung von Ang2 wird dabei von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von VEGF-A beeinflusst [49]. Bei Abwesenheit von VEGF-A induziert die Bindung von Ang2 an Tie-2 den Tod von Endothelzellen und die Gefäßregression [50]. Die Bindung von Ang2 in Gegenwart von VEGF-A induziert einen proangiogenen Stimulus und beeinflusst die Lockerung bzw. Umgestaltung interzellulärer Kontakte der Basalmembran und gewährleistet somit die Migration der Endothelzellen [50].

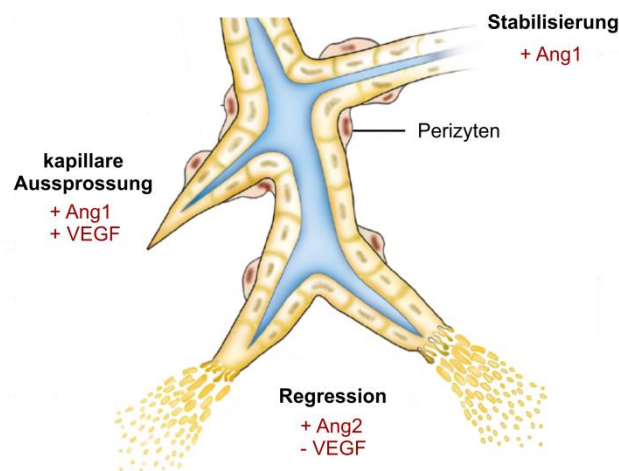


Abb. 3.1-4: Schematische Darstellung der Angiopoetin-1 (Ang1)- und Angiopoetin-2 (Ang2)-Funktion in der Angiogenese. Während eine erhöhte Ang1-Expression eine Gefäßstabilisierung induziert, wird eine Gefäßerweiterung durch kapillare Aussprossung durch eine verstärkte Expression von Ang2 und VEGF-A gefördert. Die Bindung von Ang2 an den Rezeptor Tie-2 unter Abwesenheit von VEGF induziert eine Gefäßregression. Modifiziert nach [50].

Auch der bFGF spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der Angiogenese [43]. bFGF stimuliert neben der Proliferation von Endothelzellen durch den mitogenen Effekt auf glatte Muskelzellen auch das Wachstum größerer Gefäße [43, 49, 51].

Neben den Wachstumsfaktoren spielen auch Chemokine eine Rolle bei der Angiogenese. Dabei scheinen besonders die CXC-Chemokine (Cysteinreste werden durch eine Aminosäure voneinander getrennt) wie das Monozytenattraktionsprotein-1 (MCP-1) oder Interleukin-8 (IL-8) wichtig für die Gefäßentwicklung zu sein [52]. Das angiogene MCP-1 wird hauptsächlich in Endothelzellen, Fibroblasten und Monozyten exprimiert und beeinflusst die Angiogenese durch Aktivierung von Proliferation und Migration [53]. Neuere Studien haben gezeigt, dass MCP-1 die VEGF-Expression hochreguliert [54] und somit die vaskuläre Permeabilität beeinflusst [55]. Die Freisetzung der angiogenen Chemokine erfolgt durch Leukozyten die durch FGF's oder Hypoxie rekrutiert werden [1].

Die gerichtete Migration und Proliferation der Endothelzellen wird zudem durch die Ausbildung neuer Zell-Zell-Interaktionen gesteuert. Die Rolle des Ephrin-Systems während der Angiogenese ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Anders als bei anderen Tyrosinkinase müssen die Ephrin-Liganden für die Aktivierung der Rezeptoren an die Zellmembran gebunden sein [47]. Ephrin-B2 und Ephrin-B4 zeigen zudem eine reziproke Verteilung während der Gefäßentwicklung [28, 47]. So markiert das Transmembranprotein Ephrin-B2 ausschließlich das Endothel von Arterien, während Ephrin-B4 nur in Venen nachgewiesen wurde [28, 56]. Neueste Studien zeigen, dass Ephrin-B2 eine Wechselwirkung zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen reguliert und daher möglicherweise am Aufbau arterieller Muskelwände beteiligt ist [47, 56]. Weiterhin wird die biochemische Kommunikation zwischen Endothelzellen und der extrazellulären Matrix durch Integrine wie $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ gesteuert [57]. Integrine sind Oberflächenrezeptoren für Adhäsionsmoleküle der EZM wie Fibronectin, Kollagen, Laminin oder interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs), die eine Interaktion zwischen der entstehenden Gefäßstruktur und der EZM vermitteln [58]. Zudem können Integrine MMPs an der Zelloberfläche lokalisieren und dadurch eine optimale Integration der neuen Gefäßstruktur in die umliegende Matrix vermitteln [59].

Ein weiterer Schritt in der Entwicklung von intakten Gefäßstrukturen ist die Ausbildung eines Lumens (Hohlraum in einem Gefäß) und die Verbindung mit existierenden Gefäßen [60]. Die Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und VE-Cadherin stabilisieren die Kontakte der neu gebildeten Endothelzellen untereinander und unterstützen die Organisation zu tubulären

Strukturen [61, 62]. Mit wachsender Gefäßstruktur wird in den Spitzenzellen die Produktion des PDGFB stimuliert [28, 29]. PDGFB fördert die Rekrutierung von Perizyten, die auf ihrer Oberfläche den PDGFB-Rezeptor (PDGFR β) tragen [28, 29]. Diese lagern sich an die entstandene Gefäßstruktur an und üben einen stabilisierenden Effekt aus [45, 63]. *In vitro*-Studien haben ergeben, dass der Kontakt zwischen Endothelzellen und Perizyten die Expression des transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF- β) initiiert [29]. Die Aktivierung von TGF- β führt zu einer Hemmung der Endothelzellproliferation und -migration [29, 63]. Des Weiteren erhöht TGF- β die Expression von Integrinen [64]. Die Rekrutierung der Perizyten und Anlagerung von extrazellulären Matrixproteinen an die Basalmembran führt zur Gefäßreifung und zum Übergang in den Ruhezustand [29]. Gleichzeitig unterdrücken Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) sowie Thrombospondin-1 (THBS-1) die proteolytische Wirkung von MMPs und hemmen den Abbau der EZM [65, 66]. Ohne eine Stabilisierung der gebildeten Gefäßstruktur sowie Freisetzung von anti-angiogenen Faktoren und TIMPs kommt es zu apoptotischen Vorgängen im Endothel und zur Gefäßregression [67].

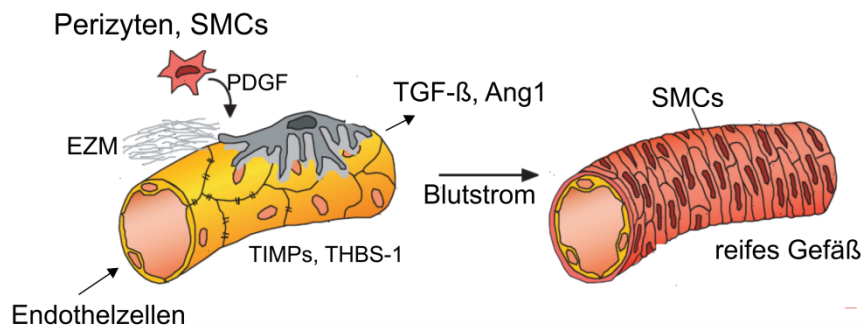


Abb. 3.1-5: Schematische Darstellung der Gefäßreifung. Der thrombozytäre Wachstumsfaktor PDGF fördert die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen. Der Kontakt zwischen Endothelzellen und Perizyten induziert die Expression des transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF- β). Zusätzlich produzieren die Perizyten Angiopoetin-1 (Ang1). Beide Faktoren hemmen die Endothelzellproliferation. Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) unterdrücken den Abbau der extrazellulären Matrix und anti-angiogene Faktoren, wie Thrombospondin-1 (THBS-1), die Proliferation der Endothelzellen. Der einsetzende Blutstrom induziert die Ausrichtung der Endothelzellen in Flussrichtung und fördert die Barrierefunktion des Endothels. Modifiziert nach [1].

3.1.4 Vaskuläres Endothel und der Einfluss von Scherstress

Das Endothel ist eine Einzellschicht aus Endothelzellen, die das Lumen der Blutgefäße auskleidet. Als innerste Zellschicht der Blutgefäße fungiert das Endothel als semipermeable Membran zwischen Blut und dem trans- sowie parazellulären Gewebe [68]. Endothelzellen sind in hohem Maße metabolisch aktiv und kontrollieren den Stoffaustausch zwischen dem

intra- und extravasalen Raum [69]. Als Reaktion auf physikalische und chemische Reaktionen reguliert das Endothel physiologische Funktionen wie den Gefäßtonus, die Aufrechterhaltung der Hämostase, der Blutversorgung der umliegenden Organe durch Aufrechterhaltung der Blutfluidität, der Angiogenese sowie der angeborenen und adaptiven Immunantwort, die für ein gesundes Gefäßsystem essentiell sind [69, 70]. Endothelzellen weisen hinsichtlich der Morphologie, Funktion und Expression eine hohe Heterogenität zwischen verschiedenen Organen, innerhalb eines Organs, sowie zwischen verschiedenen Blutgefäßtypen auf [68]. Arterien und Venen werden von einem kontinuierlichen Endothel ausgekleidet, welches sich durch besonders dichte Zell-Zell-Kontakte (*Tight Junctions*) auszeichnet und keine Poren bzw. Unterbrechungen aufweist [71]. Dieses Endothel ist besonders undurchlässig und ermöglicht einen Stoffaustausch über transzelluläre Transportmechanismen [71]. In den kleineren Kapillaren ist die Struktur des Endothels stark von den Anforderungen des umliegenden Gewebes abhängig und kann kontinuierlich, fenestriert oder diskontinuierlich sein [69]. Das diskontinuierliche Endothel weist löchrige Abstände zwischen den Endothelzellen auf, wodurch ein parazelluläre Stofftransport ermöglicht wird und ist vor allem in der Leber oder Niere zu finden [6, 71]. Fenestriertes Endothel weist kleinere Löcher als diskontinuierliches Endothel auf, welche durch Diaphragmen verschlossen sind [71].

Durch den kontinuierlichen, pulsatilen Blutstrom sind Endothelzellen auf der luminalen Seite metabolischen und dynamischen Änderungen sowie hämodynamischen Kräften ausgesetzt [7, 72]. Neben dem hydrostatischen Druck, welcher eher eine untergeordnete Rolle spielt, beeinflussen hauptsächlich die zyklische Dehnung sowie der aufgrund des Blutflusses induzierte Scherspannung die Physiologie der Endothelzellen [73]. Für die Regulation der Endothelzellfunktion ist jedoch der Scherstress (Scherspannung) hauptverantwortlich [7]. Die Blutströmung erzeugt eine tangentielle Widerstandskraft, die Scherstress an der Gefäßwand induziert [74]. Der Scherstress ist parallel zur Oberfläche und proportional zur Geschwindigkeit sowie der Viskosität des Blutes und ist umgekehrt proportional zum Radius (r) des Gefäßes [72, 73, 75]. Mit einer Variation der Hagen-Poiseuille-Gleichung, lässt sich der Scherstress (τ), den eine ideale Newton'sche Flüssigkeit unter laminarer Strömung auf die Wand einer Röhre erzeugt, berechnen [76]:

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi r^3}$$

Dabei beschreibt μ die Viskosität, Q die Flüssigkeitsströmung und r den Radius des Gefäßes. Die ermittelten Scherspannungen können als Annäherung an die *in vivo* vorherrschenden Scherkräfte in den Blutgefäßen betrachtet werden [76].

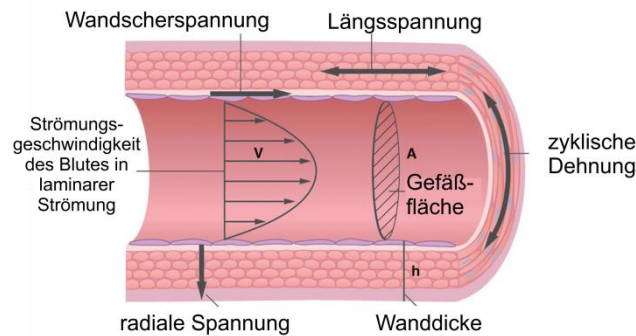


Abb. 3.1-6: Schematische Darstellung der im Blutgefäß vorherrschenden hämodynamischen Kräfte. Modifiziert nach [15].

In Abhängigkeit von Art (laminar, oszillierend, turbulent) und Stärke der Scherspannung reagieren Endothelzellen durch verschiedene Mechanismen [72]. Im menschlichen Organismus wirkt an der Endothelschicht in Arterien eine Scherspannung von 10-70 dyn/cm² [77], wobei unter physiologischen Bedingungen die mittlere Scherspannung konstant bei 10 - 15 dyn/cm² liegt [78]. In den Venen liegt die Scherspannung bei 1 - 6 dyn/cm² [73]. Ein dauerhaft erhöhter Blutfluss geht einher mit einem hohen Scherstress an der Gefäßwand und induziert eine Vergrößerung des Arterien-lumens sowie einen Umbau der Arterienwand, während ein dauerhaft verringerter Blutfluss zur Verkleinerung des Gefäßlumens bis zur Regression der Gefäßstruktur führen kann [73, 75]. In geraden Gefäßsegmenten der Arterien herrscht ein laminarer, pulsatiler Blutstrom, der die Ausbildung des atheroprotektiven, d.h. vor Arterienverkalkung schützenden, Endothelzell-Phänotyps fördert [75]. Neben einer Ausrichtung der Endothelzellen in Flussrichtung bewirkt dieser eine geringe Replikationsrate [73] der Endothelzellen, geringen oxidativen Stress und wirkt antiinflammatorisch [75]. An den Verzweigungspunkten von Arterien entsteht häufig ein turbulenter oder oszillierender Blutfluss. Dies bewirkt eine mangelnde Ausrichtung der Endothelzellen und geht einher mit einer erhöhten Replikationsrate und einer verminderten Barrierefunktion [75]. Endothelzellen exprimieren auf der Oberfläche spezifische Mechano-rezeptoren, die die physikalischen Kräfte in intrazelluläre Signale umwandeln und zelluläre Funktionen wie, Proliferation, Migration, Permeabilität und Genexpression [79]. In diesem Prozess spielen vermutlich Integrine, Ionenkanäle, Tyrosinkinase, PECAM-1 und VE-Cadherin eine entscheidende

Rolle [79, 80], sowie das dreidimensionale Aktin-Skelett, das der Zelle Form und Stabilität verleiht [75]. Die Aktinfilamente sind über die Verbindungsproteine (Catenine) an die Plasmamembran assoziiert und ermöglichen so die Übertragung der Kräfte von der apikalen Domäne auf die basalen und lateralen Domänen. Interzelluläre Kontakte über VE-Cadherine ermöglichen die Übertragung der Kräfte auf die Nachbarzellen [81]. Aufgrund der hohen Komplexität sind die genauen Mechanismen dieser Prozesse noch nicht vollständig aufgeklärt.

3.2 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein vergleichsweise junges und hochgradig interdisziplinäres Forschungsgebiet, das Bereiche aus Medizin, Biowissenschaften und Technik miteinander fusioniert [82]. Der Begriff Tissue Engineering beschreibt die Entwicklung bioartifizieller, dreidimensionaler Gewebe außerhalb des Organismus, welche als funktioneller Ersatz für krankes Gewebe in den Körper implantiert werden. „Künstlich“ gezüchtete Gewebe und Organe sollen so eine Alternative zur *in vivo* Gefäßspende darstellen. Dabei spielt vor allem die personalisierte Anpassung der Gewebestrukturen an die individuelle Patientensituation eine entscheidende Rolle. Eine weit verbreitete Strategie für die Herstellung bioartifizieller Gewebe ist die Entnahme von geeignetem, patienteneigenem (autologem) Zellmaterial, das *in vitro* kultiviert, vermehrt und anschließend auf biologischen oder synthetischen Gerüststrukturen ausgesiedelt wird [83, 84], wodurch Abstoßungsreaktionen nach der Implantation verhindert werden. Dabei muss die Gerüststruktur eine hochporöse Umgebung bereitstellen, die die Adhärenz, Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen sowie die Produktion eigener EZM unterstützt und somit die Bildung einer intakten Gewebestruktur ermöglicht [83]. Der Einsatz geeigneter, an die Gewebesysteme angepasster Reaktorsysteme ermöglicht die Adaption physiologischer und physikalischer Umgebungsbedingungen des menschlichen Organismus [82]. Die Implementierung mechanischer und biochemischer Reize unterstützt somit die weitere Funktionalisierung der gezüchteten Gewebestrukturen. Dies ist erforderlich, um das Überleben sowie die erfolgreiche Integration und Wiederherstellung der Funktion im Organismus zu gewährleisten [83].

3.2.1 Entwicklung von bioartifiziellen Gefäßprothesen und Anforderungen

Gefäßprothesen kommen zum Einsatz, wenn die natürliche Funktion der Gefäße durch alternative Methoden wie z.B. die Verwendung von *Stents* oder Ballondilatation nicht mehr hergestellt werden kann. Sie werden dabei überwiegend als Ersatz nach Schädigung von Arterien verwendet, die aufgrund von Verletzungen stark geschädigt wurden bzw. krankhafte Verengungen oder Erweiterungen aufweisen. Zur Überbrückung von arteriosklerotisch bedingten Stenosen (Verengungen) der Gefäße finden sie auch Anwendung in Bypassoperationen. Mit 70.000 Eingriffen pro Jahr gehören Bypassoperationen zu den häufigsten Operationen am Herzen in Deutschland [85]. Autologe Gefäße (Spender und Empfänger sind dieselbe Person) sind die bevorzugten Transplantate für den Ersatz von geschädigten Gefäßsegmenten [86]. Da autologe Gefäße, die für eine chirurgische Übertragung geeignet sind, aufgrund von Alters- und Gesundheitszustand der Patienten häufig fehlen, kommen hauptsächlich synthetische Prothesen zum Einsatz [87].

Polytetrafluoroethylen (PTFE) Prothesen sind in der Lage, Arterien mit einem großen Durchmesser zu ersetzen, während der Ersatz schmaler Gefäßstrukturen unter 6 mm Durchmesser mit Problemen einhergeht [88, 89]. Das Versagen synthetischer Transplantate mit einem geringen Durchmesser wird durch eine erhöhte Oberflächen-Thrombogenizität verursacht [90]. Dies geht zurück auf das Fehlen eines funktionellen vaskulären Endothels [87, 91]. Neben der fehlenden Dehnbarkeit (*Compliance*) schmaler synthetischer Prothesen, führt das Fehlen eines funktionellen vaskulären Endothels zudem zu einer erhöhten Gefahr mikrobieller Kontaminationen, was häufig einen Implantatersatz bedingt [87]. Die Transplantation allogener (von einem anderen menschlichen Spender) oder xenogener (von einem tierischen Spender) Gefäße birgt die Gefahr unerwünschter Immunreaktionen sowie Abstoßungsreaktionen [92]. Daher ist die autologe Transplantation bei mikrovaskulären Strukturen unter Verwendung patienteneigenen Venenmaterials derzeit der Standard [88], aber es besteht ein dringender Bedarf an Prothesen, die mit den autologen Gefäßen konkurrieren und diese ersetzen können [87].

Die Entwicklung bioartifizieller Gefäßprothesen besitzt das Potential, die Nachteile synthetischer Gefäßprothesen zu überwinden. Die Biohybride sollen die besten Aspekte aus synthetischem Stützmaterial und autologem Zellmaterial vereinen und somit einen geeigneten Gefäßersatz zur Nachahmung der natürlichen Arterie darstellen [90]. Es gibt wichtige Anforderungen, die ein geeignetes Gefäßimplantat erfüllen muss. Zellen, die für die vaskuläre Gewebezüchtung in Betracht kommen sind Endothelzellen, Fibroblasten, vaskuläre glatte

Muskelzellen und Stammzellen [90, 93]. Die Zellen dürfen nicht immunogen und müssen stark proliferativ sowie leicht zu isolieren sein [94]. Autologe, patienteneigene Zellquellen sind gegenüber allogenen und xenogenen vorzuziehen, um die Übertragung von Krankheiten und eine Transplantatabstoßung zu vermeiden [95, 96]. Die Forschung in der Gewebezüchtung konzentrierte sich bislang hauptsächlich auf die Verwendung autologer, ausdifferenzierter Zellen [93]. Der Vorteil in der Verwendung ausdifferenzierter vaskulärer Zellen ist, dass diese bereits auf die Ausübung spezifischer Funktionen spezialisiert sind [93]. Ein Nachteil sind die verminderten proliferativen Fähigkeiten, sowie die hohe Variabilität der Zellenproliferation zwischen den einzelnen Spendern [94]. Die Innenseite der Gefäßprothese sollte, wie auch in Blutgefäßen, mit einer konfluenten, autologen Endothelschicht ausgekleidet sein, um die Thrombozytenaggregation und somit Thrombenbildung zu verhindern [93, 97]. Zudem muss die Endothelschicht hohen Blutflussraten standhalten [88]. Gleichzeitig müssen mechanische und viskoelastische Eigenschaften, wie die Elastizität der Gefäßwand, denen nativer Gefäße entsprechen [87], um Dehnbarkeit und Rückstoß zu gewährleisten [97, 98]. Auf zellulärer Ebene muss somit die Assoziation von stabilisierenden glatten Muskelzellen sowie die Ausbildung einer EZM etabliert werden, die in der Zusammensetzung derer nativer Gefäße entspricht [97]. Eine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen in den äußeren Zellschichten der Gefäßprothese muss durch das Einbringen vaskulärer Kapillarstrukturen gewährleistet sein.

Auch die Materialeigenschaften sowie die Porosität der Stützstruktur haben einen entscheidenden Einfluss auf stabilisierende und mechanische Eigenschaften der Gefäßprothese. 3D-Gerüste stellen eine geeignete Umgebung für die Entwicklung von Geweben und Organen da. Die radiale Dehnbarkeit der bioartifiziellen Gefäßprothese verbessert sich durch zunehmende Porosität des Stützmaterials und eine optimale Endothelialisierung der Gefäßprothese erfolgt bei kleinen Porengrößen zwischen 18 - 50 µm [88, 99]. In dem Forschungsgebiet der künstlichen Gewebezüchtung wurde bereits eine Vielzahl von Materialien für die Erstellung von Gerüststrukturen ausgetestet [93]. Dabei werden kategorisch natürliche, synthetische und dezellularisierte Gerüststrukturen unterschieden [82, 93].

Weinberg und Bell haben 1986 mit der Entwicklung einer Gefäßprothese aus dem natürlich vorkommenden Biomaterial Kollagen den Grundstein für die Materialforschung auf diesem interdisziplinären Gebiet gelegt [100]. Jedoch hat die Prothese aufgrund fehlender mechanischer Festigkeit den hohen Druckbelastungen nicht standgehalten [100], was einen

Nachteil natürlicher Konstrukte gegenüber synthetischen darstellt [93]. Neben Kollagen, einem Strukturprotein der EZM, finden auch Elastin und Fibrin Anwendung. Fibrinogen und Thrombin, die Hauptbestandteile des Fibrins, können leicht aus dem Blut eines Patienten gewonnen werden. Daher ist Fibrin eine autologe Alternative zum Kollagen, mit ähnlichen mechanischen Eigenschaften [101, 102].

Im Bereich der synthetischen Stützmaterialien befinden sich hauptsächlich Polymere, wie Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA) oder Polyhydroxylalkanoat (PHA), in der Anwendung [88, 103]. Bessere mechanische Eigenschaften sowie eine kontrollierte Abbaurate, Porosität und Mikrostrukturierung sind die Vorteile synthetischer gegenüber natürlicher Stützmaterialien [93, 98]. Neben den mechanischen Eigenschaften und der Architektur der Stützmatrix ist die Biokompatibilität entscheidend, damit eine toxische Schädigung der Zellen auf der Gerüstmatrix vermieden sowie die Proliferation und Migration unterstützt wird [82]. Die Fähigkeit zur Biodegradation bestimmt die Abbaurate des Polymers und ermöglicht den Ersatz der Struktur durch körpereigene Zellen und die Bildung einer eigenen EZM [93]. Der Nachteil der Polymere ist der Mangel an Bioaktivität, d.h. das Fehlen von Proteinen, an die sich die Zellen anhaften können [104]. Daher finden in der Entwicklung vaskulärer Gefäßprothesen Polymere, die eine mechanische Stabilität gewährleisten, in Kombination mit Kollagen oder Fibrin, als Komponente für die Zelladhäsion, Anwendung [13]. Aufgrund seiner inhärenten Eigenschaften ist Fibrin eine ideale, biologische Stützgerüstkomponente für Anwendungen in der Gewebezüchtung [102]. Es ist biokompatibel, biologisch abbaubar, weist eine hohe Affinität zu verschiedenen biologischen Oberflächen auf [105] und besitzt Adhäsionsstellen für die Zellen, wodurch eine optimale Besiedlung der Konstrukte gewährleistet wird [106]. Zudem dient es auch bei der *in vivo* Angiogenese als natürliches Stützgerüst für die aussprossenden Zellen und unterstützt die Migration und Proliferation der Zellen [107]. Aufgrund der nachgewiesenen Wirkung auf Gefäßzellen ist es vor allem für die vaskuläre Gewebezüchtung von großem Interesse [104].

Dezellularisierte Gewebe bestehen vollständig aus natürlicher EZM, was Vorteile für die Biokompatibilität und mechanischen Eigenschaften mit sich bringt [98, 108]. Die Dezellularisierung spezifischer Gewebe erfolgt durch eine Kombination aus Detergenzien, Enzyminhibitoren, Puffern und physikalischen Methoden [109, 110]. Diese Prozesse können die Funktion der EZM jedoch beeinträchtigen, was zu einer Verringerung der mechanischen Eigenschaften und somit auch der Dehnbarkeit führt [98, 110]. Zudem kommt es in

dezellularisierten Xenotransplantaten häufig zu Infektionen, Thrombosen, Aneurysmenbildung und durch eine Rest-Immunogenität auch zu Immunreaktionen [110, 111].

Für die Züchtung funktionsfähiger bioartifizieller Gefäßprothesen, die in den menschlichen Organismus implantiert werden, ist zunächst eine Kultivierung von geeigneten Zellen auf einer Gerüststruktur in einem geeigneten, perfundierten Bioreaktorsystem notwendig [90]. Der Bioreaktor stellt eine Umgebung dar, in der sich die Gefäßprothese mit geeignetem biochemischem Massentransport und mechanischer Stimulation unter physiologischen Bedingungen entwickeln kann [94]. Neben den Anforderungen an die Stabilität muss auch die biologische Funktionalität natürlicher Gefäße imitiert werden [98]. Die durch die Anwendung mechanischer Konditionierung (dynamische, pulsatile Strömungsbedingungen) entstehenden hämodynamischen Kräfte (zyklische Umfangsspannung, Scherspannung und luminaler Druck) können unabhängig voneinander und auch synergetisch wirken und modulieren so die Struktur und Entwicklung der Gefäßprothesen [98, 112, 113]. Diese mechanischen Kräfte dienen als wichtige Regulatoren des Phänotyps der Zellen [94]. So beeinflussen zyklische Umfangsspannungen das Verhalten sowohl der Endothelzellen als auch der glatten Muskelzellen, die zyklisch um das Gefäß angeordnet sind [113]. Die Scherspannung zeigt hingegen nur einen direkten Einfluss auf das Endothel und erst die Freisetzung von Sekundärmolekülen, die durch die Endothelzellen sezerniert werden, beeinflusst das Verhalten der glatten Muskelzellen [75, 114]. Neben der mechanischen Konditionierung ermöglichen die Reaktoren auch eine optimale Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Gefäßprothese [115]. Bisher wurden nur wenige solcher perfundierten Systeme entwickelt, die eine dynamische, pulsatile Kultivierung der Zellen auf einer Gerüststruktur unter Überwachung physikalischer und biochemischer Parameter ermöglichen [116-118]. Maschoff *et al.* entwickelten und ermöglichten mittels geeigneter Sensortechnik eine stetige und lückenlose Kontrolle von physikalischen (Scherstress, Druck) und biochemischen (Sauerstoff, pH, Glukose/Laktat) Parametern, um die Zellvitalität zu gewährleisten [90]. Eine Überwachung der Gefäßprothese hinsichtlich Homogenität und Dicke der Gefäßwand konnte mittels Ultraschalldetektion realisiert werden [90].

Alle genannten Faktoren (Zellquelle, Gerüstmaterial, Bioreaktorsystem) zusammen sind entscheidend für die optimale Ausrichtung und Organisation der Zellen innerhalb der Gefäßprothese und somit bestimmend für eine Langzeitfunktion der Gefäßprothese im Organismus [88].

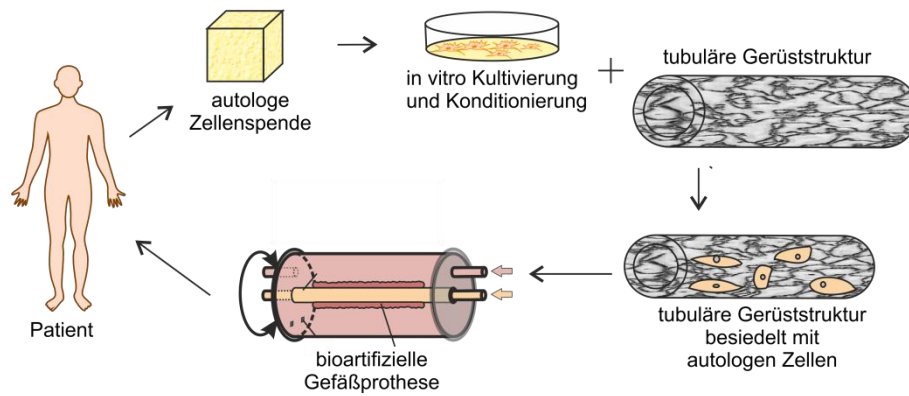


Abb. 3.2-1: Schematische Darstellung der Entwicklung einer funktionsfähigen und patientenspezifischen bioartificialen Gefäßprothese. Aus dem Fettgewebe oder Blut des Patienten werden Zellen isoliert, die *in vitro* vermehrt werden. Eine geeignete tubuläre Gerüststruktur wird mit den autologen Zellen besiedelt, welche anschließend in einem geeigneten Bioreaktorsystem durch mechanische Stimulation konditioniert werden. Nach Fertigstellung wird die patientenspezifische bioartificiale Gefäßprothese in den Spender implantiert.

3.2.1.1 Immunsuppressiva: Wirkmechanismen von Tacrolimus und Mycophenolsäure

Die Verwendung von Allo- oder Xenogefäßen für die Bypass transplantation geht immer mit einer begleitenden Immunsuppressiva-Therapie einher, um die wichtigste Komplikation nach Organ- und Gewebetransplantation, die immunologische Reaktion des Patienten auf die allogene Gefäßprothese und die nachfolgende Transplantatabstoßung, zu vermeiden [119]. Um dieses Risiko zu minimieren, ist der Einsatz von Immunsuppressiva eine Routinetherapie nach der Transplantation [120]. Eine der am häufigsten verwendeten Wirkstoffgruppen auf diesem Gebiet sind Calcineurin-Inhibitoren [121]. Innerhalb dieser Gruppe von Therapeutika ist Tacrolimus, auch bezeichnet als FK506, heutzutage aufgrund seiner Wirksamkeit und den geringeren Nebenwirkungen sowie Toxizität im Vergleich zu Cyclosporin, einem der ersten eingesetzten Calcineurin-Inhibitoren (CNIs), das am häufigsten verwendete Arzneimittel [122]. Tacrolimus ist ein komplexes Makrolidlacton und wird von dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* produziert. Der CNI wirkt auf spezifische Bindungsproteine, sogenannte Immunophiline innerhalb der T-Lymphozyten [123]. T-Lymphozyten bilden zusammen mit B-Lymphozyten den Teil der adaptiven, angeborenen Immunantwort. Die Bindung von Tacrolimus an das Immunophilin FK506-Bindungsprotein 12 (FKBP12) führt zur Bildung eines Tacrolimus-Immunophilin-Komplexes, der mit der spezifischen Calcium- und Calmodulin-abhängigen Serin-/Threonin-Proteinphosphatase, genannt Calcineurin, interagiert und diese hemmt [124]. Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert dadurch den nukleären Faktor von aktivierten T-Lymphozyten (NFAT), einen Transkriptionsfaktor, und induziert seine Translokation in den Kern [125]. Durch Bindung an einen spezifischen Promotor initiiert dieser die anschließende Hochregulation der Genexpression von

Interleukin-2 (*il-2*) und dem IL-2-Rezeptor [126]. Die Hemmung der Calcineurin-Phosphatase durch Tacrolimus unterdrückt die Verteidigung der zellulären Immunantwort, indem sie die Aktivierung der T-Zell-Proliferation verhindert [126].

In der immunsuppressiven Standardtherapie bei Organtransplantationen wird Tacrolimus mit Mycophenolsäure (MPA) und Glucokortikoiden kombiniert, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern. Hierbei wird häufig die Prodrug, das inaktive Mycophenolatmofetil verabreicht, welches erst *in vivo* vollständig zum aktiven Metaboliten MPA umgewandelt wird, der verschiedene immunsuppressive Wirkungen hat [127]. MPA ist ein spezifischer Inhibitor des Enzyms Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), das den Syntheseweg von Guanodin-5'-triphosphat (GTP) unterstützt. Das Fehlen von GTP beeinflusst die DNA-Replikation und Transkription sowie die Translation von Proteinen. Dies führt zu einem stillstehenden Zellzyklus in einer G1/S-Phase [128, 129]. Über diesen Wirkmechanismus inhibiert MPA besonders die Proliferation von B- und T-Lymphozyten aufgrund des Mangels von Guanodin und Deoxyguanodin-Nukleotiden und unterdrückt so die zelluläre Immunantwort und die Bildung von Antikörpern [129]. Darüber hinaus kann MPA zur Induktion von T-Lymphozyten-Apoptose führen [128]. Die Verwendung von Tacrolimus *in vivo* erfordert spezifische Vorkehrungen, wie die kontinuierliche Arzneimittelüberwachung im Serum, da das therapeutische Fenster des Arzneimittels eng ist [130]. Daher kann eine niedrige Serumkonzentration zu einem Arzneimittelversagen führen, das sich in einer nachfolgenden Transplantatabstoßung manifestiert, während eine hohe Serumkonzentration zytotoxisch wirken kann [130]. Insbesondere die Applikation von CNIs, aber auch die von anderen Immunsuppressiva ist mit diversen nachteiligen Nebenwirkungen und Toxizitäten verbunden, die auch die Endothelzellen eines transplantierten Organs betreffen können und so einen langfristig funktionsschädigenden Einfluss auf ein solches Organ haben (bezeichnet als chronische CNI-Toxizität).

3.2.2 Prävascularisierung in der Gewebezüchtung

Das Überleben von gezüchteten Gewebestrukturen und Organen nach der Implantation in den Organismus ist abhängig von einer adäquaten und schnellen Vaskularisierung, um die Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. [131]. Die Diffusionsgrenze von Sauerstoff und Nährstoffen liegt zwischen 100-200 μm und eine unzureichende Vaskularisierung größerer Gewebe führt zu Nährstoffmangel und Ausbildung hypoxischer, nekrotischer Bereiche innerhalb des Konstrukts, was eine verringerte Gewebefunktion bedingt [132].

In den letzten Jahren wurden bereits verschiedene Strategien entwickelt, um eine erfolgreiche Vaskularisierung der Gewebe zu ermöglichen. Einige klassische Ansätze konzentrieren sich dabei auf das Einwachsen von Blutgefäßen des Wirts in das Gewebe [131, 133], ausgelöst durch endogene Freisetzung von proangiogenen Faktoren der Zellen in den hypoxischen Bereichen des Gewebes [132, 134] oder auf die Optimierung der Materialeigenschaften von Stützgerüsten [135, 136] sowie die Integration von proangiogenen Wachstumsfaktoren in Stützmaterialien, die langsam in das Gewebe freigesetzt werden [137, 138]. Das Problem dieser Strategien liegt in der geringen Wachstumsrate neu gebildeter Kapillarstrukturen von durchschnittlich 5 µm/h [139]. Eine vollständige Vaskularisierung größerer Gewebekonstrukte würde somit mehrere Wochen dauern und mit einem enormen Funktions- bis zum Gewebeverlust einhergehen [131]. Zudem entdeckten Naito *et al.*, dass Endothelzellen nach ca. 70 Zellzyklen die Fähigkeit zur Zellteilung verlieren und Kapillarstrukturen maximal 1-2 cm in das gezüchtete Gewebe einwachsen können [140].

Ein neuer Ansatz in diesem Forschungsbereich der Gewebezüchtung ist die Erzeugung oder Integration von vaskulären Strukturen innerhalb der Konstrukte, bevor diese implantiert werden [131]. Dabei werden derzeit unterschiedlichste Prävaskularisierungs-Strategien untersucht. Ein Ansatz basiert auf der Verwendung von Zellsystemen wie z. B. Kokulturen, die proangiogene Faktoren sezernieren [141]. Diese Systeme sind der direkten pharmakologischen Stimulation vorzuziehen, da die Sekretion der Faktoren von Zellen reguliert wird und somit im physiologischen Bereich liegt und über den Verlauf der Kultivierung in Gradienten an die unterschiedlichen Stadien der Gefäßbildung und -reifung angepasst wird [132]. Zudem kann die direkte Stimulation mit z. B. VEGF oder bFGF aufgrund zu hoher Konzentrationen zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, wie erhöhter Gefäßdurchlässigkeit [141].

In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Kokultivierung von Endothelzellen mit Osteoblasten, Präadipozyten, Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) die Ausbildung vaskulärer Strukturen fördert [142-148]. Diese Zellen können in Kokultur mit Endothelzellen, aufgrund ihrer parakrinen Effekte, indirekt durch Expression und Sezernierung angiogener Faktoren die Bildung von Gefäßstrukturen beeinflussen [147]. Bei diesen Forschungsansätzen kommen hauptsächlich humane Nabelschnurzellen (HUVECs), mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMECs) und seit neustem auch endotheliale Progenitorzellen (EPCs) zum Einsatz [131, 149]. In Monokulturen besitzen Endothelzellen nicht die Fähigkeit, sich zu vaskulären Strukturen zu organisieren [147]. Die

Kokultivierung von Endothelzellen mit Perizyten unterstützt direkt die Stabilisierung und Reifung der neu gebildeten vaskulären Strukturen und verhindert somit eine Regression der Gefäße [147, 150, 151].

3.2.2.1 Kokultivierung von Endothelzellen und hMSCs

In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze für die Prävaskularisierung von Geweben durch Kokultivierung von Endothelzellen und hMSCs [148, 152]. hMSCs sind relativ einfach aus verschiedenen Quellen wie dem Knochenmark (BM-hMSCs), dem Fettgewebe (AD-hMSCs) und auch der Nabelschnur (UC-hMSCs) zu isolieren, besitzen ein hohes Expansionspotential sowie proangiogene Eigenschaften [141, 153, 154]. Für adulte hMSCs besteht eine begrenzte zelluläre Differenzierbarkeit [155] und es ist bekannt, dass hMSCs in die Umgebung von Entzündungsherden wandern (*Homing*) [156]. Daher wird angenommen, dass ihr positiver Effekt und die therapeutische Wirkung auf die parakrinen Mechanismen zurückzuführen sind [155, 157, 158]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass hMSCs, durch Förderung der Angiogenese, von therapeutischem Vorteil für die Therapie von Erkrankungen wie Myokardinfekten [159], akuten Lungenschäden [160] und neurologischen Erkrankungen sind [161, 162].

Neuere Studien beschäftigen sich daher mit der Fragestellung, wie sich die angiogenen Fähigkeiten der hMSCs auf die Gefäßbildung in Kokultur mit Endothelzellen auswirken und welches Potential dies für die Prävaskularisierung von Gewebekonstrukten birgt. Ma *et al.* untersuchten in einer Studie die angiogene Kapazität von BM-hMSCs und AD-hMSCs in Kokultur mit HUVECs und konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach 7 Tagen eine Bildung von Gefäß-ähnlichen Strukturen in beiden Kokulturen nachweisen [152]. Zudem konnte gezeigt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kokulturen mit BM-hMSCs oder AD-hMSCs gibt und das angiogene Potential der hMSCs aus unterschiedlichen Zellquellen gleich ist [152]. Durch Kokultivierung von BM-hMSCs mit EPCs in einem *Transwell*-System konnten Kampron *et al.* zeigen, dass BM-hMSCs einen signifikanten Einfluss auf die Bildung Gefäß-ähnlicher Strukturen haben und belegen, dass hMSCs ihr angiogenes Potential über die Sezernierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen ausüben [158]. Rao *et al.* beobachteten, dass die Effizienz der Vaskularisierung durch Kokultivierung von Endothelzellen und hMSCs von der Zusammensetzung der Stützmaterialien abhängig ist [163].

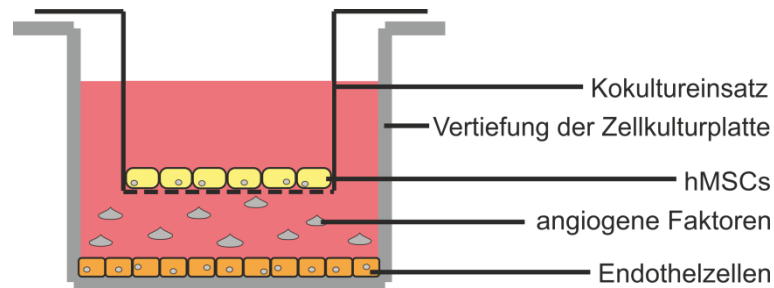


Abb. 3.2-2: Schematische Darstellung eines Transwell-Systems für die indirekte Kokultivierung von Stammzellen (hMSCs) und Endothelzellen. Die Zellen werden räumlich getrennt, jedoch unter Verwendung des gleichen Mediums, kultiviert. Der Boden des Kokultureinsatzes besteht aus einer Membran, die für sezernierte Faktoren und Moleküle, jedoch nicht für Zellen, durchlässig ist. Publiziert in [164].

Während reine Fibrin-Konstrukte eine gute Vaskularisierung förderten, bedingten Konstrukte mit einem hohen Kollagen-Typ-I-Gehalt eine verminderte Gefäßentwicklung [163]. In einem anderen Versuchsansatz konnten Lee *et al.* zeigen, dass unter Verwendung eines Hydrogel-Systems zur Herstellung von Sphäroiden mit einem Kern aus hMSCs der Nabelschnur und einer äußeren Hülle aus HUVECs die Bildung von stabilen und reifen tubulären Strukturen *in vitro* erfolgte [165]. Die hMSCs agierten dabei als perivaskuläre Zellen und stabilisierten die gebildeten vaskulären Netzwerke [165]. McFadden *et al.* verwendeten als Stützstruktur zur Kokultivierung von HUVECs und hMSCs in verschiedenen Kombinationen ein Kollagen-Glycosaminglycol-Konstrukt und demonstrierten, dass die um 3 Tage verzögerte Zugabe von hMSCs zur Bildung der am besten entwickelten Gefäße führte, wobei hier angenommen wurde, dass die hMSCs als Perizyten stabilisierend wirken [166]. Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz von hMSC-konditioniertem Medium, um die Ausbildung vaskulärer Strukturen durch Endothelzellen zu fördern. In mehreren Studien konnte ein positiver Einfluss des konditionierten Mediums auf die tubuläre Formation von Endothelzellen nachgewiesen werden [141, 154].

3.2.2.2 Einfluss der Kultivierungsparameter auf die Produktion angiogener Faktoren in hMSCs

Stammzellen können über mechanische und chemische Signale in ihre lokale Mikroumgebung mit anderen Zellen kommunizieren, um das Zellverhalten zu regulieren und Entwicklungsprozesse zu steuern [167, 168]. Dabei sind die Prozesse, die die Modulation der Produktion und Freisetzung parakriner Faktoren betreffen, von großem Interesse. Sie zeigen, wie die Zellen Informationen empfangen, um ihr Expressionsprofil zu ändern und wie die nachfolgende Freisetzung der Faktoren aus der Zelle reguliert wird. Neuere Studien zeigen, wie im Rahmen der Mechanotransduktion, also der Verarbeitung von mechanischen Stimuli

durch die hMSCs deren Genregulation und damit einhergehend deren parakrine Aktivität beeinflusst wird. Auch chemische Signale sind hier bedeutsam. Die genauen Mechanismen, wie das Sekretom der hMSCs durch die Mikroumgebung moduliert wird, sind noch nicht ausreichend aufgeklärt. Jedoch ist während einer Kultivierung die Kontrolle über die Sauerstoffspannung, die Serumkonzentration und -zusammensetzung sowie die mechanischen Eigenschaften von entscheidender Bedeutung, um die parakrine Aktivität der hMSCs direkt zu beeinflussen und zu steuern. In Hinblick z. B. auf eine mögliche hohe Sekretion proangiogener Faktoren kann eine optimale parakrine Antwort nur erzeugt werden, wenn die Zellen den notwendigen Kultivierungs-Faktoren in der richtigen Stärke ausgesetzt sind.[169]

So werden lösliche Faktoren im Medium von den hMSCs wahrgenommen, woraufhin diese ihre parakrine Antwort verändern [169]. Oskowitz *et al.* identifizierten in mRNA-Expressionsanalysen von hMSCs, die unter Serumdeprivation kultiviert wurden, eine signifikante Hochregulation von VEGF-A, Ang-1 und Ang-2 neben weiteren Faktoren [162]. Wang *et al.* konnten in einer *in vitro* Studie zeigen, dass BM-hMSCs und AD-hMSCs angiogene Faktoren wie VEGF-A, HGF, IGF-1 hochregulieren, wenn sie inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt sind, um einer Gewebeentzündung bzw. -verletzung entgegenzuwirken [170].

In weiteren Studien konnte zudem belegt werden, dass hMSCs die unter Bedingungen mit geringem O₂-Gehalt (hypoxisch) wuchsen, im Vergleich zu hMSCs die bei atmosphärischem O₂-Gehalt (normoxisch) kultiviert wurden, ihre *in vivo* Eigenschaften, wie die proliferative Kapazität, das Oberflächenantigen-Expressionsprofil sowie das Differenzierungspotenzial aufrecht erhalten [169, 171]. Im Organismus ist die O₂-Spannung deutlich niedriger als in der Atmosphäre (20 % O₂), und es zeichnet sich ab, dass dies einen starken Einfluss auf den parakrinen Effekt von hMSCs hat [169]. Paquet *et al.* zeigten, dass konditioniertes Medium von hMSCs, die unter Sauerstoffbedingungen von 0,1 % kultiviert wurden, bessere proangiogene Eigenschaften aufwies als Medium von normoxisch kultivierten hMSCs [172]. Eine weitere Studie zeigte, dass der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion in hMSCs unter hypoxischen Bedingungen von 1,5 % und 2,5 % O₂ wesentlich höher sind als unter normoxischen Bedingungen [173]. Im Gegensatz dazu kann bei einem Sauerstoffgehalt von 5 % kein Unterschied im Glukoseverbrauch und in der Laktatproduktion im Vergleich mit einer Kontrolle unter einem Sauerstoffgehalt von 21 % detektiert werden [173].

Neben den genannten Faktoren sind hMSCs *in vivo* auch mechanischen Kräften, wie der Scherspannung, ausgesetzt und neuere Studien belegen, dass eine mechanische Stimulation der hMSCs die parakrine Aktivität beeinflussen kann [169]. Kasper *et al.* untersuchten den Einfluss mechanischer Beanspruchung von hMSCs auf die proangiogene Kapazität und demonstrierten die Akkumulation von bFGF und MMPs im konditionierten Medium [141]. Die Ergebnisse zeigten jedoch in 2D und 3D eine signifikante Bildung tubulärer Strukturen im konditionierten Medium von mechanisch stimulierten gegenüber nicht stimulierten MSCs [141]. Ein positiver Einfluss von hohem Scherstress (2 Pa) auf die Produktion von VEGF-A, einem der wichtigsten Faktoren während der Angiogenese, konnte von Yuan *et al.* gezeigt werden [174].

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Kultivierungsstrategien für die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. Um eine Abstoßung von Allo- und Xeno-Gefäßtransplantaten zu verhindern, wird durch eine begleitende medikamentöse Therapie die Hemmung des Immunsystems induziert. Dafür werden häufig Immunsuppressiva, wie Tacrolimus und Mycophenolsäure (MPA) angewendet, deren Einsatz oftmals mit Nebenwirkungen verbunden ist. Daher soll in Kapitel 4.1 zunächst evaluiert werden, ob diese Immunsuppressiva zytotoxische Eigenschaften aufweisen und wenn ja, welche Auswirkungen eine immunsuppressive Therapie auf Endothelzellen und damit die körpereigenen Zellen des Patienten hat. Dies soll den Vorteil von bioartifiziellen Gefäßprothesen aus patienteneigenen (autologen) Zellen, die keine Immunsuppression notwendig machen, verdeutlichen. Als autologe Zellquelle könnten, aufgrund des hohen Differenzierungspotentials und der leichten Isolierung in ausreichender Menge, adulte Stammzellen aus Fettgewebe (AD-hMSCs) hier Anwendung finden. Demzufolge erfolgt in Kapitel 4.2 die Charakterisierung von AD-hMSCs hinsichtlich des endothelialen Differenzierungspotentials und ihrem möglichen Einsatz als innere Auskleidung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. Ein weiterer wichtiger Bereich für die erfolgreiche Entwicklung und langfristige Funktion einer bioartifiziellen Gefäßprothese ist in diesem Zusammenhang die Bildung von Kapillar-Netzwerken. Vor allem bei größeren Gefäßprothesen mit mehreren Zellschichten ist die Etablierung von *Vasa Vasorum*, d.h. kleinsten Blutgefäßen, die die äußeren Zellschichten eines Makrogefäßes mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, essentiell. Um solche Kapillar-Netzwerke z. B. aus unreifen Endothelzellen und Stammzellen, die für die Kapillarbildung eine induzierende Rolle spielen, zu generieren, wurde zusätzlich die parakrine Aktivität der AD-hMSCs, bezogen auf die Expression und Sezernierung angiogener Wachstumsfaktoren unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen, untersucht. In Kombination mit einer Glukosedepprivation erfolgten Variationen der Sauerstoffkonzentration und der mechanischen Kultivierungsbedingungen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in Kapitel 4.3 der Einfluss von konditioniertem AD-hMSC-Medium sowie der Einfluss einer direkten und indirekten Kokultur von AD-hMSCs und Endothelzellen auf die Bildung von tubulären, kapillar-ähnlichen Strukturen *in vitro* untersucht. In Kapitel 4.4 wird die Etablierung einer dynamischen Kultivierung von Endothelzellen beschrieben, die für die Gefäßentwicklung und -reifung einen entscheidenden Einfluss hat. Dabei wurde der Einfluss von definiertem

Scherstress, der *in vivo* aufgrund der hämodynamischen Kräfte des Blutflusses auf die Endothelzellen wirkt, auf die Morphologie, Ausrichtung und Physiologie der Zellen genauer untersucht.

4.1 Analyse der Toxizität von Immunsuppressiva auf HUVECs

In diesem Kapitel werden die zytotoxischen Eigenschaften der in der Organtransplantation derzeit am häufigsten verwendeten Immunsuppressiva Tacrolimus und Mycophenolsäure (MPA) auf Endothelzellen untersucht. Immunsuppressiva unterdrücken das Immunsystem in der Regel auf Basis der Leukozyten und verhindern dadurch eine Abstoßung allogener Transplantate. Diese Immunsuppressiva können jedoch im Organismus Nebenwirkungen auch auf andere zelluläre Strukturen ausüben und so z. B. eine frühe endotheliale Dysfunktion in den transplantierten Organen verursachen. Es ist daher wichtig, ihre zytotoxische Wirkung auf Endothelzellen sowie mögliche Auswirkungen auf die angiogenen Eigenschaften dieser Zellen genauer zu untersuchen. Als endotheliale Modellzellen wurden in allen folgenden Versuchen humane Nabelschnurzellen (HUVECs) verwendet. Dieses Kapitel wurde teilweise veröffentlicht in: *Thoms et al. (2018). Tacrolimus inhibits angiogenesis and induces disaggregation of endothelial cells in spheroids– Toxicity testing in a 3D cell culture approach. Toxicology in Vitro, 53, 10-19.*

4.1.1 Zytotoxizitätsbestimmung von Tacrolimus und Mycophenolsäure in 2D

Eine Analyse der toxischen Wirkung der immunsuppressiven Medikamente Tacrolimus und MPA erfolgte zunächst auf einer zweidimensionalen (2D) Einzelschicht von HUVECs. Die HUVECs wurden mit verschiedenen Tacrolimus- (10 µg/ml - 80 µg/ml) und MPA- (0,12 µg/ml - 480 µg/ml) Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert und die Zellvitalität wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue[®] (CTB) Cell Viability Tests bestimmt.

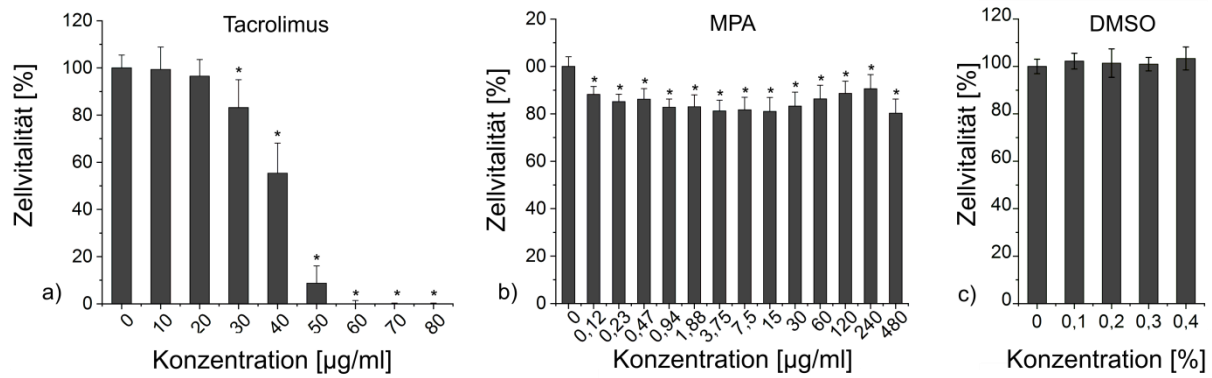


Abb. 4.1-1: Vitalitätsbestimmung von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (a; 10 µg/ml - 80 µg/ml), MPA (b; 0,12 µg/ml - 480 µg/ml) und DMSO (c; 0,1 - 0,4 %) in einer 2D-Einzelschicht. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 5 (a) und N = 3 (b, c). * = $p < 0,05$ definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle. Publiziert in [175].

Eine konzentrationsabhängige Auswirkung auf die Vitalität der HUVECs nach Behandlung mit dem Immunsuppressivum MPA ist in Abb. 4.1-1 b dargestellt. Die Vitalität der HUVECs lag nach der Inkubation mit MPA zwischen 80,3 % (bei 480 µg/ml) und 90,5 % (bei 240 µg/ml). Somit zeigt MPA in den getesteten Konzentrationen keine zytotoxische Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit auf die Endothelzellen. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante und dosisabhängige Abnahme der Zellvitalität der HUVECs nach Inkubation mit definierten Tacrolimuskonzentrationen beobachtet (Abb. 4.1-1 a). Während Tacrolimuskonzentrationen bis 20 µg/ml keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität zeigten, konnte ab 30 µg/ml ein signifikanter zytotoxischer Effekt detektiert werden. Ab einer Konzentration von 60 mg/ml wurde keine Zellvitalität mehr nachgewiesen. Für die 2D-Kultur ergibt sich somit aus der Dosis-Wirkungskurve eine mittlere inhibitorische Konzentration für Tacrolimus von $40,23 \mu\text{g/ml} \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$. Zudem wurde der Einfluss des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO), welches zum Lösen der Immunsuppressiva verwendet wurde, auf die Vitalität der HUVECs untersucht. Die Behandlung der HUVECs mit 0,4 % DMSO, welches die höchste DMSO-Konzentration in allen Experimenten darstellte, führte zu einer Zellvitalität von $103,35 \% \pm 4,84 \%$ (Abb. 4.1-1 c). Damit konnte gezeigt werden, dass von der verwendeten DMSO-Konzentration keine toxische Wirkung auf die Endothelzellen ausgeht.

Um zu bestimmen, ob der Verlust der Zellvitalität, nach Inkubation mit Tacrolimus, durch Apoptose oder Nekrose verursacht wurde, wurden die Caspase-3/7-Aktivität und die Lactatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung analysiert. Diese wurden unter Verwendung der Negativkontrolle normalisiert. Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod unter

genetischer Kontrolle, der durch eine Hochregulation von Caspasen in der Zelle ausgelöst wird. Dabei bleibt die Zellmembran intakt. Die Nekrose wird durch eine zelluläre Schädigung ausgelöst, die folglich zu Membrandefekten und damit verbunden zu einem irreversiblen Verlust der Zellfunktion und der Freisetzung von LDH führt.

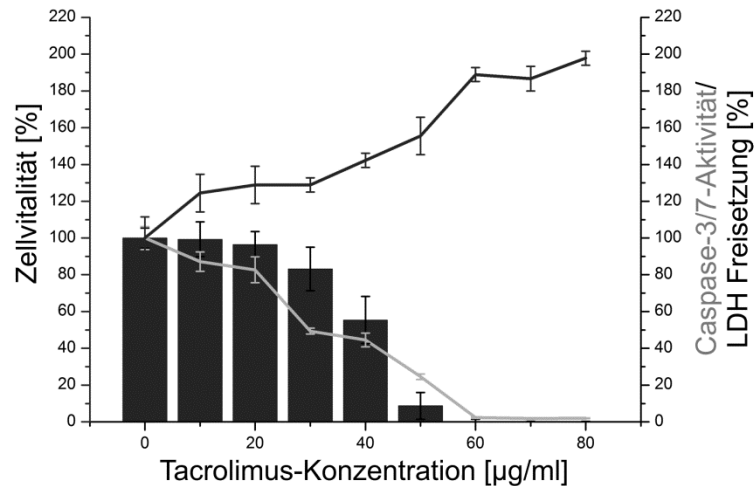


Abb. 4.1-2: Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität und LDH-Freisetzung von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (10 µg/ml - 80 µg/ml) zur Überprüfung, ob der Verlust der Zellvitalität durch Apoptose oder Nekrose verursacht wurde. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 1 in Dreifachbestimmung. Alle Messungen wurden auf die Negativkontrolle normalisiert. Publiziert in [175].

Die Analyse der Caspase-3/7-Aktivität und LDH-Freisetzung nach Tacrolimus-Behandlung der HUVECs zeigte eine zweifache Zunahme an LDH im Medium bei einer Tacrolimuskonzentration von 70 mg/ml, im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 4.1-2). Im Gegensatz dazu konnte eine nahezu proportionale Abnahme der Caspase-3/7-Aktivität zur Zellvitalität beobachtet werden. Das Ergebnis impliziert, dass der Verlust der Zellvitalität der HUVECs nach Inkubation mit Tacrolimus durch Nekrose verursacht wird. Darüber hinaus wurden mikroskopische Aufnahmen von behandelten und unbehandelten HUVECs gemacht, um die Auswirkung von Tacrolimus auf die Zellmorphologie und -struktur und damit den physiologischen Zustand der Zellen sichtbar zu machen (Abb. 4.1-3). Die Behandlung der HUVECs mit 18 ng/ml, was dem maximalen Talspiegel an Tacrolimus in der initialen Therapie für 1-3 Monate nach Organtransplantation entspricht, hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Zellmorphologie. Bei einer Konzentration von 40,23 µg/ml, der mittleren inhibitorischen Konzentration in der 2D-Untersuchung, ist neben dem Verlust vieler Zellen bereits eine leichte Schwellung der Zellen einhergehend mit einer zellulären Schädigung zu erkennen. Eine Inkubation der Zellen mit 70 µg/ml Tacrolimus, was eine letale Dosis für die

HUVECs darstellt, verdeutlicht hingegen die für den Prozess der Nekrose typische irreversible Zellschwellung und das dadurch bedingte Aufplatzen der Zellmembran.

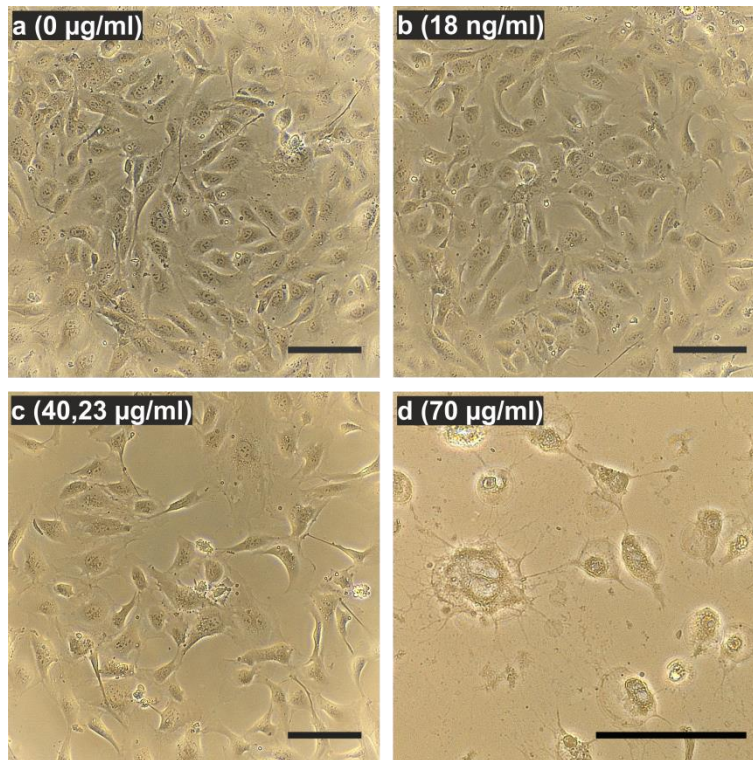


Abb. 4.1-3: Zellmorphologie von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 mg/ml, 18 ng/ml, 40,23 µg/ml, 70 µg/ml). Der Maßstab zeigt 100 µm. Publiziert in [175].

Aufgrund der geringen zytotoxischen Wirkung von MPA gegenüber den HUVECs in der 2D-Testung wurde in den folgenden Analysen ausschließlich der Einfluss von Tacrolimus auf die Endothelzellen weiter untersucht.

4.1.2 Etablierung von HUVEC-Sphäroiden zur 3D-Toxizitätstestung von Tacrolimus

Obwohl die Komplexität zellulärer Prozesse im Organismus bekannt ist, werden Toxizitätsstudien hauptsächlich noch in 2D-Testsystemen durchgeführt. Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass sich die in den 2D-Zellsystemen ermittelten Toxizitäten verschiedener Substanzen deutlich von der eigentlichen Wirkung im Organismus unterscheiden. Im Gegensatz zu der homogenen Umgebung in einem Einzelschicht-Kultivierungssystem, in der alle Zellen gleiche Bedingungen vorfinden, treffen Zellen in 3D-Kulturen auf heterogene Bedingungen mit Sauerstoff- und pH-Gradienten sowie differenzierten Proliferationsprofilen [176]. Um eine gewebeähnliche Organisation der Zellen zu imitieren und die Wirkstoff-induzierte Zellschädigung von Tacrolimus in einer 3D-Umgebung zu analysieren, wurde die Formation von HUVEC-Sphäroiden etabliert.

3D-Sphäroide weisen eine komplexe Organisation der Zellen mit zahlreichen Zell-Zell- und Zell-EZM-Wechselwirkungen auf, die essentiell für die Übertragung von physikalischen und biochemischen Signalen sind, um eine optimale zelluläre Antwort zu ermöglichen [70]. Die initiale Zellzahl der HUVECs für die Sphäroid-Formation hat einen entscheidenden Einfluss auf die Größe und Struktur der Sphäroide. Um das Verhältnis von Startzellzahl und Sphäroidgröße zu bestimmen, wurden $2 \cdot 10^3$ Zellen und $8 \cdot 10^3$ Zellen pro Vertiefung in einer nicht adhärenen 96-Loch-Zellkulturplatte mit U-förmigem Boden ausgesiedelt.

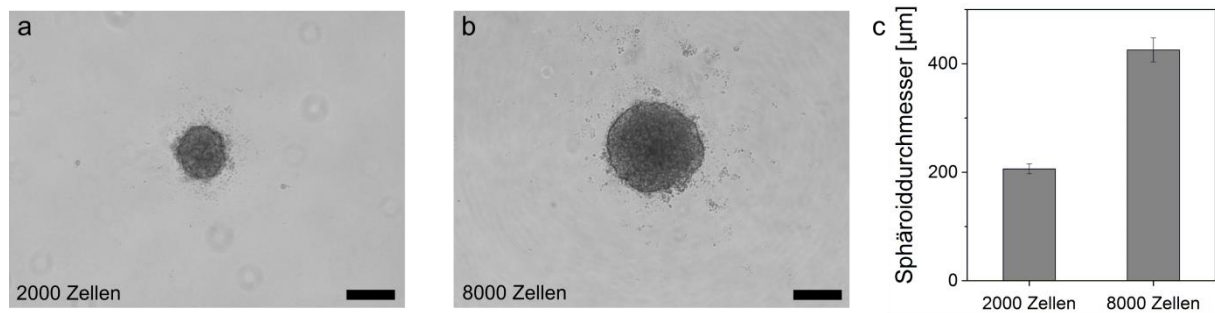


Abb. 4.1-4: Sphäroidmorphologie (a, b) sowie Sphäroiddurchmesser (c) nach 24 h Äquilibriumsdauer mit einer Startzellzahl von $2 \cdot 10^3$ HUVECs/Vertiefung und $8 \cdot 10^3$ HUVECs/Vertiefung. Der Maßstab zeigt 200 µm. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N = 3$ in Fünffachbestimmung.

Die Sphäroide mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^3$ HUVECs erreichten eine Größe von durchschnittlich $206,4 \mu\text{m} \pm 9,21 \mu\text{m}$, während die Sphäroide aus 8000 HUVECs eine durchschnittliche Größe von $438,56 \mu\text{m} \pm 10,06 \mu\text{m}$ aufwiesen (Abb. 4.1-4). Die ermittelten Daten zeigten eine deutliche Korrelation zwischen der Zellzahl und dem Sphäroiddurchmesser. So führte die Vervierfachung der Zellzahl zu einer Verdopplung des Sphäroiddurchmessers. Im Allgemeinen weisen Sphäroide mit einem Durchmesser von weniger als 500 µm eine Schichtstruktur ohne nekrotische Zellen im Kern auf. Während die äußere Schicht aus proliferierenden Zellen gebildet wird, befinden sich im Inneren ruhende Zellen [177]. Zudem zeigen Sphäroide größer als 100 - 200 µm Diffusionsbegrenzungen für Sauerstoff, Nährstoffe, Wachstumsfaktoren und Medikamente, wie sie in natürlichen Gewebestrukturen vorkommen und sind daher geeignete Zellsysteme für eine Testung von Substanzen in einer 3D-Umgebung [178, 179]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde für den folgenden 3D-Toxizitätstest eine Zelldichte von $8 \cdot 10^3$ Zellen je Sphäroid verwendet. Gleichzeitig wird dadurch eine Vergleichbarkeit mit den Toxizitätstestungen in 2D-Kultur gewährleistet, die ebenfalls mit $8 \cdot 10^3$ Zellen/Vertiefung durchgeführt wurden. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die initiale Formation der Sphäroide bereits nach 8 h nahezu abgeschlossen ist (Abb. 4.1-5). Die Äquilibriumszeit wurde jedoch auf 24 h verlängert und es war zu erkennen, dass dies zur Bildung einer kompakteren Struktur führte,

die vermutlich durch die Ausbildung von starken und physiologischen Zell-Zell-Verbindungen bedingt ist.

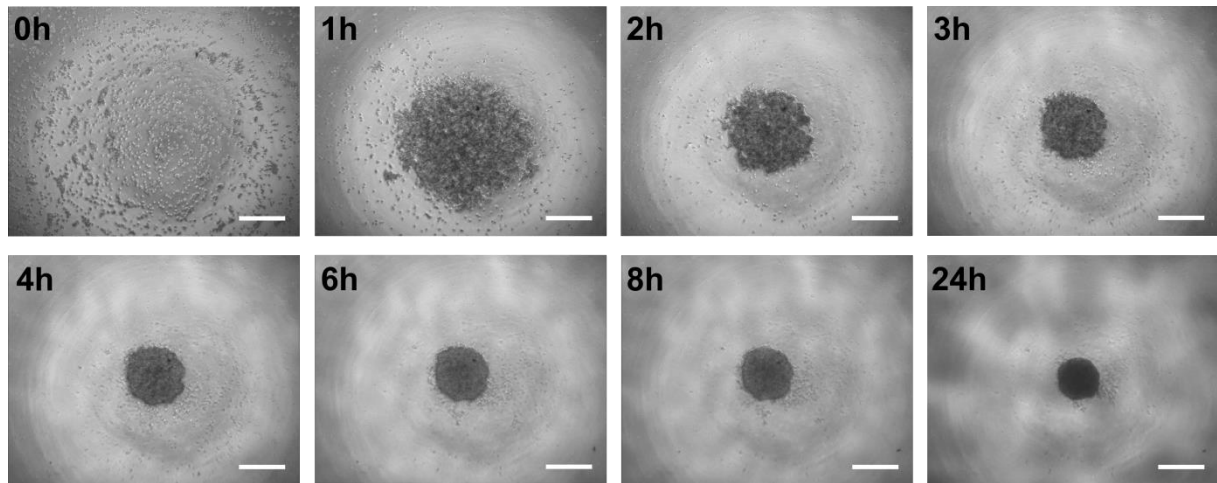


Abb. 4.1-5: Sphäroidformation mit einer Startzellzahl von $8 \cdot 10^3$ HUVECs über einen Zeitraum von 24 h. Der Maßstab zeigt 500 μm .

Nach der 24-stündigen Äquilibrationszeit wurden die Sphäroide mit Tacrolimuskonzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ - 70 $\mu\text{g/ml}$ für weitere 24 h inkubiert. Die Analyse der Zellvitalität mittels CTB-Test nach Tacrolimusbehandlung der Sphäroide zeigte auch in der 3D-Kultur eine signifikante und dosisabhängige Abnahme der Lebensfähigkeit der HUVECs. Dennoch zeigen die Dosis-Wirkungs-Kurven signifikante Unterschiede in der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von Tacrolimus zwischen dem 2D- und 3D-Zellkultursystem.

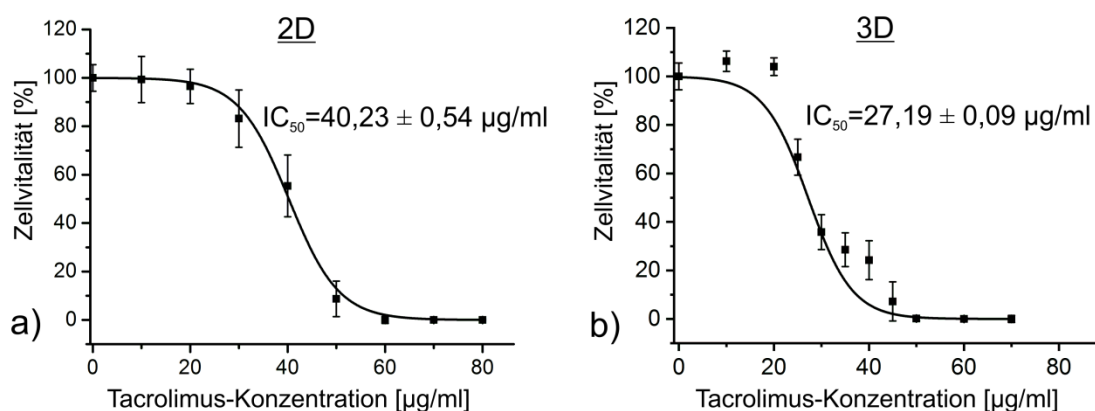


Abb. 4.1-6: Dosis-Wirkungskurve sowie IC_{50} -Konzentration nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus in einem 2D-(a) und 3D-(b) Zellkultursystem von HUVECs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N = 5$ (2D) und $N = 2$ (3D), jeweils in Dreifachbestimmung. Alle Messungen wurden auf die Negativkontrolle (100 %) normalisiert. Publiziert in [175].

Während in der 2D-Kultur der HUVECs (Abb. 4.1-6 a) ein IC_{50} - Wert von $40,23 \mu\text{g/ml} \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$ für Tacrolimus detektiert wurde, konnte in der 3D-Sphäroidkultur ein IC_{50} - Wert von $27,19 \mu\text{g/ml} \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ ermittelt werden (Abb. 4.1-6 b). Damit ist die Tacrolimuskonzentration, die eine halbmaximale Inhibition der Zellvitalität bewirkt, in den 3D-Sphäroiden um $13,04 \mu\text{g/ml}$ geringer als in der 2D-Kultur. Die Ergebnisse zeigen daher eine höhere Empfindlichkeit des heterogenen 3D-Kultursystems, das im Vergleich zur homogenen 2D-Kultur der HUVECs die *in vivo* Bedingungen wesentlich besser widerspiegelt. Zellen, die *in vitro* in einer 2D-Einzelschicht kultiviert werden, sind nicht in der Lage komplexe Zellstrukturen, wie sie in der natürlichen Umgebung vorherrschend sind, nachzubilden. Es kommt zu einem Verlust zahlreicher interzellulärer Signalwege, wodurch die zellulären Prozesse und Mechanismen verändert werden. [179, 180]

In diesem Zusammenhang konnten Lin und Chang nachweisen, dass ein für das Adhäsionsmolekül Integrin spezifischer Antikörper die Zellproliferation in einer Monozellschicht nicht hemmen kann, wohingegen in der 3D-Kultur eine Hemmung dokumentiert werden konnte [178]. Das Ergebnis deutet daraufhin, dass spezifische Zell-Zell-Kontakte über Integrine nur in einer 3D-Umgebung gebildet werden. Integrine sind wichtig für die Übertragung mechanischer Signale auf Aktinfilamente [178]. Oloumi *et al.* konnte zudem nachweisen, dass 3D-Sphäroidsysteme andere RNA- und Proteinexpressionsprofile aufweisen, wodurch die Reaktionsfähigkeit der Zellen auf Arzneimittel beeinflusst wird [181]. Sambale *et al.* (2015) beobachteten unterschiedliche Sphäroidmorphologien für verschiedene Zelltypen [182]. Während einige Zelltypen sehr kompakte Sphäroide bilden, führen andere eher zur Formation von lockeren Sphäroid-Strukturen. Dies zeigt, dass die Zell-Zell- und Zell-EZM-Wechselwirkungen zelltypspezifisch sind und somit unterschiedliche Empfindlichkeiten von Zellen in Sphäroiden und 2D-Monoschichten erhalten werden können. Daher sollte das Zellsystem, das dem natürlichen Zustand am nächsten kommt, für die spezifische Anwendung verwendet werden.

Die zytotoxische Wirkung von Tacrolimus auf die HUVEC-Sphäroide wurde ebenfalls durch eine Lebend-/Tot-Färbung untersucht (Abb. 4.1-7).

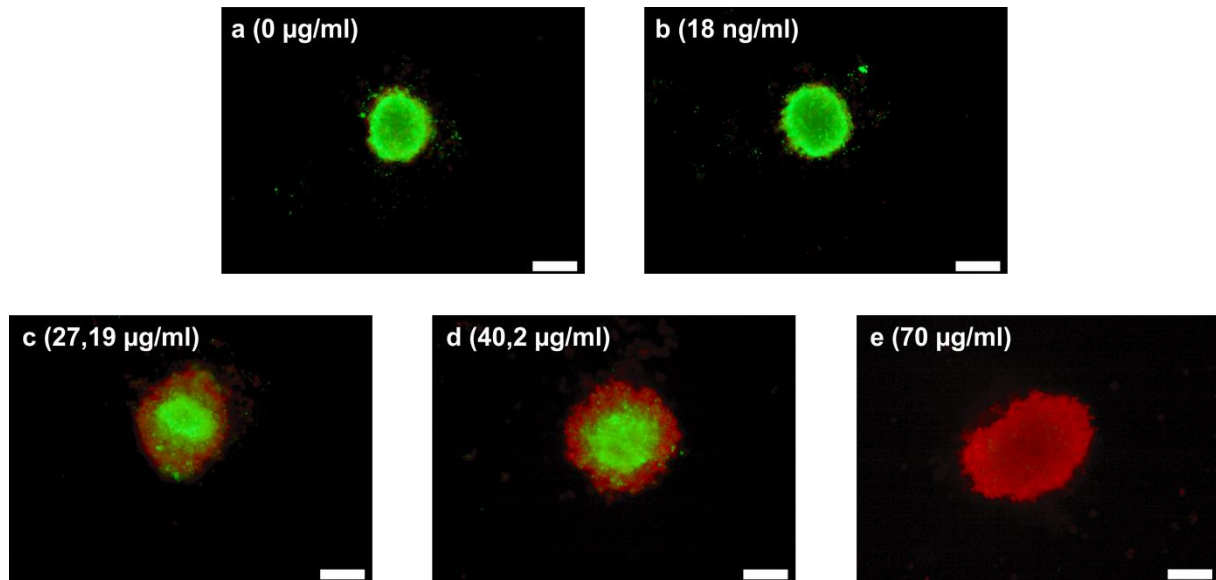


Abb. 4.1-7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Lebend-(grün)/Tot-(rot) Färbung von HUVEC-Sphäroiden nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml - 70 µg/ml). Der Maßstab zeigt 200 µm. Publiziert in [175].

Während in der Negativkontrolle (0 µg/ml Tacrolimus) und den Sphäroiden, die mit einer Konzentration von 18 ng/ml inkubiert wurden, fast ausschließlich lebende Zellen (grün) (Abb. 4.1-7 a und b) mit einer kleinen äußeren Zone toter Zellen (rot) zu beobachten waren, führten steigende Tacrolimuskonzentrationen ($IC_{50(\text{in } 3D)} = 27,19 \mu\text{g/ml}$; $IC_{50(\text{in } 2D)} = 40,2 \mu\text{g/ml}$) zu einer Zunahme der toten Zellen von der äußeren Zone in Richtung des inneren Kerns der Sphäroide (Abb. 4.1-7 c und d). Bei einer Exposition mit 70 µg/ml Tacrolimus besteht der Sphäroid ausschließlich aus toten Zellen (rot), was erklärt, warum im CTB-Test keine Zellvitalität mehr vorhanden ist (Abb. 4.1-7 e).

Wie bereits in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, basiert die Wirkung von Tacrolimus auf der Hemmung der Calcineurinphosphatase, die den nukleären Kernfaktor von aktivierten T-Lymphozyten (NFAT) dephosphoryliert und aktiviert, wodurch die T-Zellproliferation inhibiert wird. Es ist bekannt, dass NFAT nicht nur in Immunzellen, sondern auch in anderen Zelltypen eine entscheidende Rolle spielt [183]. Armesilla *et al.* zeigten, dass die Aktivierung und nukleäre Translokation von NFAT in Endothelzellen einen Überschuss im Expressionsniveau von VEGF, dem dazugehörigen Rezeptor VEGFR und die Expression des Cyclooxygenase 2 (COX-2)-Enzyms induziert, das aus zellulären Phospholipiden Prostaglandin 2 (PGE₂) synthetisiert [184]. Die produzierten und auf parakrinem Weg freigesetzten Zytokine beeinflussen die Proliferation und Migration von Endothelzellen [185]. Eine Tacrolimus-induzierte Hemmung von NFAT verursacht daher eine Veränderung im

Endothelzellmetabolismus. In Übereinstimmung mit den ermittelten Ergebnissen erklärt dies die dosisabhängige, inhibitorische Wirkung des Tacrolimus auf die Endothelzellen.

4.1.3 Auswirkung von Tacrolimus auf die Sphäroidmorphologie

Um den Einfluss von Tacrolimus auf die Endothelzellen in 3D-Sphäroiden zu beschreiben, erfolgte neben der Analyse der Zellvitalität auch eine mikroskopische Analyse der Sphäroidmorphologie nach Tacrolimusapplikation. In Abb. 4.1-8 a ist exemplarisch die Morphologie von Sphäroiden nach 24 h Äquilibriumdauer dargestellt, welche anschließend für die Inkubation mit Tacrolimus verwendet wurden. Abb. 4.1-8 c zeigt exemplarisch die Sphäroidmorphologie nach 24 h Inkubation mit 0 µg/ml Tacrolimus, welche als Negativkontrolle für die Normierung der Sphäroidfläche verwendet wurde. Die Phasenkontrastaufnahmen erlauben eine optische Beurteilung der Sphäroide.

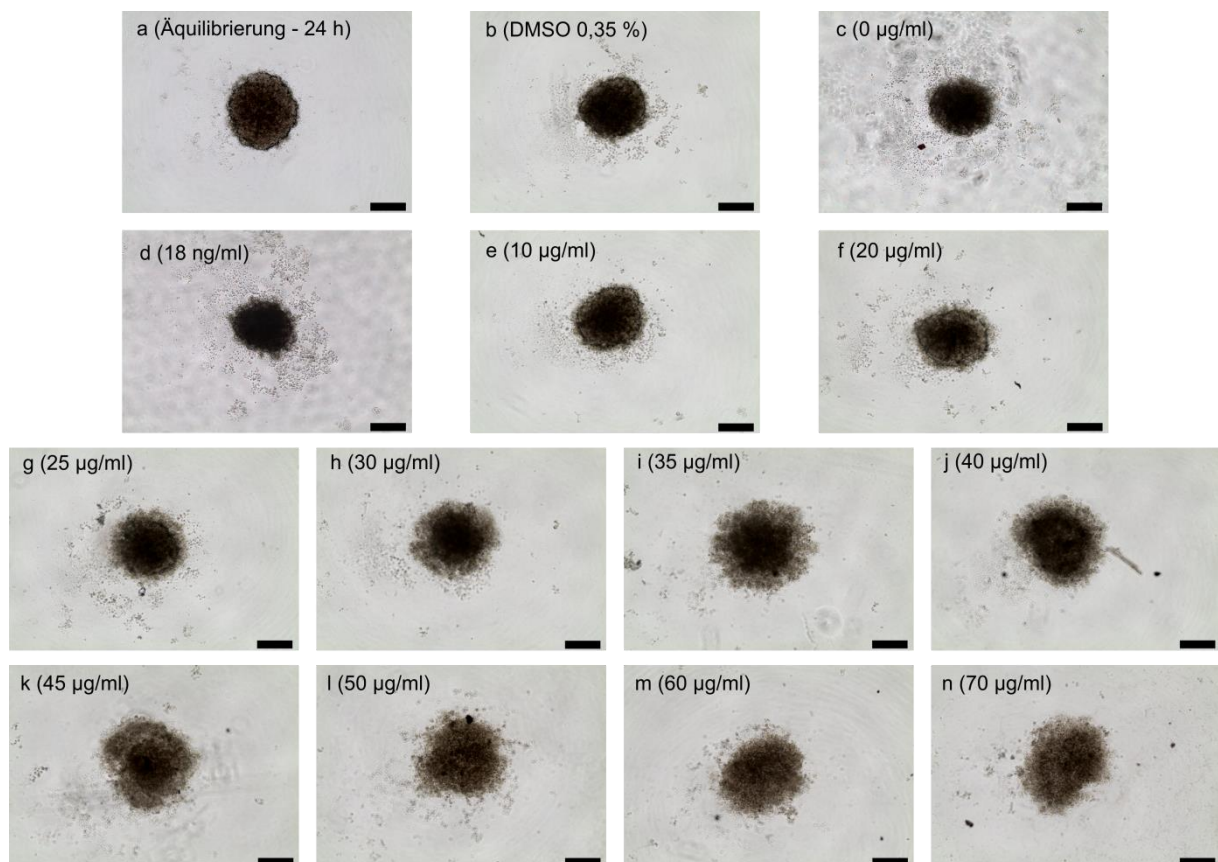


Abb. 4.1-8: Sphäroidmorphologie nach 24 Äquilibriumierung (a) sowie weiteren 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml - 70 µg/ml; c-n) und 0,35 % DMSO (b). Der Maßstab zeigt 200 µm. Publiziert in [175].

Nach 24 h Äquilibriumierung bildeten sich kompakte Sphäroide mit einer definierten Grenze zum Medium. Eine weitere Inkubation der Sphäroide über 24 h mit 0 µg/ml Tacrolimus resultierte in noch kleineren und kompakteren Sphäroiden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass

die Zellen innerhalb der Sphäroide verstärkt Zell-Zell-Verbindungen ausgebildet haben. Zellaggregation und Zell-Zell- sowie Zell-EZM-Wechselwirkungen in Sphäroidstrukturen werden direkt durch die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Cadherine beeinflusst. [186]. Aufgrund einer längeren Äquilibrationszeit können sich Expressionsprofile der HUVECs ändern, so dass im Laufe der Zeit mehr Adhäsionsmoleküle erzeugt werden.

Während 0,35 %iges DMSO, welches zum Lösen von Tacrolimus verwendet wird und die höchste Konzentration im 3D-Versuch darstellt, keine Auswirkung auf die Sphäroidmorphologie hatte (Abb. 4.1-8 b), zeigten die Sphäroide, die mit Tacrolimuskonzentrationen von 18 ng/ml - 70 µg/ml inkubiert wurden, eine dosisabhängige Disaggregation der Sphäroidstruktur, die parallel mit einer Abnahme der Zellvitalität einherging (Abb. 4.1-9). Da die Form der Sphäroide nach Tacrolimusbehandlung nicht komplett rund war, wurde eine quantitative Beurteilung der Morphologie-Änderung durch die Flächenermittlung der Sphäroide realisiert. Die Fläche wurde gegenüber der Negativkontrolle (unbehandelte Zellen, 24 h Kultivierung mit 0 µg/ml Tacrolimus; entspricht 100 %) standardisiert. Nach Inkubation der Sphäroide mit einer 0,35 %igen DMSO-Lösung konnte keine signifikante Änderung der Sphäroidfläche ($97,91 \% \pm 9,21 \%$) detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit einer Tacrolimuskonzentration von 18 ng/ml, die dem maximalen Talspiegel in der Anfangstherapie (1-3 Monate) nach einer Organtransplantation entspricht [187], zu einer erhöhten Sphäroidfläche von $113,03 \% \pm 11,88 \%$ (Abb. 4.1-9). Eine Inkubation der HUVECs mit Tacrolimus-konzentrationen von bis zu 20 µg/ml führte zu einer Zunahme der Sphäroidfläche von bis zu 25 %, jedoch ohne signifikante Veränderung der Zellvitalität. Eine weitere Erhöhung der Tacrolimuskonzentration von 25 µg/ml - 45 µg/ml führte dosisabhängig zu einem weiteren signifikanten Anstieg der Sphäroidfläche auf bis zu $207,75 \% \pm 13,18 \%$ (45 µg/ml), während gleichzeitig die Zellvitalität auf $7,2 \% \pm 8,0 \%$ sank. Parallel dazu veränderte sich die Sphäroidmorphologie mit einem abnehmenden kompakten inneren Kern aus Zellen und einer äußeren, zunehmend größer werdenden Zone mit aufgelockerter Zellstruktur.

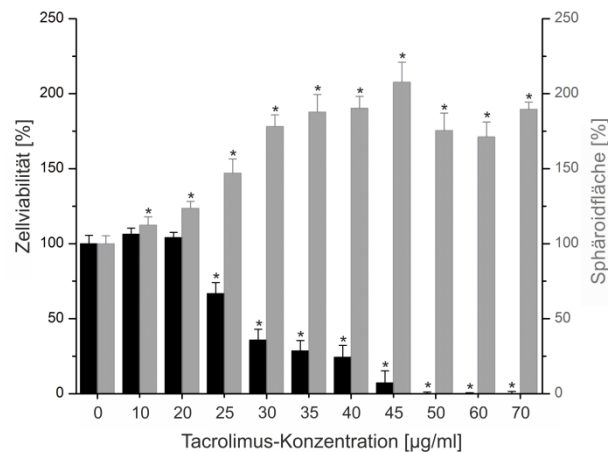


Abb. 4.1-9: Sphäroidfläche im Vergleich zur Zellvitalität der HUVEC-Sphäroide nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml - 70 µg/ml). Die Zellvitalität und Sphäroidfläche wurden auf die Negativkontrolle (100 %) normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für N = 2 in Vierfachbestimmung. * = $p < 0,05$ definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle. Publiziert in [175].

Eine Inkubation mit 50 µg/ml - 70 µg/ml Tacrolimus bewirkte eine maximale Erhöhung der Sphäroidfläche auf $189,68 \% \pm 4,9 \%$ (70 µg/ml), was darauf zurückzuführen ist, dass Zellfragmente bereits aus dem Zellverband freigesetzt wurden bzw. dissoziiert sind (Abb. 4.1-8 l, m, n). Diese Entwicklung war bei einer Konzentration von 70 µg/ml am deutlichsten erkennbar, wo neben den Zellfragmenten bereits viele einzelne Zellen aus dem Zellverband dissoziiert waren. Eine komplette Dissoziation der Zellen und ein Zusammenbruch der Sphäroide wurde jedoch nicht beobachtet, was nahe legt, dass die Zell-Zell- und Zell-EZM-Wechselwirkungen nicht vollständig unterbrochen wurden, selbst wenn die Zellen keine Vitalität mehr aufwiesen.

Die Ergebnisse bestätigen, dass Tacrolimus in einer Konzentration von bis zu 20 µg/ml für HUVECs in einem Sphäroid nicht toxisch war, aber möglicherweise einen negativen Effekt auf die Zell-Zell- und Zell-EZM-Wechselwirkungen der Endothelzellen hatte. Die optimale Funktion eines Gewebes hängt stark vom komplexen System der Zelladhäsion ab und kann nur durch die Wechselwirkung vieler Proteine aufrechterhalten werden. Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen leiten physikalische und chemische Signale weiter, die massive Auswirkungen auf das zelluläre Verhalten haben [70]. Zelladhäsionsmoleküle, die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, umfassen Integrine, Immunglobuline und Proteoglykane, aber die wichtigsten interzellulären Adhäsionsmoleküle sind die Cadherine [186, 188]. Um die Auswirkung von Tacrolimus auf die VE-Cadherin-Interaktionen zwischen den Zellen zu testen, wurden die Sphäroide nach Tacrolimusapplikation fixiert und mittels VE-Cadherin-Antikörper eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

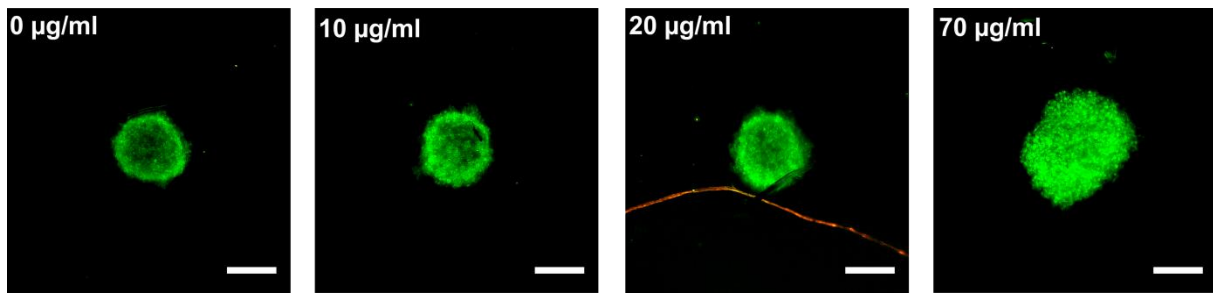


Abb. 4.1-10: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer VE-Cadherin Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC-Sphäroiden nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 70 µg/ml). Der Maßstab zeigt 200 µm.

Ein Vergleich der in Abb. 4.1-10 gezeigten Sphäroide nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus und anschließender VE-Cadherin Fluoreszenzfärbung bestätigt die Vermutung, dass Tacrolimus einen Effekt auf die VE-Cadherin-Verbindungen hatte. Während in der Negativkontrolle (0 µg/ml) ausschließlich in den äußeren Bereichen des Sphäroids eine hohe Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden konnte, zeigten die Sphäroide nach Inkubation mit 10 µg/ml bzw. 20 µg/ml Tacrolimus eine Zunahme der Intensität auch im Kern der Sphäroide. Diese Beobachtung impliziert, dass die Zell-Zell-Verbindungen in den Sphäroiden vor der Tacrolimusbehandlung sehr stark ausgeprägt waren und durch die daraus resultierende kompakte und stabile Sphäroidstruktur eine Diffusion des primären VE-Cadherin-Antikörpers sowie des sekundären Detektionsantikörpers in das Innere des Sphäroids sehr gering war. Eine Erklärung für die Zunahme der Fluoreszenzintensität im Kern der Sphäroide, nach Inkubation mit nicht toxischen Tacrolimuskonzentrationen (10 µg/ml und 20 µg/ml) könnte auf eine Beeinträchtigung der Zell-Zell-Verbindungen zurückzuführen sein. Dadurch könnte es zu einer Auflockerung der Sphäroidstruktur kommen, sodass die Antikörper bis in das Zellinnere vordringen konnten. Die Inkubation mit einer toxischen Tacrolimuskonzentration (70 µg/ml) führte zu einer gleichmäßigen Fluoreszenzintensität in der komplett aufgelockerten Sphäroidstruktur nach VE-Cadherin-Färbung. Dieses Ergebnis zeigt, dass die VE-Cadherin-Interaktionen unter diesen Bedingungen nicht vollständig unterbrochen wurden. Eine weitere Erklärung für die leichte Dissoziation der Sphäroidstruktur könnte ein negativer Einfluss von Tacrolimus auf weitere intrazelluläre Zell-Zellverbindungen wie z.B. Integrine sein. Lin und Chang konnten zeigen, dass starke Cadherin-Cadherin Verbindungen zwischen den Zellen essentiell für den Prozess der Sphäroidformation sind [178]. Infolge dessen könnte die Störung der Zell-Zell-Verbindungen die zelluläre Kommunikation und dadurch die Zellmorphologie, Funktion, Proliferation und Medikamentensensitivität der Zellen

beeinflussen. Dies ist eine potentielle Erklärung für die endotheliale Dysfunktion und die damit teilweise einhergehenden Abstoßung von Transplantaten nach einer Immunsuppressiva-Therapie mit nicht toxischen Spitzenspiegeln von Tacrolimus, die deutlich unter 10 µg/ml liegen.

4.1.4 Auswirkung von Tacrolimus auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen

Ein Schlüsselaspekt für die erfolgreiche Integration und Funktionalität eines Transplantats im Empfänger ist eine ausreichende Vaskularisierung des Gewebes, welche durch angiogene Prozesse im adulten Organismus ermöglicht wird. Daher wurden die Nebenwirkungen von Tacrolimus auf Endothelzellen auch in einem Angiogenese-Assay untersucht. Dafür wurden Endothelzellen auf einem Hydrogel, einer sogenannten basalmembranartigen Matrix, welche aus dem Sekret von Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumorzellen besteht, ausgesät und direkt mit verschiedenen Tacrolimuskonzentrationen (18 ng/ml, 40,2 µg/ml, 70 µg/ml) inkubiert (Abb. 4.1-11). Die Basalmembran übernimmt *in vivo* viele biologische Funktionen, wie die Übertragung mechanischer Signale, die die Gewebespezifität aufrechterhalten [189]. Das Sekret der EHS-Zellen, das EZM-Proteine wie Laminin I oder Kollagen IV enthält, ist in seiner Zusammensetzung der physiologischen Basalmembran, die in allen endothelialen Geweben vorkommt [189], sehr ähnlich und erlaubt dadurch eine schnelle und quantifizierbare Bildung von Gefäßstrukturen [190]. Die optische Beurteilung der gebildeten kapillarähnlichen Strukturen nach Tacrolimusbehandlung zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen der Negativkontrolle (0 µg/ml) und 18 ng/ml (Abb. 4.1-11). Eine Inkubation der HUVECs mit der IC₅₀-Konzentration, die in dem 2D-Versuchsansatz ermittelt wurde, bewirkte eine stark verminderte Formation der kapillarähnlichen Strukturen, dabei war keine zusammenhängende Netzwerkstruktur mehr erkennbar. Bei einer Konzentration von 70 µg/ml Tacrolimus bildeten sich keine kapillarähnlichen Strukturen auf dem Hydrogel und dies korreliert mit den Ergebnissen der Toxizitätstestung, bei der ein vollständiger Verlust der Zellvitalität nachgewiesen wurde.

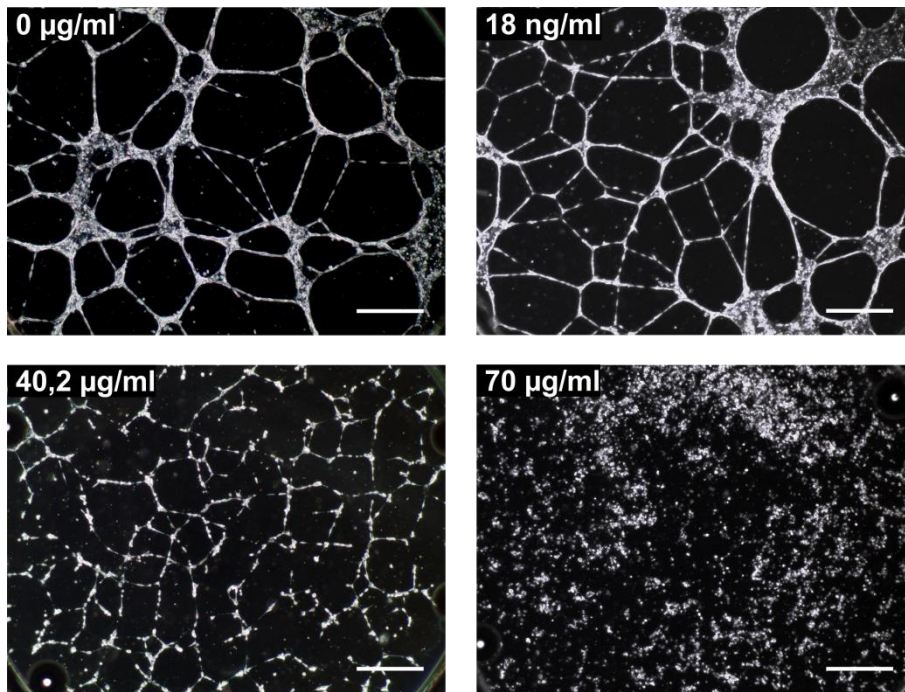


Abb. 4.1-11: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml, 18 µg/ml, 40,2 µg/ml und 70 µg/ml) in einem Angiogenese-Assay. Der Maßstab zeigt 500 µm. Publiziert in [175].

Diese Strukturen wurden mittels Angiotool[®] quantitativ analysiert. Es zeigte sich, dass verglichen mit der Negativkontrolle bereits eine Tacrolimuskonzentration von 18 ng/ml zu einer leicht verringerten Gefäßfläche von $90,23 \% \pm 10,72 \%$, einer verringerten Gesamtgefäßlänge von $89,99 \% \pm 11,01 \%$ und einer leicht gestiegenen Gesamtanzahl von Endpunkten von $108,08 \% \pm 24,12 \%$ führte (Abb. 4.1-12). Dieses Ergebnis korreliert mit der Analyse der Sphäroidmorphologie, bei der nicht-toxische Konzentrationen an Tacrolimus ebenfalls einen negativen Effekt auf den Zellverbund zeigten.

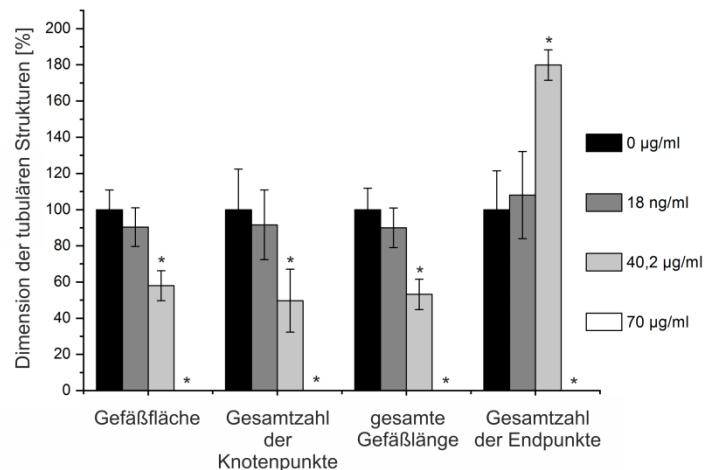


Abb. 4.1-12: Auswirkung von Tacrolimus (24 h Inkubation) auf die Formation von kapillarähnlichen Strukturen durch HUVECs im Angiogenese-Assay. Die Strukturen wurden mit der Angiotool[®] Software analysiert und dargestellt ist der Einfluss auf die Gefäßfläche, die Gesamtzahl der Knotenpunkte, die gesamte Gefäßlänge und die Gesamtzahl der Endpunkte. Die Daten wurden auf die Negativkontrolle (0 µg/ml Tacrolimus) normiert. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 2 in Doppelbestimmung. * = p < 0,05 definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle (100 %). Publiziert in [175].

Die Inkubation der Zellen mit der IC₅₀-Konzentration von Tacrolimus (40,23 µg/ml), ermittelt im 2D-Zellvitalitätstest-Assay (vgl. Kapitel 4.1.1), ergab eine signifikant verminderte Gefäßfläche von 57,96 % ± 8,32 %, eine ebenfalls signifikant verringerte Anzahl an Verbindungen von 49,72 % ± 17,38 %, eine signifikant verringerte Gesamtgefäßlänge von 53,16 % ± 8,45 % und eine deutlich erhöhte Gesamtzahl der Endpunkte von 179,90 % ± 8,44 %.

Siamakpour-Reihani *et al.* zeigten, dass Tacrolimus in einer Konzentration von 1 µM (0,82 µg/ml) die durch das sekretierte *frizzled-related* Protein 2 (SFRP2) und die VEGF-induzierte Bildung tubulärer Strukturen in einer 2H11-Maus-Endothelzellen-Kultur hemmte [125]. Der genaue Wirkungsmechanismus von SFRP2 in der Angiogenese ist jedoch immer noch umstritten. Siamakpour-Reihani *et al.*, vermuteten zudem, dass die stimulierende Wirkung von SFRP2 auf die Angiogenese durch die Wirkung von NFAT auf die Endothelzellen beeinflusst wird [125]. Eine Studie von Courtwright *et al.* zeigte, dass das Niveau von NFAT in der Kernfraktion von Endothelzellen, die mit SFRP2 behandelt wurden, erhöht ist. Zusammenfassend stützen diese Untersuchungen die Hypothese, dass die SFRP2-induzierte Angiogenese und die Formation der Kapillarstrukturen durch den Wnt/Calcium-Weg vermittelt wird, der als zelluläres Ziel von Tacrolimus gilt [191]. Dadurch wird die Aktivierung von NFAT verhindert und eine Störung des Endothelzellmetabolismus' ist die

Folge. Zudem wurde in weiteren Studien gezeigt, dass 6 h nach Tacrolimusaufnahme durch die Patienten ein AUC (Fläche unter der Kurve)-Spitzen-Level von 136,6 ng/ml - 246 ng/ml erreicht wurde [192], der bis zu 13 mal höher ist als die in dieser Arbeit untersuchte Talspiegel-Konzentration von 18 ng/ml, jedoch unterhalb einer Konzentration von 20 µg/ml liegt, welche in dieser Arbeit noch keine toxische Wirkung auf Endothelzellen zeigte. Daher ist anzunehmen, dass bereits geringe Tacrolimus-Spiegel zu Nebenwirkungen und Endotheldysfunktionen aufgrund des Verlustes der Zellintegrität, gefolgt von einer Zellablösung, führen können. Dies kann wiederum zu einem Verlust der Barrierefunktion des vormals intakten Endothels führen, selbst wenn keine signifikante toxische Wirkung dieser Konzentrationen im 3D-Sphäroid-Test nachgewiesen werden konnte. Damit könnten Immunozyten leichter vom Blut aus in das Organgewebe eindringen und Abstoßungen auslösen oder unterstützen.

4.1.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass Tacrolimus eine Dosis-Wirkungsabhängige Toxizität auf Endothelzellen zeigte und dass heterogene 3D-Kultursysteme aus HUVECs (Sphäroide), die die *in vivo* Bedingungen wesentlich besser widerspiegeln, im Vergleich zu homogenen 2D-Kulturen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Immunsuppressivum Tacrolimus aufwiesen. Dies zeigte sich in den ermittelten IC₅₀-Werten. In der 2D-Kultur wurde ein IC₅₀-Wert von 40,23 µg/ml ± 0.54 µg/ml für Tacrolimus detektiert und in der 3D-Sphäroidkultur ein IC₅₀-Wert von 27,19 µg/ml ± 0,09 µg. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass Tacrolimus, trotz unveränderter Zellvitalität, bereits negative Auswirkungen auf die Sphäroidstruktur und die Formation kapillar-ähnlicher Strukturen hatte, was die endotheliale Dysfunktion unter immunsuppressiver Therapie erklären kann. So führt eine Tacrolimuskonzentration von 18 ng/ml, die dem maximalen Talspiegel in der Anfangstherapie (1 - 3 Monate) nach einer Organtransplantation entspricht, bereits zu einer leicht dissoziierten Sphäroidstruktur und leicht verringerten Bildung von kapillarähnlichen Strukturen. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf die *in-vivo*-Situation mit Spitzenkonzentrationen von bis zu 246 ng/ml [192] in der begleitenden Tacrolimustherapie kann daher durch eine negative Beeinflussung des Metabolismus der Endothelzellen einen Verlust der Zellintegrität bewirken. Diese führt zu einem Verlust der Endothelfunktion als physiologische Barriere, fördert so Abstoßungen und bedingt auch die Beeinträchtigung der Regenerationsfähigkeit des transplantierten allogenen

Gewebes. Eine anhaltende endotheliale Dysfunktion und spätere Transplantatabstoßung können die Folge sein. Diese Ergebnisse verdeutlichen auch, dass beim Tissue Engineering, z. B. also für die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese für die Bypassoperationen autologe Zellen verwendet werden sollten, damit aufgrund des patienteneigenen Materials auf eine Immunsuppression verzichtet werden kann.

4.2 Expressionsverhalten von AD-hMSCs unter definierten Kultivierungsbedingungen

In dem vorangegangenen Kapitel wurde der Einfluss des Immunsuppressivums Tacrolimus auf Endothelzellen in einem 3D-Zellkultursystem beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass die Tacrolimus-Spitzenpiegel, die in der immunsuppressiven Therapie erreicht werden, negative Einflüsse auf die HUVECs in einem Sphäroidsystem und bei der Formation kapillar-ähnlicher Strukturen aufwiesen, obwohl die Zellvitalität nicht beeinträchtigt wurde. Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass endotheliale Dysfunktionen und ggf. somit indirekt auch das Eindringen von Immunozyten in das Organ durch Applikation hoher Tacrolimusdosen gefördert werden.

Durch die Verwendung körpereigener Zellen, für die Etablierung einer patienten-spezifischen bioartifiziellen Gefäßprothese, kann auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet werden, die bei allogenen Prothesen notwendig ist, um eine Abstoßung des körperfremden Materials zu verhindern. Gleichzeitig werden durch das Vorhandensein eines intakten Endothels innerhalb der bioartifiziellen Gefäßprothese die negativen thrombogenen Oberflächeneigenschaften künstlicher Polymer-basierter Prothesen ausgeschlossen. Da eine Isolation von autologen adulten vaskulären Endothelzellen in ausreichender Menge schwierig ist, musste zunächst eine mögliche autologe Zellquelle ermittelt werden, bevor geeignete Kultivierungsstrategien für eine bioartifizielle Gefäßprothese entwickelt werden konnten. Aufgrund des hohen Differenzierungspotentials und der leichten Isolation, wurden in diesem Kapitel adulte Stammzellen aus dem Fettgewebe zum einen hinsichtlich ihres Differenzierungspotential und der Ausbildung phänotypischer und funktioneller Merkmale von Endothelzellen und zum anderen auf die Proteinexpression endothelialer, angiogener und inflammatorischer Faktoren unter statisch-normoxischen (SN, 0 dyn/cm² und 21 % O₂), dynamisch-normoxischen (DN, ~7 - 14 dyn/cm bzw. ~8 - 16,5 dyn/cm² und 21 % O₂), statisch-hypoxischen (SH, 0 dyn/cm² und 2,5 % O₂) und dynamisch-hypoxischen Bedingungen (DH, ~7 - 14 dyn/cm² bzw. ~8 - 16,5 dyn/cm² und 2,5 % O₂) untersucht. Für die Generierung dynamischer Bedingungen wurden die Zellkulturplatten auf einem Orbitalschüttler mit einer Auslenkung von 10 mm und 300 rpm bzw. 20 mm und 175 rpm kultiviert. Diese Bedingungen entsprachen je nach Lokalisation der Zellen in den Vertiefungen der Zellkulturplatten einem Scherstress von ungefähr 8 - 16,5 dyn/cm² (10 mm Auslenkung und 300 rpm) bzw. 7 - 14,7 dyn/cm² (20 mm Auslenkung und 175 rpm),

der auf die Stammzellen aus dem Fettgewebe (AD-hMSCs) wirkte. Gleichzeitig wurde untersucht, welchen Einfluss diese Kultivierungsparameter auf die metabolische Aktivität der AD-hMSCs hatten. Um die parakrine Aktivität der AD-hMSCs bezogen auf die Sekretion angiogener Faktoren zu beurteilen, wurde die Konzentration dieser Proteine im Zellkulturmedium, das 14 Tage durch AD-hMSCs konditioniert wurde, mittels Protein-Multiplex-Assay analysiert. Zudem erfolgte eine Charakterisierung der Gentranskription der AD-hMSCs unter DN- und DH-Bedingungen nach 3, 7 und 14 Tagen Kultivierung unter den definierten Bedingungen. Diese Kapitel wurde teilweise publiziert in: *Thoms et al. (eingereicht), Dynamic-hypoxic conditioning of AD-hMSCs and co-culturing with HUVECs favors endothelial network formation*, Tissue Engineering Part A [164] und in: *Thoms et al. (2016), Analyse des Mikromilieus künstlicher Gewebe mit Protein-Multiplex-Assay*. Biospektrum, 22 (5), 471-474.

4.2.1 Metabolische Aktivität von hMSCs unter statischen, dynamischen, normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Im Bereich des Tissue Engineering und der regenerativen Medizin sind mesenchymale Stammzellen aufgrund ihres Differenzierungspotentials in eine Vielzahl von Zellarten eine attraktive Zellquelle [193]. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung wird in Stammzellen durch spezifische Mikroumgebungssignale reguliert [193]. Diese Eigenschaft kommt vor allem bei Reparatur- und Wundheilungsprozessen von krankem Gewebe im Organismus zum Tragen. In diesen Arealen ist die Blutzufuhr jedoch häufig gestört, was zu einem Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff führt [194]. Damit die Zellen unter diesen Bedingungen überleben und die Wundheilungsprozesse unterstützen können, müssen die hMSCs sich differenzieren oder ihren Stoffwechsel anpassen, wodurch spezifische Wachstumsfaktoren oder Zytokine in die Umgebung ausgeschüttet werden [194]. Um die *in-vivo*-Bedingungen *in-vitro* nachzuahmen, wird in einigen Studien ein Serumdeprivation induziert [195, 196]. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass eine Serumdeprivation eine Veränderung im hMSC-Phänotyp bewirkt und in Kombination mit hypoxischen Bedingungen über einen längeren Zeitraum zum Absterben der Stammzellen führte [195]. Die Deprivation an Serum spiegelt jedoch keinen direkten Nährstoffmangel wieder. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die AD-hMSCs in 6-Loch-Platten ausgesiedelt und nach 2 Tagen Kultivierung bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂, welche dem Adhären und Konfluentwachsen der Zellen dienten (K, T0), für 14 Tage unter SN, SH, DN und DH

Bedingungen ohne Mediumwechsel kultiviert. Nach 3, 7 und 14 Tagen erfolgte eine Analyse der Glukose- und Laktatkonzentrationen im konditionierten Medium. Neben dem Einfluss der statischen und dynamischen Kultivierung wurde auch der Einfluss von hypoxischen und normoxischen Kultivierungsbedingungen auf die metabolische Aktivität der AD-hMSCs untersucht.

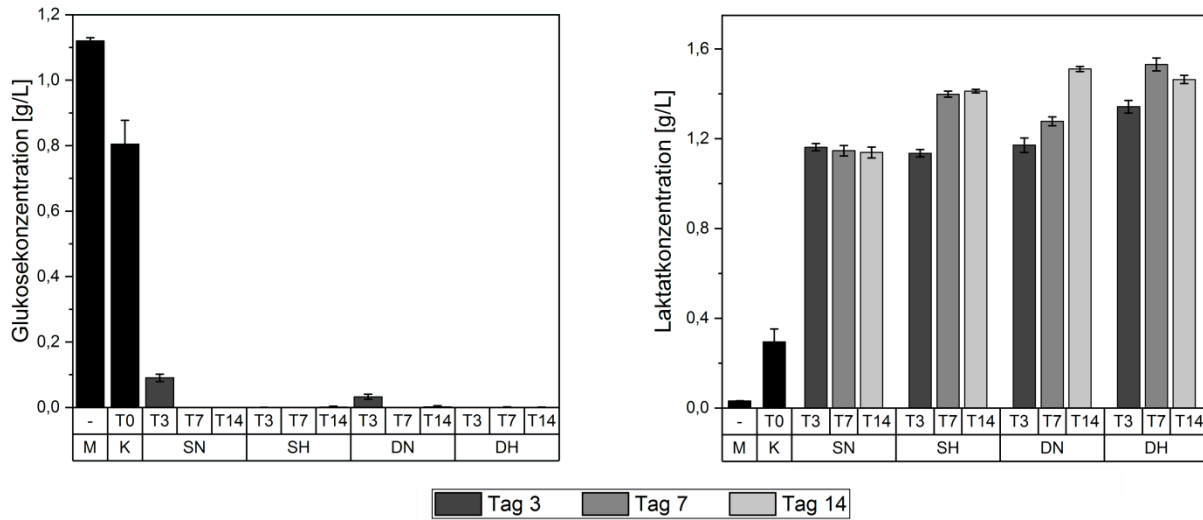


Abb. 4.2-1: Glukose-(a) und Laktatkonzentration (b) [g/L] im Kulturmedium von AD-hMSCs nach 3, 7 und 14 Tagen Kultivierung unter statisch-normoxischen (SN), statisch-hypoxischen (SH), dynamisch-normoxischen (DN) und dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen. 21 % O₂-Gehalt definiert normoxische Bedingungen und 2,5 % O₂-Gehalt hypoxische Bedingungen. Unter dynamischen Bedingungen wirken Scherspannungen von ungefähr ~ 7 - 14,7 dyn/cm² auf die AD-hMSCs. Das Medium wurde nach dem Aussiedeln der Zellen nicht gewechselt. M = Kulturmedium (α -MEM + 10 % Humanserum und 0,5 % Gentamycin), K (T0) = Medium drei Tage nach Aussiedeln der Zellen und Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂. Dieser Zeitpunkt markiert den Beginn der definierten Kulturbedingungen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 1 in Dreifachbestimmung.

Im α -MEM Kulturmedium mit 10 % Humanserum (HS) und 0,5 % Gentamycin konnte eine Glukosekonzentration von $1,12 \text{ g/L} \pm 0,09 \text{ g/L}$ und eine Laktatkonzentration von $0,03 \text{ g/L} \pm 0,00 \text{ g/L}$ detektiert werden. Diese Werte entsprechen in etwa den Herstellerangaben von 1 g/L Glukose und 0 g/L Laktat. Nach zwei Tagen, die dem Konfluentwachsen der Zellen dienen (Abb. 4.2-1, definiert als T0 bzw. K und kennzeichnet den Beginn der SN, SH, DN und DH Kultivierung), wurde von den Zellen bereits 0,32 g/L Glukose verbraucht und 0,26 g/L Laktat produziert. Unter SN, SH, DN und DH Kultivierungsbedingungen wurde eine schnelle Aufnahme an Glukose und Produktion von Laktat durch die AD-hMSCs detektiert. Nach 3 Tagen Inkubation der Zellen unter den zuvor definierten Kultivierungsbedingungen wird deutlich, dass der Glukoseverbrauch der AD-hMSCs unter normoxischen gegenüber hypoxischen Bedingungen langsamer erfolgt. Zudem zeigt ein Vergleich der Laktatkonzentrationen nach 7 und 14 Tagen einer statischen Kultivierung eine erhöhte Produktion unter hypoxischen Bedingungen. Ejtehadifar *et al.*

bestätigten die unter SH-Bedingungen erhöhte Laktatproduktion und den erhöhten Glukoseverbrauch gegenüber der SN-Kultivierung [173]. Diese Tendenz war in der vorliegenden Arbeit auch in der dynamischen Kultivierung zu beobachten. Unter hypoxischen Bedingungen war die Glukose im Medium nach 3 Tagen vollständig verbraucht. Sind Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, induziert dies eine Änderung im Metabolismus, der Enzymkinetik sowie Signalwegen in der Zelle [173]. Die hier nachgewiesene hohe metabolische Aktivität der AD-hMSCs war in Übereinstimmung mit anderen Studien, die unter Glukosedepriuation oder hypoxischen Kultivierungsbedingungen eine Umstellung des Zellstoffwechsels von der oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Glykolyse verzeichneten [194, 197]. Nuschke *et al.* fanden zudem heraus, dass hMSCs neben der Umstellung des Energiestoffwechsels die eingeschränkte Nährstoffzufuhr durch eine Hochregulation autophagischer Prozesse überleben, wodurch auch die Differenzierungseffizienz der AD-hMSCs erhöht wird [194].

4.2.2 Endotheliales Differenzierungspotential von Stammzellen aus dem Fettgewebe

Mesenchymale Stammzellen sind aufgrund ihres Differenzierungspotentials, ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und der Migrationsfähigkeit eine geeignete Zellquelle im Bereich des Tissue Engineering [198]. hMSCs sind multipotent, d.h. die Zellen können sich in spezialisierte Zelltypen differenzieren [198, 199]. Um die spezifischen Minimalkriterien für eine einheitliche Charakterisierung der hMSCs zu gewährleisten, müssen diese neben einer Plastikadhärenz und der Expression spezifischer Oberflächenmarker (CD73, CD90, CD105) ein Differenzierungspotential in Knochenzellen (Osteoblasten), Fettzellen (Adipozyten) und Knorpelzellen (Chondrozyten), also Zellen des Stütz- und Bindegewebes, aufweisen [200]. Viele Studien beschäftigen sich daher weitergehend mit einer stabilen Differenzierung von hMSCs in weitere Zelltypen wie Nervenzellen, Leberzellen oder auch Endothelzellen [201-203]. Ein weiterer Vorteil der hMSCs im Bereich des Tissue Engineering ist, dass diese Zellen immunmodulatorische Fähigkeiten und einen antiinflammatorischen Effekt besitzen [204-206], was die Gefahr einer Transplantatabstoßung bei Verwendung allogener Zellen stark verringert. Wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, scheint die Art der *in vitro* Kultivierungsparameter einen entscheidenden Einfluss auf den Metabolismus der AD-hMSCs auszuüben. Dabei ist davon auszugehen, dass nicht nur der Metabolismus der Zellen sondern auch das Differenzierungspotential und die Proteinexpression beeinflusst werden. Ein erster Versuchsdurchlauf hatte eine Differenzierung der Stammzellen in die endotheliale Richtung

zum Ziel, sodass sie sich als Zellen für die Auskleidung einer bioartifiziellen Gefäßprothese eignen würden. Es wurde analysiert, welchen Einfluss die Sauerstoff-konzentration sowie die mechanische Stimulation der AD-hMSCs in Kombination mit einem Aushungern der Zellen durch Glukosedepprivation während der *in vitro* Kultivierung auf die Expression spezifischer endothelialer, angiogener aber auch inflammatorischer Proteine hat. Dafür wurden die AD-hMSCs von zwei weiblichen Spendern (Spender 1 = 33 Jahre und Spender 2 = 44 Jahre) unterschiedlichen Alters in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesiedelt und nach 2 Tagen, die dem Adhären und Konfluentwachsen der Zellen dienen, für 7 Tage bzw. 14 Tage unter 21 % O₂ (normoxisch) oder 2,5 % O₂ (hypoxisch) und 0 dyn/cm² (statisch) sowie ungefähr 8 - 16,5 dyn/cm², je nach Lokalisation der Zellen in der Zellkulturplatte, kultiviert. In dem Kultivierungszeitraum erfolgte kein Mediumwechsel. Nach Ablauf der jeweiligen Kultivierungsdauer wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate mittels Protein-Multiplex-Assay (*BioPlex Multiplex Immunoassay*, MagPix, Biorad) untersucht. Der Protein-Multiplex-Assay basiert auf der Methode eines klassischen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), einem antikörperbasierten Nachweisverfahren zur Proteindetektion. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem klassischen ELISA ist, dass eine simultane und dadurch schnelle Analyse mehrerer Proteine in einem Probenvolumen möglich ist. Die Zelllysate wurden zunächst hinsichtlich der spezifischen Proteinkonzentrationen des Endothelzell-spezifischen Biomarkers PECAM-1 sowie des interzellulären Zelladhäsions-moleküls-1 (ICAM-1) und des vaskulären Zell-adhäsionsmoleküls-1 (VCAM-1), zwei Adhäsionsmoleküle die hauptsächlich auf Endothel-zellen zu finden sind, untersucht. Für die Auswertung wurden die Proteinkonzentrationen der spezifischen Faktoren auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1000 µg/ml in den Zelllysaten normiert.

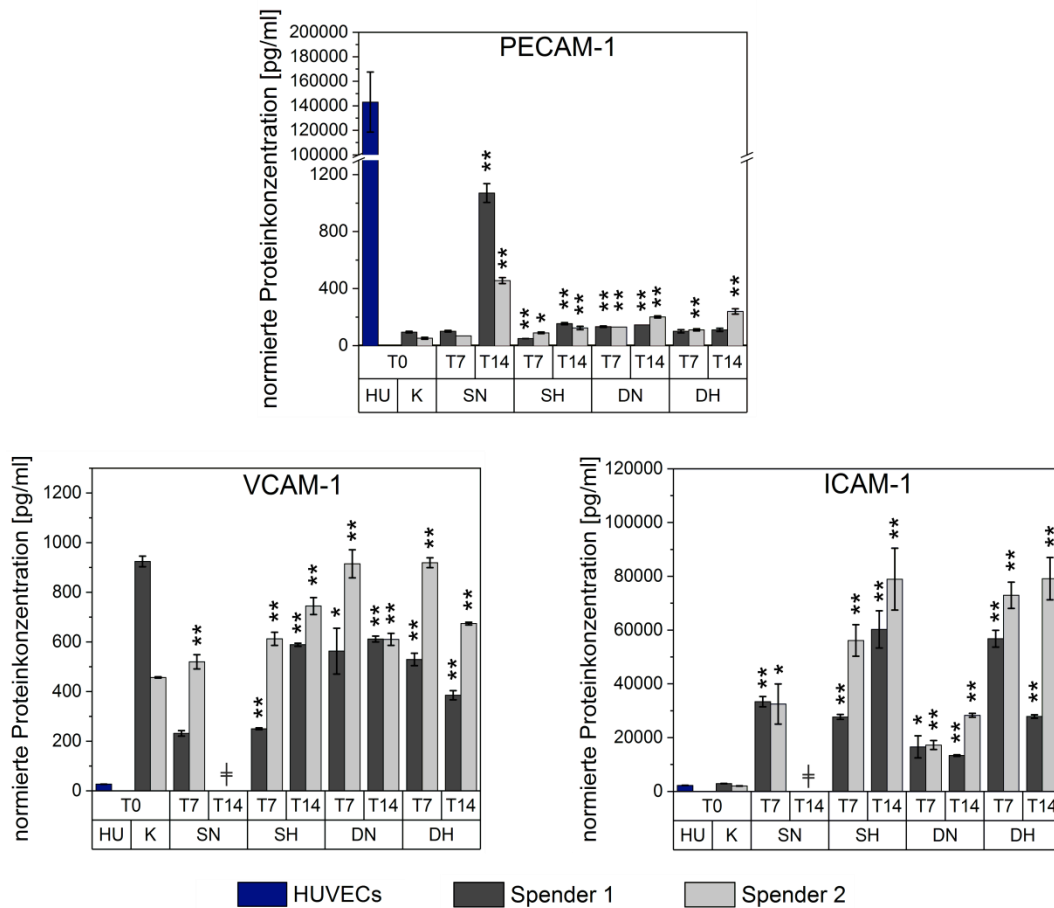


Abb. 4.2-2: Auf 1000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration normierte Proteinkonzentrationen der endothelialen Marker PECAM-1, VCAM-1 und ICAM-1 in Zelllysaten von AD-hMSCs zweier Spender (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre) nach 7- und 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~ 7 - 14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen. K (T0) = Negativkontrolle, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierungen der AD-hMSCs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 (AD-hMSCs aus mehreren Vertiefungen wurden jeweils gepoolt und die isolierten Zelllysate in Dreifachbestimmung im Protein-Multiplex-Assay vermessen). * = p < 0,01 und ** = p < 0,001 definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle. ‡ Proben nicht vorhanden. Modifiziert publiziert in [207].

Die Analysen der spezifischen Proteinlevel in den Zelllysaten zeigten für den Endothelzellmarker PECAM-1 (CD31) nach 14 Tagen eine signifikante Hochregulation der Proteinkonzentration gegenüber den Kontrollzellen (T0 = 3 Tage nach Zellaussiedlung und vor Beginn der definierten Kultivierungen) unter allen Kultivierungsbedingungen, außer für den Spender 1 unter DH Bedingungen. Die höchste Proteinkonzentration im Vergleich zur Negativkontrolle (S1 = 975,37 pg/ml; S2 = 404,95 pg/ml) wurde bei beiden Spendern nach 14 Tagen unter SN Kultivierung in den Zelllysaten der AD-hMSC detektiert. Die Nachweise von VCAM-1 in den Zelllysaten zeigten nur für den Spender 2 eine signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration gegenüber der entsprechenden Kontrolle (63,38 pg/ml - 462,51 pg/ml). Dabei zeigte sich, dass an Tag 7 der Kultivierung eine höhere Konzentration unter SN, DN und DH Bedingungen zu verzeichnen war als nach 14 Tagen Kultivierung. In den AD-hMSCs

des Spenders 1 wurde unter allen Bedingungen keine Hochregulation von VCAM-1 gegenüber der Negativkontrolle detektiert. Im Gegensatz dazu wurde die Proteinkonzentration von ICAM-1 in den AD-hMSCs beider Spender signifikant hochreguliert. Die stärkste Zunahme der ICAM-1-Konzentration in den Zelllysaten wurde unter 14-tägiger SH und DH Kultivierung (SH = 76,92 ng/ml; DH = 77,09 ng/ml) der AD-hMSCs des Spenders 2 detektiert. Während die Proteinkonzentration von VCAM-1 und ICAM-1 in den konditionierten AD-hMSCs unter allen Bedingungen höher war, zeigte sich für PECAM-1 eine 133-fach erhöhte Proteinkonzentration in den HUVECs gegenüber den durch SN Kultivierung konditionierten AD-hMSC des Spenders 1.

Zudem bildeten die AD-hMSCs von Spender 2 nach 14 Tagen dynamischer Kultivierung (DN und DH) kapillarähnliche Strukturen in den Zellkulturplatten. Mittels Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 4.2-3 a und b) der fixierten Strukturen gegen die Antigene CD31 (PECAM-1) und VE-Cadherin wurde gezeigt, dass die AD-hMSCs den endothelspezifischen Marker CD31 (a) exprimieren. Die Expression von VE-Cadherinen, welche die Zell-Zell-Adhäsion von Endothelzellen vermitteln, konnte jedoch nicht in den AD-hMSCs nachgewiesen werden (b).

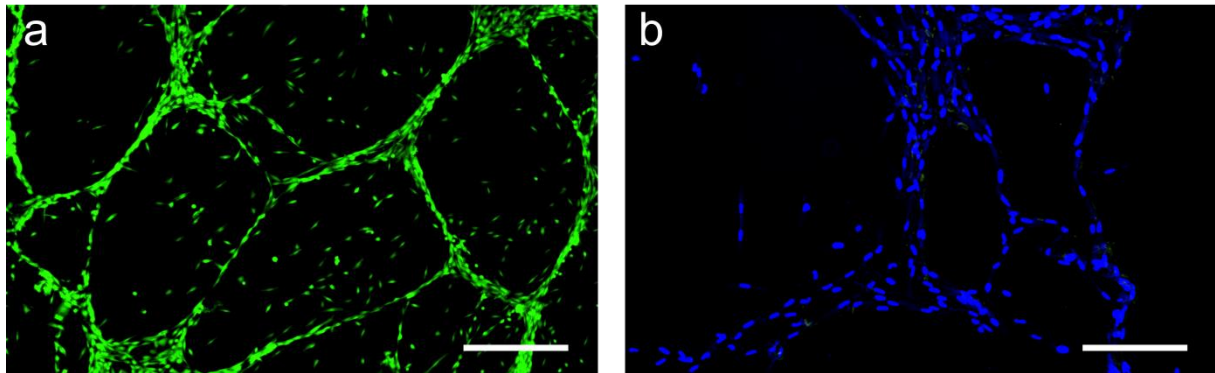


Abb. 4.2-3: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen nach CD31- (a) und VE-Cadherin- (b) Immunfluoreszenzfärbung (grün) von fixierten AD-hMSCs nach 14 Tagen Kultivierung unter dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst-Färbung sichtbar gemacht (b, blau). Der Maßstab zeigt 500 μ m.

Zusätzlich wurden die AD-hMSCs sowie HUVECs, als Positivkontrolle, gegen das Endothelzell-spezifische Antigen von Willebrand Faktor (vWF) fluoreszenzgefärbt (Abb. 4.2-4).

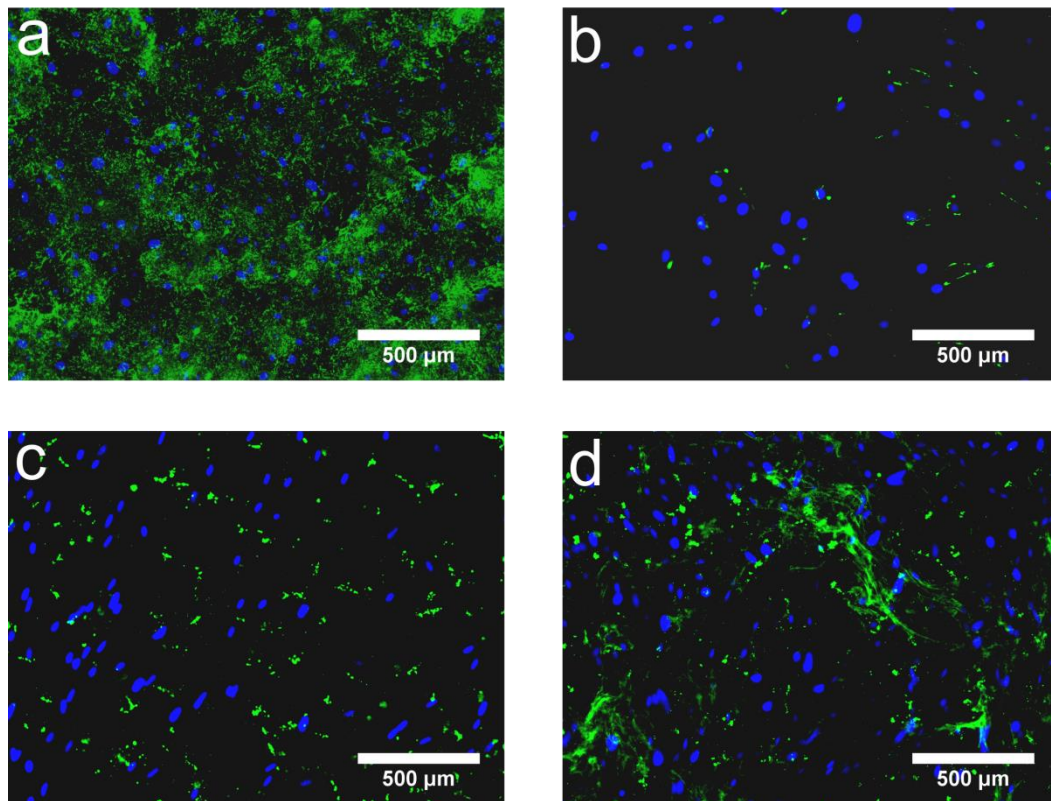


Abb. 4.2-4: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen nach vWF Immunfluoreszenzfärbung (grün) von fixierten HUVECs (a) und AD-hMSCs (b) 3 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen und Inkubation unter 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ sowie AD-hMSCs nach 14-tägiger Kultivierung unter statisch-normoxischen (c) und dynamisch-normoxischen (d) Bedingungen. Die Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht (blau).

Wie in Abb. 4.2-4 zu erkennen ist, zeigten die HUVECs (a) eine starke Expression von vWF, wohingegen die AD-hMSC vor Beginn einer definierten Kultivierung nahezu keine Expression des Antigens aufwiesen (b). Nach 14 Tagen zeigte sich unter DN Bedingungen (d) eine verstärkte Expression von vWF in den AD-hMSCs, während unter SN Bedingungen (c) nur eine geringe Zunahme des vWF gegenüber der Negativkontrolle detektiert werden konnte (b). Die Fluoreszenzaufnahmen nach der vWF-Färbung bestätigen die Ergebnisse aus der Proteinanalyse, dass die AD-hMSCs durch die DN Kultivierung Merkmale reifer Endothelzellen, einschließlich der Expression von PECAM-1, VCAM-1 und vWF erworben haben.

Oswald *et al.* zeigten, dass eine Kultivierung von hMSCs aus dem Knochenmark (BM-hMSCs) über 7 Tage unter Zugabe von 50 ng/ml VEGF-A zu einer Differenzierung der adulten BM-hMSCs mit phänotypischen und funktionellen Merkmalen von Endothelzellen führte, wie die Hochregulation der endothelspezifischen Oberflächenmarker VEGFR-1, VEGFR-2, VE-Cadherin und VCAM-1 sowie vWF [203]. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Jazayeri *et al.*, die BM-hMSCs mit einem Medium supplementiert mit 5 % FKS, IGF und

VEGF kultivierten und CD31 (PECAM-1), vWF, VCAM-1 und VE-Cadherin an der Zelloberfläche detektierten [208]. Auch Fischer *et al.* und Portalksa *et al.* beobachteten, dass AD-hMSCs infolge einer Kultivierung in spezifischem Endothelzellmedium und mit definierten Scherkräften endothelzellähnliche Eigenschaften entwickeln und funktionelle sowie phänotypische Merkmale von Endothelzellen aufweisen [209, 210]. Während Oswald *et al.* und Jazayeri *et al.* die direkte Stimulation der hMSCs durch den Zusatz von VEGF-A nutzten, zeigte die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Versuchsdurchführung unter Anwendung definierter Kultivierungsbedingungen eine natürlich hochregulierte Expression von VEGF-A in den AD-hMSCs (Abb. 4.2-5). Bei Betrachtung der Expressionsprofile von VEGF-A (Abb. 4.2-5) und PECAM-1 (Abb. 4.2-2) ist zudem eine deutliche Korrelation in der Hochregulation beider Faktoren unter den verschiedenen Bedingungen zu erkennen. Auch wenn die Proteinkonzentration des endothelialen Biomarkers PECAM-1 in den AD-hMSCs nach 14-tägiger SN Kultivierung stark hochreguliert war, war die Expression von PECAM-1 in den SN konditionierten AD-hMSCs ($\text{PECAM-1}_{\text{max}} = 1,07 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu den HUVECs ($143,07 \pm 24,5 \mu\text{g/ml}$) so gering (Abb. 4.2-2), dass eine ausreichende und stabile Differenzierung der AD-hMSCs in Endothelzellen nicht bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu waren VCAM-1 und ICAM-1 (Abb. 4.2-2) in den AD-hMSCs ($\text{ICAM-1} = 79,11 \pm 7,86 \mu\text{g/ml}$, $\text{VCAM-1} = 924,27 \pm 21,19 \text{pg/ml}$) deutlich stärker reguliert als in den HUVECs ($\text{ICAM-1} = 2,25 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$, $\text{VCAM-1} = 26,6 \pm 0,69 \text{pg/ml}$), wobei diese Faktoren keine eindeutigen endothelialen Marker sind und auch in anderen Zellen exprimiert werden. Phasenkontrastaufnahmen zeigten zudem, dass die Zellen nach der Kultivierung nicht die typische Morphologie von Endothelzellen angenommen haben. In Übereinstimmung mit Oswald *et al.* und Jazayeri *et al.* wurde in der vorliegenden Arbeit eine verstärkte Expression spezifischer endothelialer Biomarker in den AD-hMSCs nach definierter Kultivierung der Zellen nachgewiesen. Ein Vergleich der Expression Endothelzell-spezifischer Marker und phänotypischer Merkmale in den konditionierten AD-hMSCs und HUVECs zeigte jedoch, dass eine erfolgreiche und stabile Differenzierung der AD-hMSCs in Endothelzellen nicht erfolgte.

Gleichzeitig wurde jedoch auch der Einfluss der unterschiedlichen Kultivierungsparameter auf die Proteinexpression spezifischer angiogener Marker (VEGF-A, sVEGFR-1 und sTie-2) in den AD-hMSCs durch Analyse der Zelllysate untersucht. Proangiogene Marker werden während der Vaskularisierung von Geweben exprimiert und unterstützen im adulten Organismus den Prozess der Angiogenese, um eine Nähr- und Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

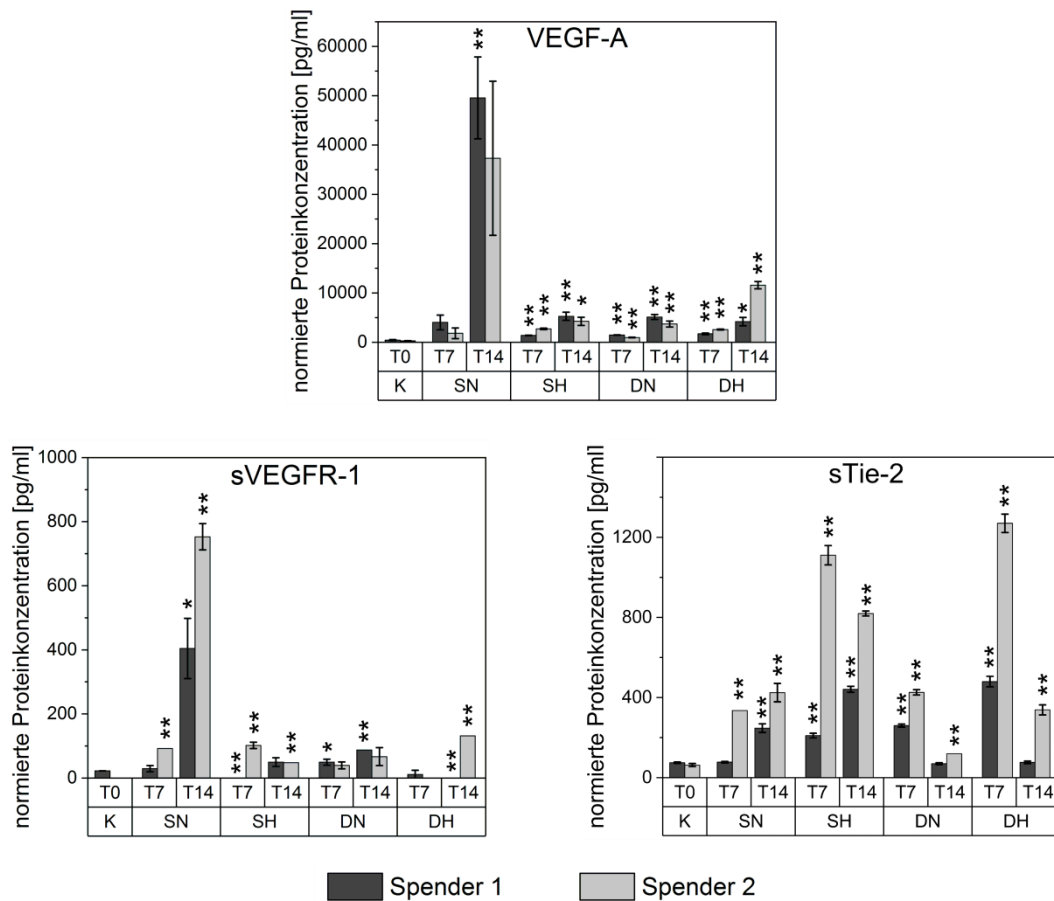


Abb. 4.2-5: Auf 1000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration normierte Proteinkonzentrationen der angiogenen Marker VEGF-A, sVEGFR-1 und sTie-2 in Zelllysaten von AD-hMSCs zweier Spender (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre) nach 7- und 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~ 7 - 14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen. K (T0) = Negativkontrolle, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierungen der AD-hMSCs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 (AD-hMSCs aus mehreren Vertiefungen wurden jeweils gepoolt und die isolierten Zelllysate in Dreifachbestimmung im Protein-Multiplex-Assay vermessen). * = p < 0,01 und ** = p < 0,001 definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle. Modifiziert publiziert in [207].

Der wichtigste angiogene Wachstumsfaktor VEGF-A wurde am stärksten nach 14 Tagen unter SN Kultivierung in den AD-hMSCs beider Spender (S1 = 49,10 ng/ml, S2 = 37,01 ng/ml) und unter DH Kultivierung in den AD-hMSCs von Spender 2 (S2 = 11,26 ng/ml) exprimiert. Während der endothelzellspezifische Rezeptor sVEGFR-2 nicht in den Zelllysaten detektiert wurde (Daten nicht gezeigt), zeigte der Rezeptor sVEGFR-1 die deutlichste Hochregulation unter 14-tägiger SN Kultivierung der AD-hMSCs beider Spender (S1 = 381,80 pg/ml; S2 = 752,93 pg/ml). Ang2, ein wichtiger proangiogener Faktor während der Umstrukturierung von Gefäßen, wurde ebenfalls nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt). Der dazugehörige Rezeptor sTie-2 zeigte die stärkste Proteinexpression nach 7 Tagen unter SH und DH Kultivierung der AD-hMSCs beider Spender (S1 = 381,80 pg/ml, S2 = 752 pg/ml) gegenüber der Negativkontrolle. Die Daten zeigen, dass die Auswahl der

optimalen Kultivierungsbedingung einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinexpression angiogener Faktoren hat. Dabei bedingte die SN Kultivierung unter 21 % Sauerstoff die stärkste Expression von VEGF-A und VEGFR-1, obwohl beide Faktoren zu den Hypoxie-induzierten Faktoren gehören.

Zudem wurde auch die Expression der Zytokine MCP-1, IL-6, IL-8 und IL-10 untersucht, um parallel die Regulation entzündlicher Prozesse in den AD-hMSCs, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, zu analysieren. Eine starke Hochregulation entzündlicher Faktoren könnte in der Entwicklung der bioartifiziellen Gefäßprothese einen negativen Einfluss auf die Barrierefunktion des Endothels ausüben.

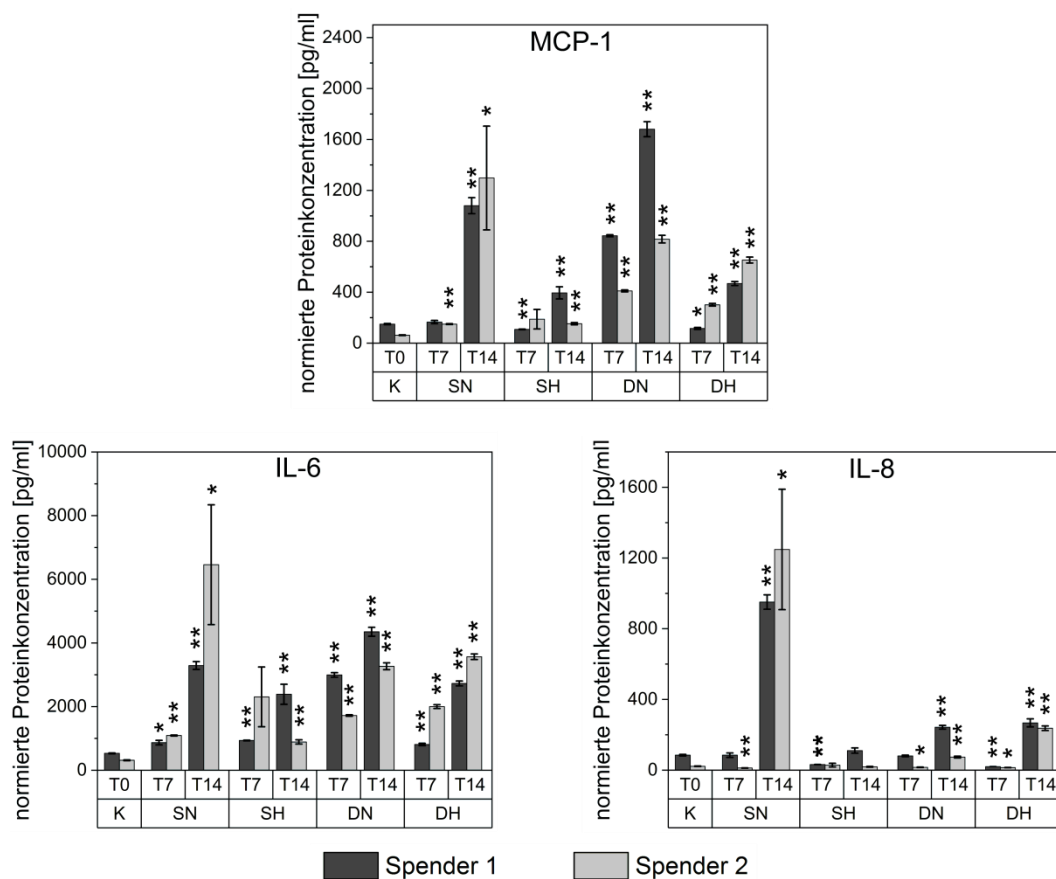


Abb. 4.2-6: Auf 1000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration normierte Proteinkonzentrationen der angiogenen bzw. inflammatorischen Marker MCP-1, IL-6 und IL-8 in Zelllysaten von AD-hMSCs zweier Spender (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre) nach 7- und 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~7 - 14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen. K (T0) = Negativkontrolle, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierungen der AD-hMSCs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 (AD-hMSCs aus mehreren Vertiefungen wurden jeweils gepoolt und die isolierten Zelllysate in Dreifachbestimmung im Protein-Multiplex-Assay vermessen). * = p<0,01 und ** = p<0,001 definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle. Modifiziert publiziert in [207].

Unter den definierten Kultivierungsparametern zeigt MCP-1 eine stark signifikante Hochregulation unter DN (Tag 7 und Tag 14) und SN (Tag 14) Bedingungen, während die

Proteinkonzentration von IL-6 an Tag 14 unter DN und DH Bedingungen für Spender 2 und unter DN-Bedingungen für Spender 1 am höchsten war. IL-10 konnte nicht in den Zelllysaten der AD-hMSCs nachgewiesen werden, jedoch wurde für IL-8 eine erhöhte Proteinkonzentration an Tag 14 unter SN Kultivierung nachgewiesen. Unter Berücksichtigung von starken spenderspezifischen Differenzen ist die Proteinexpression der inflammatorischen Marker innerhalb der einzelnen, definierten Kultivierungsbedingungen (SN, SH, DN, DH) nach 14 Tagen stärker reguliert. Bei gemeinsamer Betrachtung der vier getesteten inflammatorischen Marker führte die SH Kultivierung der AD-hMSCs zu der geringsten Expression dieser. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die hypoxische Kultivierung von hMSCs ein wichtiger Faktor für die optimale Funktion der Zellen *in vitro* ist.

Basierend auf den Ergebnissen aus diesem Versuch ergab sich, dass eine Modifikation des Phänotyps der AD-hMSCs nicht ausreichend war, um eine endotheliale Differenzierung durch die gewählten Kultivierungsparameter zu demonstrieren. Da die spezifische Endothelfunktion und damit einhergehend die Regulation physiologischer Prozesse nicht gewährleistet ist, sind die unter diesen Bedingungen konditionierten AD-hMSCs nicht für die Auskleidung einer bioartificialen Gefäßprothese als Einzelschicht geeignet.

4.2.3 Nachweis von angiogenen und inflammatorischen Biomarkern auf Proteinebene

In den letzten Jahren wurde beobachtet, dass das therapeutische Potential von hMSCs weniger auf ihre multipotenten Eigenschaften und ihr Differenzierungspotential zurückzuführen ist, sondern verstärkt ihrem Sekretom zugeschrieben werden kann [211]. Es wurde gezeigt, dass zelluläre Prozesse, wie die Zellproliferation, Differenzierung, Angiogenese oder Stimulation benachbarter Zellen, durch das Sekretom der hMSCs gesteuert werden können [212]. Diese Fähigkeit beruht auf den parakrinen Eigenschaften der hMSCs. Die hMSCs bilden systemisch durch Sekretion von bioaktiven Molekülen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen ein Mikromilieu und können so einen lokalen Einfluss auf die Umgebung mit Reaktion auf die intrazelluläre Kommunikation ausüben. Neuere Studien belegen, dass die parakrine Wirkung von MSCs einen positiven Effekt auf Blutgefäßbildung und Wundreparatur *in vivo* hat [213, 214]. Da hMSCs selbst auch aktiv auf ihre Mikroumgebung reagieren, gibt es die Hypothese, dass das Sekretom bzw. die parakrine Wirkung der hMSCs durch Modulation spezifischer Umgebungsparameter beeinflusst werden kann [212]. Ranganath *et al.* konnten bereits belegen, dass das hMSC-Sekretom *in vitro* von der Vorkonditionierung der Zellen durch

definierte Mikroumfangsfaktoren wie Hypoxie oder dem Zusatz verschiedener Wachstumsfaktoren abhängt [213, 214].

Ein weiterer Ansatz für die Nutzung von AD-hMSCs für die Entwicklung einer bioartifizialen Gefäßprothese ist daher die Stimulation von Endothelzellen durch proangiogene Faktoren, welche von AD-hMSCs aufgrund ihrer parakrinen Eigenschaften sezerniert werden. Eine erfolgreiche Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen von Endothelzellen durch Kokultivierung mit hMSCs konnte bereits durch Baldwin *et al.* nachgewiesen werden [147]. Für die optimale Vaskularisierung der äußeren Zellschichten einer bioartifizialen Gefäßprothese und die Entwicklung von *Vasa vasorum*, welche die Integration durch optimale Nähr- und Sauerstoffversorgung der Zellen und damit die optimale Langzeitfunktionalität der Gefäßprothese im Organismus unterstützen, ist die *in vitro* Etablierung von Kapillarstrukturen essentiell. Daher wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Fokus auf die Analyse der Expression und Sekretion von angiogenen Faktoren durch AD-hMSCs gelegt. Um Rückschlüsse auf die parakrinen Eigenschaften zu ziehen, wurde unter den gleichen Kulturbedingungen, wie in Kapitel 4.2.2, neben den Zelllysaten, welche ausschließlich eine Aussage über die Proteinexpression spezifischer Faktoren in den AD-hMSC erlauben, auch der Medienüberstand der Zellen analysiert. In diesem Versuchsansatz wurden die Proteinkonzentrationen ausschließlich nach 14 Tagen Kultivierung unter SN, SH, DN und DH Bedingungen analysiert. Zudem wurde die dynamische Kultivierung auf einem Orbitalschüttler mit 20 mm Auslenkung und 175 rpm durchgeführt, was einem Scherstress von ungefähr 7 bis 14,7 dyn/cm² je nach Lokalisation der Zellen in der Zellkulturplatte entsprach. Für die Charakterisierung wurden AD-hMSCs von drei weiblichen Spendern verwendet (Spender 1 = 33 Jahre, S1; Spender 2 = 44 Jahre, S2; Spender 3 = 47 Jahre, S3). Als Kontrolle wurden AD-hMSCs 2 Tage nach Aussiedlung und Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ verwendet (K, T0), bevor die spezifischen Kultivierungen gestartet wurden. Die Zellen wurden in α -MEM mit 10 % Humanserum kultiviert und während den 14 Tagen der Konditionierung erfolgte kein Wechsel des Mediums.

Die AD-hMSC zeigten nach 14-tägiger Kultivierung unter SN, SH, DN und DH Bedingungen deutliche Unterschiede in der Morphologie bzw. Ausbildung von Zellzusammenschlüssen. Unter SN und SH Bedingungen haben sich die AD-hMSCs aller drei Spender in den meisten Vertiefungen von der Zellkulturoberfläche abgelöst und Zellpellets gebildet. Eine Lebend-Tot-Färbung der Zellpellets mittels Calcein-AM und Propidiumiodid zeigte, dass der Großteil der Zellen in diesen Strukturen lebensfähig war (Abb. 4.2-7).

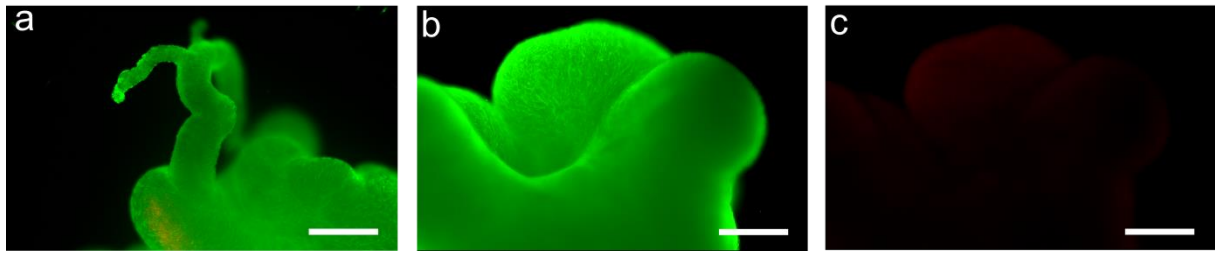


Abb. 4.2-7: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen nach Lebend-(grün)/Tot-(rot) Färbung (Calcein-AM-/Propidiumiodid-Färbung) von während der 14-tägigen Kultivierung abgelösten AD-hMSC-Zellpellets. Die Kombination beider Färbungen ist in a dargestellt, b zeigt separat die Lebendfärbung der Zellen und c die Tot-Färbung der AD-hMSCs. Der Maßstab zeigt 500 μm .

Hat keine Ablösung der Zellen stattgefunden, zeigten diese keine definierte Ausrichtung in der Zellkulturplatte (Abb. 4.2-8 b und c), während die AD-hMSCs in der DN und DH Kultivierung hauptsächlich entlang der Scherbewegung ausgerichtet waren (Abb. 4.2-8 d-e) oder kapillarähnliche Strukturen gebildet haben (Abb. 4.2-8 f-g).

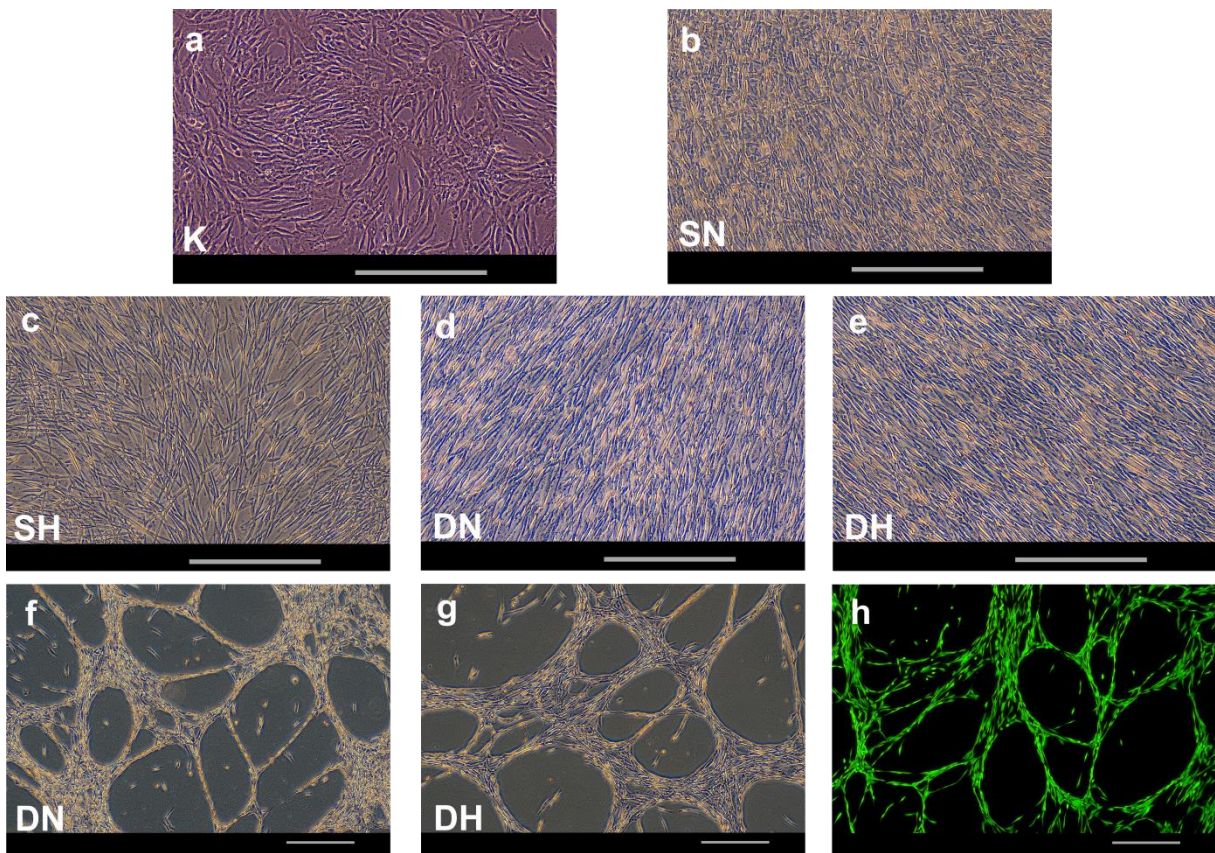


Abb. 4.2-8: Zellmorphologie von AD-hMSCs nach 14 Tagen Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm^2), dynamischen (D, 7-14,7 dyn/cm^2), normoxischen (N, 21 % O_2) und hypoxischen (H, 2,5 % O_2) Bedingungen. Dargestellt sind die AD-hMSCs 2 Tage nach dem Aussiedeln (a) (K, T0), sowie nach 14 Tagen unter SN (b), SH (c), DN (d, f) und DH (e, g) Kultivierung. Die AD-hMSCs in den Netzwerkstrukturen wurden zudem mittels Calcein-AM fluoreszenzgefärbt (grün). Der Maßstab zeigt 500 μm .

Mittels Lebend-/Tot-Färbung wurde die Viabilität der Zellen in den Netzstrukturen bestätigt (Abb. 4.2-8 h). Diese Zellformation war jedoch nur bei AD-hMSCs von Spender 2 und 3 zu beobachten. Auch unter den DN und DH Bedingungen haben sich zudem vereinzelt Zellpellets gebildet.

Neben den Zell-Zell-Bindungen sind auch Zell-EZM-Interaktionen essentiell für die Bildung eines Zellverbandes und für die Stabilisierung der kapillarähnlichen Netzwerke. Daher wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen (I, II, III, IV und V) auf den fixierten AD-hMSCs nach 14 Tagen einer DN und DH Kultivierung durchgeführt.

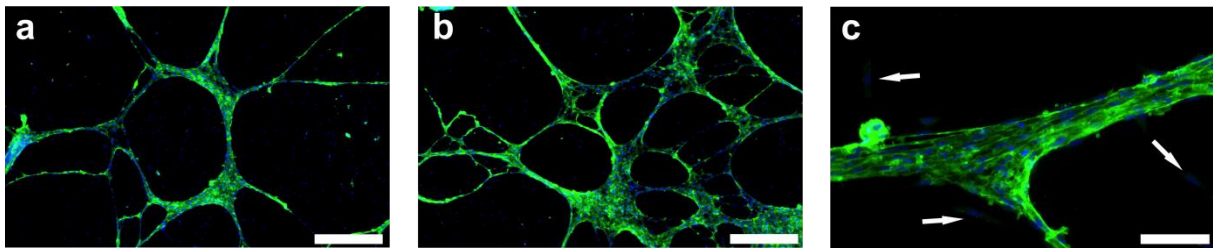


Abb. 4.2-9: Fluoreszenzaufnahmen nach Kollagen I, II, III, IV, V- Immunfluoreszenzfärbung (grün) von AD-hMSCs nach 14 Tagen Kultivierung unter (a) dynamisch-normoxischen (DN) und (b, c) dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen. Die Zellkerne wurden mittels Hoechstfärbung (blau) sichtbar gemacht. Der Maßstab zeigt 500 μm (a, b) und 100 μm (c).

Wie in Abb. 4.2-9 gezeigt, war in den kapillar-ähnlichen Strukturen, die sich während einer DN und DH Kultivierung gebildet haben, eine starke Expression von Kollagen zu beobachten, während einzelne, nicht in die Netzwerke integrierte AD-hMSCs nur eine sehr schwache Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 4.2-9 b). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Kultivierungen unter DN und DH Bedingungen den Zusammenschluss der AD-hMSCs in den Netzwerkstrukturen durch die Ausbildung von Kollagen und somit einer EZM fördern und stabilisieren. Für die unter SN und SH Bedingungen gebildeten Zellpellets wurde keine Anti-Kollagen-Färbung durchgeführt, jedoch deutet die Bildung von Zellpellets darauf hin, dass auch unter diesen Bedingungen eine Produktion und Sekretion von Kollagen stattgefunden hat und den Zusammenhalt der Zellen während des Ablösens von der Zellkulturoberfläche bewirkte. Da die AD-hMSCs hauptsächlich nach 14-tägiger Kultivierung unter DN und DH Bedingungen noch auf der Zellkulturoberfläche adhärirt waren, könnte die dynamische *in vitro* Kultivierung der AD-hMSCs einen entscheidenden Einfluss auf die Menge der exprimierten Adhäsionsmoleküle haben, welche eine stärkere Adhäsion der Zellen an die Zellkulturoberfläche vermitteln.

Für die Charakterisierung der angiogenen (VEGF-A, sVEGFR-2, PECAM-1, sTie-2, Ang2, bFGF, PLGF-bb und PDGF) und inflammatorischen Faktoren (IL-6) sowie MCP-1, das

sowohl angiogene als auch inflammatorische Eigenschaften aufweist, in den konditionierten Zellkulturüberständen wurde zunächst mit Hilfe des BCA-Test die Gesamtprotein-konzentration bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass bereits das verwendete α -MEM-Kulturmedium eine Gesamtprotein-konzentration von $6,56 \pm 0,24$ mg/ml enthielt. Dieses ist auf die Verwendung von 10 % Humanserum zu Beginn der Kultivierung zurückzuführen. Während im Zellkulturüberstand der AD-hMSCs nach zwei Tagen Kultivierung unter 37°C , 5 % CO_2 und 21 % O_2 , welches vor der spezifischen Kultivierung dem Konfluentwachsen der Zellen diente (Negativkontrolle, K, T0), ein geringer Anstieg der Gesamtprotein-konzentration zu verzeichnen war, konnte nach 14-tägiger Kultivierung ohne Mediumwechsel vor allem unter den dynamischen Bedingungen eine Gesamtprotein-konzentration von bis zu $10,70 \pm 0,74$ mg/ml ermittelt werden.

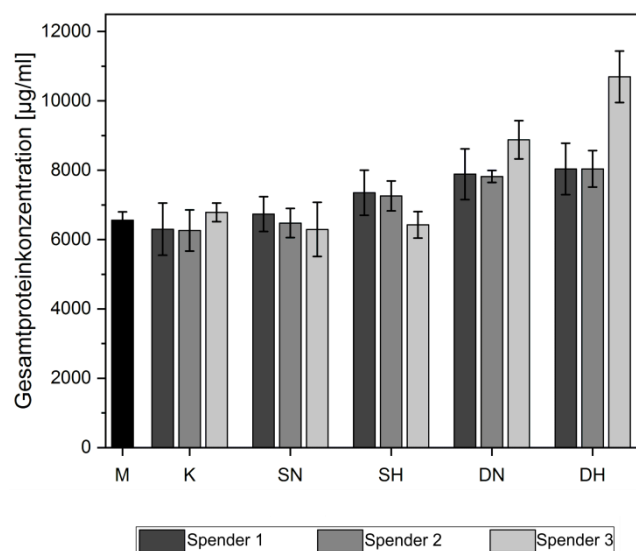


Abb. 4.2-10: Gesamtprotein-konzentration [µg/ml] im Zellkulturmedium nach 14-tägiger Kultivierung von AD-hMSCs unter statischen (S, 0 dyn/cm^2), dynamischen (D, $\sim 7 - 14,7 \text{ dyn/cm}^2$), normoxischen (N, 21 % O_2) und hypoxischen (H, 2,5 % O_2) Bedingungen ohne Mediumwechsel. M = Medium; K (T0) = Negativkontrolle, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierungen der AD-hMSCs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von $N=3$ (Zellkulturüberstände aus 6 Vertiefungen wurden jeweils gepoolt und in Dreifachbestimmung vermessen).

Durch die dynamische Kultivierung der AD-hMSCs in den Zellkulturplatten auf einem Orbitalschüttler, findet eine starke Verdunstung des Mediums statt, das anschließend an dem Deckel der Zellkulturplatte kondensiert. Dieser Prozess führt zu einer Konzentrierung der Gesamtprotein-konzentration im Zellkulturüberstand. Daher ist die erhöhte Protein-konzentration im Zellkulturüberstand unter dynamischer Kultivierung der AD-hMSCs hauptsächlich auf die Medienverdunstung und nicht auf eine vermehrte Proteinproduktion

zurückzuführen. Um diesen Einfluss bei den gemessenen Proteinkonzentrationen der angiogenen und inflammatorischen Marker im konditionierten Medium zu minimieren, wurden diese auf eine Gesamtproteinkonzentration von 5 mg/ml Medium normalisiert.

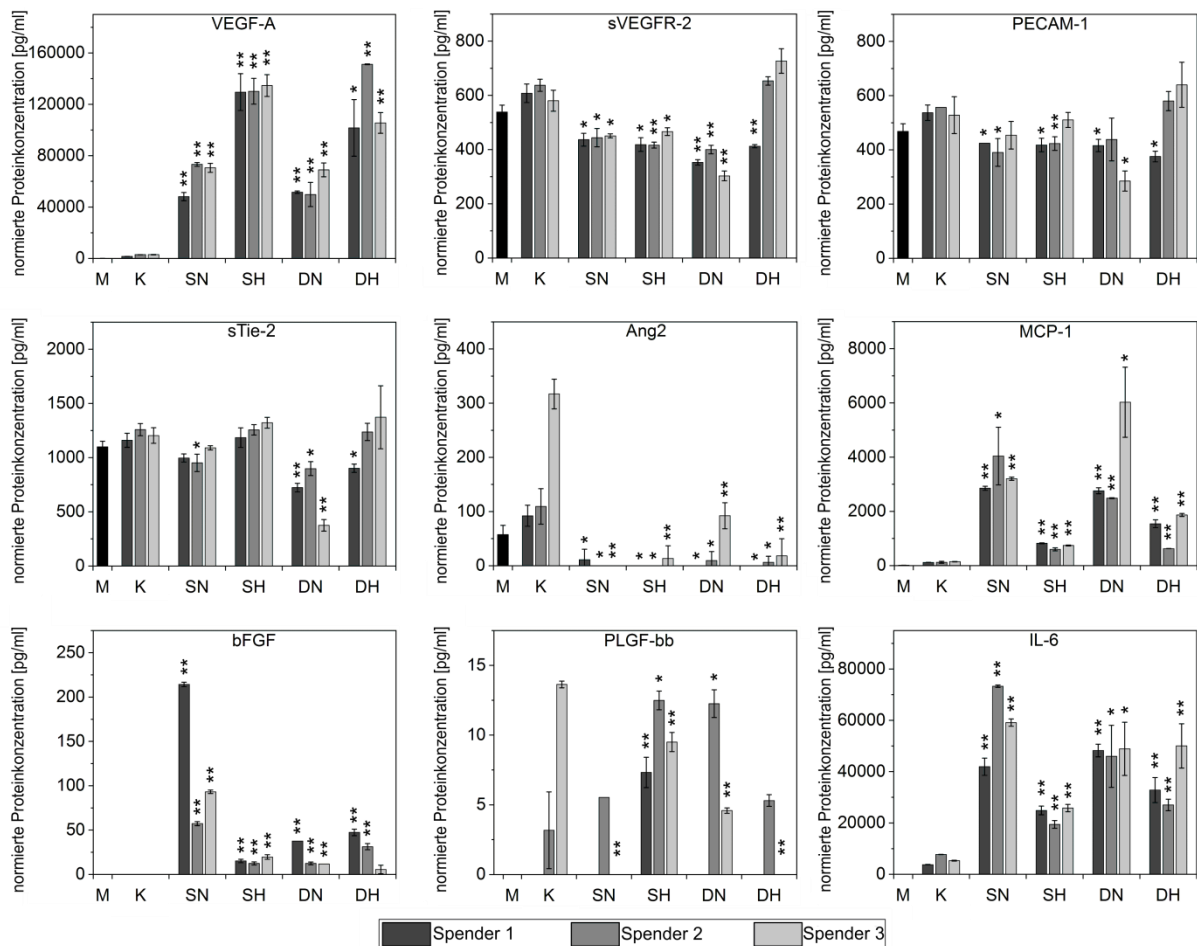


Abb. 4.2-11: Normierte Proteinkonzentrationen [pg/ml] der Biomarker VEGF-A, sVEGFR-2, PECAM-1, sTie-2, Ang2, MCP-1, bFGF, PLGF-bb und IL-6 im Zellkulturmedium konditioniert durch AD-hMSCs von drei Spendern (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre, S3 = 47 Jahre) nach 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~7 - 14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen ohne Mediumwechsel. M = Proteinkonzentration im Medium vor der Konditionierung; K (T₀) = 2 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen, die dem Konfluentwachsen der Zellen dienen, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierung der AD-hMSCs (Negativkontrolle). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 (das Medium aus 6 Vertiefungen wurden jeweils gepoolt und in Dreifachbestimmung im Protein-Multiplex-Assay vermessen). * = p<0,01 und ** = p<0,001 definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle (K). Publiziert in [164].

In Abb. 4.2-11 sind die normierten Proteinkonzentrationen angiogener und inflammatorischer Marker des konditionierten Mediums dargestellt. Die Charakterisierung des durch AD-hMSCs konditionierten Mediums zeigte signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen (46,56 ng/ml - 148,22 ng/ml) von VEGF-A, einem der wichtigsten angiogenen Faktoren in der Angiogenese, gegenüber den Negativkontrollen (jeweils auf den Spender bezogen). Dies wurde unter allen untersuchten Bedingungen detektiert, jedoch war die Sekretion unter SH

(S1 = 127,92 ng/ml; S2 = 127,20 ng/ml; S3 = 131,71g/ml) und DH (S1 = 100,13 ng/ml; S2 = 148,22 ng/ml; S3 = 102,56 ng/ml) Bedingungen, verglichen mit den Kontrollmedien (spenderspezifisch), am stärksten.

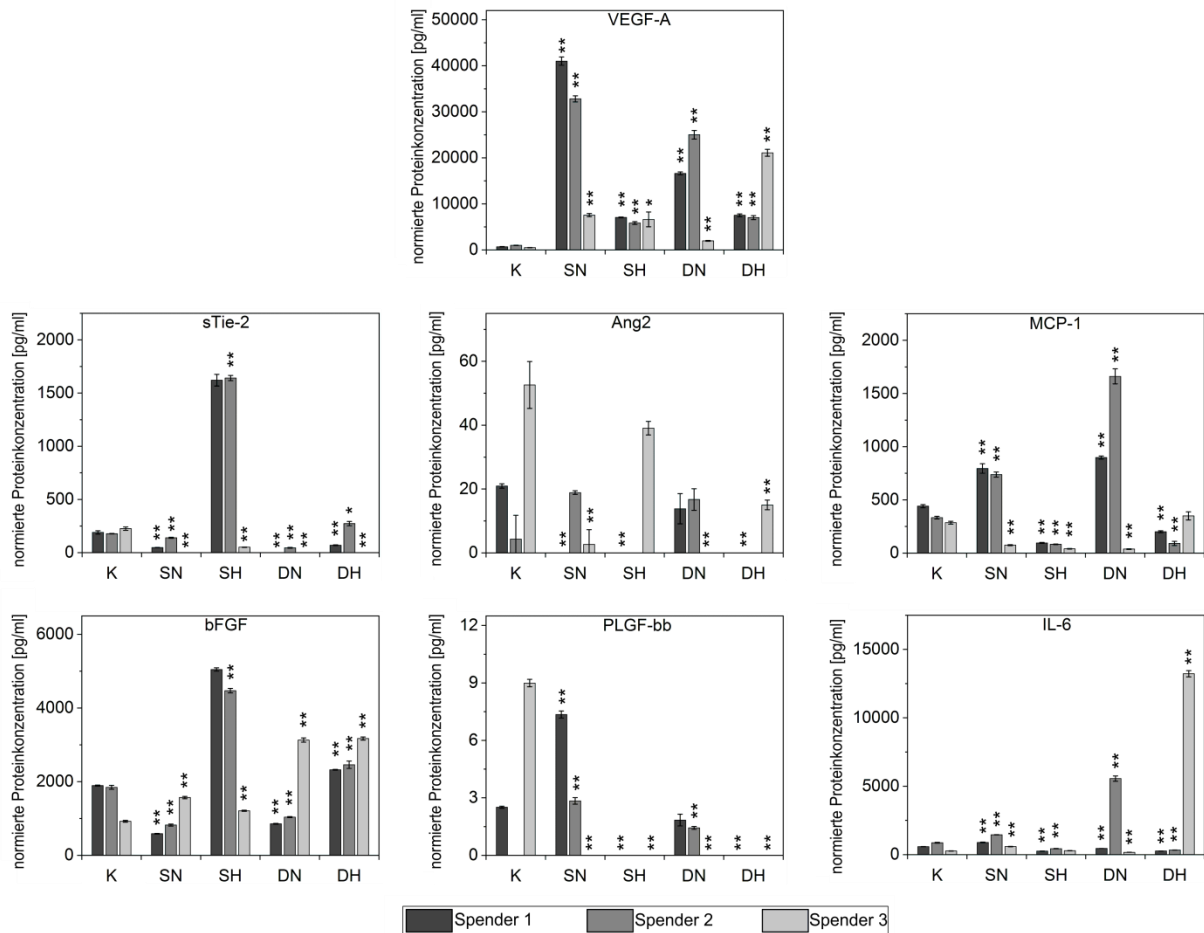


Abb. 4.2-12: Normierte Proteinkonzentrationen der Biomarker VEGF-A, sTie-2, Ang2, MCP-1, bFGF, PLGF-bb und IL-6 in Zelllysaten der AD-hMSCs von drei Spendern (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre, S3 = 47 Jahre) nach 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~7 - 14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen ohne Mediumwechsel. K (T0) = 2 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen, die dem Konfluentwachsen der Zellen dienten, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierung der AD-hMSCs (Negativkontrolle). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 (AD-hMSCs aus 12 Vertiefungen wurden jeweils gepoolt und die isolierten Zelllysate in Dreifachbestimmung im Protein-Multiplex-Assay vermessen). * = p<0,01 und ** = p<0,001 definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle. Publiziert in [164].

In den Zelllysaten, welche auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1000 µg/ml normalisiert wurden, konnten die höchsten VEGF-A Konzentrationen hingegen unter SN und DN Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 4.2-12). Dies deutet darauf hin, dass die hypoxische Kultivierung der AD-hMSCs die Sekretion von VEGF-A in das Medium fördert, während die SN gegenüber der DN Kultivierung eine stärkere Expression bedingt. Die initialen Proteinkonzentrationen des entsprechenden löslichen VEGF-Rezeptor-2

(sVEGFR-2), des endothelialen Blutplättchen-Adhäsionsmoleküls-1 (PECAM-1) und des löslichen sTie-2-Rezeptors waren aufgrund des eingesetzten Humanserums in dem verwendeten α -MEM-Medium bereits erhöht (sVEGFR-2 = 538,36 pg/ml; sTie-2 = 1099,59 pg/ml; PECAM-1 = 468,16 pg/ml). Eine Zunahme von sVEGFR-2 und PECAM-1 konnte nur unter DH Bedingungen im konditionierten Medium detektiert werden, wobei eine starke spenderspezifische Varianz zu erkennen war. Während sVEGFR-2 und PECAM-1 nur in Spender 2 und 3 hochreguliert wurden (sVEGFR-2: S2 = 16,07 pg/ml; S3 = 146,63 pg/ml und PECAM-1: S2 = 23,51 pg/ml; S3 = 111,92 pg/ml), konnte eine erhöhte Proteinkonzentration von sTie-2 unter DH Kultivierung nur für Spender 3 (168,68 pg/ml) gegenüber der Negativkontrolle detektiert werden. In der SN, SH und DH Kultivierung, in der keine signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration von sVEGFR-2 und PECAM-1 detektiert wurde, war kaum eine spenderspezifische Variation vorhanden. bFGF, ein weiterer proangiogener Faktor der in der Vaskulogenese aber auch Initiation der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, wurde am stärksten unter SN Bedingungen der AD-hMSCs in das Medium sezerniert (57,23 pg/ml - 214,27 pg/ml). Auch hier zeigten sich wieder spender-spezifische Unterschiede, jedoch konnte die höchste bFGF-Konzentration im konditionierten Medium von Spender 1 detektiert werden (214,27 pg/ml). Die stärkste Expression wurde jedoch in Zelllysaten aus der SH Kultivierung nachgewiesen (Abb. 4.2-12). Die Proteinkonzentration von PLGF-bb im konditionierten Medium war stark spenderspezifisch und mit einer maximalen Konzentration von 9,31 pg/ml sehr gering. Ang2 wurde gegenüber den Negativkontrollen unter keiner der definierten Bedingungen in das Medium sezerniert. Ein Vergleich beider Faktoren mit den Konzentrationen in den Zelllysaten (Abb. 4.2-12) zeigte ebenfalls eine geringe Proteinexpression von maximal 12,41 pg/ml (Ang2) bzw. 4,84 pg/ml (PLGF-bb) unter starker Spenderspezifität. MCP-1, ein Zytokin, das sowohl inflammatorische als auch angiogene Prozesse beeinflusst, wurde, bezogen auf Spender 1 und 2, am effektivsten unter SN und DN Bedingungen exprimiert und auch am stärksten unter diesen Bedingungen sezerniert (SN = 2,74 ng/ml - 3,92 ng/ml; DN = 2,73 ng/ml - 5,88 ng/ml). Gleiches gilt für die Sekretion des inflammatorischen Markers IL-6 (SN = 38,17 ng/ml - 65,58 ng/ml; DN = 19,29 ng/ml - 44,74 ng/ml). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die hypoxische Kultivierung der AD-hMSCs die Abgabe inflammatorischer Marker in das Medium verringert wird (Abb. 4.2-11). Auch die Analysen von MCP-1 in den Zelllysaten (Abb. 4.2-12) bestätigen eine geringere Proteinexpression unter hypoxischen gegenüber normoxischen Bedingungen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Analysen von Paquet *et al.* [172].

Die Proteinanalysen der angiogenen und inflammatorischen Faktoren in den Zelllysaten und im Zellkulturüberstand haben gezeigt, dass die Wahl der *in-vitro*-Kultivierungsparameter einen entscheidenden Einfluss auf die Expression und Sekretion dieser Faktoren durch die AD-hMSCs hat. Unabhängige Studien analysierten separat den induktiven Effekt von Hypoxie, dynamischer/mechanischer Stimulation sowie einer Deprivation an Serum auf die Sekretion angiogener Faktoren von hMSCs und konnten nachweisen, dass jede dieser Kultivierungsbedingungen für sich eine positive Auswirkung auf die Sezernierung spezifischer angiogener Faktoren zeigte [141, 162, 215]. Eine Kombination dieser Bedingungen in der hier durchgeführten Arbeit zeigte, dass eine deutlich erhöhte Sekretion VEGF-A unter hypoxischen gegenüber normoxischen Bedingungen erfolgt. Diese Analysen stimmen mit neueren Studien überein, die bestätigen, dass eine Exposition von hMSCs gegenüber Hypoxie zu einer signifikanten Hochregulierung der VEGF-A mRNA- und Proteinexpression führt [195], während die Expression der inflammatorischen Marker unter einer Sauerstoffkonzentration von 2,5 % geringer war. Dabei scheint in dieser Arbeit, die statische bzw. dynamische Kultivierung der Zellen in Kombination mit Hypoxie keinen differenzierten Effekt auf die parakrinen Eigenschaften auszuüben. Lediglich für sVEGFR-2 und PECAM-1 bewirkte die Kombination von dynamischer und hypoxischer Kultivierung der AD-hMSCs die effizienteste Sekretion der Faktoren in das Zellkulturmedium. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Exposition gegenüber Hypoxie die Hochregulation angiogener Faktoren stärker beeinflusst als die dynamische Stimulation.

Sauerstoff ist einer der wichtigsten Umweltfaktoren der zellulären Mikroumgebung und hat einen Einfluss auf verschiedenste zelluläre Prozesse [173, 216]. Hypoxische Umgebungsbedingungen in Geweben werden hervorgerufen, wenn der Sauerstoffbedarf der Zellen durch die vorhandenen Kapillaren nicht mehr gedeckt werden kann [217]. Damit die Zellen sich an die neuen Umgebungsbedingungen anpassen bzw. die vorherigen Bedingungen wieder herstellen können, wird durch die Aktivierung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs), die Genexpression weiterer Gene reguliert [173, 217]. So steuert die HIF-1 abhängige Expression angiogener Faktoren, wie VEGF-A, die Bildung neuer Blutgefäße in hypoxischen Geweben [217]. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass Sauerstoff eine Vielzahl von Effekten auf hMSCs hat und die Proliferation, die Migration, die Expression und Sekretion von Wachstumsfaktoren und das Differenzierungspotential erhöht [218]. Grayson *et al.* beobachteten, dass hMSCs, die *in vitro* unter Hypoxie kultiviert wurden, erhöhte proliferative Eigenschaften sowie eine erhöhte Expression von Kollagen I aufwiesen [216]. Zudem waren deutliche Unterschiede in der Morphologie zwischen hypoxisch und normoxisch kultivierten

hMSCs zu erkennen [216]. Übereinstimmend mit den hier durchgeführten Analysen demonstrierten Rehman *et al.* eine signifikant erhöhte Sekretion von VEGF-A unter hypoxischen gegenüber normoxischen Bedingungen [219]. Eine signifikante Zunahme von VEGF wurde auch im konditionierten Medium von mechanisch stimulierten gegenüber unstimulierten MSCs durch Kasper *et al.* nachgewiesen [141]. Im Gegensatz dazu, wurde in dieser Arbeit keine deutliche Zunahme von VEGF-A zwischen statischer und dynamischer Kultivierung der Zellen bei gleicher Sauerstoffkonzentration beobachtet. Jedoch zeigten Kasper *et al.* in Übereinstimmung, mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen, eine erhöhte Sekretion von bFGF in das Kulturmedium unter statischen Bedingungen.

4.2.4 Molekularer Nachweis von angiogenen Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen mittels qRT-PCR

Die vorangegangene Bestimmung der Proteinkonzentration unter statischer/dynamischer kombiniert mit hypoxischer/normoxischer Kultivierung der AD-hMSCs hat eine verstärkte Expression und Sekretion wichtiger angiogener Marker wie VEGF-A und sVEGFR-2 unter dynamisch-hypoxischen Bedingungen ergeben. Die Proteinexpression, d.h. die Translation von mRNA in Proteine, sowie die Sekretion der Proteine in das Medium, sind von vielen zellulären Prozessen wie der Chaperonaktivität und vor allem von posttranslationalen Modifikationen abhängig. Somit spiegelt die Proteinkonzentration in den Zellysaten und im Zellkulturmedium nicht die Expression der spezifischen Gene wider. Um den Einfluss von Hypoxie in Kombination mit statischer und dynamischer Kultivierung von AD-hMSCs unter Glukosedepriuation auf das Transkriptionslevel angiogener und inflammatorischer Marker zu untersuchen, wurde eine quantitative *Real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Für die Durchführung der qRT-PCR wurde die zelluläre Gesamt-RNA der über 3, 7, 14 Tage unter DN und DH Bedingungen konditionierten AD-hMSCs von Spender 1-3 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels Gradienten-PCR wurde zunächst die optimale Hybridisierungstemperatur der designten Primerpaare ermittelt, bevor die qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expressionslevel in den Zellen durchgeführt werden konnte. In Tab. 6.2-1 ist die Übersicht der verwendeten Primerpaare dargestellt. Zusätzlich sind die mittels Gradienten-PCR ermittelte optimierte Hybridisierungstemperatur sowie die Produktlänge angegeben.

4.2.4.1 Evaluation der potentiellen Referenzgene

Die semiquantitative Analyse der Genexpressionsdaten erforderte die Verwendung von Referenzgenen. Als Referenz waren hier die Gene geeignet, die unter hypoxischer und normoxischer Kultivierung der AD-hMSCs nicht unterschiedlich reguliert wurden. Um eine Normierung der Genexpression durchzuführen, wurde zunächst die Expressionsstabilität von 4 Referenzgenen untersucht. Basierend auf Studien zur Expressionsstabilität von Referenzgenen in AD-hMSCs nach Kultivierung unter Normoxie bzw. Hypoxie [220-222], wurden folgende Referenzgene ausgewählt: ribosomales Protein L13a (RPL13A); TATA-bindendes Protein (TBP); Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase-Aktivierungsprotein Zeta-Polypeptid (YWHAZ) und β 2-Mikroglobulin (B2M). Die Algorithmen geNorm und Normfinder ermöglichen die Identifikation der Expressionsstabilität einzelner Kandidaten-Referenzgene.

Tab. 4.2-1: Analyse der Expressionsstabilität von 4 Referenzgenen in AD-hMSC berechnet mit NormFinder und geNorm.

Gen	Stabilität (Normfinder)	Stabilität (geNorm)
TBP	0,254	1,365
RPL13A	0,281	1,397
YWHAZ	0,848	1,709
B2M	1,572	2,392

Mit Hilfe der Algorithmen geNorm und NormFinder wurden RPL13A und TBP als die Gene mit der geringsten Regulation bzw. höchsten Expressionsstabilität identifiziert (Tab. 4.2-1). Basierend auf den beiden Referenzgenen wurde ein Genexpressionsnormierungsfaktor für jede Probe gebildet, der für die weiteren mRNA-Normalisierungen verwendet wurde.

4.2.4.2 Genexpressionsprofile unter dynamisch-normoxischer und dynamisch-hypoxischer Kultivierung von AD-hMSCs

Die Transkriptionsniveaus der ausgewählten Gene wurden mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet. Die relative Expression der untersuchten Gene ist in Abb. 4.2-13 dargestellt. Die Analysen der Expressionslevel von *vegfa* nach 3, 7 und 14 Tagen Kultivierung von AD-hMSCs unter DN und DH Bedingungen zeigte nach allen Zeitpunkten ein erhöhtes Expressionslevel unter DH gegenüber DN Bedingungen. Zudem war eine Zunahme des mRNA-Levels über die Dauer der Kultivierung unter beiden Bedingungen zu erkennen. Die stärkste relative Expression wurde für alle Spender in AD-hMSC nach 14-tägiger DH Kultivierung

nachgewiesen (7,7-fach bis 19,4-fach). Im Gegensatz dazu war die Transkription von *hif1a* am stärksten zu Beginn der Kultivierung (Tag 3 und 7) für Spender 1 und 3 hochreguliert. Der Hypoxie-induzierende Faktor reguliert die Expression weiterer angiogener Faktoren und steuert somit die Induktion der Angiogenese. Eine frühe Transkription dieses Gens ist daher ausschlaggebend für die Bildung von vaskulären Strukturen. Dieses war in den AD-hMSCs von Spender 2 nicht der Fall. Über den untersuchten 14-tägigen Zeitraum war hier eine negative Regulation nahezu aller untersuchten Gene zu beobachten. Lediglich für *plgf* konnte nach 14-tägiger Kultivierung bei Spender 2 eine 16-fach erhöhte Expression relativ zur Negativkontrolle detektiert werden, während Spender 1 und 3 hier eine negative Regulation aufwiesen. *Bfgf*, ein weiterer angiogener Faktor, der für die Initiation der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, zeigte an allen Kultivierungszeitpunkten eine erhöhte Expression. Für die zwei Gegenspieler in der Angiogenese, *angpt1* und *angpt2* (Stabilisierung und Destabilisierung der vaskulären Strukturen *in vivo*), war auch eine unterschiedliche Genexpression zu beobachten. Während *angpt1* hauptsächlich zu Beginn der Kultivierung hochreguliert wurde, zeigte *angpt2* die stärkste Expression nach 14 Tagen der DH Kultivierung. Ang1 ist ein proangiogener Wachstumsfaktor, der die Stabilisierung neu gebildeter Gefäße fördert, was die frühe Regulation dieses Faktors erklären könnte. Ang2 hingegen reguliert zusammen mit weiteren Faktoren die Umstrukturierung von Gefäßstrukturen, indem es die Gefäßwände permeabilisiert. Der dazugehörige Rezeptor *tek* (sTie-2) wurde dementsprechend nur unter DH-Kultivierung der AD-hMSCs hochreguliert. *Ccl2* (MCP-1), ein Faktor, der sowohl angiogene als auch inflammatorische Eigenschaften aufweist, zeigte unter DH Kultivierung nur eine sehr schwache Regulation, *il-6* hingegen wurde unter 14-tägiger DH Kultivierung am stärksten reguliert.

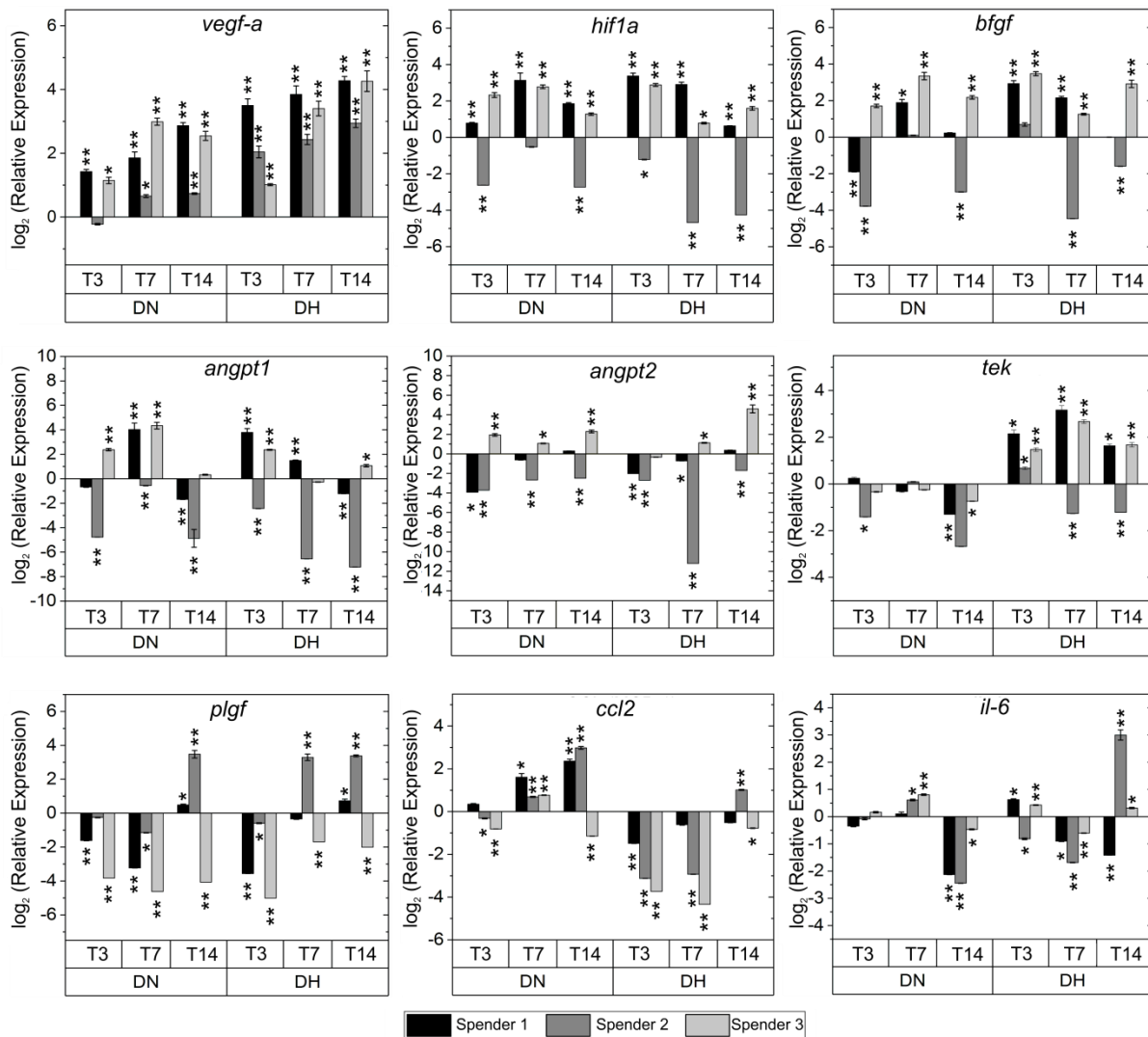


Abb. 4.2-13: Logarithmische (linearisierte) Darstellung der x-fachen Expression von angiogenen und inflammatorischen Genen in AD-hMSCs nach 3, 7 und 14 Tagen Kultivierung unter dynamisch-normoxischen (DN) und dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen relativ zur Negativkontrolle (3 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierungen der AD-hMSCs). Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 3 (AD-hMSCs aus 6 Vertiefungen wurden jeweils gepoolt und die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und in Dreifachbestimmung in der qRT-PCR vermessen). * = p<0,01 und ** = p<0,001 definiert eine signifikante Änderung bezogen auf die Negativkontrolle. Publiziert in [164].

Auffällig ist bei nahezu allen Analysen der relativen Expression die geringe bzw. negative Regulation der Gentranskription in den AD-hMSCs von Spender 2. Daher wurden die mittels qPCR ermittelten cDNA-Konzentrationen genauer analysiert.

Tab. 4.2-2: cDNA-Konzentrationen [ng/ml] der angiogenen und inflammatorischen Faktoren in AD-hMSC 2 Tage nach Aussiedeln der Zellen und Inkubation unter 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ (Negativkontrolle). Publiziert in [164].

	VEGF-A	Ang1	Ang2	sTie-2	HIF-1	bFGF	PLGF	CCL-2	IL-6
Spender 1	3,41	0,59	8,20	3,59	0,75	3,22	101,57	9,73	6,01
Spender 2	9,67	13,90	19,20	12,45	11,93	13,10	15,50	10,83	11,00
Spender 3	6,01	0,55	4,72	3,35	0,78	1,40	309,00	17,13	5,32

Tab. 4.2-3: cDNA-Konzentrationen [ng/ml] der angiogenen und inflammatorischen Faktoren in AD-hMSC nach 14 Tagen Kultivierung unter dynamisch-hypoxischen Bedingungen. Publiziert in [164].

	VEGF-A	Ang1	Ang2	sTie-2	HIF-1	FGFb	PLGF	CCL-2	IL-6
Spender 1	76,10	0,29	12,27	12,83	1,33	3,67	193,50	7,74	2,59
Spender 2	112,67	0,14	8,89	8,10	0,94	6,60	243,33	33,13	133,33
Spender 3	168,00	1,72	164,67	14,37	3,41	15,47	112,67	13,43	9,70

Die Daten zeigen (Tab. 4.2-2), dass in den Kontrollzellen von Spender 2 bereits eine um das 15-fache erhöhte cDNA-Konzentration von *hif1a* gegenüber der Konzentration in den AD-hMSCs der beiden anderen Spender detektiert wurde. Auch für *vegfa*, *angpt1*, *angpt2*, *tek*, *bfgf*, *il-6* wurde in den AD-hMSCs von Spender 2 eine erhöhte cDNA-Konzentration in den Kontrollzellen vor Beginn der definierten DN und DH Kultivierung gegenüber den anderen Spendern ermittelt. Diese bereits sehr hohe Ausgangskonzentration an mRNA in den Zellen könnte ein Grund für die geringe Regulation der Gene in diesem Spender sein. Analysen der cDNA-Konzentrationen der untersuchten Faktoren von Spender 2 nach 14 Tagen Kultivierung unter DN und DH Bedingungen (Tab. 4.2-3) zeigten zudem, dass diese im gleichen Konzentrationsbereich wie cDNA-Konzentrationen in AD-hMSCs von Spender 1 bzw. 3 liegen.

Die Charakterisierung der angiogenen Faktoren auf mRNA-Level bestätigen zum Teil die Ergebnisse der Proteinanalysen in den Zellkulturüberständen (vgl. Kapitel 4.2.3). So kann übereinstimmend mit den Proteinkonzentrationen in den konditionierten Medien eine stärkere Hochregulation von VEGF-A und sTie-2 unter dynamisch-hypoxischen Bedingungen und für MCP-1 (*ccl2*) unter dynamisch-normoxischen Bedingungen beobachtet werden. Kasper *et al.* beobachteten im Gegensatz dazu keinen Anstieg von *vegfa* in mechanisch stimulierten gegenüber unstimulierten hMSCs [141]. Zwischen Gen- und Proteinexpressionsanalysen liegt die Übereinstimmung laut Pascal *et al.* häufig nur bei 48 % - 68 % [223]. Das zeigt, dass eine schwache Korrelation zwischen Genexpressionsdaten und gemessenen Proteinleveln vorliegt. Ein Grund hierfür sind die unterschiedlichen Stadien, in denen die Genexpression aber auch die Proteinexpression geregelt wird. So spielen auf Gen-Ebene die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation sowie die mRNA-Stabilität eine wesentliche Rolle, während auf Proteinlevel die Translationseffizienz, posttranslationale Proteinmodifikationen, proteolytische Spaltungen und damit einhergehend auch die Halbwertszeiten der Proteine ausschlaggebend für das gemessene Proteinlevel sind. Daher ist es wichtig, mittels vorhandener Fragestellungen zu bestimmen, ob eine Analyse der Gen- oder Proteinexpression

für die Zielsetzung notwendig ist. Um zu bestimmen, welche Wirkung die Sekretion angiogener Faktoren und damit einhergehend der parakrine Effekt der AD-hMSCs auf die Formation kapillar-ähnlicher Strukturen durch HUVECs hat, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich die Proteinkonzentration der Faktoren im konditionierten Medium betrachtet.

4.2.5 Schlussfolgerung

Eine stabile Differenzierung der AD-hMSCs in Endothelzellen konnte unter SN, SH, DN und DH Bedingungen in Kombination mit einem Hungern der Zellen an Glukose nicht beobachtet werden, auch wenn die AD-hMSCs Merkmale reifer Endothelzellen aufwiesen. Daher sind die AD-hMSCs nicht für die innere Auskleidung der bioartifiziellen Gefäßprothese und Ausbildung eines funktionsfähigen Endothels geeignet. Durch die Charakterisierung der Proteinlevel in den Zellkulturüberständen konnte jedoch erfolgreich gezeigt werden, dass die AD-hMSCs aufgrund ihrer parakrinen Eigenschaften angiogene Faktoren in das Zellkulturmedium sezernieren und dass die hypoxische Kultivierung der Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Sekretion der Proteine hat. Zudem zeigt die dynamische Kultivierung einen leicht positiven Einfluss auf die Sekretion dieser Faktoren. Es wurde festgestellt, dass das Expressionsprofil der AD-hMSCs und damit auch die parakrinen Eigenschaften durch die Mikroumgebung der Zellen beeinflusst werden können. Wie bereits beschrieben, ist das zeitliche und konzentrationsabhängige aufeinander abgestimmte Zusammenspiel angiogener Faktoren entscheidend für die erfolgreiche Ausbildung von vaskulären Strukturen. Dies ist essentiell für die optimale Nähr- und Sauerstoffversorgung der Zellen. In dem folgenden Kapitel wird der Einfluss von Zellkulturmedium, das durch 14-tägige DH Kultivierung von AD-hMSCs konditioniert wurde, sowie die direkte Wirkung von AD-hMSCs in Kokultur mit HUVECs auf die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen von Endothelzellen genauer untersucht.

4.3 Charakterisierung der Angiogenese anhand der Bildung von kapillarähnlichen Strukturen

In dem vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass Veränderungen in der Mikroumgebung einen entscheidenden Einfluss auf die Expression sowie Sekretion sowohl angiogener als auch inflammatorischer Faktoren der AD-hMSCs haben. Die Analysen ergaben, dass unter hypoxischer Kultivierung der AD-hMSCs die Sekretion des angiogenen Faktors VEGF-A verstärkt sowie die Sekretion inflammatorischer Faktoren reduziert wird. Zudem wurde durch Kombination einer hypoxischen mit einer dynamischen Kultivierung die Sekretion weiterer angiogener Faktoren wie sVEGFR-2 oder sTie-2 verstärkt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in diesem Kapitel der Einfluss von Medium, das durch Kultivierung von AD-hMSCs unter hypoxischen (2,5 % O₂) und dynamischen (~7 - 14,7 dyn/cm²) Umgebungsbedingungen über einen Zeitraum von 14 Tagen konditioniert wurde, auf die Bildung kapillarähnlicher Strukturen durch HUVECs *in vitro* genauer analysiert. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die erfolgreiche Integration und optimale Langzeitfunktion künstlich gezüchteter Gewebestrukturen, wie bioartifizieller Gefäßprothesen, im Organismus, ist die *in vitro* Etablierung und Formation vaskulärer Kapillarsysteme vor der Implantation. Dies ist notwendig, da Kapillaren *in vivo* durchschnittlich nur 5 µm/h wachsen und eine schnelle und optimale Nährstoffversorgung aller Zellen innerhalb des künstlichen Gewebes nicht gewährleistet werden kann. Ein Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen bedingt die Ausbildung nekrotischer Bereiche und könnte dadurch die optimale Funktion des neuen Gewebes massiv einschränken. Daher wurde in 2D und 3D Zellkultursystemen evaluiert, welchen Einfluss durch AD-hMSCs konditioniertes Medium auf die Formation angiogener Strukturen hat. Zusätzlich wurden HUVECs und AD-hMSCs sowohl in konditioniertem als auch unkonditioniertem Medium kokultiviert, damit sich für eine funktionierende bioartifizielle Gefäßprothese bereits *in vitro* zwischen den Zellschichten vaskuläre Kapillarstrukturen bilden. Diese Kapitel wurde teilweise publiziert in: *Thoms et al. (eingereicht), Dynamic-hypoxic conditioning of AD-hMSCs and co-culturing with HUVECs favors endothelial network formation, Tissue Engineering Part A [164].*

4.3.1 Kokultivierung von HUVECs und AD-hMSCs in 2D

Um das *in vivo* Zusammenspiel verschiedener Zellarten nachzubilden, werden *in vitro* Kokulturen, d.h. die gleichzeitige Kultivierung mehrerer Zellarten, angewendet. Dabei werden sowohl direkte Kokultursysteme, die einen Zell-Zell-Kontakt zwischen verschiedenen Zellarten ermöglichen, und indirekte Kokulturen verwendet, die durch eine räumliche Trennung der Zellen nur einen Austausch von Botenstoffen über das Medium erlauben. Um den Einfluss einer indirekten Kokultur aus HUVECs und AD-hMSCs auf die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen durch HUVECs in 2D genauer zu untersuchen, wurde ein *Transwell*-System verwendet (Abb. 3.2-2). In diesem System wurden die HUVECs und AD-hMSCs räumlich voneinander getrennt ohne Interaktion über gemeinsame Zell-Zell-Kontakte kultiviert. Die HUVECs wurden dabei in den Vertiefungen (8,87 cm²) einer Zellkulturplatte ausgesiedelt, während die AD-hMSCs in den Kokultureinsätzen (4,5 cm²) kultiviert wurden. Der Boden dieser Kokultureinsätze besteht aus einer Membran mit einer definierten Porengröße von 0,4 µm. Dadurch sind die Kokultureinsätze für Moleküle, wie Wachstums-faktoren, jedoch nicht für Zellen durchlässig. Die HUVECs und AD-hMSCs wurden durch Verwendung des *Transwell*-Systems (Abb. 3.2-2) in dem gleichen Kulturmedium kultiviert. Dadurch können die aufgrund der parakrinen Eigenschaften der AD-hMSCs freigesetzten angiogenen Faktoren das Wachstumsverhalten und die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen der HUVECs beeinflussen.

Zunächst wurde der Effekt von konditioniertem Medium in Kombination mit einer indirekten Kokultur der HUVECs und AD-hMSCs auf die Bildung von kapillar-ähnlichen Strukturen untersucht. Dafür wurden $8 \cdot 10^3$ HUVECs/cm² in der Vertiefung einer Zellkulturplatte und $2 \cdot 10^3$ AD-hMSCs/cm² im Kokultureinsatz in einer anderen Zellkulturplatte ausplattiert und in dem jeweiligen zellspezifischen Medium (HUVECs in EGM-2 und AD-hMSCs in α -MEM) separat kultiviert. Nach einem Tag wurde der Einsatz mit den AD-hMSCs in die Zellkulturplatte zu den HUVECs gesetzt und das zellspezifische Medium durch konditioniertes α -MEM (14 Tage Kultivierung von AD-hMSCs unter DH Bedingungen) ersetzt. Das konditionierte Medium wurde hierfür 1:1 mit α -MEM Basalmedium (ohne Serum und Antibiotikum) verdünnt, um einen Teil der vollständig verbrauchten Glukose zu ersetzen. Zusätzlich wurde während der Kokultivierung alle 2 Tage 0,5 ml Medium entnommen und durch α -MEM Basalmedium ersetzt, um ein Absterben der HUVECs aufgrund der verbrauchten Glukose zu verhindern. Wie in Abb. 4.3-1 zu erkennen ist, konnte nach 7 Tagen Kokultivierung unter normoxischen Bedingungen die Bildung erster kapillar-ähnlicher

Strukturen beobachtet werden. Jedoch waren die kapillarähnlichen Strukturen noch relativ unzusammenhängend und nur vereinzelt mit großen Bereichen, in denen die HUVECs eine zusammenhängende Einzelschicht ohne Verzweigungen bildeten.

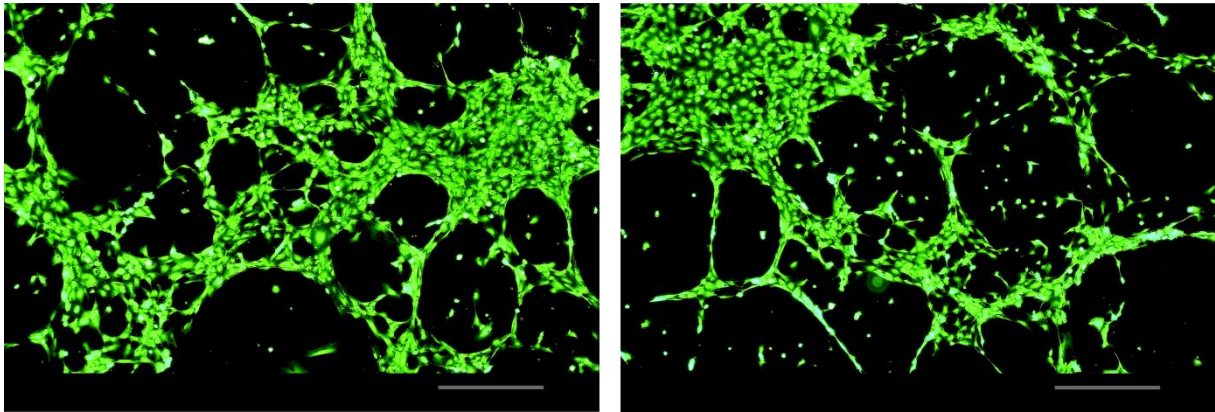


Abb. 4.3-1: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einzelner kapillarähnlicher Formationen von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter normoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium. Die Zellen wurden mittels Calcein-AM gefärbt, um die Vitalität der Zellen aufzuzeigen. Der Maßstab zeigt 500 μm .

Da in Kapitel 4.2.3 gezeigt wurde, dass AD-hMSCs während der Kultivierung Kollagen produzieren, welches als EZM-Protein die Bildung kapillarähnlicher Strukturen unterstützen könnte, wurden in einem anderen Versuchsansatz zunächst $6 \cdot 10^3$ AD-hMSCs/cm² in den Vertiefungen einer Zellkulturplatte ausplattiert und über 4 Tage unter Normoxie kultiviert. Mittels Accutase wurden die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturplatten-Vertiefungen abgelöst und anschließend $8 \cdot 10^3$ HUVECs/cm² in EGM-2 in diese vorbehandelten Vertiefungen ausgesiedelt. Gleichzeitig wurden entsprechend der vorherigen Versuchsdurchführung $2 \cdot 10^3$ AD-hMSCs/cm² in α -MEM in den Kokultureinsätzen ausplattiert und diese nach einem Tag separater Kultivierung in die Vertiefungen mit den HUVECs gesetzt und das zellspezifische Medium durch unter DH Bedingungen konditioniertem Medium (14 Tage) ersetzt. Bereits nach 4 Tagen Kokultur unter Normoxie mit konditioniertem Medium wurden definierte kapillarähnliche Strukturen durch die HUVECs gebildet (Abb. 4.3-2), während in der ersten Versuchsdurchführung (vgl. Abb. 4.3-1) erst nach 4 - 5 Tagen eine beginnende Formation solcher Strukturen beobachtet werden konnte.

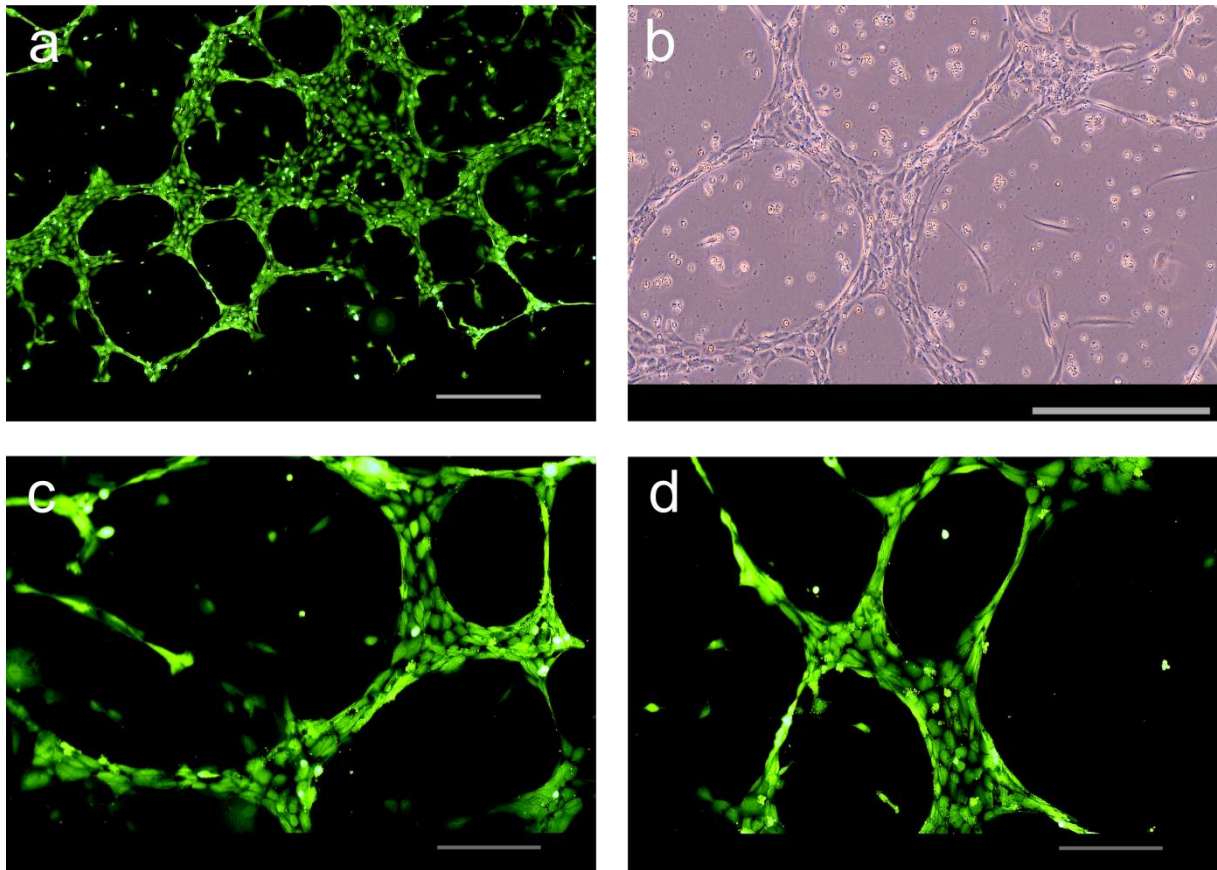


Abb. 4.3-2 Fluoreszenzmikroskop- und Phasenkontrastaufnahmen der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 4 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter normoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium auf einer vorbehandelten Oberfläche. Vor dem Aussiedeln der HUVECs wurde in den gleichen Vertiefungen einer Zellkulturplatte AD-hMSCs für 4 Tage kultiviert, mittels Accutase abgelöst und HUVECs für die indirekte Kokultur ausgesiedelt. Die HUVECs wurden mittels Calcein-AM gefärbt, um die Vitalität der Zellen zu zeigen. Der Maßstab zeigt 500 μm (a, b) und 200 μm (c, d).

Diese schnelle Formation der kapillarähnlichen Netzwerke deutet darauf hin, dass die AD-hMSCs während der 4-tägigen Kultivierung extrazelluläre Matrixproteine produzieren und sekretieren, die an der Oberfläche der Zellkulturplatte adsorbieren und die Anordnung der HUVECs in die Netzwerkstrukturen unterstützen.

Um den Einfluss von konditioniertem Medium auf die Bildung dieser Strukturen genauer zu untersuchen, wurden die HUVECs in einem weiteren Versuchsansatz unter Verwendung von konditioniertem und unkonditioniertem Medium in indirekter Kokultur mit AD-hMSCs kultiviert. Zum Vergleich wurden HUVECs außerdem in konditioniertem und unkonditioniertem α -MEM ohne Kokultur kultiviert. Zudem wurde die initiale Zellzahl der AD-hMSCs in der Kokultur von $2 \cdot 10^3$ Zellen/ cm^2 auf $8 \cdot 10^3$ Zellen/ cm^2 erhöht, um dadurch eine höhere Konzentration angiogener Faktoren während der Kokultur im Medium anzureichern. Zum einen haben die Analysen in Kapitel 4.2.3 gezeigt, dass die Sekretion von VEGF-A unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wird und zum anderen wird die

Kapillarbildung *in vivo* hauptsächlich in Bereichen induziert, in denen ein Mangel an Sauerstoff vorherrscht. Daher wurden die Zellen hier während der Kokultivierung unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, um diesen Effekt zu unterstützen.

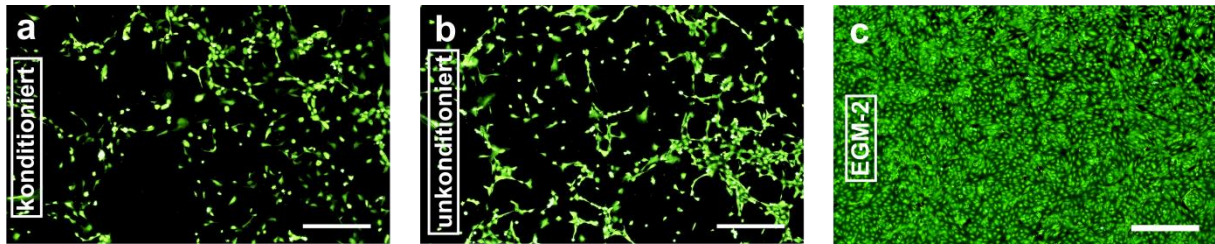


Abb. 4.3-3: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (Negativkontrollen) von HUVECs nach 7 Tagen Kultivierung ohne Kokultur unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem (a) und unkonditioniertem α -MEM (b) Medium sowie nach 6 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs in EGM-2-Medium (c). Die Zellen wurden mittels Calcein-AM gefärbt, um die Vitalität der Zellen aufzuzeigen. Der Maßstab zeigt 500 μ m.

Unter Anwendung von konditioniertem (Abb. 4.3-3 a) und unkonditioniertem (Abb. 4.3-3 b) α -MEM konnte nach 7-tägiger Kultivierung der HUVECs ohne Kokultur mit AD-hMSCs im *Transwell*-System (Negativkontrollen) keine Bildung definierter Netzwerkstrukturen beobachtet werden. Als weitere Negativkontrolle diente die indirekte Kokultur von HUVECs und AD-hMSCs in EGM-2. Hier konnte auch nach 6 Tagen der Kokultur eine 100 %ige Konfluenz der HUVECs ohne die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen beobachtet werden. Diese Kontrollen zeigten, dass das unkonditionierte α -MEM keine Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen bewirkt und auch im konditionierten Medium scheinen die angiogenen Faktoren nicht in ausreichender Menge vorhanden zu sein, um die Formation kapillar-ähnlicher Strukturen zu induzieren. Auch in der Kokultur von AD-hMSCs mit HUVECs in EGM-2 konnte keine Bildung von kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet werden.^a

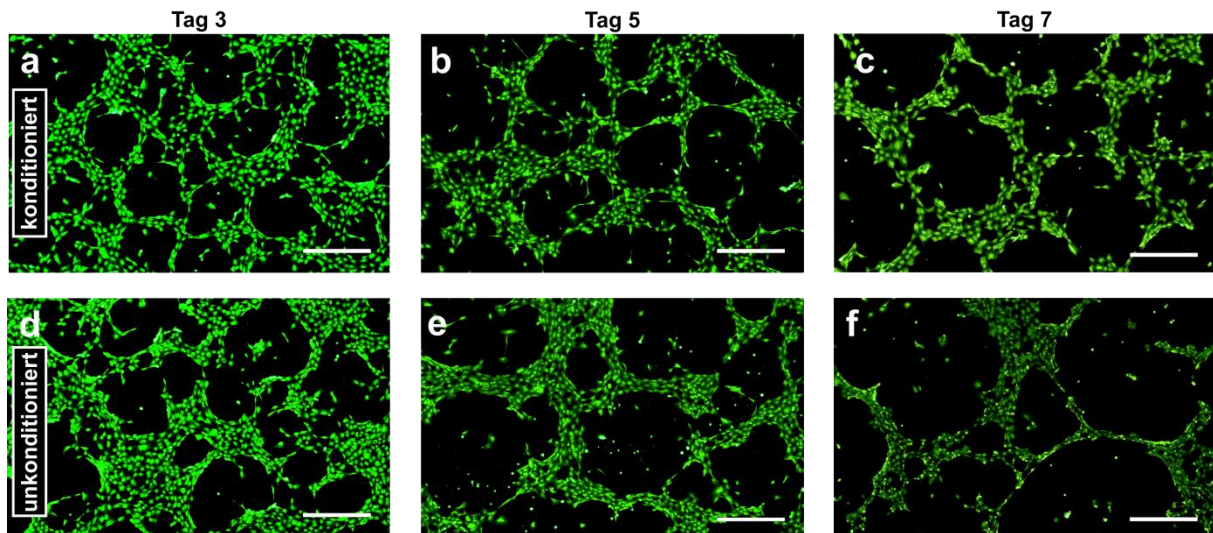


Abb. 4.3-4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 3, 5 und 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem (a-c) und unkonditioniertem α -MEM (d-f). Die Zellen wurden mittels Calcein-AM gefärbt, um die Vitalität der Zellen aufzuzeigen. Der Maßstab zeigt 500 μ m. Modifiziert publiziert in [164].

Im Gegensatz dazu wurde in Gegenwart der AD-hMSCs die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen sowohl in konditioniertem (Abb. 4.3-4 a-c) als auch unkonditioniertem (Abb. 4.3-4 d-f) Medium bereits nach drei Tagen induziert und die Strukturen waren nach 5 und 7 Tagen definierter.

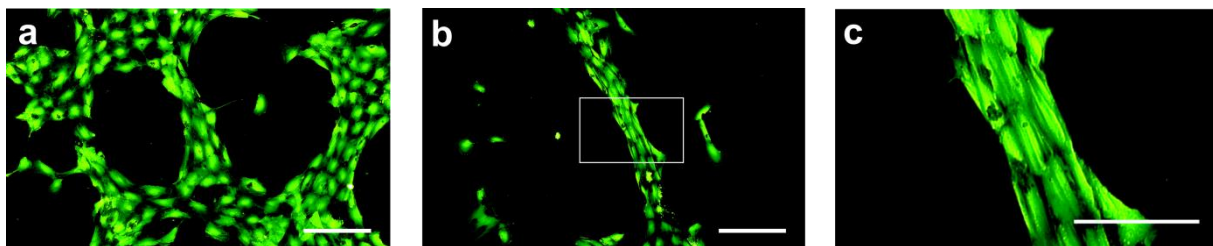


Abb. 4.3-5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem α -MEM. Die Zellen wurden mittels Calcein-AM gefärbt, um die Vitalität der Zellen aufzuzeigen. Der Maßstab zeigt 200 μ m (a, b) und 100 μ m (c).

Dabei waren nach 5-tägiger Kultivierung bereits definierte kapillarähnliche Strukturen zu beobachten (Abb. 4.3-5 a-c), die optisch eine Dreidimensionalität aufwiesen. Die Phasenkontrastaufnahmen verdeutlichen zudem, dass die Formation der Netzwerke durch die Bildung extrazellulärer Strukturen unterstützt wurde (Abb. 4.3-6). Diese blieben auch erhalten, als die HUVECs in diesen Bereichen bereits abgestorben waren.

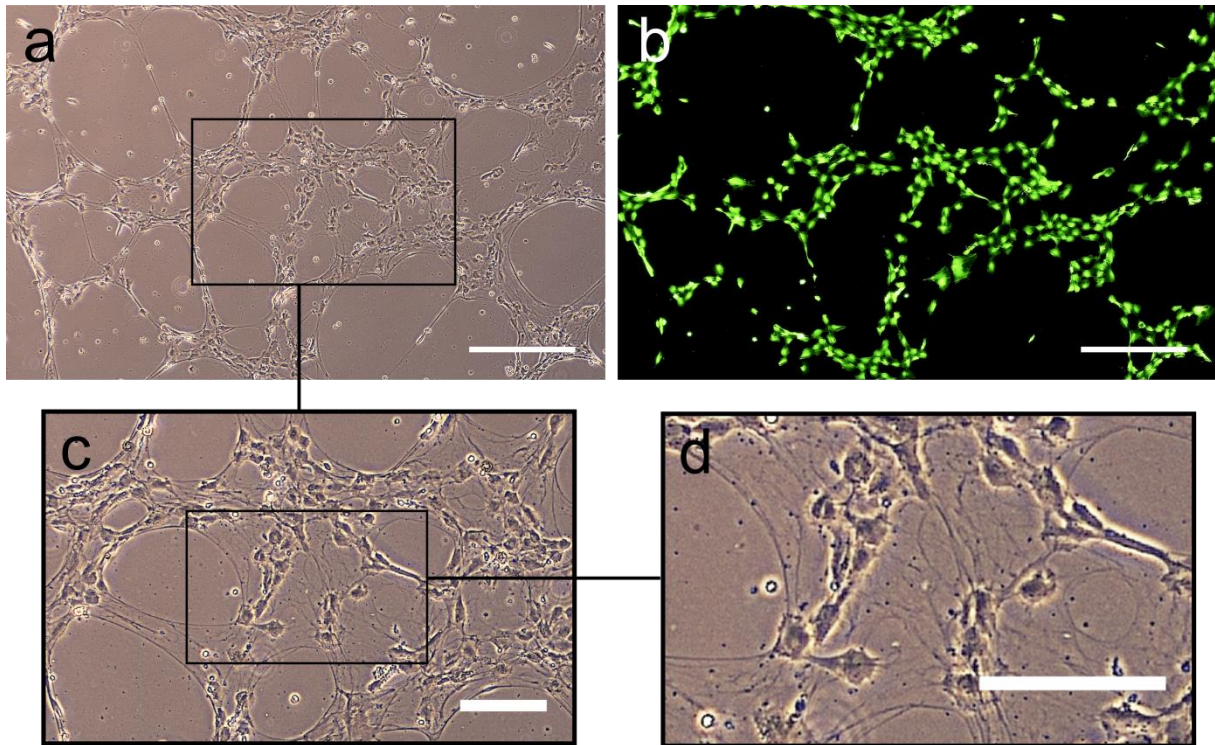


Abb. 4.3-6 Phasenkontrast (a-c)- und Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (b) der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium. Vor dem Aussiedeln der HUVECs wurde eine Vorkultur mit AD-hMSCs in den gleichen Zellkultuplatten für 4 Tage durchgeführt. Anschließend wurden die AD-hMSCs mittels Accutase abgelöst und die HUVECs für die indirekte Kokultur ausgesiedelt. Die Zellen wurden mittels Calcein-AM gefärbt, um die Vitalität der Zellen zu zeigen. Der Maßstab zeigt 500 μ (a, b) und 200 μ (c, d).

Da rein optisch nicht beurteilt werden konnte, wie stark induktiv der Effekt einer Kokultur mit konditioniertem Medium für die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen im Vergleich mit einer Kokultur in unkonditioniertem Medium ist, wurde eine quantitative Analyse der Strukturen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst mit Hilfe des Programms GraphicAnalyzer (am TCI durch Dr. Patrick Lindner entwickelt) und eines für diesen Versuch optimierten Algorithmus Maskenbilder aus den Netzwerkstrukturen erstellt (Abb. 4.3-7 b), mit denen anschließend die quantitative Analyse der gebildeten Strukturen unter Anwendung des Programms Angiotool® (Abb. 4.3-7 c) durchgeführt wurde.

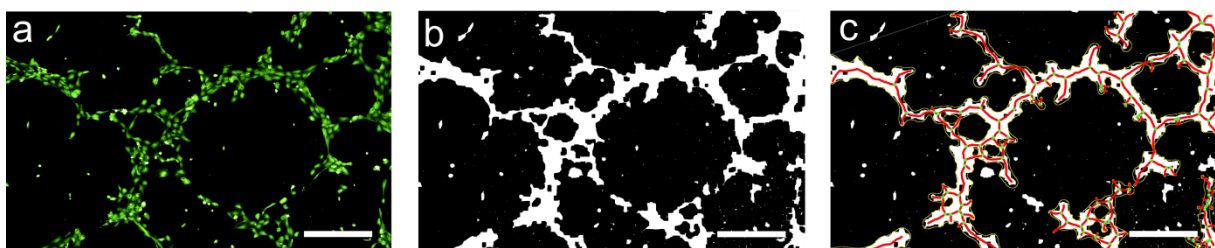


Abb. 4.3-7: Quantitative Analyse einer Fluoreszenzmikroskopaufnahme der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium. (b) zeigt das mittels GraphicAnalyzer erstellte Maskenbild der Fluoreszenzaufnahme (a) für die quantitative Analyse mit Hilfe von Angiotool® (c). Der Maßstab zeigt 500 μ m.

Die quantitative Analyse der Netzwerkstrukturen mit Angiotool® zeigte, dass die HUVECs, die in DH-konditioniertem Medium und unter Kokultur mit AD-hMSCs und Hypoxie über 7 Tage kultiviert wurden, im Vergleich zu HUVECs, die in unkonditioniertem Medium kultiviert wurden, eine signifikant größere Gefäßfläche ($31,87\% \pm 3,59\%$), eine höhere Gesamtzahl an Verbindungspunkten ($123,61 \pm 59,63$), eine höhere Gesamtgefäßlänge (in *arbitrary units*, AU) ($16590,69 \pm 5489,49$) und Gesamtzahl der Endpunkte ($93,94 \pm 24,10$) aufwiesen. In dem Ansatz mit unkonditioniertem Medium ergab sich eine Gefäßfläche von $26,62\% \pm 3,59\%$, eine Gesamtanzahl von Verbindungspunkten von $86,78 \pm 28,08$, eine Gesamtgefäßlänge von $12877,71 \pm 2875,27$ und Gesamtzahl der Endpunkte von $74,83 \pm 19,14$ (Abb. 4.3-8).

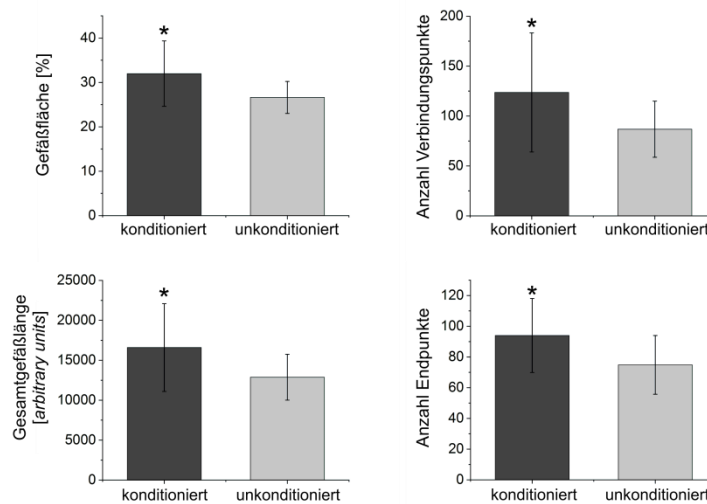


Abb. 4.3-8: Angiotool-Analyse der kapillarähnlichen Formation von HUVECs, kultiviert für 7 Tage in dynamisch-hypoxischem konditioniertem und unkonditioniertem Medium in indirekter Kokultur mit AD-hMSCs. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen von N = 2 in Dreifachbestimmung. * = $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied verglichen mit der Kokultur im unkonditioniertem Medium. Publiziert in [164].

Wie bereits beschrieben, moduliert eine multiple Anzahl angiogener Faktoren die Bildung und Reifung von Gefäßstrukturen *in vivo*. Dabei sind die richtige Konzentration und Komposition der unterschiedlichen Faktoren für jedes Stadium der Angiogenese essentiell, um die Formation von intakten und stabilen Gefäßen zu unterstützen [47]. Studien haben gezeigt, dass die Bildung eines vaskulären Netzwerks nicht allein durch die Freisetzung von VEGF-A ausgelöst werden kann, sondern auch durch die strukturstabilisierende Wirkung von Ang1 vermittelt wird [47, 224, 225]. Unter 2D-Bedingungen wurde in der hier vorliegenden Arbeit mit konditioniertem Medium und ohne Kokultivierung mit AD-hMSCs keine Bildung kapillarähnlicher Strukturen beobachtet, obwohl eine starke Sekretion von VEGF-A nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.2.3). Dies könnte zum einen auf ein vorhandenes,

jedoch niedriges Proteinlevel des destabilisierenden Ang2 zurückzuführen sein, und zum anderen durch das niedrige Level an Ang1 bedingt sein, das in mRNA-Analysen nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die zusätzliche Verwendung von AD-hMSCs in indirekter Kokultur und Kombination mit konditioniertem Medium große Vorteile für die Bildung von Kapillarnetzwerken durch Endothelzellen, wie HUVECs, bietet. Der parakrine Effekt von AD-hMSCs unterstützt die Bildung kapillarähnlicher Netzwerke im Verlauf der Kokultivierung durch Expression und Freisetzung eines umfassenden, zeitabhängigen und dem Prozess der Bildung kapillarähnlicher Strukturen angepassten Zusammenstellung angiogener Marker [224]. Dabei könnte auch die Regulation weiterer Faktoren in den AD-hMSCs, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, die röhrenartige Strukturbildung von Endothelzellen (vgl. Abb. 4.3-4) fördern. Dazu zählt der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β), der die Expression von Integrinen fördert [64] und damit eine stabilisierende Wirkung für tubuläre Strukturen durch Interaktion zwischen Endothelzellen und extrazellulärer Matrix induziert [58]. Andere für die angiogene Entwicklung wichtige Faktoren könnten der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (IGF-1) [170] oder Inhibitoren der Metalloproteasen (TIMPs) sein [65]. Darüber hinaus hemmen AD-hMSCs die vaskuläre Permeabilität durch Modulation der vaskulären endothelialen Cadherin/ β -Catenin-Signalisierung [226] und unterstützen dadurch zusätzlich die Barrierefunktion des Endothels. Zudem könnten auch die Sauerstoffkonzentration und Medienzusammensetzung die Bildung von röhrenförmigen Strukturen in der Kokultur beeinflussen [169]. Während in der indirekten Kokultur sowohl mit konditioniertem als auch unkonditioniertem α -MEM die Formation kapillarähnlicher Strukturen beobachtet wurde, zeigte trotz indirekter Kokultur mit AD-hMSCs die Anwendung von EGM-2 keinen Effekt auf die HUVECs. Das EGM-2 enthält gegenüber dem α -MEM bereits hohe Konzentrationen an Faktoren, die das optimale Wachstum und die Proliferation der Endothelzellen in der Zellkultur unterstützen sollen. Dadurch werden in den Zellen Signalwege aktiviert, die eine starke Proliferation unterstützen, während unter Anwendung von α -MEM, das ohne Konditionierung oder Kokultur mit AD-hMSCs keine Wachstumsfaktoren enthält eher ein Absterben der Zellen induziert wird (vgl. Abb. 4.3-3). Es wurde gezeigt, dass die Kombination von DH-konditioniertem Medium mit einer indirekten Kokultur von HUVECs und AD-hMSCs eine signifikant stärkere Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen ergab, als Ansätze mit unkonditioniertem Medium. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Formation von kapillar-ähnlichen Strukturen durch HUVECs in der

direkten und indirekten Kokultur mit AD-hMSCs in konditioniertem Medium auf 3D-PLLA/PLGA-Gerüststrukturen untersucht.

4.3.2 Kokultur von HUVECs und AD-hMSCs auf einer 3D-Gerüststruktur

Die 3D-Kulturen, die eine gewebeähnliche Organisation von Zellen mit heterogenen Bedingungen, wie Sauerstoff-Gradienten ermöglichen, können die *in vivo* Bedingungen von Zellen wesentlich besser widerspiegeln und erlauben dadurch eine Analyse von Zell-Zell-Interaktionen und deren Auswirkungen. Basierend auf den Ergebnissen des 2D-Zellkultursystems wurde die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen durch HUVECs in direkter oder indirekter Kokultur mit AD-hMSCs auf PLLA/PLGA- (Polymilchsäure/Poly lactid-co-Glycolid) Gerüsten unter hypoxischen (2,5 % O₂) und normoxischen (21 % O₂) Kultivierungsbedingungen in Kombination mit dem unter dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen konditionierten α -MEM-Medium (vgl. Kapitel 4.3.1) über eine Kultivierungsdauer von 7 Tagen untersucht. Die PLLA/PLGA-Gerüststrukturen wurden von der Arbeitsgruppe Levenberg *et al.* zur Verfügung gestellt. Um eine Adhäsion der HUVECs und AD-hMSCs an der PLLA/PLGA-Gerüststruktur zu gewährleisten, wurden die Zellen in einer Fibrinogenlösung resuspendiert und nach direkter Zugabe von Thrombin zu der Fibrinogen-Zell-Lösung auf die Gerüststruktur gegeben. Das durch die Thrombin-induzierte Quervernetzung von Fibrinogen entstehende Fibrin umschließt die porösen Strukturen des PLLA-PLGA-Gerüsts und unterstützt die Adhäsion der Zellen an diese. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, ist Fibrin ein natürlich vorkommendes und biologisch abbaubares Substrat und unterstützt im Organismus als physiologische Gerüststruktur die Prozesse der Angiogenese [105, 107]. Ein weiterer Vorteil für die Nutzung dieses Substrates in der Entwicklung einer bioartificialen Gefäßprothese besteht in der leichten Isolation von Fibrinogen und Thrombin, den Vorläufern für die Bildung von Fibringelen, aus dem Blut eines Patienten, sodass durch die Verwendung von patienteneigenem Material zur Beschichtung der Gerüststrukturen das potentielle Risiko einer Fremdkörperreaktion verhindert werden kann [101, 106].

PLLA/PLGA-Gerüste, die nur mit HUVECs besiedelt waren, wurden in einem *Transwell*-System zusammen mit $5 \cdot 10^4$ AD-hMSCs im Kokultureinsatz kultiviert, was einer indirekten Kokultur der Zellen entsprach. Für die direkte Kokultur wurden die HUVECs und AD-hMSCs in einem Verhältnis von 5:1 ($2,5 \cdot 10^5$ HUVECs; $5 \cdot 10^4$ AD-hMSCs) auf dem PLLA/PLGA-Gerüst kultiviert. Die Zellen wurden für einen Tag mit einer Kombination aus

EGM-2 und α -MEM (1:1) kultiviert, um für beide Zellarten ein optimales Anwachsen auf den Strukturen zu garantieren. Für weitere 7 Tage wurden die Zellen mit unkonditioniertem α -MEM (10 % HS und 0,5 % Gentamycin) unter normoxischen Bedingungen kultiviert. In Abb. 4.3-9 sind die Calcein-AM gefärbten Zellen nach 7 Tagen direkter und indirekter Kokultur der AD-hMSCs und HUVECs auf den PLLA/PLGA-Gerüsten dargestellt. Während die direkte Kokultur von HUVECs und AD-hMSCs (Verhältnis 5:1) zu einem vollständigen Überwachsen der PLLA/PLGA-Gerüststrukturen mit AD-hMSCs, ohne die Ausbildung definierter kapillar-ähnlicher Strukturen, führte (Abb. 4.3-9 b,b.1), konnte in der indirekten Kokultur der Zellen die Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen durch HUVECs in dem Gerüst beobachtet werden (Abb. 4.3-9 a, a.1-a.3).

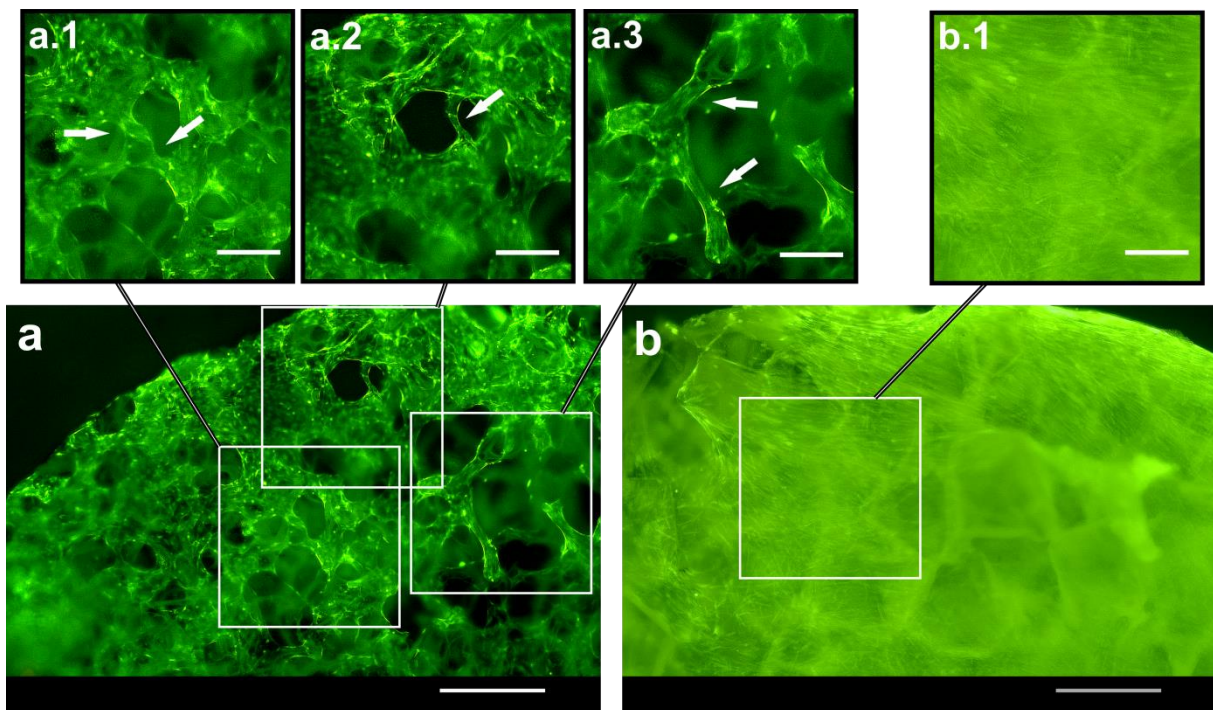


Abb. 4.3-9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs (a, a.1-a.3), sowie von HUVECs und AD-hMSCs nach 7 Tagen direkter Kokultur (b, b.1) unter normoxischen Bedingungen mit unkonditioniertem α -MEM auf PLLA/PLGA-Gerüsten. Die Zellen wurden mittels Calcein-AM gefärbt, um die Vitalität der Zellen zu zeigen. Der Maßstab zeigt 500 μ m (a, b) und 200 μ m (a.1 - a.3, b.1).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die HUVECs und AD-hMSCs in einer direkten und indirekten Kokultur über eine Dauer von 7 Tagen unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen und unter Verwendung von konditioniertem Medium (DH Kultivierung von AD-hMSCs über 14 Tage) kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen am Ende der Kultivierung fixiert und die Aktinfilamente der Zellen mittels Phalloidin gefärbt. Wie in Abb. 4.3-10 dargestellt, wurde in Übereinstimmung mit dem vorangegangenen Versuch, in der direkten Kokultur von HUVECs und AD-hMSCs, lediglich ein Überwachsen der PLLA/PLGA-

Gerüststruktur durch die Zellen beobachtet, während sich in der indirekten Kokultur eindeutig kapillarähnliche Strukturen ausbildeten (siehe Pfeile in Abb. 4.3-9). Die Kultivierung der Zellen unter normoxischen (Abb. 4.3-10 d-f) bzw. hypoxischen (Abb. 4.3-10 a-c) Bedingungen schien dabei keinen optisch sichtbaren Einfluss auf die Bildung der kapillarähnlichen Strukturen zu haben.

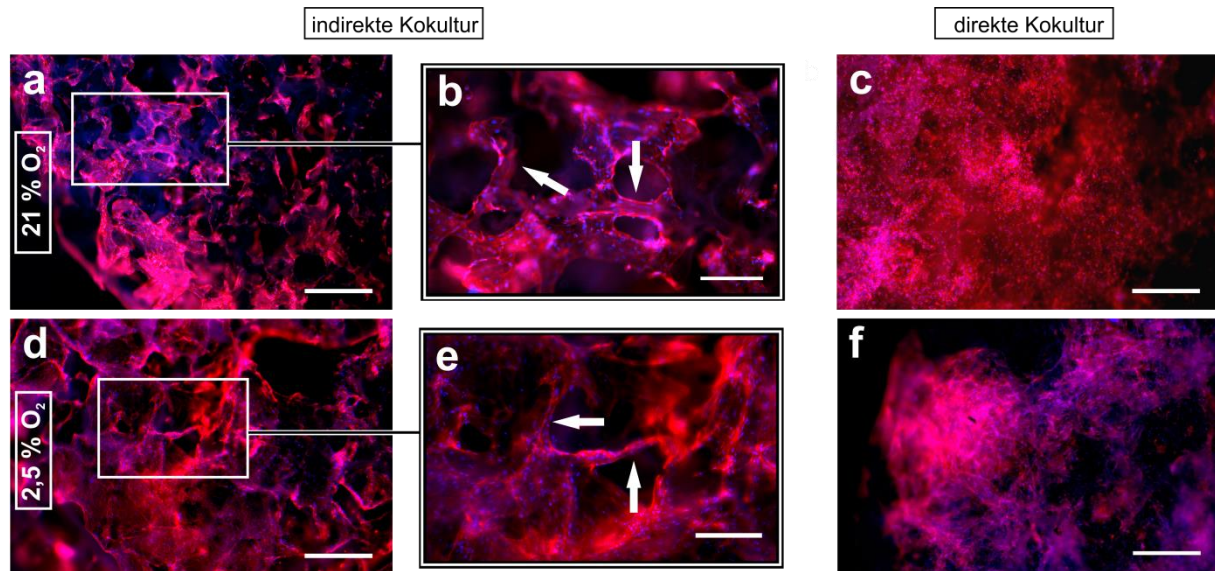


Abb. 4.3-10 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs (a, b, d, e) sowie von HUVECs und AD-hMSCs nach 7 Tagen direkter Kokultur (c, f) unter normoxischen (obere Reihe) und hypoxischen (untere Reihe) Bedingungen mit konditioniertem α -MEM auf PLLA/PLGA-Gerüsten. Die Zellen wurden mittels Phalloidin (rot) und Hoechst (blau) gefärbt, um die Aktinfilamente und Zellkerne sichtbar zu machen. Die Pfeile zeigen kapillarähnliche Strukturen an. Der Maßstab zeigt 500 μ m (a, c, d, f) und 200 μ m (b, e). Modifiziert publiziert in [164].

Wie bereits in dem 2D-Versuchsansatz beobachtet (Kapitel 4.3.1), konnte auch in 3D gezeigt werden, dass die Bildung kapillarähnlicher Strukturen nur in der indirekten Kokultur, in der AD-hMSCs und HUVECs räumlich voneinander getrennt kultiviert wurden aber das gleiche Medium teilten, zu beobachten war. Davies *et al.* und Conway *et al.* zeigten, dass Endothelzellen sich ohne die direkte Interaktion mit hMSCs zu kapillar-ähnlichen Strukturen organisieren, wenn diese von einer EZM umgeben und angiogenen Faktoren ausgesetzt sind [59, 227]. Andere Studien haben gezeigt, dass in der direkten Kokultur von HUVECs und hMSCs eine Bildung röhrenförmiger Strukturen beobachtet werden konnte [228, 229], in der hMSCs aufgrund ihrer parakrinen Eigenschaften die Bildung von Gefäßstrukturen fördern und die Stabilisierung unterstützen [228]. Um die Regression der neu gebildeten Strukturen zu verhindern, müssen die Endothelzellen mit hMSCs interagieren, die auch als Perizyten fungieren und die Reifung, Stabilisierung und Permeabilität der neuen Gefäße durch Zell-Zell-Kontakte unterstützen [226, 230-232]. Ein Grund für das Überwachsen der Gerüststruktur in der direkten Kokultur in der vorliegenden Arbeit könnte das in den

Experimenten verwendete HUVECs/AD-hMSCs-Zellenverhältnis von 5:1 sein. Die stärkste Bildung von tubulären Strukturen in Fibrin/Kollagen-Matrices konnte von Rao *et al.* bei einem 3:2 Verhältnis von HUVECs und hMSCs nachgewiesen werden [163]. Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Bildung der kapillarähnlichen Strukturen haben könnten, sind die mechanischen Eigenschaften der Gerüststruktur. Studien zeigten, dass der Grad der Formation tubulärer Strukturen von den Eigenschaften der umliegenden Matrix abhängig ist und dass sich mit zunehmender Steifigkeit die Bildung der kapillar-ähnlichen Strukturen verringert [163, 233, 234].

4.3.3 Schlussfolgerung

Es wurde gezeigt, dass die alleinige Kultivierung von HUVECs in Zellkulturmedium, das unter dynamisch-hypoxischen Kultivierungsbedingungen von AD-hMSCs konditioniert wurde, keine Bildung kapillar-ähnlicher Strukturen induziert. In der indirekten Kokultur mit AD-hMSCs wurde jedoch *in vitro* eine signifikant erhöhte Formation kapillar-ähnlicher Strukturen gegenüber der indirekten Kokultur in unkonditioniertem Medium nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind wichtig für die Entwicklung *in vitro* vaskularisierter Konstrukte für die künstliche Gewebezüchtung und unterstützen aktuelle Forschungsansätze für die kombinierte Verwendung von Kokulturen in Kombination mit natürlich konditioniertem Medium. Der Vorteil einer Kokultivierung von Zellen zur Unterstützung der Formation vaskulärer Strukturen gegenüber der definierten Applikation spezifischer angiogener Faktoren ist die Produktion und Freisetzung in physiologischen Mengen und die Expression einer passenden Komposition von angiogenen Markern über den gesamten zeitlichen Verlauf der Gefäßbildung und -reifung. Für die Übertragung der hier optimierten Kultivierungsstrategie auf die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese ist der erste Schritt bezüglich der *in vitro* Etablierung und Integration von vaskulären Strukturen erfolgt. Jedoch muss für eine erfolgreiche Reifung und Stabilisierung der Strukturen die direkte Kokultur beider Zellarten weiter optimiert werden, um die erfolgreiche Vaskularisierung und Ausbildung von funktionellen *Vasa Vasorum* zu induzieren.

4.4 Etablierung einer dynamischen Kultivierung von HUVECs

In dem vorherigen Kapitel wurde die Wirkung einer Kokultur aus Endothelzellen und Stammzellen auf die Bildung von kleinsten kapillarähnlichen Strukturen untersucht. Diese sind essentiell für eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung von Zellen in komplexen Gewebestrukturen und somit ein wichtiger Parameter bei der Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. Ein weiterer Parameter, der für die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese mit einem Durchmesser von 0,6 bis 0,9 cm essentiell ist, ist die Auskleidung der dem Blutfluss zugerichteten Seite der Prothese mit einer konfluenten Schicht aus Endothelzellen, dem sogenannten Endothel. Endothelzellen, die die innere Zellschicht aller vaskulären Strukturen im Organismus bilden, sind *in vivo* aufgrund des kontinuierlichen, pulsatilen Blutstroms physikalischen und biochemischen Prozessen ausgesetzt. Diese hämodynamischen Kräfte, die stetig auf die Endothelzellen wirken, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Barrierefunktion und damit einhergehend auf die Zellmorphologie, die Zellausrichtung, die Zell-Zell-Verbindungen und die Endothelpermeabilität und regulieren somit die Funktion des Endothels [235]. Für die Etablierung einer funktionsfähigen Endothelzellschicht, innerhalb der bioartifiziellen Gefäßprothese, wird in diesem Kapitel zunächst der Einfluss einer dynamischen Kultivierung auf Endothelzellen in einer Durchflussskammer untersucht, in der die HUVECs als Einzelschicht auf einer Zellkulturoberfläche adhären. Da Endothelzellen die Blutgefäße in einer Einzelschicht von innen auskleiden, entspricht diese Versuchsdurchführung als vereinfachtes Modell den *in vivo* Bedingungen und ermöglicht gleichzeitig eine *in situ* Analyse der HUVECs in Echtzeit. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wird ein definierter, laminarer Volumenstrom über die Zellen geleitet und die Auswirkung der daraus resultierenden Scherspannung auf die Endothelzellmorphologie, die Zell-Zell-Kontakte und die Barrierefunktion des Endothels untersucht. Für alle in diesem Kapitel durchgeführten Versuche wurden ausschließlich HUVECs von Passage 2 bis Passage 5 verwendet.

4.4.1 Ermittlung der dynamischen Viskosität des Kulturmediums

Die Viskosität ist definiert als der Widerstand einer Flüssigkeit gegenüber einer Scherbelastung. Die dynamische Viskosität des Kulturmediums hat einen entscheidenden Einfluss auf die Scherspannung, die bei definierten Volumenströmen auf die Endothelzellen wirkt. Eine definierte Scherspannung ist die Grundlage für eine optimale Konditionierung von Endothelzellen unter dynamischen Kultivierungsbedingungen *in vitro*. Für die Bestimmung der Viskosität des Endothelzellmediums EGM-2 mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 0,5 % Gentamycin, das in den folgenden Versuchen für die Kultivierung der HUVECs unter laminarer Strömung verwendet wurde, wurde ein Scherrheometer verwendet. Das Prinzip der Viskositätsbestimmung basiert auf einem Aufbau, bei dem das Medium zwischen zwei Platten geschert wird, wobei die obere Platte, auch als Scherkopf definiert, mit einer definierten Geschwindigkeit rotiert, während die untere Platte fest steht. Für die Viskositätsbestimmung des EGM-2 wurde ein Messkopf mit einem Durchmesser von 39,98 mm verwendet, der Messspalt wurde auf 0,4 mm festgelegt und ein Medienvolumen von 0,535 ml verwendet. Da die Viskosität einer Flüssigkeit stark von der Temperatur abhängig ist, wurde eine Messtemperatur von 37°C verwendet, welche der Kultivierungstemperatur der Zellen im Brutschrank entspricht. Die Bestimmung der Medienviskosität erfolgte bei Scherraten von 10 - 2000 1/s bzw. 10 - 3000 1/s. Unter Anwendung dieser Parameter wurde im Scherrheometer das Drehmoment bestimmt, welches aufgebracht werden muss, um die Geschwindigkeit des Scherkopfes aufrecht zu erhalten. Die Berechnung der dynamischen Viskosität aus diesen Werten wurde durch die Software durchgeführt.

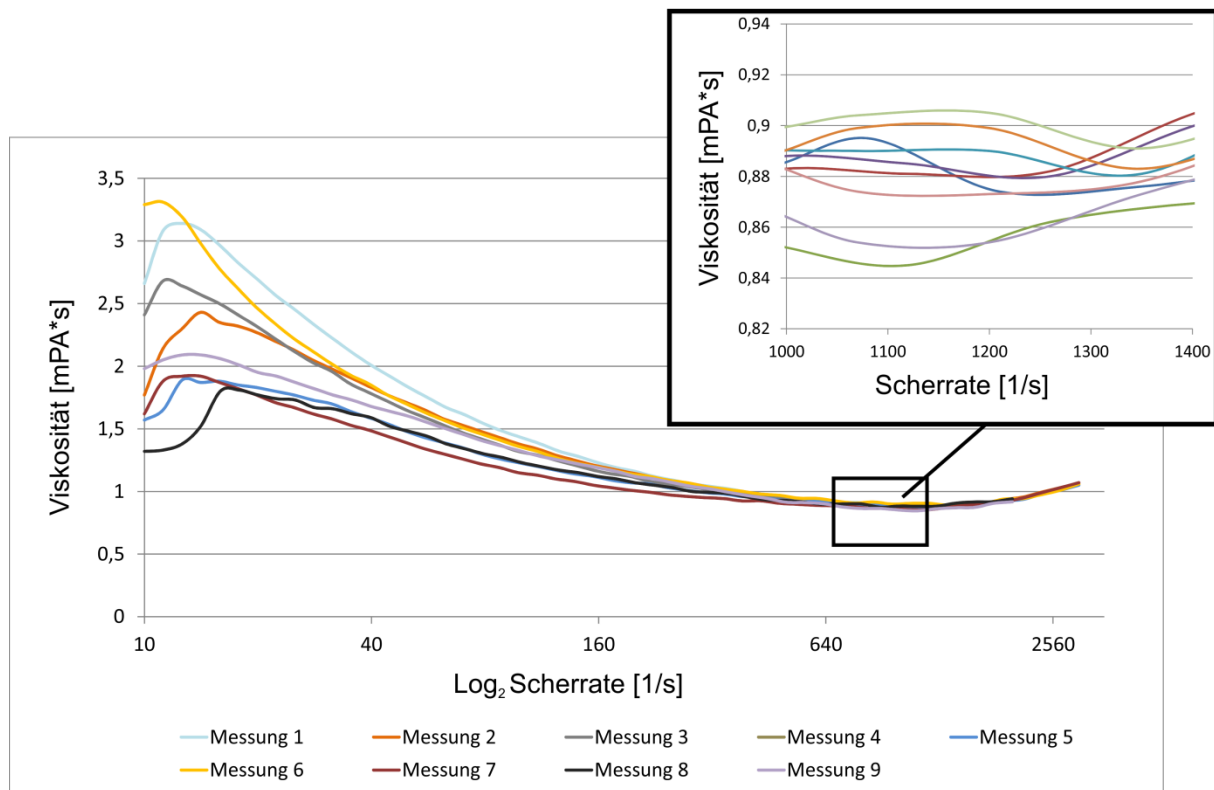


Abb. 4.4-1: Scherratenabhängige Viskosität [mPA*s] von EGM-2 Medium. Die dynamische Viskosität von EGM-2 Medium mit 10 % fetalem Kälberserum und 0,5 % Gentamycin wurde mittels Scherrheometer bei Scherraten zwischen 10 - 2000 1/s und 10 - 3000 1/s sowie einer Messtemperatur von 37°C ermittelt.

In Abb. 4.4-1 ist die dynamische Viskosität des EGM-2 Mediums mit 10 % FKS und 0,5 % Gentamycin aus neun Messungen und in Abhängigkeit von der Scherrate dargestellt. Die Viskosität des Mediums zeigte bis zu einer Scherrate von 1000 1/s ein scherverdünnendes Verhalten, d.h. eine Abhängigkeit von der Scherrate. Mit zunehmender Scherrate wurde eine Abnahme der Medienviskosität detektiert. Ab einer Scherrate von 1400 1/s war jedoch wieder eine Zunahme der Viskosität zu beobachten. Aufgrund der hohen Scherrate wurde die Medienprobe unter dem Messkopf stark nach außen gedrückt, sodass sich ein zunehmend turbulentes Verhalten des Mediums entwickelte und sich die Menge des Mediumvolumens unter dem Messkopf veränderte. Bei Scherraten im Bereich von 1000 1/s - 1400 1/s blieben die Viskositätswerte konstant. Aus diesem Grund wurden für die genaue Bestimmung der dynamischen Viskosität des EGM-2 Mediums die in diesem Scherraten-Bereich ermittelten Viskositätswerte gemittelt und es ergab sich eine Viskosität von $0,88 \pm 0,015$ mPA*s. Diese lag um 0,16 mPA*s höher als die vom Hersteller der Durchflusskammern angegebene Viskosität von ungefähr 0,72 mPA*s. Die in diesem Kapitel ermittelte dynamische Viskosität (0,88 mPA*s) wurde für die Berechnung der definierten Scherspannung in der dynamische Kultivierung der HUVECs verwendet.

4.4.2 Optimierung der Oberflächenbeschichtung und der Besiedlungszellzahl

Es ist bekannt, dass die Art der adsorbierten Oberflächenproteine die Zellausbreitungsdynamik beeinflusst. Als eine Alternative zu Kollagen-Gerüststrukturen haben einige Arbeitsgruppen die Verwendung von Fibrin für die Entwicklung von Gefäßtransplantaten untersucht [236]. Bereits Zilla *et al.* zeigten, dass Fibrin ein geeignetes Material für die Beschichtung einer PTFE-Prothese ist und die Bildung einer Endothelzellschicht ermöglicht, die gegen Scherstress resistent ist [237]. Da für die spätere Entwicklung der bioartifiziellen Gefäßprothese die Adhäsion der Zellen auf der künstlichen Gerüststruktur durch die Beschichtung dieser mit Patienten-eigenem Fibrin optimiert werden soll, wurde zunächst die Beschichtung der Durchflusskammern mit Fibrinogen und Thrombin zur Ausbildung eines Fibringels ausgetestet.

Die Beschichtung erfolgte in unbehandelten Durchflusskammern (μ -slide $I^{0.4}$ Luer und μ -slide $I^{0.8}$ Luer) mit einer Kanalhöhe von 0,8 mm und 0,4 mm, die eine hydrophobe, zellabstoßende Oberfläche aufweisen. Erst nach spezifischer Beschichtung der Kanäle können die Zellen auf der Oberfläche adhären. Um das Auspolymerisieren und die Bildung des Fibringels in den Durchflusskammern besser beurteilen zu können, wurde der Versuch parallel auf einem Glasobjektträger und in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Nach 45 min Inkubation mit der Fibrinogenlösung (10 mg/ml) und anschließender 15 min Inkubation mit Thrombin (2,5 U/ml) konnte auf dem Glasobjektträger und in dem Reaktionsgefäß die Bildung eines Fibringels beobachtet werden. Daher wurden die Durchflusskammern mit Zellkulturmedium gespült, um zu analysieren, ob die Kanäle durch die Bildung des Fibringels verschlossen wurden. Die Durchflusskammern mit einer Kanalhöhe von 0,8 mm konnten auch nach der Beschichtung noch mit Medium durchspült werden, während die Kammern mit einer Kanalhöhe von 0,4 mm komplett verschlossen waren. Bei der Überprüfung der Durchlässigkeit der Fibrin-beschichteten Kanäle fiel auf, dass der Kanal mit einer Höhe von 0,8 mm, der normalerweise ein Kanalvolumen von 200 μ l aufweist, nur noch ein Volumen von ungefähr 100 μ l fassen konnte. Dies war ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass sich in den Kanälen ein Fibringel ausgebildet hat. Diese Durchflusskammern wurden anschließend genutzt, um die Adhärenz der HUVECs auf dem Fibringel mit der Adhärenz der Zellen in Durchflusskammern (0,4 mm Kanalhöhe) zu vergleichen, die bereits vom Hersteller für die Kultivierung von Zellen optimiert worden sind (*ibitreat*). Hierfür wurden die Durchflusskammern mit je 100 μ l einer Zellsuspension aus $1 \cdot 10^5$ HUVECs gefüllt. Nach

einer Inkubationsdauer von 2,5 h (*ibitreat*-Beschichtung) bzw. 2,75 h (Fibrinbeschichtung) wurde die Adhärenz der Zellen am Phasenkontrastmikroskop beurteilt.

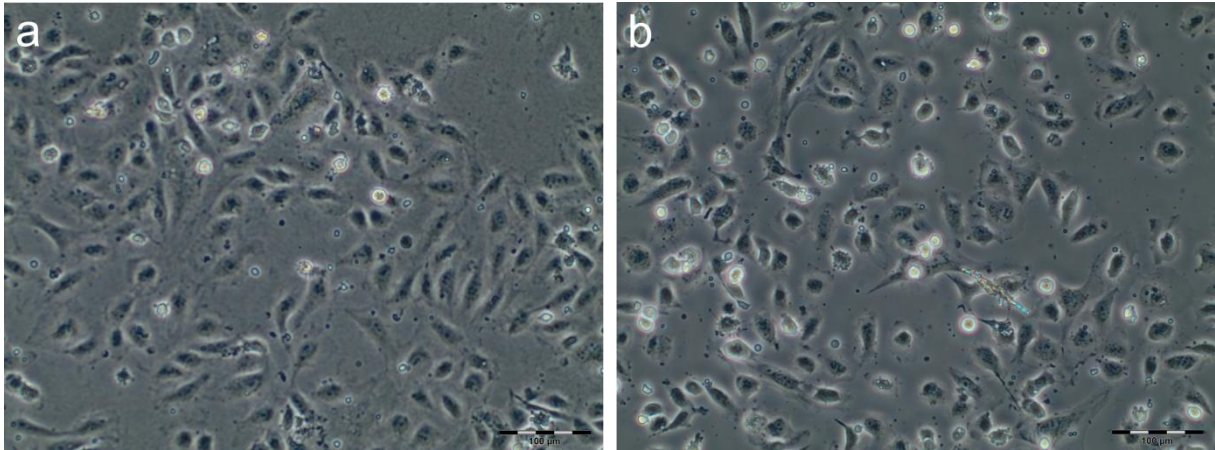


Abb. 4.4-2: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs in Durchflusskammern auf einer Fibrinbeschichtung nach 2,75 h (a) und *ibitreat*-Beschichtung nach 2,5 h Inkubationsdauer (b). Der Maßstab zeigt 100 µm.

Wie in Abb. 4.4-2 zu erkennen ist, hat die Beschichtung der unbehandelten Durchflusskammern mit Fibrin die Adhäsion der HUVECs in diesen Durchflusskammern ermöglicht. Ein Vergleich der Adhäsion der HUVECs auf der Fibrin-beschichteten mit der *ibitreat* Oberfläche zeigte, dass die HUVECs auf beiden Oberflächen adhärirt waren. Jedoch bestätigt die optische Beurteilung eine stärkere Adhäsion der HUVECs an die Fibrin-beschichtete Oberfläche der Durchflusskammern. Um zu überprüfen, wie sich die HUVECs unter dynamischen Kultivierungsbedingungen auf der Fibrin-beschichteten Oberfläche verhalten, wurden die Zellen in dem in Abb. 4.4-3 dargestellten System unter laminarer Strömung kultiviert.

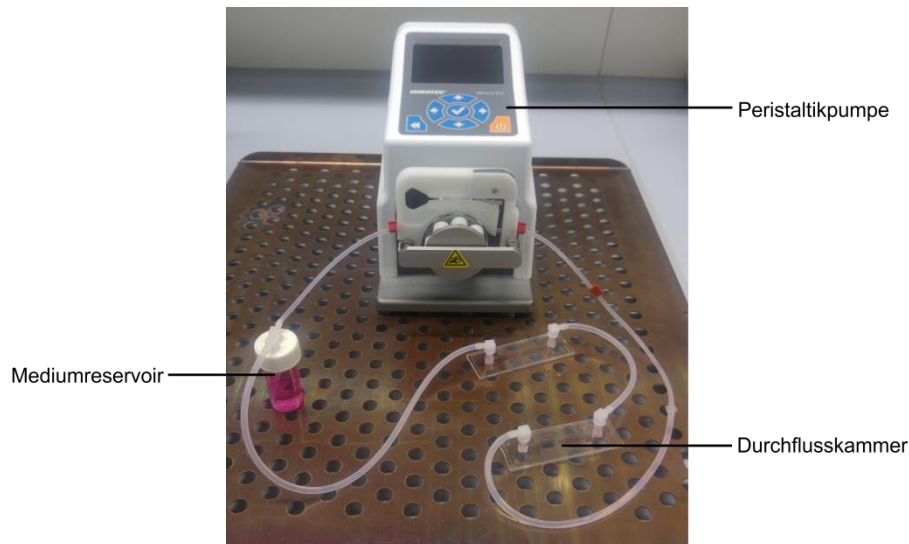


Abb. 4.4-3: Reaktor-System für die dynamische Kultivierung von HUVECs in Durchflusskammern. Ein definierter Volumenstrom wird mittels Peristaltikpumpe erzeugt.

Für die Erzeugung eines definierten Volumenstroms wurde eine Peristaltikpumpe verwendet. Da sich das Kanalvolumen von 200 μl in der Durchflusskammer mit 0,8 mm Kanalhöhe aufgrund der Fibrinbeschichtung halbiert hat, wurde die Peristaltikpumpe unter Verwendung einer 0,4 mm Durchflusskammer mit einem Kanalvolumen von 100 μl auf einen definierten Volumenstrom von 3 ml/min kalibriert. Mit Hilfe der Peristaltikpumpe wurde das Medium über ein Schlauchsystem aus dem Medienreservoir durch den Kanal der Durchflusskammer gepumpt und erzeugte dadurch einen definierten Scherstress (Scherspannung) auf die HUVECs. Es wurden $1,3 \cdot 10^5$ HUVECs in der Durchflusskammer (0,8 mm) ausgesiedelt. Nach einer statischen Inkubationsdauer der HUVECs von 3 h wurde die dynamische Kultivierung der Zellen im Inkubator mit einem Volumenstrom von 3 ml/min gestartet. Nach 3 Tagen unter dynamischer Kultivierung lösten sich die Zellen nach und nach von der Oberfläche ab (Abb. 4.4-4).

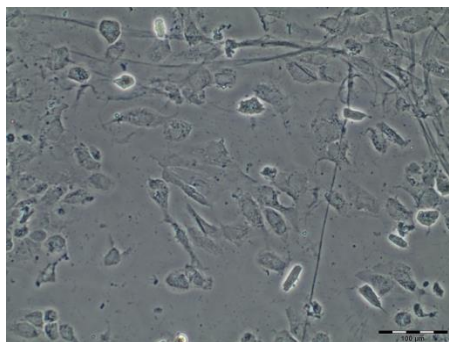


Abb. 4.4-4: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 3 Tagen dynamischer Kultivierung (3 ml/min) in einer Fibrin-beschichteten Durchflusskammer. Der Maßstab zeigt 100 μm .

Dieses Verhalten war ebenfalls bei einer Kultivierung der HUVECs in den *ibitreat*-Durchfluskkammern zu beobachten. Zum einen könnte durch die dynamische Kultivierung ein Teil des Fibringels weggespült worden sein, zum anderen könnte der Sauerstoffgehalt in dem geschlossenen System so stark gesunken sein, dass sich dies negativ auf die Vitalität der Zellen auswirkte. Ein weiteres Problem war die Entstehung von Luftblasen im System, die in den Durchfluskkammern einen verstärkten Scherstress auf die Zellen ausübten und diese wegspülten.

Durch die Beschichtung der Durchfluskkammern mit Fibrinogen und Thrombin wurde die Bildung eines Fibringels induziert. Jedoch ließ sich in den Durchfluskkammern weder die genaue Dicke des Gels bestimmen, noch konnte eine gleichmäßige Beschichtung, bezogen auf die Höhe des gebildeten Gels in der kompletten Länge des Kanals, garantiert werden. Beide Faktoren verhinderten die Durchführung einer dynamischen Kultivierung von HUVECs unter definiertem Scherstress. Aus diesen Versuchen ließ sich somit zum einen schlussfolgern, dass die Durchfluskkammern nicht für die Beschichtung mit Fibrin geeignet waren, wenn eine dynamische Kultivierung der Zellen unter definierten Bedingungen durchgeführt werden sollte. Zum anderen musste der Versuchsaufbau für die dynamische Kultivierung weiter optimiert werden, um die Blasenbildung und das Ablösen der Zellen zu verhindern. Die *in vitro* Bildung des Fibringels wird durch eine Reaktion von Thrombin und Fibrinogen vermittelt. Fibrinogen ist ein Proteinkomplex der aus 6 Untereinheiten besteht. Durch die enzymatische Reaktion des Enzyms Thrombin werden aus dem Hexamer Fibrinmonomere freigesetzt, die anschließend spontan zu einem Fibringel auspolymerisieren. Daraus lässt sich ableiten, dass die einzelnen Untereinheiten des Fibrinogens der Angriffspunkt für Zelloberflächenproteine sind, die eine Adhäsion der Zellen auf dem Fibringel vermitteln. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Versuchsansatz unbeschichtete Durchfluskkammern (0,4 mm Kanalhöhe) mit verschiedenen Konzentrationen einer Fibrinogenlösung (75 µg/ml; 100 µg/ml und 250 µg/ml in 0,15 M NaCl-Lösung) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Zellkulturmedium gespült, bevor diese mit je $1,3 \cdot 10^5$ HUVECs besiedelt wurden.

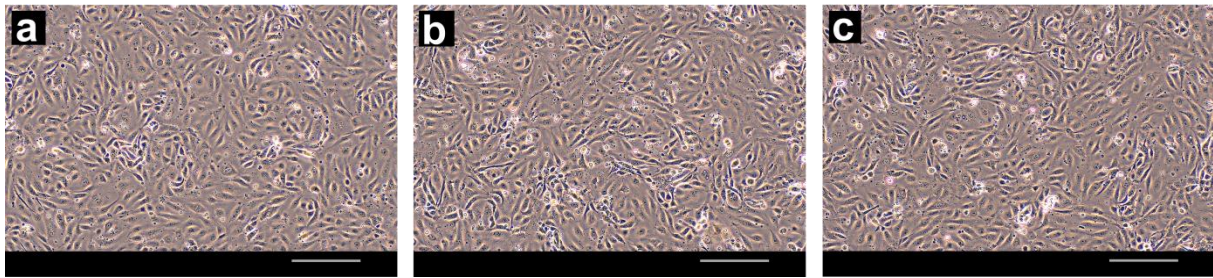


Abb. 4.4-5: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 24 h Inkubationsdauer in Durchflusskammern, die zuvor mit Fibrinogenlösungen mit Konzentrationen von 1,5 µg/ml (a); 2 µg/ml (b) und 5 µg/ml (c) für 1 h beschichtet wurden. Der Maßstab zeigt 200 µm.

Wie in Abb. 4.4-5. dargestellt, hat sich nach 24 h Inkubationsdauer in allen Durchflusskammern eine konfluente Zellschicht gebildet und es waren keine Unterschiede in der Adhärenz der Zellen zwischen den mit unterschiedlichen Fibrinogenkonzentrationen beschichteten Durchflusskammern zu erkennen. Da der Hersteller der Durchflusskammern für die in späteren Versuchen verwendeten ECIS-Durchflusskammern eine Proteinkonzentration von 200 µg/ml empfiehlt, wurde diese Konzentration bereits für die in diesem Kapitel durchgeführten Versuche verwendet.

Für eine dynamische Kultivierung von HUVECs in den Durchflusskammern (0,4 mm μ -slide $I^{0.4}$ Luer) musste zudem die Besiedlungszellzahl der Kanäle so optimiert werden, dass die Zellen nach 2 - 3 h Adhäsionsdauer eine optisch konfluente Zellschicht bildeten. Dies ist notwendig, damit die Zellen in der anschließenden dynamischen Kultivierung nicht durch den indizierten Flüssigkeitsstrom von der Oberfläche abgelöst werden. Eine konfluente Zellschicht, in der die Zellen bereits leichte Zell-Zell-Verbindungen aufgebaut haben, ist wesentlich resistenter gegenüber dem durch die dynamische Kultivierung induzierten Scherstress. Die Bestimmung der optimalen Zellzahl erfolgte in den Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern (0,4 mm Kanalhöhe). Laut Herstellerangaben sollen die Durchflusskammern mit einer Zellzahl von $1,2 - 2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml, abhängig von der Zellart, besiedelt werden. Zur Bestimmung der optimalen Besiedlungszelldichte wurden die Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern mit je 100 µl Zellsuspension mit $1,1 \cdot 10^5$, $1,3 \cdot 10^5$ und $1,5 \cdot 10^5$ HUVECs in EGM-2 Medium besiedelt.

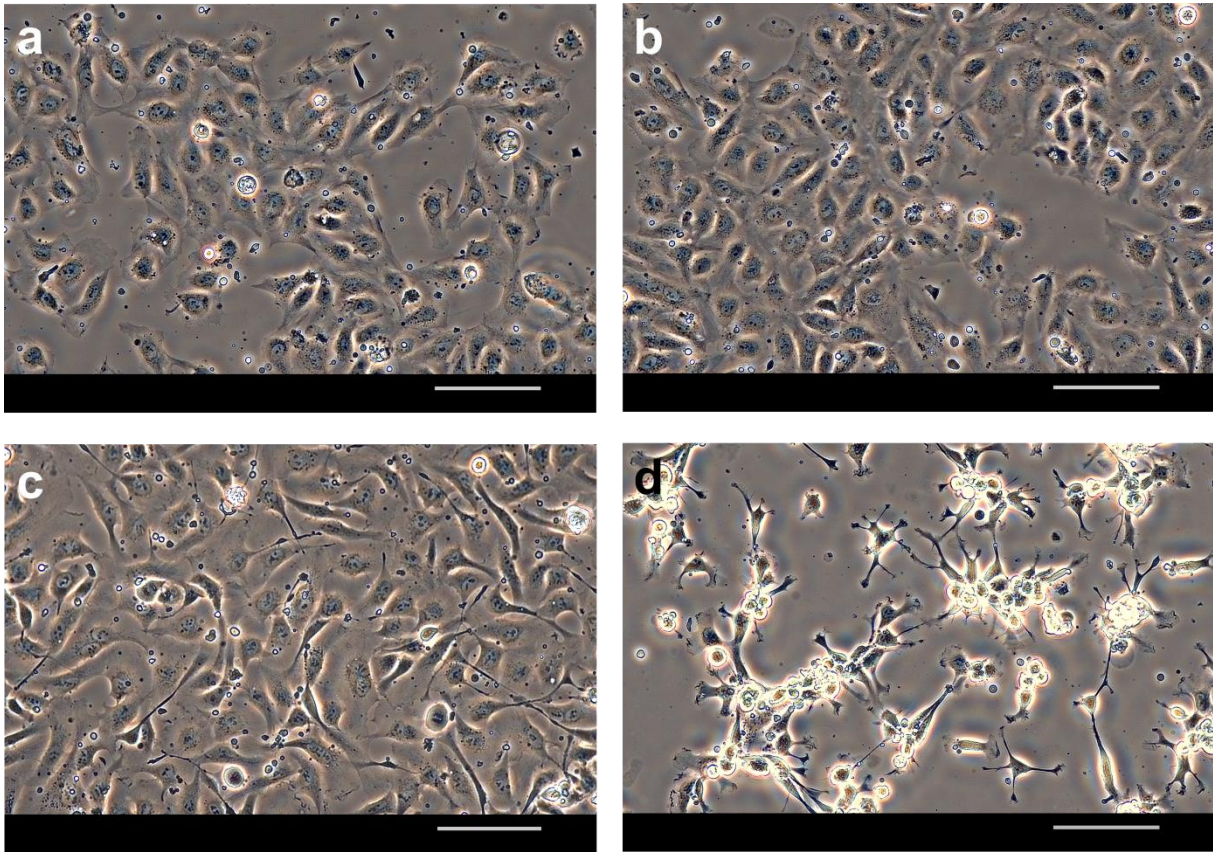


Abb. 4.4-6: Phasenkontrastaufnahmen nach 2,5 h Inkubationsdauer mit $1,1 \cdot 10^6$ (a); $1,3 \cdot 10^6$ (b) und $1,5 \cdot 10^6$ (c) HUVECs/ml in Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern sowie $1,5 \cdot 10^6$ HUVECs/ml in einer unbeschichteten Durchflusskammer (d). Der Maßstab zeigt 100 μm .

In Abb. 4.4-6 a-c sind die Phasenkontrastaufnahmen der unterschiedlichen Besiedlungszellichten in den Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern nach 2,5 h Adhäsionsdauer gezeigt. Eine Zellzahl von $1,5 \cdot 10^6$ HUVECs/ml bildete eine zu 100 % optisch konfluente Zellschicht nach 2,5 h Inkubation bei 37°C aus (Abb. 4.4-6 c). Geringere Besiedlungszellichten von $1,1 \cdot 10^6$ HUVECs/ml oder $1,3 \cdot 10^6$ HUVECs/ml resultierten in einer Zellkonfluenz von 50 - 60 % (Abb. 4.4-6 a) bzw. 70-80 % (Abb. 4.4-6 b). Um zu beurteilen, wie sich die Anwendung einer unbeschichteten Oberfläche (Abb. 4.4-6 d) auf die Zelladhärenz auswirkt, wurden zusätzlich HUVECs mit einer Zelldichte von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einer unbeschichteten Durchflusskammer für 2,5 h inkubiert. Wie in Abb. 4.4-6 d zu erkennen ist, waren nur wenige Zellen auf der Oberfläche adhärirt. Aufgrund der fehlenden Beschichtung der Zellkulturoberfläche der Durchflusskammer mit extrazellulären Proteinen wie z.B. Kollagen, Elastin, Fibrinogen also Proteinen der EZM, ist keine ausreichende Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche möglich. Die geringe Adhärenz der Zellen auf der Oberfläche beruht auf den im FKS des Kulturmediums vorhandenen Proteinen, die sich teilweise auf der Zellkulturoberfläche abgesetzt haben. Dieses zeigt, dass eine Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit Fibrinogen ausschlaggebend für eine optimale

Zelladhärenz und die Ausbildung einer geschlossenen Endothelschicht ist. Für die folgenden dynamischen Kultivierungen wurde daher eine initiale Zellzahl von $1,5 \cdot 10^6$ HUVECs/ml für die Besiedlung der Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern verwendet.

4.4.3 Auswirkung von definiertem Scherstress auf HUVECs

Um den Effekt von definiertem Scherstress (Scherspannung), der aufgrund des kontinuierlichen, pulsatilen Blutstroms in den Gefäßen vorherrscht, auf HUVECs zu analysieren, wurden die in Kapitel 4.4.2 optimierten Bedingungen zur Kultivierung der Zellen in den Durchflusskammern verwendet: $1,5 \cdot 10^5$ HUVECs pro Durchflusskammer, Fibrinogen-Beschichtung und die ermittelte Viskosität des EGM-2-Mediums (10 % FKS und 0,5 % Gentamycin). Zudem wurde das Mini-Reaktor-System weiter optimiert und neben der Integration eines am Institut für Technische Chemie gebauten Blasenfängers, ein Ausgang im Medienreservoir für den Gasaustausch mit der Umgebung integriert. Das optimierte System ist in Abb. 4.4-7 dargestellt

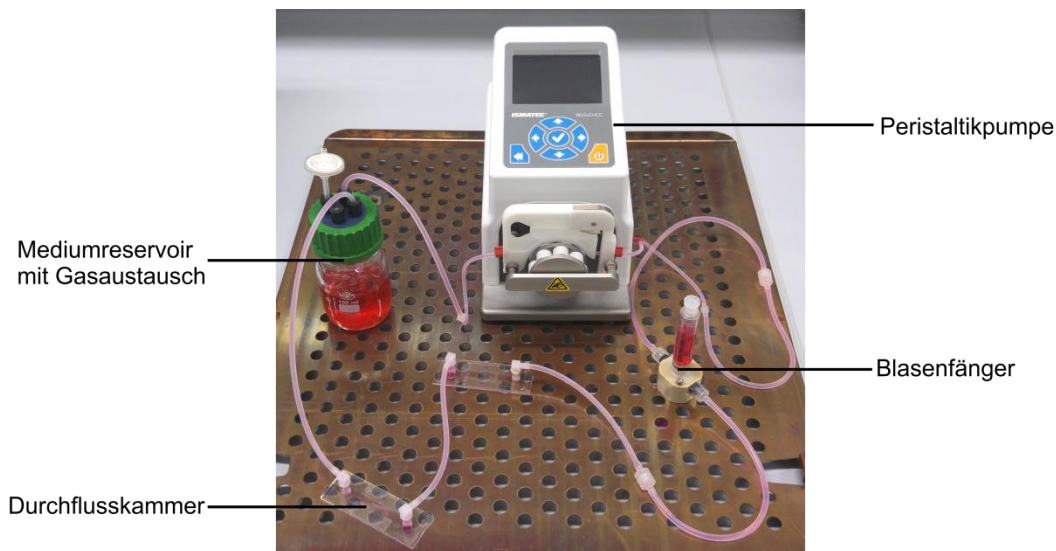


Abb. 4.4-7: Reaktor-System für die dynamische Kultivierung von HUVECs in Durchflusskammern. Ein definierter Volumenstrom wird mittels Peristaltikpumpe erzeugt. Der Blasenfänger verhindert die Bewegung von Luftblasen durch die Durchflusskammern.

Im arteriellen Kreislauf beträgt der Scherstress, der auf die Endothelzellen wirkt, laut experimenteller Bestimmung von Nerem *et al.* $10 \text{ dyn/cm}^2 - 70 \text{ dyn/cm}^2$ [77], wobei höherer Scherstress hauptsächlich in kleinen Arteriolen und an Gabelungen (Bifurkation) von Blutgefäßen auftritt [238]. Simulationen von Dai *et al.* zeigten, dass in größeren geraden Gefäßsegmenten überwiegend ein Scherstress von ungefähr 4 dyn/cm^2 bis 20 dyn/cm^2 auf die Endothelschicht wirkt [238]. Da auch für die spätere Entwicklung der bioartifizialen

Gefäßprothese zunächst lineare Gerüststrukturen mit Zellen besiedelt und diese unter laminarer Strömung in einem geeigneten Reaktorsystem kultiviert werden sollen, wurden die HUVECs in den folgenden Experimenten neben statischen Bedingungen (0 dyn/cm²) unter Scherspannungen von 5 dyn/cm² und 20 dyn/cm² kultiviert. Um die *in vivo* Bedingungen von Endothelzellen genauer nachzuahmen und den Einfluss einer dynamischen Kultivierung auf die Morphologie, Zell-Zell-Verbindungen und Barrierefunktion der Zellen zu analysieren, wurden die Zellen als zweidimensionale Einzelschicht in Durchfluskkammern kultiviert. Parallel zu den Versuchen in den klassischen Durchfluskkammern wurde die Kultivierung der HUVECs in speziellen Durchfluskkammern für die elektrische Zell-Substrat-Impedanzmessung (ECIS™) durchgeführt.

Die Scherspannung (τ), auch als Scherstress bezeichnet, wird definiert als eine Reibungskraft (F) pro Flächeneinheit (A). Dabei ist die Richtung der aufgetragenen Kraft parallel zur Oberfläche.

$$\tau = \frac{F}{A}$$

Die Berechnung der Scherspannung, die unter definierter laminarer Strömung auf die Zellen wirkt, erfolgte mittels der vom Hersteller der Durchfluskkammern angegebenen Formeln. Diese wurden bereits unter Einbezug eines dimensionslosen Faktors (bezogen auf die Kanalhöhe) für die Berechnung der Scherspannung in den Durchfluskkammern optimiert. Für die Ermittlung der Flussraten (ϕ), die erreicht werden mussten, damit ein definierter Scherstress (τ) von 5 dyn/cm² bzw. 20 dyn/cm² in den Durchfluskkammern (Kanalhöhe 0,4 mm) auf die Zellen wirkt, wurde daher folgende Formel unter Berücksichtigung der in Kapitel 4.4.1 ermittelten dynamischen Viskosität (η) von 0,88 mPA*s (0,0088 dyn s/cm²) verwendet:

$$\tau = \eta * 131,6 * \phi$$

Daraus ergeben sich Flussraten von 4,3 ml/min (5 dyn/cm²) und 17,3 ml/min (20 dyn/cm²) für die dynamische Kultivierung der HUVECs in den Standard Durchfluskkammern (Kanalhöhe 0,4 mm).

Da die ECIS-Durchfluskkammern nur eine Kanalhöhe von 0,36 mm aufwiesen, wurde für die Berechnung der Flussraten folgende Formel verwendet:

$$\tau = \eta * 161,7 * \phi$$

Für die dynamische Kultivierung von HUVECs unter definiertem Scherstress in den ECIS-Durchflusskammern ergeben sich daraus Volumenströme von 3,5 ml/min (5 dyn/cm²) und 14,1 ml/min (20 dyn/cm²).

4.4.3.1 Zellmorphologie, Ausrichtung der Aktinfilamente und Einfluss auf Zell-Zell-Verbindungen

Es ist bekannt, dass Endothelzellen auf mechanische Kräfte reagieren und ihre Morphologie, die Struktur des Zytoskeletts und Funktionen verändern [239]. Um den Einfluss von definiertem Scherstress auf die Zellmorphologie, Zellausrichtung und Zell-Zell-Interaktion sowie das enge Zusammenspiel dieser Prozesse in HUVECs genauer zu untersuchen, wurden diese unter Scherspannungen von 0, 5 und 20 dyn/cm² über einen Zeitraum von 168 h kultiviert. Dieser Prozess wurde mittels Echtzeitmikroskopie überwacht. 2,5 - 3 h nach dem Aussiedeln der Zellen wurde die Kultivierung der Zellen unter laminarer Strömung begonnen. Zudem wurden die HUVECs 2,5 h, 24 h, 72 h, 120 h und 168 h nach dem Aussiedeln fixiert und die Aktin-Filamente und VE-Cadherine mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

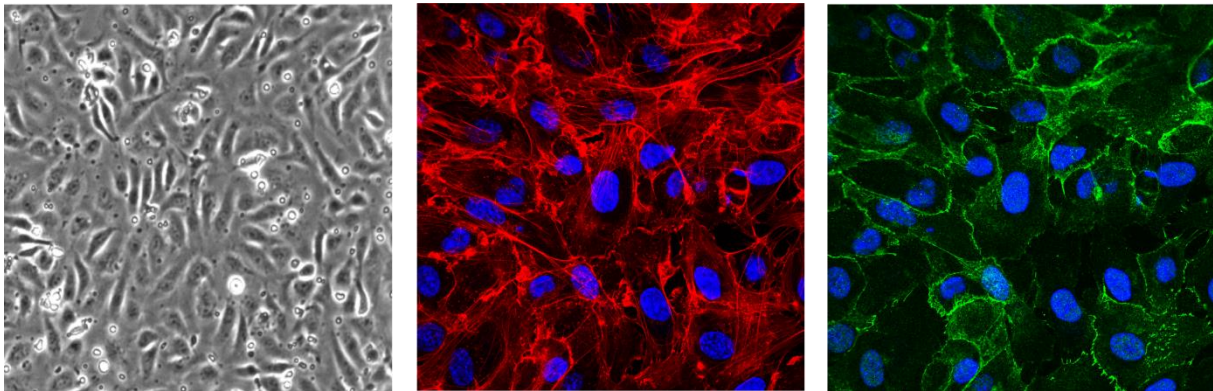


Abb. 4.4-8: Phasenkontrast- (a) und Fluoreszenzaufnahmen fixierter HUVECs 2,5 h nach dem Aussiedeln und angefärbt mit Phalloidin (b, rot) und gefärbt gegen VE-Cadherin (c, grün). Die Zellkerne sind mit Hoechst-färbung (blau) sichtbar gemacht.

Nach 2,5 h Adhäsionszeit wurde die Ausbildung einer 100 % konfluenten Zellschicht beobachtet (Abb. 4.4-8 a). Die Färbung mittels Phalloidin zeigte zu diesem Zeitpunkt eine diffuse Ausrichtung der Aktin-Filamente (Abb. 4.4-8 b) und mittels Färbung der VE-Cadherine wurde bestätigt, dass diese in den Zellen kaum exprimiert wurden (Abb. 4.4-8 c).

Für die dynamische Kultivierung von HUVECs unter einem Scherstress von 5 dyn/cm² wurde der Volumenstrom nach ~ 2,5 h statischer Kultivierung zunächst auf 0,6 ml (0,7 dyn/cm²) erhöht, um die Zellen an die veränderten Umgebungsbedingungen zu gewöhnen und langsam zu konditionieren. In den Echtzeitaufnahmen konnte kurz nach dem Einsetzen der laminaren

Strömung eine verringerte Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche beobachtet werden, ohne dass die Zellen durch den laminaren Strom weggespült wurden. Daher wurde der Volumenstrom ab Stunde 3,5 zunächst wieder abgestellt, um eine erneute Adhäsion der HUVECs zu ermöglichen. Ab Stunde 6,5 wurde der Volumenstrom wieder auf 0,6 ml/min erhöht, was erneut zu einer leicht verringerten Adhäsion der HUVECs führte. Der Volumenstrom wurde jedoch nicht gestoppt und ab Stunde 6,8 auf 2,4 ml/min erhöht. Nachdem die HUVECs wieder eine 100 %ige Konfluenz aufwiesen, wurde der Volumenstrom ab Stunde 9,5 final auf 4,3 ml/min (5 dyn/cm^2) erhöht.

Für eine finale Scherspannung von 20 dyn/cm^2 wurde der Volumenstrom nach 2,5 h statischer Adhäsionszeit auf 0,6 ml ($0,7 \text{ dyn/cm}^2$) erhöht und über einen Zeitraum von 6 h auf $17,3 \text{ ml/min}$ (20 dyn/cm^2) erhöht. Dabei wurde kein Verlust der Zelladhäsion beobachtet.

In der statischen Kultivierung der HUVECs wurde in den Durchflussskammern nach 2,5 h statischer Kultivierung der Volumenstrom auf 0,18 ml ($0,2 \text{ dyn/cm}^2$) erhöht. Dies ist notwendig, damit die Zellen mit Glukose versorgt werden und damit toxische Stoffwechselprodukte entfernt werden, die die Zellvitalität beeinflussen könnten. Zudem hat eine Scherspannung bis $0,7 \text{ dyn/cm}^2$ nach Fey *et al.* keine Auswirkung auf die Endothelzellen und korreliert mit statischen Bedingungen [240]. Der Volumenstrom wurde über die Dauer der Kultivierung erneut verringert und ab Stunde 67 vollständig beendet und ausschließlich alle 24 h für 8 min auf 0,6 ml/min ($0,7 \text{ dyn/cm}^2$) hochgefahren. Dies wird genauer in Kapitel 4.4.3.2 dargestellt.

Unter statischer Kultivierung ($0 \text{ dyn/cm}^2 - 0,2 \text{ dyn/cm}^2$) konnte über die gesamte Kultivierungsdauer keine einheitliche Ausrichtung der HUVECs nachgewiesen werden (Abb. 4.4-9, obere Reihe). Zudem zeigten die Echtzeitaufnahmen ein starkes Migrationsverhalten der HUVECs über die gesamte Kultivierungsdauer.

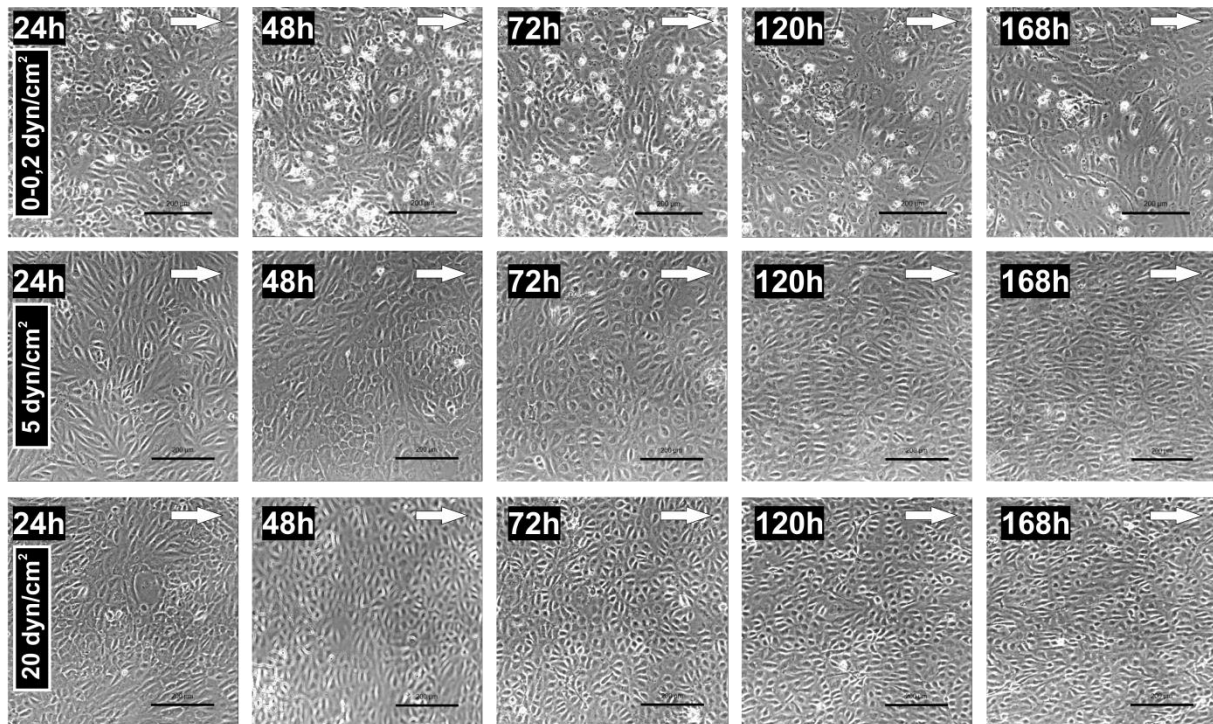


Abb. 4.4-9: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 24 h, 48 h, 72 h, 120 h und 168 h unter statischen (obere Reihe, 0-0,2 dyn/cm²), und dynamischen (mittlere Reihe 5 dyn/cm², untere Reihe 20 dyn/cm²) Kultivierungsbedingungen in Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern. Die Pfeile zeigen die Richtung der laminaren Strömung. Der Maßstab zeigt 200 µm.

Wie in Abb. 4.4-9 gezeigt, konnte unter Scherstressbedingungen von 5 dyn/cm² (mittlere Reihe) und 20 dyn/cm² (untere Reihe) zu Beginn der Kultivierung (24 h) noch ein starkes Migrationsverhalten der HUVECs mit einer beginnenden Ausrichtung der Zellen senkrecht zur laminaren Strömung in den Echtzeitaufnahmen beobachtet werden. Diese Ausrichtung der HUVECs war noch deutlicher nach einer Kultivierungsdauer von 48 h zu beobachten. Nach weiteren 24 h zeigte sich eine langsame Umorientierung der Zellausrichtung, wobei die Organisation der HUVECs auf der Kulturoberfläche wieder sehr diffus wirkte. Unter dynamischer Kultivierung der HUVECs konnten eine Verlängerung der Zellform und eine Orientierung der Zellen entlang der laminaren Strömung nach 120 h eindeutig beobachtet werden, die sich in den nächsten 48 h der Kultivierung weiter stabilisierten. Versuche von Sato *et al.* bestätigen die ausgeprägte Orientierung der Endothelzellen in Fließrichtung [239]. Des Weiteren, konnte nach 24 h (20 dyn/cm²) und 48 h (5 dyn/cm²) Gesamtkultivierungsdauer ein deutlich abgeflachtes Zellprofil der HUVECs gegenüber den statisch kultivierten Zellen beobachtet werden.

Die in den Phasenkontrastaufnahmen beobachtete Umorientierung der Zellausrichtung unter laminarer Strömung konnte auch durch die Ausrichtung der Aktinfilamente in den Zellen bestätigt werden (Abb. 4.4-10).

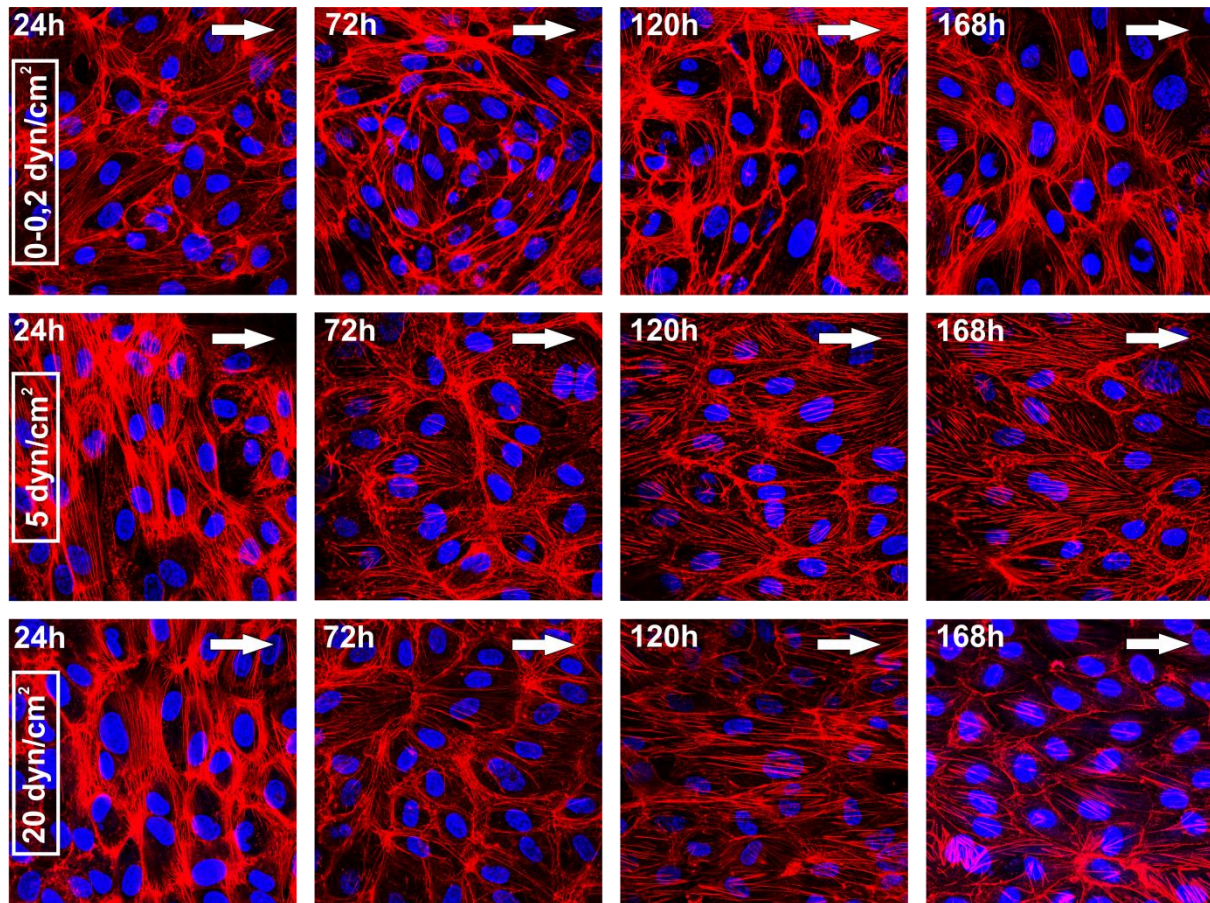


Abb. 4.4-10: Fluoreszenzaufnahmen von fixierten HUVECs nach 24 h, 72 h, 120 h und 168 h statischer (0-0,2 dyn/cm²) und dynamischer (5 dyn/cm², 20 dyn/cm²) Gesamtkultivierungsdauer in Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern. Die Aktinfilamente (rot) sind mit Phalloidin und die Zellkerne (blau) mit Hoechst angefärbt. Die Pfeile zeigen die Richtung der laminaren Strömung.

Bereits 24 h nach dem Aussiedeln der Zellen konnte in dem dynamischen Kultivierungsansatz unter 5 dyn/cm² und 20 dyn/cm² eine eindeutige Ausrichtung der Aktinfilamente senkrecht zur laminaren Strömung (Abb. 4.4-10) beobachtet werden, während diese unter 0 dyn/cm² diffuse Strukturen bildeten, vergleichbar mit denen 2,5 h nach dem Aussiedeln der Zellen (vgl. Abb. 4.4-8). Nach 72 h Kultivierungsdauer zeigte sich bereits, dass die Aktinfilamente langsam beginnen sich entlang der laminaren Strömung auszurichten und ab 120 h Kultivierungsdauer konnte unter beiden Scherstressbedingungen (5 dyn/cm² und 20 dyn/cm²) eine vollständige Ausrichtung der Filamente in Richtung des Volumenstroms beobachtet werden, wobei die Ausrichtung der Aktinfilamente entlang der laminaren Strömung unter 20 dyn/cm² stärker war. Unter statischen Bedingungen zeigte sich über den Verlauf der Kultivierung eine zunehmende Organisation der Aktinfilamente in den Zellen, jedoch konnte keine spezifische Ausrichtung beobachtet werden. Dies verdeutlicht, dass die Morphologie der HUVECs stark von der Ausrichtung der Aktinfilamente entlang der laminaren Strömung abhängt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen bestätigten auch Sato *et al.* und

Noria *et al.* eine enge Verbindung zwischen der Reorganisation sowie Ausrichtung der Zytoskelettstruktur (Intermediärfilamente, Mikrotubuli, Aktinfasern) und der Endothelzellmorphologie unter laminarer Strömung [239, 241]. Endothelzellen reagieren auf die Scherspannung, die auf die apikale (nach oben gerichtete) Oberfläche der Zellen wirkt, durch Mechanotransduktionsreaktionen die das Zytoskelett und die Zell-Zell-Verbindungen, wie *Tight Junctions* oder Adhäsionsproteine (z. B. VE-Cadherine oder PECAM-1) beeinflussen [242, 243]. Dabei vermitteln α - und β -Catenin als regulatorische Einheiten, die Transduktionsreaktionen zwischen den Aktinfilamenten und den VE-Cadherinen und die Übertragung von zellulären Kontraktionskräften auf benachbarte Zellen [244]. Somit haben Änderungen in der Zytoskelettstruktur der Zellen, ausgelöst durch einen mechanischen Stimulus, einen starken Einfluss auf die interzelluläre Spannung und damit einhergehend auf die Hochregulation der Endothelzell-spezifischen VE-Cadherine, mit der Konsequenz einer stärkeren Zell-Zell-Konnektivität, [243] stärkeren mechanischen Belastbarkeit und Aufrechterhaltung der Endothelintegrität sowie Regulation der Gefäßpermeabilität [244]. Daher wurde im Folgenden die Auswirkung von definiertem Scherstress auf die Expression von VE-Cadherinen und die Ausbildung von Cadherin-Cadherin-Bindungen untersucht.

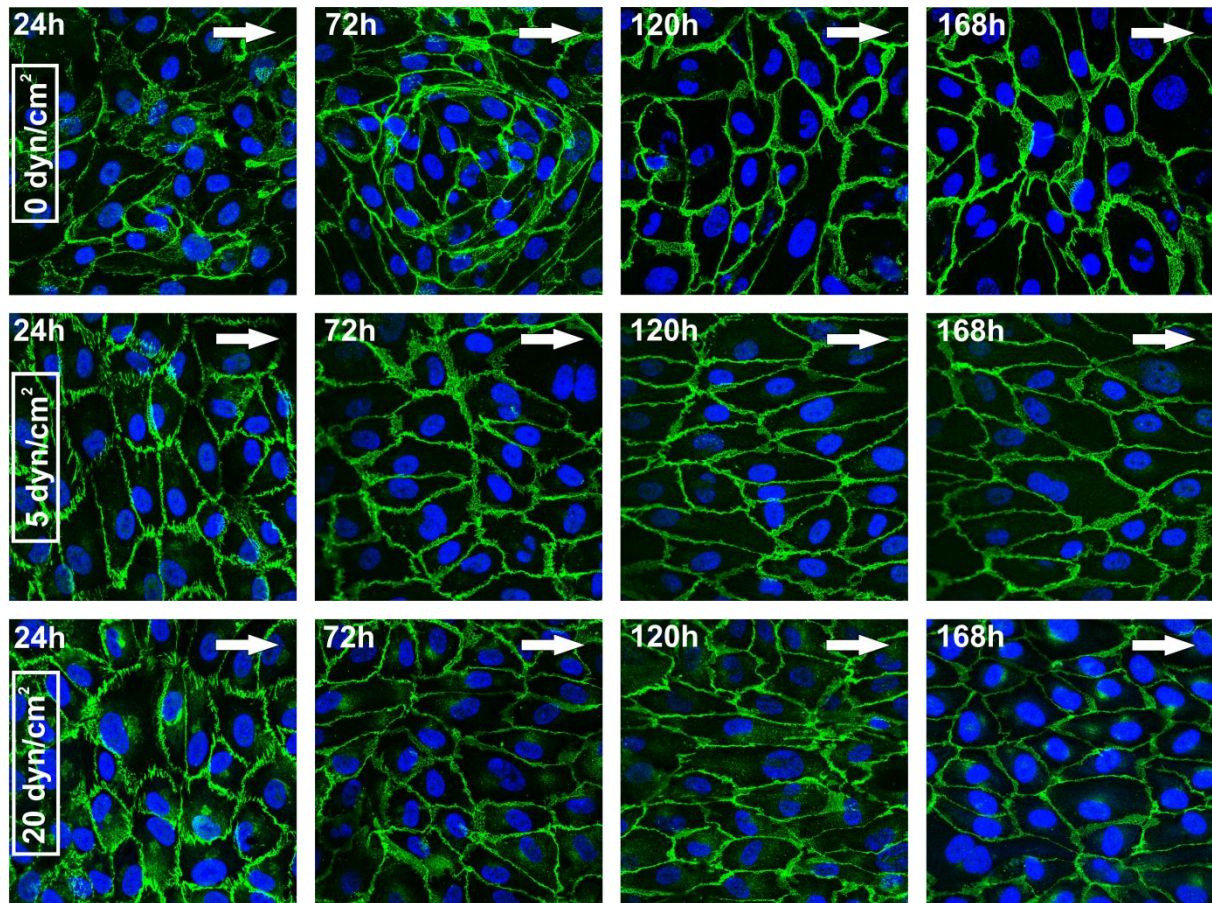


Abb. 4.4-11 Fluoreszenzaufnahmen von fixierten HUVECs nach 24 h, 72 h, 120 h und 168 h statischer (0-0,2 dyn/cm²) und dynamischer (5 dyn/cm², 20 dyn/cm²) Gesamtkultivierungsdauer in Fibrinogenbeschichteten Durchflusskammern. Die Ve-Cadherine (grün) sind mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und die Zellkerne (blau) mit Hoechst angefärbt. Die Pfeile zeigen die Richtung der laminaren Strömung.

Der Prozess, wie die durch laminare Strömung induzierten Kräfte die Barrierefunktion von Endothelzellen beeinflussen, ist noch nicht komplett aufgeklärt, aber übereinstimmend mit den hier gewonnenen Ergebnissen wurde in weiteren Studien beobachtet, dass diese Kräfte den Aufbau und die Verstärkung von Adhäsionsverbindungen unterstützen können [243, 245-247]. Ting *et al.* zeigten zudem, dass die laminare Strömung einen Anstieg der Spannung im Zytoskelett verursacht, wodurch interzelluläre Kräfte erhöht werden, die den Aufbau von Adhäsionsverbindungen und *Tight Junctions* induzieren [243]. Diese wiederum verhindern in der Endothelschicht den Durchgang von Molekülen und Ionen und verbessern dadurch die Barrierefunktion und strukturelle Integrität des Endothels [81, 248]. Die zytoplasmatische Domäne der VE-Cadherine bindet an die Aktinfilamente, was den Signaltransfer in die Zelle ermöglicht [81, 249], die für die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und -polarität wichtig sind [81, 250].

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass unter den gewählten dynamischen Scherstressbedingungen von 5 dyn/cm^2 und 20 dyn/cm^2 , wie sie *in vivo* in größeren Arterien überwiegend vorherrschen, eine Ausrichtung der Aktinfilamente und damit einhergehend der Zellmorphologie, sowie die Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte durch VE-Cadherine erfolgt (Abb. 4.4-11). Im Gegensatz zu Reiser *et al.*, die unter einem Scherstress von 10 dyn/cm^2 eine Ausrichtung der Zellen mit der laminaren Strömung bereits nach wenigen Stunden beobachteten, welche über die Dauer der Kultivierung (96 h) erhalten blieb [251], konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl unter einer Scherspannung von 5 dyn/cm^2 als auch 20 dyn/cm^2 , nach anfänglicher Ausrichtung der Zellen senkrecht zum laminaren Strom, erst nach 96 h Kultivierung eine beginnende Ausrichtung der HUVECs nachgewiesen werden. Dieses führte im weiteren Verlauf zur Formation einer entlang der laminaren Strömung ausgerichteten, stabilen und konfluenten Endothelzellschicht.

In dem folgenden Kapitel erfolgt mittels elektrischer Zell-Substrat-Impedanzmessung (ECISTM) neben der mikroskopischen eine sub-mikroskopische d.h. physiologische Analyse der Endothelschicht, um die Auswirkung laminarer Strömung auf die Barrierefunktion des Endothels genauer zu bestimmen.

4.4.3.2 Impedanzanalysen mittels ECIS

Die elektrische Zell-Substrat-Impedanzmessung (ECISTM) ermöglicht eine nicht invasive, physiologische Untersuchung von lebendigen Zellen *in vitro*. Das Prinzip der Impedanzmessung basiert auf Goldfilm-Elektroden, auf dem Boden der Durchflusskammern auf denen die Zellen aufwachsen. Das genaue Prinzip der Impedanzmessung ist ausführlicher in Kapitel 7.5.3 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden *ECIS 1 Channel Flow Array 10E* mit 8×10 Elektroden verwendet (Abb. 4.4-12).

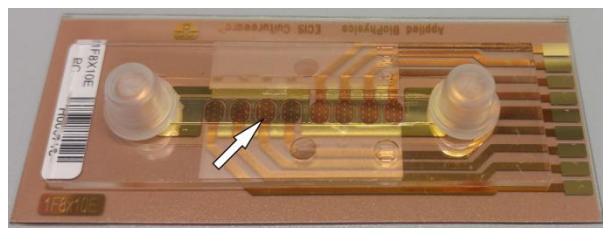


Abb. 4.4-12: Durchflusskammer für die elektrische Zell-Substrat-Impedanzmessung (ECISTM) von Applied Biophysics mit 8×10 Elektroden. Der Pfeil zeigt auf einen der 8 Bereiche, die jeweils 10 Elektroden enthalten.

Mit zunehmender Zellzahl auf den Elektroden wird eine Erhöhung der Impedanz induziert, bis diese bei einer konfluenten Zellschicht maximal ist. In konfluenten Zellschichten wird der Stromfluss daher überwiegend durch die Morphologie und Zell-Zell-Verbindungen beeinflusst. Bei einer konfluenten Zellschicht fließt der angelegte Wechselstrom bei niedrigen Frequenzen nur noch unter bzw. zwischen den benachbarten Zellen (parazellulär) und bei Frequenzen über 40 kHz kapazitiv durch die isolierende Zelleschicht (transzellulär). Der parazelluläre Stromfluss beschreibt den Membranwiderstand bzw. Ionenfluss und liefert Informationen über die Zell-Zell-Kontakte und Barrierefunktion der konfluenten Zellschicht. Dieser transzelluläre Stromfluss beschreibt die Membrankapazität und wird durch Veränderungen in der Membranstruktur, also der Zellmorphologie, beeinflusst. Da die Zellen auf Veränderungen in ihrer Mikroumgebung, ausgelöst durch physikalische oder biochemische Stimuli, mit hoher Sensitivität reagieren, können so online morphologische Änderungen, wie die Ausrichtung des Zytoskeletts, die Änderung der Zellprofile oder auch die Bildung von Zell-Zell-Verbindungen im submikroskopischen Bereich verfolgt werden. [252, 253]

Über eine Dauer von 168 h wurde in der vorliegenden Arbeit immer bei einer Frequenz von 4 kHz der Widerstand und bei einer Frequenz von 64 kHz die Kapazität gemessen. Zunächst wurden HUVECs unter statischen Kultivierungsbedingungen betrachtet (Abb. 4.4-13). Hierfür wurden $1 \cdot 10^5$ HUVECs je ECIS-Durchflussskammer (Kanalhöhe 0,36 mm) ausgesiedelt, sodass sich eine konfluente Zellschicht ausbilden konnte, und nach 2,5 h Adhäsionsdauer unter geringen dynamischen Bedingungen von maximal $0,21 \text{ dyn/cm}^2$ kultiviert. Dies war notwendig, um die empfindliche ECIS-Messung nicht durch einen täglichen Wechsel des Mediums zu stören. Dadurch, dass sich der Elektrolytgehalt in frischem Zellkulturmedium von dem über die Dauer der dynamischen Kultivierung verwendeten Medium, das über mehrere Tage im CO_2 -Inkubator verwendet wird, unterscheidet, kann ein Wechsel des kompletten Mediums zu Abweichungen in der Impedanzmessung führen [240].

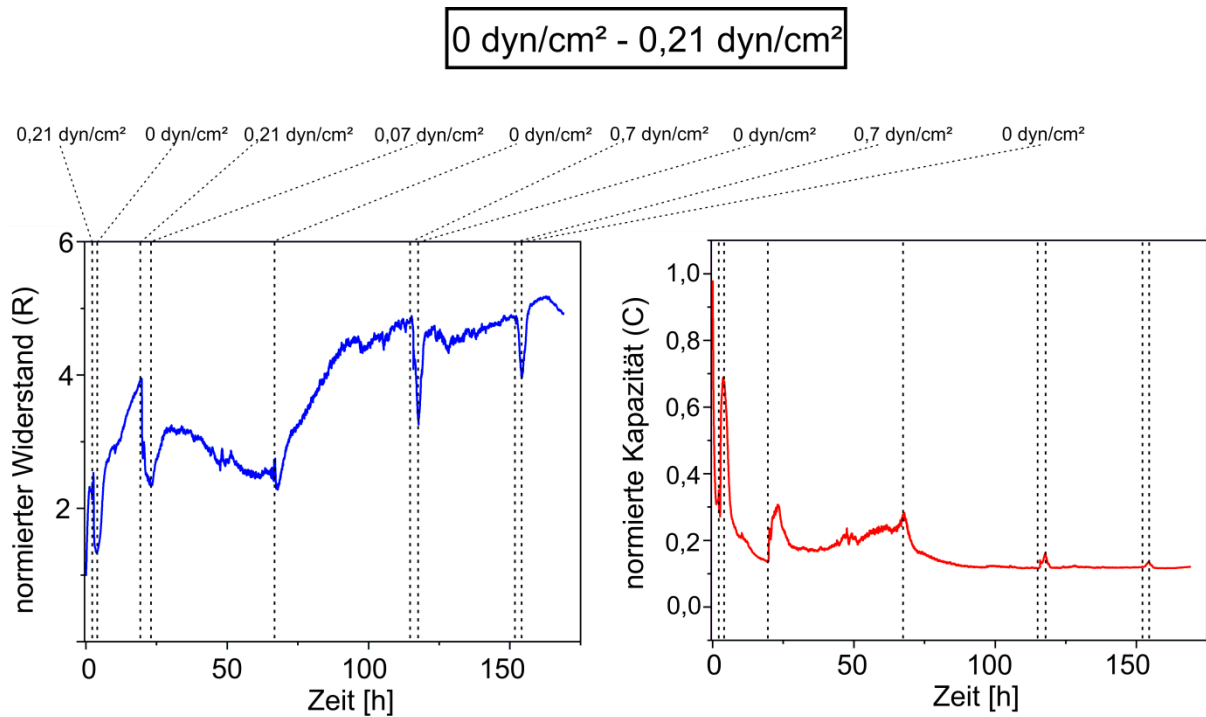


Abb. 4.4-13: Normierter Widerstand und normierte Kapazität von konfluenten HUVECs unter statischer (0 dyn/cm² - 0,21 dyn/cm²) Kultivierung in Abhängigkeit von der Zeit. Die gestrichelten Linien zeigen Änderungen der Scherspannung und damit des Volumenstromes an.

Direkt nach Beginn der laminaren Strömung konnte eine starke Abnahme des Widerstandes beobachtet werden. Bis Stunde 4 wurde kein erneuter Anstieg des Widerstandes detektiert. Darauf basierend wurde der Volumenstrom gestoppt und die HUVECs bis Stunde 19,5 unter 0 dyn/cm² kultiviert. In dieser Zeit wurde eine Zunahme des Widerstandes über den Anfangswert hinaus beobachtet. Ab Stunde 19,5 wurde der Volumenstrom mit 0,15 ml/min (0,21 dyn/cm²) erneut gestartet, was wieder zu einer starken Abnahme des Widerstandes führte. Eine Reduktion des Volumenstroms auf 0,05 ml/min (0,07 dyn/cm²) bedingte nach kurzzeitiger Zunahme eine kontinuierliche Abnahme des Widerstandes. Eine Abnahme des Widerstandes ist typisch für dynamisch kultivierte HUVECs, die aufgrund der kompakten konfluenten Zellschicht ohne Überlagerung einzelner Zellen einen stärkeren Ionenfluss aufweisen. Daher lässt sich für diese statische Versuchsdurchführung mit minimalen dynamischen Bedingungen schließen, dass der geringe laminare Volumenstrom, der unter Verwendung einer Peristaltikpumpe erzeugt wird, Auswirkungen auf die Endothelzellen hat. Gleichzeitig erfolgte eine Echtzeitaufnahme von HUVECs, die mit gleicher Zellzahl in normierten Durchflusskammern (Kanalhöhe 0,4 mm) ausgesiedelt wurden (Abb. 4.4-9). Diese zeigten jedoch, dass die Zellen keine Ausrichtung entlang des Volumenstroms und zudem ein, für statisch kultivierte Zellen, typisches Migrationsverhalten aufwiesen. Daher könnte auch der geringe Volumenstrom bereits optisch nicht sichtbare physiologische Änderungen, wie

eine geringe Änderung von Zell-Zell-Kontakten, als Endothelzellreaktion verursachen. Aus diesem Grund wurde der Volumenstrom nach Stunde 67 erneut gestoppt und die HUVECs für den restlichen Verlauf der Kultivierung unter 0 dyn/cm^2 kultiviert, was zu einem deutlichen Anstieg des Widerstandes und einer Abnahme der Kapazität führte. Lediglich für den alle 24 h notwendigen Mediumwechsel wurde für 8 min ein Volumenstrom von $0,5 \text{ ml/min}$ ($0,7 \text{ dyn/cm}^2$) appliziert, der kurzzeitige Änderungen der Impedanz verursachte. Diese Analysen zeigen, dass bereits kleinste Änderungen in der Mikroumgebung der Zellen eine Reaktion in den HUVECs hervorrufen.

Für die dynamischen Kultivierungen mit finalen Scherspannungen von 5 dyn/cm^2 und 20 dyn/cm^2 wurde die langsame und schrittweise Erhöhung der Scherspannung zu Beginn der Kultivierungen wie in Kapitel 4.4.3.1 beschrieben durchgeführt. Da in den ECIS-Durchfluskkammern eine geringere Kanalhöhe von $0,36 \text{ mm}$ vorliegt wurden die Volumenströme dementsprechend angepasst. In beiden Versuchsdurchläufen wurden die Zellen nach dem Aussiedeln über eine Dauer von 168 h kultiviert.

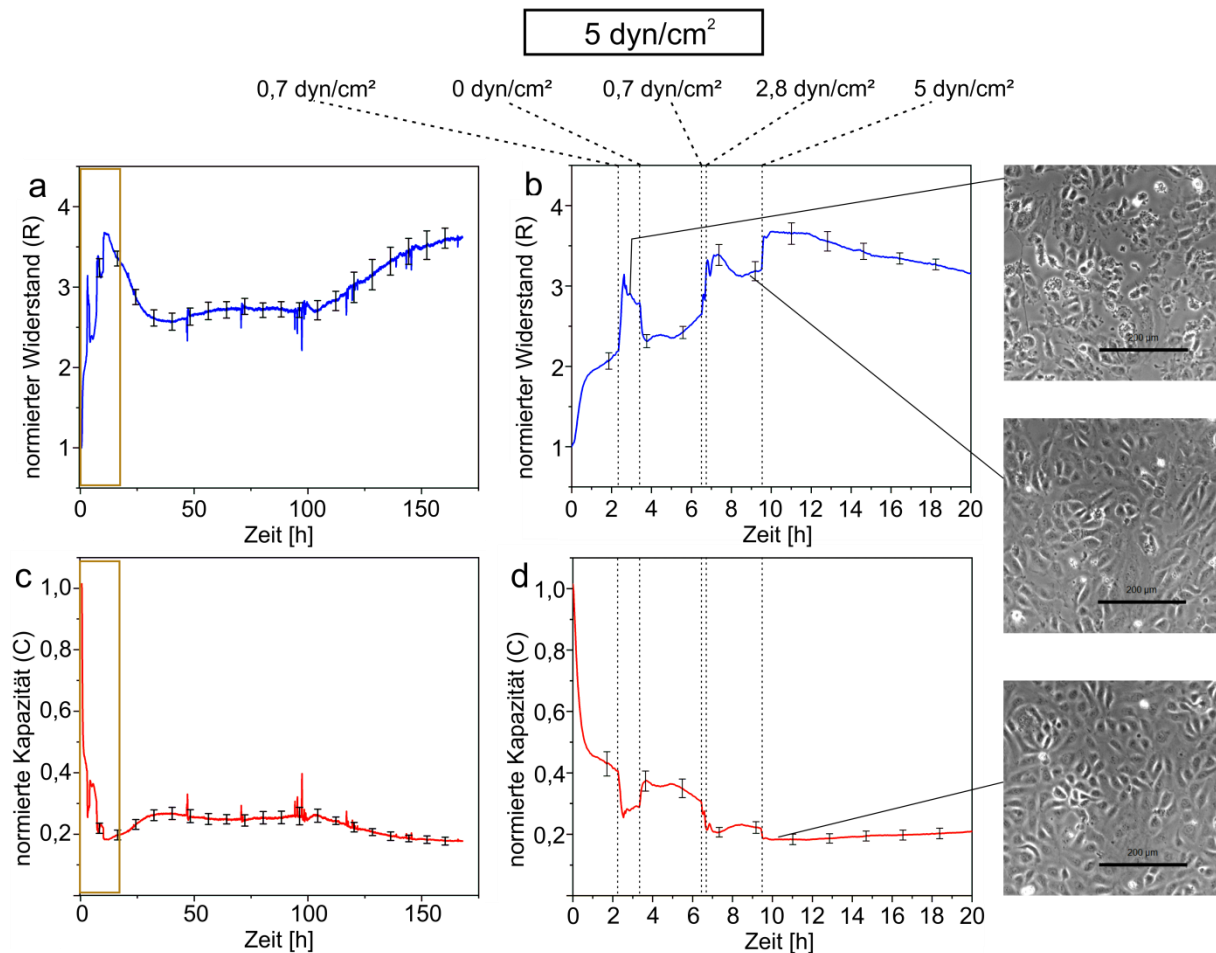


Abb. 4.4-14: Normierter Widerstand (a, b) und normierte Kapazität (b, d) von konfluenten HUVECs unter dynamischer Kultivierung (5 dyn/cm^2) in Abhängigkeit von der Zeit. In b und d sind die in a und c markierten Abschnitte vergrößert dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen Änderungen Scherspannung und damit des Volumenstromes an. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen aus der Impedanzmessung in einer ECIS-Durchflusskammer von 6×10 Elektroden. Der Maßstab zeigt $200 \mu\text{m}$.

In Abb. 4.4-14 a und c sind die Änderungen der Widerstands- und Kapazitätsmessungen unter einer Scherspannung von 5 dyn/cm^2 über den Verlauf der Kultivierung dargestellt. Die Abb. 4.4-14 b und d zeigte den Verlauf der Widerstands- und Kapazitätsmessung in den ersten 20 der Kultivierung detaillierter, dabei sind die Änderungen der Volumenströme durch die gestrichelten Linien markiert. Durch die einsetzende laminare Strömung ($0,5 \text{ ml/min}$; $0,7 \text{ dyn/cm}^2$) nach $2,5 \text{ h}$ statischer Kultivierung wurde eine kurze sprunghafte Zunahme des Widerstandes (Abb. 4.4-14) induziert. Für den Verlauf der Kapazität wurde ein genau entgegengesetztes Verhalten detektiert. Die Änderung des Widerstandes und der Kapazität deuten darauf hin, dass die Zellen empfindlich auf den Beginn der laminaren Strömung reagieren. Wie bereits in Kapitel 4.4.3.1 gezeigt, gehen diese physiologischen Scherbedingungen mit morphologischen Änderungen der Zelle einher. Dies wurde auch bei der optischen Beurteilung der Zellmorphologie deutlich (siehe Kapitel 4.4.3.1, Abb. 4.4-9). In den Echtzeitaufnahmen konnte eine Änderung des Zellprofils direkt nach dem Beginn der

dynamischen Kultivierung beobachtet werden. Wenn die statische Endothelschicht zu Beginn der laminaren Strömung einer plötzlichen Zunahme von Scher- und Druckkräften ausgesetzt ist, werden die Zellen gegen die Oberfläche der Kammer gedrückt wodurch diese abflachen [235]. Dadurch bedingt wird der Längs-Radius der Zellen erhöht, was zu einem Anstieg des Widerstandes führt [235]. Die ECIS-Analyse bestätigt zudem durch die Abnahme der Kapazität, d.h. des transzellulären Stromflusses, dass die laminare Strömung eine direkte Änderung der Zellhöhe bewirkt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Analysen von DePaola *et al.* und Davies *et al.* [235, 254]. Auf den kurzzeitigen Anstieg folgte eine starke kontinuierliche Abnahme des Widerstandes und Zunahme der Kapazität. Dies war auf eine verringerte Adhärenz der Zellen auf den Elektroden zurückzuführen, was gleichzeitig in der Echtzeitaufnahme beobachtet werden konnte (Abb. 4.4-14), ohne dass die Zellen durch den laminaren Strom weggespült wurden. Die dadurch bedingte Verringerung der Zellkonfluenz ermöglicht einen stärkeren Stromfluss, wodurch der Widerstand sinkt. Ab Stunde 4 wurde der Volumenstrom gestoppt, um eine erneute Adhäsion der HUVECs zu ermöglichen und ab Stunde 6,5 wieder auf 0,5 ml/min erhöht. Dies führte erneut zu einer Zunahme des Widerstandes gefolgt von einer geringen Abnahme und verringerten Adhärenz der Zellen auf der Oberfläche. Der Volumenstrom wurde jedoch nicht gestoppt und ab Stunde 6,8 auf 2 ml/min (2,8 dyn/cm²) erhöht. Nachdem die HUVECs wieder eine 100 %ige Konfluenz aufwiesen, wurde der Volumenstrom ab Stunde 9,5 final auf 3,5 ml/min (5 dyn/cm²) erhöht.

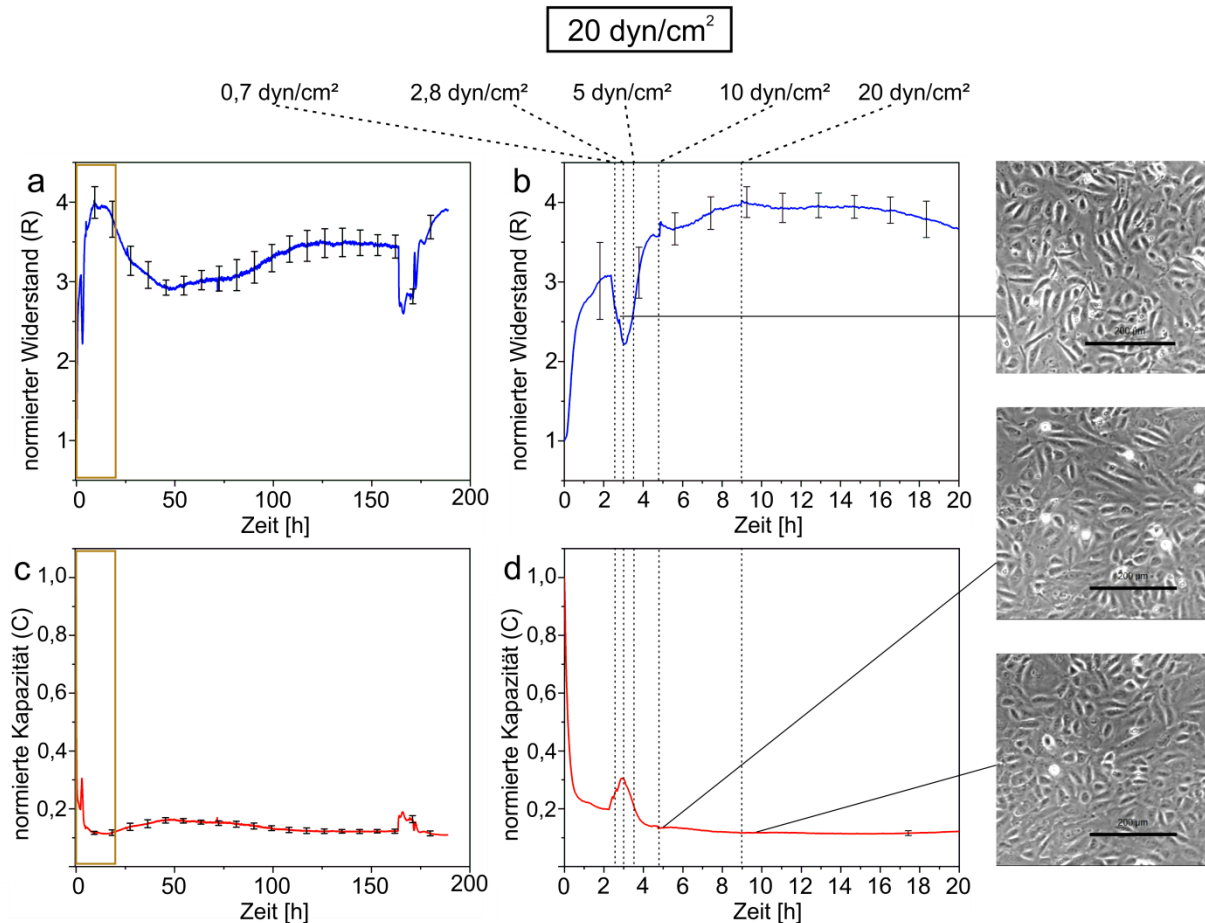


Abb. 4.4-15: Normierter Widerstand (a, b) und normierte Kapazität (b, d) von konfluenten HUVECs unter dynamischer Kultivierung (5 dyn/cm²) in Abhängigkeit von der Zeit. In b und d sind die in a und c markierten Abschnitte vergrößert dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen Änderungen Scherspannung und damit des Volumenstromes an. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen aus der Impedanzmessung in einer ECIS-Durchflusskammer von 6 x 10 Elektroden. Der Maßstab zeigt 200 µm.

Für die Kultivierung mit einer finalen Scherspannung von 20 dyn/cm² wurde der Volumenstrom nach 2,5 h statischer Adhäsionsdauer mit 0,5 ml/min (0,7 dyn/cm²) gestartet und über einen Zeitraum von 6 h auf 14,1 ml/min (20 dyn/cm²) erhöht. Dies zeigte sich zunächst in einer Zunahme des Widerstandes und Abnahme der Kapazität wieder (Abb. 4.4-15). Nach Erreichen der Scherspannung von 20 dyn/cm² konnte eine langsame und kontinuierliche Abnahme des Widerstandes beobachtet werden. Die in der vorliegenden Arbeit in beiden dynamischen Kultivierungen folgende Abnahme des Widerstandes und Zunahme der Kapazität bis 40 h/50 h spiegelt die Reaktion der Zellen auf den mechanischen Reiz wieder und gehen einher mit der in den Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen beobachteten Zunahme von VE-Cadherin-Bindungen (Abb. 4.4-11) und Änderung der Zellmorphologie und Zellausrichtung (Abb. 4.4-9). Im Gegensatz zur statischen Kultivierung, in der die Zellen teilweise übereinander wachsen und sich überlappen, bedingt die laminare Strömung und der dadurch induzierte Scherstress eine wesentlich kompaktere Verteilung der

Zellen auf der Kulturoberfläche, die zudem durch die Zunahme der VE-Cadherin-Bindungen stabilisiert wird. Der Ionenfluss zwischen den benachbarten Zellen wird stärker, was zu einer Änderung des parazellulären Stromflusses und zu einer Abnahme des Widerstandes führt. Gleichzeitig wirkt sich die Migration und Ausrichtung der Zellen auf die Auflösung und Neubildung der interzellulären Verbindungen aus, was auch mit der Abnahme des Widerstandes einhergeht [235]. Zudem zeigte die kontinuierliche Zunahme der Kapazität, dass die Zellen ihr Profil verändern und aufgrund der bestehenden 100 %ige Konfluenz in die Höhe wachsen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurde nach geringer Zunahme des Widerstandes und Abnahme der Kapazität ein konstanter Verlauf beobachtet. Die Zellen beginnen langsam sich mit der laminaren Strömung auszurichten. Dieser Prozess ist mit einer Disassemblierung und erneuten Bildung der Adhäsionskontakte verbunden [255] und dies spiegelt sich geringen Änderungen der Impedanzmessung wieder. Nach 80 h Kultivierungsdauer (20 dyn/cm²) konnte bis zu einer Gesamtkultivierungsdauer von 120 h erneut eine geringe Widerstandszunahme beobachtet werden und eine damit einhergehende Änderung der Barrierefunktion des Endothels, die sich nach 120 h wieder stabilisierte. Bei Betrachtung der Zellausrichtung in den Phasenkontrastaufnahmen in Abb. 4.4-9 und nach VE-Cadherin- (Abb. 4.4-11) sowie Aktin-Färbung (Abb. 4.4-10) wird deutlich, dass die Zellen nach 72 h noch keine deutliche Ausrichtung entlang der laminaren Strömung aufweisen, während diese nach 120 h eindeutig zu erkennen war. Diese Veränderung der Zellausrichtung und damit auch der Zellmorphologie in der Einzelschicht könnte daher der Auslöser für die Änderung in der Barrierefunktion (Änderung des Widerstandes) sein. In der dynamischen Kultivierung der HUVECs unter einem Scherstress von 5 dyn/cm² wurde ab einer Kultivierungsdauer von 103 h eine stetige Zunahme des Widerstandes und eine Abnahme der Kapazität gemessen, obwohl eine eindeutige Ausrichtung der HUVECs entlang der laminaren Strömung erst nach 120 h zu beobachten war. Während die Abnahme der Kapazität durch ein Abflachen der Zellen verursacht worden sein könnte, könnten Veränderungen in der Mikroumgebung der Zellen oder physiologische, intrazelluläre Änderungen einen negativen Einfluss auf die Barrierefunktion der Endothelschicht ausgeübt haben. Als Reaktion auf eine Scherspannung zeigen Endothelzellen neben den morphologischen auch molekularbiologische Änderungen der Expressionsprofile, biochemische Änderungen durch Beeinflussung verschiedenster Signalwege und auch Änderungen der Zell-Zell-Interaktionen [80, 235, 243, 256, 257]. So spiegeln sich in der Impedanzmessung nicht nur optisch sichtbare morphologische Änderungen, sondern auch submikroskopische physiologische Reaktionen wieder, die durch Anpassung der

Endothelzellen an die laminare Strömung induziert werden. Diese Beobachtungen zeigen eindeutig, dass eine optisch positive Beurteilung der Zellkonfluenz und Zellausrichtung in den Phasenkontrast- sowie Fluoreszenzaufnahmen keine genauen Rückschlüssen auf die physiologischen Bedingungen der Zellen erlaubt und dass bereits leichte Änderungen der physikalischen Stimuli einen umfangreichen Einfluss auf die Funktion des Endothels haben können. Zudem belegen die Analysen, dass die relativ starke Änderung des Widerstandes und der Kapazität zu Beginn der Kultivierung überwiegend durch morphologische Veränderungen verursacht wurden, während im späteren Verlauf der Kultivierung kaum noch eine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet wurde, sondern biochemische Reaktionen der Zellen mit der Änderung des Widerstandes und der Kapazität einhergehen. Diese Beobachtungen wurden durch DePaola *et al.* bestätigt [235]. In Kapitel 6.1 ist der Verlauf der dynamischen Kultivierungen unter 5 dyn/cm^2 (Tab. 6.1-1) und 20 dyn/cm^2 (Tab. 6.1-2) noch einmal tabellarisch zusammengefasst.

4.4.4 Schlussfolgerung

In diesem Kapitel konnte erfolgreich der Einfluss von laminarer Strömung auf Endothelzellen wie HUVECs untersucht werden. Durch Optimierung der Oberflächenbeschichtung in den Durchflusskammern und Bestimmung der optimalen initialen Zellzahl konnte nach experimenteller Analyse der dynamischen Viskosität des Zellkulturmediums die dynamische Kultivierung der HUVECs mit definierten Scherspannungen von 5 dyn/cm^2 und 20 dyn/cm^2 durchgeführt werden. Durch Analyse der Zellmorphologie, der VE-Cadherin-Bindungen und Aktinfilament-Struktur wurde bestätigt, dass eine Ausrichtung der Zellen nach 120 h entlang der laminarer Strömung erreicht wurde. Zusätzlich konnte mittels ECIS eine Zunahme der Barrierefunktion über den Verlauf der dynamischen Kultivierung unter 20 dyn/cm^2 beobachtet werden. Für die Etablierung einer dynamischen Kultivierung von HUVECs auf einer tubulären Gerüststruktur ist zu beachten, dass die Kultivierung mit einer geringen Scherspannung von nicht mehr als $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ gestartet und dass der applizierte Volumenstrom je nach der finalen Scherspannung, die auf die Zellen appliziert werden soll über einen Zeitabschnitt von bis zu 10 Stunden langsam gesteigert werden sollte, um eine Konditionierung und Adaption der Zellen an die neue Mikroumgebung zu gewährleisten und ein Ablösen der Zellen zu verhindern. Zu hoher Scherstress direkt zu Beginn der Kultivierung kann die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte und damit auch die Endothelzellintegrität beeinflussen [243, 258].

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Kultivierungsstrategien für die Erstellung und Kultivierung bioartifizieller, patientenspezifischer Gefäßprothesen in einem geeigneten Reaktorsystem, die als Gefäßersatz benötigt werden. Dazu wurde zunächst der Einfluss einer immunsuppressiven Therapie, die nach der Transplantation körperfremder Gefäßprothesen zwingend notwendig ist, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, auf Endothelzellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Immunsuppressivum Tacrolimus eine dosisabhängige Toxizität auf Endothelzellen aufweist. Anhand der ermittelten IC_{50} -Werte konnte zudem gezeigt werden, dass heterogene 3D-Sphäroid-Kultursysteme aus HUVECs, die annäherungsweise *in vivo* Bedingungen mit Diffusionsgradienten für Nährstoffe und Sauerstoff widerspiegeln, im Vergleich zu homogenen 2D-Zellkulturen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Immunsuppressivum Tacrolimus aufwiesen. Während in der 2D-Kultur ein IC_{50} - Wert von $40,23 \mu\text{g/ml} \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$ für Tacrolimus nachgewiesen wurde, konnte in der 3D-Sphäroidkultur ein um $13,04 \mu\text{g/ml}$ niedrigerer IC_{50} - Wert von $27,19 \mu\text{g/ml} \pm 0,09 \mu\text{g}$ bestimmt werden. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass Tacrolimus, trotz unveränderter Zellvitalität, bei einer Konzentration von 18 ng/ml , die dem maximalen Talspiegel in der Anfangstherapie (1-3 Monate) nach einer Organtransplantation entspricht, zu einer leicht dissoziierten Sphäroidstruktur und leicht verringerten Bildung von kapillarähnlichen Strukturen führte. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die *in-vivo*-Situation mit Spitzenkonzentrationen von bis zu 246 ng/ml in der begleitenden Tacrolimus-therapie kann daher durch eine negative Beeinflussung der Zell-Zell-Interaktionen der Endothelzellen einen Verlust der Zellintegrität bewirken, was die Regenerationsfähigkeit des transplantierten allogenen Gewebes beeinträchtigen und eine endotheliale Dysfunktion unter immunsuppressiver Therapie erklären kann. Spätere Transplantatabstoßungen werden durch die Durchlässigkeit des Endothels gefördert. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass autologe bioartifizielle Gefäßprothesen anstelle von allogenen Gefäßmaterial das optimalere Konzept darstellen, mit dem auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet werden kann.

Aufgrund des hohen pluripotenten Differenzierungspotentials und der leichten Isolation aus dem Organismus sind mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (AD-hMSCs) eine gut verfügbare autologe Zellquelle. Die Untersuchung des endothelialen Differenzierungspotentials von Stammzellen aus dem Fettgewebe (AD-hMSCs) zeigte, dass eine stabile

Differenzierung in Endothelzellen unter statisch-normoxischen (SN), statisch-hypoxischen (SH), dynamisch-normoxischen (DN) und dynamisch-hypoxischen (DH) Kultivierungsbedingungen in Kombination mit einem Hungern der Zellen an Glukose nicht erreicht werden konnte, auch wenn die AD-hMSCs Merkmale reifer Endothelzellen aufwiesen. Daher sind die AD-hMSCs für die Ausbildung eines funktionsfähigen Endothels und Auskleidung der bioartifiziellen Gefäßprothese nicht geeignet.

Eine Charakterisierung der Proteinlevel angiogener Faktoren in den Zellkulturüberständen konditionierter AD-hMSCs zeigte jedoch, dass die AD-hMSCs sehr gute parakrine Eigenschaften aufwiesen und vor allem unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen erhöhte Proteinkonzentrationen angiogener Biomarker sezernieren, während die Sekretion inflammatorischer Biomarker verringert ist. Zusätzlich hatte die dynamische Kultivierung der Zellen einen leicht positiven Einfluss auf die Sekretion der angiogenen Faktoren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Expressionsprofil der AD-hMSCs und damit auch die parakrinen Eigenschaften durch die Mikroumgebung der Zellen beeinflusst werden können. Das zeitliche und konzentrationsabhängige aufeinander abgestimmte Zusammenspiel angiogener Faktoren ist entscheidend für die erfolgreiche Ausbildung von vaskulären Strukturen, die essentiell für eine optimale Nähr- und Sauerstoffversorgung der Zellen in den äußeren Schichten bioartifizieller Gefäßprothesen, sind. Der Einfluss von konditioniertem Zellkulturmedium, das durch dynamische-hypoxische Kultivierung von AD-hMSCs über einen Zeitraum von 14 Tagen mit angiogenen Faktoren angereichert wurde, auf die Formation kapillarähnlicher Strukturen durch HUVECs wurde in einem weiteren Versuchsansatz untersucht. Es wurde gezeigt, dass die alleinige Kultivierung von HUVECs in Zellkulturmedium, das unter dynamisch-hypoxischer Kultivierung von AD-hMSCs konditioniert wurde, keine Bildung kapillarähnlicher Strukturen induzierte, während in der indirekten Kokultur mit AD-hMSCs *in vitro* eine signifikant erhöhte Formation kapillarähnlicher Strukturen nachgewiesen werden konnte. Die Übertragung dieser Bedingungen auf dreidimensionale PLLA/PLGA-Gerüststrukturen führte zu einer erfolgreichen Bildung kapillarähnlicher Strukturen in einer indirekten Kokultur von AD-hMSCs und HUVECs, während in der direkten Kokultur die Gerüststruktur durch AD-hMSCs überwuchert wurde. Der Vorteil einer Kokultivierung von Zellen zur Unterstützung der Formation vaskulärer Strukturen gegenüber der definierten Applikation spezifischer angiogener Faktoren ist die Produktion und Freisetzung verschiedener Faktoren in physiologischen Mengen und die Expression eines geeigneten Mileus an angiogenen Markern über den gesamten zeitlichen Verlauf der Gefäßbildung und -reifung. Diese Ergebnisse sind wichtig für die Entwicklung *in vitro* vaskularisierter

Konstrukte für die künstliche Gewebezüchtung. Für die Übertragung dieser Kultivierungsstrategie auf die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese ist somit ein erster Schritt hinsichtlich der *in vitro* Etablierung und Integration von vaskulären Strukturen erfolgt. Für eine erfolgreiche Reifung und Stabilisierung der Strukturen muss die direkte Kokultur beider Zellarten weiter optimiert werden, um die erfolgreiche Vaskularisierung und Ausbildung der funktionellen *Vasa Vasorum* (kleine Arterien und Venen in der Wand großer Blutgefäße) zu induzieren.

Die hämodynamischen Kräfte, die *in vivo* aufgrund des Blutflusses stetig auf die Endothelzellen wirken, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Barrierefunktion und damit einhergehend auf die Zellmorphologie, die Zell-Zell-Verbindungen und die Endothelpermeabilität und regulieren somit die Funktion des Endothels. Für die Etablierung einer funktionsfähigen Endothelzellschicht innerhalb der bioartifiziellen Gefäßprothese wurde daher der Einfluss einer dynamischen Kultivierung auf HUVECs in Durchfluskkammern untersucht. Da Endothelzellen die Blutgefäße in einer Einzelschicht von innen auskleiden, entspricht diese Versuchsdurchführung als vereinfachtes Modell den *in vivo* Bedingungen. Zudem soll für die spätere Entwicklung der bioartifiziellen Gefäßprothese die Adhäsion der Zellen auf der künstlichen Gerüststruktur durch die Beschichtung dieser mit Patienteneigenem Fibrin optimiert werden. In Analogie dazu wurde daher zunächst die Beschichtung der Durchfluskkammern mit Fibrinogen durchgeführt, einem Proteinkomplex der aus 6 Untereinheiten besteht und durch enzymatische Reaktion mit Thrombin ein Fibrinigel ausbildet. Durch Optimierung der Oberflächenbeschichtung in den Durchfluskkammern mit Fibrinogen und Bestimmung der optimalen initialen Zellzahl der HUVECs von $1,5 \cdot 10^5$ konnte nach experimenteller Analyse der dynamischen Viskosität des Zellkulturmediums die dynamische Kultivierung der HUVECs mit definierten Scherspannungen von 5 dyn/cm^2 und 20 dyn/cm^2 durchgeführt werden, einem Scherspannungsbereich, der laut Dai *et al.* überwiegend in größeren geraden Gefäßsegmenten auftritt. Durch Analyse der Zellmorphologie, der VE-Cadherin-Bindungen und der Aktinfilament-Struktur wurde bestätigt, dass eine optimale Ausrichtung der Zellen nach 120 h unter laminarer Strömung erreicht wurde. Zusätzlich konnte mittels ECIS eine Zunahme der Barrierefunktion über den Verlauf der dynamischen Kultivierung unter 20 dyn/cm^2 beobachtet werden. Für die Etablierung einer dynamischen Kultivierung von HUVECs auf einer tubulären Gerüststruktur ist zu beachten, dass der Scherstress und damit einhergehend der applizierte Volumenstrom über einen Zeitabschnitt von mehreren Stunden langsam gesteigert werden sollte, um eine Konditionierung und Adaption der Zellen an die neue Mikroumgebung zu gewährleisten.

Zusammengenommen konnten in der vorliegenden Arbeit erfolgreiche Kultivierungsstrategien für die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese etabliert werden. Weiterhin muss jedoch die Auswahl einer geeigneten autologen Zellquelle für die Ausbildung eines funktionsfähigen Endothels optimiert werden. Eine weiterführende Strategie ist die Zell-Sortierung der isolierten Gesamtpopulation von Stammzellen aus dem Fettgewebe mittels Durchflusszytometrie. So ließen sich bereits prävasculärer Untertypen selektieren, die positiv für den Oberflächenmarker CD31 sind und daher ein erhöhtes Potenzial für die Differenzierung in Endothelzellen aufweisen könnten und diesen Phänotyp dann auch nachhaltig beibehalten. Alternativ könnten auch autologe endotheliale Progenitorzellen (EPCs), die einfach aus dem peripheren Blut eines Patienten isoliert werden können, Anwendung in der Entwicklung der bioartifiziellen Gefäßprothese finden. Als autologer Zellersatz für die in der vorliegenden Arbeit beforschten HUVECs könnten die EPCs unter definierten Kultivierungsbedingungen zu adulten Endothelzellen differenziert werden und durch Konditionierung unter laminarer Strömung ein funktionsfähiges Endothel ausbilden und andererseits durch Kokultivierung mit AD-hMSCs zur Ausbildung eines vaskulären Netzwerks aus kapillären Strukturen dienen.

Auch die Wahl eines geeigneten synthetischen Materials für die Erstellung einer dreidimensionalen Gerüststruktur, die zum einen zu Beginn der Kultivierung eine hohe Stabilität aufweist, um das Aufwachsen der Zellen und die dynamische Kultivierung zu ermöglichen, und zum anderen relativ zeitnah nach der Transplantation in den Organismus abgebaut und durch die aufgewachsenen Zellen ersetzt wird, muss weiter optimiert werden. Dabei könnte der 3D-Druck eine geeignete Methode für die Erstellung der röhrenförmigen Gerüststrukturen aus einem geeigneten synthetischen Material sein. Zusätzlich könnte die entstehende Struktur während des Druckprozesses bereits mit Proteinen aus der extrazellulären Matrix und den autologen Zellen besiedelt werden.

Die in dieser Arbeit in den Zellkulturplatten oder auf kleineren Gerüststrukturen erfolgreich entwickelten Kultivierungsstrategien besitzen ein hohes Potential für die Entwicklung einer bioartifiziellen Gefäßprothese. Diese Strategien müssen in nachfolgenden Arbeiten auf das am Institut für Technische Chemie und Institut für Mikroelektroniksysteme in Kooperation entwickelte und bereits funktionsfähige Bioreaktorsystem übertragen und entsprechend modifiziert werden. Das Reaktorsystem verfügt über einen inter- und extratubulären Kultivierungsstrom, die getrennt voneinander analysiert und konditioniert werden können. So ist eine Konditionierung der Endothelschicht durch eine pulsatile Perfusion, die den *in vivo*

Bedingungen entspricht, möglich. Das Monitoring der Mikroumgebung (pH, pO₂, pCO₂, Glukose, Laktat) der besiedelten Gerüststrukturen in dem Reaktorsystem erfolgt über elektrochemische und optische Sensoren sowie Biosensoren. Durch das in der vorliegenden Arbeit optimierte Kultivierungssystem für Endothelzellen in den Durchflusskammern kann zunächst mittels Fließinjektionsanalyse der Glukose- und Laktatverbrauch in dem System online überwacht werden und die ermittelten Ergebnisse als Basis für die Kultivierung von Zellen auf einer 3D-Gerüststruktur in dem Reaktorsystem verwendet werden.

6 Anhang

6.1 Ergänzendes Material

Tab. 6.1-1: Übersicht über den Verlauf der dynamischen Kultivierung von HUVECs unter einer Scherspannung von 5 dyn/cm² in den ECIS-Durchflusskammern.

Zeitpunkt	Volumenstrom	Widerstand (R)/Kapazität (C)	beobachtetes Zellverhalten
2,5 h-3,5 h	0,5 ml/min (0,7 dyn/cm ²)	steigt/sinkt: - auf das Abflachen der Zellen zurückzuführen dann sinkt/steigt: -verringerte Adhärenz auf den Elektroden	- Zellen überlappen teilweise - leichtes Abflachen der Zellprofile - verringerte Zelladhärenz und dadurch verringerte Konfluenz
3,5 h-6,5 h	0 ml/min (0 dyn/cm ²)	- sinkt/steigt kurz dann steigt/sinkt: - Zellen adhäreren wieder auf Elektroden	- Zellkonfluenz steigt wieder auf 100 %
6,5 h-9,5 h	0,5 ml/min- 2 ml/min (0,7 dyn/cm ² - 2,8 dyn/cm ²)	steigt/sinkt: - auf das Abflachen der Zellen zurückzuführen dann sinkt/steigt: -Zellen überlappen nicht mehr so stark = R sinkt	- Zellen überlappen teilweise - kurzzeitig verringerte Zelladhärenz - Abflachen der Zellprofile
9,5 h-43 h	3,5 ml/min (5 dyn/cm ²)	sinkt/steigt: Zellen überlappen nicht mehr und VE-Cadherin-Bindung zwischen den Zellen noch nicht vollständig ausgebildet dadurch starker transzellulärer Stromfluss = R sinkt C steigt = Zellen wachsen aufgrund 100 %igen Konfluenz in die Höhe	Zellen und Aktinfilamente richten sich senkrecht zur laminaren Strömung aus VE-Cadherin-Bindungen durch Ausrichtung der Zellen senkrecht zum laminaren Strom stärker beansprucht
43 h-103 h	3,5 ml/min (5 dyn/cm ²)	konstant:	Zellen und Aktinfilamente richten sich langsam entlang der laminaren Strömung aus verstärkte Ausbildung von VE-Cadherin-Bindungen
103 h-168 h	3,5 ml/min (5 dyn/cm ²)	Steigt/sinkt R steigt = VE-Cadherin-Bindung zwischen Zellen nehmen zu = enge Zell-Zell-Kontakte, dadurch fließt weniger Strom transzellulär	Zellen und Aktinfilamente entlang der laminaren Strömung ausgerichtet Starke Ve-Cadherin-Bindungen = enge Zell-Zell-Kontakte geringes Migrationsverhalten

Tab. 6.1-2: Übersicht über den Verlauf der dynamischen Kultivierung von HUVECs unter einer Scherspannung von 20 dyn/cm² in den ECIS-Durchflusskammern.

Zeitpunkt	Volumenstrom	Widerstand (R)/Kapazität (C)	beobachtetes Zellverhalten
2,5 h-4,8 h	0,5 ml/min- 3,5 ml/min (0,7 dyn/cm ²)- (5 dyn/cm ²)	- sinkt/steigt kurzzeitig: - auf vorheriges anschließen des Schlauchsystems zurückzuführen - dann steigt/sinkt: - auf das Abflachen der Zellen zurückzuführen	- Zellen liegen teilweise übereinander - leichtes Abflachen der Zellprofile - starkes Migrationsverhalten
4,8 h-9 h	7 ml/min (10 dyn/cm ²)	- steigt/sinkt: - Zellen liegen teilweise noch übereinander dadurch ist der parazelluläre Stromfluss noch geringer=R steigt	Teilweise Ausrichtung entlang laminarer Strömung/ teilweise Bildung von <i>cobblestone</i> (Pflasterstein) Morphologie
9 h-20 h	14,1 ml/min (20 dyn/cm ²)	sinkt/konstant: Zellen überlappen nicht mehr, dadurch starker transzellulärer Stromfluss = R sinkt C konstant = Zellprofile durch einsetzende laminare Strömung noch sehr flach = hoher kapazitärer Stromfluss	Zellprofil wirkt stark abgeflacht, teilweise stark längliche Ausrichtung der Zellen, teilweise <i>cobblestone</i> Morphologie
20 h-50 h	14,1 ml/min (20 dyn/cm ²)	sinkt/steigt: R sinkt = starker transzellulärer Strom da VE-Cadherin-Bindung zwischen den Zellen noch nicht vollständig ausgebildet = kleine Lücken zwischen den Zellen C steigt = Zellen wachsen aufgrund 100 %iger Konfluenz in die Höhe	Zellen und Aktinfilamente richten sich senkrecht zur laminaren Strömung aus VE-Cadherin-Bindungen durch Ausrichtung der Zellen senkrecht zum laminaren Strom stärker beansprucht
50 h-120 h	14,1 ml/min (20 dyn/cm ²)	steigt/sinkt: R steigt = VE-Cadherin-Bindung zwischen Zellen nehmen zu = enge Zell-Zell-Kontakte, dadurch fließt weniger Strom transzellulär	Zellen und Aktinfilamente richten sich langsam entlang der laminaren Strömung aus verstärkte Ausbildung von VE-Cadherin-Bindungen
120 h-168 h	14,1 ml/min (20 dyn/cm ²)	konstant	Zellen und Aktinfilamente entlang der laminaren Strömung ausgerichtet Starke Ve-Cadherin-Bindungen = enge Zell-Zell-Kontakte geringes Migrationsverhalten

6.2 Material

6.2.1 Chemikalien

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
α -Minimum Essential Medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BME cultrex	AMS Biotechnology, Cambridge, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Calcein-AM	Promega GmbH, Mannheim
Calciumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eisessig	AppliChem GmbH, Darmstadt
Endothelzellmedium II Ready-to-use	PromoCell GmbH, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Fibrinogen	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Gentamycin	Biochrom GmbH, Berlin
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Humanserum (HS)	c. c. pro GmbH, Oberdorla
Isopropanol 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Mycophenolsäure	VWR International GmbH, Darmstad
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Nonidet-P40	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

PMSF	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Sodium Deoxycholate	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tacrolimus (FK506)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Thrombin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Trypan Blue	VWR International GmbH, Darmstad

6.2.2 Puffer

DAPI-Färbepuffer	100 mM Tris, pH = 7 150 mM Natriumchlorid 1 mM Calciumchlorid 0,5 mM Magnesiumchlorid 0,1 % Nonidet-P40 steril filtrieren
DAPI-Stammlösung	500 µg/ mL DAPI in dH ₂ O
DAPI-Färbelösung	2 µL DAPI-Stammlösung/mL DAPI-Färbepuffer
Paraformaldehyd-PBS-Puffer (4 % PFA)	200 mL dH ₂ O auf 60°C erhitzen 10 g Paraformaldehyd hinzufügen, rühren 50 µL Natronlauge (10 N) hinzugeben, rühren 25 mL 10x PBS hinzugeben Mit dH ₂ O auf 250 mL auffüllen steril filtrieren
RIPA-Puffer	150 mM NaCl 1 % TritonX-100 0,5 % sodium deoxycolat 50 mM Tris, pH 8 1 mM EDTA + 2 µl PMSF
Tris-EDTA (TE)-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH = 8

Tris-Azetat-EDTA Puffer (TAE)	40 mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris-Base) 20 mM Eisessig 1 mM EDTA pH 8,0
vWF-Puffer	10 mM PBS 1 % BSA 0,09 % Natriumazid (NaN ₃)

6.2.3 Analyse-Kits

CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
Apo-One Homogeneous Caspase-3/7	Promega GmbH, Mannheim
Cytotoxicity Detection Kit ^{Plus} LDH	Hoffmann-LaRoche, Basel
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
RNA-Isolation RNeasy Mini Kit Plus	Qiagen GmbH, Hilden
Bio-Plex Pro Reagent Kit (I, II und III)	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Human Cytokine Group I Standards 27-Plex	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Human Cytokine Group I 5-plex Assay (IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, PDGF-BB)	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Human Cytokine Group II 2-plex Assay (ICAM-1, VCAM-1)	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 1 16-plex Standards 1-pk	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Pro Human Cancer Panel 1 Set (FGF-basic, PECAM-1, sTie-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2)	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panel 2 (Angiopoetin-2, PLGF, VEGF-A, IL-6)	BioRad Laboratories GmbH, München
MagPix Calibration Kit	BioRad Laboratories GmbH, München
MagPix Verification Kit	BioRad Laboratories GmbH, München
MagPix Drive Fluid	BioRad Laboratories GmbH, München

6.2.4 Primer, Enzyme, Größenstandard und Elektrophorese

Primer

Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Tab. 6.2-1: Übersicht über die verwendeten Primer für die Analyse der Gentranskription in den AD-hMSCs mittels qRT-PCR. Zusätzlich sind die optimierte Hybridisierungstemperaturen der Primer und die Produktlänge angegeben.

Gen	NCBI Referenznummer der mRNA Sequenz	Primersequenz	Hybridisierungstemperatur (°C)	Produktlänge
<i>tbp</i>	NM_001172085	for: 5'ggt gct aaa gtc aga gca gaa3' rev: 5'caa ggg tac at gaga gcc att a3'	61	100
<i>rpl13a</i>	NM_012423	for: 5'gcc tac aag aaa gtt tgc cta tc3' rev: 5'tgg ctt tct ctt tcc tct tct c3'	60	104
<i>b2m</i>	NM_004048	for: 5'cca gcg tac tcc aaa gat tca3' rev: 5'tgg atg aaa ccc aga cac ata g3'	61	94
<i>ywhaz</i>	NM_001135702	for: 5'cac tta caa ggc tgt ggt aga a3' rev: 5'gca gct gta gtc aaa ggt gta3'	62	100
<i>vegfa</i>	NM_001171626	for: 5'tgg tgt ctt cac tgg atg tat tt3' rev: 5'agt ctc tca tct cct cct ctt c3'	61	99
<i>angpt1</i>	NM_001146	for: 5'taa cag gag gat ggt ggt ttg3' rev: 5'aac tgg gcc ctt tga agt ag3'	60	123
<i>angpt2</i>	NM_001118888	for: 5'gga cca aag caa gac cct aaa3' rev: 5'tga cag cag cgt ctg taa ac3'	60	109
<i>hif1a</i>	NM_001243084	for: 5'gtc tgc aac atg gaa gg tatt g3' rev: 5'gca ggt cat agg tgg ttt ct3'	61	103
<i>bfgf</i>	NM_002006	for: 5'gca gtg gct cat gcc tat att3' rev: 5'ggt ttc acc agg ttg gtc tt3'	60	92
<i>plgf</i>	NM_001293643	for: 5'cac ccg gct cgt gta ttt att a3' rev: 5'gag gca ttc agc agg gaa a3'	62	98
<i>ccl2</i>	NM_002982	for: 5'ggc tga gac taa ccc aga aac rev: 5'gaa tga agg tgg ctg cta tga	63	106
<i>Il-6</i>	NM_001318095	for: 5'cct aga gta cct cca gaa cag a3' rev: 5'cag gaa ctg gat cag gac tt3'	62	88
<i>tek</i>	NM_001290078	for: 5'gac tgt gga caa gg gaga taa c3' rev: 5'ggc act gaa tgg atg aag ga3'	60	105

SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

5x Green GoTaq Reaktionspuffer

Promega GmbH, Mannheim

GoTaq Polymerase

Promega GmbH, Mannheim

dNTP-Mix

Promega GmbH, Mannheim

GoTaq qPCR Mastermix

Promega GmbH, Mannheim

Roti-Safe GelStain

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

GeneRule™ 100 bp DNA Ladder Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

6.2.5 Antikörper

Rabbit anti Human collagen I/II/III/IV/V antibody	BioRad Laboratories GmbH, München Biorad
CD31 polyklonaler Antikörper	Bioss Antibodies, Woburn, USA
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-VE-cadherin antibody – Intercellular Junction Marker	Abcam, Cambridge, UK
FITC-Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Genemed Biotechnologies Inc., San Fransisco, USA
Rabbit anti-Von Willebrand Faktor	Genemed Biotechnologies Inc., San Fransisco, USA
Phalloidin-iFluor 555 Reagent-CytoPainter	Abcam, Cambridge, UK

6.2.6 Verbrauchsmaterial

Angiogenesis µ-slide	ibidi GmbH, München
µ-slide ^{0,4} I Luer (ibitreat, uncoated)	ibidi GmbH, München
µ-slide ^{0,8} I Luer (uncoated)	ibidi GmbH, München
CryoPure-Gefäße 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
ECIS 1 Channel Flow Array 10E	ibidi GmbH, München
Gewebekulturplatten (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Gewebekulturplatten (6-Well, 96-Well)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Greiner 96-Wellplatte U-Boden , Cellstar®	VWR International GmbH, Darmstadt
Luer-Lock-Anschlüsse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mediumfilter: Sartolab P20 plus	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Multipipette-Aufsätze: Combitips BioPur	Eppendorf AG, Hamburg
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Platten	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Pipettenspitzen (10 µl, 20-200 µl, 1000 µl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schlauchverbinder	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sterilfilter 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt
3-Stopper-Schlauch (1,14 mm, 2,79 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Stripette Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Inc., NY, USA
Stripette Pipette (50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Inserts 0,4, 6-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Verlängerungsschlauch (2,79 mm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
Zellsieb (70 µm Nylon)	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning Inc., NY, USA

6.2.7 Geräte

Absorptions-Plattenleser: Epoch	BioTek Instruments Inc., Vermont, USA
Agarosegel-Elektrophorese-System	Thermo Scientific, Waltham
BioPlex [®] MagPix [™] Multiplex Reader	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex Manager MP Software	BioRad Laboratories GmbH, München
CO ₂ -Inkubator: Heracell 150 iCu, O ₂ Regelung	Thermo Scientific, Waltham
ECIS [™] Model Z Theta	Applied BioPhysics, Troy, USA
Fluoreszenzanregung: LED pE-300	Olympus Corporation, Tokio
CXK53 Filterset (blau & grün Anregung)	Olympus Corporation, Tokio
DAPI-Filterset	Olympus Corporation, Tokio
Fluoreszenzmikroskop Olympus CKX3	Olympus Corporation, Tokio
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50	Olympus Corporation, Tokio
Flüssigkeitsabsaugsystem: BioChem VacuCenter	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Gradienten-PCR-Thermocycler	VWR International GmbH, Darmstadt
Inkubatormikroskop: Lumascope LS520	IL-Biosystems GmbH, Königswinter

INTAS UV Dokumentationssystem	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
iQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System	BioRad Laboratories gmbH, München
Kamera: Jenoptik Progres Gryphax Kapella	Jenoptik Optical Systems GmbH, Jena
4-Kanal Pumpe Ismatec Reglo ICC	IDEX Health & Science, Wertheim
Konfokalmikroskop Leica TCS SP8 X	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Laborschüttler IKA MTS 4	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau
Magnetrührer: Cimarec i Mono Direct	Thermo Scientific, Waltham
Mehrkanalpipette 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten-Leser Fluoroskan Ascent	Thermo Scientific, Waltham
Mikrotiterplatten-Leser: SpectraMax i3x	Molecular Devices Germany GmbH, Ismaning
Mini-Zentrifuge: minispin plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multipette Stream	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipettierhilfe: Accujet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Reinstwasseranlage	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Rheometer	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Rotationsschüttler: Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sterilbank Herasafe 2020	Thermo Scientific, Waltham
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer IKA MS3 basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau
Wasserbad Memmert WNB22	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
YSI 2700 SELECT analyzer	YSI Incorporated Life Sciences, Yellow Springs, USA
Zentrifuge: Heraeus Megafuge 8	Thermo Scientific, Waltham
Zentrifuge mit Kühlung: MicroStar 17R	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifuge für PCR-Platten: 5430	Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifuge Thermo Heraeus Fresco 17 centrifuge

Thermo Scientific, Waltham

Centrifuge 5702

Eppendorf AG, Hamburg

7 Methoden

7.1 Zellkultur

7.1.1 Grundlagen der Zellkulturtechnik

7.1.1.1 Revitalisierung von Primärzellen

Die tiefgefrorenen Primärzellen (AD-hMSCs und HUVECs) werden dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort in einem 37°C warmem Wasserbad durch leichtes schwenken des Kryoröhrchens aufgetaut. Die Zellsuspension wird im Anschluss in eine Zellkulturflasche überführt, in der bereits 10 ml (T75 - Flasche) bzw. 24 ml (T175 - Flasche) warmes Medium vorgelegt sind. Durch leichtes Schwenken der Kulturflasche werden die Zellen gleichmäßig auf der Wachstumsfläche verteilt. Die Zellen werden bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Ist der Großteil der Zellen am darauffolgenden Tag auf der Wachstumsfläche adhärirt, wird das Kulturmedium in der Zellkulturflasche gewechselt. Hierzu wird das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und durch die gleiche Menge an neuem 37°C warmem Medium ersetzt. Dabei wird das Kulturmedium so in die Zellkulturflasche pipettiert, dass die Zellen dadurch nicht von der Wachstumsfläche abgespült werden. Die Zellen werden weiter bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ kultiviert, bis die Wachstumsfläche zu 80 % - 90 % konfluent bewachsen ist. Die HUVECs werden in *Endothelial Cell Growth Medium 2* (EGM-2) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) sowie 0,5 % Gentamycin kultiviert. Die AD-hMSCs werden in *α-Minimum Essential Medium* (MEM) mit 10 % Humanserum und 0,5 % Gentamycin kultiviert.

7.1.1.2 Kultivierung und passagieren von Primärzellen

Ist die Wachstumsfläche der Zellkulturflasche zu 80 % - 90 % konfluent mit Zellen bewachsen (3 - 4 Tage) müssen die Zellen passagiert werden. Passagieren beschreibt das Ablösen der adhärenen Zellen von der Wachstumsfläche und aufteilen auf neue Kulturgefäße. Bei einer 100 %igen Konfluenz wird aufgrund des Platzmangels und einer damit einhergehenden Kontaktinhibierung die Proliferation der Zellen gehemmt. Zudem wird eine Vereinzlung der Zellen nach dem Ablösen schwieriger und führt zu einer ungenauen Zellzahlbestimmung. Um die Zellen von der Zellkulturoberfläche abzulösen werden diese

zunächst mit warmem 1 x PBS gewaschen um lösliche Proteine von der Zelloberfläche abzuwaschen. Dieser Schritt ist notwendig damit Accutase, eine Lösung aus proteolytischen Enzymen, effizient die Peptidbindungen der Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Kontakte hydrolysieren kann. Die Zellen werden für 5 - 10 min bei 37°C mit der Accutase (T75 = 3 ml, T175 = 4 ml) inkubiert. Durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche kann das Ablösen der Zellen unterstützt werden. Nach spätestens 10 min muss die enzymatische Reaktion der Accutase unterdrückt werden, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Wenn alle Peptidbindungen zwischen den Zellen und der Wachstumsfläche gespalten sind, hydrolysiert die proteolytisch wirksame Lösung Proteine in der Zellmembran, was zu einem Membranzusammenbruch und dadurch zum Sterben der Zellen führt. Die enzymatische Reaktion der Accutase kann durch die Zugabe der gleichen Menge an Kulturmedium (3 ml bzw. 4 ml), das Serum enthält, gestoppt werden. Die Zellen werden anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Gemisches vereinzelt und suspendiert. Das Zellgemisch wird in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen werden für 5 min bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in einer definierten Menge an Kulturmedium resuspendiert. Für die Bestimmung der Zelldichte werden 20 µl der Zellsuspension entnommen und 1:2 mit Trypanblau vermischt. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff der tote Zellen blau anfärbt. Die Zelldichte wird mittels einer Neubauer *Improved* Zählkammer ermittelt. Ungefähr 7 µl des Zell-Trypanblau-Gemischs werden auf den Mittelsteg pipettiert und durch Kapillarkräfte werden diese unter das Deckgläschen gezogen. Für die Bestimmung der Zelldichte werden die Zellen in den 4 Großquadraten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser wird aufgrund der Trypanblau-Verdünnung mit dem Faktor 2 multipliziert und das Produkt wird wiederum mit 10^4 multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen.

7.1.1.3 Kryokonservierung von Primärzellen

Für die Kryokonservierung der Primärzellen wird zunächst das Kryomedium vorbereitet. Dieses setzt sich zusammen aus 70 % Basalmedium, 20 % Humanserum (AD-hMSCs) bzw. FKS (HUVECs) sowie 10 % DMSO. Das Kryomedium wird bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Nachdem die Zelldichte bestimmt wurde, werden die Zellen erneut für 5 min bei 300 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet anschließend in Kryomedium resuspendiert, sodass $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter vorhanden sind. 1 ml der Zellsuspension wird in jedes Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen werden direkt in Kryo-Einfriergerät (Mr. Frosty) gestellt und für mindestens 24 h bei -80°C

eingefroren. Für die Langzeitlagerung der Zellen werden die Kryoröhrchen in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt.

7.1.2 Toxizitätstestung in 2D und 3D sowie Etablierung und Kultivierung von Sphäroiden

Für die Toxizitätstestung von Tacrolimus und MPA in einer 2D-Zellkultur wurden je 100 µl einer Zellsuspension aus HUVECs in EGM-2 mit einer Zelldichte von $8 \cdot 10^4$ Zellen/ml in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesiedelt und für 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Im nächsten Schritt wird das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit einer Verdünnungsreihe von Tacrolimus (10 µg/ml-70 µg/ml) bzw. MPA (0,12 µg/ml-480 µg/ml) sowie 0,4 % DMSO, welches als Lösungsmittel für die Immunsuppressiva verwendet wird, für weitere 24 h inkubiert.

Die Toxizitätstestung von Tacrolimus in einer 3D-Zellkultur wird mit HUVEC-Sphäroiden durchgeführt. Für die Formation von Sphäroiden aus HUVECs wird zunächst eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von $8 \cdot 10^4$ HUVECs/ml in EGM-2 hergestellt. Jeweils 100 µl der Zellsuspension werden auf eine nicht adhärente 96-Well-Zellkulturplatte mit U-förmigem Boden aufgetragen. Die Zellen werden 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Aufgrund des U-förmigen Bodens strömen die Zellen während der Inkubationszeit in die Mitte der Vertiefungen und lagern sich zu Zellagglomeraten (Sphäroiden) zusammen. Nach 24 h werden 60 µl des Mediums entfernt und die Sphäroide für weitere 24 h mit definierten Tacrolimuskonzentrationen (18 ng/ml-70 µg/ml in EGM-2), sowie 0,35 % DMSO in einem Endvolumen von 160 µl inkubiert. Zusätzlich wird in beiden Versuchsdurchführungen eine Negativkontrolle ohne Zusatz der Immunsuppressiva kultiviert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgt mittels CellTiter Blue Assay. Die optische Analyse der Sphäroide wird direkt vor und 24 Stunden nach der Tacrolimus-Behandlung mittels Umkehrlichtmikroskop Olympus IX50 und der CellSens-Software (Olympus SC30, Japan) durchgeführt. Der Durchmesser (nach Höhe und Breite bei wiederholten Messungen) und die Fläche der Sphäroide werden mit der Software cellSens bestimmt.

7.1.3 Angiogenese Assay

Um die Fähigkeit von Endothelzellen zur Bildung von kapillarähnlichen Strukturen nach der Behandlung mit definierten Tacrolimuskonzentrationen zu testen, wird ein Angiogenese-

Assay gemäß des Herstellerprotokolls (ibidi, München, Deutschland) durchgeführt. *Cultrex*[®] *Basalmembran Extrakt* (BME) aus der *Engelbreth-Holm-Swarm* Zelllinie wird auf Eis aufgetaut und je 10 µl des Extrakts werden in die Vertiefungen des *ibidi µ-slides Angiogenesis* pipettiert. Die *µ-slides* werden für mindestens 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert um eine Polymerisation des Extrakts zu ermöglichen. Im nächsten Schritt werden $1 \cdot 10^5$ HUVECs in je 50 µl EGM-2, das mit verschiedenen Tacrolimuskonzentrationen (0 µg/ml; 18 ng/ml; 40,2 µg/ml; 70 µg/ml) versetzt wird, resuspendiert und je Vertiefung auf die auspolymerisierte Matrix aufgetragen. Die *µ-slides* werden für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie werden nach 24 h Aufnahmen von den Zellen gemacht und die Bildung der kapillarähnlichen Strukturen mit der Angiotool[®] Software quantitativ ausgewertet. Dazu wurden folgende Einstellungen verwendet: *vessel diameter* = 12 µm, *vessel intensity* = 15-255 und *fill holes* = 240.

7.2 Analyse der Zellvitalität und Zellviabilität von primären Zellen

7.2.1 CellTiter Blue Assay (CTB)

Die Zellvitalität kann durch Analyse der metabolischen Aktivität der Zellen mit Hilfe des CellTiter Blue (CTB) Assay bestimmt werden. Der blaue Farbstoff Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-10-ium-7-olate) wird durch die metabolische Aktivität der lebenden Zellen zum pinken Farbstoff Resorufin (3-Oxo-3H-phenoxazin-10-ium-7-olate) reduziert. Nach Ablauf der Reaktion (2D-Kultur=2 h; Sphäroide=4 h) wird die Bildung des Produkts Resorufin photometrisch mittels Fluoreszenzmessung bei einer Wellenlänge von 544 nm bestimmt. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Zellzahl bzw. Zellvitalität. In der 2D-Toxizitätstestung wird das Medium nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen für den folgenden Lactatdehydrogenase-Nachweis abgenommen und die Zellen mit je 100 µl einer CTB-Lösung (CTB-Reagenz 1:10 mit EGM-2-Basalmedium (ohne FKS und Gentamycin) verdünnt) für 2 h bei 37°C inkubiert. In der 3D-Sphäroid-Kultur werden je Vertiefung 120 µl der 160 µl Medium abgenommen und durch 120 µl CTB-Lösung ersetzt, sodass eine finale CTB-Konzentration von 10 % je Vertiefung erreicht wird.

7.2.2 Nachweis von Apoptose (Caspase 3/7)

Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod unter genetischer Kontrolle, der vor allem durch eine Hochregulation der Caspasen-3 und -7 in den Zellen ausgelöst wird. Hierbei bleibt die Zellmembran intakt. Daher werden die Zellen zunächst lysiert. Ein Nachweis der freigesetzten Caspasen erfolgt mit Hilfe des Apo-ONE[®] Homogenase Caspase-3/7 Assay. Ein nicht-fluoreszierendes Substrat wird durch die freigesetzten Caspasen-3/7-Enzyme zu einem fluoreszierenden Substrat umgesetzt, das bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und einer Wellenlänge von 538 nm detektiert wird.

Für den Nachweis der Caspasen-3/-7 werden $8 \cdot 10^3$ HUVECs/Vertiefung in einer 96-Wellplatte ausgesiedelt und für 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Anschließend werden 100 µl einer Tacrolimuslösung (0 µg/ml-80 µg/ml in EGM-2) auf die Zellen gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Nachdem die Überstände für den folgenden Lactatdehydrogenase-Nachweis abgenommen worden sind und die Zellvitalität mittels CTB-Assay bestimmt worden ist, wird in jede Vertiefung 50 µl fertiges ApoONE-Reagenz und 50 µl EGM-2-Basalmedium gegeben. Die Platte wird für 30 sec bei 300 rpm geschüttelt, für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Fluoreszenzplattenleser vermessen.

7.2.3 Nachweis von Nekrose (Lactatdehydrogenase)

Die Nekrose beschreibt einen Zelltod, der durch eine zelluläre Schädigung ausgelöst wird. Diese führt zu Membrandefekten und damit verbunden zu einem irreversiblen Verlust der Zellfunktion und der Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) aus den Zellen. Der Nachweis von Nekrose erfolgt mit dem Cytotoxicity Detection Kit, mit dem die Aktivität von freigesetztem LDH enzymatisch bestimmt wird. Durch die LDH-katalysierte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat wird NAD⁺ in einem ersten Schritt zu NADH/H⁺ reduziert. Im zweiten Schritt reduziert der Katalysator das Tetrazoliumsalz INT zu Formazan. Die Absorption wird bei 490 nm und 690 nm in einem Plattenleser bestimmt. Die gemessene Absorption ist proportional zu der freigesetzten Menge an LDH.

Für den Nachweis von LDH werden $8 \cdot 10^3$ HUVECs/Vertiefung in einer 96-Wellplatte ausgesiedelt und für 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Anschließend werden 100 µl einer Tacrolimuslösung (0 µg/ml-80 µg/ml in EGM-2) auf die Zellen gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Je 50 µl der Überstände werden abgenommen, auf eine neue Zellkulturplatte übertragen und mit je 50 µl des fertig angesetzten LDH-Reagenzes gemischt.

Die Proben werden für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch Hinzufügen von 25 µl Stopp-Lösung wird die Reaktion abgebrochen und die Proben anschließend im Plattenleser vermessen.

7.2.4 Zellfärbung mittels Calcein-Acetoxyethyl und Propidiumiodid

Die Viabilität der Zellen kann durch eine Lebend-/Tot-Färbung mittels Calcein-Acetoxyethyl (AM) und Propidiumiodid bestimmt werden. Calcein-AM ist ein nicht fluoreszierender Ester, der durch die Zellmembran transportiert werden kann. Durch enzymatisch wirkende Esterasen wird im Zytoplasma die Acetoxyethylgruppe abgespalten. Das dadurch entstehende Calcein bildet mit Calciumionen einen fluoreszierenden Komplex der die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Da aktive Esterasen in toten Zellen nicht vorhanden sind, werden nur lebende Zellen angefärbt. Propidiumiodid färbt hingegen nur abgestorbene, nekrotische Zellen, da es die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann. Der Farbstoff interkaliert in der Zelle in die Nucleinsäuren.

Für die Fluoreszenzfärbung der Zellen wird eine Calcein-AM und eine Propidiumiodid Arbeitslösung hergestellt. Dafür wird die Calcein-AM Stocklösung (1 mg/ml in DMSO) 1:30 in PBS und anschließend 1:10 in EGM-2-Basalmedium verdünnt. Die Propidiumiodid Stocklösung (1 mg/ml) wird 1:20 in PBS verdünnt und je 100 µl der fertig verdünnte Calcein-AM Färbelösung mit 1 µl Propidiumiodid-Arbeitslösung versetzt. Das Medium wird von den Zellen abgesaugt und diese anschließend mit der Calcein-AM/Propidiumiodid-Färbelösung für 1 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Mittels Fluoreszenzmikroskop kann die Färbung der Zellen sichtbar gemacht werden (CXK53 Fluoreszenzfilterset: blaue und grüne Anregung). Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

7.3 Metabolismus und Expressionsverhalten der AD-hMSCs

7.3.1 Konditionierung von AD-hMSCs

Um das Differenzierungspotential von AD-hMSCs sowie die Expression und Sekretion verschiedener Biomarker zu analysieren werden die AD-hMSCs unter definierten Bedingungen kultiviert. Dafür werden $3 \cdot 10^3$ AD-hMSCs/cm² in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausplattiert und für 3 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert bzw. $4,75 \cdot 10^3$ AD-hMSCs/cm² für 2 Tage bei den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend

werden die AD-hMSCs ohne erneuten Mediumwechsel über einen Zeitraum von 14 Tagen unter statisch-normoxisch (SN), statisch-hypoxisch (SH), dynamisch-normoxisch (DN) und dynamisch-hypoxisch (DH) Bedingungen kultiviert. Für die dynamische Kultivierung werden die Zellkulturplatten auf einem Orbitalschüttler kultiviert. Dabei werden zwei Orbitalschüttler mit unterschiedlichen Auslenkungen verwendet. AD-hMSCs die bei einer Auslenkung von 10 mm bei 300 rpm kultiviert werden, erfahren eine Scherspannung von $\sim 8-16,5$ dyn/cm² und AD-hMSCs die bei einer Auslenkung von 20 mm und 175 rpm kultiviert werden eine Scherspannung von $\sim 7-14,7$ dyn/cm². Die Variation der Bedingungen ist in den spezifischen Unterkapiteln genauer aufgeführt. Die Berechnung der Scherspannung, die in den Zellkulturplatten auf die AD-hMSCs wirkt, wurde nach Dardik et al. durchgeführt [259]:

$$\tau = (r * \sqrt{\eta * \rho * (2 * \pi * rpm)^3}) / 100$$

τ = Scherspannung (Scherstress)

r = Radius in mm

η = Dichte der Flüssigkeit

ρ = dynamische Viskosität (mPa*s)

rpm = Umdrehungen pro Minute

Die hypoxische Kultivierung erfolgt bei 2,5 % O₂ und die normoxische Kultivierung bei 21 % O₂. Nach festgelegten Zeitpunkten, die in den jeweiligen Unterkapiteln genauer definiert sind, wird das konditionierte Medium von den Zellen abgenommen und für die Glukose/Laktat-Bestimmung als auch für die Analyse spezifischer Proteine im Protein-Multiplex-Assay verwendet. Zusätzlich werden Proteine und RNA aus den Zellen isoliert.

7.3.2 Glukose-Verbrauch und Laktat-Produktion

Für die Bestimmung der Glukose- und Laktat-Konzentration wurde 0,5 ml Medium nach 3, 7 und 14 Tagen der in Kapitel 7.3.1 beschrieben definierten Kultivierung der AD-hMSCs aus jeweils 6 Vertiefungen einer 6-Wellplatte entnommen, gepoolt und in Dreifachbestimmung mit Hilfe des YSI 2700 SELECT vermessen. Zusätzlich wurde die Glukose- und Laktatkonzentration in dem α -MEM-Medium vor dem Aussiedeln der AD-hMSCs (Negativkontrolle) sowie 2 Tage nach Aussiedeln der Zellen und vor Beginn der definierten Kultivierung vermessen.

7.3.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die AD-hMSCs aus je 6 Vertiefungen einer 6-Lochplatte werden nach 3, 7 und 14 Tagen unter DN und DH Kultivierung, sowie 2 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen (vgl. Kapitel 7.3.1), einmal mit PBS gewaschen und mittels Zellschaber von der Oberfläche abgelöst. Die Zellen werden für 10 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets bis zur Isolation der RNA bei -20°C gelagert. Die Isolation der kompletten RNA erfolgt mittels RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH) und wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA-Pellets werden mittels Druckluft getrocknet und in 40 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration sowie Reinheit der Proben wird mittels NanoDrop 1000-Messung bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die RNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) muss die isolierte RNA revers transkribiert werden. Dafür werden 1 µg/ml-2 µg/ml RNA (je nach Konzentration der RNA) mittels SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA wird bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

7.3.4 Primerdesign

Die Primerpaare (*forward* und *reverse*) werden mit dem *PrimerQuest Tool* von Integrated DNA Technologies (IDT, USA) unter Anwendung der Optionen *qPCR*, *2 Primer* und *Intercalating DNA* designt. Die designten Primer werden durch Thermo Fischer Scientific Inc. (UK) synthetisiert. Eine Übersicht der ausgewählten Primer ist in Tab. 6.2-1 zu finden.

7.3.5 Gradienten PCR

Mit Hilfe einer Gradienten-PCR werden die vom Hersteller angegebenen Primer-Hybridisierungstemperaturen überprüft bzw. optimiert. Dafür werden die cDNA Proben der AD-hMSCs 2 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen (Negativkontrolle) verwendet. Die lyophilisierten Primer werden mit RNase-freiem Wasser gelöst, sodass die Konzentration der Stocklösung 100 pmol/µl beträgt. Je 10 µl Stocklösung der *forward* und *reversed* Primer werden mit 80 µl H₂O vermischt, sodass die Primer 1:10 verdünnt vorliegen. Für die Gradienten-PCR werden je 50 µl Reaktionsgefäß folgende Reaktanden miteinander vermischt: 15,75 µl dH₂O, 5 µl Green GoTaq Reaktionspuffer, 1 µl cDNA, 2 µl dNTP-Mix,

1 µl Primer-Mix und 0,25 µl GoTaq Polymerase. In einem Gradienten-Thermocycler wird ein Temperatur-Gradient von 5°C zwischen der ersten und letzten Probe eingestellt (60°C - 65°C). Je Primerpaar werden 6 Proben bei definierten Hybridisierungstemperaturen (60°C; 60,7°C; 62,4°C, 62,8°C; 64,1°C und 65°C) inkubiert. Zunächst werden die Proben jedoch bei 95°C für 5 min denaturiert, dann werden 42 Zyklen aus drei Temperaturschritten, die jeweils 30 sec andauern, durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt die DNA-Denaturierung bei 95°C, im zweiten Schritt die Hybridisierung der Primer bei den zuvor definierten Temperaturen und als letzter Schritt wird der komplementären Strang bei 72°C gebildet. Nach durchlaufen der Zyklen findet bei 72°C über 5 min eine Vervollständigung der Stränge statt und anschließend werden die Proben auf 8°C herunter gekühlt. Zur Überprüfung der optimalen Hybridisierungstemperatur werden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt.

7.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Überprüfung der PCR-Produkte. Es wird ein 1 %iges Agarosegel hergestellt. Dafür wird 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer für 2 min in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt. Unter Rühren wird die Lösung leicht abgekühlt und 5 µl Roti-Safe GelStain, das in die DNA interkaliert, hinzugegeben. Die Lösung wird in eine Gelkammer gegossen in der bereits ein Kamm mit 12 Taschen eingesetzt ist. Nach 30 min ist das Agaroselösung auspolymerisiert und kann in die Gelelektrophoresekammer gelegt werden. Die Kammer wird mit TAE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel komplett bedeckt ist und der Kamm entfernt. 3 µl des DNA-Größenstandards *GeneRuler* 100 bp DNA *Ladder* wird mit 3 µl *Green* GoTaq Reaktionspuffer vermischt und sowie je 15 µl der Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird für 45 min bei 100 V durchgeführt und anschließend werden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und Bildaufnahmen angefertigt..

7.3.7 qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) basiert auf dem Prinzip der klassischen Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von Nukleinsäure, ermöglicht aber gleichzeitig eine Echtzeit-Quantifizierung der DNA-Konzentration. Während der PCR interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]Green in die vervielfältigten DNA-

Doppelstränge, wodurch die Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge zunimmt. Die Vervielfältigung der cDNA erfolgt in 45 Zyklen und am Ende eines jeden Zyklus wird die DNA-Menge mit Hilfe der Fluoreszenzsignale quantifiziert. Eine korrekte Quantifizierung ist jedoch nur in der exponentiellen Phase möglich. Da die Dauer der exponentiellen Phase abhängig von der Anzahl der cDNA-Kopien zu Beginn der qRT-PCR ist, wird für eine vergleichbare Quantifizierung der C_T -Wert oder auch Schwellenwert-Zyklus, der den Anfang des exponentiellen Wachstums beschreibt, gemessen. Die relative Quantifizierung der cDNA-Menge erfordert die Verwendung von Referenzgenen als interne Kontrolle, um Unterschiede in der Ausgangsmenge der mRNA auszugleichen. RPL13A und TBP werden als Referenzgene verwendet. Für die qRT-PCR werden je 50 μ l Reaktionsgefäß folgende Reaktanden miteinander vermischt: 10,5 μ l dH₂O, 1 μ l cDNA, 1 μ l Primer-Mix und 12,5 μ l GoTaq qPCR *Mastermix*. Die qRT-PCR wird mit Hilfe des iQ5 Multicolor *Real-time PCR Detection Systems* durchgeführt. Zunächst wird die cDNA für 10 min bei 95°C denaturiert. Es folgen 45 Zyklen aus drei Temperaturschritten. Bei 95°C wird die cDNA für 30 sec denaturiert, gefolgt von einer Anlagerung der Primer bei der zuvor ermittelten optimalen Hybridisierungstemperatur für 1 min und Verlängerung der neuen DNA-Stränge bei 72°C für 30 sec. Anschließend folgt eine abschließende Verlängerung aller DNA-Abschnitt bei 72°C für 5 min. Als Negativkontrolle wird ein Ansatz ohne cDNA verwendet. Nach abgeschlossener qRT-PCR-Reaktion werden die Schmelzkurven analysiert um unspezifische Bindungen der Primer auszuschließen.

Die mit der PCR-Effizienz korrigierten relativen Mengen werden nach Pfaffl *et al.* berechnet [260]. Um semiquantitative mRNA-Analysen der interessierenden Gene zu beurteilen, wird die Expressionsstabilität von 4 Referenzgenen (ribosomales Protein L13a (RPL13A), TATA-Bindungsprotein (TBP), Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase-Aktivierungsprotein, Zeta-Polypeptid (YWHAZ)) β 2-Mikroglobulin (B2M)) bewertet. Mit Hilfe der Algorithmen geNorm (v3.5) [261] und NormFinder (v0.953) [262] erfolgt die Identifikation der am stabilsten exprimierten Gene, die für alle weiteren Normalisierungen auf mRNA-Ebene verwendet werden. Die Transkriptniveaus ausgewählter Gene werden dann mit der modifizierten $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet.

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

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

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

7.3.8 Proteinisolation

Für die Proteinisolation werden je Spender und Kultivierungsbedingung AD-hMSCs aus den Vertiefungen von zwei 6-Wellplatten verwendet. Zuerst wird aus jeder der 12 Vertiefungen 0,1 ml Mediumüberstand abgenommen (pro Spender und Kultivierungsbedingung) und in einem Reaktionsgefäß gepoolt. Diese Proben enthalten die sezernierten Proteine und werden später separat mittels BioPlex-Assay vermessen.

Anschließend wird das restliche Medium verworfen und die Zellen in den 6-Wellplatten zunächst einmal mit kaltem PBS gewaschen, das im Anschluss vollständig aus den Vertiefungen entfernt wird. Anschließend werden 75 µl kalter RIPA-Puffer je Vertiefung auf die Zellen gegeben. Dafür werden vor jeder Isolierung 2 µl PMSF (500 mM) auf 1 ml RIPA-Puffer hinzugegeben. Die AD-hMSCs werden mit einem Zellschaber von der Zellkulturoberfläche gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Zellpellet wird verworfen. In dem Überstand (Zelllysate) befinden sich die isolierten Gesamtproteine der Zellen. Die Proben werden bis zu weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

7.3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Die Gesamtproteinkonzentration in den Zelllysaten und im Mediumüberstand wird mit Hilfe des BCA (Bicinchoninsäure)-Tests bestimmt, einer biochemischen Methode zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen. Durch die Reaktion der Peptidbindungen von Proteinen mit zweiwertigen Kupferkationen entstehen im alkalischen Milieu einwertige Kupferkationen. Diese bilden mit BCA-Molekülen einen violetten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Der BCA-Test wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wird eine Standardverdünnungsreihe von BSA (Rinderserumalbumin, Stocklösung 2 mg/ml) mit bekannter Proteinkonzentration hergestellt. Je 25 µl der Standardverdünnungsreihe und der Proben werden in Zweifachbestimmung auf eine 96-Wellplatte aufgetragen und für 30 min mit 200 µl BCA *Working Reagent* bei 37 C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Gesamtproteinkonzentration der Proben wird anhand der ermittelten Standardkurve und unter Einbezug der Probenverdünnungen bestimmt.

7.3.10 BioPlex Multiplex Immunoassay

Der BioPlex Multiplex Immunoassay basiert auf der Methode eines klassischen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), d.h. einem antikörperbasierten Verfahren zur Proteindetektion. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem klassischen ELISA ist die simultane Analyse mehrerer Proteine in einem Probenvolumen. Das Prinzip des Protein-Multiplex-Assay basiert auf miniaturisierten, magnetischen Kugeln, die durch Fluoreszenzmarker farbkodiert sind. Die primären Antikörper, die spezifisch gegen ein Protein gerichtet sind, sind an die Oberfläche der Kugeln gekoppelt. Verschiedene farbkodierte mit unterschiedlichen Antikörpern-gekoppelte Kugeln können für die Inkubation mit dem Proteinlysate und Mediumüberstand kombiniert werden. Ungebundenes Protein wird im darauffolgenden Waschschrift entfernt. Es erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Zweitantikörpers der gegen ein weiteres Epitop des zu analysierenden Proteins gerichtet ist. Ungebundene Zweitantikörper werden in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach Zugabe des Fluoreszenz-markierten (Phycoerythrin) Streptavidins und einem weiteren Waschschrift erfolgt die Analyse mittels Multiplex-Lesegerät (BioPlex MAGPIX™ System). Das System saugt die Kugeln auf und aufgrund der magnetischen Eigenschaften werden diese auf einer Platte immobilisiert. Mit Hilfe roter lichtemittierender Dioden (LEDs) erfolgt anschließend die Detektion der farbkodierten Kugeln die jeweils Antikörper gegen ein spezifisches Protein gebunden haben. Die grünen LEDs ermöglichen die Intensitätsbestimmung des Phycoerythrins mittels Bildsensor (CCD-Kamera). Die Proteinbestimmung mittels Protein-Multiplex-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben werden auf Eis aufgetaut und die Zelllysate werden für die Messung mit dem Bioplex Sample diluent HB mit 0,5 % BSA und die Mediumüberstände in α -MEM-Basalmedium auf eine Proteinkonzentration von 200-900 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Der mitgelieferte Standard wird nach Herstellerangaben in dem Bioplex Standard diluent verdünnt. Die Standards werden in Zweifachbestimmung und die Proben in Dreifachbestimmung vermessen. Für die Analyse der Proben wird die Bioplex Software verwendet.

7.4 Kokultivierung von HUVECs und AD-hMSCs

In der Kokultur werden verschiedene Zellarten gleichzeitig in einem Zellkultursystem kultiviert um die *in vivo* Interaktion der Zellen *in vitro* zu analysieren. Dabei wird zwischen der direkten und der indirekten Kokultur unterschieden. Bei der indirekten Kokultur werden

die Zellen räumlich voneinander getrennt, jedoch in dem gleichen Zellkulturmedium kultiviert, sodass die unterschiedlichen Zellarten keine direkte Zell-Zell-Interaktion eingehen können aber eine Beeinflussung durch die sezernierten Wachstumsfaktoren erfolgt. In der direkten Kokultur werden die Zellen unterschiedlicher Zellarten zusammen kultiviert, wodurch direkte Zell-Zell-Verbindungen entstehen.

7.4.1 Kokultivierung in einem zweidimensionalen Ansatz

Die zweidimensionale, indirekte Kokultivierung von HUVECs und AD-hMSCs erfolgt in 6-Wellplatten mit speziellen Kokultureinsätzen. Dieser Versuchsaufbau wird auch als *Transwell-System* bezeichnet. Je Vertiefung (8,87 cm²) werden 8*10³ HUVECs/cm² in 3 ml EGM-2 ausgesiedelt. In einer separaten 6-Wellplatte werden 2 ml α -MEM in die Vertiefungen gegeben und die Kokultureinsätze eingesetzt. Die Zellzahlen der ausgesiedelten AD-hMSCs in den Kokultureinsätzen (4,5 cm²) variiert zwischen 2*10³ AD-hMSCs/cm² und 8*10³ AD-hMSCs/cm² (Kapitel 4.3) in 2,5 ml α -MEM. Der Boden der Kokultureinsätze besteht aus einer Membran, die für Wachstumsfaktoren und Zellkulturmedium, jedoch nicht für Zellen durchlässig ist. Es werden Kokultureinsätze mit einer Porengröße von 0,4 μ m verwendet. Nach einem Tag separater Kultivierung wird aus allen Vertiefungen und den Kokultureinsätzen das zellspezifische Medium entfernt, die Kokultureinsätze in die Vertiefungen mit den HUVECs gesetzt und 2 ml konditioniertes (durch Kultivierung von AD-hMSCs über 14 Tage unter dynamisch-hypoxischen Bedingungen) bzw. unkonditioniertes α -MEM in die Vertiefungen der Zellkulturplatte und 2,5 ml in die Kokultureinsätze gegeben. Die Zellen werden über einen Zeitraum von 3, 5 und 7 Tagen kokultiviert und anschließend mit Calcein-AM gefärbt. Für die Auswertung der kapillarähnlichen Strukturen wird mittels *GraphicAnalyzer* (*Threshold* = 7, *Window* = 17) eine Maske aus den Strukturen erstellt und diese anschließend in die *AngioTool* Software unter Anwendung folgender Parameter ausgewertet: *vessel diameter* = 5-25 μ m, *vessel intensity* = 15-255, *remove small particles* = 10,000 und *fill holes* = 360.

7.4.2 Kokultivierung in einem dreidimensionalen Ansatz

Für die dreidimensionale Kokultivierung von HUVECs und AD-hMSCs werden Polymilchsäure/Poly lactid-co-Glycolid (PLLA/PLGA)-Gerüststrukturen verwendet. Die PLLA/PLGA-Gerüststrukturen werden von der Arbeitsgruppe Levenberg *et al.* zur Verfügung

gestellt und dort mittels *porogen leaching* hergestellt. Für die indirekte Kokultur werden je zu besiedelnder Gerüststruktur $2,5 \cdot 10^5$ HUVECs und für die direkte Kokultur zusätzlich je $5 \cdot 10^4$ AD-hMSCs in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, bei 300 g für 10 min zentrifugiert und der Mediumüberstand vollständig entfernt. Die HUVECs werden in 10 μ l Thrombin-Lösung (2,5 U/ml in PBS) resuspendiert, direkt 10 μ l Fibrinogen-Lösung (10 mg/ml in PBS) hinzugegeben, einmal auf und ab pipettiert und die 20 μ l direkt auf die PLLA/PLGA-Gerüststruktur gegeben. Die besiedelten PLLA/PLGA-Gerüststrukturen werden für 30 min bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Für die indirekte Kokultur werden parallel $1,5 \cdot 10^4$ AD-hMSCs in den Kokultureinsätzen in 2 ml konditioniertem bzw. unkonditioniertem Medium ausgesiedelt. Nach 30 min Inkubationsdauer werden für die indirekte Kokultur drei Gerüststrukturen die nur mit HUVECs besiedelt wurden in eine Vertiefung einer 6-Wellplatte mit 2 ml konditioniertem bzw. unkonditioniertem α -MEM gelegt und der Kokultureinsatz hinzugefügt. Für die direkte Kokultur werden drei der mit HUVECs und AD-hMSCs besiedelten PLLA/PLGA-Gerüststrukturen in eine Vertiefung einer 6-Wellplatte gelegt und mit 4 ml konditioniertem bzw. unkonditioniertem α -MEM kultiviert. Die Zellen werden für 7 Tage auf den Gerüststrukturen kultiviert und anschließend direkt mit Calcein-AM angefärbt oder fixiert und die Aktinfilamente mit Phalloidin und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt.

7.5 Dynamische Kultivierung von HUVECs

7.5.1 Viskositätsbestimmung mittels Rheometer

Eine Voraussetzung für die Kultivierung der Endothelzellen unter definierter Scherspannung ist die Kenntnis der Medienviskosität (EGM-2 + 10 % FKS und 0,5 % Gentamycin). Die Viskositätsbestimmung erfolgt in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Scherrheometers. Das Prinzip basiert auf einem Aufbau, bei dem das Medium zwischen zwei Platten geschert wird. Dabei ist die untere Platte feststehend und die obere Platte, der Scherkopf, rotiert mit einer definierten Geschwindigkeit. Für die Viskositätsbestimmung von EGM-2 wird ein Messkopf (PP40) mit einem Durchmesser von 39,98 mm verwendet und der Messspalt wird auf 0,4 mm festgelegt. Vor Beginn der Messung stoppt das Gerät zunächst in der Trimmposition, einer Position kurz vor der Messposition, die dem abstreifen von überschüssigem Probenvolumen dient. Dies kann jedoch zu geringen Ungenauigkeiten im Probenvolumen führen, woraus Abweichungen der Messwerte resultieren könnten. Daher

wird zunächst das optimale Mediumvolumen ermittelt, das in der Trimmposition unter den Messkopf passt, genau bis an den Rand des Scherkopfes reicht, ohne an den Seiten herauszulaufen und somit kein trimmen der Probe erfordert. Bevor die Messung gestartet werden kann, wird das Medium auf eine definierte Temperatur von 37°C aufgeheizt, da die Viskosität einer Flüssigkeit stark temperaturabhängig ist und die HUVECs in der späteren dynamischen Kultivierung bei 37°C inkubiert werden. Die Erwärmung des Mediums erfolgt über die untere, feststehende Platte. Damit ein zu starkes verdunsten der Probe und dadurch bedingte Veränderung der Messwerte verhindert wird, wird in eine zusätzliche Vertiefung PBS pipettiert und ein Schutz um die Messanordnung angebracht. Die Medienviskosität wird für Scherraten von 10-2000 1/s bzw. 10-3000 1/s bestimmt. Dabei wird der erste Messpunkt über eine Messpunktdauer von 100 sec aufgenommen, die mit jedem weiteren Messpunkt logarithmisch reduziert wird, sodass der letzte Messpunkt mit einer Messpunktdauer von 5 s aufgenommen wird. Je niedriger die Kraft ist, die aufgebracht werden muss desto länger muss die Messung erfolgen. Das zur Aufrechterhaltung der Scherraten notwendige Drehmoment wird gemessen, woraus die dazugehörige Software die Schubspannung und die dynamische Viskosität bestimmt.

7.5.2 Beschichtung, Besiedlung und Kultivierung in Durchflusskammern

Für die dynamische Kultivierung von HUVECs werden in der vorliegenden Arbeit Durchflusskammern (*μ slide I Luer*) verwendet. Neben Durchflusskammern, deren Zellkulturoberfläche bereits für Kultivierung adhärenter Zellen durch den Hersteller behandelt ist, werden auch unbeschichtete Durchflusskammern verwendet. Damit eine optimale Adhäsion der Zellen an die Oberfläche gewährleistet wird, werden diese mit Fibrinogen beschichtet. Dafür werden je 100 μl einer Fibrinogen-Lösung (200 μg/ml in 0,15 M NaCl) in die Kanäle der Durchflusskammern (*μ slide^{0,4} I Luer uncoated* mit einer Kanalhöhe von 0,4 mm) gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Kammern dreimal mit 0,15 M NaCl und dreimal mit EGM-2 (10 % FKS und 0,5 % Gentamycin) gespült. Dabei ist darauf zu achten, dass die Durchflusskammern bis zu der Zellbesiedelung mit Medium gefüllt bleiben, da eine gleichmäßige Verteilung der Zellen durch die mögliche Bildung von Luftkammern verhindert wird. Je 100 μl einer Zellsuspension aus $1,5 \cdot 10^6$ HUVECs/ml EGM-2 werden in den Kanal gegeben, die Zellen in den Durchflusskammern für 2,5 h unter statischen Bedingungen bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert und anschließend je 60 μl Medium in die seitlichen Medienreservoirs gegeben,

bevor das Schlauchsystem für die dynamische Kultivierung der Zellen angeschlossen wird. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wird der Volumenstrom induziert. Die zeitliche Abfolge der Erhöhung der Flussraten und damit einhergehenden Scherspannungen sind in den jeweiligen Unterkapiteln genau definiert. Die HUVECs werden ab dem Zeitpunkt des Aussiedelns für mindestens 168 h kultiviert. Es werden in einer Kultivierung 5 Durchflusskammern hintereinandergeschaltet. 24 h, 72 h, 120 h und 168 h nach dem Aussiedeln der Zellen wird je eine Durchflusskammer aus dem System genommen und die Zellen für weitere Fluoreszenzfärbungen fixiert. Zusätzlich werden die Zellen in einer Durchflusskammer 2,5 h nach dem aussiedeln fixiert. Über den kompletten Verlauf der Kultivierung werden Echtzeitaufnahmen der HUVECs mit dem LumaScope-Mikroskop gemacht.

7.5.3 Impedanzmessung (ECIS)

Die elektrische Zell-Substrat-Impedanzmessung (ECIS™) ermöglicht eine nicht invasive, physiologische Untersuchung von lebendigen Zellen *in vitro*. Das Prinzip der Impedanzmessung basiert auf der Verwendung von Goldfilm-Elektroden, auf dem Boden der Durchflusskammern. Zwischen Referenz- und Messelektrode fließt ein Wechselstrom (I). Mit zunehmendem Zellwachstum wird aufgrund der isolierenden Eigenschaften der Plasmamembran der Zellen der Stromfluss behindert und es bildet sich ein Potential (V) zwischen Mess- und Gegenelektrode, das von dem System gemessen wird. Die Impedanz (Z) wird somit durch das Ohmsche Gesetz definiert.

$$Z = \frac{V}{I}$$

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete ECIS Z Theta-System, erlaubt bei der Messung der frequenzabhängigen Impedanz (Z) eine Unterscheidung zwischen dem Membranwiderstand (R) und der Membrankapazität (C) (siehe Formel).

$$Z = \sqrt{R^2 + \left(\frac{1}{2\pi fC}\right)^2}$$

f =Frequenz

Die Ursache hierfür ist, dass der angelegte Wechselstrom bei verschiedenen Frequenzen auf zwei unterschiedlichen Wegen durch die konfluente Zellschicht fließt. Bei niedrigen

Frequenzen fließt der Großteil des Stroms zwischen (parazellulär) oder unter den benachbarten Zellen. Der parazelluläre Stromfluss beschreibt den Membranwiderstand bzw. Ionenfluss. Bei höheren Frequenzen über 40 kHz fließt hingegen mehr Strom kapazitiv durch die isolierende Zellschicht. Nach Ausbildung einer 100 %igen Zellkonfluenz kann durch Messung des Membranwiderstandes und der Membrankapazität der Effekt weitere Einflüsse aus der Mikroumgebung der Zellen, wie induzierter Scherstress, untersucht werden. Da die Gold-Elektroden nicht für eine optimale Adhäsion der Zellen vorbereitet sind, werden diese zunächst mit einer Fibrinogen-Lösung (200 µg Fibrinogen/ml in 0,15 M NaCl) beschichtet. Dafür werden 90 µl der Fibrinogen-Lösung in die ECIS-Durchflusskammern (Kanalhöhe 0,36 mm und Kanalvolumen 90 µl) gegeben, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit einer 0,15 M NaCl-Lösung und dreimal mit EGM-2-Basalmedium gespült. Anschließend wird das ECIS™ Model Z Theta System für die Messung vorbereitet. Dafür wird mit Hilfe eines *ECIS Test Arrays* eine Überprüfung und gegebenenfalls Kalibration des Gerätes durchgeführt. Darauf folgend wird die mit Medium gefüllte ECIS-Durchflusskammer an den Adapter angeschlossen und eine Stabilisierung der Elektroden-Impedanzwerte durchgeführt. Ist dies erfolgt, werden 90 µl einer Zellsuspension mit $1 \cdot 10^5$ HUVECs in die Durchflusskammer gegeben und diese an den Adapter angeschlossen, die Messung unter Verwendung der *Multiple Frequencies* Option gestartet und die Zellen für 2,5 h unter statischen Bedingungen bei 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Nach 1 h Inkubationsdauer werden die seitlichen Medienreservoirs mit je 60 µl EGM-2 (10 % FKS und 0,5 % Gentamycin) aufgefüllt. Nach 2,5 h Inkubationsdauer wird die Messung erneut pausiert und die Durchflusskammer für eine dynamische Kultivierung der HUVECs mit den Schläuchen des Kultivierungssystems verbunden und die Kultivierung bis zu einer Gesamtdauer von 168 h unter definierten Scherspannung, die in den jeweiligen Unterkapiteln näher beschrieben sind, fortgesetzt.

7.6 Zellfärbung und Immunfluoreszenz

7.6.1 Fixierung der Zellen

Die Fixierung dient der Konservierung der Zellen. Dabei werden die Proteine der Zellen denaturiert, behalten jedoch weitestgehend ihre Struktur, sodass Signalkaskaden und Stoffwechselwege konserviert werden. Zudem werden die Zellen für immunzytochemische Färbelösungen besser durchlässig. In dieser Arbeit wurde für die Fixierung der Zellen 4 %-

iges Paraformaldehyd (PFA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein quervernetzendes Fixierungsreagenz das Hydroxid-Methylen-Verbindungen zwischen Proteingruppen ausbildet. Zunächst wird das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen für 30 min mit einer 4 %-igen PFA-Lösung (in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Fixierung wird PFA-Lösung mit einer Temperatur von 4°C verwendet. Anschließend werden die Zellen in Zellkulturplatten dreimal mit PBS gewaschen. Zellen die in Durchflussskammern kultiviert wurden, werden sechsmal mit PBS gespült. Um die Zellmembran für die anschließenden Immunfluoreszenzfärbungen durchlässig zu machen werden die Zellen für 1 h mit einer Triton-X-100-Lösung (0,1% in PBS) ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal bzw. sechsmal mit PBS gewaschen. Die Zellen können in PBS bei 4°C über einen längeren Zeitraum, von Wochen bis Monaten gelagert werden ohne das eine Veränderung der Zellmorphologie oder Zellschädigung auftritt.

7.6.2 Zellfärbung mittels DAPI/Hoechst

Die Färbung mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) und Hoechst 33342 ermöglicht die Visualisierung von Zellkernen. Beide Farbstoffe interkalieren in Adenin/Thymin (AT)-Bereiche doppelsträngiger DNA und bilden einen Komplex der mittels Fluoreszenzmikroskop (DAPI-Filterset) sichtbar gemacht werden kann. Der Unterschied zwischen beiden Färbereagenzien liegt in den toxischen Eigenschaften. Hoechst 33342 weist eine geringere Toxizität als DAPI auf und eignet sich auch für die Zellkernfärbung von viablen Zellen. Für die DAPI/Hoechst33342-Färbung werden die fixierten bzw. unfixierten Zellen mit einer Färbelösung (1 µg/ml in DAPI-Färbepuffer bzw. PBS) für 15 min bei 37°C bzw. Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

7.6.3 VE-Cadherin Färbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung der VE-Cadherine werden die Endothelzellen über Nacht mit einem primären Anti-VE-Cadherin Antikörper aus dem Kaninchen (1:1000 in PBS) bei 5°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Alexa Fluor 488-markierten Zweitantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG H&L, Ex: 495nm, Em: 519nm) in einer 1:2000 Verdünnung (2 µg/ml in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert der gegen den Erstantikörper gerichtet ist. Die Zellen werden dreimal mit

PBS gewaschen und können mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (CXK53 Fluoreszenzfilterset: blaue Anregung) oder anschließend mit Phalloidin oder Hoechst angefärbt werden.

7.6.4 Phalloidin-Färbung

Phalloidin ist ein Phallotoxin aus dem grünen Knollenblätterpilz. Aufgrund seiner hohen Affinität wird es für die direkte Immunfluoreszenzfärbung von Aktin-Filamenten (F-Aktin) eingesetzt. Die fixierten und permeabilisierten Zellen werden mit einer 1:1000 verdünnten Phalloidin-iFluor 555-Färbelösung (in PBS + 1 % BSA), die bereits fluoreszenz-markiert ist, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Phalloidin-iFluor 555 (Ex/Em = 556/574 nm) gefärbten Aktinfilamente können mittels Fluoreszenzmikroskopie (CXK53 Fluoreszenzfilterset: grüne Anregung) sichtbar gemacht werden.

7.6.5 vWF-Färbung

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein multimeres Glycoprotein, das überwiegend von Endothelzellen exprimiert wird und die Adhäsion von Thrombozyten nach Gefäßverletzungen vermittelt. Eine Immunfluoreszenzfärbung gegen vWF erlaubt die Charakterisierung von Endothelzellen. Die fixierten Zellen werden mit einer 1:50 Verdünnung (2,06 µg/ml in vWF-Puffer) des primären *Rabbit* anti-Von Willebrand Faktor Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor diese mit einer 1:20 Verdünnung (37,5 µg/ml in 10 mM PBS + 10 % *Goat serum*) des sekundären FITC-*Goat anti-Rabbit* IgG (H+L) erneut für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert werden. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die vWF-Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie (U-MNB Filter, Anregungsfilter: BP470-490, Barrierefilter: BA590) sichtbar gemacht.

7.6.6 Kollagen-Färbung

Kollagen ist ein Strukturprotein und neben Elastin ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Für den Nachweis von Kollagen werden die Zellen mit einer 1:20 Verdünnung (50 µg/ml in PBS) des primären anti-Kollagen I, II, III, IV, V Antikörpers über Nacht bei 5°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Daraufhin werden die Zellen mit

einem Alexa Fluor 488-markierten Zweitantikörper (*Goat anti-Rabbit IgG H&L*, Ex: 495nm, Em: 519nm), der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, in einer 1:2000 Verdünnung (2 µg/ml in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wird die Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen sichtbar gemacht (CXK53 Fluoreszenzfilterset: blaue Anregung).

7.6.7 CD31-Färbung

Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1) oder auch *Cluster of Differentiation 31* (CD31) ist ein Glycoprotein, welches neben Thrombozyten und Monozyten überwiegend auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Für den Nachweis von CD31 auf der Oberfläche der konditionierten AD-hMSCs werden die Zellen 1:100 Verdünnung (in PBS) des primären anti-CD31 Antikörpers über Nacht bei 5°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Daraufhin werden die Zellen mit einem Alexa Fluor 488-markierten Zweitantikörper (*Goat Anti-Rabbit IgG H&L*, Ex: 495nm, Em: 519nm), der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, in einer 1:2000 Verdünnung (2 µg/ml in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und können mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (CXK53 Fluoreszenzfilterset: blaue Anregung) oder anschließend mit Hoechst die Zellkerne angefärbt werden.

7.6.8 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung der Varianzanalyse (ANOVA, Einweg) durchgeführt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1-1: Schematischer Darstellung der Gefäßwand einer Arterie. Modifiziert nach [15]. . . . 4	4
Abb. 3.1-2: Schematische Darstellung der Gefäßentwicklung. 6	6
Abb. 3.1-3: Schematische Darstellung der beginnenden kapillaren Aussprossung durch Selektion der Endothelspitzenzelle..... 8	8
Abb. 3.1-4: Schematische Darstellung der Angiopoetin-1 (Ang1)- und Angiopoetin-2 (Ang2)-Funktion in der Angiogenese..... 9	9
Abb. 3.1-5: Schematische Darstellung der Gefäßreifung..... 11	11
Abb. 3.1-6: Schematische Darstellung der im Blutgefäß vorherrschenden hämodynamischen Kräfte..... 13	13
Abb. 3.2-1: Schematische Darstellung der Entwicklung einer funktionsfähigen und patientenspezifischen bioartifiziellen Gefäßprothese..... 19	19
Abb. 3.2-2: Schematische Darstellung eines <i>Transwell</i> -Systems für die indirekte Kokultivierung von Stammzellen (hMSCs) und Endothelzellen.. 23	23
Abb. 4.1-1: Vitalitätsbestimmung von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (a; 10 µg/ml – 80 µg/ml), MPA (b; 0,12 µg/ml - 480 µg/ml) und DMSO (c; 0,1 - 0,4 %) in einer 2D-Einzelschicht..... 28	28
Abb. 4.1-2: Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität und LDH-Freisetzung von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (10 µg/ml - 80 µg/ml) zur Überprüfung, ob der Verlust der Zellvitalität durch Apoptose oder Nekrose verursacht wurde..... 29	29
Abb. 4.1-3: Zellmorphologie von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 mg/ml, 18 ng/ml, 40,23 µg/ml, 70 µg/ml). 30	30
Abb. 4.1-4: Sphäroidmorphologie (a, b) sowie Sphäroiddurchmesser (c) nach 24 h Äquilibrationdauer mit einer Startzellzahl von $2 \cdot 10^3$ HUVECs/Vertiefung und $8 \cdot 10^3$ HUVECs/Vertiefung. 31	31
Abb. 4.1-5: Sphäroidformation mit einer Startzellzahl von $8 \cdot 10^3$ HUVECs über einen Zeitraum von 24 h. 32	32

Abb. 4.1-6: Dosis-Wirkungskurve sowie IC ₅₀ -Konzentration nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus in einem 2D-(a) und 3D-(b) Zellkultursystem von HUVECs..	32
Abb. 4.1-7: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen nach Lebend-(grün)/Tot-(rot) Färbung von HUVEC-Sphäroiden nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml - 70 µg/ml).	34
Abb. 4.1-8: Sphäroidmorphologie nach 24 Äquilibrierung (a) sowie weiteren 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml - 70 µg/ml; c-n) und 0,35 % DMSO (b).	35
Abb. 4.1-9: Sphäroidfläche im Vergleich zur Zellvitalität der HUVEC-Sphäroide nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml – 70 µg/ml).	37
Abb. 4.1-10: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer VE-Cadherin Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC-Sphäroiden nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 70 µg/ml).	38
Abb. 4.1-11: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 24 h Inkubation mit Tacrolimus (0 µg/ml, 18 µg/ml, 40,2 µg/ml und 70 µg/ml) in einem Angiogenese-Assay.	40
Abb. 4.1-12: Auswirkung von Tacrolimus (24 h Inkubation) auf die Formation von kapillar-ähnlichen Strukturen durch HUVECs im Angiogenese-Assay.	41
Abb. 4.2-1: Glukose-(a) und Laktatkonzentration (b) [g/L] im Kulturmedium von AD-hMSCs nach 3, 7 und 14 Tagen Kultivierung unter statisch-normoxischen (SN), statisch-hypoxischen (SH), dynamisch-normoxischen (DN) und dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen. 21 % O ₂ -Gehalt definiert normoxische Bedingungen und 2,5 % O ₂ -Gehalt hypoxische Bedingungen.	46
Abb. 4.2-2: Auf 1000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration normierte Proteinkonzentrationen der endothelialen Marker PECAM-1, VCAM-1 und ICAM-1 in Zelllysaten von AD-hMSCs zweier Spender (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre) nach 7- und 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm ²), dynamischen (D, 7-14,7 dyn/cm ²), normoxischen (N, 21 % O ₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O ₂) Bedingungen.	49
Abb. 4.2-3: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen nach CD31- (a) und VE-Cadherin- (b) Immunfluoreszenzfärbung von fixierten AD-hMSCs nach 14 Tagen Kultivierung unter dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen.	50

- Abb. 4.2-4: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen nach vWF Immunfluoreszenzfärbung von fixierten HUVECs (a) und AD-hMSCs (b) 3 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen und Inkubation unter 37°C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ sowie AD-hMSCs nach 14-tägiger Kultivierung unter statisch-normoxischen (c) und dynamisch-normoxischen (d) Bedingungen. 51
- Abb. 4.2-5: Auf 1000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration normierte Proteinkonzentrationen der angiogenen Marker VEGF-A, sVEGFR-1 und sTie-2 in Zelllysaten von AD-hMSCs zweier Spender (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre) nach 7- und 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, 7-14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen..... 53
- Abb. 4.2-6: Auf 1000 µg/ml Gesamtproteinkonzentration normierte Proteinkonzentrationen der angiogenen bzw. inflammatorischen Marker MCP-1, IL-6 und IL-8 in Zelllysaten von AD-hMSCs zweier Spender (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre) nach 7- und 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, 7-14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen..... 54
- Abb. 4.2-7: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen nach Lebend-(grün)/Tot-(rot) Färbung (Calcein-AM-/PI-Färbung) von während der 14-tägigen Kultivierung abgelösten AD-hMSC-Zellpellets.. 57
- Abb. 4.2-8: Zellmorphologie von AD-hMSCs nach 14 Tagen Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, 7-14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen. 57
- Abb. 4.2-9: Fluoreszenzaufnahmen nach Kollagen I, II, III, IV, V- Immunfluoreszenzfärbung (grün) von AD-hMSCs nach 14 Tagen Kultivierung unter (a) dynamisch-normoxischen (DN) und (b, c) dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen. 58
- Abb. 4.2-10: Gesamtproteinkonzentration [µg/ml] im Zellkulturmedium nach 14-tägiger Kultivierung von AD-hMSCs unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~7-14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen ohne Mediumwechsel..... 59

- Abb. 4.2-11: Normierte Proteinkonzentrationen [pg/ml] der Biomarker VEGF-A, sVEGFR-2, PECAM-1, sTie-2, Ang2, MCP-1, bFGF, PLGF-bb und IL-6 im Zellkulturmedium konditioniert durch AD-hMSCs von drei Spendern (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre, S3 = 47 Jahre) nach 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~7-14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen ohne Mediumwechsel. . 60
- Abb. 4.2-12: Normierte Proteinkonzentrationen der Biomarker VEGF-A, sTie-2, Ang2, MCP-1, bFGF, PLGF-bb und IL-6 in Zelllysaten der AD-hMSCs von drei Spendern (S1 = 33 Jahre, S2 = 44 Jahre, S3 = 47 Jahre) nach 14-tägiger Kultivierung unter statischen (S, 0 dyn/cm²), dynamischen (D, ~7-14,7 dyn/cm²), normoxischen (N, 21 % O₂) und hypoxischen (H, 2,5 % O₂) Bedingungen ohne Mediumwechsel. . 61
- Abb. 4.2-13: Logarithmische (linearisierte) Darstellung der x-fachen Expression von angiogenen und inflammatorischen Genen in AD-hMSCs nach 3, 7 und 14 Tagen Kultivierung unter dynamisch-normoxischen (DN) und dynamisch-hypoxischen (DH) Bedingungen relativ zur Negativkontrolle (3 Tage nach dem Aussiedeln der Zellen, definiert den Startpunkt der spezifischen Kultivierungen der AD-hMSCs). 67
- Abb. 4.3-1: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einzelner kapillarähnlicher Formationen von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter normoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium. 72
- Abb. 4.3-2 Fluoreszenzmikroskop- und Phasenkontrastaufnahmen der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 4 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter normoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium auf einer vorbehandelten Oberfläche..... 73
- Abb. 4.3-3: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (Negativkontrollen) von HUVECs nach 7 Tagen Kultivierung ohne Kokultur unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem (a) und unkonditioniertem α -MEM (b) Medium sowie nach 6 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs in EGM-2-Medium (c)..... 74
- Abb. 4.3-4: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 3, 5 und 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem (a-c) und unkonditioniertem α -MEM (d-f).. . 75

Abb. 4.3-5: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem α -MEM.....	75
Abb. 4.3-6 Phasenkontrast (a-c)- und Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (b) der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium.....	76
Abb. 4.3-7: Quantitative Analyse einer Fluoreszenzmikroskopaufnahme der kapillarähnlichen Formation von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs unter hypoxischen Bedingungen mit konditioniertem Medium.	76
Abb. 4.3-8: Angiotool-Analyse der kapillarähnlichen Formation von HUVECs, kultiviert für 7 Tage in dynamisch-hypoxischem konditioniertem und unkonditioniertem Medium in indirekter Kokultur mit AD-hMSCs.....	77
Abb. 4.3-9: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs (a, a.1-a.3), sowie von HUVECs und AD-hMSCs nach 7 Tagen direkter Kokultur (b, b.1) unter normoxischen Bedingungen mit unkonditioniertem α -MEM auf PLLA/PLGA-Gerüsten.	80
Abb. 4.3-10 Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von HUVECs nach 7 Tagen indirekter Kokultur mit AD-hMSCs (a, b, d, e) sowie von HUVECS und AD-hMSCs nach 7 Tagen direkter Kokultur (c, f) unter normoxischen (obere Reihe) und hypoxischen (untere Reihe) Bedingungen mit konditioniertem α -MEM auf PLLA/PLGA-Gerüsten.....	81
Abb. 4.4-1: Scherratenabhängige Viskosität [mPA*s] von EGM-2 Medium.....	85
Abb. 4.4-2: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs in Durchfluskkammern auf einer Fibrinbeschichtung nach 2,75 h (a) und <i>ibitreat</i> -Beschichtung nach 2,5 h Inkubationsdauer (b).....	87
Abb. 4.4-3: Reaktor-System für die dynamische Kultivierung von HUVECs in Durchfluskkammern.	88
Abb. 4.4-4: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 3 Tagen dynamischer Kultivierung (3 ml/min) in einer Fibrin-beschichteten Durchfluskkammer.	88

Abb. 4.4-5: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 24 h Inkubationsdauer in Durchflusskammern, die zuvor mit Fibrinogenlösungen mit Konzentrationen von 1,5 µg/ml (a); 2 µg/ml (b) und 5 µg/ml (c) für 1 h beschichtet wurden..... 90

Abb. 4.4-6: Phasenkontrastaufnahmen nach 2,5 h Inkubationsdauer mit $1,1 \cdot 10^6$ (a); $1,3 \cdot 10^6$ (b) und $1,5 \cdot 10^6$ (c) HUVECs/ml in Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern sowie $1,5 \cdot 10^6$ HUVECs/ml in einer unbeschichteten Durchflusskammer (d)..... 91

Abb. 4.4-7: Reaktor-System für die dynamische Kultivierung von HUVECs in Durchflusskammern. 92

Abb. 4.4-8: Phasenkontrast- (a) und Fluoreszenzaufnahmen fixierter HUVECs 2,5 h nach dem Aussiedeln und angefärbt mit Phalloidin (b, rot) und gefärbt gegen VE-Cadherin (c, grün). 94

Abb. 4.4-9: Phasenkontrastaufnahmen von HUVECs nach 24 h, 48 h, 72 h, 120 h und 168 h statischer (0-0,2 dyn/cm²) und dynamischer (5 dyn/cm², 20 dyn/cm²) Gesamtkultivierungsdauer in Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern. 96

Abb. 4.4-10: Fluoreszenzaufnahmen von fixierten HUVECs nach 24 h, 72 h, 120 h und 168 h statischer (0-0,2 dyn/cm²) und dynamischer (5 dyn/cm², 20 dyn/cm²) Gesamtkultivierungsdauer in Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern. 97

Abb. 4.4-11 Fluoreszenzaufnahmen von fixierten HUVECs nach 24 h, 72 h, 120 h und 168 h statischer (0-0,2 dyn/cm²) und dynamischer (5 dyn/cm², 20 dyn/cm²) Gesamtkultivierungsdauer in Fibrinogen-beschichteten Durchflusskammern. 99

Abb. 4.4-12: Durchflusskammer für die elektrische Zell-Substrat-Impedanzmessung (ECIS™) von Applied Biophysics mit 8 x 10 Elektroden. 100

Abb. 4.4-13: Normierter Widerstand und normierte Kapazität von konfluenten HUVECs unter statischer (0 dyn/cm² - 0,21 dyn/cm²) Kultivierung in Abhängigkeit von der Zeit. 102

Abb. 4.4-14: Normierter Widerstand (a, b) und normierte Kapazität (b, d) von konfluenten HUVECs unter dynamischer Kultivierung (5 dyn/cm²) in Abhängigkeit von der Zeit. In b und d sind die in a und c markierten Abschnitte vergrößert dargestellt. 104

Abb. 4.4-15: Normierter Widerstand (a, b) und normierte Kapazität (b, d) von konfluenten HUVECs unter dynamischer Kultivierung (5 dyn/cm^2) in Abhängigkeit von der Zeit. In b und d sind die in a und c markierten Abschnitte vergrößert dargestellt.

..... 106

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.2-1: Analyse der Expressionsstabilität von 4 Referenzgenen in AD-hMSC berechnet mit NormFinder und geNorm.	65
Tab. 4.2-2: cDNA-Konzentrationen [ng/ml] der angiogenen und inflammatorischen Faktoren in AD-hMSC 2 Tage nach Aussiedeln der Zellen und Inkubation unter 37°C, 5 % CO ₂ und 21 % O ₂ (Negativkontrolle).....	67
Tab. 4.2-3: cDNA-Konzentrationen [ng/ml] der angiogenen und inflammatorischen Faktoren in AD-hMSC nach 14 Tagen Kultivierung unter dynamisch-hypoxischen Bedingungen.	68
Tab. 6.1-1: Übersicht über den Verlauf der dynamischen Kultivierung von HUVECs unter einer Scherspannung von 5 dyn/cm ² in den ECIS-Durchflussskammen.	114
Tab. 6.1-2: Übersicht über den Verlauf der dynamischen Kultivierung von HUVECs unter einer Scherspannung von 20 dyn/cm ² in den ECIS-Durchflussskammern.	115
Tab. 6.2-1: Übersicht über die verwendeten Primer für die Analyse der Gentranskription in den AD-hMSCs mittels qRT-PCR.	119

Literaturverzeichnis

- [1] P. Carmeliet, "Manipulating angiogenesis in medicine," *Journal of internal medicine*, vol. 255, pp. 538-561, 2004.
- [2] S. Patan, "Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling," *Journal of neuro-oncology*, vol. 50, pp. 1-15, 2000.
- [3] J. Folkman, "Angiogenesis," in *Biology of endothelial cells*, ed: Springer, 1984, pp. 412-428.
- [4] G. L. Semenza, "Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 102, pp. 840-847, 2007.
- [5] M. A. Traore and S. C. George, "Tissue engineering the vascular tree," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 23, pp. 505-514, 2017.
- [6] W. C. Aird, "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds," *Circulation research*, vol. 100, pp. 174-190, 2007.
- [7] B. D. Johnson, K. J. Mather, and J. P. Wallace, "Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications," *Vascular medicine*, vol. 16, pp. 365-377, 2011.
- [8] E. A. Jones, F. le Noble, and A. Eichmann, "What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics," *Physiology*, vol. 21, pp. 388-395, 2006.
- [9] A. Armulik, G. Genové, and C. Betsholtz, "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises," *Developmental cell*, vol. 21, pp. 193-215, 2011.
- [10] T. Ishida, M. Takahashi, M. A. Corson, and B. C. Berk, "Fluid shear stress-mediated signal transduction: How do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses?," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 811, pp. 12-24, 1997.
- [11] L. A. Martinez-Lemus, M. A. Hill, and G. A. Meininger, "The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure," *Physiology*, vol. 24, pp. 45-57, 2009.
- [12] M. Zimarino, M. D'andreamatteo, R. Waksman, S. E. Epstein, and R. De Caterina, "The dynamics of the coronary collateral circulation," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 11, pp. 191-197, 2014.
- [13] J. P. Stegemann, S. N. Kaszuba, and S. L. Rowe, "Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials," *Tissue engineering*, vol. 13, pp. 2601-2613, 2007.
- [14] J. E. Wagenseil and R. P. Mecham, "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics," *Physiological reviews*, vol. 89, pp. 957-989, 2009.

- [15] M. C. Whitlock and W. G. Hundley, "Noninvasive imaging of flow and vascular function in disease of the aorta," *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 8, pp. 1094-1106, 2015.
- [16] P. Carmeliet, "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis," *Nature medicine*, vol. 6, p. 389, 2000.
- [17] W. Risau and I. Flamme, "Vasculogenesis," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 11, pp. 73-91, 1995.
- [18] M. Papetti and I. M. Herman, "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 282, pp. C947-C970, 2002.
- [19] C. Kalka, T. Asahara, W. Krone, and J. M. Isner, "Angiogenese und Vaskulogenese Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation," *Herz*, vol. 25, pp. 611-622, September 01 2000.
- [20] S. Kazemi, D. Wenzel, E. Kolossov, N. Lenka, A. Raible, P. Sasse, *et al.*, "Differential role of bFGF and VEGF for vasculogenesis," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 12, pp. 55-62, 2002.
- [21] M. Pepper, N. Ferrara, L. Orci, and R. Montesano, "Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 189, pp. 824-831, 1992.
- [22] W. Risau, "Mechanisms of angiogenesis," *nature*, vol. 386, p. 671, 1997.
- [23] M. Klagsbrun and P. D'amore, "Regulators of angiogenesis," *Annual review of physiology*, vol. 53, pp. 217-239, 1991.
- [24] S. Frank, G. Hübner, G. Breier, M. T. Longaker, D. G. Greenhalgh, and S. Werner, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, pp. 12607-12613, 1995.
- [25] S. Patan, B. Haenni, and P. H. Burri, "Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall," *Microvascular research*, vol. 51, pp. 80-98, 1996.
- [26] S. Patan, "TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth," *Microvascular research*, vol. 56, pp. 1-21, 1998.
- [27] P. Ten Dijke and H. M. Arthur, "Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 8, p. 857, 2007.
- [28] R. H. Adams and K. Alitalo, "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 8, p. 464, 2007.
- [29] A. Karamysheva, "Mechanisms of angiogenesis," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 73, p. 751, 2008.

- [30] I. Stein, M. Neeman, D. Shweiki, A. Itin, and E. Keshet, "Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes," *Molecular and cellular biology*, vol. 15, pp. 5363-5368, 1995.
- [31] J. A. Forsythe, B.-H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, *et al.*, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1," *Molecular and cellular biology*, vol. 16, pp. 4604-4613, 1996.
- [32] G. L. Semenza, F. Agani, N. Iyer, L. Kotch, E. Laughner, S. Leung, *et al.*, "Regulation of Cardiovascular Development and Physiology by Hypoxia-Inducible Factor 1a," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 874, pp. 262-268, 1999.
- [33] C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe, "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system," *Nature medicine*, vol. 9, p. 677, 2003.
- [34] H. Zeng, H. F. Dvorak, and D. Mukhopadhyay, "Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 26969-26979, 2001.
- [35] M. S. Pepper, "Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 21, pp. 1104-1117, 2001.
- [36] G. Cao, C. D. O'Brien, Z. Zhou, S. M. Sanders, J. N. Greenbaum, A. Makrigiannakis, *et al.*, "Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 282, pp. C1181-C1190, 2002.
- [37] H. F. Dvorak, L. F. Brown, M. Detmar, and A. M. Dvorak, "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis," *The American journal of pathology*, vol. 146, p. 1029, 1995.
- [38] R. C. Sainson, J. Aoto, M. N. Nakatsu, M. Holderfield, E. Conn, E. Koller, *et al.*, "Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis," *The FASEB journal*, vol. 19, pp. 1027-1029, 2005.
- [39] Z.-J. Liu, T. Shirakawa, Y. Li, A. Soma, M. Oka, G. P. Dotto, *et al.*, "Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis," *Molecular and cellular biology*, vol. 23, pp. 14-25, 2003.
- [40] Z. Tahergorabi and M. Khazaei, "A review on angiogenesis and its assays," *Iranian journal of basic medical sciences*, vol. 15, p. 1110, 2012.
- [41] S. P. Herbert and D. Y. Stainier, "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 12, p. 551, 2011.
- [42] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," *Nature*, vol. 473, p. 298, 2011.

- [43] M. J. Cross and L. Claesson-Welsh, "FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition," *Trends in pharmacological sciences*, vol. 22, pp. 201-207, 2001.
- [44] C. Ruhrberg, H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, *et al.*, "Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis," *Genes & development*, vol. 16, pp. 2684-2698, 2002.
- [45] K. Gaengel, G. Genové, A. Armulik, and C. Betsholtz, "Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 29, pp. 630-638, 2009.
- [46] G. Thurston, J. S. Rudge, E. Ioffe, H. Zhou, L. Ross, S. D. Croll, *et al.*, "Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage," *Nature medicine*, vol. 6, p. 460, 2000.
- [47] G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, and J. Holash, "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation," *Nature*, vol. 407, p. 242, 2000.
- [48] S. J. Mandriota and M. S. Pepper, "Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia," *Circulation research*, vol. 83, pp. 852-859, 1998.
- [49] J. Rouwkema and A. Khademhosseini, "Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks," *Trends in biotechnology*, vol. 34, pp. 733-745, 2016.
- [50] M. Ramsauer and P. A. D'Amore, "Getting Tie (2) d up in angiogenesis," *The Journal of clinical investigation*, vol. 110, pp. 1615-1617, 2002.
- [51] P. Carmeliet, "Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis?," ed: Am Heart Assoc, 2000.
- [52] A. Li, S. Dubey, M. L. Varney, B. J. Dave, and R. K. Singh, "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis," *The Journal of Immunology*, vol. 170, pp. 3369-3376, 2003.
- [53] A. Yadav, V. Saini, and S. Arora, "MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review," *Clinica chimica acta*, vol. 411, pp. 1570-1579, 2010.
- [54] K. H. Hong, J. Ryu, and K. H. Han, "Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A," *Blood*, vol. 105, pp. 1405-1407, 2005.
- [55] M. Yamada, S. Kim, K. Egashira, M. Takeya, T. Ikeda, O. Mimura, *et al.*, "Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 23, pp. 1996-2001, 2003.
- [56] R. H. Adams, G. A. Wilkinson, C. Weiss, F. Diella, N. W. Gale, U. Deutsch, *et al.*, "Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of

- arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis," *Genes & development*, vol. 13, pp. 295-306, 1999.
- [57] B. P. Eliceiri and D. A. Cheresh, "The role of α v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development," *The Journal of clinical investigation*, vol. 103, pp. 1227-1230, 1999.
- [58] C. H. Streuli and N. Akhtar, "Signal co-operation between integrins and other receptor systems," *Biochemical Journal*, vol. 418, pp. 491-506, 2009.
- [59] E. M. Conway, D. Collen, and P. Carmeliet, "Molecular mechanisms of blood vessel growth," *Cardiovascular research*, vol. 49, pp. 507-521, 2001.
- [60] A. Joussen, B. Kirchhof, and C. Gottstein, "Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese," *Der Ophthalmologe*, vol. 100, pp. 284-291, 2003.
- [61] T. Matsumura, K. Wolff, and P. Petzelbauer, "Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin," *The Journal of Immunology*, vol. 158, pp. 3408-3416, 1997.
- [62] D. Vestweber, "VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 28, pp. 223-232, 2008.
- [63] R. K. Jain, "Molecular regulation of vessel maturation," *Nature medicine*, vol. 9, p. 685, 2003.
- [64] K. A. Knudsen, C. Frankowski, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock, "A role for cadherins in cellular signaling and differentiation," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 72, pp. 168-176, 1998.
- [65] D.-W. Seo, H. Li, L. Guedez, P. T. Wingfield, T. Diaz, R. Salloum, *et al.*, "TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism," *Cell*, vol. 114, pp. 171-180, 2003.
- [66] K. Bein and M. Simons, "Thrombospondin Type 1 Repeats Interact with Matrix Metalloproteinase 2 REGULATION OF METALLOPROTEINASE ACTIVITY," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 32167-32173, 2000.
- [67] E. C. Watson, Z. L. Grant, and L. Coultas, "Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 74, pp. 4387-4403, December 01 2017.
- [68] T. Stevens, J. G. Garcia, D. M. Shasby, J. Bhattacharya, and A. B. Malik, "Mechanisms regulating endothelial cell barrier function," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 279, pp. L419-L422, 2000.
- [69] W. C. Aird, "Endothelial cell heterogeneity," *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 2, p. a006429, 2012.
- [70] J. E. Deanfield, J. P. Halcox, and T. J. Rabelink, "Endothelial function and dysfunction," *Circulation*, vol. 115, pp. 1285-1295, 2007.

- [71] W. C. Aird, "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms," *Circulation research*, vol. 100, pp. 158-173, 2007.
- [72] J.-J. Chiu and S. Chien, "Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives," *Physiological reviews*, vol. 91, pp. 327-387, 2011.
- [73] T. G. Papaioannou and C. Stefanadis, "Vascular wall shear stress: basic principles and methods," *Hellenic J Cardiol*, vol. 46, pp. 9-15, 2005.
- [74] C. Slager, J. Wentzel, F. Gijzen, J. Schuurbijs, A. Van der Wal, A. Van der Steen, *et al.*, "The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 2, p. 401, 2005.
- [75] C. Hahn and M. A. Schwartz, "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 10, p. 53, 2009.
- [76] J. J. Paszkowiak and A. Dardik, "Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside," *Vascular and endovascular surgery*, vol. 37, pp. 47-57, 2003.
- [77] R. M. Nerem, R. W. Alexander, D. C. Chappell, R. M. Medford, S. E. Varner, and W. R. Taylor, "The study of the influence of flow on vascular endothelial biology," *The American journal of the medical sciences*, vol. 316, pp. 169-175, 1998.
- [78] S. Lehoux, Y. Castier, and A. Tedgui, "Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces," *Journal of internal medicine*, vol. 259, pp. 381-392, 2006.
- [79] Y.-S. J. Li, J. H. Haga, and S. Chien, "Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells," *Journal of biomechanics*, vol. 38, pp. 1949-1971, 2005.
- [80] D. E. Conway, M. T. Breckenridge, E. Hinde, E. Gratton, C. S. Chen, and M. A. Schwartz, "Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1," *Current Biology*, vol. 23, pp. 1024-1030, 2013.
- [81] E. Dejana, "Endothelial cell-cell junctions: happy together," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 5, p. 261, 2004.
- [82] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Materials today*, vol. 14, pp. 88-95, 2011.
- [83] J. M. Polak and A. E. Bishop, "Stem cells and tissue engineering: past, present, and future," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1068, pp. 352-366, 2006.
- [84] F. E. Smit and P. M. Dohmen, "Cardiovascular tissue engineering: where we come from and where are we now?," *Medical science monitor basic research*, vol. 21, p. 1, 2015.
- [85] <https://www.uksh.de/herzchirurgie-luebeck/Informationen+für+Ärzte/Operationsverfahren/Koronare+Bypasschirurgie.html>. (28.09.2018).

- [86] H. Bergmeister, M. Strobl, C. Grasl, R. Liska, and H. Schima, "Tissue engineering of vascular grafts," *European Surgery*, vol. 45, pp. 187-193, 2013.
- [87] M. Neufurth, X. Wang, E. Tolba, B. Dorweiler, H. C. Schröder, T. Link, *et al.*, "Modular small diameter vascular grafts with bioactive functionalities," *PloS one*, vol. 10, p. e0133632, 2015.
- [88] R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, P. E. Butler, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, "Current status of prosthetic bypass grafts: a review," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 74, pp. 570-581, 2005.
- [89] M. Deutsch, J. Meinhart, P. Zilla, N. Howanietz, M. Gorlitzer, A. Froeschl, *et al.*, "Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts," *Journal of vascular surgery*, vol. 49, pp. 352-362, 2009.
- [90] P. Maschhoff, S. Heene, A. Lavrentieva, T. Hentrop, C. Leibold, M. N. Wahalla, *et al.*, "An intelligent bioreactor system for the cultivation of a bioartificial vascular graft," *Engineering in Life Sciences*, vol. 17, pp. 567-578, 2017.
- [91] S. A. Loh, B. S. Howell, C. B. Rockman, N. S. Cayne, M. A. Adelman, I. Gulkarov, *et al.*, "Mid-and long-term results of the treatment of infrainguinal arterial occlusive disease with precuffed expanded polytetrafluoroethylene grafts compared with vein grafts," *Annals of vascular surgery*, vol. 27, pp. 208-217, 2013.
- [92] D. Hielscher, C. Kaebisch, B. J. V. Braun, K. Gray, and E. Tobiasch, "Stem Cell Sources and Graft Material for Vascular Tissue Engineering," *Stem Cell Reviews and Reports*, pp. 1-26, 2018.
- [93] D. G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, and D. Mantovani, "Small-diameter vascular tissue engineering," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 10, p. 410, 2013.
- [94] E. Rabkin and F. J. Schoen, "Cardiovascular tissue engineering," *Cardiovascular pathology*, vol. 11, pp. 305-317, 2002.
- [95] R. M. Nerem and D. Seliktar, "Vascular tissue engineering," *Annual review of biomedical engineering*, vol. 3, pp. 225-243, 2001.
- [96] J. Platt and T. Nagayasu, "Current status of xenotransplantation," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 26, pp. 1026-1032, 1999.
- [97] S. L. Mitchell and L. E. Niklason, "Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts," *Cardiovascular Pathology*, vol. 12, pp. 59-64, 2003.
- [98] B. C. Isenberg, C. Williams, and R. T. Tranquillo, "Small-diameter artificial arteries engineered in vitro," *Circulation research*, vol. 98, pp. 25-35, 2006.
- [99] T. Matsuda and Y. Nakayama, "Surface microarchitectural design in biomedical applications: in vitro transmural endothelialization on microporous segmented polyurethane films fabricated using an excimer laser," *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, vol. 31, pp. 235-242, 1996.

- [100] C. B. Weinberg and E. Bell, "A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells," *Science*, vol. 231, pp. 397-400, 1986.
- [101] A. Haisch, A. Loch, J. David, A. Pruss, R. Hansen, and M. Sittinger, "Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering," *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 38, pp. 686-689, 2000.
- [102] F. M. Shaikh, A. Callanan, E. G. Kavanagh, P. E. Burke, P. A. Grace, and T. M. McGloughlin, "Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering," *Cells Tissues Organs*, vol. 188, pp. 333-346, 2008.
- [103] A. Tiwari, H. Salacinski, A. M. Seifalian, and G. Hamilton, "New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes," *Cardiovascular Surgery*, vol. 10, pp. 191-197, 2002.
- [104] K. H. Yow, J. Ingram, S. Korossis, E. Ingham, and S. Homer-Vanniasinkam, "Tissue engineering of vascular conduits," *British Journal of Surgery: Incorporating European Journal of Surgery and Swiss Surgery*, vol. 93, pp. 652-661, 2006.
- [105] W. Bensaid, J. Triffitt, C. Blanchat, K. Oudina, L. Sedel, and H. Petite, "A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2497-2502, 2003.
- [106] Q. Ye, G. Zünd, P. Benedikt, S. Jockenhoevel, S. P. Hoerstrup, S. Sakyama, *et al.*, "Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering," *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, vol. 17, pp. 587-591, 2000.
- [107] D. L. Amrani, J. P. Diorio, and Y. Delmotte, "Wound healing: role of commercial fibrin sealants," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 936, pp. 566-579, 2001.
- [108] C. E. Schmidt and J. M. Baier, "Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2215-2231, 2000.
- [109] A. Bader, T. Schilling, O. E. Teebken, G. Brandes, T. Herden, G. Steinhoff, *et al.*, "Tissue engineering of heart valves—human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves," *European journal of cardio-thoracic surgery*, vol. 14, pp. 279-284, 1998.
- [110] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak, "Decellularization of tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3675-3683, 2006.
- [111] O. E. Teebken and A. Haverich, "Tissue engineering of small diameter vascular grafts," *European journal of vascular and endovascular surgery*, vol. 23, pp. 475-485, 2002.
- [112] S. Zhao, A. Suci, T. Ziegler, J. E. Moore Jr, E. Bürki, J.-J. Meister, *et al.*, "Synergistic effects of fluid shear stress and cyclic circumferential stretch on vascular endothelial cell morphology and cytoskeleton," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 15, pp. 1781-1786, 1995.
- [113] J. D. Kakisis, C. D. Liapis, and B. E. Sumpio, "Effects of cyclic strain on vascular cells," *Endothelium*, vol. 11, pp. 17-28, 2004.

- [114] P. F. Davies, "Flow-mediated endothelial mechanotransduction," *Physiological reviews*, vol. 75, pp. 519-560, 1995.
- [115] M. Pei, L. A. Solchaga, J. Seidel, L. Zeng, G. Vunjak-Novakovic, A. I. Caplan, *et al.*, "Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds," *The FASEB Journal*, vol. 16, pp. 1691-1694, 2002.
- [116] C. Arrigoni, A. Chittò, S. Mantero, and A. Remuzzi, "Rotating versus perfusion bioreactor for the culture of engineered vascular constructs based on hyaluronic acid," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 100, pp. 988-997, 2008.
- [117] R. Sodian, T. Lemke, C. Fritsche, S. P. Hoerstrup, P. Fu, E. V. Potapov, *et al.*, "Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering," *Tissue engineering*, vol. 8, pp. 863-870, 2002.
- [118] C. Williams and T. M. Wick, "Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries," *Tissue engineering*, vol. 10, pp. 930-941, 2004.
- [119] C. Frohn, L. Fricke, J. C. Puchta, and H. Kirchner, "The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 16, pp. 355-360, 2001.
- [120] H. Z. Vilma Duarte Oliveira, Thomas Rath, "Mutagenic and cytotoxic effects of immunosuppressive drugs on human lymphocyte cultures.," *Experimental and Clinical Transplantation*, vol. 2, pp. 273-282, 2004.
- [121] M. Naesens, D. R. Kuypers, and M. Sarwal, "Calcineurin inhibitor nephrotoxicity," *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 4, pp. 481-508, Feb 2009.
- [122] R. S. G. MD, "Current and Evolving Immunosuppressive Regimens in Kidney Transplantation," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 47, pp. S3-S21, 2006.
- [123] R. A. Aramburu J, Klee CB., "Calcineurin: from structure to function.," *Current Topics in Cellular Regulation*, vol. 36, pp. 237-95, 2000.
- [124] L. C. Patrick G. Hogan, Julie Nardone, *et al.*, "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT," *Genes and Development*, vol. 17, pp. 2205-2232, 2003.
- [125] S. Siamakpour-Reihani, J. Caster, D. B. Nepal, A. Courtwright, E. Hilliard, J. Usary, *et al.*, "The role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis—a rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor tacrolimus," *PLoS One*, vol. 6, p. e20412, 2011.
- [126] S. R. Martinez-Martinez, Juan M., "Inhibitors of the Calcineurin / NFAT Pathway," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 11, pp. 997-1007, 2004.
- [127] H. Sollinger, "Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients," *Transplantation*, vol. 60, pp. 225-232, 1995.
- [128] A. C. Allison and E. M. Eugui, "Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action," *Immunopharmacology*, vol. 47, pp. 85-118, 2000.

- [129] B. Chaigne-Delalande, G. Guidicelli, L. Couzi, P. Merville, W. Mahfouf, S. Bouchet, *et al.*, "The immunosuppressor mycophenolic acid kills activated lymphocytes by inducing a nonclassical actin-dependent necrotic signal," *The Journal of Immunology*, vol. 181, pp. 7630-7638, 2008.
- [130] P. E. Wallemacq and R. K. Verbeeck, "Comparative Clinical Pharmacokinetics of Tacrolimus in Paediatric and Adult Patients," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 40, pp. 283-295, April 01 2001.
- [131] M. W. Laschke and M. D. Menger, "Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions," *Biotechnology advances*, vol. 34, pp. 112-121, 2016.
- [132] J. Rouwkema, N. C. Rivron, and C. A. van Blitterswijk, "Vascularization in tissue engineering," *Trends in biotechnology*, vol. 26, pp. 434-441, 2008.
- [133] M. Laschke and M. Menger, "Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation," *European Surgical Research*, vol. 48, pp. 85-92, 2012.
- [134] M. W. Laschke, Y. Harder, M. Amon, I. Martin, J. Farhadi, A. Ring, *et al.*, "Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes," *Tissue engineering*, vol. 12, pp. 2093-2104, 2006.
- [135] S. W. Choi, Y. Zhang, M. R. MacEwan, and Y. Xia, "Neovascularization in biodegradable inverse opal scaffolds with uniform and precisely controlled pore sizes," *Advanced healthcare materials*, vol. 2, pp. 145-154, 2013.
- [136] V. S. Joshi, N. Y. Lei, C. M. Walthers, B. Wu, and J. C. Dunn, "Macroporosity enhances vascularization of electrospun scaffolds," *Journal of Surgical Research*, vol. 183, pp. 18-26, 2013.
- [137] M. Laschke, M. Rücker, G. Jensen, C. Carvalho, R. Mülhaupt, N. C. Gellrich, *et al.*, "Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 85, pp. 397-407, 2008.
- [138] S. Singh, B. M. Wu, and J. C. Dunn, "Delivery of VEGF using collagen-coated polycaprolactone scaffolds stimulates angiogenesis," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 100, pp. 720-727, 2012.
- [139] U. Utzinger, B. Baggett, J. A. Weiss, J. B. Hoying, and L. T. Edgar, "Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis," *Angiogenesis*, vol. 18, pp. 219-232, 2015.
- [140] Y. Naito, T. Shinoka, D. Duncan, N. Hibino, D. Solomon, M. Cleary, *et al.*, "Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 63, pp. 312-323, 2011.

- [141] G. Kasper, N. Dankert, J. Tuischer, M. Hoefft, T. Gaber, J. D. Glaeser, *et al.*, "Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment," *Stem cells*, vol. 25, pp. 903-910, 2007.
- [142] J. Borges, M. C. Müller, A. Momeni, G. Björn Stark, and N. Torio-Padron, "In vitro analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix," *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, vol. 16, pp. 141-148, 2007.
- [143] R. E. Unger, S. Ghanaati, C. Orth, A. Sartoris, M. Barbeck, S. Halstenberg, *et al.*, "The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 6959-6967, 2010.
- [144] J. R. Hurley, S. Balaji, and D. A. Narboneva, "Complex temporal regulation of capillary morphogenesis by fibroblasts," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 299, pp. C444-C453, 2010.
- [145] N. Koike, D. Fukumura, O. Gralla, P. Au, J. S. Schechner, and R. K. Jain, "Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels," *Nature*, vol. 428, p. 138, 2004.
- [146] A. Hofmann, U. Ritz, S. Verrier, D. Eglin, M. Alini, S. Fuchs, *et al.*, "The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4217-4226, 2008.
- [147] J. Baldwin, M. Antille, U. Bonda, E. M. De-Juan-Pardo, K. Khosrotehrani, S. Ivanovski, *et al.*, "In vitro pre-vascularisation of tissue-engineered constructs A co-culture perspective," *Vascular cell*, vol. 6, p. 13, 2014.
- [148] T. O. Pedersen, A. L. Blois, Y. Xue, Z. Xing, M. Cottler-Fox, I. Fristad, *et al.*, "Osteogenic stimulatory conditions enhance growth and maturation of endothelial cell microvascular networks in culture with mesenchymal stem cells," *Journal of tissue engineering*, vol. 3, p. 2041731412443236, 2012.
- [149] R. E. Unger, E. Dohle, and C. J. Kirkpatrick, "Improving vascularization of engineered bone through the generation of pro-angiogenic effects in co-culture systems," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 94, pp. 116-125, 2015.
- [150] R. J. Bodnar, M. E. Rodgers, W. C. Chen, and A. Wells, "Pericyte regulation of vascular remodeling through the CXC receptor 3," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 33, pp. 2818-2829, 2013.
- [151] M. Franco, P. Roswall, E. Cortez, D. Hanahan, and K. Pietras, "Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression," *Blood*, pp. blood-2011-01-331694, 2011.
- [152] J. Ma, F. Yang, S. K. Both, H.-J. Prins, M. N. Helder, J. Pan, *et al.*, "In vitro and in vivo angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/HUVECs cocultures," *Biofabrication*, vol. 6, p. 015005, 2014.

- [153] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, *et al.*, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *science*, vol. 284, pp. 143-147, 1999.
- [154] C. Shen, P. Lie, T. Miao, M. Yu, Q. Lu, T. Feng, *et al.*, "Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis," *Molecular medicine reports*, vol. 12, pp. 20-30, 2015.
- [155] M. M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese, D. Fergusson, B. W. Winston, J. C. Marshall, *et al.*, "Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials," *PloS one*, vol. 7, p. e47559, 2012.
- [156] A. Caplan, "Why are MSCs therapeutic? New data: new insight," *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, vol. 217, pp. 318-324, 2009.
- [157] L. da Silva Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas, and A. I. Caplan, "Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells," *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 20, pp. 419-427, 2009.
- [158] W. Kamprom, P. Kheolamai, U. Yaowalak, A. Supokawej, M. Wattanapanitch, C. Laowtammathron, *et al.*, "Effects of mesenchymal stem cell-derived cytokines on the functional properties of endothelial progenitor cells," *European journal of cell biology*, vol. 95, pp. 153-163, 2016.
- [159] A. J. Boyle, I. K. McNiece, and J. M. Hare, "Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair," in *Stem Cells for Myocardial Regeneration*, ed: Springer, 2010, pp. 65-84.
- [160] M. A. Matthay, A. Goolaerts, J. P. Howard, and J. W. Lee, "Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence," *Critical care medicine*, vol. 38, p. S569, 2010.
- [161] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," *Nature reviews immunology*, vol. 8, p. 726, 2008.
- [162] A. Oskowitz, H. McFerrin, M. Gutschow, M. L. Carter, and R. Pochampally, "Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic," *Stem cell research*, vol. 6, pp. 215-225, 2011.
- [163] R. R. Rao, A. W. Peterson, J. Ceccarelli, A. J. Putnam, and J. P. Stegemann, "Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials," *Angiogenesis*, vol. 15, pp. 253-264, 2012.
- [164] S. Thoms, R. Jonczyk, T. Scheper, and C. Blume, "Dynamic-hypoxic conditioning of AD-hMSCs and co-culturing with HUVECs favors endothelial network formation," *Tissue Engineering Part A*, submitted.
- [165] W.-Y. Lee, H.-W. Tsai, J.-H. Chiang, S.-M. Hwang, D.-Y. Chen, L.-W. Hsu, *et al.*, "Core-shell cell bodies composed of human cbMSCs and HUVECs for functional vasculogenesis," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 8446-8455, 2011.

- [166] T. McFadden, G. Duffy, A. Allen, H. Stevens, S. Schwarzmaier, N. Plesnila, *et al.*, "The delayed addition of human mesenchymal stem cells to pre-formed endothelial cell networks results in functional vascularization of a collagen–glycosaminoglycan scaffold in vivo," *Acta biomaterialia*, vol. 9, pp. 9303-9316, 2013.
- [167] K. H. Vining and D. J. Mooney, "Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, p. 728, 2017.
- [168] R. M. Tenney and D. E. Discher, "Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation," *Current opinion in cell biology*, vol. 21, pp. 630-635, 2009.
- [169] G. D. Kusuma, J. Carthew, R. Lim, and J. E. Frith, "Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect," *Stem cells and development*, vol. 26, pp. 617-631, 2017.
- [170] M. Wang, P. R. Crisostomo, C. Herring, K. K. Meldrum, and D. R. Meldrum, "Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism," *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 291, pp. R880-R884, 2006.
- [171] S. P. Hung, J. H. Ho, Y. R. V. Shih, T. Lo, and O. K. Lee, "Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 30, pp. 260-266, 2012.
- [172] J. Paquet, M. Deschepper, A. Moya, D. Logeart-Avramoglou, C. Boisson-Vidal, and H. Petite, "Oxygen tension regulates human mesenchymal stem cell paracrine functions," *Stem cells translational medicine*, vol. 4, pp. 809-821, 2015.
- [173] M. Ejtehadifar, K. Shamsasenjan, A. Movassaghpour, P. Akbarzadehlaleh, N. Dehdilani, P. Abbasi, *et al.*, "The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology," *Advanced pharmaceutical bulletin*, vol. 5, p. 141, 2015.
- [174] L. Yuan, N. Sakamoto, G. Song, and M. Sato, "High-level shear stress stimulates endothelial differentiation and VEGF secretion by human mesenchymal stem cells," *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 6, pp. 220-229, 2013.
- [175] S. Thoms, A. I. Ali, R. Jonczyk, T. Scheper, and C. Blume, "Tacrolimus inhibits angiogenesis and induces disaggregation of endothelial cells in spheroids–Toxicity testing in a 3D cell culture approach," *Toxicology in Vitro*, vol. 53, pp. 10-19, 2018.
- [176] M. Drewitz, M. Helbling, N. Fried, M. Bieri, W. Moritz, J. Lichtenberg, *et al.*, "Towards automated production and drug sensitivity testing using scaffold-free spherical tumor microtissues," *Biotechnology journal*, vol. 6, pp. 1488-1496, 2011.
- [177] G. Mehta, A. Y. Hsiao, M. Ingram, G. D. Luker, and S. Takayama, "Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy," *Journal of Controlled Release*, vol. 164, pp. 192-204, 2012.
- [178] R. Z. Lin and H. Y. Chang, "Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research," *Biotechnology journal*, vol. 3, pp. 1172-1184, 2008.

- [179] M. Zanoni, F. Piccinini, C. Arienti, A. Zamagni, S. Santi, R. Polico, *et al.*, "3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained," *Scientific reports*, vol. 6, 2016.
- [180] M. J. Bissell and D. Radisky, "Putting tumours in context," *Nature Reviews Cancer*, vol. 1, p. 46, 2001.
- [181] A. Oloumi, W. Lam, J. Banath, and P. Olive, "Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids," *International journal of radiation biology*, vol. 78, pp. 483-492, 2002.
- [182] F. Sambale, A. Lavrentieva, F. Stahl, C. Blume, M. Stiesch, C. Kasper, *et al.*, "Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing," *Journal of biotechnology*, vol. 205, pp. 120-129, 2015.
- [183] L. M. Nilsson, Z.-W. Sun, J. Nilsson, I. Nordström, Y.-W. Chen, J. D. Molkenkin, *et al.*, "Novel blocker of NFAT activation inhibits IL-6 production in human myometrial arteries and reduces vascular smooth muscle cell proliferation," *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 292, pp. C1167-C1178, 2007.
- [184] A. L. Armesilla, E. Lorenzo, P. G. Del Arco, S. Martínez-Martínez, A. Alfranca, and J. M. Redondo, "Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression," *Molecular and cellular biology*, vol. 19, pp. 2032-2043, 1999.
- [185] T. Minami, K. Horiuchi, M. Miura, M. R. Abid, W. Takabe, N. Noguchi, *et al.*, "Vascular endothelial growth factor-and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pp. 50537-50554, 2004.
- [186] B. M. Gumbiner, "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis," *Cell*, vol. 84, pp. 345-357, 1996.
- [187] <http://wwwalt.med-rz.uni-sb.de/cgi-zlab/referenzwerte.cgi?Kriterium=C>. (12.10.2018).
- [188] R. J. Esper, R. A. Nordaby, J. O. Vilarriño, A. Paragano, J. L. Cacharrón, and R. A. Machado, "Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal," *Cardiovascular diabetology*, vol. 5, p. 4, 2006.
- [189] G. Benton, I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman, and J. Koblinski, "Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 79, pp. 3-18, 2014.
- [190] I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman, and G. Benton, "The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art," *Angiogenesis*, vol. 12, pp. 267-274, 2009.
- [191] A. Courtwright, S. Siamakpour-Reihani, J. L. Arbiser, N. Banet, E. Hilliard, L. Fried, *et al.*, "Secreted frizzles-related protein 2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway," *Cancer research*, vol. 69, pp. 4621-4628, 2009.

- [192] P. Naik, M. Madhavarapu, P. Mayur, K. S. Nayak, and V. Sritharan, "Pharmacokinetics of tacrolimus in adult renal transplant recipients," 2012.
- [193] H. Abdollahi, L. J. Harris, P. Zhang, S. McIlhenny, V. Srinivas, T. Tulenko, *et al.*, "The role of hypoxia in stem cell differentiation and therapeutics," *Journal of Surgical Research*, vol. 165, pp. 112-117, 2011.
- [194] A. Nuschke, M. Rodrigues, A. W. Wells, K. Sylakowski, and A. Wells, "Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation," *Stem cell research & therapy*, vol. 7, p. 179, 2016.
- [195] E. Potier, E. Ferreira, A. Meunier, L. Sedel, D. Logeart-Avramoglou, and H. Petite, "Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death," *Tissue engineering*, vol. 13, pp. 1325-1331, 2007.
- [196] Q. Zhang, Y.-J. Yang, H. Wang, Q.-T. Dong, T.-J. Wang, H.-Y. Qian, *et al.*, "Autophagy activation: a novel mechanism of atorvastatin to protect mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation via AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway," *Stem cells and development*, vol. 21, pp. 1321-1332, 2012.
- [197] F. Dos Santos, P. Z. Andrade, J. S. Boura, M. M. Abecasis, C. L. Da Silva, and J. M. Cabral, "Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia," *Journal of cellular physiology*, vol. 223, pp. 27-35, 2010.
- [198] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. A. Bunnell, "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine," *Circulation research*, vol. 100, pp. 1249-1260, 2007.
- [199] P. C. Baer and H. Geiger, "Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity," *Stem cells international*, vol. 2012, 2012.
- [200] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, pp. 315-317, 2006.
- [201] H. Aurich, M. Sgodda, P. Kaltwaßer, M. Vetter, A. Weise, T. Liehr, *et al.*, "Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo," *Gut*, vol. 58, pp. 570-581, 2009.
- [202] M. P. Prabhakaran, J. R. Venugopal, and S. Ramakrishna, "Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 4996-5003, 2009.
- [203] J. Oswald, S. Boxberger, B. Jørgensen, S. Feldmann, G. Ehniger, M. Bornhäuser, *et al.*, "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro," *Stem cells*, vol. 22, pp. 377-384, 2004.
- [204] A. J. Salgado, R. L. Reis, N. Sousa, and J. M. Gimble, "Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine," *Current stem cell research & therapy*, vol. 5, pp. 103-110, 2010.

- [205] G. Siegel, R. Schäfer, and F. Dazzi, "The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells," *Transplantation*, vol. 87, pp. S45-S49, 2009.
- [206] A. J. Nauta and W. E. Fibbe, "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells," *Blood*, vol. 110, pp. 3499-3506, 2007.
- [207] S. Thoms, R. Jonczyk, A. Lavrentieva, and C. Blume, "Analyse des Mikromilieus künstlicher Gewebe mit Protein-Multiplex-Assays," *BIOspektrum*, vol. 22, pp. 471-474, 2016.
- [208] M. Jazayeri, A. Allameh, M. Soleimani, S. H. Jazayeri, A. Piryaeei, and S. Kazemnejad, "Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells," *Cell biology international*, vol. 32, pp. 1183-1192, 2008.
- [209] K. J. Portalska, A. Leferink, N. Groen, H. Fernandes, L. Moroni, C. van Blitterswijk, *et al.*, "Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells," *PloS one*, vol. 7, p. e46842, 2012.
- [210] L. J. Fischer, S. McIlhenny, T. Tulenko, N. Golesorkhi, P. Zhang, R. Larson, *et al.*, "Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force," *Journal of Surgical Research*, vol. 152, pp. 157-166, 2009.
- [211] A. J. Salgado and J. M. Gimble, "Secretome of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine," *Biochimie*, vol. 95, p. 2195, 2013.
- [212] F. G. Teixeira, K. M. Panchalingam, R. Assunção-Silva, S. C. Serra, B. Mendes-Pinheiro, P. Patrício, *et al.*, "Modulation of the mesenchymal stem cell secretome using computer-controlled bioreactors: impact on neuronal cell proliferation, survival and differentiation," *Scientific reports*, vol. 6, p. srep27791, 2016.
- [213] S. H. Ranganath, O. Levy, M. S. Inamdar, and J. M. Karp, "Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease," *Cell stem cell*, vol. 10, pp. 244-258, 2012.
- [214] S. M. Watt, F. Gullo, M. van der Garde, D. Markeson, R. Camicia, C. P. Khoo, *et al.*, "The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential," *British medical bulletin*, vol. 108, pp. 25-53, 2013.
- [215] S. M. Chacko, S. Ahmed, K. Selvendiran, M. L. Kuppusamy, M. Khan, and P. Kuppusamy, "Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 299, pp. C1562-C1570, 2010.
- [216] W. L. Grayson, F. Zhao, B. Bunnell, and T. Ma, "Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 358, pp. 948-953, 2007.
- [217] I. Papandreou, R. A. Cairns, L. Fontana, A. L. Lim, and N. C. Denko, "HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption," *Cell metabolism*, vol. 3, pp. 187-197, 2006.

- [218] S. Kang, S. M. Kim, and J. H. Sung, "Cellular and molecular stimulation of adipose-derived stem cells under hypoxia," *Cell biology international*, vol. 38, pp. 553-562, 2014.
- [219] J. Rehman, D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, *et al.*, "Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells," *Circulation*, vol. 109, pp. 1292-1298, 2004.
- [220] P. R. Amable, M. V. T. Teixeira, R. B. V. Carias, J. M. Granjeiro, and R. Borojevic, "Identification of appropriate reference genes for human mesenchymal cells during expansion and differentiation," *PLoS One*, vol. 8, p. e73792, 2013.
- [221] X. Li, Q. Yang, J. Bai, Y. Yang, L. Zhong, and Y. Wang, "Identification of optimal reference genes for quantitative PCR studies on human mesenchymal stem cells," *Molecular medicine reports*, vol. 11, pp. 1304-1311, 2015.
- [222] J. Tratwal, B. Follin, A. Ekblond, J. Kastrup, and M. Haack-Sørensen, "Identification of a common reference gene pair for qPCR in human mesenchymal stromal cells from different tissue sources treated with VEGF," *BMC molecular biology*, vol. 15, p. 11, 2014.
- [223] L. E. Pascal, L. D. True, D. S. Campbell, E. W. Deutsch, M. Risk, I. M. Coleman, *et al.*, "Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate," *BMC genomics*, vol. 9, p. 246, 2008.
- [224] E. Potier, E. Ferreira, R. Andriamanalijaona, J.-P. Pujol, K. Oudina, D. Logeart-Avramoglou, *et al.*, "Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression," *Bone*, vol. 40, pp. 1078-1087, 2007.
- [225] J. D. Ash and P. A. Overbeek, "Lens-specific VEGF-A expression induces angioblast migration and proliferation and stimulates angiogenic remodeling," *Developmental biology*, vol. 223, pp. 383-398, 2000.
- [226] S. Pati, A. Y. Khakoo, J. Zhao, F. Jimenez, M. H. Gerber, M. Harting, *et al.*, "Human mesenchymal stem cells inhibit vascular permeability by modulating vascular endothelial cadherin/ β -catenin signaling," *Stem cells and development*, vol. 20, pp. 89-101, 2010.
- [227] G. E. Davis, K. J. Bayless, and A. Mavila, "Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices," *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, vol. 268, pp. 252-275, 2002.
- [228] T. O. Pedersen, A. L. Blois, Z. Xing, Y. Xue, Y. Sun, A. Finne-Wistrand, *et al.*, "Endothelial microvascular networks affect gene-expression profiles and osteogenic potential of tissue-engineered constructs," *Stem cell research & therapy*, vol. 4, p. 52, 2013.
- [229] R.-Z. Lin, R. Moreno-Luna, B. Zhou, W. T. Pu, and J. M. Melero-Martin, "Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells," *Angiogenesis*, vol. 15, pp. 443-455, 2012.
- [230] H. Gerhardt and C. Betsholtz, "Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis," *Cell and tissue research*, vol. 314, pp. 15-23, 2003.

- [231] J. M. Sorrell, M. A. Baber, and A. I. Caplan, "Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation," *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, pp. 1751-1761, 2009.
- [232] A. I. Caplan, "All MSCs are pericytes?," *Cell stem cell*, vol. 3, pp. 229-230, 2008.
- [233] P. Critser, S. Kreger, S. Voytik-Harbin, and M. Yoder, "Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo," *Microvascular research*, vol. 80, pp. 23-30, 2010.
- [234] E. Kniazeva, S. Kachgal, and A. J. Putnam, "Effects of extracellular matrix density and mesenchymal stem cells on neovascularization in vivo," *Tissue engineering Part A*, vol. 17, pp. 905-914, 2010.
- [235] N. DePaola, J. E. Phelps, L. Florez, C. R. Keese, F. L. Minnear, I. Giaever, *et al.*, "Electrical impedance of cultured endothelium under fluid flow," *Annals of biomedical engineering*, vol. 29, pp. 648-656, 2001.
- [236] M. Peck, D. Gebhart, N. Dusserre, T. N. McAllister, and N. L'heureux, "The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art," *Cells Tissues Organs*, vol. 195, pp. 144-158, 2012.
- [237] P. Zilla, R. Fasol, P. Preiss, M. Kadletz, M. Deutsch, H. Schima, *et al.*, "Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts," *Surgery*, vol. 105, pp. 515-522, 1989.
- [238] G. Dai, M. R. Kaazempur-Mofrad, S. Natarajan, Y. Zhang, S. Vaughn, B. R. Blackman, *et al.*, "Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and-resistant regions of human vasculature," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, pp. 14871-14876, 2004.
- [239] M. Sato and T. Ohashi, "Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli," *Biorheology*, vol. 42, pp. 421-441, 2005.
- [240] C. Fey, A. Reiser, H. Wagner, A. Bieser, and R. Zantl, "Defining the Critical Shear Stress Range in Long Term HUVEC Cell Culture."
- [241] S. Noria, F. Xu, S. McCue, M. Jones, A. I. Gotlieb, and B. L. Langille, "Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress," *The American journal of pathology*, vol. 164, pp. 1211-1223, 2004.
- [242] E. Tzima, M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, E. Dejana, D. A. Schultz, B. Engelhardt, *et al.*, "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress," *Nature*, vol. 437, p. 426, 2005.
- [243] L. H. Ting, J. R. Jahn, J. I. Jung, B. R. Shuman, S. Fegghi, S. J. Han, *et al.*, "Flow mechanotransduction regulates traction forces, intercellular forces, and adherens junctions," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 302, pp. H2220-H2229, 2012.
- [244] D. Gulino-Debrac, "Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function," *Tissue barriers*, vol. 1, p. e24180, 2013.

- [245] Z. Liu, J. L. Tan, D. M. Cohen, M. T. Yang, N. J. Sniadecki, S. A. Ruiz, *et al.*, "Mechanical tugging force regulates the size of cell–cell junctions," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, pp. 9944-9949, 2010.
- [246] U. Potard, J. Butler, and N. Wang, "Cytoskeletal mechanics in confluent epithelial cells probed through integrins and E-cadherins," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 272, pp. C1654-C1663, 1997.
- [247] S. Yonemura, Y. Wada, T. Watanabe, A. Nagafuchi, and M. Shibata, " α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development," *Nature cell biology*, vol. 12, p. 533, 2010.
- [248] D. Mehta and A. B. Malik, "Signaling mechanisms regulating endothelial permeability," *Physiological reviews*, vol. 86, pp. 279-367, 2006.
- [249] K. Matter and M. S. Balda, "Signalling to and from tight junctions," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 4, p. 225, 2003.
- [250] M. G. Lampugnani, A. Zanetti, F. Breviario, G. Balconi, F. Orsenigo, M. Corada, *et al.*, "VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam," *Molecular biology of the cell*, vol. 13, pp. 1175-1189, 2002.
- [251] A. Reiser, H. Wagner, A. Bieser, B. Fabry, and R. Zantl, "Changes in cell-cell contacts of endothelial cells (HUVEC) under long term shear stress conditions," in *ANGIOGENESIS*, 2014, pp. 962-962.
- [252] R. Szulcek, H. J. Bogaard, and G. P. van Nieuw Amerongen, "Electric cell-substrate impedance sensing for the quantification of endothelial proliferation, barrier function, and motility," *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2014.
- [253] J. A. Stolwijk, K. Matrougui, C. W. Renken, and M. Trebak, "Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements," *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, vol. 467, pp. 2193-2218, 2015.
- [254] P. F. Davies, A. Robotewskyj, and M. L. Griem, "Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces," *The Journal of clinical investigation*, vol. 93, pp. 2031-2038, 1994.
- [255] S. Noria, D. B. Cowan, A. I. Gotlieb, and B. L. Langille, "Transient and steady-state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions," *Circulation research*, vol. 85, pp. 504-514, 1999.
- [256] M. Weber, M. B. Baker, J. P. Moore, and C. D. Searles, "MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 393, pp. 643-648, 2010.
- [257] E. Tzima, M. A. Del Pozo, W. B. Kiosses, S. A. Mohamed, S. Li, S. Chien, *et al.*, "Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression," *The EMBO journal*, vol. 21, pp. 6791-6800, 2002.

- [258] Y.-S. Chu, W. A. Thomas, O. Eder, F. Pincet, E. Perez, J. P. Thiery, *et al.*, "Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42," *J Cell Biol*, vol. 167, pp. 1183-1194, 2004.
- [259] A. Dardik, L. Chen, J. Frattini, H. Asada, F. Aziz, F. A. Kudo, *et al.*, "Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells," *Journal of vascular surgery*, vol. 41, pp. 869-880, 2005.
- [260] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR," *Nucleic acids research*, vol. 29, pp. e45-e45, 2001.
- [261] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, *et al.*, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes," *Genome biology*, vol. 3, p. research0034. 1, 2002.
- [262] C. L. Andersen, J. L. Jensen, and T. F. Ørntoft, "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets," *Cancer research*, vol. 64, pp. 5245-5250, 2004.

Lebenslauf

Name: Stefanie Thoms
Geburtsdatum/ -ort: 11.10.1987, Greifswald
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung

01/2015 – 2018 Promotionsstudium Chemie
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

10/2012 – 11/2014 Masterstudium Life Science
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Master of Science

10/2009 – 10/2012 Bachelorstudium Life Science
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Bachelor of Science

Berufliche Praxis

01/2015 – 12/2018 Wissenschaftliche Hilfskraft/Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

02/2009 – 09/2009 Biologielaborantin
Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Friedberg (Hessen)

Berufliche Ausbildung

08/2006 – 02/2009 Ausbildung zur Biologielaborantin
Fresenius AG in Bad Homburg v. d. H.

Schulbildung

09/1997 – 07/2006 Gymnasium Grimmen in Grimmen
Abschluss: Abitur

Zusätzliche Praktika

01/2014 – 03/2014 Praktikum am Friedrich-Loeffler-Institut –
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für
molekulare Virologie und Zellbiologie, Leitung Dr. Jutta Veits