

**Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-,
Plastische und Wiederherstellungschirurgie (Chirurgische Klinik II)
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Meffert**

**Vergleich der Kollagenentwicklung und Differenzierungsfähigkeit
humaner Stammzellen des Fettgewebes unter dem Einfluss des Prolyl-4-
Hydroxylase-Inhibitors EDHB im 2D und 3D Modell**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Daniel Lukaszyc
aus Stuttgart**

Würzburg, Dezember 2020



Referent: Prof. Dr. rer. nat. T. Blunk

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. R. Ebert

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2021

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das menschliche Fettgewebe	3
1.2 Die adipogene Differenzierung	4
1.3 Die Extrazellulärmatrix von Fettgewebe	8
1.4 Kollagene	9
1.5 Die dynamischen Vorgänge in der Extrazellulärmatrix	12
1.6 Der Effekt von Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) auf die Kollagensynthese und adipogene Differenzierung	13
1.7 Das dreidimensionale (3D) Kulturmodell	14
1.8 Housekeeping Gene	15
1.9 Ziele dieser Arbeit	16
2. Material	17
2.1 Laborgeräte	17
2.2 Laborverbrauchsmaterialien	18
2.3 Chemikalien	19
2.4 Puffer und Lösungen	19
2.5 Induktoren zur Adipozytendifferenzierung (Stammlösungen)	20
2.6 Zellkultur	20
2.7 Antikörper, Oligonukleotide und Enzyme	21
2.8 Kits	22
3. Methoden	23
3.1 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus humanem Fettgewebe	23
3.2 Zellexpansion	24
3.3 Zweidimensionales (2D) Kulturmodell	24
3.4 Dreidimensionales (3D) Kulturmodell	25
3.5 Kryoschnitthanfertigung der 3D Sphäroide	26
3.6 Oil Red O Färbung	27
3.7 Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung (Live/Dead- Assay)	27
3.8 Immunhistochemische Analyse der Kollagenbestandteile der Extrazellulärmatrix	28

3.9	Mikroskopie	28
3.10	Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels DNA Assay	29
3.11	Bestimmung des Triglyceridgehaltes mittels Triglycerid Assay	29
3.12	RNA Isolation und cDNA Herstellung (reverse Transkription)	30
3.13	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	31
3.14	Evaluation der Housekeeping Gene	31
3.15	Statistik	33
4.	Ergebnisse	34
4.1	Ermittlung eines stabilen Housekeeping Gens	34
4.2	Einfluss von EDHB auf die adipogene Differenzierung und Kollagensynthese von hASCs im 2D und 3D Kulturmodell	37
4.2.1	Überprüfung der Toxizität von EDHB auf undifferenzierte hASCs	37
4.2.2	Einfluss des Prolylhydroxylase-Hemmstoffs EDHB auf die adipogene Differenzierung von hASCs in der 2D und 3D Kultur	41
4.2.3	Adipogene Differenzierung auf mRNA-Ebene unter dem Einfluss von EDHB	47
4.2.4	Die Kollagenentwicklung der Extrazellulärmatrix während der adipogenen Differenzierung unter dem Einfluss von EDHB in der 2D und 3D Zellkultur	50
4.2.4.1	Entwicklung von Kollagen I unter dem Einfluss von EDHB	51
4.2.4.2	Entwicklung von Kollagen IV unter dem Einfluss von EDHB	55
4.2.4.3	Entwicklung von Kollagen VI unter dem Einfluss von EDHB	58
4.2.5	Kollagenentwicklung auf mRNA-Ebene unter dem Einfluss von EDHB	62
5.	Diskussion	65
5.1	Evaluation eines geeigneten Housekeeping Gens zur Normalisierung der quantitativen PCR	66
5.2	Adipogene Differenzierung von hASCs in der 2D und 3D Kultur unter Zugabe von EDHB	67
5.3	Entwicklung von Kollagenen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von EDHB im 2D und 3D Vergleich	69

5.4 Analyse der Genexpression der Kollagene I und IV während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von EDHB im 2D und 3D Vergleich	72
6. Zusammenfassung	74
7. Literaturverzeichnis	77
Appendix	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis	
III Tabellenverzeichnis	
IV Danksagung	
V Lebenslauf	
VI Veröffentlichungen	

1. Einleitung

In der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie nehmen Verfahren zur Wiederherstellung der Gewebeintegrität sekundärer Weichteildefekte infolge von Unfallverletzungen, operativen Eingriffen wie Tumorresektionen oder aufgrund angeborener Fehlbildungen einen großen Stellenwert ein. Mit 4,5 Millionen Eingriffen pro Jahr werden am häufigsten rekonstruktive Eingriffe nach Entfernungen von Tumoren durchgeführt (Stand 2019, American Society of Plastic Surgeons).¹ Körpereigene (autologe) Fettgewebstransplantationen haben dabei in den letzten zweieinhalb Jahrzehnten an Bedeutung zugenommen, da sie in Bezug auf die Biokompatibilität, Immunantwort und Abwendung einer Transplantatabstoßung ein ideales Implantat darstellen.^{2,3} Neben frei transplantierbarem Fettgewebe werden gestielte Lappenplastiken zur Deckung von Weichteil- und Volumendefekten verwendet.⁴ Ein ungelöstes Problem stellen jedoch stark variierende und somit unvorhersehbare Transplantatresultate dar. Die Ausbildung von Zysten sowie eine hohe Rate an partiellen Nekrosen aufgrund einer mangelnden Revaskularisation und damit einhergehender voranschreitender Resorption des Transplantats wurden bei der Verwendung von freiem Fettgewebe beschrieben.^{3,5,6} Rekonstruktionen anhand gestielter Lappenplastiken sind insbesondere bei großen Defekten mit komplexen chirurgischen Eingriffen verbunden, die eine hohe Zahl von Komplikationen an der Hebe- und Empfängerstelle aufweisen wie Infektionen, Narbenbildung, Bewegungseinschränkung und Volumendefizite an der Entnahmestelle.^{4,7,8}

Die Entwicklung von geeigneten Implantaten ist daher ein bedeutendes Ziel des Tissue Engineering von Fettgewebe. Gegenstand heutiger experimenteller Forschung in diesem Bereich sind zahlreiche Methoden zur Herstellung von Fettgewebekonstrukten, die dem nativen Gewebe gleichen und so als dauerhafter Weichteilersatz klinische Anwendung finden können. In azellulären Ansätzen, die auf dem Prinzip der de novo Adipogenese beruhen, werden z.B. wachstumsfaktorhaltige Mikrosphären und spezielle basalmembranartige Matrices wie Matrigel, welche aus Sarkomzellen von Mäusen gewonnen werden, genutzt, um in vivo über physiologische Mechanismen wie

Rekrutierung von Vorläuferzellen, Angiogenese und adipogene Differenzierung die Neubildung von Fettgewebe aus körpereigenen Zellen zu generieren.^{9,10} Daneben kommen zellbasierte Konzepte unter Verwendung adulter mesenchymaler Stammzellen, die aus dem Fettgewebe oder Knochenmark isoliert werden, zum Einsatz.³ In vitro werden diese Zellen in einen 3D Träger (Scaffold) ausgesät, kultiviert und anschließend in vivo implantiert. Dafür stehen verschiedene natürliche und synthetische Biomaterialien zur Verfügung. Die Anforderungen an solche Biomaterialien sind zahlreich, denn sie müssen biologisch kompatibel, besiedelbar, abbaubar, formstabil, einfach implantierbar und langlebig sein sowie eine Vaskularisation unterstützen.² Insbesondere die Etablierung eines funktionsfähigen Gefäßsystems stellt eine große Herausforderung im Tissue Engineering von Fettgewebe dar, da Fettgewebe als stark vaskularisiertes Gewebe besonders anfällig für eine Minderdurchblutung ist.^{11,12} Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der hergestellten Fettgewebekonstrukte kann über Diffusion jedoch nur auf einer Strecke von ca. 200 µm erfolgen.¹³ Um die Funktionalität und den Volumenerhalt größerer Implantate zu gewährleisten werden verschiedene vaskularisationsunterstützende Verfahren in vivo und in vitro eingesetzt. Dazu zählt der mikrochirurgische Einbau von Gefäßschlingen oder –stümpfen in vivo zur Nutzung des Angiogenesepotenzials der wirtseigenen Gefäße¹⁴, die Zugabe von angiogenesestimulierenden Faktoren wie FGF-2 und VEGF^{10,15,16} und die Stimulation der Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren in den implantierten ASCs mittels Transfektion oder hypoxischer Vorkultivierung.¹⁴

Die Herausforderung Fettgewebe herzustellen, welches dem nativen Gewebe äquivalent ist, führte zu umfangreichen Forschungen bezüglich zellulärer und molekularer Mechanismen der Adipozytendifferenzierung anhand von Adipozytenvorläuferzellen in 2D Zellkultursystemen.¹⁷ In der Vergangenheit wurde dabei zunehmend die maßgebliche Rolle der Extrazellulärmatrix (EZM) für die Ausreifung, Funktion und das Überleben der Adipozyten deutlich.¹⁸⁻²⁰ Durch die Ausbildung eines soliden extrazellulären Gerüsts und der Basallamina der Zellen trägt sie zur Reduktion von mechanischem Stress und

damit zu einem geringerem Rupturrisiko der vulnerablen, mit Lipidtropfen beladenen Zellen bei.²¹ Über die Zusammensetzung ihrer Komponenten sowie Zell-Matrix-Interaktionen reguliert sie zudem die Umfangszunahme von Adipozyten und ist an Signalmechanismen während der Adipogenese beteiligt.^{22,23} Die zahlreichen einflussnehmenden Faktoren der EZM sind dabei noch nicht ausreichend erforscht.

1.1 Das menschliche Fettgewebe

Es gibt zwei physiologisch auftretende Arten von Fettgewebe im menschlichen Körper: braunes (plurivakuoläres) und weißes (univakuoläres) Fettgewebe. Braunes Fett kommt vor allem bei Neugeborenen vor und ist für die Wärmeerzeugung zuständig. Mit zunehmenden Alter wird es durch weißes Fett ersetzt und somit auf ein Minimum reduziert.²⁴ Mit einem Anteil von 10-29% des Körpergewichts stellt weißes Fett beim normalgewichtigen Erwachsenen das am meisten vorkommende Gewebe dar.²⁵ Neben der Energiespeicherung durch Einlagerung von Triglyceriden, thermischer Isolierung und mechanischer Schutzbarriere besitzt das Fettgewebe eine wichtige endokrine Funktion mit Bereitstellung von verschiedenen Adipokinen, Zytokinen, Steroidhormonen und Prostaglandinen.^{24,26} Auf diese Weise nimmt es Einfluss auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel, die Energie- und Gefäßhomöostase, Angiogenese, Blutgerinnung, Fibrinolyse, Fortpflanzung, das Immunsystem und Entzündungsreaktionen.²⁶⁻²⁸

Weißes Fettgewebe setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen, dessen Hauptanteil reife Adipozyten ausmachen. Ihr Zytoplasma wird fast vollständig von einem großen triglyceridhaltigen Lipidtropfen ausgefüllt. Daneben finden sich mesenchymale Stammzellen (adipose-derived stem cells, ASCs), Präadipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Lymphozyten und Monozyten, was in der Gesamtheit als stromal vascular fraction (SVF) bezeichnet wird.^{24,29,30}

Von besonderem Interesse für das Tissue Engineering sind ASCs, deren Fähigkeit als undifferenzierte, multipotente, sich selbst regenerierende, adulte Stammzellen proliferieren zu können, genutzt wird.³¹ Im Gegensatz zu

embryonalen Stammzellen bestehen bei multipotenten Stammzellen keine ethischen Konflikte, sodass diese Zellpopulation in der Forschung breite Anwendung findet.^{32,33} Darüberhinaus lassen sich ASCs auf einfache und reproduzierbare Weise in großen Mengen isolieren.³² Zunächst wird dabei die SVF aus subkutanem Fettgewebe aus Liposuktionsmaterial oder abdominoplastischen Eingriffen durch enzymatische Verdauung isoliert.^{34,35} Durch nachfolgende Kultivierung der Zellen mit regelmäßigen Medium- und Passagewechsel können die plastikadhärenten ASCs größtenteils von den restlichen Zellen der SVF getrennt werden.³⁶

Mit Zelllinien-spezifischen Induktionsfaktoren sind ASCs nun in der Lage zu Adipozyten, aber auch zu Zellen des Knorpel-, Knochen- und Muskelgewebes zu differenzieren.^{31,34} Die adipogene Differenzierung wird dabei neben verschiedenen Wachstumsfaktoren und Hormonen auch von Zell-Zell- und insbesondere Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst.^{2,37} Gerade bezüglich der Zell-Matrix-Interaktionen sind die genauen Mechanismen dabei noch nicht bekannt, sodass es auf diesem Feld weiterer Forschung bedarf.

1.2 Die adipogene Differenzierung

Grundsätzlich kann die adipogene Differenzierung von ASCs zu reifen Adipozyten in zwei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase, der Determinierungsphase, werden aus den multipotenten Stammzellen determinierte Vorläuferzellen der adipogenen Zellreihe, sogenannte Präadipozyten. Sie behalten ihre Eigenschaft zu proliferieren bei, jedoch verlieren sie die Fähigkeit zu Zellen anderer Zellreihen zu differenzieren. Über die Mechanismen dieser Phase ist bis heute nur wenig bekannt und ein spezifischer, determinierender Faktor noch nicht identifiziert.¹⁷

In der zweiten Phase findet schließlich die terminale Differenzierung statt. Dabei differenzieren die Präadipozyten zu reifen Adipozyten, was mit der Synthese und Akkumulation von Lipiden, Erhöhung der Insulinsensitivität sowie Sekretion fettgewebsspezifischer Proteine und Enzyme einhergeht.³⁸ Abbildung 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Stadien der adipogenen Differenzierung.³⁹

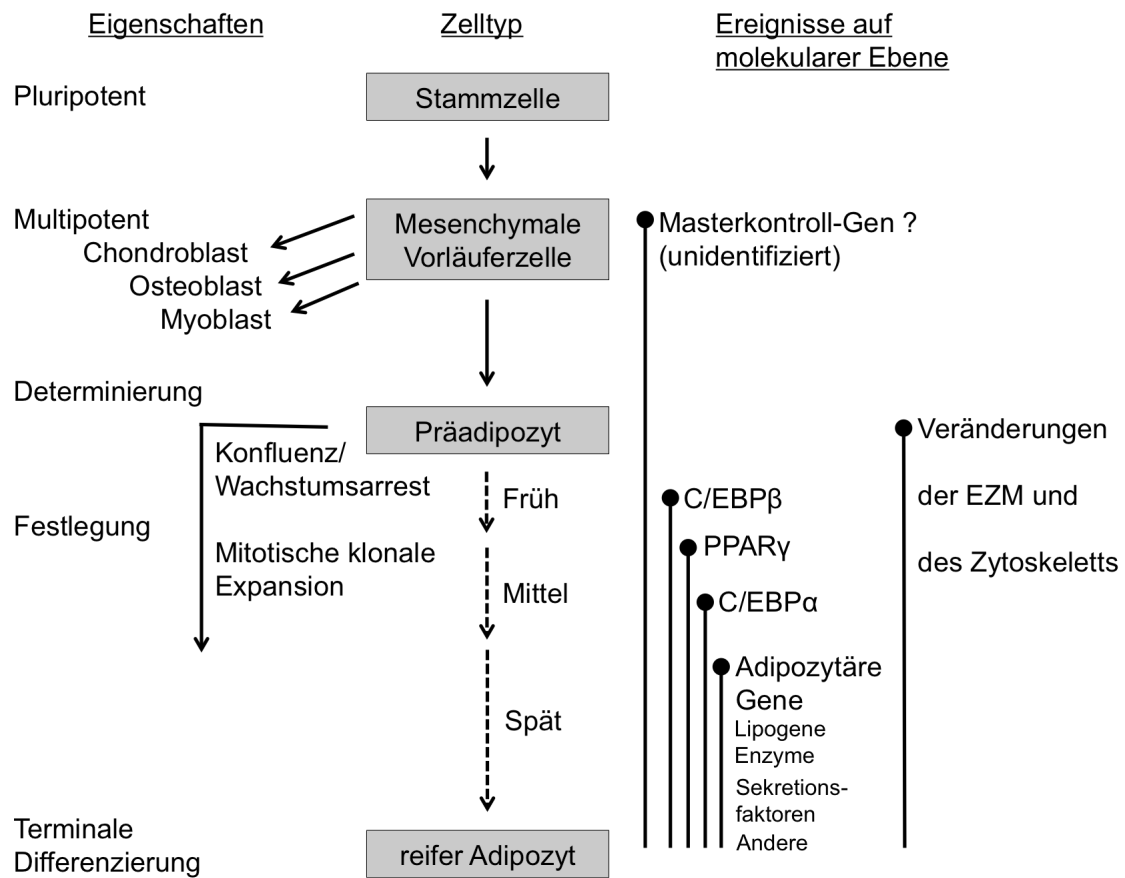


Abbildung 1. Überblick über die Stadien der adipogenen Differenzierung (nach Smas, C. M. und Sul, H. S.³⁹, übersetzt und modifiziert wiederveröffentlicht mit freundlicher Genehmigung von Portland Press, Ltd., Genehmigung erteilt durch Copyright Clearance Center, Inc.). Abkürzungen: C/EBP = CCAAT/enhancer binding protein, EZM = Extrazellulärmatrix, PPAR = peroxisome proliferator-activated receptor.

Die umfangreichsten Untersuchungen zu den zellulären und molekularen Vorgängen der terminalen Differenzierung wurden an den aus Mausembryonen stammenden Präadipozyten-Zelllinien 3T3-L1 und 3T3-F422A durchgeführt.⁴⁰ Ex vivo arretieren die Präadipozyten in der Zellkultur nach einem initialen Proliferationsschub durch Kontaktinhibition in ihrem Zellzyklus. Unter hormoneller Induktion verlassen die Zellen diese Phase des Wachstumsarrests synchron und es folgen mehrere Zellteilungszyklen, was als mitotische klonale Expansion (mitotic clonal expansion, MCE) bezeichnet wird. Anschließend verlassen die Zellen diesen Zellzyklus wieder und es folgt die terminale Differenzierung.⁴¹ Inwieweit die MCE ein essentieller Schritt für die

Adipogenese wird kontrovers diskutiert, da in Studien, in denen die MCE blockiert wurde, trotzdem eine Differenzierung der Zellen stattfinden konnte.⁴² Durch Aktivierung einer Transkriptionskaskade werden in der Folge Gene zur Reifung der Vorläuferzellen zu Adipozyten exprimiert.⁴³ Einen Überblick über die Regulation der Genkaskade der Adipogenese bietet Abbildung 2.⁴⁴

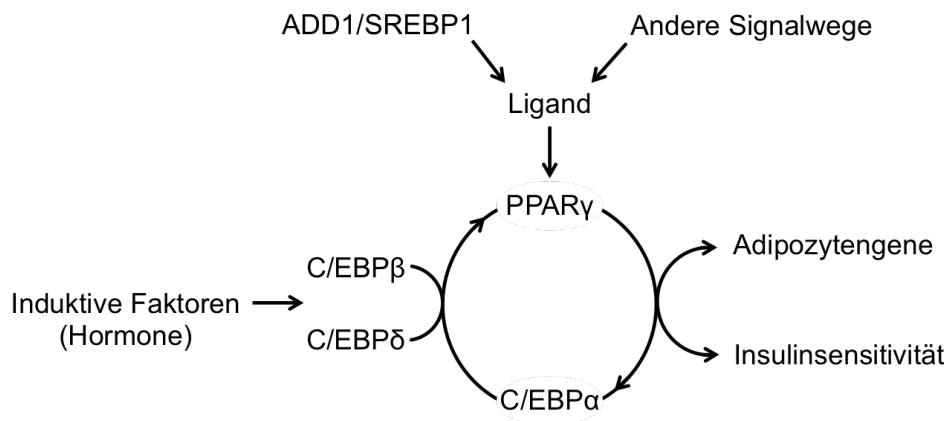


Abbildung 2. Regulation der Genkaskade der Adipogenese (nach Wu Z. et al.⁴⁴, übersetzt wiederveröffentlicht mit freundlicher Genehmigung von Elsevier). Abkürzungen: C/EBP = CCAAT/enhancer-binding protein, PPAR = peroxisome proliferator-activated receptor, SREBP-1/ADD-1 = sterol regulatory element binding protein 1/adipocyte differentiation and determination factor 1.

Als wichtigste Regulatoren der Adipozytenreifung wurden die Transkriptionsfaktoren peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein- α (C/EBP α), C/EBP β und C/EBP δ identifiziert.⁴⁴ PPAR γ ist ein hochaffiner Kernrezeptor für Thiazolidindion, das als Antidiabetikum eingesetzt wird und erstmals die tragende Rolle von PPAR γ im Lipidstoffwechsel und der Steigerung der Insulinsensitivität hervorhob.⁴⁵ Seine Expression findet in der Differenzierungsphase früh statt und ist für diese essentiell.^{44,46} Zudem ist PPAR γ für den Erhalt des differenzierten Stadiums notwendig.⁴⁷ Ebenfalls in einem frühen Stadium erfolgt die Expression von C/EBP β und C/EBP δ , die u.a. an der Arretierung des Zellwachstums sowie an der Aktivierung von PPAR γ beteiligt sind. Ein weiterer Faktor in diesem Zusammenhang ist das durch Insulin vermehrt exprimierte sterol response element-binding protein-1 (SREBP1) (früher als adipocyte determination and

differentiation factor 1, ADD1 bezeichnet), das wahrscheinlich über die Produktion von endogenen Liganden für PPAR γ eine verstärkte Aktivierung des Rezeptors bewirkt.⁴⁸ Eine weitere positive Regulation der PPAR γ - und C/EBP α -Expression erfolgt zudem durch das cAMP response element-binding protein (CREB), das durch das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die wiederum verstärkt durch Insulin bereitgestellt werden, aktiviert wird.³⁸ C/EBP α wird relativ spät während der terminalen Differenzierung induziert und ist über einen positiven Feedbackmechanismus an der Aufrechterhaltung der PPAR γ -Expression in differenzierten Adipozyten beteiligt. Beide Gene bewirken gemeinsam die Expression weiterer Adipozytengene sowie eine Steigerung der Insulinsensitivität durch die Erhöhung der Insulinrezeptorenanzahl und sind damit maßgeblich für den vollständigen Programmablauf der Adipogenese verantwortlich.⁴⁴

Reife Adipozyten sind durch die Produktion mehrerer fettgewebsspezifischer Enzyme und Proteine gekennzeichnet. Dazu gehören die Lipoproteinlipase (LPL), die eine bedeutende Rolle bei der Akkumulation von Lipiden spielt, das Fettsäure-bindende Protein 4 (fatty acid-binding protein 4, FABP4), häufig auch als adipocyte protein (aP2) bezeichnet, der Fettsäuretransporter FAT/CD36, das Lipidtröpfchen umgebende Hüllprotein Perilipin, der insulinabhängige Glukosetransporter GLUT-4 sowie die Adipokine Adiponektin, Adipsin, Leptin, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und viele weitere.^{17,49}

In vivo wird die Adipogenese vermutlich durch Zytokine anderer Zellen induziert.⁵⁰ Um die Differenzierungsvorgänge in vitro studieren zu können, werden bestimmte Induktionsfaktoren verwendet. Typischerweise wird dabei eine Mischung aus Dexamethason, Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Insulin oder Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) verwendet. Zusätzlich wird häufig Indometacin, ein antiinflammatorisch wirkender Stoff, hinzugefügt, der durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR γ die adipogene Differenzierung induziert. Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid und stimuliert ebenfalls die Adipogenese. IBMX fungiert als Inhibitor der Phosphodiesterase

und erhöht damit den Spiegel des für die Differenzierung notwendigen cAMPs. Die Wirkungsweise von Insulin ist dabei vielfältig und beinhaltet eine vermehrte positive Regulation der PPAR γ - und C/EBP α -Expression sowie eine Reduktion von antiadipogenen Transkriptionsfaktoren.^{2,49}

Zusammen mit den metabolischen Vorgängen verändert sich auch die Morphologie der heranreifenden Zellen. Aus den zunächst spindelförmigen Vorläuferzellen entstehen runde, Lipid-beladene, reife Adipozyten, deren Zellkern an den Rand der Zelle verlagert wird. Die Kugelform ist dabei jedoch nicht primär der Akkumulation und Einlagerung von Lipiden geschuldet. So konnte in Versuchen mit 3T3-L1 Präadipozyten auch dann eine biochemische und morphologische Differenzierung beobachtet werden, wenn die Triglyceridakkumulation inhibiert wurde.⁵¹ Die sphärische Form ist vielmehr das Ergebnis von Veränderungen in den Bestandteilen des Zytoskeletts und der EZM, die bereits in einer frühen Phase der Differenzierung stattfinden und zusätzlich Einfluss auf die Adipogenese nehmen.¹⁷ Die EZM umgibt als nicht-zelluläre Komponente des Fettgewebes die Adipozyten und besteht aus vielfältigen Proteinen und Polysacchariden, welche über Transmembran-Rezeptoren wie z.B. Integrine, andere Laminin-Rezeptoren und Syndecane mit dem Zytoskelett der Zellen verbunden sind. Auf diese Weise wird über Mechanismen der Zell-Matrix-Adhäsion und Signaltransduktion aktiv Einfluss auf zelluläre Prozesse und die Differenzierungsfähigkeit von ASCs zu reifen Adipozyten genommen.⁵²

1.3 Die Extrazellulärmatrix von Fettgewebe

Alle Gewebe und Organe des menschlichen Körpers sind mit einer zellfreien Komponente ausgestattet, der EZM. Diese bildet dabei nicht nur physikalisch ein essentielles Gerüst für die Zellen, sondern übt auch eine wichtige regulatorische Funktion aus, indem sie die Zellmigration, -proliferation und -differenzierung, das Zellwachstum, die Morphogenese, die Homöostase sowie das Überleben der Zellen steuert. Grundsätzlich besteht die EZM aus Wasser, Proteinen und Polysacchariden, jedoch ist die genaue Zusammensetzung und

Verteilung dieser Komponenten sehr heterogen und für jedes Gewebe spezifisch.^{53,54} Darüberhinaus verändert sie sich während unterschiedlicher Entwicklungsstadien eines Gewebes und kann sich in Zellsubtypen weiter unterscheiden.⁵⁵ Zu den zwei Hauptklassen der EZM-Proteine zählen Proteoglykane und fibröse Proteine. Letztere beinhalten u.a. Kollagene, Laminine, Fibronectin, Vitronectin und Elastin. Daneben finden sich verschiedene Wachstumsfaktoren, Enzyme und Glykoproteine.^{21,53} Dabei muss die EZM als eine dynamische Struktur gesehen werden, die nicht nur während der Gewebedifferenzierung, sondern auch in ausgereiften Geweben einem ständigen, energieaufwendigen, enzymatischen und nicht-enzymatischen Umbauvorgang unterliegt.²¹

In der EZM von Fettgewebe konnten in früheren Studien anhand immunologischer Verfahren in 3T3-L1 Adipozyten aus Mäusen Kollagen IV, Lamininkomplexe und Nidogen (Entaktin) sowie in intramuskulären Präadipozyten aus Rindern (bovine intramuscular preadipocytes, BIP) Kollagen I-VI, Laminin und Fibronectin als vorherrschende Proteine ausgemacht werden.^{56,57} In neueren Microarray- und Proteomanalysen wurde eine Vielzahl weiterer Komponenten der EZM von Adipozyten identifiziert.⁵⁸⁻⁶¹ Eine tabellarische Auflistung dazugehöriger Kernproteine wurde von Mariman und Wang (2010) zusammengestellt.²¹ Insgesamt konnten 20 Untereinheiten aus 12 verschiedenen Kollagenen in der EZM von Nagetieren und die Kollagene I, III-VI, XII, XIV, XV und XVIII in der EZM von menschlichem, viszeralem Fettgewebe nachgewiesen werden.²¹ Bei der Untersuchung morphologischer Eigenschaften der EZM von reifen Adipozyten beobachteten Kubo et al. mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) ein dichtes Netzwerk aus Kollagenfibrillen und fibrillären Bündeln um die Adipozyten, welche zusammen mit fibroblastischen Vorläuferzellen benachbarte Adipozyten zu einem Fettzell-Cluster verbanden.⁶²

1.4 Kollagene

Kollagene zählen zu den fibrösen Strukturproteinen der EZM und stellen beim Menschen mit einem Anteil von ungefähr 30% der Gesamtmasse aller Proteine

das am häufigsten vorkommende Protein dar.^{54,63} Es sind insgesamt 28 verschiedene Kollagentypen (Typ I-XXVIII) bekannt, die sich stets aus drei Polypeptidketten, den sogenannten α -Ketten, zusammensetzen und umeinander gewunden eine rechtsgängige Tripelhelix ausbilden. In diesen tripelhelikalen Abschnitten, auch Kollagen-Domäne (Col-domain) genannt, besteht jede α -Kette aus repetitiven (–Glycin–X–Y–)-Triplets, wobei an Position X häufig Prolin und an Position Y Hydroxyprolin zu finden ist. Hydroxyprolin entsteht dabei noch vor der Tripelhelixbildung durch die posttranslationale Hydroxylierung von Prolin mittels des Enzyms Prolyl-4-Hydroxylase. Diese spezielle Anordnung ermöglicht die Faltung einer eng gewundenen, stabilen Helix. An beiden Enden werden die Kollagen-Domänen von einer Nicht-Kollagen-Domäne (NC-domain) flankiert, die aus (–Nicht-Glycin–X–Y–)-Regionen bestehen und für den strukturellen Zusammenbau sowie die biologische Aktivität der Kollagene wichtig sind.^{64,65} Ein tripelhelikales Molekül kann dabei aus einem Homotrimer, also drei identischen α -Ketten, bestehen oder ein Heterotrimer aus zwei oder drei verschiedenen α -Ketten bilden. Durch alternative Promoter und alternatives Splicing existieren innerhalb eines Kollagentyps verschiedene α -Ketten und molekulare Isoformen, wodurch sich die Vielfalt an verschiedenen Kollagenen vergrößert.⁶⁶ Grundsätzlich lassen sich Kollagene nach ihrem supramolekularen Zusammenbau in zwei Gruppen aufteilen: fibrilläre und nicht-fibrilläre Kollagene. Kennzeichnend für fibrilläre Kollagene ist das Vorhandensein einer großen tripelhelikalen Domäne, wohingegen nicht-fibrilläre Kollagene mehrere tripelhelikale Abschnitte aufweisen. Als Sondertyp der fibrillären Kollagene gilt die Verankerungsfibrille Kollagen VII. Zu den Subgruppen der nicht-fibrillären Kollagene zählen Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (engl.: fibril-associated collagens with interrupted triple helices, FACITs), netzbildende Kollagene, transmembranäre Kollagene, MULTIPLEXINS (multiple triple-helix domains and interruptions) und Kollagen XXVIII, das keiner Subgruppe zugeordnet werden kann.^{66,67} In der folgenden Tabelle sind die Kollagene nach dieser Einteilung abgebildet.

Tabelle 1. Einteilung der verschiedenen Kollagentypen nach fibrillären und nicht-fibrillären Kollagenen. (FACITs = fibril-associated collagens with interrupted triple helices; MULTIPLEXINs = multiple triple-helix domains and interruptions)

Art	Kollagentyp
Fibrilläre Kollagene	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
Verankerungsfibrille	VII
Nicht-fibrilläre Kollagene	
FACITs	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI
Netzbildende Kollagene	IV, VI, VIII, X
Transmembranäre Kollagene	XIII, XVII, XXIII, XXV
MULTIPLEXINs	XV, XVIII
Andere	XXVIII

Im Fettgewebe erfolgt die Herstellung der Kollagene zum Teil durch die Adipozyten selbst sowie weitere Zellen der SVF wie Präadipozyten, multipotente Stammzellen, Endothelzellen und eingewanderte Monozyten/Makrophagen. In der EZM von menschlichem, viszeralem Fettgewebe wurden bisher die Kollagene I, III-VI, XII, XIV, XV und XVIII nachgewiesen.²¹ Dabei sind vor allem die Typen I, IV und VI ein wesentlicher Bestandteil in weißem Fettgewebe.⁶⁸ Das fibrilläre Kollagen I findet sich im interstitiellen Raum und trägt zur grundlegenden Architektur der EZM bei.⁶⁹ Eine besondere Rolle kommt Kollagen IV zu, das den Hauptbestandteil der Basallamina bildet und damit die Adipozyten umhüllt.⁷⁰ Die Expression dieses netzbildenden Kollagens nimmt mit Beginn der Differenzierung erheblich zu und ist für das Überleben der Adipozyten essentiell. Ein spezifischeres Kollagen für Fettgewebe scheint Typ VI zu sein.²¹ Es bildet den größten Anteil in der EZM von Adipozyten und es gibt Hinweise darauf, dass eine Fehlregulation seiner Expression an der Entstehung von Adipositas-assoziierten Krankheiten beteiligt ist.^{68,71,72} Es interagiert mit verschiedenen Proteinen der Matrix wie Proteoglykanen und Fibronectin. Zudem wird durch das Zusammenspiel mit Kollagen I und IV eine wichtige Funktion bei der Verankerung der Basalmembran an der Zelle sowie der Regulation der strukturellen Organisation der EZM vermutet.^{21,23}

1.5 Die dynamischen Vorgänge in der Extrazellulärmatrix

Die Veränderungen des intrazellulären Metabolismus mit einer zunehmenden Speicherung von Triglyceriden während der adipogenen Differenzierung werden von einer Änderung der Zellmorphologie begleitet. So nehmen die ursprünglich fibroblasten-ähnlichen Präadipozyten eine runde Zellform an, die eine intrazelluläre Akkumulation von Lipidtropfen ermöglicht.⁷³ Voraussetzung dafür ist eine Umorganisation des Zytoskeletts sowie der EZM, die mit Veränderungen in der Expression von Kollagenen und weiteren extrazellulären Bestandteilen einhergehen. Dabei beobachtet man einen Umbau der EZM von einer fibrillären in eine laminaire Struktur.²¹

Eines der ersten Merkmale, die bei der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten beobachtet werden kann, ist die Biogenese einer Basalmembran.^{74,75} Weiner et al. und Ojima et al. zeigten dabei in in vitro Versuchen mit Präadipozyten der Mauszelllinie 3T3-L1, dass sich mit Beginn der adipogenen Induktion die relative Konzentration der mRNA der fibrillenbildenden Kollagentypen I und III zusammen mit ihrer Transkriptionsrate über den gesamten Zeitraum der Differenzierung reduzierte. Gleichzeitig stieg die Synthese der Basalmembran-bildenden Komponenten Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglycan 2 (Perlecan), Nidogen-1 (Entaktin) sowie die β 1-Untereinheit von Laminin, welche ihr höchstes Niveau in der mittleren Phase der Differenzierung erreichten. Genauso verhielt es sich mit Kollagen V und VI, deren maximale Sekretion ebenfalls in der mittleren Phase gemessen wurde.^{73,76}

Ein weiteres frühes Merkmal der adipogenen Differenzierung ist die Abnahme der Genexpression der α 2-Kette von Kollagen VI (COL6A2). Seine Transkriptionsrate ist in Präadipozyten hoch, nimmt im Verlauf allmählich ab und ist in reifen Adipozyten nur noch in sehr geringen Mengen vorhanden. Somit stellt es einen sehr spezifischen Marker für Präadipozyten dar.^{23,68}

Betrachtet man die EZM von reifen Adipozyten, kann auch hier ein aktiv betriebener, stetiger Umsatz beobachtet werden, wie Bouwman et al. in Versuchen mit reifen 3T3-L1 Adipozyten zeigten.⁷⁷ Der Auf- und Abbau der EZM steht in reifen Adipozyten im Gleichgewicht, wohingegen der Anteil an

konstruktiven Faktoren während der adipogenen Differenzierung überwiegt. Die am Abbau beteiligten Enzyme gehören entweder zum fibrinolytischen System oder zu den Matrix-Metalloproteinasen (MMP). An der Synthese von Kollagenen sind verschiedene posttranslationale, modifizierende Enzyme des endoplasmatischen Retikulums, Zytoplasmas und Extrazellulärraums beteiligt (z.B. Prolin- und Lysin-Hydroxylasen, Glykosyltransferasen und Prokollagenasen) sowie extrazelluläre Inhibitoren, welche die o.g. destruktiven Enzyme hemmen.²¹

1.6 Der Effekt von Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) auf die Kollagensynthese und adipogene Differenzierung

Zu den intrazellulären Enzymen, die an der Kollagensynthese beteiligt sind, zählt u.a. die Prolyl-4-Hydroxylase. Im rauen endoplasmatischen Retikulum katalysiert sie in Kollagenvorstufen die Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin. Durch diese posttranslationale Modifikation wird die Tripelhelixbildung der Peptidketten ermöglicht, die anschließend als Prokollagene in die EZM sezerniert werden. Mit Hilfe von EDHB, das ein Struktur analogon der beiden essentiellen Kofaktoren Ascorbat und α -Ketoglutarat (2-Oxoglutarat) darstellt, kann die Prolyl-4-Hydroxylase-Reaktion kompetitiv gehemmt und damit die Tripelhelixbildung gestört werden. Der korrekte Zusammenbau zu supramolekularen Strukturen im extrazellulären Raum wird dadurch verhindert. Das Resultat sind dysfunktionale Proteine, die rasch degradiert werden. EDHB stellt so einen spezifischen Inhibitor der Kollagensynthese dar.⁷⁸

Ibrahimi et al. demonstrierten in 2D Zellkulturversuchen mit TA1 Präadipozyten aus Mäusen mit Hilfe von EDHB die essentielle Rolle der Kollagene für die terminale Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten. Durch Zugabe des Enzyminhibitors während der Anfangsphase der Differenzierung konnte eine Reduktion der sezernierten Kollagene zusammen mit einer konzentrationsabhängigen Hemmung der an der Adipogenese beteiligten Enzyme Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH), Lipoproteinlipase und des adipogenen Markers aP2 beobachtet werden.²³ Ebenso zeigten Nakajima

et al. unter Verwendung von BIPs in 2D Kulturen den negativen Effekt von EDHB auf die Adipogenese durch eine konzentrationsabhängige Hemmung der Triglyceridakkumulation sowie eine Reduktion der Kollagene IV, V und VI bis auf das Level der Präadipozyten.⁶⁹ Für die Verwendung von humanen ASCs in einem 3D Kulturmodell wurde die adipogene Differenzierung in Verbindung mit der Kollagenentwicklung unter EDHB bisher noch nicht untersucht.

1.7 Das dreidimensionale (3D) Kulturmodell

Bei der Verwendung von konventionellen 2D Kultursystemen bilden die Zellen einen Monolayer aus, wodurch die Komplexität der natürlichen Mikroumgebung einer Zelle nicht erfasst werden kann. Das in vivo vorherrschende dreidimensionale Netzwerk aus EZM-Komponenten, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen ist hier geringer ausgebildet. Über biomechanische Eigenschaften und Bindung von Membranproteinen, Wachstumsfaktoren, Enzymen und anderen diffusionsfähigen Molekülen in der EZM werden dabei die Kommunikation der Zelle mit ihrer Umgebung sowie die Zelldifferenzierung und -funktion beeinflusst.⁷⁹⁻⁸¹ Unterschiede zwischen Zellen in einer 3D und 2D Umgebung wurden dabei u.a. in der Morphologie, Matrix-Adhäsion, Ausprägung von Stressfasern, Zellmigration, Gen- und Proteinexpression sowie dem Verhalten gegenüber interstitiellen Strömungen wie Blut- und Lymphfluss festgestellt.⁸⁰

Die Mechanismen der adipogenen Differenzierung wurden bislang intensiv unter Verwendung von 2D Zellkulturen erforscht.⁸² Dabei wird auch die Differenzierungsfähigkeit von ASCs stark von Faktoren ihrer Mikroumgebung, wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen oder dem lokalen Sauerstoffgehalt, beeinflusst.^{2,38,83} Um die gewonnenen Erkenntnisse in den Kontext eines 3D Kultursystems zu setzen, wurden verschiedene 3D Modelle entwickelt. Ein häufig verwendetes Modell in der Grundlagenforschung ist das multizelluläre Sphäroid. Eine Methode ein solches Sphäroid zu generieren ist die sogenannte „liquid overlay technique“, bei der adhärenente Zellen auf einer nicht-adhärenenten Rundbodenplatte ausgesät werden und zu einem Zellverband aggregieren. Auf diese Weise entsteht ein weitgehend homogener, dreidimensionaler

Zellverband, der keinen Träger (scaffold) benötigt und die natürliche Mikroumgebung der Zellen besser rekapituliert.^{84,85} Durch die Verwendung solcher Sphäroide konnte für mesenchymale Stammzellen eine gesteigerte osteogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit im Vergleich zu konventionellen 2D Kulturen beobachtet werden.⁸⁶

1.8 Housekeeping Gene

Viele Kenntnisse über die intra- und extrazellulären Vorgänge humaner Adipozyten stammen von Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Sie ermöglicht es in Proben, aus denen nur geringe Mengen mRNA isoliert werden können, Veränderungen der Genexpression zu beobachten. Durch die einfache Handhabung und hohe Sensitivität stellt sie daher auch bei der Untersuchung von Veränderungen der Genexpression während der adipogenen Differenzierung ein geeignetes Verfahren dar.^{87,88} Die Detektion kleiner Veränderungen in der Genexpression gelingt dabei anhand einer relativen Quantifizierung, was den Einsatz eines internen Standards zur Normalisierung der gemessenen Werte erfordert. Hierzu werden Gene verwendet, die unter den gewählten experimentellen Bedingungen stabil exprimiert werden.⁸⁹ Von einer Vielzahl sogenannter Housekeeping Gene (HKG), die meist in grundlegende Zellfunktionen involviert sind, werden diese Eigenschaften angenommen. Obwohl sie einen Goldstandard in der Normalisierung der qPCR darstellen, existiert keine einheitliche Verwendung und für einige herkömmlich verwendete HKG wie z.B. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Beta-actin (ACTB) und 18S werden in der Literatur Instabilitäten beschrieben.⁹⁰⁻⁹² Dennoch werden sie häufig ohne auf die Stabilität ihrer mRNA-Expression unter den jeweiligen Versuchsbedingungen überprüft zu werden eingesetzt. Die Validität der Ergebnisse ist unterdessen erheblich von der Auswahl eines adäquaten, stabil exprimierten Kontrollgens abhängig. HKG, die einer Regulation ausgesetzt sind, führen zu signifikanten, unvorhersehbaren intra- und interindividuellen Unterschieden in ihren Expressionsmustern.⁹³ Zur Bestimmung der Housekeeping Gen Stabilität finden in der Literatur die Softwares Bestkeeper⁹⁴,

Normfinder⁹⁵ und geNorm⁹⁶ (qBase+) häufige Anwendung. Neben Versuchen in konventionellen 2D Kulturen wurden sie auch in verschiedenen 3D Modellen unter Verwendung von Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen aus der Synovia genutzt.^{97,98} Unseres Wissens nach wurde das Expressionsverhalten der gängigen HKG in Versuchen mit adipogener Differenzierung von hASCs im Vergleich einer 2D und 3D Zellkultur bislang nicht untersucht. Um valide Ergebnisse aus Genexpressionsanalysen beider Kultursysteme zu generieren, war es daher essentiell im Vorfeld ein geeignetes HKG zu evaluieren.

1.9 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitors EDHB auf die Kollagensynthese und Adipogenese von menschlichen Stammzellen des Fettgewebes (human adipose-derived stem cells, hASC) in einer 2D und 3D Kultur zu untersuchen. Auf diese Weise sollte die Rolle der EZM für die Differenzierungsfähigkeit der Zellen zu reifen Adipozyten näher beleuchtet werden. Im Einzelnen wurden die Ausbildung der Kollagene I, IV und VI und die Auswirkung auf die Lipidsynthese unter dem Einfluss von EDHB vergleichend in einem konventionellen 2D Kultursystem und 3D Sphäroid-Modell betrachtet. Neben histologischen Färbungen, immunhistochemischen Analysen und Bestimmungen des Triglyceridgehaltes mittels Triglycerid-Assay wurden die Unterschiede in der Kollagenbildung und adipogenen Differenzierung mit Hilfe der qPCR quantifiziert.

Um die Validität der Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse in den unterschiedlichen Kulturmodellen zu gewährleisten, muss ein geeignetes Referenzgen zur Normalisierung der Daten verwendet werden. Eine weitere Intention dieser Arbeit war daher die Identifikation eines Housekeeping Gens, das während der adipogenen Differenzierung von hASCs in einem 2D und 3D Kultursystem stabil exprimiert wird. Dazu wurde das Expressionsverhalten herkömmlich verwendeter HKG überprüft und das Referenzgen mit der höchsten Stabilität unter den gegebenen Versuchsbedingungen ermittelt.

2. Material

2.1 Laborgeräte

CO ₂ Inkubator	IBS integra biosciences, Fernwald, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer Tecan GENios pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr, Biberach, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte Model L-81	Labinco, Breda, Niederlande
Kühlschrank	Liebherr, Biberach, Deutschland
Kryostat CM 3050 S	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop BX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop inverted IX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge Sigma 1-14	Sigma Centrifuges, Newtown, Shropshire, Vereinigtes Königreich
Multisteppipette HandyStep®	Brand, Wertheim, Deutschland
pH Meter HI2210	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette controller accu-jet® pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Real-Time PCR Detection System CFX96™	Bio-Rad, München, Deutschland
Spektrophotometer MRC	Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA
Mikroplattenleser	
Sterilwerkbank HeraSafe Typ HS 18	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermoschüttler Model MHR 23	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
TissueLyser Qiagen	Retsch, Haan, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortex IKA® MS 3 basic	IKA-Works Inc, Wilmington, NC, USA

Wasserbad

Memmert, Schwabach, Deutschland

2.2 Laborverbrauchsmaterialien

Glas-Pasteurpipetten

Brand, Wertheim, Deutschland

Mikroskop-Deckgläschen

Marienburg, Lauda Königshofen,
Deutschland

Mikroskop-Objektträger

R. Langenbrinck, Emmendingen,
Deutschland

Nunc® CryoTubes®

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
USA

Parafilm®

VWR, Darmstadt, Deutschland

PCR-Streifen mit 8 Gefäßen

Biozym, Hessisch Oldendorf,
Deutschland

Pipettenspitze 20 µl

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Pipettenspitze 200 µl, 300 µl, 1000 µl

Starlab, Hamburg, Deutschland

Polypropylene tube 15 ml, 50 ml

Greiner Bio-One, Frickenhausen,
Deutschland

Puderfreie Nitril Handschuhe

Medline, Kleve, Deutschland

SensiCare Ice®

Reagenzien-Reservoir

VWR, Darmstadt, Deutschland

Safe seal micro tubes 1,5 ml, 2,0 ml

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Serological Pipetten 5 ml, 10 ml,
25 ml, 50ml

Greiner Bio-One, Frickenhausen,
Deutschland

Spritzen 10 ml, 20 ml

BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Spritzenfilter 0,2 µm

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Terralin® Flüssigdesinfektionsmittel

Schülke, Norderstedt, Deutschland

Tissue-Tek®

Sakura, Staufen, Deutschland

Zellkulturflasche T75, T175

Greiner Bio-One, Frickenhausen,
Deutschland

Zellkulturplatte 24 Well

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
USA

Zellkulturplatte 96 Well

TPP, Trasadingen, Schweiz

2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen überwiegend von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (München, Deutschland). Ausnahmen stellen folgende aufgelisteten Chemikalien dar:

Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Antibody Diluent, Dako REAL™	Dako, Santa Clara, CA, USA
BODIPY® 493/503	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glycergel® Mounting Medium	Dako, Santa Clara, CA, USA
ImmunoSelect® Antifading Mounting Medium DAPI	Dianova, Hamburg, Deutschland
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thesit® Gel	Gepepharm, Hennef (Sieg), Deutschland
TRIzol™ Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.4 Puffer und Lösungen

Hoechst 33258 Stammlösung	0,1 mg/ml in ddH ₂ O → Gebrauchslösung: 0,1 µl/ml in 1 x TEN Puffer
Kollagenase-Puffer	0,1 M HEPES, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ , 5 mM Glukose, 0,1% Kollagenase NB4, 1,5% BSA → pH 7,4
Oil Red O Färbelösung	0,5 g Oil Red O in 100 ml Isopropylalkohol, 66,6 ml ddH ₂ O → vor Gebrauch filtriert (0,2 µm Filter)
1 x Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	10 PBS (Dulbecco A) Tabl./ 1 L ddH ₂ O

Phosphatgepufferte Salzlösung	50 mM Phosphat-Puffer, 2 mM Na ₂ EDTA•2H ₂ O, 2 M NaCl → pH 7,4
1 x TEN Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl → pH 7,4

2.5 Induktoren zur Adipozytendifferenzierung (Stammlösungen)

Dexamethason-Stammlösung (Sigma-Aldrich)	1 mM in Ethanol
Humaninsulin-Stammlösung (Promocell)	1,7 mM in 30 mM HCL, sterilfiltriert
IBMX-Stammlösung (Serva)	25 mM in ddH ₂ O, Zusatz von einer Spatelspitze Na ₂ CO ₃ , sterilfiltriert
Indometacin-Stammlösung (Sigma-Aldrich)	50 mM in Ethanol

2.6 Zellkultur

Kulturmedium zur Zellexpansion	DMEM/F-12 (Gibco® Thermo Fisher Scientific) 10% FCS (Gibco® Thermo Fisher Scientific) 1% P/S: Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10.000 µg/ml) (Gibco® Thermo Fisher Scientific)
Gefriermedium	DMEM/F-12 (Gibco® Thermo Fisher Scientific) 10% FCS (Gibco® Thermo Fisher Scientific) 1% P/S (Gibco® Thermo Fisher Scientific) 5% DMSO (Sigma)
Basalmedium	Preadipocyte Basal Medium (PBM-2) (Lonza) 10% FCS (Gibco® Thermo Fisher Scientific)

Induktionsmedium zur adipogenen Differenzierung	1% P/S (Gibco® Thermo Fisher Scientific) Preadipocyte Basal Medium (PBM-2) (Lonza) 10% FCS (Gibco® Thermo Fisher Scientific) 1% P/S (Gibco® Thermo Fisher Scientific) 1 µM Dexamethason 1,7 µM Humaninsulin 500 µM IBMX 200 µM Indometacin
Trypsin-EDTA (0,25%), phenol red	Gibco® Thermo Fisher Scientific
Collagenase NB4 aus <i>Clostridium histolyticum</i>	SERVA Electrophoresis

2.7 Antikörper, Oligonukleotide und Enzyme

Tabelle 2. Primäre Antikörper.

Primäre Antikörper Typ IgG (Kaninchen)	Hersteller
anti- collagen I , 1:800 verdünnt in DAKO REAL™ Antibody Diluent	Abcam® (ab34710)
anti- collagen IV , 1:150 verdünnt in DAKO REAL™ Antibody Diluent	Abcam® (ab19808)
anti- collagen VI , 1:200 verdünnt in DAKO REAL™ Antibody Diluent	Abcam® (ab6588)

Tabelle 3. Sekundäre Antikörper.

Sekundäre Antikörper Typ IgG (Ziege)	Hersteller
Alexa Fluor® 594-conjugated anti-rabbit , 1:400 verdünnt in DAKO REAL™ Antibody Diluent	Dianova (111-585 008)

Tabelle 4. Primersequenzen für die quantitative PCR.

Primer	Sequenz	Hersteller
COL1A1	nicht bekannt	QuantiTect Primer Assay, Qiagen
COL4A2	nicht bekannt	QuantiTect Primer Assay, Qiagen
GAPDH	forward: AGT CAG CCG CAT CTT CTT TT reverse: CCA ATA CGA CCA AAT CCG TTG	Biomers
ACTB	forward: CGA GAA GAT GAC CCA GAT CA reverse: CGT ACA GGG ATA GCA CAG C	biomers
RPL13a	forward: AAG TAC CAG GCA GTG ACA G reverse: CCT GTT TCC GTA GCC TCA TG	biomers
EF1 α	forward: CCC CGA CAC AGT AGC ATT TG reverse: TGA CTT TCC ATC CCT TGA ACC	biomers
B2M	forward: CGT GTG AAC CAT GTG ACT TTG reverse: TGC GGC ATC TTC AAA CCT C	biomers
18S	forward: GGA CAG GAT TGA CAG ATT GAT reverse: AGT CTC GTT CGT TAT CGG AAT	biomers
aP2	nicht bekannt	QuantiTect Primer Assay, Qiagen
C/EBP α	nicht bekannt	QuantiTect Primer Assay, Qiagen
PPAR γ	nicht bekannt	QuantiTect Primer Assay, Qiagen

2.8 Kits

ImProm-II™ Reverse Transcription System

Promega

Live/Dead Cell Staining Kit II

PromoKine

MESA GREEN qPCR™ Mastermix Plus für SYBR®

Eurogentec

Serum Triglycerid Bestimmungs-Kit

Sigma- Aldrich

3. Methoden

3.1 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus humanem Fettgewebe

Für alle Versuche dieser Arbeit wurden Stammzellen verwendet, die aus Fettgewebe weiblicher Spenderinnen gewonnen wurden. Im englischen Sprachgebrauch werden die Stammzellen als *human adipose-derived stem cells* (hASCs) bezeichnet. Sie sind mesenchymalen Ursprungs und können aus Liposuktionsmaterial oder überschüssigem Fett von Reduktionsplastiken isoliert werden.⁹⁹ In allen Versuchen mit EDHB sind hierbei kommerziell erworbene Zellen der Firma Lonza (Basel, Schweiz) verwendet worden. In Versuchen zur Ermittlung eines stabilen HKGs isolierten wir Stammzellen aus Liposuktionsaspirat einer 30-jährigen Spenderin nach erfolgter Einverständniserklärung. Ein entsprechendes positives Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg lag vor (141/14).

Zur Isolierung der Stammzellen wurde das Liposuktionsaspirat enzymatisch mit einer Kollagenase verdaut. Dabei wurde das Material auf einem Plattformschüttler für 2 Stunden bei 37°C in einem Kollagenasepuffer inkubiert. Danach konnte durch Filtration mit einem 100 µm Filter der flüssige Teil mit darin enthaltenen Stammzellen vom festen Fettgewebe getrennt werden. Die Suspension wurde anschließend bei 311 rcf für 10 min zentrifugiert und die an der Oberfläche schwimmenden ausgereiften Fettzellen abgesaugt. Abhängig von der Menge der Probe wurde dann eine geringe Menge PBS hinzugefügt, ein weiteres Mal bei 311 rcf für 10 min zentrifugiert und die schwimmenden Fettzellen erneut abgesaugt. Der Rest der Suspension wurde nochmals filtriert, bei 700 rcf für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Das auf diese Weise gebildete Pellet enthält neben den gewünschten hASCs auch noch weitere Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, glatte Muskelzellen, Leukozyten und Adipozytenvorläuferzellen und wird *stromal vascular fraction* (SVF) genannt.³⁵ Dieses Pellet konnte anschließend durch Resuspension mit Kulturmedium zur weiteren Zellexpansion in Zellkulturflaschen überführt werden. Sollten die gewonnenen Zellen zur Lagerung kryokonserviert werden, so wurden sie in Kulturmedium mit 5% DMSO bei

-80°C eingefroren. Dabei war es wichtig eine schrittweise Reduktion der Temperatur von etwa 1°C pro Minute zu erreichen, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Dazu wurden die zu konservierenden Röhrchen über Nacht in mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainern bei -80°C eingefroren.

3.2 Zellexpansion

Die isolierten hASCs sowie die kommerziell erworbenen hASCs der Firma Lonza wurden zur Expansion mit einer Zelldichte von 10.000 – 15.000 Zellen/cm² in T175 Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. hASCs besitzen die Fähigkeit an Plastik zu adhären und so einen Zellrasen am Boden der Flasche auszubilden, während die anderen Zellfraktionen der SVF dies nicht tun.² Auf diese Weise konnten am darauffolgenden Tag mit dem Wechsel des Kulturmediums nicht-adhären Zellen entfernt werden. Jeden zweiten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt, wodurch die adhären hASCs mit jedem Mediumwechsel weiter selektiert wurden. Bei annähernder Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin für 5 min im Inkubator inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit Kulturmedium abgestoppt und die Suspension in ein Polypropylen-Tube überführt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 311 rcf entstand ein Pellet, das nach Absaugen des Überstands in Kulturmedium resuspendiert wurde und anschließend die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt werden konnte. Mit einer Zelldichte von 10.000 – 15.000 Zellen/cm² wurden die Zellen auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt und erneut bis zur Konfluenz kultiviert. Nach diesem Verfahren wurden die Zellen bis zur Passage 3 (P3) expandiert.

3.3 Zweidimensionales (2D) Kulturmodell

In den Versuchen wurden die Zellen in 24-Well Platten mit 50.000 Zellen pro Well in Basalmedium ausgesät, was einer Zelldichte von 25.000 Zellen/cm² entspricht. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag -2 definiert. Zwei Tage nach der Aussaat wurde zur adipogenen Differenzierung der Zellen das Basalmedium durch Induktionsmedium ersetzt. Hierbei wurde je nach Versuchsreihe

zusätzlich der in Ethanol gelöste Enzyminhibitor Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Der Wechsel des Induktionsmediums mit oder ohne Enzyminhibitor erfolgte jeden zweiten Tag bis zum Versuchsende. Die 24-Well Platten befanden sich während der gesamten Versuchsdauer im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

Wurde für den Versuch neben einer 2D auch eine 3D Kultur angelegt, so erfolgte der Ersatz des Basalmediums an Tag 0 nur zur Hälfte mit Induktionsmedium, welches dann jedoch aus doppelt konzentrierten Induktionsfaktoren bestand. Alle weiteren Mediumwechsel erfolgten mit der Hälfte einfach konzentrierten Induktionsmediums. Dieses Vorgehen war notwendig um gleiche Voraussetzungen wie bei der 3D Zellkultur zu schaffen (siehe 3.4).

3.4 Dreidimensionales (3D) Kulturmodell

Zur Herstellung von 3D Zellkulturen wurde das Prinzip der sogenannten „liquid overlay technique“ genutzt. Die Zellen befinden sich dabei in einem beschichteten Well, an dessen Fläche sie nicht adhären können. Durch Aggregation der im Medium befindlichen Zellen bei stetiger Rotation auf einem Plattformschüttler formen diese eine dreidimensionale Struktur, das sogenannte Sphäroid.^{84,85}

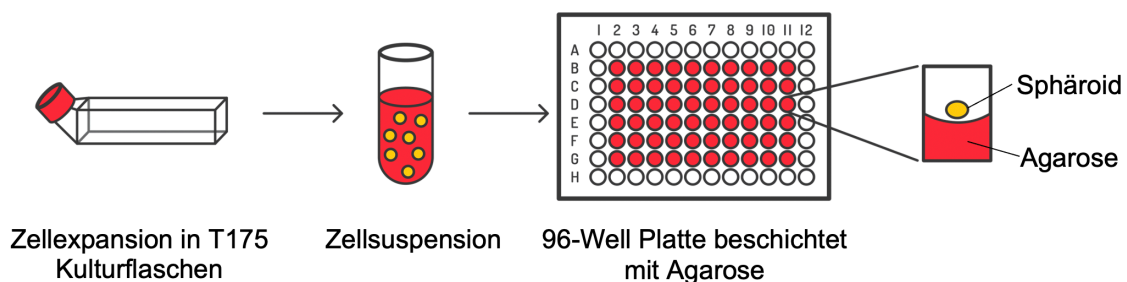


Abbildung 3. Herstellung von 3D Sphäroiden mit Hilfe der „liquid overlay technique“ (nach Weiser, B.⁸⁵, wiederveröffentlicht mit freundlicher Genehmigung). hASC's wurden in T175 Kulturflaschen expandiert und mit einer Zellzahl von 5.000 Zellen pro Well auf eine 96-Well Platte ausgesät. Jedes einzelne Well wurde zuvor mit 1,5% Agarose-Gel beschichtet, welches als nicht-adhärenente Fläche diente. Durch die Eigenschaft der Agarose einen konkaven Meniskus auszubilden und stetige Rotation der 96-Well Platte auf einem Plattformschüttler aggregierten die Zellen in der Mitte des Wells und formten dabei ein multizelluläres Sphäroid.

Jedes Well einer 96-Well Platte wurde hierfür zuvor mit 50 µl 1,5% Agarose-Gel, das in DMEM/F-12 gelöst war, beschichtet. Dieses diente als nicht adhärenzte Fläche. Da ein Verdunsten des Mediums in den äußeren Reihen der Platte über den Versuchszeitraum die Versuchsbedingungen beeinflussen könnte, wurden die äußeren Reihen nicht mit Zellen beimpft, sondern lediglich mit penicillin- (10000 U/ml) und streptomycinhaltigem (10000 µg/ml) PBS gefüllt. Es folgte die Aussaat der Zellen im Basalmedium (siehe 3.3) mit 5.000 Zellen pro Well. Analog zur 2D Kultur wurde dieser Zeitpunkt als Tag -2 definiert und eine Aggregation der Zellen bis Tag 0 abgewartet. Danach erfolgte die Induktion der Adipogenese indem die Hälfte des Mediums mit Induktionsmedium, bestehend aus doppelt konzentrierten Induktionsfaktoren (mit oder ohne Enzyminhibitor), ausgetauscht wurde. Ein kompletter Austausch des im Well befindlichen Mediums würde zum versehentlichen Aufsaugen und Verlust des Sphäroids führen. Darauf folgende Mediumwechsel und Probenentnahmen erfolgten exakt wie in der 2D Kultur (siehe 3.3). Die 96-Well Platten befanden sich während der gesamten Versuchsdauer auf einem Plattformschüttler (50 rpm) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

3.5 Kryoschnitthanfertigung der 3D Sphäroide

Für die histologische Weiterverarbeitung der Sphäroide aus den 3D Zellkulturen wurden die Proben zunächst in 3,7%igem Formalin in PBS für 20 min fixiert. Um das Auffinden der farblosen Sphäroide zu ermöglichen, wurden diese anschließend für 15 min mit Methylenblau gefärbt. Daraufhin wurden die Sphäroide mit in ddH₂O gelöster Sucrose in aufsteigender Konzentration (10%, 20%, 30% bis 40%) für jeweils 30 min dehydratisiert. Die dehydratisierten Sphäroide wurden anschließend in TissueTek[®] eingebettet und bei -80°C eingefroren. Am Kryotom (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger fixiert. Nur Schnitte mit dem gesamten Querschnitt des Sphäroids wurden für weitere Analysen verwendet.

3.6 Oil Red O Färbung

Mit der Oil Red O (ORO) Färbung können intrazelluläre Triglyceride dargestellt werden. Je nach Versuch wurden die Proben an Tag 0, 7, 9, 14 oder 21 nach der adipogenen Induktion gefärbt.

Die Proben der 2D Kultur konnten direkt im Well gefärbt werden. Dazu wurde die Probe zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 3,7%igem Formalin in PBS fixiert. Für die Proben der 3D Kultur wurden die hergestellten Sphäroidschnitte verwendet (siehe 3.5). Anschließend wurden die Proben der 2D und 3D Kultur mit ddH₂O gewaschen und mit der ORO-Färbelösung für 6 min inkubiert. Um die Zellkerne zu färben erfolgte nach einem erneuten Waschvorgang mit ddH₂O eine 3 minütige Inkubation mit Mayer's-Hämatoxylin. Zur Entwicklung der Hämalaun-Färbung mussten die Proben anschließend mehrmals mit kaltem Leitungswasser gewaschen werden. Die gefärbten Proben wurden abschließend mit PBS bedeckt (2D Proben) bzw. mit Glycergel auf Objektträgern fixiert (3D Proben).

3.7 Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung (Live/Dead- Assay)

Zur Unterscheidung vitaler und abgestorbener Zellen wurde das Live/Dead cell staining Kit des Herstellers PromoKine verwendet. Dieses enthält zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, Calcein-AM und Ethidium homodimer III. Das grünfluoreszierende Calcein markiert vitale Zellen, indem der Vorläufer Calcein-AM durch die Zellmembran vitaler Zellen penetrieren kann und dort von zellulären Esterasen zum zellmembranimpermeablen Calcein hydrolysiert wird. Das Ethidium hingegen lässt tote Zellen rot fluoreszieren, da es nur durch defekte Zellmembranbereiche toter Zellen ins Zytoplasma gelangen kann und dort mit der DNA des Zellkerns interkaliert. Das Kit wurde gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Färbung konnte dabei direkt in den Wells der 2D Zellkultur durchgeführt werden.

3.8 Immunhistochemische Analyse der Kollagenbestandteile der Extrazellulärmatrix

Mittels kollagentypspezifischer Antikörper gegen Kollagen I, IV und VI wurden an Tag 0, 5 und 9 nach Beginn der adipogenen Differenzierung und Behandlung mit EDHB immunhistochemische Färbungen angefertigt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Proben zuvor in PBS mit 1% bovine serum albumin (BSA) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die primären Antikörper wurden in Antibody Diluent wie in Tabelle 2 (siehe 2.7) aufgeführt verdünnt. Die verdünnten Antikörper wurden anschließend in die Wells (2D) bzw. auf die Kryoschnitte (3D) pipettiert und über Nacht in einer Feuchtekammer bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben dreimal für je 2 min in PBS auf einem Plattformschüttler gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der Sekundärantikörper, welcher mit dem Farbstoff AlexaFluor® 594 konjugiert ist, wurde gemäß Tabelle 3 (siehe 2.7) verdünnt und die Proben damit für 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde danach wiederholt. Anschließend wurden die Schnitte mit BODIPY® 493/503 - Stammlösung (1 mg/ml), welche 1:100 in PBS verdünnt wurde, für 15 min bei Dunkelheit inkubiert. BODIPY® 493/503 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher akkumulierte Lipidtropfen darstellt. Diese Technik wurde alternativ zur Färbung der Lipidtropfen mittels Oil Red O angewandt. Danach wurden die Proben mehrmals mit PBS auf einem Plattformschüttler gewaschen. Abschließend erfolgte eine Färbung der Nuklei mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Dafür wurden zwei Tropfen des DAPI Mounting Mediums in die Wells der 2D Proben für 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur appliziert und anschließend mit PBS gewaschen. Auf die Kryoschnitte der 3D Proben wurden ebenfalls zwei Tropfen DAPI Mounting Medium hinzugefügt und direkt mit einem Deckglas abgedeckt.

3.9 Mikroskopie

Die 2D Proben wurden mit dem inversen Olympus IX51 Mikroskop und die 3D Proben mit dem Olympus BX51 Mikroskop aufgenommen. Für Calcein und

BODIPY® 493/503 wurde der FITC Filter (ex./em. 460-490 nm/ 520 nm), für Ethidium und AlexaFluor® 594 der TRITC Filter (ex./em. 530-550 nm/ 590 nm) und für DAPI der DAPI Filter (ex./em. 330-385 nm/ 420 nm) verwendet.

Die weitere Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mittels der cellSens Software von Olympus.

3.10 Bestimmung des DNA-Gehaltes mittels DNA Assay

Für die Isolation der Zell-DNA wurde jede Probe unter Zugabe von je 250 µl Phosphat-Saline-Puffer zunächst sonifiziert. Für die anschließende Messung wurden 10 µl der Probe verwendet und mit 200 µl einer Arbeitslösung, bestehend aus in TEN-Puffer gelöster Stammlösung Hoechst 33258 (0,1 mg/ml), versetzt. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte jeweils aus biologischen Triplikaten einer Probe. Ein Replikat entsprach einer Zellzahl von 100.000 Zellen. Somit wurden für die 2D Kultur zwei Wells einer 24-Well Platte und für die 3D Kultur 20 Sphäroide pro Replikat verwendet. Zur Messung wurden technische Duplikate auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Als DNA Standard diente eine Lösung mit einem definierten DNA-Gehalt von 23,2 µg/ml. Die Messung wurde am Fluoreszenzspektrometer (Tecan GENios pro, Tecan Dtl. GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei einer Extinktionswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 458 nm durchgeführt.

3.11 Bestimmung des Triglyceridgehaltes mittels Triglycerid Assay

Zur quantitativen Bestimmung des während der Differenzierung gebildeten Fettanteils wurde ein Triglycerid Assay durchgeführt. Die Zellen wurden in je 250 µl 0,5%iger Thesit-Lösung aufgenommen und anschließend sonifiziert. Das verwendete Arbeitsreagenz bestand aus einem enzymatischen Triglyceridbestimmungs-Kit der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), nach dessen Herstellerangaben weiter verfahren wurde. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Hydrolyse des Triglycerids in seinen Glycerolanteil und seine Fettsäureketten mittels Lipase. Durch nachfolgende enzymatische Reaktionen am Glycerolanteil wird dessen Gehalt durch das dabei entstehende rot-violett farbige Quinonimin gemessen, dessen Absorptionsmaximum bei 540

nm liegt. Ein Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm ist direkt proportional zur Triglyceridkonzentration in der Probe. Um eine Aussage über den tatsächlichen Triglyceridgehalt treffen zu können wurde eine Standardgerade mit einem definierten Glycerolgehalt angefertigt. Analog zum DNA Assay (siehe 3.10) wurden biologische Triplikate und technische Duplikate gemessen. Ein biologisches Replikat entsprach einer Zellzahl von 100.000 Zellen. Somit wurden für die 2D Kultur zwei Wells und für die 3D Kultur 20 Sphäroide pro Replikat verwendet. Vor der Messung wurde eine Inkubationszeit von 15 min eingehalten. Die Messung erfolgte am Spektrophotometer (MRX microplate reader, Dynatech Laboratories, Chantilly, Virginia, USA) bei 540 nm. Der Triglyceridgehalt wurde relativ zum DNA-Gehalt (siehe 3.10) angegeben.

3.12 RNA Isolation und cDNA Herstellung (reverse Transkription)

Für die Genexpressionsanalyse mittels qPCR musste zunächst die RNA der Proben extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden. Es wurden biologische Triplikate einer Probe verwendet, wobei jedes Replikat aus drei Wells einer 24-Well Platte der 2D Kultur bzw. 30 Sphäroiden der 3D Kultur bestand. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann in TRIzol[®] Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgenommen. Die im Trizol befindlichen Zellen wurden mit Hilfe einer kleinen Stahlkugel im TissueLyser bei 20 Hz für 2 min zertrümmert. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min bei 4°C wurde die RNA vom Rest der Zellen getrennt. Durch Waschvorgänge mit Isopropanol und 70%igem Ethanol entstand ein Pellet, welches die RNA enthielt. Die RNA Pellets wurden in 30 µl Wasser aufgenommen und für 10 min bei 56°C im Wärmeblock gelöst. Die Menge der extrahierten RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt (Nanodrop 2000c Spektrophotometer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Für nachfolgende Genexpressionsanalysen war es erforderlich aus der isolierten RNA die Erststrang-cDNA zu synthetisieren. Dazu wurde das IMProm-II™ Reverse Transcription System Kit der Firma Promega (Fitchburg, WI, USA) verwendet. Für jede Probe wurden dabei 1 µg RNA eingesetzt und

das jeweils benötigte RNA Volumen jeder Probe mit ddH₂O auf ein Volumen von 11,6 µl aufgefüllt. Jeder Probe wurde dann gemäß Herstellerangaben 8,4 µl des Transkriptionsmix mit dem darin enthaltenen Random-Primer und der reversen Transkriptase hinzugefügt.

3.13 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zu Beginn wurde die cDNA der einzelnen Proben mit DNase/RNase-freiem ddH₂O 1:10 verdünnt. Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte dann mittels der MESA GREEN qPCR MasterMix Plus MeteorTaq Polymerase und den in Tabelle 4 aufgelisteten Primern (siehe 2.7) am CFX96™ Real-Time System von Bio-Rad. Alle PCR-Läufe wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt. Dieser bestand aus einer initialen Denaturierung der Proben bei 95°C für 15 min gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus jeweils 95°C für 15 s, 55°C für 30 s und 72°C für 30 s. Die mRNA-Expressionsrate wurde unter Verwendung des HKGs EF1α normalisiert. EF1α wurde zuvor als stabilstes Referenzgen ermittelt (siehe 3.14). Mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode wurde die Vervielfältigung (fold increase) der Expressionslevel (unter der Annahme einer Amplifikationseffizienz von 100%) bestimmt.¹⁰⁰ Die Expressionsrate aller 2D und 3D Proben wurde stets relativ zu den Proben an Tag 0 der 2D Kultur angegeben.

3.14 Evaluation der Housekeeping Gene

Für die Ermittlung eines stabilen HKGs wurden sechs herkömmlich verwendete Referenzgene (ACTB = Beta-actin, B2M = β2-Mikroglobulin, EF1α = eukaryotic translational elongation factor 1 alpha, GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, RPL13a = Ribosomales Protein L13a und 18S = 18S Ribosom) hinsichtlich der Stabilität ihrer mRNA-Expressionsrate unter 21-tägiger Kultivierung mit adipogener Differenzierung im 2D und 3D Versuch untersucht. Die Probenentnahme erfolgte an den Tagen 0, 7, 14 und 21. Um bei der qPCR Messung möglichst gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurde folgendermaßen vorgegangen: Auf eine 96-Well Platte wurde stets eine adipogen induzierte und eine nicht-induzierte 2D sowie 3D Probe der jeweiligen

Zeitpunkte als technisches Duplikat und eine Negativkontrolle mit H₂O aufgetragen. Dies ließ Platz für die Untersuchung von drei verschiedenen HKG auf einer Platte. Für jedes HKG konnte damit der mittlere Ct-Wert (cycle threshold, Schwellenwertzyklus) einer induzierten und nicht-induzierten 2D sowie 3D Probe zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt werden. Dabei wurden biologische Triplikate angefertigt.

Die Stabilität der HKG wurde nun auf mehrere Arten überprüft, wobei sich das Ergebnis auf den Mittelwert der biologischen Triplikate bezieht. Zum einen wurden die mittleren Ct-Werte aller Proben eines HKGs zusammengefasst und daraus das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt. Zum anderen wurde der Interquartile Range (IQR), also der Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile, zusammen mit dem Median und den beiden Extremwerten (größter und kleinster Ct-Wert) berechnet und als Box-Whisker-Plot aufgetragen.

Außerdem wurden die zur Analyse von HKG bekannten Softwares Bestkeeper⁹⁴, Normfinder⁹⁵ und GeNorm⁹⁶ (qBase+) mit ihren unterschiedlichen Algorithmen eingesetzt. Auch hier wurde das Ergebnis als Mittelwert der biologischen Triplikate angegeben.

Die Software Bestkeeper arbeitet als Excel Addin und ist frei erhältlich (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>). Die Ct-Werte der qPCR Messung können direkt eingesetzt werden. Das Programm ermittelt das stabilste HKG anhand der Mittelabweichung des geometrischen Mittels.⁹⁴

Normfinder ist ebenfalls ein Excel Addin und kostenfrei erhältlich (<http://moma.dk/normfinder-software>). Die gemessenen Ct-Werte müssen hier in einer linearen Skalierung angegeben werden. Um eine relative Quantifizierung der Werte zu erhalten wurde der kleinste Ct-Wert einer Gruppe gleich dem Wert „1“ gesetzt und die restlichen Werte dazu in Relation angegeben. Das durch dieses Programm ermittelte stabilste HKG besitzt die kleinste Intra- und Intergruppen-Varianz der getesteten HKG, welche durch einen Algorithmus berechnet wird.⁹⁵

GeNorm ist Teil der Software qBase+ (<https://www.qbaseplus.com>) und kommerziell erwerbbar. In dieser Arbeit wurde die kostenlose Testversion

verwendet. Die zugrundeliegende Funktionsweise wurden von Vandesompele et al. publiziert.⁹⁶ Die Ct-Werte können in diesem Programm direkt eingesetzt werden. Die Stabilitätsmessung basiert hier auf dem Prinzip, dass das Verhältnis der Expression zweier geeigneter Referenzgene in allen Proben identisch sein sollte und eine fehlende Stabilität eines oder beider Gene zu einer größeren Varianz dieses Verhältnisses führt. Der Vergleich der HKG untereinander führte zu der Bedingung möglichst viele HKG auf einer 96-Well Platte zu messen. Aus diesem Grund wurden hier keine technischen Duplikate aufgetragen und alle zu testenden HKG auf eine Platte aufgetragen.

3.15 Statistik

Alle quantitativen Ergebnisse sind als Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse (einfaktorielle oder zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)) und anschließendem Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche nach Bonferroni ermittelt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen. Für die statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism 6 verwendet.

4. Ergebnisse

Um die Zusammenhänge zwischen der EZM und der adipogenen Differenzierung zu untersuchen, wurden unter anderem Genexpressionsanalysen durchgeführt. Voraussetzung zur Generierung valider Ergebnisse war die Evaluation eines stabilen Housekeeping Gens. Im Folgenden sind zunächst die Versuchsergebnisse zur Ermittlung eines stabilen HKGs aufgeführt. Anschließend werden die Ergebnisse der Zellkultivierungsversuche unter Einfluss des Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitors EDHB aufgeführt, bei denen die Differenzierungsfähigkeit zusammen mit der Entwicklung der EZM von hASCs vergleichend in einem 2D und 3D Modell betrachtet werden.

4.1 Ermittlung eines stabilen Housekeeping Gens

Bei Expressionsanalysen von Genen wird die Expression von HKG als Referenz herangezogen. HKG sollen daher eine stabile Expression unter unterschiedlichen Kulturbedingungen aufweisen. Frühere Studien zur Genexpression in adipogen differenzierten Zellen in einer 2D vs. 3D Kultur ließen Zweifel an der Stabilität des üblicherweise verwendeten und weit verbreiteten HKGs ACTB unter diesen Kulturbedingungen aufkommen (unveröffentlichte Ergebnisse). Um aussagekräftige Werte für die Genexpression von adipogenen Markern und verschiedenen Kollagenen unter adipogener Differenzierung zu erhalten war es jedoch essentiell ein stabiles Referenzgen zu verwenden. Dazu wurde die Expression von sechs herkömmlich verwendeten HKG in einer 2D und 3D Kultur mit undifferenzierten oder differenzierten hASCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung ermittelt. Da zur Bestimmung eines geeigneten HKGs keine einheitlichen Protokolle existierten, verglichen wir die statistischen Parameter Standardabweichung und Interquartilsabstand (Interquartile Range, IQR) der gemessenen Ct-Werte mit den Ergebnissen dreier zur Analyse der HKG-Stabilität bekannter Softwares. Für jedes dieser Kriterien wurde ein Ranking erstellt und anhand dessen das beste HKG evaluiert (Tabelle 5).

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen (STABW) aller gemessenen Werte erzielte EF1 α das beste Ergebnis mit der kleinsten Standardabweichung von +/- 0,45, gefolgt von RPL13a mit +/- 0,61 (Abbildung 4). Mit Ausnahme von 18S hatten alle weiteren HKG eine doppelt so hohe Standardabweichung wie EF1 α (Abbildung 4).

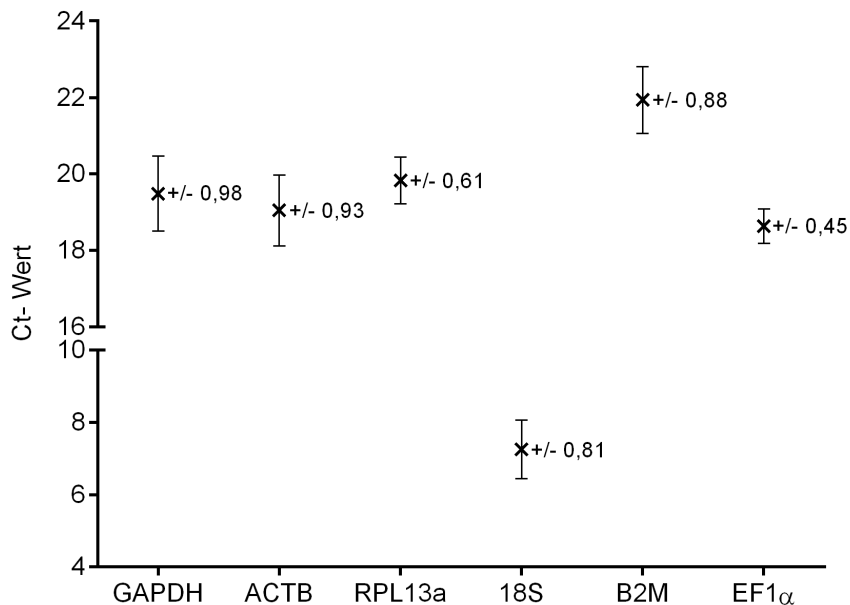


Abbildung 4. Betrachtung der HKG-Stabilität anhand der Standardabweichung. Ct-Wert und STABW verschiedener HKG ermittelt anhand einer qPCR. Die Werte setzen sich aus den Ct-Werten von adipogen induzierten sowie nicht-induzierten 2D und 3D Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur (Tag 0, 7, 14, 21) zusammen. Jeder Wert wurde als das arithmetische Mittel \pm Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten ermittelt.

Eine weitere sinnvolle Möglichkeit die Streuung der Ct-Werte eines HKGs und somit seine Stabilität zu beurteilen ist die Berechnung des Interquartilabstandes (IQR). Dieser gibt an, wie breit das Intervall ist, in dem die mittleren 50 % der Stichprobeelemente liegen. Grafisch ist die Verteilung der Ct-Werte als Boxplot wiedergegeben, das die 25. und 75. Perzentile der gemessenen Werte anzeigt. Mit einem IQR von 0,43 besaß EF1 α das kleinste Intervall. Zudem war die Spanne zwischen den Minimal- und Maximalwerten am geringsten. An zweiter Stelle rangierte RPL13a mit einem IQR von 0,69. Der IQR der übrigen HKG ergab einen Wert > 1 und war so deutlich über doppelt so hoch wie von EF1 α (Abbildung 5).

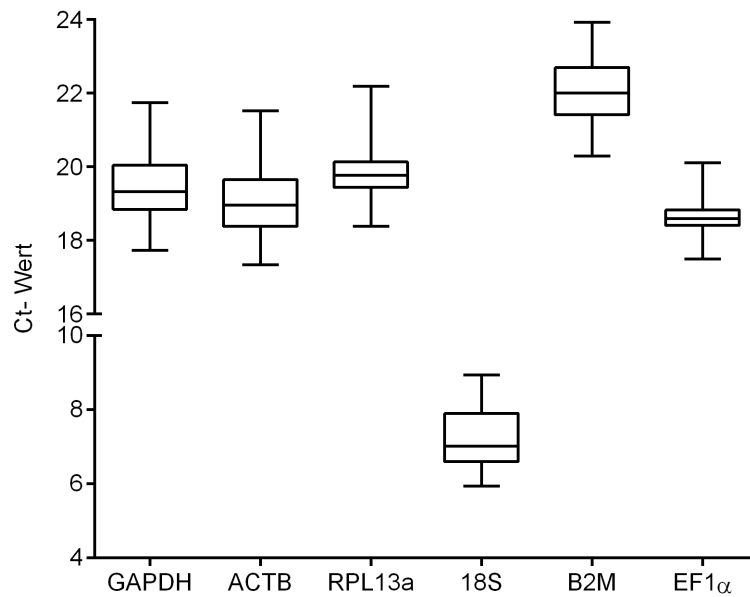


Abbildung 5. Betrachtung der HKG-Stabilität anhand der Verteilung der Ct-Werte dargestellt als Box-Whisker-Plot. Darstellung der beiden Extremwerte, des oberen und unteren Quartils sowie des Medians der Ct-Werte der HKG ermittelt anhand einer qPCR. Die Werte setzen sich aus den Ct-Werten von adipogen induzierten sowie nicht-induzierten 2D und 3D Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur (Tag 0, 7, 14, 21) zusammen. Die Extremwerte stellen jeweils den minimalen und maximalen Wert von drei biologischen Replikaten dar, alle weiteren Werte wurden als das arithmetische Mittel ermittelt.

Die Ergebnisse, die anhand der Softwares GeNorm, Normfinder und Bestkeeper erzielt worden sind, bestätigten die vorherigen Analysen bezüglich Standardabweichung und IQR (Tabelle 5). In allen drei Programmen erzielte EF1 α das beste Ergebnis. Aus diesen Gründen wählten wir für weitere qPCR Messungen EF1 α als HKG aus.

Tabelle 5. Rangordnung der getesteten HKG anhand verschiedener Stabilitätsparameter. Die Stabilitätsparameter sind durch die Algorithmen von GeNorm (M-Value), Normfinder (Stability Value) und Bestkeeper (Standard Deviation = Mittelabweichung) sowie dem Interquartile Range (IQR) und der Standardabweichung (STABW) von Ct-Werten der entsprechenden HKG in adipogen induzierten und nicht-induzierten Zellen errechnet.

Rang	GeNorm	Normfinder	Bestkeeper	STABW	IQR
1	EF1 α (0,19)	EF1 α (0,18)	EF1 α (0,32)	EF1 α (0,45)	EF1 α (0,43)
2	RPL13a (0,20)	GAPDH (0,32)	RPL13a (0,48)	RPL13a (0,61)	RPL13a (0,69)
3	18S (0,2)	RPL13a (0,39)	18S (0,69)	18S (0,81)	B2M (1,11)
4	GAPDH (0,38)	ACTB (0,43)	B2M (0,70)	B2M (0,88)	GAPDH (1,20)
5	ACTB (0,53)	18S (0,51)	ACTB (0,74)	ACTB (0,93)	ACTB (1,27)
6	B2M (0,56)	B2M (0,59)	GAPDH (0,76)	GAPDH (0,98)	18S (1,31)
Kriterium	[M-Value]	[Stability Value]	[Standard Deviation]	[Standardabweichung]	[Interquartile Range]

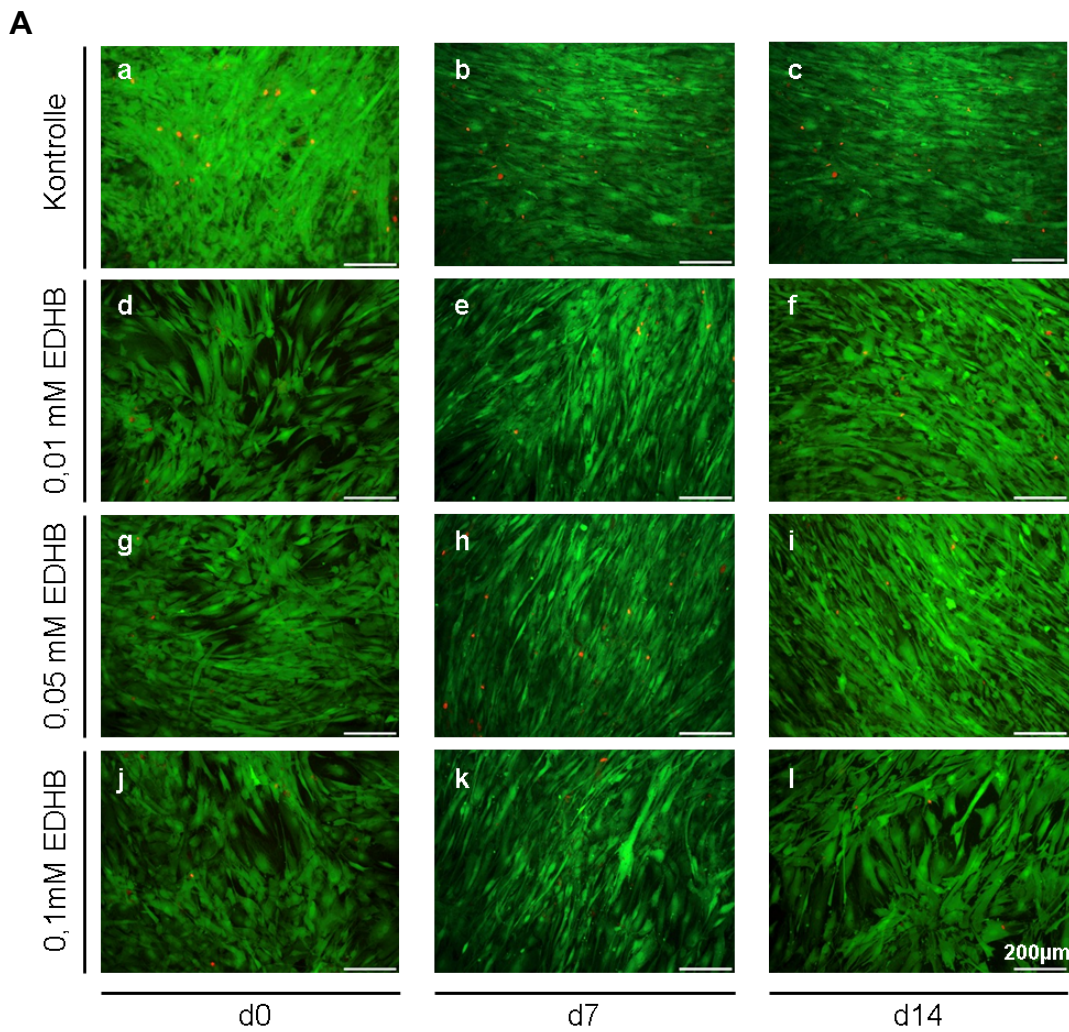
4.2 Einfluss von EDHB auf die adipogene Differenzierung und Kollagensynthese von hASCs im 2D und 3D Kulturmodell

4.2.1 Überprüfung der Toxizität von EDHB auf undifferenzierte hASCs

Um den Einfluss der EZM auf die adipogene Differenzierung von hASCs zu untersuchen und mögliche Unterschiede in einem 2D und 3D Modell zu erfassen, wurde der Enzyminhibitor EDHB verwendet. Als spezifischer Inhibitor der Prolylhydroxylase stört er die Tripelhelixbildung der Kollagene, welche den Hauptbestandteil der EZM bilden²³. Welche Konsequenz die Zugabe dieses Inhibitors auf die adipogene Differenzierung der hASCs in einem 2D und 3D Kultursystem hat, war Gegenstand dieser Arbeit.

Im Vorfeld sollte eine toxische Wirkung des EDHBs auf hASCs ausgeschlossen werden. Dafür wurden die Zellen in einer konventionellen 2D Zellkultur 14 Tage lang in Basalmedium kultiviert und folgende Konzentrationen an EDHB in Ethanol hinzugefügt: 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM sowie eine Lösungsmittelkontrolle mit Ethanol. Der Enzyminhibitor wurde einerseits am Tag der Aussaat (Tag -2), andererseits bei Konfluenz der Zellen (Tag 0 = Zeitpunkt der adipogenen Induktion in Differenzierungsversuchen) hinzugegeben und die Proben an Tag 0, 7 und 14 entnommen.

In der Live/Dead Zellfärbung, bei der vitale Zellen grün und tote Zellen rot fluoreszieren, waren bei allen getesteten EDHB-Konzentrationen sowie der Kontrollgruppe nur sehr wenige tote Zellen aufzufinden (Abbildung 6; A, B). Es konnte daher kein toxischer Effekt des EDHBs bzw. seiner Trägersubstanz (Ethanol) auf die undifferenzierten hASCs nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Live/Dead-Färbung wurde der DNA-Gehalt der Proben als quantitatives Maß für die Zellzahl ermittelt (Abbildung 7; A, B).



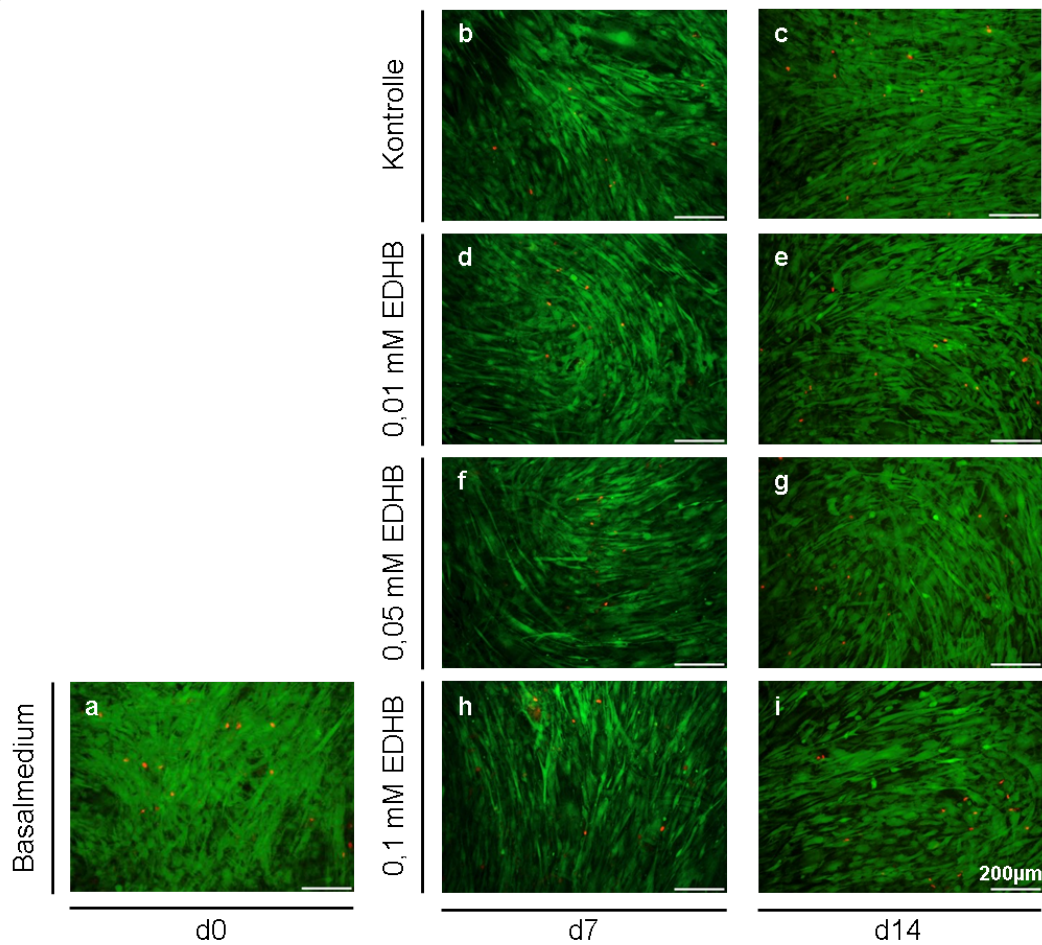
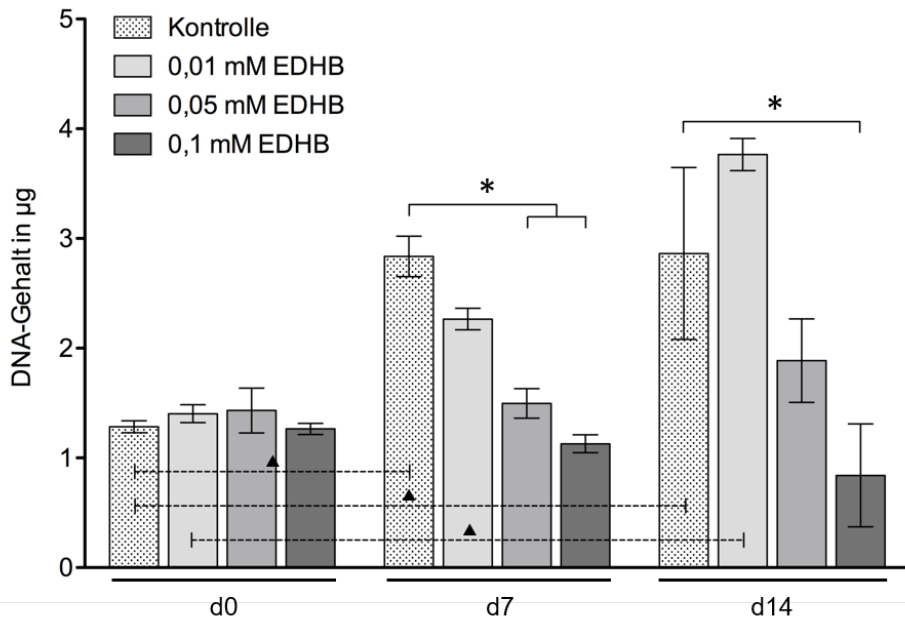
B

Abbildung 6. Untersuchung der Toxizität von EDHB in einer 2D Zellkultur. Der Effekt des EDHBs auf die Vitalität der hASCs bei Zugabe am Tag der Aussaat (Tag -2) (A) bzw. bei Konfluenz der Zellen (Tag 0) (B) bis zum Versuchsende. Die Zellen wurden mit 0,1% Ethanol (Kontrolle) oder den angegebenen Konzentrationen EDHB (0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) behandelt und ein Live/Dead-Assay an Tag 0, 7 und 14 durchgeführt. Lebende Zellen erscheinen grün, tote Zellen sind rot gefärbt. (Es sind repräsentative Aufnahmen mehrerer gefärbter Wells einer 2D Zellkultur dargestellt.)

Unbehandelte Zellen wiesen nach 14-tägiger Kultivierung in beiden Ansätzen eine Verdopplung des DNA-Gehaltes auf. Eine Konzentration von 0,01 mM EDHB zeigte keinen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen, unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe des EDHBs. Ab einer EDHB-Menge von 0,05 mM zeigte sich in beiden Gruppen eine konzentrationsabhängige Abnahme des DNA-Gehaltes, was auf einen proliferationsinhibierenden Effekt des EDHBs auf die hASCs schließen lässt. Mit Zugabe von 0,1 mM EDHB konnte im Verlauf gegenüber den Proben an Tag 0 keine Zunahme des DNA-

Gehaltes gemessen werden. Ein toxischer Effekt von EDHB, welcher durch die Reduktion der Zellzahl zu einem signifikanten Rückgang des DNA-Gehaltes führen würde, konnte auch mittels der Bestimmung des DNA-Gehaltes nicht nachgewiesen werden.

A



B

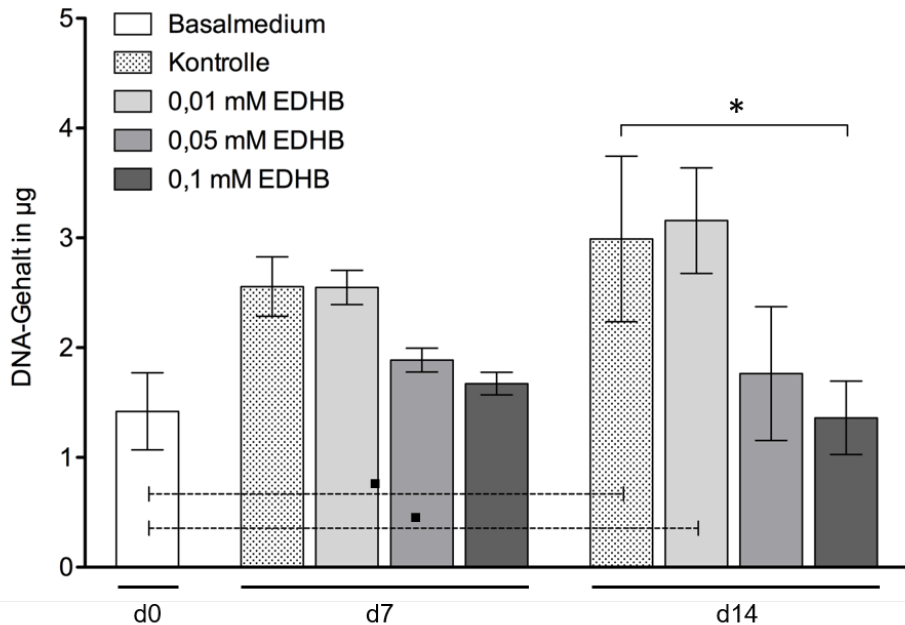


Abbildung 7. DNA-Gehalt in hASCs nach Behandlung mit EDHB in einer 2D Zellkultur. Der Effekt des EDHBs auf den DNA-Gehalt von hASCs bei Zugabe am Tag der Aussaat (Tag -

2) **(A)** bzw. bei Konfluenz der Zellen (Tag 0) **(B)** bis zum Versuchsende. Die Zellen wurden mit Ethanol (Kontrolle) oder den angegebenen Konzentrationen EDHB (0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) behandelt und der DNA-Gehalt an Tag 0, 7 und 14 gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung des DNA-Gehaltes in μg von drei biologischen Replikaten einer 2D Zellkultur. * Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen verschiedenen Konzentrationen EDHB und der Kontrollgruppe des jeweiligen Zeitpunkts. \blacktriangle Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen verschiedenen Konzentrationen EDHB und den jeweiligen Konzentrationen an Tag 0. \blacksquare Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen verschiedenen Konzentrationen EDHB und der Probe an Tag 0 in Basalmedium.

Zwischen den beiden Startzeitpunkten, also der Gruppe, die das EDHB bereits zum Tag der Aussaat (Abbildung 6,7; A), und derjenigen, die es zwei Tage später (Abbildung 6,7; B) erhielt, waren in der Live/Dead Zellfärbung sowie in der Messung des DNA-Gehaltes keine wesentlichen Unterschiede auszumachen. Im Überleben der Zellen sowie bei der Zellproliferation zeigten die Ergebnisse große Ähnlichkeit, sodass der Zeitpunkt der EDHB-Zugabe keine Rolle zu spielen schien. Wir entschieden uns in den folgenden Experimenten das EDHB zeitgleich mit dem Start der adipogenen Phase, also Tag 0, hinzuzugeben.

4.2.2 Einfluss des Prolylhydroxylase-Hemmstoffs EDHB auf die adipogene Differenzierung von hASCs in der 2D und 3D Kultur

In einer 3D Zellkultur können in vivo Bedingungen bekanntermaßen besser modelliert werden als in einer 2D Zellkultur.¹⁰¹ Der Einfluss von EDHB auf die adipogene Differenzierung der hASCs wurde daher vergleichend in einer 2D und der 3D Sphäroid-Kultur untersucht. Dazu wurden die Zellen mit adipogenem Induktionsmedium und verschiedenen Konzentrationen EDHB 9 Tage lang kultiviert. Dabei wurden im ersten Versuch 0,01 mM und 0,05 mM EDHB und im nächsten Versuch 0,05 mM und 0,1 mM EDHB eingesetzt. Eine histologische Darstellung mittels Oil Red O Färbung, welche intrazelluläre Lipidtropfen rot anfärbt (Abbildung 9), wurde an den Tagen 0, 5 und 9 angefertigt. An Tag 0 existieren dabei für 2D und 3D nur Proben von nicht-induzierten Zellen ohne EDHB-Zusatz, da die Zellen vor der Zugabe des Induktionsmediums und des EDHBs untersucht wurden.

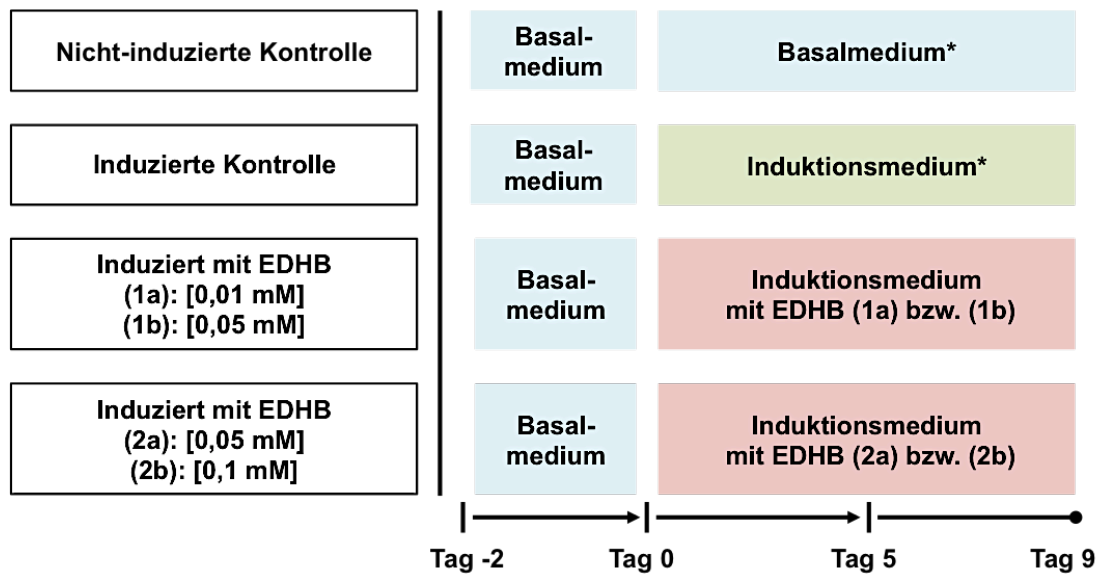
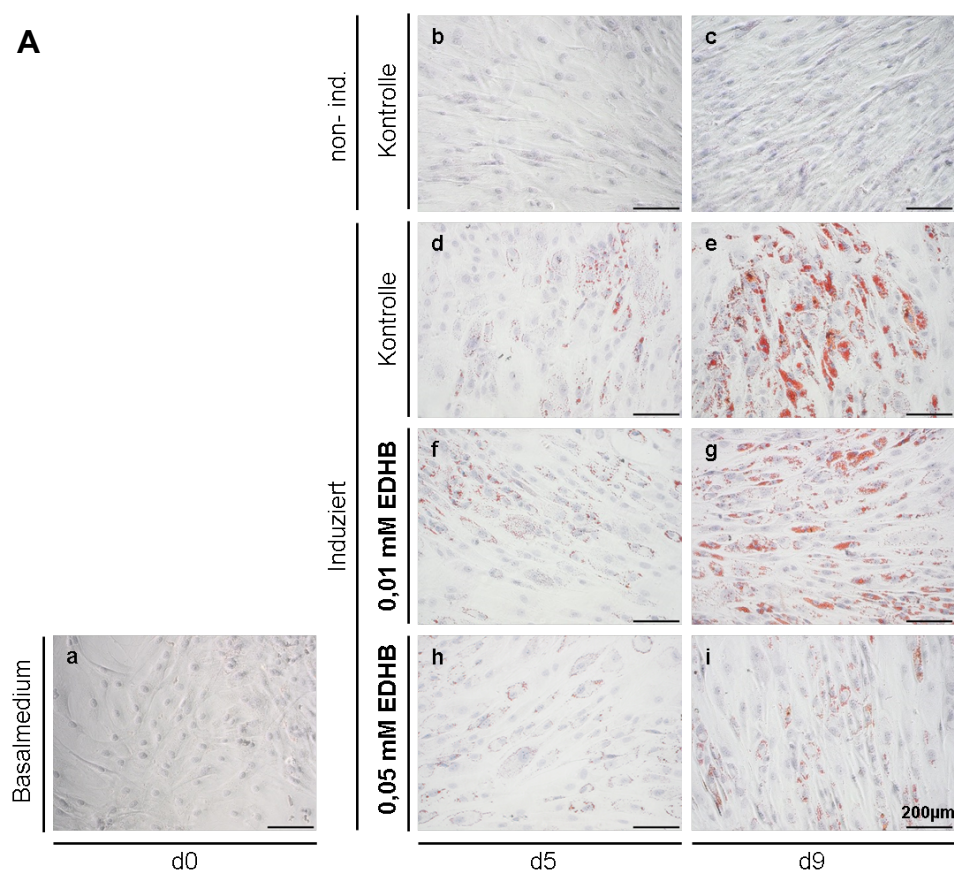


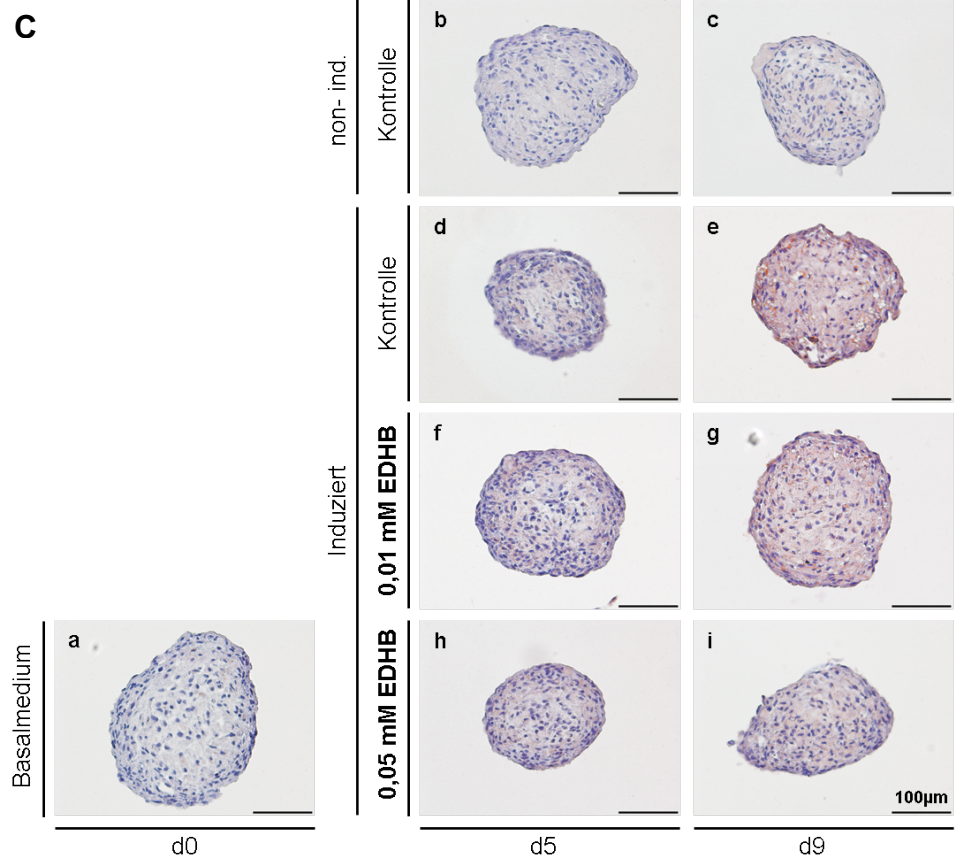
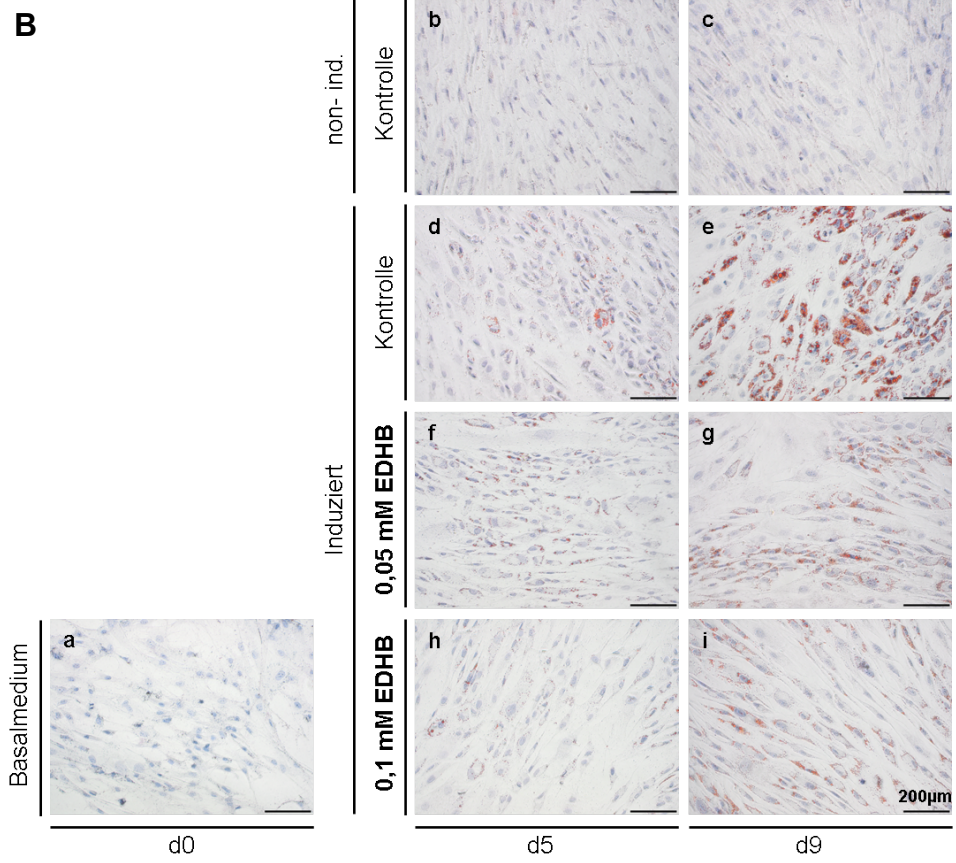
Abbildung 8. Schematische Darstellung der Versuche mit dem Prollyl-4-Hydroxylase-Inhibitor EDHB. Die Zellen wurden an Tag -2 in Basalmedium ohne Zusatz des Inhibitors ausgesät. Bei Konfluenz der Zellen an Tag 0 wurde die adipogene Differenzierung eingeleitet. Zu diesem Zeitpunkt wurde ebenfalls der in Ethanol gelöste Inhibitor Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) je nach Versuch in den Konzentrationen 0,01 mM und 0,05 mM (1. Versuch, 1a + 1b) bzw. 0,05 mM und 0,1 mM (2. Versuch, 2a + 2b) hinzugegeben. Die Zellen wurden bis Tag 9 kultiviert und es wurden Proben an den Tagen 0, 5 und 9 entnommen. Die Versuche wurden in einem 2D und 3D Modell durchgeführt. Als induzierte Kontrolle diente eine Probe in Induktionsmedium, als nicht-induzierte Kontrolle eine Probe in Basalmedium. *Beide Kontrollgruppen wurden mit der gleichen Menge Ethanol versetzt wie sie in der höchstkonzentrierten Probe mit EDHB vorhanden war. In keinem der Experimente gab es signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen, die mit Ethanol versetzt wurden und zusätzlichen Kontrollen, die kein Ethanol erhielten (unveröffentlichte Ergebnisse).

Im 2D Modell waren an Tag 5 in allen induzierten Proben in einer histologischen Analyse sehr geringe Mengen Lipide aufzufinden, wobei kein Unterschied zwischen den EDHB-behandelten Proben und der Positivkontrolle, bestehend aus induzierten, unbehandelten hASCs, zu sehen war. Im 3D Modell konnten an Tag 5 hingegen noch in keiner Probe Lipide angefärbt werden. An Tag 9 konnte in beiden Kulturmodellen eine deutliche Adipogenese in den induzierten Proben beobachtet werden, welche in den nicht-induzierten Proben ausblieb. In Anwesenheit von EDHB war die intrazelluläre Lipidtropfenbildung in der 2D Zellkultur (Abbildung 9; A,B), sowie in der 3D Zellkultur (Abbildung 9; C,D) im Vergleich zur Positivkontrolle reduziert. Dabei konnte in beiden Modellen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Triglyceridakkumulation beobachtet werden, wobei der inhibitorische Effekt in der 2D Zellkultur durch

Zugabe von 0,1 mM EDHB im Vergleich zu 0,05 mM EDHB nicht weiter gesteigert werden konnte. Die Lipidanfärbung war bei diesen beiden Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle stark gemindert, jedoch vorhanden. In der 3D Zellkultur hingegen konnten bereits ab 0,05 mM EDHB keine Lipidtropfen mehr angefärbt werden.

Somit waren die induzierten hASCs in beiden Kultivierungsformen durch die Anwesenheit von EDHB in ihrer adipogenen Differenzierung beeinträchtigt, wobei der Effekt durch das Erreichen eines vollständigen Fehlens anzufärbender Lipide ab 0,05 mM EDHB im 3D Modell stärker ausgeprägt war als in 2D.





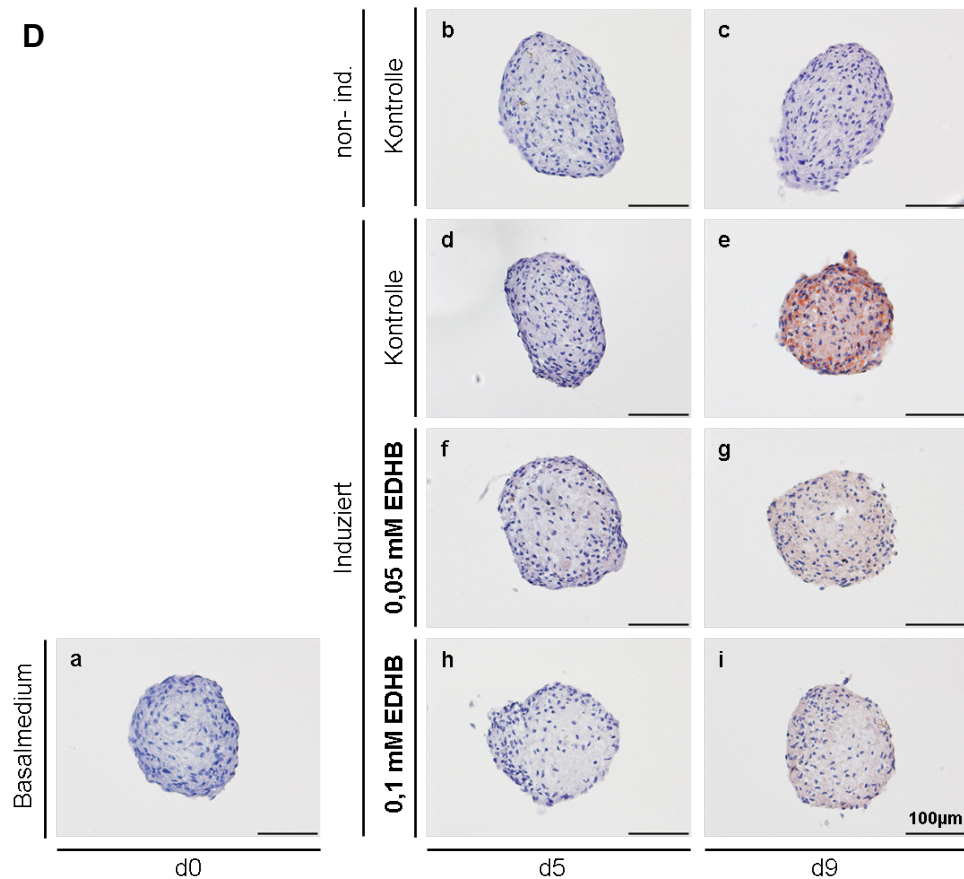


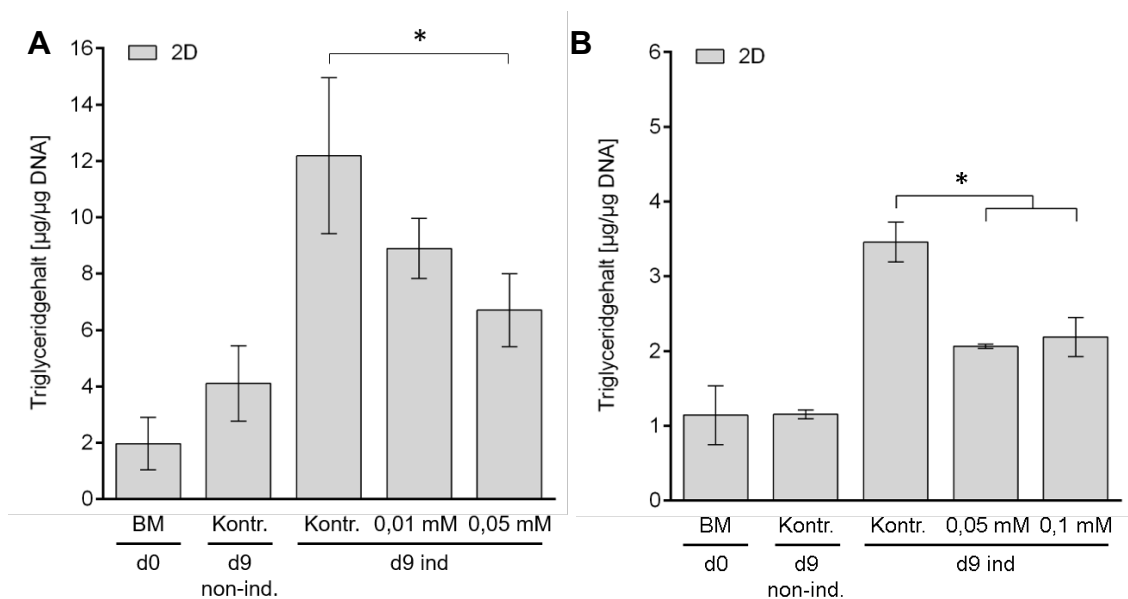
Abbildung 9. Der Effekt von EDHB auf die adipogene Differenzierung von hASCs im Vergleich einer 2D und 3D Zellkultur. Die Zellen wurden 9 Tage in Induktionsmedium kultiviert. In zwei getrennten Versuchen wurde während der adipogenen Phase EDHB in den Konzentrationen 0,01 mM und 0,05 mM (**A,C**) bzw. 0,05 mM und 0,1 mM (**B,D**) hinzugegeben. Es wurde in beiden Versuchen eine Negativkontrolle, bestehend aus Basalmedium mit Ethanol und eine Positivkontrolle, welche Induktionsmedium mit Ethanol enthielt, durchgeführt. Die Triglyceridakkumulation wurde an Tag 0, 5 und 9 bestimmt. **A,B**) Oil Red O Färbung intrazellulärer Lipidtropfen einer 2D Zellkultur eines Wells. **C,D**) Kryoschnittenanfertigung von 3D Sphäroiden aus dem Zentrum eines Sphäroids und anschließende Oil Red O Färbung. (Es sind repräsentative Aufnahmen mehrerer gefärbter Wells bzw. Sphäroide dargestellt.)

Zur Quantifizierung der Lipidsynthese wurde der intrazelluläre Triglyceridgehalt in den Proben an den Tagen 0 und 9 gemessen. In der 2D Kultur war an Tag 9 eine konzentrationsabhängige Reduktion der Triglyceridmenge durch EDHB im Vergleich zur induzierten unbehandelten Kontrolle zu erkennen. Eine weitere Reduktion des Triglyceridgehaltes durch eine Konzentrationssteigerung des EDHB von 0,05 mM auf 0,1 mM war jedoch nicht möglich. Der minimale Triglyceridgehalt lag bei dem doppelten Wert der nicht-induzierten Kontrolle (Abbildung 10; A,B).

Im 3D Modell resultierte eine ähnlich starke Abnahme des Triglyceridgehaltes bei Zugabe von 0,01 mM wie in der 2D Kultur. Jedoch reduzierte sich die Menge der Triglyceride in den Proben von 0,01 mM zu 0,05 mM nochmals um die Hälfte und war damit annähernd auf gleichem Niveau der Negativkontrolle. Der Einsatz von 0,1 mM EDHB führte ebenfalls zu keiner weiteren Reduktion (Abbildung 10; C,D).

Sowohl die Histologie als auch der Triglyceridassay zeigten, dass die Menge an Triglyceriden in induzierten hASCs in beiden Kultursystemen durch 0,05 mM EDHB maximal gesenkt werden konnte. Es ergab sich jedoch ein stärkerer Effekt des EDHBs auf die Zellen im 3D Kultursystem, da der Triglyceridgehalt annähernd auf das Niveau der nicht-induzierten Kontrolle gesenkt wurde.

Durch Zugabe des EDHBs lässt sich folglich die adipogene Differenzierung inhibieren. Die Adipogenese wurde dabei im 3D Modell tendenziell stärker negativ beeinflusst als im 2D Modell.



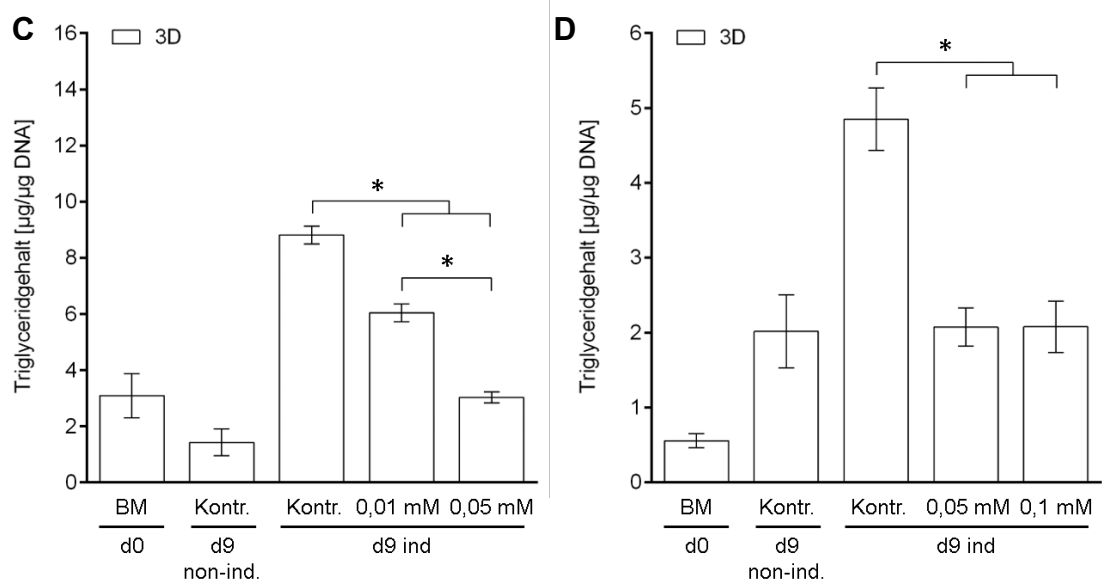


Abbildung 10. Quantifizierung des Triglyceridgehaltes unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur. 9-tägige Kultivierung in Induktionsmedium mit Zusatz von 0,01 mM und 0,05 mM EDHB (A,C) bzw. 0,05 mM und 0,1 mM EDHB (B,D) im Vergleich einer 2D (A,B) und 3D (C,D) Zellkultur. Als Positivkontrolle diente eine induzierte Probe ohne EDHB und als Negativkontrolle eine nicht-induzierte Probe ohne EDHB. Der Triglyceridgehalt wurde auf den DNA-Gehalt normalisiert. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=3$). * Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen verschiedenen Konzentrationen EDHB und Positivkontrolle.

4.2.3 Adipogene Differenzierung auf mRNA-Ebene unter dem Einfluss von EDHB

Zusätzlich zur histologischen und quantitativen Analyse des Triglyceridgehaltes in differenzierenden hASCs wurde die adipogene Differenzierung auf der Transkriptionsebene untersucht. Dabei wurden die Expressionsraten der adipogenen Marker aP2 (Abbildung 11; A) und C/EBP α (Abbildung 11; B) unter dem Einfluss von EDHB mittels qPCR gemessen. Die hASCs wurden 9 Tage lang in einer 2D und 3D Zellkultur in entweder EDHB-haltigem (0,05 mM; 0,1 mM) oder reinem Induktionsmedium kultiviert.

Im 2D Modell konnte in den differenzierten Zellen ein starker Anstieg der aP2 Expression gemessen werden. Dabei wurde durch Zusatz von 0,05 mM EDHB die Expressionsrate im Mittel um ca. 30% reduziert und ließ sich durch Zusatz von 0,1 mM EDHB nicht weiter senken. Auch im 3D Modell konnte mit Induktion

der Adipogenese eine Zunahme der aP2 Expression nachgewiesen werden, wobei diese tendenziell geringer ausfiel als in 2D. Durch Zugabe von EDHB konnte hier eine signifikante Reduktion im Mittel um ca. 70% erreicht werden. Zwischen 0,05 mM und 0,1 mM EDHB konnte kein Unterschied gemessen werden.

Die Untersuchung des Markers C/EBP α zeigte ein ähnliches Verhalten der Expressionsrate wie aP2. In der 2D Kultur konnte ebenso eine tendenziell höhere Expressionsrate gemessen werden als in den 3D Sphäroiden. Die Reduktion, die durch die Zugabe von EDHB erzielt wurde, war prozentual im 3D Modell (ca. 60%) stärker ausgeprägt als im 2D Modell (ca. 40%). Die Werte für 0,05 mM und 0,1 mM EDHB zeigten keinen Unterschied. Eine Signifikanz wurde im 2D Modell bei einer Konzentration von 0,1 mM EDHB im Vergleich zur Positivkontrolle ermittelt.

Zusammenfassend zeigten in beiden Systemen diejenigen Proben, die mit EDHB versetzt wurden, eine niedrigere Expressionsrate der adipogenen Marker aP2 und C/EBP α als die Kontrollen ohne Enzyminhibitor. Daraus lässt sich schließen, dass die adipogene Differenzierung durch EDHB partiell gehemmt wird, wobei der Effekt in 3D stärker ausgeprägt war als in 2D. Im nächsten Schritt wollten wir nun untersuchen wie sich die Kollagenentwicklung und damit die EZM unter Zugabe von EDHB im 2D und 3D Modell verändert.

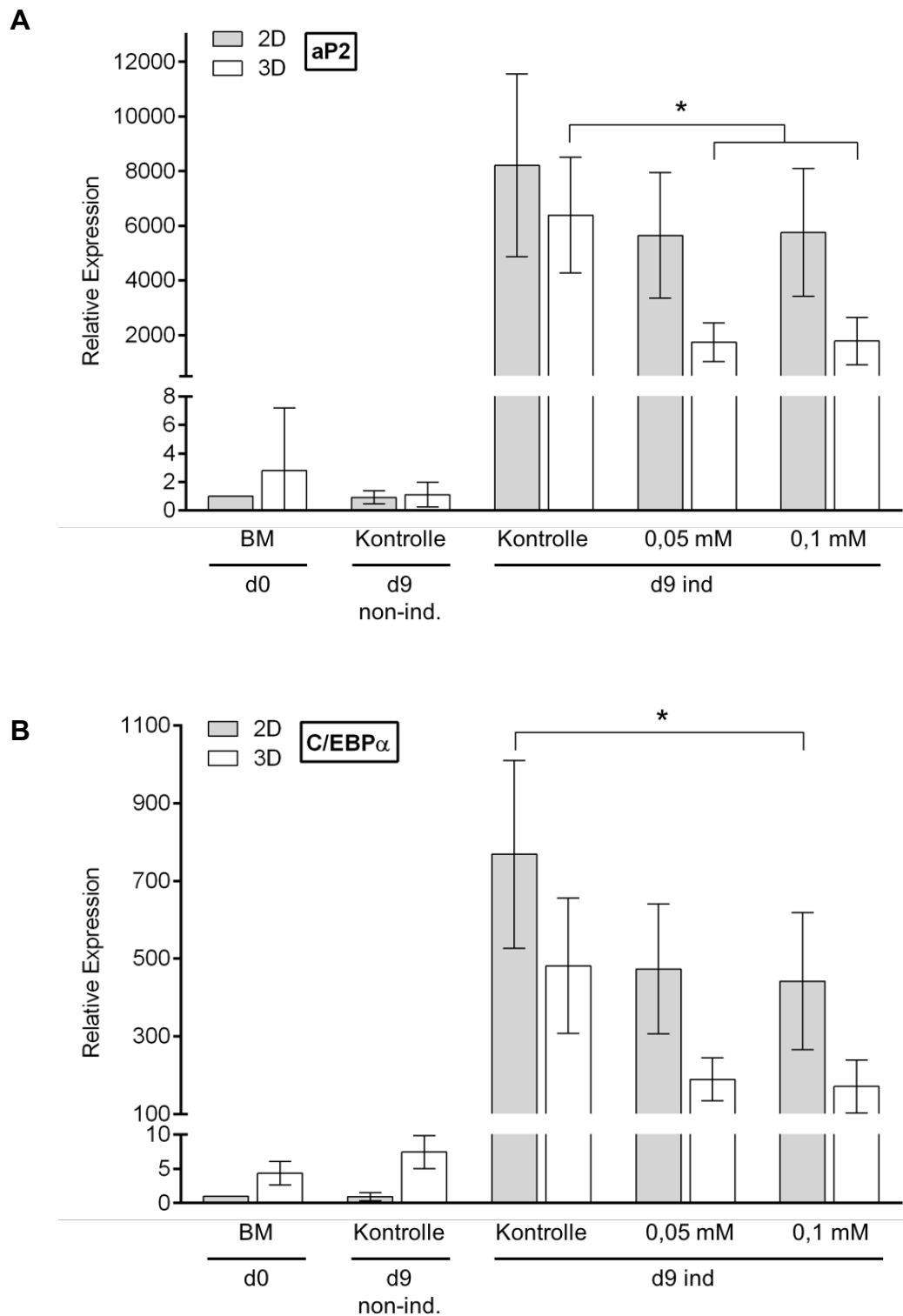


Abbildung 11. Relative Expression adipogener Marker in hASCs unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur. Der Effekt des EDHBs auf die Genexpression der adipogenen Marker aP2 (**A**) und C/EBP α (**B**) im Vergleich einer 2D Zellkultur und 3D Sphäroiden. Die Analyse wurde mittels qPCR durchgeführt. Gezeigt ist die relative Expression von aP2 (**A**) und C/EBP α (**B**) zu Tag 0 der 2D Zellkultur. Als Housekeeping Gen wurde EF1 α verwendet. Die Zellen wurden 9 Tage lang in Induktionsmedium mit EDHB (0,05 mM, 0,1 mM) bzw. ohne EDHB kultiviert. Eine undifferenzierte Probe in Basalmedium diente als Negativkontrolle. Die

Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). * Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen verschiedenen Konzentrationen EDHB und Positivkontrolle.

4.2.4 Die Kollagenentwicklung der Extrazellulärmatrix während der adipogenen Differenzierung unter dem Einfluss von EDHB in der 2D und 3D Zellkultur

Während der Adipogenese menschlicher Stammzellen des Fettgewebes setzt sich die EZM je nach Entwicklungsphase aus unterschiedlichen Komponenten zusammen. So entwickelt sich die EZM von einer fibrillären in eine laminare Struktur.²¹ Kollagen als Hauptbestandteil der EZM unterliegt somit dynamischen Umbauvorgängen. Um zu untersuchen, welchen Einfluss das EDHB auf die Synthese des Kollagens während der Adipogenese hat, wurden im Folgenden die Kollagene I, IV und VI immunhistochemisch gefärbt. Dies erfolgte in Proben einer konventionellen 2D Zellkultur sowie einem 3D Sphäroid-System, die an Tag 0, 5 und 9 nach Beginn der adipogenen Differenzierung und Behandlung mit EDHB (1. Versuch, 0,01 mM und 0,05 mM; 2. Versuch 0,05 mM und 0,1 mM) gefärbt wurden.

Die adipogene Differenzierung dieser Zellen wurde bereits im Vorfeld untersucht und beschrieben (siehe 4.2.2). Um die adipogene Differenzierung der Zellen auch in der immunhistochemischen Färbung darstellen zu können, wurden die Proben zusätzlich mit dem lipidgängigen Farbstoff BODIPY angefärbt. Das Ergebnis bezüglich der Triglyceridakkumulation kann für alle nachfolgend dargestellten 2D sowie 3D Abbildungen zusammengefasst werden, da es sich dabei um dieselben Versuche handelte und in den Abbildungen lediglich unterschiedliche Kollagene dargestellt wurden.

In den 2D Proben konnten an Tag 0 (Abbildung 12,13,15; A; a,b) sowie in der nicht-induzierten Kontrolle (Abbildung 12,13,15; A; c,e) keine Lipide angefärbt werden. Bei der Kontrolle mit induzierten Zellen konnte an Tag 5 eine beginnende und an Tag 9 eine effektive Differenzierung nachgewiesen werden (Abbildung 12,13,15; A; g,i). Bei Zugabe von EDHB konnte eine

konzentrationsabhängige Abnahme der Lipidsynthese beobachtet werden, wobei zwischen 0,05 mM und 0,1 mM EDHB nahezu kein Unterschied sichtbar war (Abbildung 12,13,15; A; q,u). Im 3D Modell konnte für die Proben an Tag 0 sowie für die nicht-induzierte und induzierte Kontrolle ein identisches Verhalten zu den 2D Proben beobachtet werden. Die Lipidmenge war in Proben mit 0,01 mM EDHB im Vergleich zur induzierten Kontrolle leicht reduziert (Abbildung 12,13,15; B; m). Ein Unterschied zur 2D Kultur fiel ab einer Konzentration von 0,05 mM EDHB auf. Hier, sowie in der nächst höheren Konzentration von 0,1 mM EDHB, konnte kein Signal für Lipide gemessen werden (Abbildung 12,13,15; B; q,u).

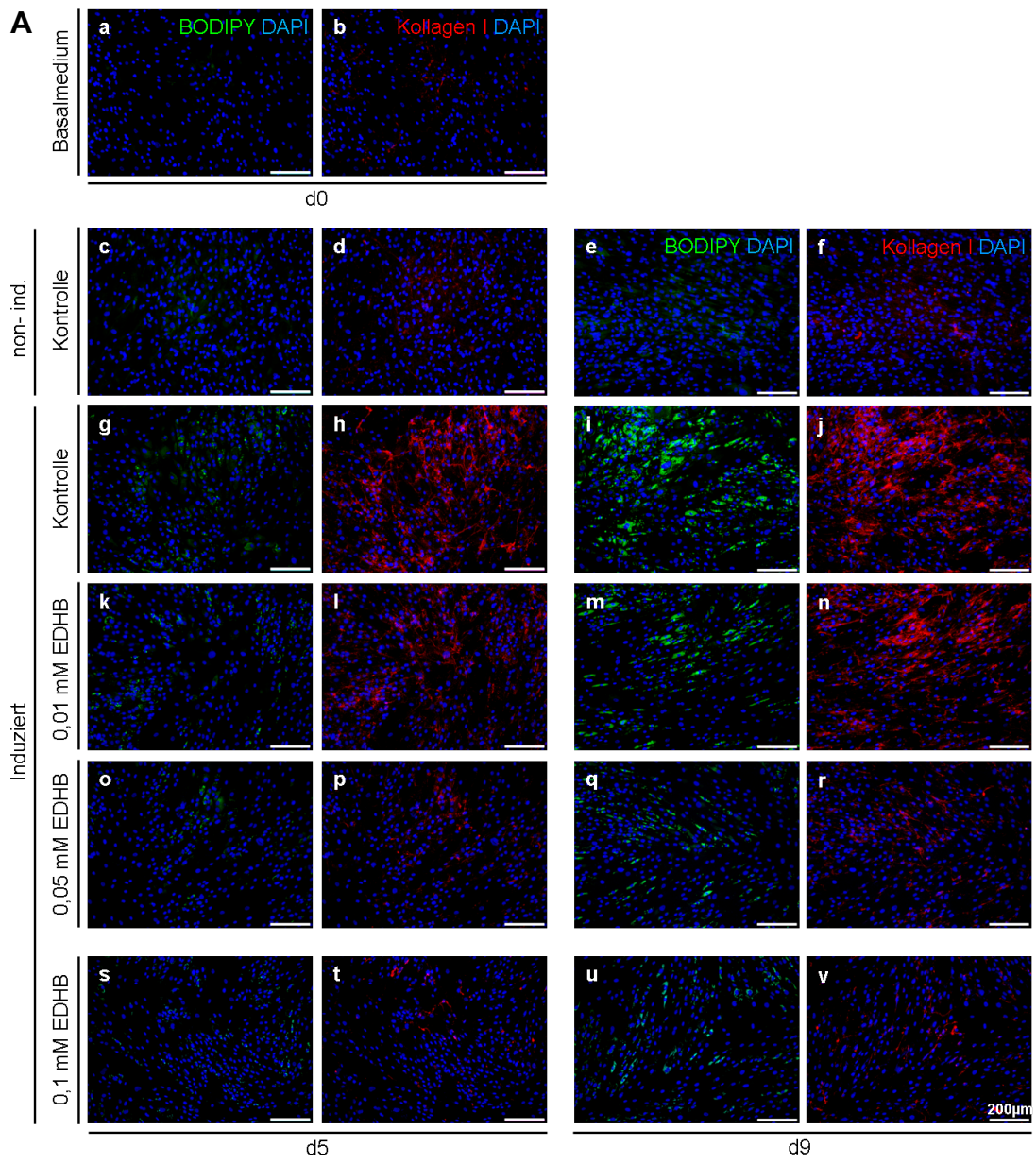
4.2.4.1 Entwicklung von Kollagen I unter dem Einfluss von EDHB

Zunächst untersuchten wir das fibrilläre Kollagen I.⁶⁴ Bei Betrachtung der 2D Zellkultur zeigte sich eine von der Differenzierung der hASCs abhängige Entwicklung des Kollagens. Kollagen I konnte an Tag 0 sowie in der nicht-induzierten Kontrolle ohne EDHB über den gesamten Zeitraum in sehr geringem Maß nachgewiesen werden (Abbildung 12; A; b,d,f). Mit Induktion der Adipogenese ließ sich bereits an Tag 5 deutlich Kollagen I anfärben (Abbildung 12; A; h), was bis Tag 9 nochmals verstärkt wurde (Abbildung 12; A; j). Mit dem Zusatz von EDHB wurde die Menge des gebildeten Kollagen I konzentrationsabhängig reduziert. Bei Einsatz von 0,01 mM EDHB wurde die Kollagenentwicklung nur gering gehemmt (Abbildung 12; A; l,n), jedoch ab einer Konzentration von 0,05 mM EDHB deutlich und maximal reduziert (Abbildung 12; A; p,r,t,v). Hinsichtlich der Struktur unterschied sich das gebildete Kollagen I zudem deutlich von der induzierten Kontrolle ohne EDHB. Während sich bei Zellen ohne EDHB-Zusatz lange und verzweigte Strukturen anfärben ließen, konnten in Proben mit höherkonzentriertem EDHB nur noch vereinzelte und kurze Strukturen detektiert werden.

In den 3D Proben war ebenfalls ein deutlicher Unterschied der Kollagensynthese zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen festzustellen. An Tag 0 sowie im weiteren Verlauf der nicht-induzierten Proben wurde nur wenig und vor allem peripher lokalisiertes Kollagen I nachgewiesen.

Mit Induktion der Adipogenese konnte bereits an Tag 5 eine starke Kollagensynthese festgestellt werden (Abbildung 12; B; h,l). Diese zeigte ab Zugabe von 0,05 mM EDHB eine merkliche Abnahme (Abbildung 12; B; p,r). Der Effekt ließ sich mit einer Konzentration von 0,1 mM EDHB jedoch nicht weiter steigern (Abbildung 12; B; t,v). Über die Struktur des Kollagens kann keine Aussage getroffen werden, da es sich um einzelne Schnittbilder aus einem dreidimensionalen Sphäroid handelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Kollagen I sowohl in 2D als auch in 3D Adipogenese-abhängig synthetisiert wurde. Durch Zugabe von EDHB wurde die Produktion konzentrationsabhängig eingeschränkt, sodass ab 0,05 mM annähernd das Niveau der nicht-induzierten Kontrolle erreicht wurde.



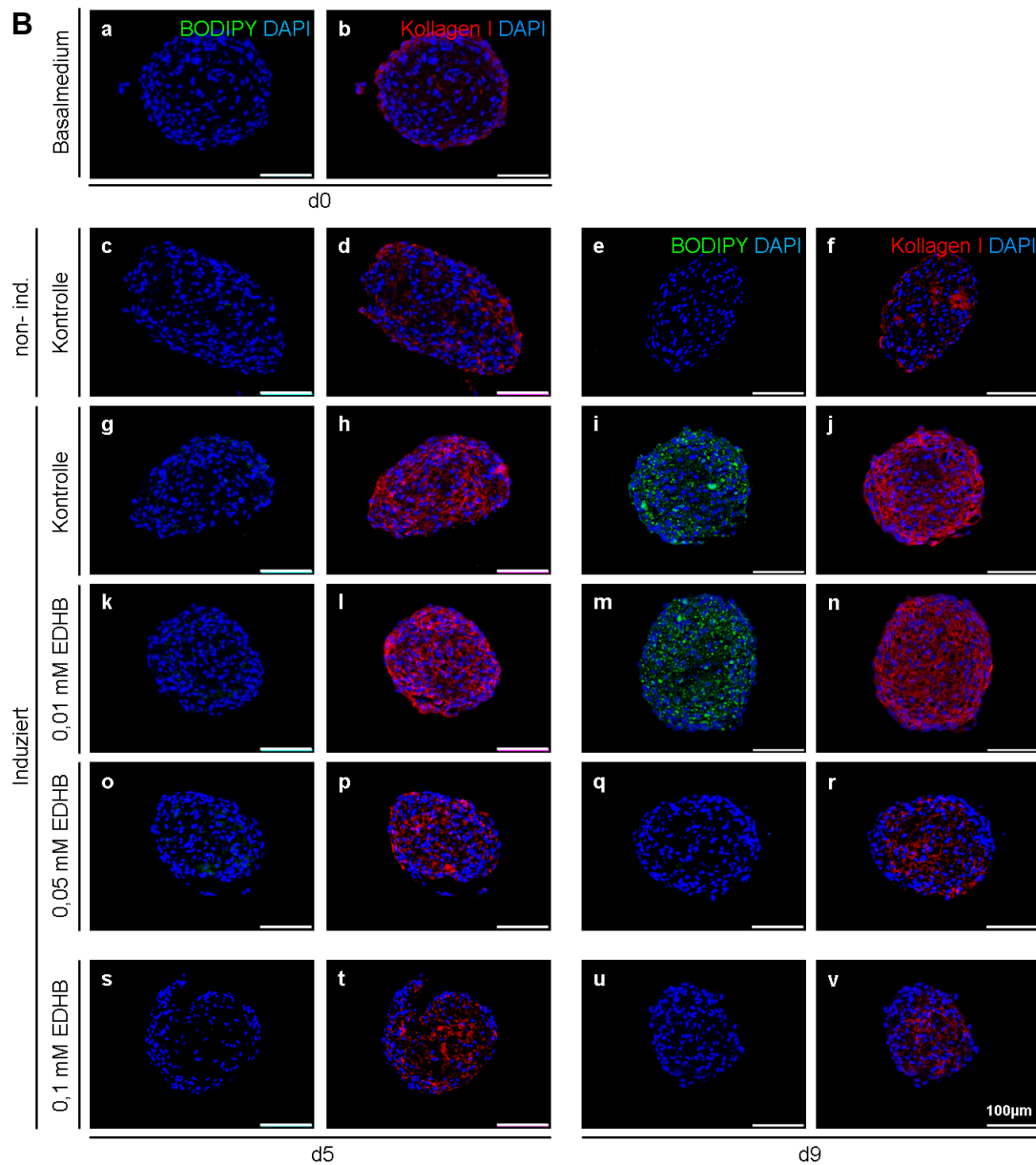


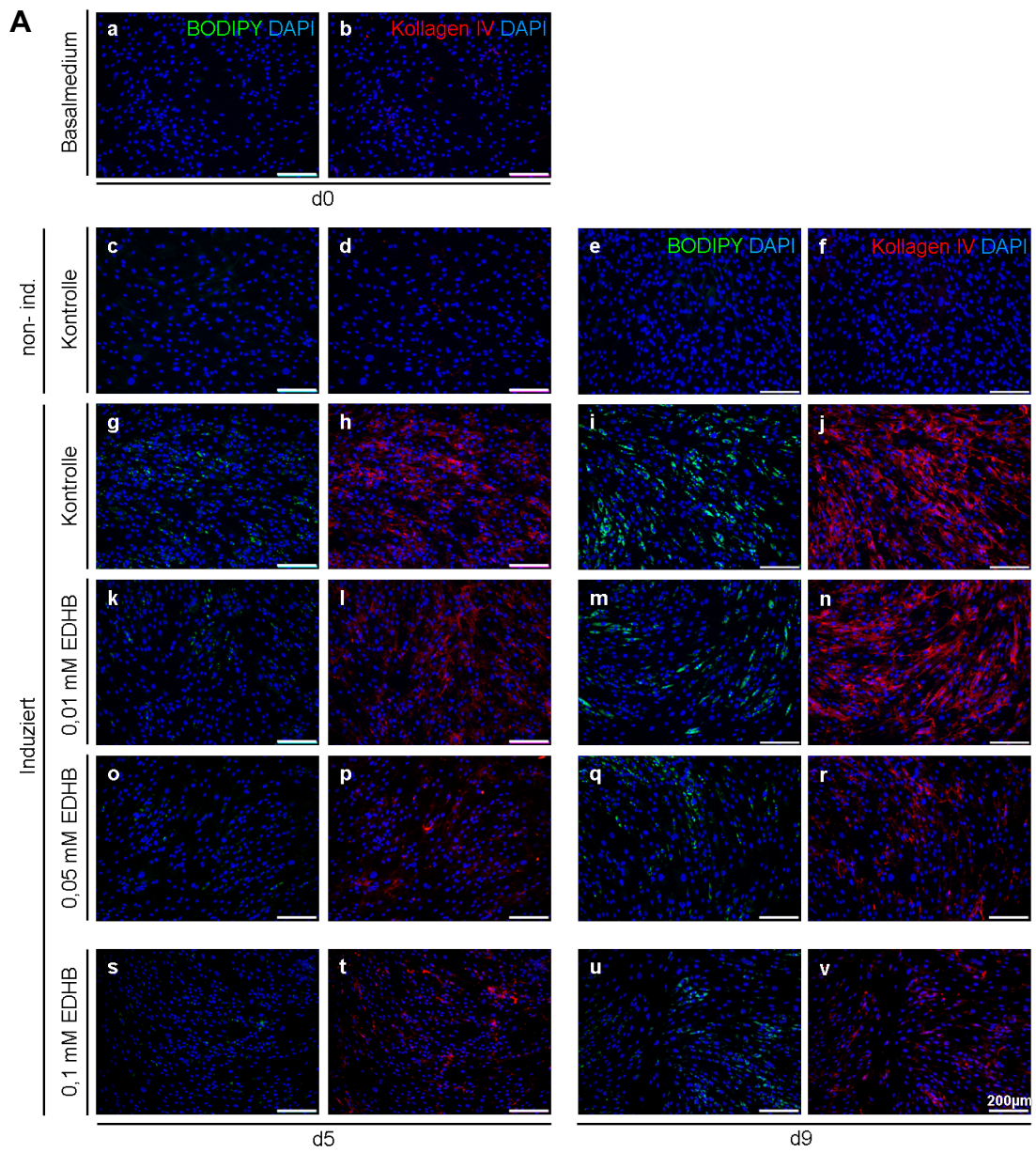
Abbildung 12. Kollagen I Entwicklung während der Adipogenese unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur. Immunhistochemische Analyse der Kollagen I Entwicklung in der Extrazellulärmatrix in einer 2D Zellkultur (**A**) und einem 3D Sphäroid-Modell (**B**) während der Adipogenese und unter Zugabe aufsteigender EDHB-Konzentrationen. In zwei getrennten Versuchen wurde während der adipogenen Phase EDHB in den Konzentrationen 0,01 mM und 0,05 mM (k-r) bzw. 0,05 mM und 0,1 mM (s-v) hinzugegeben. Als Kontrollen dienten Zellen in Basalmedium mit Ethanol (non-ind. Kontrolle) sowie Induktionsmedium mit Ethanol (induzierte Kontrolle). Kollagen I: rot; Lipidtropfen (BODIPY-Färbung): grün; Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. (Es sind repräsentative Aufnahmen mehrerer gefärbter Wells bzw. Sphäroide dargestellt.)

4.2.4.2 Entwicklung von Kollagen IV unter dem Einfluss von EDHB

Kollagen IV gehört zu den netzbildenden, nicht-fibrillären Kollagenen und bildet den Hauptbestandteil der Basalmembran.^{64,70} Im 2D Kultursystem steigerte sich die Synthese von Kollagen IV während der Adipogenese sehr stark im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen. In den nicht-induzierten Proben konnte während des gesamten Verlaufs kein Kollagen IV nachgewiesen werden (Abbildung 13; A; d,f). Erst mit der adipogenen Induktion begannen die Zellen Kollagen IV in die Matrix zu sezernieren. Bis Tag 9 bildeten sie große Mengen Kollagen IV, welches sich wie ein Netz um die Zellen spannte (Abbildung 13; A; j; Abbildung 14). Mit Zugabe des EDHBs wurde die Kollagensynthese wiederum konzentrationsabhängig reduziert. Eine Störung der Kollagenentwicklung wurde ab einer Konzentration von 0,05 mM EDHB sehr deutlich (Abbildung 13; A; p,r). Die netzartige Anordnung des Kollagen IV in der Extrazellulärmatrix war hier nicht mehr zu erkennen.

In der 3D Zellkultur konnte ebenfalls eine mit beginnender Differenzierung stattfindende Kollagen IV Produktion beobachtet werden (Abbildung 13; B; h,j). Nicht-induzierte Zellen hingegen bildeten kein nachweisbares Kollagen IV aus (Abbildung 13, B, d,f). Unter dem Einfluss von EDHB dezimierte sich die Kollagen IV Produktion in einer konzentrationsabhängigen Weise deutlich (Abbildung 13; B; n,r,v).

Insgesamt konnte kein Unterschied zwischen der 2D und 3D Zellkultur ausgemacht werden. In beiden Fällen wurde Kollagen IV nur in differenzierten hASCs gebildet und seine Synthese mit Zugabe von EDHB konzentrationsabhängig gestört.



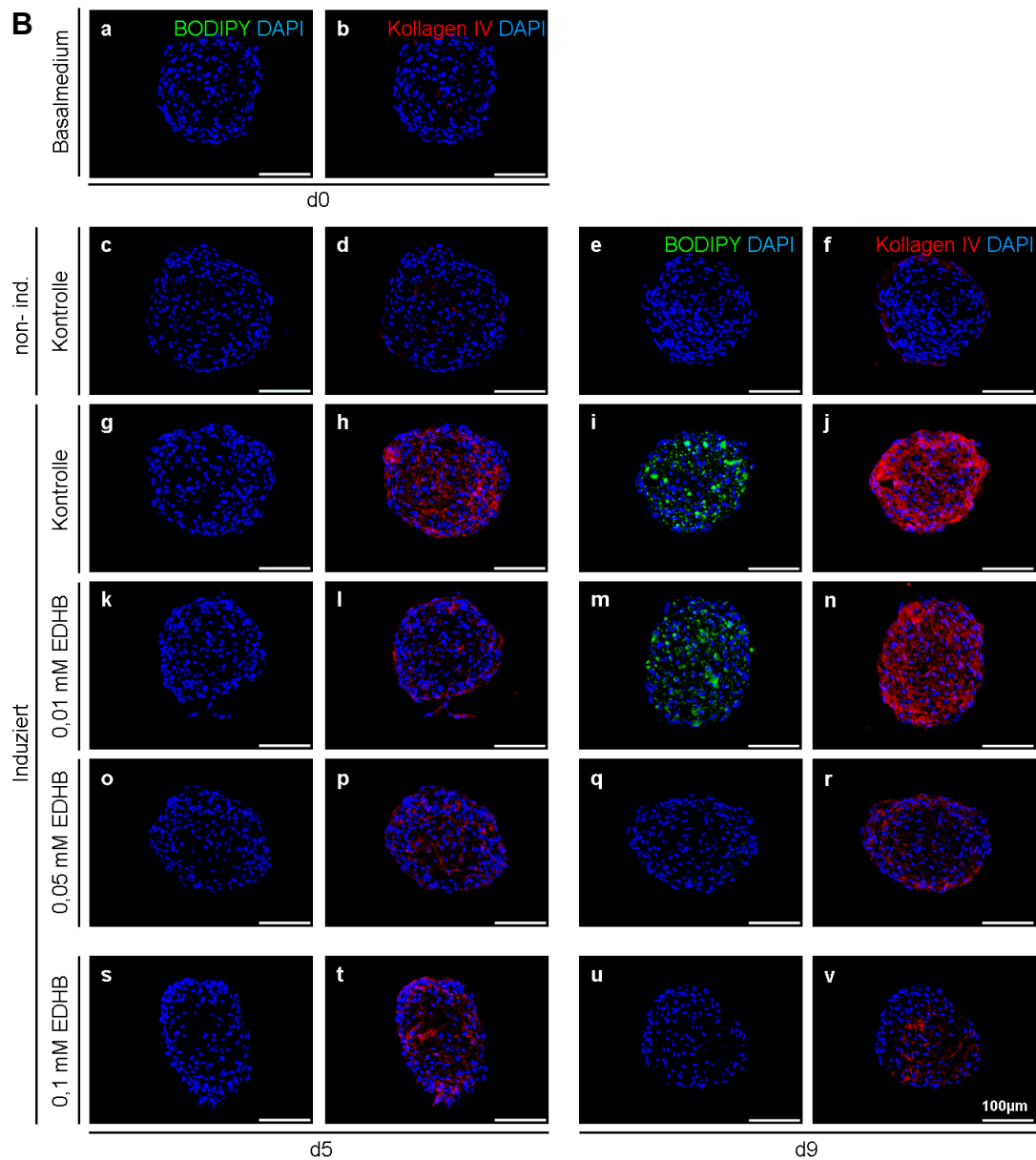


Abbildung 13. Kollagen IV Entwicklung während der Adipogenese unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur. Immunhistochemische Analyse der Kollagen IV Entwicklung in der Extrazellulärmatrix in einer 2D Zellkultur (A) und einem 3D Sphäroid-Modell (B) während der Adipogenese und unter Zugabe aufsteigender EDHB-Konzentrationen. In zwei getrennten Versuchen wurde während der adipogenen Phase EDHB in den Konzentrationen 0,01 mM und 0,05 mM (k-r) bzw. 0,05 mM und 0,1 mM (s-v) hinzugegeben. Als Kontrollen dienten Zellen in Basalmedium mit Ethanol (non-ind. Kontrolle) sowie Induktionsmedium mit Ethanol (induzierte Kontrolle). Kollagen I: rot; Lipidtropfen (BODIPY-Färbung): grün; Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. (Es sind repräsentative Aufnahmen mehrerer gefärbter Wells bzw. Sphäroide dargestellt.)

Bei der Betrachtung aller drei übereinandergelegten Filterkanäle des Mikroskops stellte sich die Kollokalisierung von grün fluoreszierenden Lipidtropfen und rot fluoreszierendem Kollagen IV deutlich dar. Das Kollagen konnte vor allem dort detektiert werden, wo die Zellen bereits Triglyceride synthetisierten. Reife Adipozyten wurden dabei ringsum von Kollagen IV umgeben. Bei Zugabe von 0,1 mM EDHB war das Signal für BODIPY sowie Kollagen IV deutlich reduziert.

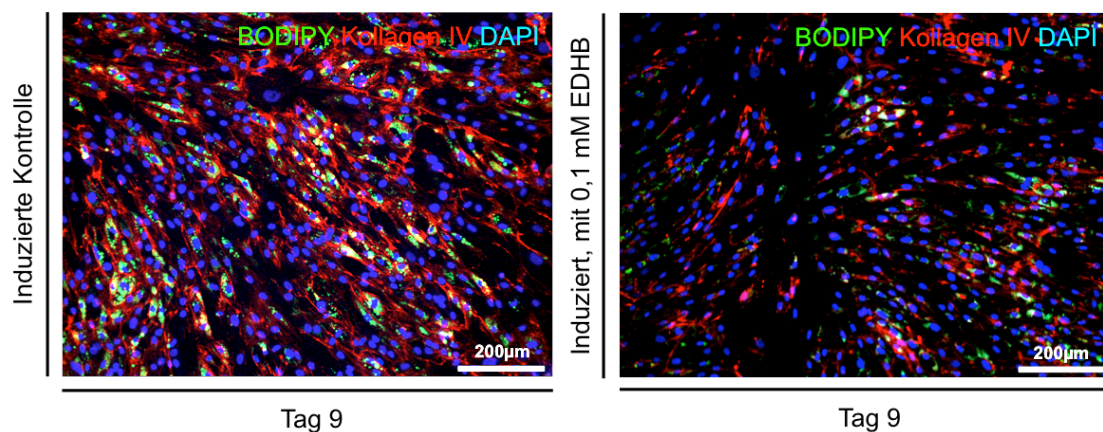


Abbildung 14. Anfärbung von Kollagen IV und intrazellulären Lipiden in einer 2D Zellkultur mit und ohne EDHB. Immunhistochemische Färbung. Dargestellt sind die übereinandergelegten Filterkanäle für BODIPY (grün, Lipidtropfen), Kollagen IV (rot) und DAPI (blau, Zellkerne) für eine Kontrollprobe ohne Zugabe von EDHB (Induzierte Kontrolle) und eine Probe mit Zugabe von 0,1 mM EDHB, die 9 Tage in Induktionsmedium kultiviert wurden. (Es sind repräsentative Aufnahmen mehrerer gefärbter Wells dargestellt.)

4.2.4.3 Entwicklung von Kollagen VI unter dem Einfluss von EDHB

Ein weiteres netzbildendes, nicht-fibrilläres Kollagen, das wir untersuchten, war Kollagen VI⁶⁴. Es konnte in der 2D Kultur bereits an Tag 0 (Abbildung 15; A; b) in geringen Mengen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf nahm die Menge an Kollagen VI in den Proben undifferenzierter hASCs bei eher schwachem Signal insgesamt weiter zu. An Tag 9 (Abbildung 15; A; f) konnte zwar ubiquitär im Extrazellulärraum Kollagen VI nachgewiesen werden, jedoch färbte sich dieses nur punkt- bzw. strichförmig an und war im Vergleich zu den induzierten Proben deutlich schwächer ausgebildet. Die differenzierten und unbehandelten Zellen synthetisierten bereits an Tag 5 flächendeckend Kollagen

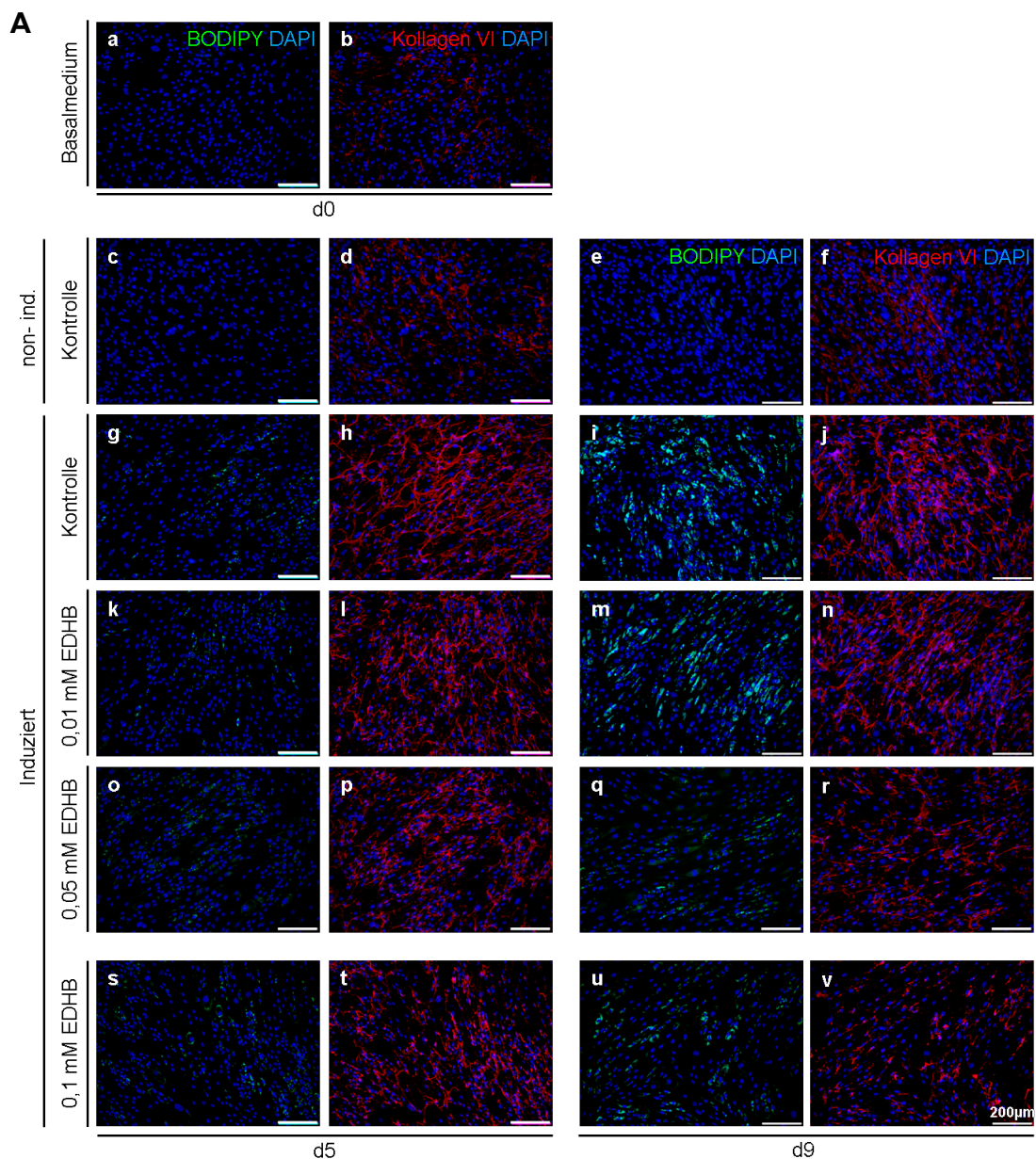
VI (Abbildung 15; A; h). Dieses bildete lange Fasern mit zahlreichen Verzweigungen aus. Mit dem Zusatz von EDHB wurde an Tag 5 zwar ebenfalls Kollagen VI gebildet (Abbildung 15; A; l,p,t), dieses zeigte jedoch schon ab einer Konzentration von 0,01 mM EDHB einen beginnenden Strukturverlust (Abbildung 15; A; l). Das gemessene Signal nahm im weiteren Verlauf ab und fiel vor allem bei 0,05 mM und 0,1 mM EDHB an Tag 9 im Vergleich zu Tag 5 geringer aus (Abbildung 15; A; r,v). Es zeigte sich insgesamt ein konzentrationsabhängiger Strukturverlust und eine Abnahme der Kollagen VI Produktion.

In der 3D Zellkultur war ebenfalls an Tag 0 ein geringes Signal an Kollagen VI nachweisbar (Abbildung 15; B; b). In nicht-induzierten Proben konnte zwar eine vermehrte Kollagensynthese festgestellt werden, allerdings nicht in derselben Intensität wie in den induzierten Proben. Letztere sezernierten bereits ab Tag 5 reichlich Kollagen VI in die EZM (Abbildung 15; B; h), was durch Zugabe von 0,01 mM EDHB nicht gehemmt werden konnte (Abbildung 15; B; l). Erst ab einer Konzentration von 0,05 mM EDHB kam es zu einer merklichen Abnahme des gebildeten Kollagens (Abbildung 15; B; p,r). Mit 0,1 mM EDHB wurde dieser Effekt nicht weiter verstärkt (Abbildung 15; B; t,v). An Tag 9 war die synthetisierte Menge Kollagen, genauso wie in der 2D Kultur, geringer als an Tag 5.

In der Summe konnte in 2D wie in 3D jeweils auch bei nicht-induzierten Proben Kollagen VI nachgewiesen werden. Mit beginnender Differenzierung der Zellen nahm dieses jedoch deutlich zu und veränderte sich bezüglich der Struktur. Die Zugabe von EDHB wirkte sich in einer konzentrationsabhängigen Weise negativ auf die Synthese aus, wobei mit fortschreitender Dauer der Kultivierung die Menge des Kollagens unter EDHB tendenziell abnahm.

Die immunhistochemische Analyse der Kollagentypen I, IV und VI zeigte eine deutliche Steigerung ihrer Synthese während der Adipogenese von hASCs unter Kontrollbedingungen. Unter dem Einfluss von EDHB wurde die Menge der gebildeten Kollagene in einer konzentrationsabhängigen Weise im 2D sowie 3D Modell stark reduziert. Dabei konnte durch eine Konzentrationserhöhung des

EDHBs von 0,05 mM auf 0,1 mM kein weiterer negativer Effekt erzielt werden. Zudem imponierte in den 2D Kulturen ein zunehmender Strukturverlust der Kollagenfasern. Die Hemmung der Kollagensynthese durch EDHB wurde von einer ebenfalls konzentrationsabhängigen Abnahme der Differenzierungsfähigkeit der hASCs begleitet. In der Lipidanfärbung mittels BODIPY konnte dabei im 3D Modell ab einer Konzentration von 0,05 mM EDHB kein Signal mehr gemessen werden, wohingegen im 2D Modell auch in den Proben mit 0,05 mM und 0,1 mM EDHB geringe Mengen an Lipiden nachweisbar waren.



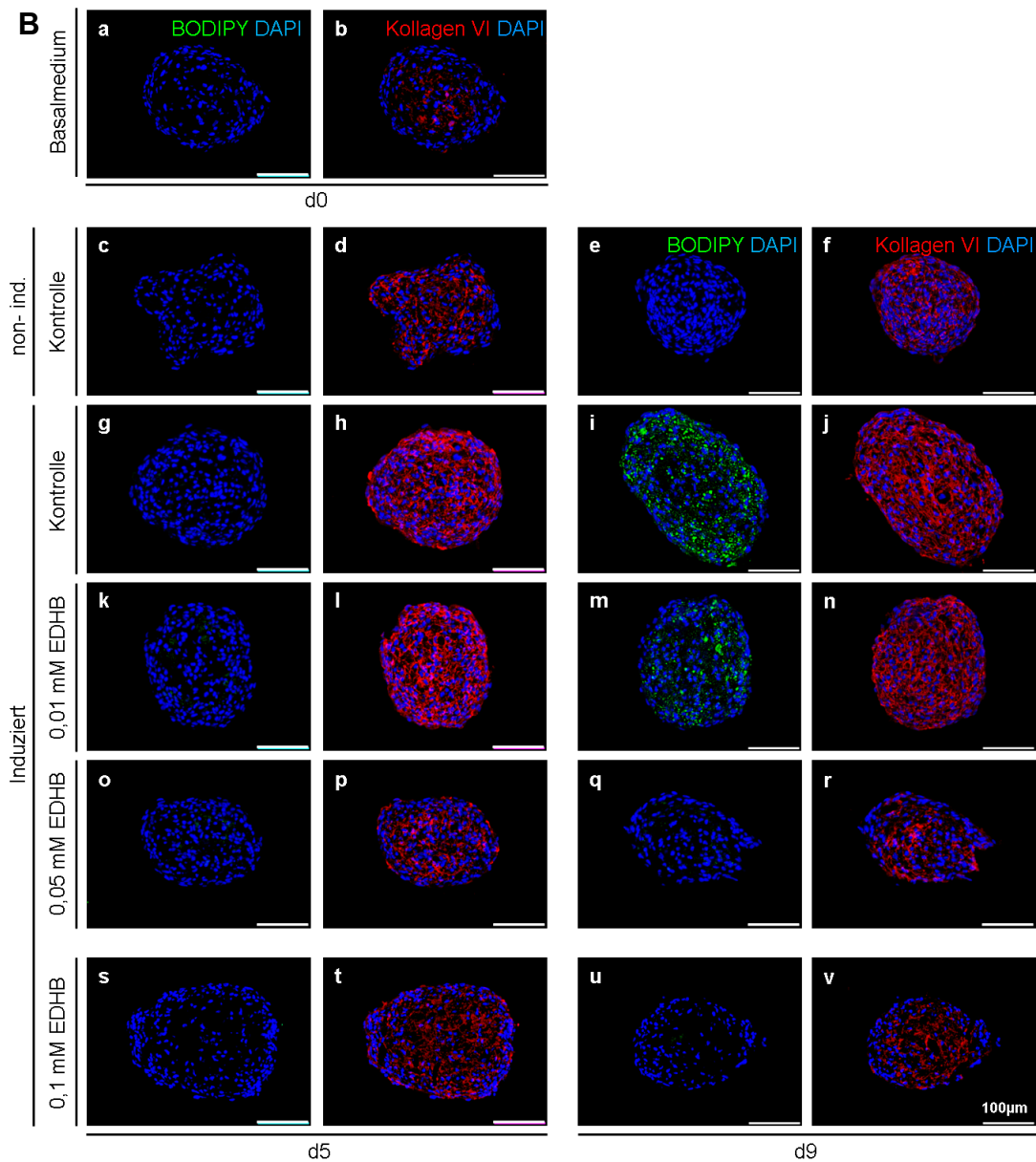


Abbildung 15. Kollagen VI Entwicklung während der Adipogenese unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur. Immunhistochemische Analyse der Kollagen VI Entwicklung in der Extrazellulärmatrix in einer 2D Zellkultur (A) und einem 3D Sphäroid-Modell (B) während der Adipogenese und unter Zugabe aufsteigender EDHB-Konzentrationen. In zwei getrennten Versuchen wurde während der adipogenen Phase EDHB in den Konzentrationen 0,01 mM und 0,05 mM (k-r) bzw. 0,05 mM und 0,1 mM (s-v) hinzugegeben. Als Kontrollen dienten Zellen in Basalmedium mit Ethanol (non-ind. Kontrolle) sowie Induktionsmedium mit Ethanol (induzierte Kontrolle). Kollagen I: rot; Lipidtropfen (BODIPY-Färbung): grün; Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. (Es sind repräsentative Aufnahmen mehrerer gefärbter Wells bzw. Sphäroide dargestellt.)

4.2.5 Kollagenentwicklung auf mRNA-Ebene unter dem Einfluss von EDHB

Neben der immunhistochemischen Analyse untersuchten wir die Expression der Kollagene IV und I auf Transkriptionsebene in differenzierten und undifferenzierten hASCs im 2D sowie 3D Modell nach 9-tägiger Kultivierung.

In der 2D Kultur war die COL4A2 Expression (Kollagen IV) in den nicht-induzierten Zellen an Tag 9 auf dem gleichen Niveau wie an Tag 0 (Abbildung 16; A). Bei den induzierten Proben hingegen stieg die Expressionsrate auf das 5-fache an. Dieser Anstieg war auch bei Zugabe von 0,05 mM und 0,1 mM EDHB zu beobachten (Abbildung 16; A).

Im 3D Sphäroid-System konnte in den nicht-induzierten Proben ebenfalls kein Anstieg der Expression von COL4A2 gemessen werden. Mit der adipogenen Induktion stieg die Expression von COL4A2 um das 3-fache im Vergleich zu Tag 0 an. Dabei erhöhte nur 0,1 mM EDHB und nicht 0,05 mM EDHB die Expression nochmals signifikant um etwa das Doppelte.

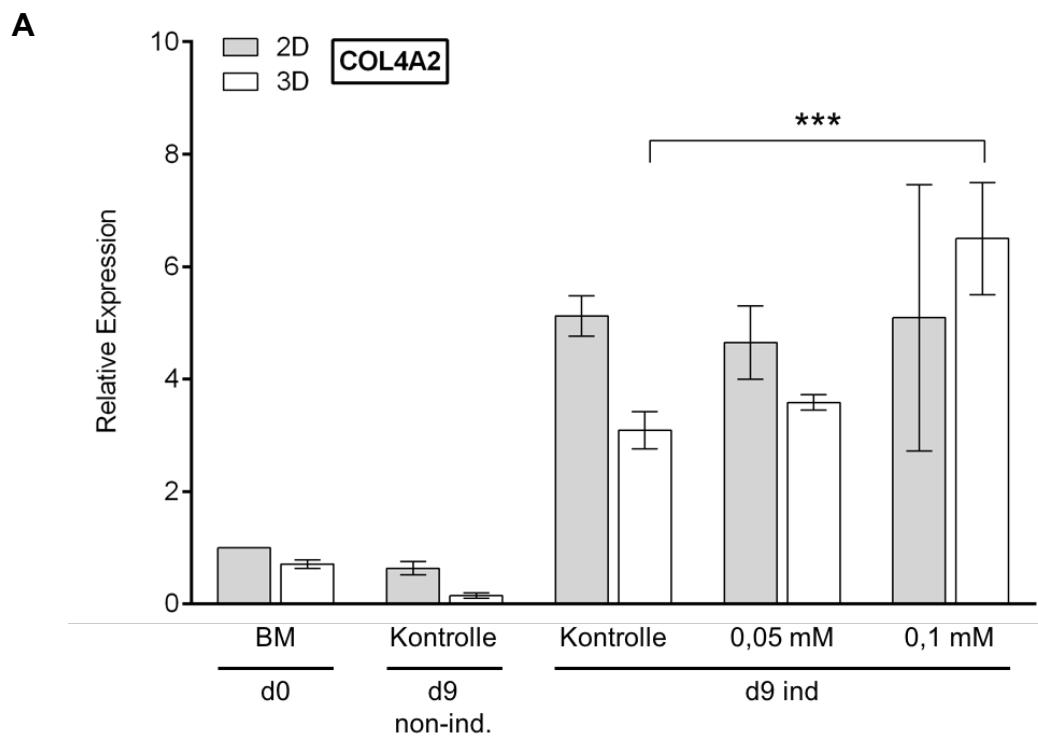
Das 2D und 3D Modell verhielten sich somit ähnlich, wobei in 3D etwas geringere Werte gemessen wurden. Ein deutlicher Unterschied bestand jedoch bei Gabe von 0,1 mM EDHB, das in 3D zu einem signifikanten Anstieg der COL4A Expression führte.

Die Untersuchung von Kollagen I ergab im 2D Modell eine mit stattgehabter Differenzierung der Zellen stark verringerte Expressionsrate im Vergleich zu Tag 0 und der nicht-induzierten Probe. Durch Zugabe des EDHBs konnte kein weiterer Einfluss auf die Expressionsrate beobachtet werden.

Auch im 3D Modell war eine deutliche und EDHB-unabhängige Abnahme der Expressionsrate in den induzierten Proben zu sehen. Insgesamt waren die Expressionsraten etwas geringer als in 2D.

Eine wesentliche Beobachtung in der Kollagenentwicklung auf mRNA-Ebene war somit die gegenläufige Expression von Kollagen I und IV. An Tag 0 sowie in nicht-induzierten Zellen ist die Rate der Genexpression für Kollagen I am höchsten und nimmt durch die Differenzierung der Zellen deutlich ab,

wohingegen die Genexpression von Kollagen IV erst durch die Adipogenese gesteigert wird. Außerdem ging aus diesem Versuch hervor, dass durch EDHB die Genexpression der untersuchten Kollagene in der 2D sowie 3D Kultur nicht negativ beeinflusst wurde. Bei der Verwendung von 0,1 mM EDHB kam es in den 3D Proben sogar zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression von Kollagen IV. Für die Expression von Kollagen I auf mRNA-Ebene konnte hingegen kein Effekt durch Zugabe von EDHB beobachtet werden konnte.



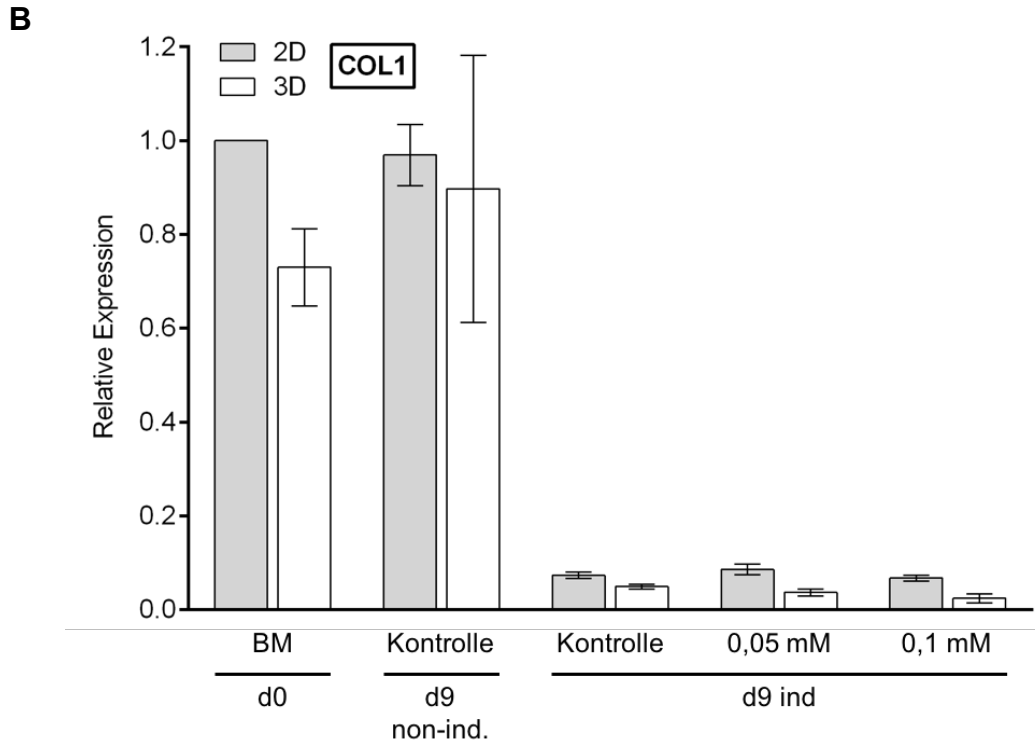


Abbildung 16. Relative Genexpression von COL4A2 und COL1 in hASCs unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur. Der Effekt des EDHBs auf die Genexpression von COL4A2, einer spezifischen Alpha-Kette des Kollagen IV (**A**) sowie COL1 (Kollagen 1) (**B**). Die Analyse erfolgte mittels qPCR. Die mRNA entstammt aus Zellen, welche in einer 2D Zellkultur und einem 3D Zellsystem kultiviert wurden. Zur Normalisierung diente Tag 0 der 2D Zellkultur. Als Housekeeping Gen wurde EF1 α verwendet. Die Zellen wurden 9 Tage lang in Induktionsmedium mit EDHB (0,05 mM, 0,1 mM) bzw. ohne EDHB kultiviert. Eine undifferenzierte Probe in Basalmedium diente als Negativkontrolle. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3). *** Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen verschiedenen Konzentrationen EDHB und Positivkontrolle.

5. Diskussion

Im Tissue Engineering von Fettgewebe ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (ASCs) aufgrund ihrer Multipotenz sowie der einfachen und reproduzierbaren Gewinnung sehr beliebt.^{31,32} Die bisherige Forschung zu ASCs erfolgte vor allem anhand konventioneller 2D Zellkulturen.^{2,3,34,99} Die Zellen befinden sich dabei allerdings nicht in ihrer natürlichen Mikroumgebung und sind dadurch in ihren Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen eingeschränkt. Da die Differenzierungsfähigkeit von Stammzellen jedoch stark von ihrer Umgebung beeinflusst wird, ist die Verwendbarkeit zweidimensional kultivierter Zellen für die Generierung von Fettgewebe limitiert.^{81,102} Im Gegensatz dazu zeigten 3D Modelle basierend auf der Selbstorganisation von Zellen zu einem dreidimensionalen Zellverband eine natürlichere Mikroumgebung, in der die Zellen innerhalb ihrer endogenen EZM liegen und mit ihr interagieren können.¹⁰³ Für die Herstellung von Fettgewebekonstrukten ist der Einsatz von 3D Sphäroiden aus ASCs bislang kaum erforscht.¹⁰⁴ Es fehlen Erkenntnisse zu strukturellen Eigenschaften und Einflussnahme auf die adipogene Differenzierung. In dieser Arbeit wurde daher die Entwicklung der EZM und Differenzierungsfähigkeit von 3D Sphäroiden menschlicher Stammzellen des Fettgewebes unter dem Einfluss des Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitors EDHB betrachtet und mit einer 2D Kultur verglichen. Die untersuchten Kollagene I, IV und VI bilden dabei die Hauptbestandteile der EZM von reifen Adipozyten.

Bei der Durchführung von Genexpressionsanalysen mittels quantitativer PCR stießen wir dabei auf ein weit verbreitetes, jedoch uneinheitlich behandeltes Problem. Für die Quantifizierung eines zu untersuchenden Gens ist es notwendig die erhobenen Daten zu normalisieren. Häufig wird hierfür ein Referenzgen verwendet, welches unter jeglichen Bedingungen stabil exprimiert werden sollte. Viele herkömmlich verwendete HKG erfüllen dieses Kriterium allerdings nicht, wodurch die Validität der erhobenen Ergebnisse stark eingeschränkt wird.⁸⁹⁻⁹² Vor der Verwendung eines HKGs sollte daher seine Stabilität überprüft werden.¹⁰⁵ Ein einheitliches Protokoll zur Evaluation eines geeigneten HKGs existiert dabei nicht, weshalb wir mehrere HKG anhand

statistischer Parameter sowie der Verwendung von Analyse-Softwareprogrammen ausgewertet und ein Ranking erstellt.

5.1 Evaluation eines geeigneten Housekeeping Gens zur Normalisierung der quantitativen PCR

Die qPCR ist eine der meist genutzten Verfahren zur Analyse der Genexpression. Als quantitative Analyseverfahren ist sie wesentlich von einer korrekten internen Normalisierung der gemessenen Werte abhängig. Obwohl die Verwendung von HKG hierfür den Goldstandard darstellt, werden in der heutigen Forschung viele verschiedene HKG eingesetzt, von denen einige häufig verwendete Gene wie GAPDH und ACTB unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen und Verwendung verschiedener Gewebe- oder Zellarten eine instabile Expression aufzeigten.^{90,106} Dadurch können fehlerhafte Ergebnisse resultieren und Studien nur eingeschränkt verglichen werden. Vor der Verwendung eines HKGs ist es daher unerlässlich, seine Stabilität anhand eigener Versuchsproben zu überprüfen.¹⁰⁵ Wir konnten keine Studien zur Evaluation eines HKGs für Genexpressionsanalysen in Versuchen mit adipogener Differenzierung von hASCs im Vergleich einer 2D und 3D Zellkultur finden. Aus diesem Grund testeten wir sechs herkömmlich verwendete HKG (ACTB, B2M, EF1 α , GAPDH, RPL13a und 18S). Wir analysierten dabei die Stabilität ihrer mRNA-Expressionsrate anhand der gemessenen Ct-Werte und ermittelten ihre Variabilität während der adipogenen Differenzierung im 2D und 3D Modell. Zudem verglichen wir unsere Ergebnisse mit den zur Analyse von HKG bekannten Softwares Bestkeeper⁹⁴, Normfinder⁹⁵ und GeNorm⁹⁶ (qBase+). Dabei bestätigte sich die in der Literatur für GAPDH und ACTB beschriebene Instabilität.^{107,108} Beide Gene wiesen große Schwankungen in ihrer Expressionsrate auf und erzielten mit Ausnahme der Analyse mittels Normfinder ein schlechtes Ergebnis in den verschiedenen Auswertungskriterien. EF1 α hingegen erzielte durchweg in allen Stabilitätskriterien das beste Ergebnis und wurde daher am stabilsten exprimiert. Neben EF1 α erlangte RPL13a in vier von fünf Kriterien die zweitbeste Stabilitätswertung, womit diese beiden Gene im 2D und 3D Modell

durch den Differenzierungsvorgang am wenigsten beeinflusst wurden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Feststellungen von Gentile et al., die unter Verwendung von menschlichen vaskulären Stromazellen (*human vascular stromal cells*, hVSCs) in adipogenen Differenzierungsversuchen einer 2D Kultur ebenfalls EF1 α und RPL13a als robusteste HKG ermittelten.¹⁰⁹ Einige Autoren sprechen sich für die Verwendung von mehreren HKG aus, wodurch die Validität von Genexpressionsanalysen möglicherweise weiter erhöht werden kann.^{96,105,110,111} Eine denkbare Kombination zur Normalisierung der qPCR wäre in diesem Fall also EF1 α und RPL13a. Mögliche Limitationen für dieses Verfahren stellen das Vorhandensein geringer Probenmengen und höhere Kosten dar.¹⁰⁶ Aufgrund der bestätigten Stabilität unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde EF1 α in dieser Arbeit in allen qPCR Analysen in adipogen differenzierten ASCs in 2D und 3D Kultur als HKG verwendet. Weiterhin wurde EF1 α in der Arbeitsgruppe in allen weiterführenden Arbeiten zur Genexpression bei adipogener Differenzierung und 3D Kultur von ASCs als HKG eingesetzt.

5.2 Adipogene Differenzierung von hASCs in der 2D und 3D Kultur unter Zugabe von EDHB

Es ist bekannt, dass die Bestandteile der EZM und ihre dynamischen Veränderungen einen wichtigen Einfluss auf den Differenzierungsvorgang von ASCs zu Adipozyten haben.⁵⁴ Kollagene als Hauptbestandteil der EZM spielen dabei *in vitro* eine essentielle Rolle für die terminale Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten. Durch Hemmung ihrer Synthese mittels EDHB konnte in 2D Versuchen mit BIPs und TA1-Präadipozyten eine konzentrationsabhängige Reduktion der adipogenen Differenzierung beobachtet werden.^{23,69} In Versuchen von Nakajima et al. erreichte die Triglyceridabnahme unter den verwendeten EDHB-Konzentrationen von 0,01 mM, 0,04 mM, 0,1 mM und 0,2 mM ab einer Konzentration von 0,1 mM ein Plateau.⁶⁹ In der Arbeit von Ibrahim et al. war ebenfalls die maximale Abnahme der GPDH-Aktivität, welche einen Indikator für die Zelldifferenzierung und Triglyceridakkumulation darstellt, bei 0,1 mM EDHB nachweisbar.²³ Zu

Versuchen mit hASCs ist uns bisher keine Literatur bekannt. Im Vorfeld überprüften wir daher unterschiedliche EDHB-Konzentrationen und Substitutionszeitpunkte bezüglich einer möglichen toxischen Wirkung auf die Zellen. Gemessen an der Kontrollgruppe zeigte sich durch die Zugabe des Enzyminhibitors zwar eine konzentrationsabhängige Reduktion des DNA-Gehaltes der Proben und damit ein proliferationsinhibierender Effekt, jedoch ließ sich kein signifikanter Rückgang der DNA-Menge im Vergleich zum Versuchsbeginn nachweisen. Die Zugabe von EDHB am Tag der Aussaat oder nach Konfluenz der Zellen an Tag 2 wies dabei keine Unterschiede auf. Auch histologisch stellte sich keine erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen dar, sodass eine Toxizität ausgeschlossen werden konnte.

In unseren Differenzierungsversuchen, in denen wir 0,01 mM, 0,05 mM und 0,1 mM EDHB verwendeten, ließ sich der zuvor beschriebene konzentrationsabhängige negative Effekt von EDHB auf die Adipogenese auch unter Verwendung von hASCs nachweisen. Die Ergebnisse der histologischen Färbung und Quantifizierung des Triglyceridgehaltes wiesen dabei auf einen tendenziell stärkeren inhibitorischen Effekt von EDHB auf die Adipogenese in der 3D Kultur im Vergleich zur 2D Kultur hin. Die maximale Hemmung der adipogenen Differenzierung wurde jeweils ab einer Konzentration von 0,05 mM EDHB erreicht, welche damit im Vergleich zu früheren Studien an anderen Zelltypen etwas früher erreicht wurde. Die Untersuchung der Expression der späten adipogenen Marker aP2 und C/EBP α spiegelte den inhibitorischen Effekt auf die Adipogenese auch auf der mRNA-Ebene wider. In 2D und 3D waren die Markergene unter Zugabe von EDHB deutlich reduziert. Die Reduktion der aP2-Expression im 2D Modell zeigten Ibrahim et al. bereits an TA1-Prädipozyten.²³ Erstmals konnten wir den Effekt auch in einem 3D Modell mit hASCs nachweisen. Im 2D und 3D Vergleich konnte dabei analog zu den Ergebnissen der Bestimmung der Triglyceridsynthese eine stärkere Abnahme der mRNA-Expression und damit ein stärkerer negativer Effekt im 3D Modell beobachtet werden. Die Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, dass eine aktive Kollagensynthese für die adipogene Differenzierung von hASCs notwendig ist.

Auch in einer vorausgegangenen Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe konnte ein konzentrationsabhängiger negativer Effekt von EDHB auf die Adipogenese von hASCs in einer 2D und 3D Kultur nachgewiesen werden.¹¹² Eine Betrachtung der Kollagenentwicklung während der adipogenen Differenzierung mit und ohne Zugabe des Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitors EDHB wurde dort hingegen nicht vorgenommen. Wir analysierten daher verschiedene Kollagentypen, welche einen Großteil der EZM in Adipozyten ausmachen, hinsichtlich ihrer Entwicklung unter dem Einfluss von EDHB auf histologischer und Genexpressions-Ebene.

5.3 Entwicklung von Kollagenen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von EDHB im 2D und 3D Vergleich

Bei der Untersuchung der Kollagenentwicklung mittels kollagentypspezifischer Antikörper gegen Kollagen I, IV und VI konnte nach 9-tägiger adipogener Differenzierung ohne den Enzyminhibitor EDHB eine deutliche Zunahme der untersuchten Kollagene in der EZM im Vergleich zu undifferenzierten hASCs in 2D und 3D festgestellt werden. Als Maß für die adipogene Differenzierung erfolgte zusätzlich die Anfärbung der Lipidtröpfchen mittels BODIPY. Dadurch ließ sich die Entwicklung des Kollagens und die Triglyceridakkumulation gleichzeitig verfolgen. Im Versuchsverlauf konnte mit Zunahme der Lipidanfärbung auch für die untersuchten Kollagene ein gesteigertes Signal detektiert werden. Bei Betrachtung von Kollagen IV wurde dessen Kolokalisation zu den differenzierenden Adipozyten besonders deutlich. Entsprechend seiner Funktion als Hauptbestandteil der adipozytären Basalmembran wurden die lipidbeladenen Zellen dabei vollständig von Kollagen IV umhüllt.⁷⁰ Diese Beobachtung geht mit in der Literatur beschriebenen immunhistochemischen Beobachtungen einher.^{62,113} Seine Entwicklung ist ein typisches Merkmal der EZM von reifen Adipozyten.²⁰ In undifferenzierten Zellen kommt es kaum vor und konnte auch in unseren undifferenzierten Proben zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Ein spezifisches Kollagen für Adipozyten stellt es dennoch nicht dar, da es auch in anderen Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Osteoblasten und

Chondrozyten vorkommt.²¹ Durch Zugabe von EDHB konnte zusammen mit der Reduktion der Triglyceridsynthese eine konzentrationsabhängige Reduktion der Kollagen IV Produktion in 2D sowie 3D erzielt werden, wobei zwischen beiden Modellen keine Unterschiede festgestellt werden konnten. In den Proben der 2D Kultur fiel eine Auflösung der typischen netzartigen Struktur von Kollagen IV auf. Als nicht-fibrilläres, netzbildendes Kollagen besitzt es mehrere tripelhelikale Abschnitte, die durch Zugabe von EDHB unterbrochen werden könnten.

Kollagen I ist ein fibrilläres Kollagen und für die grundlegende Architektur der EZM wichtig.⁶⁹ Es ist nicht nur in Adipozyten zu finden, sondern stellt auch in anderen Zellarten wie Fibroblasten, 3T3-L1 Präadipozyten und BIPs ein Hauptkollagen ihrer Matrix dar.^{57,76,114} In unseren Versuchen konnte es in geringem Maß in undifferenzierten Zellen der 2D und 3D Zellkultur nachgewiesen werden. Sein Anteil nahm durch die adipogene Differenzierung der Zellen in 2D und 3D deutlich zu. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen früherer Studien, in denen Kollagen I ein dichtes Netzwerk während der Differenzierung ausbildete.^{57,62,115} Es gilt als Hauptbestandteil des Verankerungssystems und ist am Zusammenhalt der univakuolären Adipozyten untereinander verantwortlich.⁶² In Anwesenheit von EDHB wurde die Synthese von Kollagen I konzentrationsabhängig gehemmt und war damit in EDHB-behandelten Proben in deutlich geringerem Ausmaß nachweisbar. Dieser Effekt war in gleicher Form auch im 3D Modell vorhanden. In den 2D Proben imponierte zudem ein Verlust der Kollagenstruktur, indem sich mit steigender EDHB-Konzentration lediglich kurzstreckige Anteile anfärben ließen. Im Gegensatz dazu bildeten die induzierten Proben ohne EDHB langstreckige und verzweigte Kollagenfasern aus. Kollagen I besitzt als fibrilläres Kollagen eine große tripelhelikale Domäne, deren Ausbildung durch EDHB gestört sein könnte. Die Syntheseeinschränkung und der Strukturverlust könnten somit durch eine Störung im supramolekularen Aufbau nachvollzogen werden. Inwieweit eine Strukturveränderung auch in 3D vorliegt konnte methodenbedingt anhand der vorliegenden Kryoschnitte der 3D Sphäroide nicht

beurteilt werden. Weitere Untersuchungen mittels Konfokalmikroskopie könnten dahingehend zusätzliche Erkenntnisse bringen.

Kollagen VI gehört zu den nicht-fibrillären, netzbildenden Kollagenen und ist an der Interaktion mit verschiedenen Proteinen der Matrix wie Proteoglykanen und Fibronektin sowie im Zusammenspiel mit Kollagen I und IV an der Verankerung der Basalmembran an der Zelle und der Regulation der strukturellen Organisation der EZM beteiligt.^{21,23} In Fettzellen von Mäusen stellt es das häufigste Kollagen der EZM dar.⁶⁸ Auch in unseren Versuchen ließ es sich bereits zu Beginn (Tag 0) in geringen Mengen in den 2D und 3D Proben nachweisen und zeigte mit adipogener Induktion der Zellen jeweils eine sehr starke Synthesezunahme. Neben dem hohen Gehalt in der EZM von Fettgewebe ist die Beteiligung an Adipositas-assoziierten Krankheiten eine Besonderheit von Kollagen VI, sodass ihm für die physiologischen Prozesse in Fettgewebe offenbar eine wichtige Bedeutung zukommt.^{68,71,72} Interessanterweise konnten Nakajima et al. durch Kultivierung von BIPs in mit Kollagen VI beschichteten Wells den inhibitorischen Effekt von EDHB auf die Adipogenese zum Teil aufheben und eine signifikante Triglyceridakkumulation nachweisen.⁶⁹ Dies weist weiterhin auf eine tragende Rolle des Kollagen VI für die adipogene Differenzierungsfähigkeit der Zellen hin. Durch Zugabe von EDHB konnte ein konzentrationsabhängiger Strukturverlust und eine Abnahme der Kollagen VI Produktion in den 2D Proben nachgewiesen werden. In den 3D Proben war ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme festzustellen, jedoch war die notwendige minimale Konzentration mit 0,05 mM EDHB im Vergleich zu 0,01 mM EDHB im 2D Versuch höher. In beiden Modellen fiel eine stärkere Anfärbung des Kollagens an Tag 5 im Vergleich zu Tag 9 auf. In Beobachtungen aus Studien zur dynamischen Entwicklung der EZM-Komponenten in Versuchen mit 3T3-L1 Präadipozyten wurde die maximale Sekretion von Kollagen VI ebenfalls in der mittleren Phase der Adipogenese gemessen, sodass Kollagen VI eine wichtige Rolle in der Anregung und Aufrechterhaltung der Adipogenese spielen könnte.^{73,76}

Die unterschiedlich starke Sekretion eines Kollagentyps während der Adipogenese wirkt sich möglicherweise auch auf das Potential der

Synthesehemmung mit EDHB aus. Daneben könnten weitere Faktoren wie Anzahl und Größe der jeweiligen tripelhelikalen Abschnitte eine Rolle spielen. Außerdem kann die Ausbildung der verschiedenen Kollagentypen unterschiedlich stark von einer adäquaten adipogenen Differenzierung abhängig sein. Diesbezüglich könnten weitere Forschungen wie beispielsweise Analysen mittels Rasterelektronenmikroskopie nähere Erkenntnisse bringen.

5.4 Analyse der Genexpression der Kollagene I und IV während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von EDHB im 2D und 3D Vergleich

Neben den histologischen Analysen wurden die Veränderungen der Kollagenentwicklung unter Zugabe von EDHB auch auf Genexpressionsebene untersucht.

Die Analyse der Genexpression von Kollagen I und IV während der Adipogenese zeigte eine gegenläufige Expression. Während die Rate der Genexpression für Kollagen I zu Beginn des Versuchs und in nicht-induzierten Zellen am höchsten war und durch die Differenzierung der Zellen deutlich abnahm, wurde die Genexpression von Kollagen IV erst durch die Adipogenese gesteigert. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen aus 2D Versuchen mit 3T3-L1 Zellen von Weiner et al. sowie Aratani et al. überein.^{56,76} Durch Zugabe von EDHB wurde die Genexpression der untersuchten Kollagene in der 2D sowie 3D Kultur nicht negativ beeinflusst. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass EDHB die Hemmung der Kollagensynthese erst im letzten Schritt der Proteinsynthese durch Störung der Tripelhelixbildung bewirkt. Um bereits die Expression auf mRNA-Ebene zu unterbinden und damit ein vollständiges Ausbleiben der Kollagensynthese zu erreichen müssten Versuche mit genveränderten Knock-Out-Zellen durchgeführt werden. Durch gezieltes Ausschalten einzelner Kollagentypen könnte damit auch die Relevanz jedes einzelnen Kollagentyps für den ordnungsgemäßen Ablauf der adipogenen Differenzierung näher beleuchtet werden.

Interessanterweise konnte bei der Verwendung von 0,1 mM EDHB in Proben der 3D Kultur ein signifikanter Anstieg der Genexpression von Kollagen IV

beobachtet werden. Dies impliziert einen positiven Effekt von EDHB auf die Genexpression, möglicherweise im Sinne eines Feedbackmechanismus durch Ausbleiben einer adäquaten Kollagensynthese.

Insgesamt konnte basierend auf den durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Kollagensynthese mit einer Beeinträchtigung der adipogenen Differenzierung der hASCs assoziiert ist und damit ein Zusammenhang zwischen dynamischen Prozessen in der EZM und der Differenzierungsfähigkeit der Zellen besteht. Die Verwendung eines 3D Sphäroid-Modells ermöglicht es dabei die Komplexität eines dreidimensionalen Gewebeverbands in vivo besser abzubilden. Die Berücksichtigung von Erkenntnissen über die Bedeutung der extrazellulären Matrix als wesentlichen Einflussfaktor auf das Zellverhalten, wie z.B. die Differenzierungsfähigkeit, könnte einen wichtigen Beitrag bei der Entwicklung klinisch anwendbarer Fettgewebekonstrukte als Weichteilersatz leisten.

6. Zusammenfassung

Das Tissue Engineering von Fettgewebe befasst sich mit der Herstellung von biologisch äquivalenten Gewebekonstrukten mit dem Ziel, diese in der Regenerativen Medizin zur Deckung von Weichteildefekten einzusetzen. Dies führte zu intensiven Forschungen bezüglich zellulärer und molekularer Mechanismen von Adipozyten und Differenzierungsprozessen ihrer Vorläuferzellen. Es wurde jedoch auch zunehmend die Bedeutung der Extrazellulärmatrix (EZM) für die Ausreifung, Funktion und das Überleben von Adipozyten deutlich.¹⁸⁻²⁰ Untersuchungen zur EZM und ihrer Einflussnahme auf die Adipogenese wurden bislang hauptsächlich an konventionellen zweidimensionalen Zellkulturen unter Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (bone marrow-derived MSC), Präadipozyten der Mauszelllinie 3T3-L1 und intramuskulären Präadipozyten aus Rindern (bovine intramuscular preadipocytes, BIP) vorgenommen.^{23,56,69,76,115} Ziel dieser Arbeit war es Erkenntnisse über den Einfluss der EZM auf die adipogene Differenzierungsfähigkeit unter Verwendung von humanen mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes (human adipose-derived stem cells, hASC) zu gewinnen. Um in vitro eine natürlichere Mikroumgebung der Zellen zu generieren, wurde neben einer 2D Kultur vergleichend ein 3D Modell bestehend aus multizellulären Sphäroiden verwendet.^{84,85} Zur Untersuchung der Unterschiede in der Kollagenentwicklung und adipogenen Differenzierung im 2D und 3D Modell wurde unter anderem die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet. Als interner Standard wird hierbei ein stabil exprimiertes Housekeeping Gen (HKG) benötigt.⁹³ In zuvor durchgeführten Versuchen wie auch in Berichten der Literatur zeigte sich jedoch, dass einige herkömmlich verwendete HKG unter Versuchsbedingungen eine instabile Expression aufwiesen.^{90,106} Es war daher essentiell im Vorfeld ein HKG zu ermitteln, das während der adipogenen Differenzierung von hASCs in einem 2D und 3D Kultursystem stabil exprimiert wurde. Die Ermittlung statistischer Parameter (Standardabweichung und Interquartilsabstand) sowie die Ergebnisse dreier zur Stabilitätsprüfung

eingesetzten Softwares identifizierten EF1 α als robustestes HKG, infolgedessen es für alle weiteren qPCR Analysen verwendet wurde.

Der Zusammenhang zwischen der EZM-Entwicklung und der Adipogenese wurde durch Hemmung der Kollagenentwicklung unter Verwendung von Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat (EDHB) untersucht. EDHB ist ein Inhibitor der Prolyl-4-Hydroxylase, welche in Kollagenvorstufen die Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin katalysiert und damit für die Tripelhelixbildung von Kollagenen notwendig ist.⁷⁸ Den Zellen wurden in einer 2D und 3D Kultur zeitgleich mit der adipogenen Induktion verschiedene Konzentrationen EDHB hinzugefügt.

Bei Betrachtung der Triglyceridsynthese mittels Histologie und quantitativer Analyse (Triglyceridassay) konnte in beiden Kultursystemen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Adipogenese festgestellt werden. Im Unterschied zur 2D Kultur konnte der Triglyceridgehalt im 3D Modell annähernd auf das Niveau der nicht-induzierten Kontrolle gesenkt werden und damit ein tendenziell stärkerer negativer Effekt im 3D Modell demonstriert werden. In Untersuchungen zur Genexpression wurde die Expressionsrate der späten adipogenen Marker α P2 und C/EBP α maximal durch Zugabe von 0,05 mM EDHB gesenkt, wobei der Effekt in 3D erneut stärker ausgeprägt war.

Bei Betrachtung der Kollagenentwicklung zeigte sich immunhistochemisch zunächst eine Adipogenese-assoziierte Entwicklung der Kollagene I, IV und VI im 2D und 3D Modell. Auf mRNA-Ebene hingegen war eine unterschiedliche Expression von Kollagen I und IV nachweisbar. Für Kollagen I wurde eine Abnahme der Expression bei Differenzierung der Zellen beobachtet, während die Expressionsrate von Kollagen IV erst mit Beginn der Adipogenese gesteigert wurde. Durch die Zugabe von EDHB ließ sich die Kollagenbildung gleichermaßen in 2D und 3D konzentrationsabhängig inhibieren. Damit konnte ein Rückgang der Synthese von drei für die Adipozyten relevanten Kollagenen zusammen mit der Störung der adipogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Die Genexpression der untersuchten Kollagene wurde durch EDHB nicht negativ beeinflusst. In Folgestudien könnte die Relevanz jedes einzelnen Kollagentyps durch gezieltes Ausschalten einzelner Kollagentypen, beispielsweise mittels genveränderter Knock-Out-Zellen, näher beleuchtet werden.

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf einen engen Zusammenhang der Kollagensynthese mit der Adipogenese hin. Inwieweit eine durch Zell-Matrix-Interaktionen ausgelöste Signaltransduktion und regulatorische Mechanismen in den Präadipozyten die Adipogenese beeinflussen, bleibt jedoch Gegenstand zukünftiger Forschung.

7. Literaturverzeichnis

1. ASPS National Clearinghouse of Plastic Surgery Procedural Statistics. (erhältlich unter <https://www.plasticsurgery.org/documents/News/Statistics/2019/plastic-surgery-statistics-full-report-2019.pdf>, 2019).
2. Bauer-Kreisel, P., Goepferich, A. & Blunk, T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 798-813 (2010).
3. Brett, E., Chung, N., Leavitt, W.T., Momeni, A., Longaker, M.T. & Wan, D.C. A Review of Cell-Based Strategies for Soft Tissue Reconstruction. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **23**, 336-346 (2017).
4. Dolderer, J.H., Medved, F., Haas, R.M., Siegel-Axel, D.I., Schiller, S.M. & Schaller, H.E. Angiogenesis and vascularisation in adipose tissue engineering. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie* **45**, 99-107 (2013).
5. Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Hirohi, T. & Harii, K. Cell-Assisted Lipotransfer for Cosmetic Breast Augmentation: Supportive Use of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells. *Aesthetic Plastic Surgery* **32**, 48-55 (2008).
6. Huss, F.R. & Kratz, G. Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* **36**, 166-171 (2002).
7. Garvey, P.B., Buchel, E.W., Pockaj, B.A., Casey, W.J.I., Gray, R.J., Hernández, J.L. & Samson, T.D. DIEP and Pedicled TRAM Flaps: A Comparison of Outcomes. *Plastic and Reconstructive Surgery* **117**, 1711-1719 (2006).
8. Tachi, M. & Yamada, A. Choice of flaps for breast reconstruction. *International Journal of Clinical Oncology* **10**, 289-297 (2005).
9. Kawaguchi, N., Toriyama, K., Nicodemou-Lena, E., Inou, K., Torii, S. & Kitagawa, Y. De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1062-1066 (1998).
10. Tabata, Y., Miyao, M., Inamoto, T., Ishii, T., Hirano, Y., Yamaoki, Y. & Ikada, Y. De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering* **6**, 279-289 (2000).

11. Lijnen, H.R. Angiogenesis and obesity. *Cardiovascular Research* **78**, 286-293 (2008).
12. Rupnick, M.A., Panigrahy, D., Zhang, C.Y., Dallabrida, S.M., Lowell, B.B., Langer, R. & Folkman, M.J. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10730-10735 (2002).
13. Jain, R.K., Au, P., Tam, J., Duda, D.G. & Fukumura, D. Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology* **23**, 821-823 (2005).
14. Lovett, M., Lee, K., Edwards, A. & Kaplan, D.L. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **15**, 353-370 (2009).
15. Kimura, Y., Ozeki, M., Inamoto, T. & Tabata, Y. Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* **24**, 2513-2521 (2003).
16. Rophael, J.A., Craft, R.O., Palmer, J.A., Hussey, A.J., Thomas, G.P., Morrison, W.A., Penington, A.J. & Mitchell, G.M. Angiogenic growth factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and adipogenesis. *The American Journal of Pathology* **171**, 2048-2057 (2007).
17. Gregoire, F.M., Smas, C.M. & Sul, H.S. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* **78**, 783 (1998).
18. Divoux, A. & Clement, K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obesity Reviews* **12**, 494-503 (2011).
19. Gattazzo, F., Urciuolo, A. & Bonaldo, P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**, 2506-2519 (2014).
20. Huang, G. & Greenspan, D.S. ECM roles in the function of metabolic tissues. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **23**, 16-22 (2012).
21. Mariman, E.C. & Wang, P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 1277-1292 (2010).
22. Rutkowski, J.M., Stern, J.H. & Scherer, P.E. The cell biology of fat expansion. *The Journal of Cell Biology* **208**, 501-512 (2015).

23. Ibrahim, A., Bonino, F., Bardon, S., Ailhaud, G. & Dani, C. Essential role of collagens for terminal differentiation of preadipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **187**, 1314-1322 (1992).
24. Wankhade, U.D., Shen, M., Kolhe, R. & Fulzele, S. Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem Cells International* **2016**, article ID: 3206807 (2016).
25. Kahn, C.R. The Origin of Fat: Can We Nip Obesity in the Vascular Bud? *Science* **322**, 542-543 (2008).
26. Guerre-Millo, M. Adipose tissue hormones. *Journal of Endocrinological Investigation* **25**, 855-861 (2002).
27. Fruhbeck, G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods in Molecular Biology* **456**, 1-22 (2008).
28. Galic, S., Oakhill, J.S. & Steinberg, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* **316**, 129-139 (2010).
29. Ibrahim, M.M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews* **11**, 11-18 (2010).
30. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A. & Chen, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1821-1830 (2003).
31. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. & Hedrick, M.H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 4279-4295 (2002).
32. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. & Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* **7**, 211-228 (2001).
33. Hyun, I. The bioethics of stem cell research and therapy. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 71-75 (2010).
34. Gimble, J. & Guilak, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* **5**, 362-369 (2003).
35. Gimble, J.M., Katz, A.J. & Bunnell, B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research* **100**, 1249-1260 (2007).

36. Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl, H., Rubin, J.P., Yoshimura, K. & Gimble, J.M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641-648 (2013).
37. Poulos, S.P., Dodson, M.V., Culver, M.F. & Hausman, G.J. The increasingly complex regulation of adipocyte differentiation. *Experimental Biology and Medicine* **241**, 449-456 (2016).
38. Rosen, E.D. & MacDougald, O.A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **7**, 885-896 (2006).
39. Smas, C.M. & Sul, H.S. Control of adipocyte differentiation. *Biochemical Journal* **309**, 697-710 (1995).
40. Sarjeant, K. & Stephens, J.M. Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**, a008417 (2012).
41. Otto, T.C. & Lane, M.D. Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 229-242 (2005).
42. Qiu, Z., Wei, Y., Chen, N., Jiang, M., Wu, J. & Liao, K. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 11988-11995 (2001).
43. Cristancho, A.G. & Lazar, M.A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **12**, 722-734 (2011).
44. Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J. & Spiegelman, B.M. Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *Molecular Cell* **3**, 151-158 (1999).
45. Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M. & Kliewer, S.A. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 12953-12956 (1995).
46. Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M. & Mortensen, R.M. PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell* **4**, 611-617 (1999).

47. Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N. & Kasuga, M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **51**, 2045-2055 (2002).
48. Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M. & Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4333-4337 (1998).
49. Zhang, Y., Khan, D., Delling, J. & Tobiasch, E. Mechanisms Underlying the Osteo- and Adipo-Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *The Scientific World Journal* **2012**, article ID: 793823 (2012).
50. Yamasaki, S., Nakashima, T., Kawakami, A., Miyashita, T., Tanaka, F., Ida, H., Migita, K., Origuchi, T. & Eguchi, K. Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. *Rheumatology (Oxford, England)* **43**, 448-452 (2004).
51. Kuri-Harcuch, W., Wise, L.S. & Green, H. Interruption of the adipose conversion of 3T3 cells by biotin deficiency: differentiation without triglyceride accumulation. *Cell* **14**, 53-59 (1978).
52. Hynes, R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219 (2009).
53. Frantz, C., Stewart, K.M. & Weaver, V.M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* **123**, 4195-4200 (2010).
54. Daley, W.P., Peters, S.B. & Larsen, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science* **121**, 255 (2008).
55. Rozario, T. & DeSimone, D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental Biology* **341**, 126-140 (2010).
56. Aratani, Y. & Kitagawa, Y. Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 16163-16169 (1988).
57. Nakajima, I., Yamaguchi, T., Ozutsumi, K. & Aso, H. Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation* **63**, 193-200 (1998).
58. Alvarez-Llamas, G., Szalowska, E., de Vries, M.P., Weening, D., Landman, K., Hoek, A., Wolffenbuttel, B.H., Roelofsen, H. & Vonk, R.J.

- Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**, 589-600 (2007).
59. Burton, G.R., Guan, Y., Nagarajan, R. & McGehee, R.E., Jr. Microarray analysis of gene expression during early adipocyte differentiation. *Gene* **293**, 21-31 (2002).
 60. Renes, J., Bouwman, F., Noben, J.P., Evelo, C., Robben, J. & Mariman, E. Protein profiling of 3T3-L1 adipocyte differentiation and (tumor necrosis factor alpha-mediated) starvation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 492-503 (2005).
 61. Welsh, G.I., Griffiths, M.R., Webster, K.J., Page, M.J. & Tavare, J.M. Proteome analysis of adipogenesis. *Proteomics* **4**, 1042-1051 (2004).
 62. Kubo, Y., Kaidzu, S., Nakajima, I., Takenouchi, K. & Nakamura, F. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **36**, 38-44 (2000).
 63. Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics* **20**, 33-43 (2004).
 64. Gordon, M.K. & Hahn, R.A. Collagens. *Cell and Tissue Research* **339**, 247-257 (2010).
 65. Muiznieks, L.D. & Keeley, F.W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832**, 866-875 (2013).
 66. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a004978 (2011).
 67. Shoulders, M.D. & Raines, R.T. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 929-958 (2009).
 68. Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S. & Scherer, P.E. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 1575-1591 (2009).
 69. Nakajima, I., Muroya, S., Tanabe, R. & Chikuni, K. Positive effect of collagen V and VI on triglyceride accumulation during differentiation in cultures of bovine intramuscular adipocytes. *Differentiation* **70**, 84-91 (2002).

70. Pierleoni, C., Verdenelli, F., Castellucci, M. & Cinti, S. Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. *European Journal of Histochemistry* **42**, 183-188 (1998).
71. Iyengar, P., Espina, V., Williams, T.W., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L.A., Lee, H., Temple, K., Graves, R., Pollard, J., Chopra, N., Russell, R.G., Sasisekharan, R., Trock, B.J., Lippman, M., Calvert, V.S., Petricoin, E.F., 3rd, Liotta, L., Dadachova, E., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., Bonaldo, P. & Scherer, P.E. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 1163-1176 (2005).
72. Pasarica, M., Gowronska-Kozak, B., Burk, D., Remedios, I., Hymel, D., Gimble, J., Ravussin, E., Bray, G.A. & Smith, S.R. Adipose tissue collagen VI in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**, 5155-5162 (2009).
73. Ojima, K., Oe, M., Nakajima, I., Muroya, S. & Nishimura, T. Dynamics of protein secretion during adipocyte differentiation. *FEBS Open Bio* **6**, 816-826 (2016).
74. Kuri-Harcuch, W., Arguello, C. & Marsch-Moreno, M. Extracellular matrix production by mouse 3T3-F442A cells during adipose differentiation in culture. *Differentiation* **28**, 173-178 (1984).
75. Napolitano, L. The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *The Journal of Cell Biology* **18**, 663-679 (1963).
76. Weiner, F.R., Shah, A., Smith, P.J., Rubin, C.S. & Zern, M.A. Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor alpha. *Biochemistry* **28**, 4094-4099 (1989).
77. Bouwman, F., Renes, J. & Mariman, E. A combination of protein profiling and isotopomer analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry reveals an active metabolism of the extracellular matrix of 3T3-L1 adipocytes. *Proteomics* **4**, 3855-3863 (2004).
78. Kivirikko, K.I., Myllyla, R. & Pihlajaniemi, T. Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **3**, 1609-1617 (1989).
79. Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D. & Steimberg, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes & Nutrition* **4**, 13-22 (2009).

80. Pedersen, J.A. & Swartz, M.A. Mechanobiology in the Third Dimension. *Annals of Biomedical Engineering* **33**, 1469-1490 (2005).
81. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R. & Yamada, K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**, 1708-1712 (2001).
82. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. Molecular regulation of adipogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 145-171 (2000).
83. Chun, T.H., Hotary, K.B., Sabeh, F., Saltiel, A.R., Allen, E.D. & Weiss, S.J. A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* **125**, 577-591 (2006).
84. Santini, M.T. & Rainaldi, G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* **67**, 148-157 (1999)..
85. Weiser, B. Adipose Tissue Engineering - Precultivation Strategies towards Clinical Applications & a Novel 3-D Model of Adipogenesis for Basic Research. Ph.D. thesis, University of Regensburg (2008).
86. Frith, J.E., Thomson, B. & Genever, P.G. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Engineering Part C: Methods* **16**, 735-749 (2010).
87. Gorzelniak, K., Janke, J., Engeli, S. & Sharma, A.M. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Hormone and Metabolic* **33**, 625-627 (2001).
88. Fraga, D., Meulia, T. & Fenster, S. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* **8**, 10.13.11-10.13.40 (2014).
89. Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C. & Gutierrez, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany* **60**, 487-493 (2009).
90. Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 169-193 (2000).
91. Serazin-Leroy, V., Denis-Henriot, D., Morot, M., de Mazancourt, P. & Giudicelli, Y. Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts. *Molecular and Cellular Probes* **12**, 283-291 (1998).

92. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* **75**, 291-295 (1999).
93. Bustin, S.A. & Nolan, T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **15**, 155-166 (2004).
94. Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509-515 (2004).
95. Andersen, C.L., Jensen, J.L. & Orntoft, T.F. 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* **64**, 5245-5250 (2004).
96. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, article number: research0034.1 (2002).
97. Chooi, W.H., Zhou, R., Yeo, S.S., Zhang, F. & Wang, D.-A. Determination and Validation of Reference Gene Stability for qPCR Analysis in Polysaccharide Hydrogel-Based 3D Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cell Cultural Models. *Molecular Biotechnology* **54**, 623-633 (2013).
98. Ito, A., Aoyama, T., Tajino, J., Nagai, M., Yamaguchi, S., Iijima, H., Zhang, X., Akiyama, H. & Kuroki, H. Evaluation of reference genes for human chondrocytes cultured in several different thermal environments. *International Journal of Hyperthermia* **30**, 210-216 (2014).
99. Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B. & Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* **45**, 115-120 (2008).
100. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
101. Fischbach, C., Spruss, T., Weiser, B., Neubauer, M., Becker, C., Hacker, M., Gopferich, A. & Blunk, T. Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes. *Experimental Cell Research* **300**, 54-64 (2004).

102. Watt, F.M. & Hogan, B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427-1430 (2000).
103. Stricker, S., Knaus, P. & Simon, H.G. Putting Cells into Context. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **5**, 32 (2017).
104. Zhang, K., Song, L., Wang, J., Yan, S., Li, G., Cui, L. & Yin, J. Strategy for constructing vascularized adipose units in poly(l-glutamic acid) hydrogel porous scaffold through inducing in-situ formation of ASCs spheroids. *Acta Biomaterialia* **51**, 246-257 (2017).
105. Wong, M.L. & Medrano, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75-85 (2005).
106. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes And Immunity* **6**, 279 (2005).
107. Curtis, K.M., Gomez, L.A., Rios, C., Garbayo, E., Raval, A.P., Perez-Pinzon, M.A. & Schiller, P.C. EF1alpha and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *BMC molecular biology* **11**, 61 (2010).
108. Warrington, J.A., Nair, A., Mahadevappa, M. & Tsyganskaya, M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiological Genomics* **2**, 143-147 (2000).
109. Gentile, A.M., Lhamyani, S., Coin-Araguez, L., Oliva-Olivera, W., Zayed, H., Vega-Rioja, A., Monteseirin, J., Romero-Zerbo, S.Y., Tinahones, F.J., Bermudez-Silva, F.J. & El Bekay, R. RPL13A and EEF1A1 Are Suitable Reference Genes for qPCR during Adipocyte Differentiation of Vascular Stromal Cells from Patients with Different BMI and HOMA-IR. *PLOS ONE* **11**, e0157002 (2016).
110. Hamalainen, H.K., Tubman, J.C., Vikman, S., Kyrola, T., Ylikoski, E., Warrington, J.A. & Lahesmaa, R. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry* **299**, 63-70 (2001).
111. B Bustin, S.A., Beaulieu, J.F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S., Olsvik, P.A., Penning, L.C. & Toegel, S. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology* **11**, 74 (2010).

112. Seitz, A.K. 2-D and 3-D adipocyte cell culture; promising tools for basic research and approaches towards clinical therapies. Ph.D. thesis, University of Regensburg (2010).
113. Chun, T.H. Peri-adipocyte ECM remodeling in obesity and adipose tissue fibrosis. *Adipocyte* **1**, 89-95 (2012).
114. Goldberg, B. Kinetics of processing of type I and type III procollagens in fibroblast cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3322-3325 (1977).
115. Ullah, M., Sittinger, M. & Ringe, J. Extracellular matrix of adipogenically differentiated mesenchymal stem cells reveals a network of collagen filaments, mostly interwoven by hexagonal structural units. *Matrix Biology* **32**, 452-465 (2013).

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Beta-actin
aP2	adipocyte Protein 2
ASC	adipose-derived stem cells
B2M	β2-Mikroglobulin
BIP	bovine intramuscular preadipocytes
BM	Basalmembran
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	copy/complementary deoxyribonucleic acid
C/EBP α,β,δ	CCAAT/enhancer-binding protein alpha, beta, delta
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
EF1 α	eukaryotic translational elongation factor 1 alpha
EDHB	Ethyl-3,4-dihydroxybenzoat
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EZM	Extrazellulärmatrix
FABP4	fatty acid-binding protein 4
FACITs	fibril-associated collagens with interrupted triple helices
FAT/CD36	fatty acid translocase CD36
FCS	fetal Bovine Serum
FGF-2	fibroblast growth factor 2
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLUT-4	glucose transporter 4
GPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase

hASC	human adipose-derived stem cells
hVSC	human vascular stromal cells
HKG	Housekeeping Gen
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IGF-I	insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobulin G
IQR	Interquartile Range
LPL	Lipoproteinlipase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleid acid
ORO	Oil Red O
PBM-2	preadipocyte basal medium 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
P/S	Penicillin und Streptomycin
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RPL13a	Ribosomales Protein L13a
rcf	relative centrifugal force
SREBP-1/ADD-1	sterol regulatory element binding protein 1/adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1
SVF	stromal-vascular fraction
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
U	units
VEGF	vascular endothelial growth factor
18S	18S Ribosom
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional

II Abbildungsverzeichnis

1. Überblick über die Stadien der adipogenen Differenzierung.	5
2. Regulation der Genkaskade der Adipogenese.	6
3. Herstellung von 3D Sphäroiden mit Hilfe der „liquid overlay technique“.	25
4. Betrachtung der HKG-Stabilität anhand der Standardabweichung.	35
5. Betrachtung der HKG-Stabilität anhand der Verteilung der Ct-Werte dargestellt als Box-Whisker-Plot.	36
6. Untersuchung der Toxizität von EDHB in einer 2D Zellkultur.	39
7. DNA-Gehalt in hASCs nach Behandlung mit EDHB in einer 2D Zellkultur.	40
8. Schematische Darstellung der Versuche mit dem Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitor EDHB.	42
9. Der Effekt von EDHB auf die adipogene Differenzierung von hASCs im Vergleich einer 2D und 3D Zellkultur.	45
10. Quantifizierung des Triglyceridgehaltes unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur.	47
11. Relative Expression adipogener Marker in hASCs unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur.	49
12. Kollagen I Entwicklung während der Adipogenese unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur.	54
13. Kollagen IV Entwicklung während der Adipogenese unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur.	57
14. Anfärbung von Kollagen IV und intrazellulären Lipiden in einer 2D Zellkultur mit und ohne EDHB.	58
15. Kollagen VI Entwicklung während der Adipogenese unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur.	61
16. Relative Genexpression von COL4A2 und COL1 in hASCs unter Zugabe von EDHB in einer 2D und 3D Zellkultur.	64

III Tabellenverzeichnis

1. Einteilung der verschiedenen Kollagentypen nach fibrillären und nicht-fibrillären Kollagenen.	11
2. Primäre Antikörper.	21
3. Sekundäre Antikörper.	21
4. Primersequenzen für die quantitative PCR.	22

IV Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. rer. nat. Torsten Blunk für die Überlassung des Dissertationsthemas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich meiner Co-Betreuerin Dr. rer. nat. Petra Bauer-Kreisel danken, die mir stets in allen Fragen zur Seite stand und mich bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit unterstützte.

Für die Heranführung an die experimentelle Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten danke ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe der unfallchirurgischen Forschung, allen voran Christiane Höfner, die mich bei der Planung, Umsetzung und Durchführung meiner Versuche tatkräftig unterstützte.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und speziell meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglichten und mich weit über die Dissertation hinaus stets unterstützten. Ebenso möchte ich mich bei meiner Freundin Carina Jägers für die seelische und moralische Unterstützung während sämtlicher Höhen und Tiefen der Arbeit bedanken.

V Veröffentlichungen

Publikationen

1. **Lukaszyk, D.**, Krebs, M., Kübler, H., Kocot, A., Hatzichristodoulou, G. Bilaterale intrauterine Hodentorsion bei einem reifen Neugeborenen. *Urologe* **58**, 1198–1200 (2019).
2. Hoefner, C., Muhr, C., Horder, H., Wiesner, M., Wittmann, K., **Lukaszyk, D.**, Radeloff, K., Winnefeld, M., Becker, M., Blunk, T., Bauer-Kreisel, P. Human ASC Spheroids Possess High Adipogenic Capacity and Acquire an Adipose Tissue-like ECM Pattern. *Tissue Engineering Part A*, **26**, 915-926 (2020).

Posterpräsentation

1. **Lukaszyk, D.**, Hoefner, C., Bauer-Kreisel, P., Blunk, T. Collagen Synthesis as a Regulatory Factor of Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells - Comparison of 3D and 2D Culture Conditions. 4th International Conference “Strategies in Tissue Engineering” (WITE), Würzburg, Deutschland (2015).
2. **Lukaszyk, D.**, Hoefner, C., Meffert, R.H., Blunk, T., Bauer-Kreisel, P. Synthesis and Possible Role of Collagens during Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in a Three-Dimensional Context. 19. Chirurgische Forschungstage, Würzburg, Deutschland (2015).