

Charakterisierung und Anwendung von primären humanen mikrovaskulären Endothelzellen mit erweiterter Proliferationsfähigkeit

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Katharina Scheller

aus Ludwigshafen am Rhein

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter : Prof. Dr. Heike Walles

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel als Quelle verwendet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass die Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Heidelberg, 15.10.2012

Katharina Scheller

Zusammenfassung

Das Arbeitsgebiet Tissue Engineering befasst sich mit der Klärung der Mechanismen, die der Funktionen verschiedener Gewebearten zu Grunde liegen sowie mit der Entwicklung alternativer Strategien zur Behandlung von Organversagen bzw. Organverlusten. Aufgrund des akuten Mangels an Spenderorganen gewinnt dieses Arbeitsgebiet immer mehr an Bedeutung. Das noch sehr junge Feld vereint Technik mit Biowissenschaften und generiert so *ex-vivo* bioartifizielle Transplantate, die *in-vivo* die Organfunktion wiederherstellen bzw. ersetzen. Zudem werden im Tissue Engineering bioartifizielle Langzeitmodelle für Gewebe generiert, welche die physiologische Situation im menschlichen Körper darstellen und somit *in-vitro* als Testsysteme Verwendung finden. Einer der kritischsten Punkte im Tissue Engineering ist die ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff. Bioartifizielle Gewebe mit einer Dicke von bis zu 200 µm können mittels Diffusion ausreichend versorgt werden. Erfolgreich transplantiert wurden bisher dünne und avaskuläre Strukturen, wie Knorpel und Haut. Für dickere Transplantate ist die Versorgung der Zellen alleine durch Diffusion jedoch nicht gegeben. Hierfür müssen Mechanismen und Strategien zur Prävascularisierung der artifiziellen Gewebekonstrukte entwickelt werden, damit die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung aller Zellen, auch im Inneren des Transplantates, von Anfang an gewährleistet ist. Eine wichtige Rolle bei der Prävascularisierung spielt die Angiogenese. Sie ist der zentrale physiologische Prozess für eine erfolgreiche Gefäßneubildung zur Prävascularisierung von Transplantaten bzw. *in-vitro* Modellen. Dabei ist die Wahl einer geeigneten Zellquelle entscheidend, da die Zellen die Basis für die Angiogenese darstellen. Mikrovaskuläre Endothelzellen (mvEZ) sind maßgeblich an der Angiogenese beteiligt. Die Funktionalität der Zellen muss gewährleistet sein, damit das artifizielle Gewebekonstrukt seine physiologische Funktion ausführen kann.

Das Problem bei der Verwendung von humanen primären mvEZ ist ihre geringe Verfügbarkeit, ihre limitierte Proliferationskapazität und der schnelle Verlust ihrer typischen Endothelzellmarker *in-vitro*. Die Ausbeute an Primärzellen bei der Isolierung ist begrenzt und reicht meist nicht aus, um Trägermaterialien zu besiedeln und eine Vaskularisierung zu erreichen. Der Aufbau standardisierter *in-vitro* Testsysteme ist durch die geringe Zellausbeute auch nicht möglich. Die upcyte[®] Technologie bietet hierfür einen Lösungsansatz. In der vorliegenden Arbeit konnten upcyte[®] mvEZ als Alternative zu primären mvEZ generiert

werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen eine erweiterte Proliferationsfähigkeit aufweisen und im Vergleich zu primären mvEZ durchschnittlich 15 zusätzliche Populationsverdopplungen leisten können. Dadurch ist es möglich 3×10^4 -fach mehr upcyte[®] mvEZ eines Spenders zu generieren verglichen mit den korrespondierenden Primärzellen. Die gute und ausreichende Verfügbarkeit der Zellen macht sie interessant für die Standardisierung von *in-vitro* Testsystemen, ebenso können die Zellen zur Prävascularisierung von Transplantaten eingesetzt werden. Upcyte[®] mvEZ zeigen zahlreiche Primärzellmerkmale, die in der Literatur beschrieben sind. Im konfluenten Zustand zeigen sie die für primäre mvEZ spezifische pflastersteinartige Morphologie. Darüber hinaus exprimieren upcyte[®] mvEZ typische Endothelzellmarker wie CD31, vWF, eNOS, CD105, CD146 und VEGFR-2 vergleichbar zu primären mvEZ. Eine weitere endothelzellspezifische Eigenschaft ist die Bindung von *Ulex europaeus agglutinin I* Lektin an die alpha-L-Fucose enthaltene Kohlenhydratstrukturen von mvEZs. Auch hier wurden upcyte[®] Zellen mit primären mvEZ verglichen und zeigten die hierfür charakteristischen Strukturen. Zusätzlich zu Morphologie, Proliferationskapazität und endothelzellspezifischen Markern, zeigen upcyte[®] mvEZ auch mehrere funktionelle Eigenschaften, welche in primären mvEZ beobachtet werden können, wie beispielsweise die Aufnahme von Dil-markiertem acetyliertem Low Density Lipoprotein (Dil-Ac-LDL) oder die Fähigkeit den Prozess der Angiogenese zu unterstützen. Darunter versteht man die Ausbildung von kapillarähnlichen, verzweigten Strukturen auf einer Basalmembranmatrix sowie die Fähigkeit zur Migration. Zusätzlich bilden Sphäroide aus upcyte[®] mvEZ dreidimensionale luminäre Zellformationen in einer Kollagenmatrix aus. Diese Charakteristika zeigen den quasi-primären Phänotyp der upcyte[®] mvEZs. Upcyte[®] mvEZ sind darüber hinaus äußerst robust in der Handhabung, d.h. die Zellen wachsen auf unbeschichteten Zellkulturschalen, sind kryokonservierbar und benötigen nur 5% fötales Kälberserum im Kulturmedium. Upcyte[®] mvEZ zeigen jedoch im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien, die ähnlich gut handhabbar sind, kein Wachstum im Softagar, stellen ihre Proliferation nach 20-40 Populationsverdopplungen ein und haben keine reduzierte Expression von REIC/Dkk, einem Schlüsselmolekül, welches in Zelllinien herunterreguliert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in-vitro* Testsystem als Alternative zum Tierversuch entwickelt. Das Angiogenese Tube Formation Kit wurde mit Hilfe der upcyte[®] mvEZ etabliert und standardisiert. Mithilfe dieses Kits können Substanzen identifiziert werden, die pro- oder anti-angiogene Wirkung besitzen. Pro-angiogene Faktoren werden für die Wundheilung oder für die Verbesserung der Gefäßneubildung bei Transplantationen benötigt. Anti-angiogene Faktoren finden vor allem in der Krebstherapie Anwendung, um die Vaskularisierung eines Tumors zu unterbinden. Das Kit liefert schnelle, reproduzierbare Ergebnisse, ist einfach in der Handhabung und ermöglicht die parallele Untersuchung mehrerer Substanzen.

Upcyte[®] mvEZ stellen darüber hinaus eine neuartige mögliche Zellquelle für die Generierung prävaskularisierter Trägermaterialien im Tissue Engineering dar. In der vorliegenden Arbeit konnte die Wiederbesiedlung der biologisch vaskularisierte Matrix (BioVaSc) mit upcyte[®] mvEZ vergleichbar zu primären mvEZ gezeigt werden. Die biologisch vaskularisierte Matrix basiert auf einem azellularisierten Schweinedünndarmsegment mit intaktem Gefäßsystem inklusive arteriellem Zufluss sowie venösem Abfluss. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen I und III. Die BioVaSc kombiniert die Vorteile eines erhaltenen Gefäßsystems mit den Vorteilen der Verwendung einer azellularisierten Matrix aus natürlichen Bestandteilen. Das erhaltene, mit upcyte[®] mvEZ wiederbesiedelte Gefäßsystem steht zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und zum Abtransport von Stoffwechselprodukten zur Verfügung. Zusätzlich kann das ehemalige Darmlumen der BioVaSc mit einem entsprechenden Zelltyp wie zum Beispiel Hepatozyten besiedelt werden. Die Versorgung dieser Zellen wird durch das Gefäßsystem gewährleistet. Der Einsatz von upcyte[®] mvEZ in der BioVaSc stellt einen neuen, vielversprechenden Ansatz zur Herstellung eines vaskularisierten Modells für Gewebekonstrukte dar, wie beispielsweise einem Leberkonstrukt. Die Verwendung von upcyte[®] mvEZ bieten zusätzlich einige technische Vorteile, wie zum Beispiel ihre bereits erwähnte einfache Handhabung und die Tatsache, dass sie sich ohne Funktionsverlust kryokonservieren lassen. Auch hier sind die bereits oben erwähnten Vorteile wie erweiterte Proliferationsfähigkeit, die gute Verfügbarkeit im Vergleich zu primären mvEZ wichtig. Durch die kürzere Generationszeit der upcyte[®] mvEZ können zusätzlich Kosten und Zeit eingespart werden. Auch die zeit- und kostenintensive Isolation der primären mvEZ muss durch die Verwendung von upcyte[®] mvEZ seltener durchgeführt werden. Humane primäre mikrovaskuläre Endothelzellen können patientenspezifisch aus einer kleinen Haut-Biopsie isoliert werden und anschließend mit der upcyte[®] Technologie behandelt werden. Durch die

Verwendung autologer upcyte[®] mvEZs kann die Gefahr einer Abstoßungsreaktion bei einer Transplantation verringert werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass upcyte[®] mvEZ vergleichbar zu primären mvEZs sind und somit eine geeignete Alternative für die Generierung prävaskulierter Trägermaterialien und Aufbau von *in-vitro* Testsystemen darstellen. Darüber hinaus wurde ein neues, innovatives System für die Generierung einer perfundierten, mit Endothelzellen wiederbesiedelten Matrix für künstliches Gewebe *in-vitro* entwickelt. Ergebnisse aus dieser Arbeit durchliefen 2012 erfolgreich den Peer-reviewed Prozess des Journal Tissue Engineering Part C und wurden mit dem Titel „Upcyte microvascular endothelial cells repopulate decellularized scaffold“ veröffentlicht.

Summary

The scope of tissue engineering includes researching mechanisms underlying the function of different types of tissue, as well as the development of alternative strategies for the treatment of organ failure or organ loss. Due to the acute shortage of donor organs, tissue engineering continuously gains more importance. Tissue engineering research is a rather new discipline and combines engineering with biological science. It generates *ex-vivo* bioartificial transplants, which reconstitute or replace the organ function *in-vivo*. Furthermore, tissue engineering is applied to generate bioartificial long-term tissue models, which mimics the physiological constitution of the human body and which thus can be used as *in-vitro* test system. One of the critical aspects of tissue engineering is the adequate supply of cells with nutrition and oxygen. Bioartificial tissue up to a thickness of 200µm can be supplied sufficiently via diffusion. Thin and avascular structures, such as cartilage and skin, have already been successfully transplanted. For thicker transplants, the supply of cells, only via diffusion is not sufficient. For this purpose, mechanisms and strategies for pre-vascularization of artificial tissue constructs need to be developed in order to ensure the supply of nutrition and oxygen to the inside of a transplant from the beginning. An important part of pre-vascularization is angiogenesis. It is the core physiological process for a successful vascularization for pre-vascularization of transplants, respectively *in-vitro* models. Thereby, the selection of a suitable cell source is crucial, as these cells form the basis of angiogenesis. Microvascular endothelial cells (mvEC) are an important part of angiogenesis. Their cell function must be ensured, so that the artificial tissue construct is able to carry out its physiological function.

Using human primary mvEC is critical due to the quick loss of their endothelial cell marker *in-vitro* but their limited availability and capacity of proliferation presents a problem. The number of primary cells from a single isolation is limited and most of the time not sufficient to populate scaffolds in order to achieve a vascularization. Additionally, the number of cells is also not sufficient for setup a standardized *in-vitro* test system. Upcyte[®] technology provides an approach to solving this problem. This work focused on the generation of upcyte[®] mvEC as alternative to primary mvEC. It was shown that cells treated with upcyte[®] technology have an enhanced capability of proliferation, resulting in 15 additional population doublings, compared to primary mvEC. Thus, it is possible to generate 3x10⁴-fold more upcyte[®] mvEC

from one donor compared to corresponding primary cells. The sufficient cell availability is important for the standardization of *in-vitro* test systems, as well as the usage for pre-vascularization of transplants. Upcyte[®] mvEC show many primary cell-like characteristics, which are described in literature. In the confluent state, upcyte[®] mvEC show a primary cell-specific cobblestone-like morphology. Furthermore, upcyte[®] mvEC express typical endothelial cell markers, such as CD31, vWF, eNOS, CD105, CD146 and VEGFR-2, at a similar level to primary mvEZ. An additional endothelial cell-specific attribute is the linkage of *Ulex europaeus agglutinin I* lectin to carbohydrate-structures of mvEC, which contain alpha-L-fucose. These data showed that there was a good comparison between the characteristics of upcyte[®] and primary mvEC. In addition to morphology, proliferation capacity and endothelial cell-specific markers, upcyte[®] mvEC showed functional characteristics, which are also observed in primary mvEC. Examples include the uptake of Dil-marked acetylated low density lipoprotein (Dil-Ac-LDL) and the ability to support the process of angiogenesis. This comprises the formation of capillary-like, branched structures on a basal membrane matrix, as well as the ability to migrate. In addition, spheroids formed from upcyte[®] mvEC formed three dimensional luminal cell formations in a collagen matrix. These characteristics show the quasi-phenotype of upcyte[®] mvEC. Moreover, upcyte[®] mvEC are robust during the handling of the cells: the cells grow in uncoated cell culture dishes; are cryopreservable; and require only 5% fetal calf serum in the culture medium. In contrast to immortalized cell lines, which are also simple to handle, upcyte[®] mvEC do not grow in soft agar, stop dividing after 20-40 population doublings and show no reduced expression of REIC/Dkk, a key molecule which was originally found to be down-regulated in human immortalized cells and tumor-driven cell lines.

In the course of this work, an *in-vitro* test system was developed as an alternative to animal experiments. The angiogenesis formation kit was established and standardized using upcyte[®] mvEC. The kit enables the identification of substances exhibiting pro- or anti-angiogenic effects. Pro-angiogenic factors are needed for wound healing and the improved vascularization of transplants. Anti-angiogenic factors are used especially in cancer therapy, in order to circumvent the vascularization of a tumor. The kit yields fast and reproducible results, is easy to handle and allows the analysis of multiple substances in parallel.

Upcyte[®] mvEC also represents a new promising cell source for the generation of pre-vascularized scaffolds in the tissue engineering context. This work has shown that a biological vascularized matrix can be re-populated with upcyte[®] mvEC, achieving similar results to a re-population by primary mvEC. The biological vascularized matrix is based on an decellularized segment of a pig intestine, with an intact vascular system, including arterial inflow and venous outflow. The matrix consists mainly of collagen I and III. The BioVaSc combines the benefits of a conserved vascular system with the advantages of using a decellularized matrix made of natural components. The conserved and upcyte[®] mvEC re-populated vascular system is used to ensure nutrition and oxygen supply, as well as the removal of metabolic waste. Additionally, the gut lumen of the BioVaSc can be re-populated with other appropriate cell types, for example with hepatocytes. The vascular system provides for the supply of these cells. The use of upcyte[®] mvEC in BioVaSc represents a promising new approach for producing a model for vascularized tissue constructs, such as a liver constructs. Using upcyte[®] mvEC also offers additional technical advantages, such as their simplicity and the fact that they can be cryopreserved without loss of function. Benefits such as enhanced ability to proliferate and the easy availability, compared to primary mvEC, are also important. Due to the shorter generation time of upcyte[®] mvEC, additional costs and time can be saved. Also, the time- and cost-intensive isolation of the primary mvEC can be markedly reduced when using upcyte[®] mvEC. For example, human primary mvEC cells can be isolated via a small patient-specific skin biopsy and subsequently treated with the upcyte[®] technology. By using autologous upcyte[®] mvEC, the risk of rejection can be reduced during a transplantation.

In summary, this work focussed on the development of upcyte[®] mvEC which were shown to be comparable to primary mvEC and therefore represent a sufficient and reliable alternative cell source for the generation of pre-vascularized scaffolds and the construction of *in-vitro* test systems. Moreover, a new and innovative system for the generation of a perfusable, endothelialized matrix for artificial tissue *in-vitro* has been developed. Results of this study pass the peer-reviewed process of Tissue Engineering Part C in 2012 under the title „Upcyte microvascular endothelial cells repopulate decellularized scaffold“.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BioVaSc	Biological Vascularized Scaffold
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
DAPI	4`6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
Dil	1,1`-Dioctadecyl-1-3,3,3`,3`-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat
Dil-Ac-LDL	Dil-markiertes acetyliertes Low Density Lipoprotein
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
EZ	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz Acitvated Cell Sorter
FBS	Fetal bovine serum

Abkürzungsverzeichnis

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
H ₂ O	Wasser
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
M	Molar
min	Minute
Mio	Millionen
MM	Mastermix
mM	millimolar
mm	Milimeter
ml	Mililiter
MOI	Multiplicity of Infection
mvEZ	mikrovaskuläre Endothelzellen
MTT	3-(4,5-Dimehtylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

P	Passage
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PV	Populationsverdopplung
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl phosphate
s.	siehe
TE	Tissue Engineering
ü.N.	über Nacht
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VEGF	Vascular Endothelial growth factor
vWF	Von- Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	I
Zusammenfassung/ Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	IX

1. Einleitung	1
1.1 Tissue Engineering	1
1.1.1 Trägermaterial im Tissue Engineering	4
1.1.2 Bioreaktoren im Tissue Engineering	6
1.1.3 Zellquellen im Tissue Engineering	8
1.1.4 Vaskularisierung im Tissue Engineering.....	11
1.1.5 Angiogenese	13
1.1.6 Aufbau des Endothels	15
1.2 Methoden zur Stimulation der Proliferation von primären Zellen	21
1.2.1 Immortalisierung.....	21
1.2.2 Upcyten.....	22
1.2.3 Wachstumsfaktoren	23
1.3 Ziel der Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Chemikalien und Zusätze	27
2.1.2 Biopsiematerial	28
2.1.3 Zellen	28
2.1.4 Zellkulturmedium, Puffer und Lösungen	29
2.1.5 Antikörper.....	32
2.1.6 Kits.....	32
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	33
2.1.8 Geräte.....	33
2.1.9 Primer	34
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Isolation von mikrovaskulärer Endothelzellen (mvEZ) aus humaner adulter Haut.....	35
2.2.2 Kultivierung der Zellen als Monolayer-Kultur (2D)	36
2.2.3 Gentransfer mittels lentiviraler Vektoren	39

2.2.4	Charakterisierung der upcyte [®] mvEZs	44
2.2.5	3D-Kultivierung der Zellen	55
3.	Ergebnisse.....	62
3.1	2D- Kultivierung und Charakterisierung der mikrovaskulären Endothelzellen	62
3.1.1	Isolation primärer mikrovakulärer Endothelzellen.....	62
3.1.2	Transduktionseffizienz	63
3.1.3	Upcyte [®] Technologie.....	67
3.1.4	Charakterisierung.....	71
3.1.5	Abgrenzung zu Zelllinien	85
3.2	3D- Kultivierung und Wiederbesiedlung des Gefäßsystems der BioVaSc mit upcyte [®] mvEZ	88
3.2.1	Wiederbesiedlung der vaskularisierten Matrix mit upcyte [®] mvEZ88	
3.2.2	Mikroskopische Bewertung der Besiedlung nach Versuchsende	89
3.2.3	Immunhistologische Bewertung der Besiedlung.....	92
3.2.4	Histologische Analyse der Besiedlung mittels Fluoreszenzmarkierung der Zellen	93
4.	Diskussion.....	95
4.1	2D-Kultivierung und Charakterisierung der Zellen	96
4.1.1	Zellisolation	96
4.1.2	Transduktionseffizienz	97
4.1.3	Charakterisierung der upcyte [®] mvEZ.....	98
4.2	Abgrenzung zu Zelllinien	105
4.3	Kultivierung der upcyte [®] mvEZ in der biologisch vaskularisierten Matrix	106
4.4	Einordnung der upcyte [®] mvEZ in den aktuellen Stand des Tissue Engineering	110
5.	Ausblick	118
6.	Literaturverzeichnis	120
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	141
8.	Danksagung..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	

1. Einleitung

1.1 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet zwischen Ingenieuren, Medizinern und Naturwissenschaftlern. Im Fokus des Tissue Engineering steht die Klärung der Mechanismen, die der Funktionen verschiedener Gewebearten zu Grunde liegen. Ziel ist die Herstellung von biologischem Ersatzgewebe mit gewebespezifischer Funktion zur Verbesserung oder dem Ersatz von geschädigten Organen- bzw. dessen Integration ins Empfängerewebe (siehe Abb. 1) (Langer & Vacanti 1993; Anon 2008). Zur Herstellung des biologischen Ersatzgewebes sollten im Idealfall patienteneigene Zellen verwendet werden, da diese Zellen bei einer Transplantation vom Immunsystem nicht als fremd erkannt werden. Eine entscheidende Rolle spielt die Isolation, Kultivierung und Expansion von primären Zellen aus kleinen Spenderbiopsien. Die Zellen werden auf eine Matrix aufgebracht und ordnen sich zu einem Ersatzgewebe an. Diese 3D-Kultivierung fördert die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte und ist daher entscheidend für die Gewebeentwicklung und für die Aufnahme von gewebetypischen Funktionen der Zellen (Krieg & LeRoy 1998).

Tissue Engineering rückt immer mehr in den Fokus der Öffentlichkeit, da weltweit ein akuter Organmangel herrscht. Alleine in Deutschland warten ungefähr 12.000 Menschen auf ein Spenderorgan. Allerdings wurden 2011 gerade einmal 1.900 Organe transplantiert (Anon 2012). 10.100 Menschen warteten daher erfolglos auf ein Spenderorgan. Pro Tag sterben drei Menschen, die auf der Warteliste für eine Organspende stehen, da kein passendes Spenderorgan rechtzeitig zur Verfügung steht (Anon 2012). Auch neue chirurgische Methoden, wie die Transplantation von Geweben aus lebenden Spendern oder die Teilung von Organen, können den immer steigenden Bedarf nicht decken. Die Herstellung komplexer bioartifizieller Organe stellt auch in Zukunft eine große Herausforderung dar. Jedoch ist es bereits jetzt schon möglich, einfache Gewebestrukturen *ex-vivo* herzustellen. Dabei ist es besonders wichtig, dass eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Gewebekomplexe gewährleistet ist. Gerade bei *ex-vivo* hergestellten Transplantaten, ist die ausreichende Versorgung der Zellen in tieferen Lagen des Konstrukts oft unzureichend (Walles et al. 2003). Es kommt zum Absterben der Zellen im Inneren des Konstrukts. Das

Problem kann durch Vaskularisierung des bioartifiziellen Ersatzgewebes gelöst werden. Die Ersatzgewebe können dem Patienten einerseits implantiert werden, andererseits auch als externe bioartifizielle Organsysteme dienen (Mazariegos et al. 2002). Beide Möglichkeiten sollen die ausgefallene Organ- bzw. Gewebefunktion unterstützen. Dabei sind die Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Wechselwirkungen (Griffith 2002), die Ausrichtung der Zellen in der Matrix (Skalak & Price 1996), die Vaskularisierung des bioartifiziellen Ersatzgewebes (Skalak 1994) und die Modifizierung der Matrix (Hutmacher, 2001) von entscheidender Bedeutung für den Erfolg des Tissue Engineering Ansatzes.

Im Fokus des Tissue Engineerings steht jedoch nicht nur der *in-vivo* Einsatz, sondern auch der Aufbau von *in-vitro* Testsystemen. Ziel ist es dabei, Tierversuche zu vermindern und Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu entwickeln (Liebsch et al. 2011). Zum Beispiel ist seit 2004 in der Europäischen Union die Durchführung von Tierversuchen für die Entwicklung von Kosmetika verboten. Daher müssen Alternativen zur Überprüfung der Kosmetika auf Unbedenklichkeit für den Menschen entwickelt werden. Eine weitere Verschärfung der EU-Kosmetikrichtlinie (2003/15/EU) sieht vor, dass ab 2013 keine fertigen Kosmetika aus Drittländern, die in Tierversuchen getestet wurden, in der EU vermarktet werden dürfen. *In-vitro* Tissue Engineering Modelle könnten den Einsatz von Tierversuchen in der präklinischen Forschung stark reduzieren. In der Krebsforschung werden zum Beispiel viele neue Substanzen für den therapeutischen Einsatz getestet und daher bieten sich gerade hier *in-vitro* Testsysteme für die erste Beurteilung der Wirkung der Substanzen an (Maurer 1994). Weitere Vorteile gegenüber Tierversuchen sind die geringeren ethischen Bedenken, das Kosteneinsparungspotential und, da mit menschlichen Zellen gearbeitet wird, die bessere Übertragbarkeit auf den Menschen (Schanz et al. 2012). Die Forschung im Bereich Tissue Engineering umfasst beinahe jedes Organ oder Gewebe zur Generierung von Ersatzgewebe, wie z. B. Leber-, Herz-, Augen-, Meniskus- und Knochentransplantate (Terai et al. 2002; Tran et al. 2003; Binder et al. 2002; Malvankar & Khan 2012; Nguyen et al. 2012). Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung von Haut- und Knorpeltransplantaten, die schon im klinischen Einsatz sind (Brittberg et al. 2001). Bereits 1981 wurden die ersten Hauttransplantationen durch O'Connor und Kollegen durchgeführt (O'Connor et al. 1981). Prinzipiell ist festzustellen, dass mit zunehmender Komplexität eines Organs, auch die Schwierigkeit der Entwicklung eines bioartifiziellen Ersatzgewebes ansteigt.

Die drei Bausteine der *ex-vivo* Herstellung von bioartifiziellen Ersatzgeweben sind:

1. Funktionelle, gewebespezifische Zellen
2. Trägergerüste, die die 3D-Kultivierung der Zellen ermöglichen und daher zur Funktionsverbesserung beitragen (Scaffold, Matrix)
3. Kulturgefäße, in denen die Zellen auf das Trägergerüst aufgebracht werden können und das Ersatzgewebe *ex-vivo* reifen kann

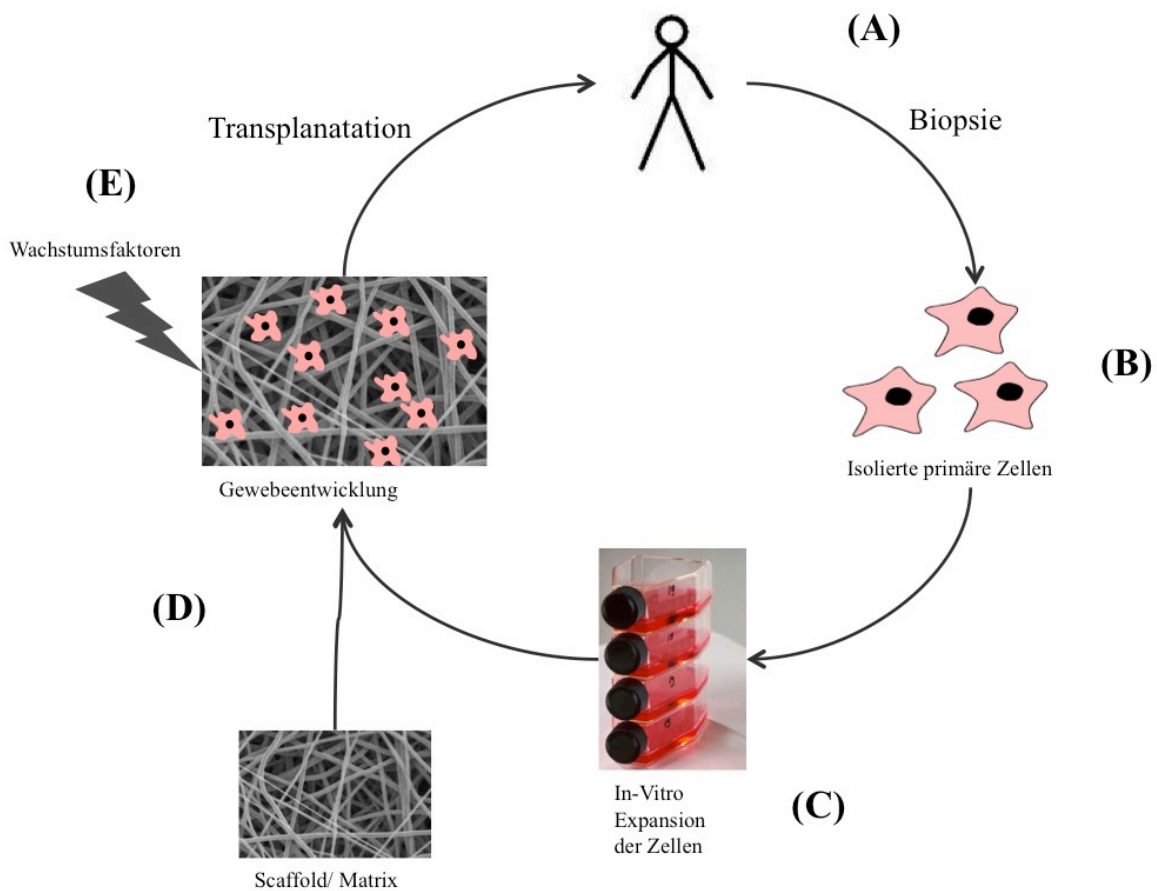


Abbildung 1: Zyklus des Tissue Engineering. (A) Entnahme der Biopsie (B) Isolation der primären Zellen (C) Vermehrung der Zellen (D) Besiedlung des Trägermaterial mit Zellen (E) Gewebeentwicklung mit anschließender Transplantation.

1.1.1 Trägermaterial im Tissue Engineering

Das Zellwachstum, die Zellfunktion und die Gewebedifferenzierung werden stark durch das räumliche Umfeld beeinflusst, so dass das Trägermaterial eine zelltypische Organisation und spezifische Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen unterstützen muss (Strehl & Minuth 2002; Griffith & Naughton 2002; Naderi et al. 2011). Ein Dedifferenzierungsprozess, der zum Funktionsverlust der Zellen führt, kann so verhindert werden. In einer normalen zweidimensionalen Einschicht-Zellkultur fehlt den Zellen oft der Kontakt zur extrazellulären Matrix (EZM) bzw. zu deren Komponenten. Dies führt zu Veränderungen der Genexpression und letztendlich zum Verlust einiger typischer Zellcharakteristika. Daher ist eine Optimierung der Kulturbedingungen primärer Zellen und die des Trägermaterials während der *ex-vivo* Expansionsphase unumgänglich, um die Zellfunktion zu erhalten. Ein Beispiel hierfür sind die Knorpelzellen, die direkt nach der Isolation, dreidimensional in Kollagen bzw. Komponenten der EZM kultiviert werden, um eine Dedifferenzierung zu verhindern (Walles et al. 2004; Dorotka et al. 2005; Cherubino et al. 2003).

Das Trägermaterial hat Einfluss auf die Zellen und leistet einen großen Beitrag zum Gelingen des Tissue Engineering Ansatzes (Stock & Vacanti 2001). Ein Trägermaterial für alle bioartifiziellen Gewebe gibt es daher nicht. Das Material muss immer für den jeweiligen Bestimmungsort und Zelltyp optimiert werden, um den Differenzierungsstatus optimal zu erhalten. Bei der Generierung von Knochen muss zum Beispiel die Synthese von extrazellulären Hartmaterial durch das Trägermaterial unterstützt werden (Nguyen et al. 2012). Das Ersatzmaterial darf weder allergen, noch zytotoxisch sein, oder immunologische Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Es sollte stattdessen biokompatibel, benetzbar und bioresorbierbar sein und eine hydrophile Oberfläche besitzen, d.h. nach der Implantation langsam degradiert werden und durch körpereigene Komponenten bzw. Strukturen ersetzt werden (Griffith & Naughton 2002). Für Tissue Engineering Anwendungen wurde eine Vielzahl an verschiedenen Ausgangsmaterialien (synthetische und biologische Trägermaterialien) und Formen des Trägermaterials (Schwämme, Gele, faserige Röhren, Folien, Vlies usw.) entwickelt.

Synthetisch hergestellte Trägermaterialien:

Die synthetisch hergestellten Trägermaterialien basieren auf Polymermaterialien. Für die Herstellung von bioartifiziellen Matrices existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten. Polyurethane sind zum Beispiel für ihre elastische Komponente, Poly (Vinyl-Alkohole) für ihre hydrophile Eigenschaft und Poly (Methyl-metacrylate) für ihre physikalische Festigkeit und Transparenz bekannt (Anon 2008). Bei der Herstellung einer biodegradierbaren Trägerstruktur, sind hingegen Polylactide (PLA), Polyglycolide (PGA), Poly (lactide-co-glycolide) (PLGA), Polyanhydride oder Polyorthoester zu nennen (Griffith & Naughton 2002; Stock & Vacanti 2001). Ein entscheidender Punkt für das Zellwachstum bzw. für die Gewebeentwicklung ist die Porengröße und die Verbindung zwischen den Poren des Trägermaterials (Naderi et al. 2011; Martin et al. 2004). Das Ziel ist es, synthetische Trägermaterialien, die die Zellfunktion und die Vaskularisierung unterstützen, zu generieren. Zudem sollen sie den Sauerstoffgehalt besser regulieren, den Mediumfluss bzw. Blutfluss optimieren, die Zelladhäsion verbessern, sowie die Angiogenese induzieren (Liu & Chen 2005). Ein Nachteil synthetischer Trägermaterialien ist, dass sie häufig bei der Degradation giftige Abbauprodukte bilden. Somit muss eine stetige Versorgung der Zellen mit neuen Nährstoffen und Sauerstoff, sowie der Abtransport der giftigen Abbauprodukte, gewährleistet sein.

Biologische Trägermaterialien:

Als biologisches Trägermaterial sind einerseits Materialien aus natürlichen Polymeren (z. B: Kollagen, Glykosaminoglykane und Fibronectin), andererseits zellfreie menschliche (allogene) oder tierische (xenogene) Matrices etabliert (Stock & Vacanti 2001). Kollagen I befindet sich zum Beispiel schon als biologische Trägersubstanz für Knorpelzellen in der klinischen Anwendung (Kreuz et al., 2011; Kreuz et al., 2009). Ein Nachteil bei der Verwendung natürlicher Polymere, ist die fehlende Garantie der notwendigen 3D-Struktur und einer physiologischen Versorgung durch Blutgefäße. Hingegen bietet die Verwendung von nativen zellfreien Matrices den Vorteil, dass die natürliche 3D-Struktur der EZM erhalten bleibt (Hoshiba et al., 2010). Die allogenen und xenogenen Matrices müssen vor ihrem Einsatz vollständig von ihren ursprünglichen Zellen befreit sein (Meezan et al., 1975). Die zellfreien Matrices finden bis dato vor allem ihre Anwendung im Bereich des

kardiovaskulären Tissue Engineerings von Herzklappen (Bader et al. 1998) und Blutgefäßen (Amiel et al., 2006; Robotin-Johnson et al., 1998). Biologische Matrices besitzen sehr gute Eigenschaften hinsichtlich Adhäsion, Proliferation und Migration. Allerdings bergen sie auch, durch die Verwendung von xenogenen Matrices mit „fremden“ EZM-Komponenten und der Übertragung pathogener Viren, die Gefahr einer Abstoßungsreaktion (Fodor 2003). Bei diesen Ansätzen ist auch das Problem der mangelnden Zellversorgung im Inneren von Trägermaterialien bei Transplantaten, die dicker als 200 µm sind, noch nicht gelöst. Das am Fraunhofer IGB Stuttgart entwickelte biologisch vaskularisierte Scaffold (BioVaSc) könnte möglicherweise das Problem der mangelnden Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff lösen (Mertsching et al. 2005). Die BioVaSc kombiniert den Vorteil eines Gefäßsystems zur physiologischen Versorgung der Zellen, mit den Vorteilen eines biologischen Trägermaterials. Als Matrix dient ein azellularisiertes Schweinedünndarmsegment mit intaktem Gefäßsystem.

Die Modifizierung von Oberflächen der Trägermaterialien ist eine Weiterentwicklung. Hierbei sollen die Kultivierungsbedingungen für die Zellen verbessert werden. Durch das Beschichten der Trägermaterialien, z. B. mit Nano-Diamantpartikeln, wird eine bessere Adhäsion von Zellen erreicht (Kloss et al. 2007; Lechleitner et al. 2008). Auch die Beschichtung einer azellularisierter Matrix mit dem pro-angiogenetischen Faktor CCN-1, verbessert die Zelladhäsion von humane Nabelschnur-Endothelzellen HUVEC (Bär et al. 2010). Das Aufbringen von Integrinen oder Rezeptorkomponenten der EZM sind weitere Möglichkeiten. Außerdem besteht die Möglichkeit, Trägermaterialien so zu konstruieren, dass sie Wachstumsfaktoren abgeben und somit die Differenzierung, Proliferation und Migration der Zellen beeinflussen (Griffith & Naughton 2002).

1.1.2 Bioreaktoren im Tissue Engineering

Bioreaktoren sind Gefäße für die dreidimensionale Kultivierung unterschiedlicher Zellen und Gewebe, unter physiologisch ähnlichen Bedingungen. Für den Aufbau von bioartifiziellen Gewebetransplantaten und Testsystemen ist es wichtig, dass die zellspezifischen Eigenschaften erhalten bleiben. Im Bioreaktorsystem werden diese Bedingungen computergesteuert und computerüberwacht aufrechterhalten (Hutmacher & Singh 2008;

Mertsching & Hansmann 2009) . Diese Einstellungen sollen den Bedingungen am späteren Einsatzort im Körper stark ähneln. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Medienfluss, Rotations-, Dehnungs- und Pulsationsstress einen positiven Effekt auf den Erhalt zellenspezifischen Eigenschaften bzw. auf die Aufbau bioartifizieller Gewebesysteme haben (Ratcliffe & Niklason 2002).

Die ersten einfachen Bioreaktorsysteme pumpen lediglich das Kulturmedium über die Zellen (Griffith & Naughton 2002). Die nächste Generation konnte bereits Druck und Scheranspruch, sowie eine gepulste Flussrate kontrollieren (Griffith & Naughton 2002). Definierter mechanischer Stress fördert zum Beispiel die Vitalität und Differenzierung von gefäßbildenden Endothelzellen (Kadohama et al. 2007). Bioreaktoren sind hoch technisiert und können neben der Temperatur, auch den Gasaustausch, den pH-Wert, den Druck, den Scherstress und die Flussrate kontrollieren (Martin et al. 2004). Durch diesen künstlichen „Blutkreislauf“, soll die natürliche Umgebung der Zellen *in-vivo* nachgeahmt werden und dadurch die Gewebebildung fördern bzw. erst ermöglichen (Minuth et al. 2004). Einer der kritischsten Punkte bei der 3D-Kultivierung *in-vitro*, ist die unzureichende bzw. ungleichmäßige Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen im Inneren der Trägermaterialien. Über Diffusion können die Zellen maximal 200 µm weit ins Innere der Trägermaterialien versorgt werden (Lightfoot 1974; Rouwkema et al. 2008). Diese Limitierung in der Versorgung der Zellen, kann durch eine dynamische Kultivierung in einem Bioreaktorsystem reduziert werden (Martin et al. 2004). Zur optimalen Versorgung der Zellen im Inneren des Transplantates, sind Gefäßsysteme nötig (Jain et al., 2005). Außerdem werden toxische Abbauprodukte abtransportiert und die Zelle gleichzeitig mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Durch die dynamische Kultivierung der Zellen im Bioreaktor, erreicht man eine höhere Besiedlungsrate und eine einheitlichere Zellverteilung im Vergleich zur statischen Zellkultur (Martin et al. 2004). Im System sollten keine Luftblasen vorhanden sein, da diese die Zufuhr des Kulturmediums reduzieren und durch die erhöhte Oberflächenspannung, das sich bildende Gewebe geschädigt werden könnte. Das Totvolumen des Reaktorsystems, sollte daher so gering wie möglich sein (Minuth et al. 2004).

1.1.3 Zellquellen im Tissue Engineering

Für das Tissue Engineering kommen grundsätzlich vier verschiedene Zellquellen in Frage:

- Primäre Zellen (Autolog, Allogen und Xenogen)
- Stammzellen (Autolog, Allogen und Xenogen)
- Induzierte pluripotente Stammzellen iPS (Autolog, Allogen und Xenogen)
- Zelllinien (Allogen und Xenogen)

Primäre Zellen sind funktionell, haben aber oftmals nur ein eingeschränktes Proliferationspotential und dedifferenzieren sehr schnell (Fodor, 2003; Unger et al., 2002). Von Vorteil ist, dass sie ein geringes tumorigenes Potential aufweisen und sie für ihre Aufgabe spezialisiert sind. Eine Möglichkeit sind autologe primäre Zellen, die dem Patienten durch Biopsien entnommen, *ex-vivo* expandiert und dann reimplantiert werden. Diese Zellen bergen kein Risiko einer Abstoßungsreaktion. Sie sind jedoch nur in begrenzter Anzahl verfügbar bzw. oft *ex-vivo* schlecht oder nicht kultivierbar (Fodor 2003). Hepatozyten oder Nervenzellen vermehren sich zum Beispiel *in-vitro* nicht, wodurch nur eine geringe Anzahl an Zellen eines Patienten für die Generierung eines Transplantates zur Verfügung steht bzw. nur eine geringe Anzahl an Zellen für *in-vitro* Experimente vorhanden ist. Es ist auch nicht möglich, von jedem Gewebe Biopsien zu entnehmen. Für den Aufbau einer Herzklappe, muss für die Isolierung der Zellen auf eine Biopsie von peripheren Venen zurückgegriffen werden, da eine direkte Biopsieentnahme nicht möglich ist (Stock & Vacanti 2001). Autologe Zelltherapien befinden sich bereits im klinischen Einsatz, z. B. bei der Therapie zur Wiederherstellung von Gelenkknorpel (Brittberg et al. 2001; Bentley et al. 2003) oder bei der Behandlung von schweren Brandwunden (Epicel[®]) (Navsaria et al. 1995; Kuroyanagi et al. 1993). Die Verwendung von allogenen Zellmaterial, das entweder von humanen oder xenogenen (tierische Herkunft) Spendern stammt, ist eine weitere mögliche Zellquelle. Jedoch ist der Einsatz der Zellen aufgrund von potentiellen immunologischen Abstoßungsreaktionen nur limitiert möglich und macht somit den Einsatz von Immunsuppressiva notwendig (Fodor 2003). Zusätzlich birgt der Einsatz von xenogenen Zellen die Gefahr der Übertragung von tierischen Pathogenen (Griffith & Naughton 2002). Allerdings gibt es auch hier einige vielversprechende Ansätze zur Behandlung von Diabetes (Tibell et al. 1994) und

neurologischen Erkrankungen (Fink et al. 2000; Deacon et al. 1997; Schumacher et al. 2000). Es gibt bereits auch schon für den Markt zugelassene allogene Gewebepräparate. Apligraf[®] ist ein Hautersatz und kommt bei der Heilung von chronischen Wunden, z. B. bei einem diabetischen Fuß, zum Einsatz (Parenteau et al. 1992). Das besondere hierbei ist, dass das Präparat keine immunologische Reaktion auslöst und somit keine Gabe von Immunsuppressiva nötig macht (Briscoe et al. 1999; Sabolinski et al. 1996). Ein vergleichbares Produkt ist Dermagraft[®] von Smith & Nephew.

Eine weitere Zellquelle stellen die Stammzellen dar. Diese Zellen sind in der Lage, sich nahezu in jeden Zelltyp des menschlichen Organismus zu entwickeln (pluripotent) (Schofield 1979). Sie besitzen ein großes Proliferationspotential. Man unterscheidet zwischen embryonalen Stammzellen und adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen können aus der Blastozyste von Embryonen isoliert werden. Allerdings spielen sie aus ethischen Gründen und aufgrund ihrer geringen Verfügbarkeit für das Tissue Engineering eine untergeordnete Rolle (Levenberg et al. 2002; Griffith & Naughton 2002). Adulte Stammzellen hingegen sind in somatischem Gewebe wie Knochenmark, Blut, Leber, Muskel und Haut vorhanden und somit leichter verfügbar (Naderi et al. 2011). Sie besitzen im Vergleich zu den embryonalen Stammzellen zwar ein geringeres Differenzierungspotential, haben dafür aber auch ein geringeres Risiko für maligne Entartung. Durch die Zugabe von zellspezifischen Wachstumsfaktoren, kann man ihre Differenzierung in verschiedene Zelltypen induzieren. Mesenchymale adulte Stammzellen können z. B. in Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten, Kardiomyozyten, Hepatozyten, Endothelzellen und neuronale Zellen differenzieren (Wang et al. 2011) und sind daher ein viel versprechender Kandidat für die Verwendung in der Regenerativen Medizin. Eine neue und viel versprechende Zellquelle im Tissue Engineering, sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPS). Hierbei handelt es sich um künstlich reprogrammierte somatische Zellen, die dadurch wieder einen embryonalen Stammzell-ähnlichen Phänotyp annehmen. Die Reprogrammierung wird durch von außen angeregte Expression spezieller Transkriptionsfaktoren in den somatischen Zellen angestoßen. iPS-Zellen haben einen vergleichbaren Phänotyp wie embryonale Stammzellen. Sie zeigen vergleichbare Genexpressionen und die Möglichkeit zur Differenzierung in alle drei Keimblätter (Takahashi et al. 2007). Die Vorteile bei der Verwendung von iPS, sind ihre leichte und ausreichende Verfügbarkeit und die fehlende immunologische Reaktion. Erste Erfahrungen wurden im Bereich der Therapie der Sichelzellenanämie und der Parkinson

Erkrankung gesammelt (Nelson et al. 2010). Autologe Zellen von Mäusen mit Sichelzellanämie, wurden in iPS Zellen verändert, das kranke Gen mit einem funktionsfähiges ausgetauscht und wieder transplantiert. Die Mäuse zeigten einen verbesserten pathophysiologischen Phänotyp und die Ergebnisse waren vielversprechend (Hanna et al. 2007). Ähnlich wurden Neuronen, welche aus iPS Zellen generiert wurden, in ein Mausmodell für die Parkinson Erkrankung transplantiert und eine Verbesserung der Symptome beobachtet (Wernig et al. 2008).

Eine weitere interessante Zellquelle für Tissue Engineering, sind die sogenannten Vorläufer- bzw. Progenitorzellen. Diese Zellen stammen von adulten Stammzellen ab, sind bereits weiter differenziert (multipotent) und in ihrer Funktion festgelegt (Stock & Vacanti 2001). Endothelvorläuferzellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und konnten bereits in zwei klinischen Studien zur Behandlung eines Verschlusses der Kranzarterien (Erbs et al. 2005; Lenk et al. 2005) zeigen, dass sie für den Einsatz im Tissue Engineering geeignet sind (Miller-Kasprzak & Jagodziński 2007). Einer der wichtigsten Punkte bei der Verwendung von Stammzellen ist, dass man ihre Differenzierung kontrolliert induziert und den Verlauf überwacht, um eine normal funktionierende differenzierte Zelle zu erhalten. Allerdings stellt die Isolation und Aufreinigung von ausreichender Menge an Stammzellen, iPS und Vorläuferzellen noch eine große Herausforderung dar. Somit ist ihr Beitrag zur Lösung von Problemen im Tissue Engineering noch gering (Stock & Vacanti 2001).

Zelllinien haben theoretisch ein unbegrenztes Proliferationspotential. Somit bergen sie eine große Mutationsgefahr und bilden leicht Tumore. Außerdem sind diese Zellen immortalisiert und auf Grund dessen in ihren Eigenschaften substanziell verändert. Zelllinien sind deshalb als Zellquelle für den *in-vivo* Einsatz im Tissue Engineering ungeeignet, finden aber Verwendung in extrakorporale Systemen. Diese Systeme haben verschiedene Anwendungsbereiche, z.B. als künstliche Herzen, künstliche Nieren oder auch als künstliche Lebern. Prinzipiell gibt es maschinelle oder bioartifizielle Verfahren zur Unterstützung der geschädigten Funktion des Patienten. Die Bioartificial Liver (BAL) ist ein Beispiel für das bioartifizielle Verfahren. Das BAL System ist ein mit beispielsweise HepRG Zellen kombinierter Bioreaktor, welcher Teilfunktionen der Leber übernehmen kann wie Ammoniumelimination, Harnstoffproduktion, Laktatabbau und 6 β -Hydroxylierung von Testosteron (Nibourg et al. 2012; Carpentier et al. 2009).

1.1.4 Vaskularisierung im Tissue Engineering

Eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung von künstlich hergestellten Gewebe- und Organtransplantaten, ist die mangelhafte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Transplantates nach Transplantation in den Patienten (Folkman 1971; Novosel et al. 2011). Es kommt zum Absterben der Zellen im Inneren des Konstrukts. Die Zellen können maximal 200 μm weit durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Colton 1995; Kannan et al. 2005). Die Entwicklung eines künstlichen Gefäßsystems zur Versorgung des Gewebekonstrukts mit Sauerstoff und Nährstoffen ist daher eine der größten Herausforderungen (Rivron et al. 2008; Levenberg & Langer 2004). Vaskularisierung des Gewebes ist außerdem für die Kommunikation, zum Abtransport von Stoffwechselprodukten und zur Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen wichtig. Die Zellen im Inneren des Transplantates können maximal ein paar Stunden ohne Sauerstoff- und Nährstoffversorgung überleben, allerdings dauert es Tage bis ein Gefäßsystem vom Patienten in das Konstrukt wächst (Griffith & Naughton 2002). Die bisherigen Erfolge im Tissue Engineering erzielte man im Bereich von dünnen Konstrukten wie Haut (Kirsner et al. 1998) oder in Konstrukten ohne Gefäßsystem wie z.B. Knorpel (Brittberg et al. 1994). Bei der Herstellung von komplexeren Gewebearten ist aber die Versorgung über ein Gefäßsystem unumgänglich (Rivron et al. 2008). Das Blutgefäßsystem hat einen sehr komplexen Aufbau mit zahlreichen Verzweigungen und verschiedenen Hierarchieebenen, von der Arterie und Vene bis hin zu den kleinsten Kapillaren. Bisher ist es gelungen, große Gefäße mit einem Innendurchmesser über 5 mm synthetisch nachzubauen und mit Zellen zu besiedeln. 2001 gelang es Shinoka und Kollegen, einem 5 Jahre alten Mädchen, erfolgreich die Lungenarterie zu transplantieren. Hierfür wurde ein Polycaprolacton- Polylactidsäure Ko-Polymer Trägerstoff mit einem Durchmesser von 10 mm verwendet und mit autologen Endothelzellen besiedelt (Shin'oka et al. 2001). Auch die Generierung von Gefäßen in mittleren Größen (50-100 μm) ist möglich (Chrobak et al. 2006). Die kleinsten Gefäße haben gerade mal einen Durchmesser von 4-10 μm und bestehen aus einer Einzelschicht an Endothelzellen. Allerdings ist es bisher noch nicht gelungen, ein solches mikrovaskuläres System *in-vivo* aufzubauen. Die Konstrukte bergen stets ein hohes Risiko zur Thrombenbildung, da es zu einer biologischen Reaktion mit den Blut- bzw. Gewebekomponenten kommt (Zhou et al. 2012).

Um ein mikrovaskuläres System in einem Transplantat zu erzeugen, wurden zwei Strategien entwickelt.

1. Kombination von Trägermaterial mit angiogenen Stimuli → Stimulation der Neoangiogenese *in-vivo* (Rivron et al. 2008).
2. *in-vitro* Kombination eines generierten Gefäßsystems mit Gewebe vor der Transplantation → Verbesserung der Zellversorgung (Novosel et al. 2011).

Die Stimulation der Aussprossung neuer Blutgefäße im Patienten hat den Nachteil, dass nach wie vor die Versorgung des Transplantats mit Sauerstoff und Nährstoffen erst nach ein paar Tagen gewährleistet ist und daher für große Gewebekonstrukte nicht praktikabel erscheint. Richardson *et al.* hat gezeigt, dass selbst mit einem Release-System, welches zuerst VEGF zur Stimulation der Gefäßbildung und dann PDGF zur Stabilisierung des Gefäßes mit Hilfe von Perizyten freigibt, eine Vaskularisierung des Transplantats erst nach zwei Wochen auslöst (Richardson et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Neovaskularisierung *in-vivo*, ist das immobilisieren von Proteinen oder Peptiden auf dem Trägermaterial (Rosso et al. 2005; Conconi et al. 2010). Somit liegt der Fokus auf der Entwicklung von *in-vitro* prevaskularisierten Gewebekonstrukten. Diese *in-vitro* künstlich erzeugten Gefäßsysteme sind einerseits für das Tissue Engineering, andererseits auch als Modellsystem für die Testung von Arzneimitteln von großem Interesse. In den vergangenen Jahren wurde in diesem Bereich intensiv geforscht. 1998 entwickelten Black und Kollegen ein Hautäquivalent aus Fibroblasten, Keratinozyten und Humane Nabelvenen Endothelzellen (HUVEC) auf einem Chitosan/Kollagen Trägermaterial. Die Endothelzellen organisierten sich selbst zu tubulären Systemen (Black et al. 1998). L'Heureux und Kollegen entwickelten für die Behandlung von Patienten, die aufgrund einer Komplikation bei der Hämodialyse eine arteriovenöse Fistel brauchten, ein auf autologen Endothelzellen und Fibroblasten basierendes Gefäßtransplantat. Es wurden bereits 10 Patienten erfolgreich damit therapiert (L'Heureux et al. 2007; L'Heureux et al. 2006). Ein weiterer erfolgsversprechender Ansatz für den Aufbau vaskularisierter Testsysteme oder Gewebetransplantate, ist die Verwendung von azellularisierten Matrices mit erhaltenem Gefäßsystem (Mertsching et al. 2005). Diese Matrices bieten mit ihrem arteriellen Zugang und venösen Abgang einen großen Vorteil gegenüber anderen Matrices, da die Zellen von Anfang an optimal über den direkten Anschluss an einen Bioreaktor mit Nährstoffen versorgt werden können.

1.1.4.2 Biologisch vaskularisiertes Scaffold (BioVaSc)

Die biologische vaskularisierte Matrix (BioVaSc) wird aus dem porcinen Dünndarm (Jejunum) isoliert. Das entnommene 10-15 cm lange Darmstück wird mit Natriumdesoxycholatlösung von allen Zellen befreit. Nach der Azellularisierung verbleibt eine Matrix mit intaktem Gefäßsystem (Arterien, Venen und Kapillaren), die hauptsächlich aus Kollagen I besteht (Mertsching et al. 2005). Im Anschluss an die γ -Bestrahlung lässt sich sowohl das Gefäßsystem, als auch das Lumen der BioVaSc mit Zellen wiederbesiedeln (Mertsching et al. 2005; Mertsching et al. 2009). Folglich ermöglicht dieses Trägermaterial einen optimierten Stofftransport durch das intakte Gefäßsystem, den Erhalt der Vitalität und Funktionalität der kultivierten Zellen, sowie die Herstellung größerer Organstrukturen durch die Möglichkeit der Besiedlung des Lumens der BioVaSc mit einem anderen Zelltyp. Außerdem kann durch die Verwendung von patienteneigenen Zellen auf die Gabe von lebenslangen Immunsuppressiva verzichtet werden. Bei einer Transplantation kann das erhaltene Gefäßsystem der BioVaSc mit dem bestehenden Gefäßsystem des Patienten verbunden werden, wodurch das implantierte Gewebestück von Anfang an ausreichend versorgt wird. 2009 gelang es Macchiarini und Kollegen das erste Mal, ein Tracheastück in einen Menschen zu transplantieren (Macchiarini et al. 2004). Ein weiteres Anwendungsgebiet für die BioVaSc ist der Einsatz als Testsystem in der pharmakologischen, toxikologischen, kosmetischen oder auch Grundlagenforschung (Mertsching 2006). Deshalb wurde in den vergangenen Jahren verstärkt an der Entwicklung von humanen vaskulären Testsystemen mithilfe der BioVaSc gearbeitet. Im Fokus stehen Darmtestsysteme (Pusch et al. 2011), Lebermodelle (Linke et al. 2007), Tumortestsysteme (Thude et al. 2008) und Tracheamodelle (Schanz et al. 2009).

1.1.5 Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man die Bildung neuer Blutgefäße in einem adulten Organismus durch Sprossung aus einem bereits vorhandenen Kapillarbett (Folkman & Shing 1992; Carmeliet 2000). Die Bildung neuer Blutgefäße umfasst eine Reihe komplexer Ereignisse und ist grundlegend für die Entwicklung, Regenerierung und Entstehung neuer Gewebe (Folkman & Shing 1992). Die Angiogenese spielt sowohl bei physiologischen Prozessen, wie z.B.

Wundheilung oder weiblicher Reproduktionszyklus, als auch bei pathologischen Prozessen wie zum Beispiel der Tumorentstehung (Folkman 1971) oder der diabetischen Retinopathie (Tremolada et al. 2012; Campochiaro 2004) eine große Rolle (Griffioen & Molema 2000; Maragoudakis 2000). Bei physiologischen Prozessen ist die Angiogenese streng reguliert, nur für kurze Zeit aktiviert und anschließend wieder komplett inaktiviert.

Angiogenese ist ein intensives Zusammenspiel von Zellen, löslichen Faktoren wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixkomponenten (Patan 2004; Adams & Alitalo 2007). Durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren, wie etwa Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und durch Vasodilation (Carmeliet 2000; Folkman & Shing 1992), kommt es zuerst zur angiogenen Aktivierung der Gefäßendothelzellen. Die Zellen beginnen durch die Bildung von Matrixmetalloproteinasen und Plasminogen-Aktivatoren ihre umgebende Basalmembran abzubauen (Mignatti & Rifkin 1996). Es folgt die Wanderung der Endothelzellen in das Interstitium. Hierbei entstehen luminäre Zellformationen und Gefäßstümpfe, die sogenannten *vascular sprouts*. Die Endothelzellen beginnen zu proliferieren und das Blutgefäß wächst (Carmeliet 2000). Bei der Ausdifferenzierung und Stabilisierung des fertigen neuen Blutgefäßes, spielen noch glatte Muskelzellen, Perizyten, Fibroblasten und auch extrazelluläre Matrixkomponenten eine zentrale Rolle. Zur Stabilisierung der neuen Blutgefäße muss zunächst die Migration, Proliferation und die Proteolyse der extrazellulären Matrix abgeschlossen sein. Erst dann erfolgt die Rekonstruktion der Basalmembran, der interstitiellen Matrix (Ausprunk & Folkman 1977) und die Anlagerung von Perizyten (Hirschi & D'Amore 1996; Hirschi et al. 2002).

An der Regulation der Angiogenese sind pro- und anti-angiogene Faktoren beteiligt. Kommt es zur Dominanz pro-angiogener Faktoren, führt dies zur Aktivierung des Endothels und zur Bildung von Blutgefäßen (Iruela-Arispe & Dvorak 1997). In den vergangenen Jahren wurden viele pro- und antiangiogene Faktoren identifiziert und können heute rekombinant hergestellt werden. Die Faktoren können verwendet werden, um das Einwachsen von Blutgefäßen in *in vitro* hergestelltem Ersatzgewebe zu beschleunigen. Beispielhaft zu nennen sind Wachstumsfaktoren, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), oder unterschiedliche Fibroblast Growth Factor-Varianten (FGF-1 und FGF-2) und Zytokine wie Angipoetin (Ang-1) und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Nomi et al. 2006). Einer der wichtigsten

Stimulatoren der Neovaskularisierung ist VEGF. VEGF ist ein dimeres Glykoprotein, das durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen vorkommt (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆), die an verschiedenen Tyrosinkinase-Rezeptoren der Plasmamembran von Endothelzellen binden. Die beiden Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und KDR (VEGFR-2) sind die zwei häufigsten beschriebenen Rezeptoren auf Endothelzellen und weisen eine hohe Bindungsaffinität für VEGF auf (de Vries et al. 1992). Bindet VEGF diese Rezeptoren an ihrer extrazellulären Domäne, führt dies zur Aktivierung des Signaltransduktionswegs und weiterführend zu einer Expression von Serinprotease, Cysteinprotease und Matrixmetalloproteasen (Adams & Alitalo 2007). Als Folge kommt es zur Permeabilisierung. Zu den anti-angiogenen Faktoren gehören unter anderem Angiostatin (O'Reilly 1997) und Endostatin (O'Reilly et al. 1997), die gerade in der Krebstherapie getestet werden. Beide Substanzen inhibieren die Endothelzellproliferation und dadurch auch die Tumorangiogenese und den damit verbundenen Tumorwachstum. Ein Tumor kann nur wachsen, wenn die Zellen über ein Blutgefäßsystem mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Kerbel 2000). Inhibitoren der Angiogenese sind daher Teil der Krebstherapie (Mackey et al. 2012; Antonarakis & Carducci 2012).

1.1.6 Aufbau des Endothels

Als Endothel bezeichnet man die innerste Zellschicht von Blutgefäßen. Alle Gefäße sind, unabhängig von ihrem Aufbau und je nach Gefäßart unterschiedlich, mit einer einschichtigen Schicht von Endothelzellen (Plattenepithel) ausgekleidet. Das Plattenepithel sitzt einer Basallamina auf (Aird 2007a). Das Blutgefäßsystem gewährleistet die Versorgung des Körpers mit Nährstoffen und sorgt gleichzeitig für den Abtransport von Stoffwechselprodukten in allen Geweberegionen. Grundsätzlich besitzen alle größeren Blutgefäße einen typischen Wandaufbau aus drei Schichten; (I) Tunica intima, Endothel, subendotheliale Schicht, (II) Tunica media, glatte Muskulatur und (III) Tunica adventitia, Bindegewebe. Die kleineren Kapillaren bestehen nur aus dem Endothel. Die Endothelzellen tragen eine negativ geladene Glykosaminoglykanschicht auf ihrer Oberfläche, welche eine wichtige Rolle bei dem Aufbau des kolloidosmotischen Konzentrationsgefälle spielt (Woodcock & Woodcock 2012). Der menschliche Organismus umfasst gut 1×10^{13} Endothelzellen auf einer mit dem Blut in Kontakt tretenden Fläche von 350 m^2 (Pries et al.

2000). Durch genetische Prädispositionen und äußeren Einflüssen der jeweiligen Umgebung, unterscheiden sich die Endothelien sowohl zwischen großen und kleinen Blutgefäße innerhalb einer Spezies, als auch zwischen unterschiedlichen Spezies (Pries & Kuebler 2006).

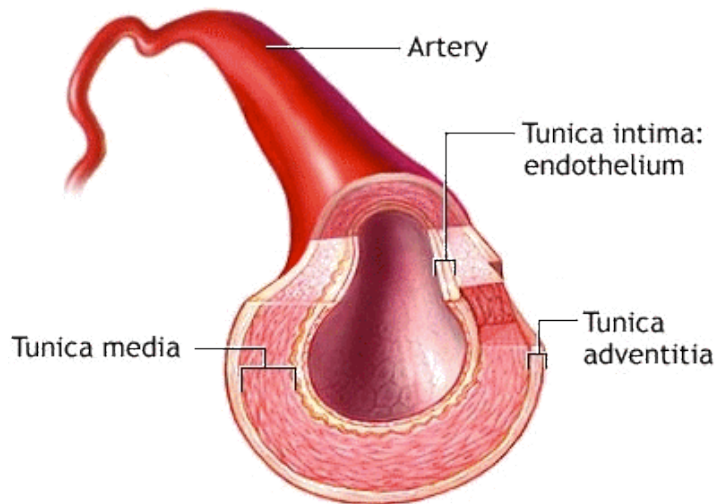


Abbildung 2: Aufbau eines Blutgefäßes. Das Endothel besteht aus drei Schichten. Die innerste Schicht ist die Tunica intima, welche aus einer Einzelschicht an Endothelzellen besteht. Die Tunica media besteht aus glatten Muskelzellen, elastischen und kollagenen Fasern, sowie Proteoglykanen. Die Tunica adventitia ist aus Bindegewebe aufgebaut.

(<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19194.htm>)

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Endothelien: kontinuierlich, fenestriert und diskontinuierlich (Bennett et al. 1959). Kontinuierliches Endothel besitzt stark ausgeprägte Tight Junction. Ein Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe wird durch hochselektive Transportmechanismen kontrolliert und ist, für im Blut gelöste Stoffe, verhältnismäßig undurchlässig. Tight Junctions sind Membranproteine, die sich zu schmalen Bändern zusammen lagern und die Zelle ummanteln. Die Bänder benachbarter Zellen sind eng miteinander verbunden und verschließen so die Zellzwischenräume. Die so gebildete Diffusionsbarriere kontrolliert den Fluss von Molekülen über das Epithel. Zusätzlich erhalten Tight Junctions die Zellpolarität der Endothelzellen und verhindern die freie Bewegung der Membrankomponenten (Schneeberger & Lynch 1984; Bauer et al. 2011). Bei dem fenestrierten Endothel können auch größere Moleküle von bis zu 50-60 nm das Endothel

problemlos passieren. Allerdings besitzt dieses Endothel meist ein semipermeables Diaphragma, welches das passieren von sehr großen Molekülen einschränkt (Pries & Kuebler 2006). Die Basallamina ist hier kontinuierlich ausgebildet. Das diskontinuierliche Endothel ist sehr durchlässig und stellt selbst für Zellen keine Barriere dar. Teilweise besteht kein Zell-Zell Kontakt zwischen den Endothelzellen. Die Basallamina ist nicht oder nicht vollständig ausgebildet.

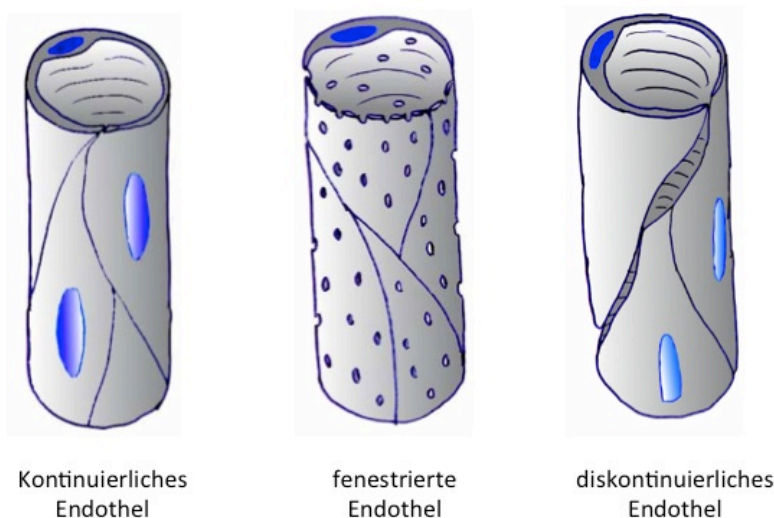


Abbildung 3: verschiedene Gefäßtypen. Kontinuierliches Endothel besitzt eine geschlossene Endothelschicht, erlaubt daher nur den Durchtritt sehr kleiner Moleküle. Fenestriertes Endothel hat zwischen den Endothelzellen, kleine 60-70 nm große Poren, durch die kleinere Proteine hindurchtreten können. Diskontinuierliches Endothel ist sehr durchlässig und die Endothelzellen haben oft keinen Kontakt mehr zueinander. (<http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icv/cardiovascularsystemppt.htm>)

Das Endothel ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Es reguliert als Barriere den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut, ist an der Blutdruckregulation beteiligt und beeinflusst durch die Aktivierung bzw. Hemmung von Gerinnungsprozessen die Fließgeschwindigkeit des Blutes. Weiterhin spielt das Endothel eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen. Hierbei wird es lokal aktiviert, was dazu führt, dass sich bestimmte

weiße Blutkörperchen an das Endothel binden und ihrerseits aktiviert werden. Die aktivierten weißen Blutkörperchen wandern dann durch das Endothel und helfen im unterhalb liegenden Gewebe die Infektionen zu bekämpfen. Die Angiogenese, das ist die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen, ist eine weitere wichtige Aufgabe (Pries & Kuebler 2006). Durch diese große Beteiligung an wichtigen physiologischen Prozessen, hat eine Funktionsstörung meist gravierende Folgen (Aird 2007b). Bei einer Leberfibrose kommt es zum Beispiel zu einer sogenannten Kapillarisierung. Hier wandelt sich eine fenestrierte in eine kontinuierliche Basallamina um und es kann zu Behinderungen von Sauerstoffdiffusion oder Stofftransport kommen (Aird 2007b). Bei einer akuten, durch eine Sepsis ausgelösten Lungenschädigung, kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Lungenendothels und einer induzierten Leukozyten-Transmigration (Andonegui et al. 2003).

1.1.6.1 Endothelzellen

Endothelzellen kleiden einschichtig das Lumen aller Blutgefäße aus und bilden mit Perizyten zusammen die Kapillaren. Das Endothel ist die räumliche Trennung zwischen Intravasal- und Extravasalraum. Endothelzellen haben eine längliche Form und eine Größe von ungefähr $20 \times 50 \mu\text{m}^2$. Kultiviert man sie *in-vitro* bis zur Konfluenz, nehmen sie ihre typische pflastersteinartige Morphologie an (Manconi et al. 2000). Endothelzellen spielen bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie der Entwicklung, Reproduktion von Geweben und Wundheilung (Folkman & Shing 1992), aber auch bei pathologischen Prozessen wie diabetische Retinopathie (Durham & Herman 2011), Tumorinvasion (Carmeliet & Jain 2000) und Gelenkentzündungen (Khan et al. 2010) eine Rolle. Außerdem produzieren Endothelzellen Stoffe zur Regulation des Blutdruckes und zum Aufbau der Basalmembran (Irving et al. 1984). Endothelzellen exprimieren spezifische Endothelzell-Marker, welche eine Identifizierung dieses Zelltyps *in-vivo* und *in-vitro* ermöglicht (Manconi et al. 2000). Die Glykoproteine Von Willebrand Faktor und CD31 sind typische Endothelzellmarker (DeLisser et al. 1994; Jaffe et al. 1973a). Cluster of Differentiation Marker 31 (CD31) wird vorwiegend in dem Bereich von Zell-Zell Kontakten exprimiert. Weitere zellspezifische Expressionsmarker sind eNOS (Dudzinski et al. 2006), CD105 (Gougos & Letarte 1988), CD146 (Li et al. 2003) und VEGFR-1 (Hanahan 1997). Die endotheliale Stickstoffmonoxid

Synthase (eNOS) wird ausschließlich in Endothelzellen exprimiert und ist entweder über einen Lipid-Anker an der Zellmembran oder nach Aktivierung z.B. durch VEGF im Golgi-Apparat zu finden. CD146 und CD105 sind jeweils Oberflächenmarker von Endothelzellen. CD105 ist Bestandteil des TGF- β Rezeptorkomplexes und ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Sanz-Rodriguez et al. 2004). Über die Funktion von CD146 ist noch wenig bekannt, aber das Oberflächenmolekül spielt eine Rolle bei der Verbindung von Endothelzellen mit Aktinfilamenten (Elshal et al. 2005). VEGFR-2 liegt entweder membrangebunden oder löslich vor. Der Rezeptor wird von Vascular Endothelial Growth Factor VEGF gebunden und ist somit an der Vaskulogenese und der Angiogenese beteiligt. Funktionelle Fähigkeiten von Endothelzellen sind u. a. die Aufnahme von 1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat-markierten acetylierten Low Density Lipoprotein (Dil-AC-LDL) (Voyta et al. 1984) und die Ausbildung von kapillarähnlichen, verzweigten Strukturen auf einer Basalmembranmatrix (Arnaoutova et al. 2009; Lawley & Kubota 1989). *Ulex europaeus agglutinin* Lektin bindet spezifisch alpha-L-Fucose Zuckerstrukturen auf Endothelzellen (Jackson et al. 1990). Anhand dieses Sets an verschiedenen Merkmalen kann man die verschiedenen Endothellzelltypen unterscheiden, wobei nicht jeder Zelltyp alle Kriterien erfüllt (Scott & Bicknell 1993). Endothelzellen unterscheiden sich nicht nur zwischen Spezies, sondern auch zwischen Organen innerhalb eines Organismus. Selbst Endothelzellen aus Gefäßen verschiedener Größen exprimieren unterschiedliche Endothelzellmarker (Manconi et al. 2000; Petzelbauer et al. 1993). Es ist bekannt, dass der komplexe Prozess der Angiogenese (siehe Kapitel 1.1.5) sich auf den Bereich des mikrovaskulären Gefäßsystems beschränkt (Jackson & Nguyen 1997).

Das Problem von humanen primären Zellen im Allgemeinen und natürlich auch von humanen mikrovaskulären Endothelzellen ist, ihre geringe Verfügbarkeit und den oft schnellen Verlust ihrer typischen Endothelzellmarker *in-vitro* (Unger et al. 2002). Außerdem stellt die Isolation und die Kultivierung von primären mikrovaskulären Endothelzellen in Reinkultur eine Herausforderung dar (Scott & Bicknell 1993). Es existieren zahlreiche Protokolle zur Isolation von primären Endothelzellen, doch ist das Problem der Kontamination mit Fremdzellen zum Beispiel Fibroblasten immer noch nicht gelöst. Ein weiteres Problem ist ihre sehr geringe Proliferationskapazität und ihr sehr langsames Wachstum (Kim & von Recum 2008). Alternativen zu primären Endothelzellen sind Zelllinien, Endothelvorläuferzellen oder embryonale Stammzellen. Allerdings verlieren Zelllinien ihre zellspezifischen Marker bzw.

zeigen nur wenige Merkmale von primären Endothelzellen und sind daher keine gute Alternative zu der Verwendung von primären Zellen (Unger et al. 2002). Die Isolation von humanen embryonalen Stammzellen ist zwar möglich, aber die Differenzierung ist noch nicht vollständig kontrollierbar, um die Zellen *in-vivo* einzusetzen. Außerdem wirft die Verwendung dieser Zellen ethische Fragen auf (Bajada et al. 2008; Vandewoude & Rollin 2009). Adulte Stammzellen bzw. Endothelvorläuferzellen können einfacher isoliert werden, allerdings ist ihr Differenzierungsstatus oft unklar und die Anzahl an Zellen ist meist sehr gering. Auch herrscht Unklarheit über die Marker die zur Isolierung bzw. Identifikation der einzelnen Vorläuferzelltypen verwendet werden und somit ist die Nomenklatur der Vorläuferzellen oft verwirrend. Hier müssen in Zukunft Anstrengungen in der Auswahl an geeigneten zellspezifischen Marker gemacht werden, die zur Isolation verwendet werden, um eine homogene Zellpopulation zu erhalten (Unger et al. 2002). Zum jetzigen Zeitpunkt stellen Vorläuferzellen keine sichere Alternative zur Verwendung von primären Zellen in Tissue Engineering Fragestellungen dar.

1.2 Methoden zur Stimulation der Proliferation von primären Zellen

1.2.1 Immortalisierung

Unter Immortalisierung versteht man in der Zellbiologie das „Unsterblich-Machen“ von Zellen, also die uneingeschränkte Proliferationsfähigkeit. So generiert man Zelllinien, die sich *in-vitro* unbegrenzt vermehren lassen. Dieses unbegrenzte Wachstum kann man durch verschiedene Techniken erreichen. Eine Möglichkeit ist die Infektion mit Viren, wie dem Epstein-Barr Virus (EBV). Die Zelllinien MEC-1 und MEC-2 wurden aus peripheren Blutzellen einer 64-jährigen Patientin mit chronischem B-Zell-Lymphom generiert. Die Zellen wurden mit dem Zellkulturüberstand der Affenzelllinie B95-8 inkubiert, welcher infektiöse EBV-Partikel enthielt. Die Zellen immortalisierten (Caligaris-Cappio et al. 1987). Die Hybridom-Technik wird z. B. zur Herstellung immortalisierter antikörperproduzierender Zelllinien verwendet (Köhler & Milstein 1975). Eine antikörperproduzierende Zelle (B-Zellen) wird mit einer Myelomzelle (Krebszellen) fusioniert. Es entstehen quasi-unsterbliche Hybride, welche uneingeschränkt die gewünschten Antikörper sezernieren, stark dereguliert sind und somit nicht dem programmierten Zelltod unterliegen. Dadurch ist es möglich die antikörperproduzierenden B-Zellen, die *in-vivo* eine limitierte Lebensdauer aufweisen, auch *in-vitro* effizient zu kultivieren. Ein weiteres Mittel zur Immortalisierung ist die Aktivierung der Telomerase. Hier wird durch Transduktion das hTERT-Gen in die Zelle eingebracht. Dadurch kann eine Telomeraseaktivität induziert werden, was mit einer Verlängerung der Telomere einhergeht und diese konstant gehalten werden kann (Bodnar et al. 1998; Yang et al. 1999). In einer *in-vivo* Situation verkürzen sich die Telomere bei jeder Zellteilung bis zu einer kritischen Länge, ab der sich die Zellen nicht mehr weiter teilen kann und in den Zustand der Seneszenz, einem ruhenden Zustand, übergehen und letztendlich sterben. Die Aktivierung der Telomerase scheint auch ein Schlüsselereignis bei der Entstehung vieler maligner Transformationen zu sein. Die Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex und führt mit Hilfe ihrer RNA-Einheit als Matrize eine *de-novo* Synthese von DNA an die Telomere durch. Die Rekonstruktion der Telomere ermöglicht diesen Zellen somit ein unbegrenztes Wachstum (Shay & Wright 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Generierung von Zellen mit unbegrenzter Proliferationsfähigkeit, ist das Einbringen von viralen Onkogenen, wie z.B. Simian Virus 40 (SV40). Durch den Einsatz viraler Onkogene kann in nahezu allen Zelltypen

ein uneingeschränktes Wachstum erreicht werden. Das Einbringen viraler Onkogene hat einen großen Einfluss auf die Zellphysiologie der Zelllinie und dadurch unterscheiden sie sich von primären Zellen (Unger et al. 2002; Hopfer et al. 1996). Zelllinien haben eine hohe Proliferationskapazität, sind jedoch wegen ihres abweichenden Phänotyps von primären Zellen nicht für den Einsatz im Tissue Engineering geeignet. Zelllinien sind aber ein unabhömmliches Werkzeug für die Aufklärung verschiedener molekularer Prozesse, wie Signalkaskaden oder Differenzierungsprozesse oder auch für biotechnologische Anwendung wie die Antikörperproduktion.

1.2.2 Upcyten

Die upcyte[®] Technologie ist eine Methode zur Generierung von quasi-primären Zellen durch lentivirale Transduktion mit proliferationsfördernden Genen (Braspenning & Holder 2010). Die Technologie ermöglicht die Herstellung von primären Zellen mit erweiterter Proliferationsfähigkeit, ohne den Verlust der zelltypischen Merkmale (Burkard et al. 2012). Diese quasi-primären Zellen haben das Potential für 20-40 Populationsverdopplungen, ohne den Verlust ihrer karyotypischen Stabilität oder den Verlust ihres Phänotyps. Nach diesen zusätzlichen Populationsverdopplungen stellen die upcyte[®] Zellen ihren Wachstum ein und gehen in die Seneszenz über. Somit sind sie von ihrer Proliferationskapazität zwischen primären Zellen (max. 10-25 Populationsverdopplungen) und Zelllinien (>60 Populationsverdopplungen) anzusiedeln. Upcyte[®] Zellen sind genetisch stabil und nicht immortalisiert. Das Arbeiten mit primären Zellen *in-vitro* ist wegen der geringen Ausbeute bei der Isolation und der schnellen Dedifferenzierung oft schwierig. Primäre Zellen haben eine geringe Proliferationskapazität und gehen danach in die Seneszenz (Hayflick & Moorhead 1961; Hahn 2002).

Nach dem Upcyte[®] Prozess werden die Zellen in einer geringen Dichte ausgesät und beginnen zu proliferieren. Die nicht-transduzierten Zellen besitzen weiterhin die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit und verdünnen sich nach und nach aus der Kultur heraus, sodass eine Selektion nicht notwendig ist. Die Erweiterung der Proliferationskapazität unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp. Primäre Hepatozyten teilen sich *in-vitro* nicht, im Gegensatz dazu erreichen upcyte[®] Hepatozyten bis zu 40 Populationsverdopplungen (Burkard et al. 2012).

Generell zeichnen sich upcyte[®] Zellen durch ihre erweiterte Proliferationskapazität, bei gleichzeitigem Erhalt ihrer Primärzellmerkmale, aus. Die Zellen sind einfach in ihrer Handhabung und bieten die Möglichkeit zur Generierung großer Mengen an Zellen eines Spenders. Somit sind upcyte[®] Zellen u. a. besonders geeignet für die Standardisierung von *in-vitro* Testsystemen und für den Einsatz im Tissue Engineering.

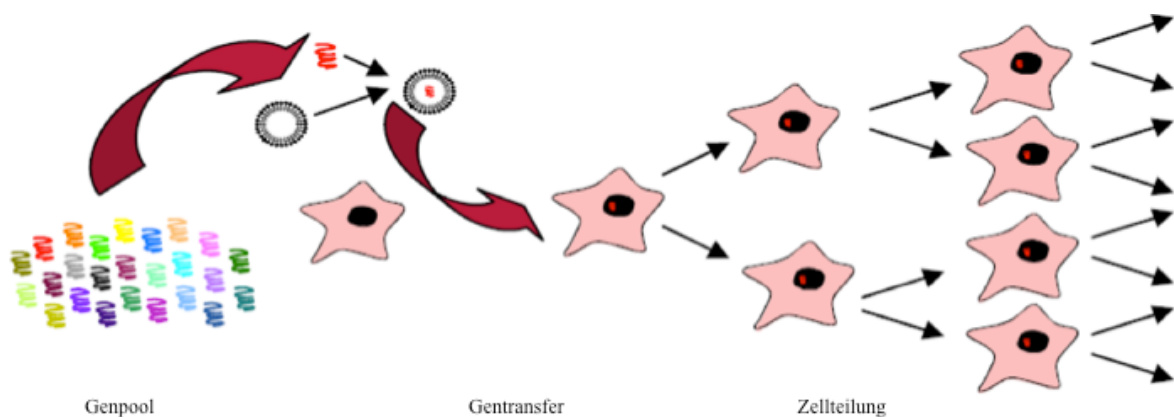


Abb. 4: Schematische Darstellung der upcyte[®] Technologie. Proliferationsfördernde Gene werden mittels lentiviralen Gentransfer auf primäre Zellen übertragen. Die Zellen beginnen zu proliferieren.

1.2.3 Wachstumsfaktoren

Mittels Wachstumsfaktoren, Mitogenen und Hormonen ist es möglich, die natürliche Zellproliferation zu steigern. In kommerziellen Zellkulturmedien sind oft bereits solche Zusätze enthalten, um geeignete Kulturbedingungen zur optimalen Zellproliferation zu schaffen. Die Zellproliferation äußert sich in Zellteilung und Zellwachstum. Für die kontrollierte Teilung sind komplexe Signalkaskaden verantwortlich. Dabei spielen Botenstoffe wie Mitogene und Wachstumsfaktoren, sowie Hormone, als Auslöser der Signalkaskade, eine entscheidende Rolle.

Wachstumsfaktoren sind extrazelluläre Proteine, welche über die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren die Genexpression regulieren und dadurch die Zellproliferation und die Differenzierung beeinflussen (Gospodarowicz & Moran 1976). Der epidermale Wachstumsfaktor zum Beispiel stimuliert die Proliferation einer Reihe von Zelltypen und wird daher oft Zellkulturmedium zugesetzt. Durch die Stimulation des membranständigen EGF-Rezeptors kommt es zur Förderung der Zellproliferation. Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Durch Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Autophosphorylierung und zur Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalkaskaden. Diese variieren zwischen verschiedenen Zelltypen und können zur Zellproliferation, Zelldifferenzierung und zum Überleben der Zelle führen (Carpenter & Cohen 1979; Gospodarowicz et al. 1978). Lektine gehören zu Mitogenen und führen oft zu Agglutinationen, was eine Zellaktivierung und Proliferation zur Folge hat. β -Galactoside spezifische Lektine, wie zum Beispiel *Peanut agglutinin* Lektin, führen zu einer Erhöhung der Proliferation von glatten Muskelzellen und Lungenarterienendothelzellen *in-vitro* (Sanford & Harris-Hooker 1990). Hormone gehören auch zu den Zellproliferationsfördernden Substanzen. Sie regulieren unter anderem den Stoffwechsel und kontrollieren einige physiologischen Parameter, z.B. Glucosekonzentration, um den Organismus an Veränderungen der Umwelt anzupassen. Insulin ist Bestandteil von Zellkulturmedien, da es an der Regulation von Zellwachstum und Proliferation beteiligt ist. Zusätzlich aktiviert es die Transkription von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind (Straus 1984; Desbois-Mouthon et al. 2000). Somit kann man durch die optimale Zusammensetzung des Zellkulturmediums die Proliferation von primären Zellen stimulieren und optimieren.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Generierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (mvEZ) mit erweiterter und schnellerer Proliferationsfähigkeit bei gleichzeitigem Erhalt endothelialer Primärzellmerkmale. Dazu mussten Anforderungen an die Zellen definiert werden, die den Primärzellcharakter zeigen und die dafür nötigen Testmethoden etabliert werden. Außerdem sollten die Zellen leicht in der Handhabung sein. Dies beinhaltet die Kultur auf normalen Zellkulturplatten, die Verwendung von kostengünstigem Zellkulturmedium und die Möglichkeit die Zellen zu kryokonservieren. Es war darauf zu achten, dass keine Immortalisierung der Zellen stattfand.

Die neu generierten quasi-primären mvEZ (upcyte[®] mvEZ) sollen als alternative Zellquelle zur Wiederbesiedlung der biologischen vaskularisierten Matrix (BioVaSc) für *in-vitro* Testmodelle oder Transplantate im Tissue Engineering etabliert werden. Die Basis für den Erfolg einer kompletten Wiederbesiedlung des Blutgefäßsystems der BioVaSc sind die Endothelzellen. Endothelzellen sind eine natürliche Quelle für angiogene Faktoren und Differenzierungsfaktoren und daher als natürlicher Trigger der Gefäßneubildung das Mittel der Wahl. Eine unnatürliche Expression an angiogenen Faktoren kann zu einem deformierten und nicht-funktionellen Blutgefäß führen (Springer et al. 1998). Die üblicherweise für die Wiederbesiedlung der BioVaSc verwendeten primären Zellen besitzen eine geringe Proliferationskapazität, verlieren ihrer typischen Endothelzellmarker *in-vitro* und reichen oft zur Wiederbesiedlung azellularisierter Matrices nicht aus. Zusätzlich sind sie anspruchsvoll in ihrer Handhabung. Diese Probleme gestalten den Einsatz von humanen primären mvEZ sowohl im Tissue Engineering als auch in der Entwicklung von *in-vitro* Testsystemen schwierig. Durch die Etablierung der upcyte[®] Technologie auf mikrovaskulären Endothelzellen soll in der vorliegenden Arbeit ein Lösungsansatz für die komplette Wiederbesiedlung der BioVaSc gefunden werden. Durch die erweiterte Proliferationsfähigkeit der upcyte[®] mvEZs und damit verbundene potentiell nahezu unbegrenzte Anzahl an upcyte[®] mvEZs, soll das Problem der geringen Verfügbarkeit gelöst werden. Weiter mussten Methoden zur Analyse der Wiederbesiedlung der BioVaSc mit upcyte[®] mvEZ etabliert werden. Die Vitalität und der Primärcharakter der upcyte[®] mvEZ nach der Wiederbesiedlung mussten gezeigt werden. Ein wichtiger Punkt bei der Wiederbesiedlung der BioVaSc bzw.

Prävaskularisierung ist die Angiogenese. Sie ist der zentrale physiologische Prozess für eine erfolgreiche Prävaskularisierung von Transplantaten bzw. *in-vitro* Modellen. Mikrovaskuläre Endothelzellen sind maßgeblich an der Angiogenese beteiligt. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit *in-vitro* Zellaassays, zur Beurteilung der Fähigkeit der upcyte® Zellen Angiogenese zu unterstützen, etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Zusätze

Chemikalien	Hersteller/Firmensitz
Accutase	PAA (Cölbe)
Aceton	NeoLab (Heidelberg)
Agarose	AppliChem (Darmstadt)
AlamarBlue [®]	Invitrogen (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V	AppliChem (Darmstadt)
Alexa Fluor [®] 488-Ac-LDL	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Anti [®]	Invitrogen (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	NeoLab (Heidelberg)
Calcein-AM	Sigma- Aldrich (Steinheim)
Collagen, Typ I	BD (Heidelberg)
4`6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI)	Sigma- Aldrich (Steinheim)
Dispase	Sigma- Aldrich (Steinheim)
DMSO	Sigma- Aldrich (Steinheim)
DNaseI	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Eosin	Sigma- Aldrich (Steinheim)
Essigsäure	AppliChem (Darmstadt)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
Ethanol (99,8% p.a)	AppliChem (Darmstadt)
FACS solutions: Clean; Rinse; Flow	BD (Heidelberg)
FBS gold	PAA (Cölbe)
Fluoresceindiacetat	Sigma- Aldrich (Steinheim)
Formaldehyd 37%	AppliChem (Darmstadt)
Gentamycin	Sigma- Aldrich (Steinheim)
Hematoxilin	Dako (Hamburg)
Histofix	Roth (Karlsruhe)
Isomount [®]	LABOnord (Temlemars, Frankreich)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Lipofectamin 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Matrigel [®]	BD (Heidelberg)
Mayer`s Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Methylcellulose	Sigma- Aldrich (Steinheim)
MTT	Appllichem (Darmstadt)
Mowiol	Roth (Karlsruhe)
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid	Appllichem (Darmstadt)

Natriumdesoxycholat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat	Applichem (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Applichem (Darmstadt)
Oligo dT Primer	Biospring (Frankfurt am Main)
Pellet Paint	VWR (Darmstadt)
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Polybren	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNasin [®] , RNase Inhibitor	Promega (Mannheim)
SeaPrep Agarose	Lonza (Basel, Schweiz)
Tryphanblau 0,4%	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<i>Ulex europaeus</i> Lektin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Versene	Invitrogen (Karlsruhe)
VEGF	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.1.2 Biopsiematerial

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen wurden aus Präputienbiopsien und Hautbiopsien von Spendern unterschiedlichen Alters isoliert. Die Operationen erfolgten in der Klinik Charlottenhaus in Stuttgart.

Porcine Jejunumsegmente wurden in der Abteilung für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Tübingen unter sterilen Bedingungen von deutschen Landrasseschweinen (15-25kg) entnommen. Bis zu seiner Aufarbeitung lagerte das Material maximal einen Tag in phosphatgepufferter Salzlösung mit 1% Gentamycin bei 4°C.

2.1.3 Zellen

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
293 FT	Invitrogen (Karlsruhe)
HepG2	DSMZ (Braunschweig)
HUVEC	Cell Systems (Troisdorf)
NHDF	Invitrogen (Karlsruhe)
Primäre mvEZ	PromoCell (Heidelberg)
Upcyte [®] mvEZ	Medicyte (Heidelberg)

2.1.4 Zellkulturmedium, Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Zellkulturmedium

Endothelial Cell Growth Medium ECGM (PromoCell, Heidelberg, C-22120)

Endothelial Cell Growth Supplement/ Heparin	0,4%
Fötales Kälberserum	5%
Epidermal Growth Factor	10 ng/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Endothelzellen Basalmedium	500 ml

Einfriermedium

ECGM Medium	70%
DMSO	10%
FBS	20%

Bezeichnung

Hersteller/Firmensitz

DMEM	PAA (Cölbe)
MEM- Nicht essentielle Aminosäuren	PAN (Aidenbach)
Opti- MEM I	Invitrogen (Karlsruhe)
Quantum 333	PAA (Cölbe)

2.1.4.2 Puffer

PBS⁻, pH 7,2

NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,5 mM
Aqua dest.	Ad 1000 ml

PBS⁺, pH 7,2

NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,5 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,9 mM
Aqua dest.	Ad 1000 ml

PBS⁻/EDTA, pH 7,2

Na-EDTA Salz	140 mM
NaCl	140 mM
KCl	2 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,5 mM
Aqua dest.	Ad 1000 ml

TBS, pH 7,2

Tris/HCl	0,05 mol/l
NaCl	0,1 mol/l
Aqua dest.	Ad 100 ml

2.1.4.3 Lösungen

Antigenmaskierung

Pronaselösung	1% ige Stocklösung (20x): 100 mg Pronase in 10 ml TBS-Puffer lösen und in 0,1 ml Aliquots bei -20°C lagern 0,05%ige Arbeitslösung Pronase (1:20 verd.): 0,1 ml Stocklösung mit 1,9 ml TBS-Puffer verdünnen
---------------	---

Azellularisierungslösung (Az-Lösung)

Natriumdesoxycholat	20 g
Aqua dest.	Ad 500 ml

Calcein-AM Färbelösung

Calcein-AM	1 mg
DMSO	Ad 100 ml
FBS	1,1 ml

Dispase

Dispase	2 mg/ml (1,1U/mg)
Aqua dest.	Ad 500 ml

HE-Färbelösung

Eosin	2g Eosinpulver; 200 ml Aqua dest.; 4 Tr. Essigsäure 96% p.a
Mayer`s Hämalan	Fertiglösung
Differenzierungslösung	0,25% Salzsäure (37% p.a.); 50 vol% Etanol (96% p.a.); ad Aqua dest.

Lagermedium für Biopsate, pH 7,2

FBS	100 ml (10%)
Gentamycin	10 ml (1%)
DMEM	Ad 1l

Lebend-Tod Färbelösung

FDA	10 µl (5 µg/ml in Aceton)
Propidiumiodid	90 µl (0,5 µg/ml in PBS ⁻)
PBS ⁻	Ad 200 µl

MTT-Färbelösung

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid MTT	5 mg
Aqua dest.	Ad 1 ml

MTT- Solubilization/Stopplösung

SDS	10g
DMSO	99,4 ml
Essigsäure	0,6 ml

Trypsin/EDTA

Trypsin	5 g/l
EDTA- 4N	2 g/l
NaCl	8,5 g/l
Versene (1:5000)	10 ml Trypsin/EDTA auf 100 ml Versene

2.1.5 Antikörper

Antigen	Klone	Abstammung	Hersteller/Firmensitz
Humanes CD31	JC70A	Monoklonal (IgG1)	Maus DAKO (Glostrup, Dänemark)
Humanes vWF	F8/86	Monoklonal (IgG1)	Maus DAKO (Glostrup, Dänemark)
Humanes Kollagen I		Monoklonal (IgG2a)	Maus Acris (Herford)
Humanes eNOS		Polyklonal Hase	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
Humanes CD105	SN6h	Monoklonal (IgG1)	Maus DAKO (Glostrup, Dänemark)
Humanes CD34	4H11	Monoklonal (IgG1)	Maus BioLegend (London, United Kingdom)
Humanes CD146	P1H12	Monoklonal (IgG1)	Maus Abcam (Cambridge, United Kingdom)

Sekundär-Antikörper	Spezifität	Hersteller/Firmensitz
Cy TM 3-konjugierter AffiniPure	Goat anti-Mouse (IgG)	Jackson Immuno Research (Suffolk, United Kingdom)

2.1.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
Advance TM HRP	Dako (Glostrup, Dänemark)
DNA staining kit	Merck (Darmstadt)
QIAshredder TM	Qiagen (Hilden)
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiFast TM SYBR [®] Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy [®] Micro Kit	Qiagen (Hilden)
SuperScript [®] III First Strand Synthese Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
ViraPower TM Lentiviral Packaging Mix	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
BD FluoroBlok insert	BD (Heidelberg)
Easy Load® Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Greiner (Frickenhausen)
Einfrierröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Einmalhandschuhe	Diagonal (Münster)
Gewebekulturplatten 145mm, 60mm und 100mm Cellstar®	Greiner (Frickenhausen)
Gewebekulturflaschen 25cm ² , 75cm ² und 175cm ²	Corning (New York, USA)
Lab Tek® Chamber-slides, 8 well	Thermo Scientific (Schwerte)
Multiwellplatten 6 well, 24 well, 96 well	Greiner (Frickenhausen)
Objektträger	Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Petrischalen 60 mm	Greiner (Frickenhausen)
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning (New York, USA)
Skapelle	Aesculap AG (Tuttlingen)
Spin-XU 20ml Concentrator, 100K Cutoff	Corning (New York, USA)
Sterilfilter, 0,2µm	Whatman (Dassel)
Sterilfilter, 0,45µm	Whatman (Dassel)
Reagenzgefäße 1,5ml, 2ml	Sarstedt (Hamburg)
Reagenzgefäße 0,1ml	Qiagen (Hilden)
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	BD (Heidelberg)

2.1.8 Geräte

Geräte	Typ	Hersteller/ Firmensitz
Analysewaage	BP 211D	Sartorius (Göttingen)
Autoklav	5075 ELV	Systec (Wettenberg)
Cryo 1°C Freezing Container	5100	Nalgene Nunc International (Wiesbaden)
Eismaschine	MF 26	Scotsman (Milan)
Erlenmeyerkolben, Bechergläser		Schott (Mainz)
FACS Calibur	E5091	BD (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer.Z1	Zeiss (Heidelberg)
Kühlschrank		Liebherr (Biberach an der Riss)
Inkubator	NU-5500E	Integra Bioscience GmbH (Fernwald)
Laminar Flow	Hera Safe	Kendra (Hanau)
Magnetrührer mit Heizung	Mr 3001 K	OmniLab (Bremen)

Messzylinder, versch. Größen		Duran (Wertheim)
Mikroskop	DMIL	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Mikroplatten Reader	Fluostar	BMG labtech (Virginia)
Mikroplatten Reader	Sunrise	Tecan (Crailsheim)
Mikrozentrifuge	5804R	Eppendorf (Hamburg)
Laborflaschen		Simax (Czech Republic)
Nanodrop	2000	Thermo Scientific (Schwerte)
Neubauer Zählkammer		NeoLab (Heidelberg)
PCR Gerät	PTC-200	MJ Research (St. Bruno, Kanada)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten	10µl, 200µl, 1000µl SL-PetteXE	Nichiryo (Maryland heights, USA)
pH Meter		InoLabServo (Singapore)
Realtime-PCR Gerät	Rotor-Gene Q	Qiagen (Hilden)
Shaker	DRS-12	NeoLab (Heidelberg)
Stickstofftank	CryoPlus 1	Thermo Scientific (Schwerte)
Tiefkühlschrank (-20°C)		PKM (Moers)
Tiefkühlschrank (-80°C)	Hera freeze	Heraeus (Hanau)
Universalwärmeschrank	Function line	Heraeus (Hanau)
Vakuumpumpe	VacuSafe	Integra Biosciences (Fernwald)
Vortex	Vortex Genie-2	Scientific Industries (Karlsruhe)
Zentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge	Biofuge stratos	Heraeus (Hanau)
Wasserbad	GFL	M&S Laborgeräte GmbH (Wiesloch)

2.1.9 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller/Firmensitz
LTR-143 forward	TGTGTGCCCGTCTGTTGTGT	Biospring (Frankfurt am Main)
LTR-143 reverse	GAGTCCTGCGTCGAGAGAGC	Biospring (Frankfurt am Main)
sd-DKK3-176F	TGCACCGAGAAATTCACAAG	Biospring (Frankfurt am Main)
sd-DKK3-176R	CTGGCAGGTGTACTGGAAGC	Biospring (Frankfurt am Main)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von mikrovaskulärer Endothelzellen (mvEZ) aus humaner adulter Haut

Die Zellisolation der mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte nach einem Standardprotokoll des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg. Die Aufarbeitung des Hautbiopsats erfolgt spätestens ein Tag nach dem Erhalt (siehe Abb.5). Eine Sterilprobe des Transportmediums wurde genommen und ü.N. bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, um mögliche Kontaminationen auszuschließen.

Zunächst wurde das Hautbiopsat dreimal mit PBS⁺-Lösung gespült und alle Fett- und anderen Gewebereste entfernt. Anschließend wurde das Biopsat mit dem Skalpell in ca. 2-3 mm breite Streifen geschnitten und einmal mit PBS⁻-Lösung gespült. Nachfolgend wurden die Hautstreifen mit einer Dispase-Lösung bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass alle Hautstücke von der Dispase-Lösung bedeckt waren. Am darauffolgenden Tag wurden, mithilfe zweier Pinzetten, die Epidermis und die Dermis voneinander getrennt. Die Epidermis wurde verworfen oder zur Isolation von Keratinozyten weiterverwendet. Die Dermis wurde in eine mit PBS⁺-Lösung gefüllte Petrischale überführt. Die Dermisstreifen wurden einmal mit Versene-Lösung gespült und danach für 40 min. in Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion mit 1% FBS abgestoppt und die Dermisstreifen in ein vorgewärmtes ECGM Zellkulturmedium überführt. Jeder Streifen wurde mit dem Skalpell unter leichten Druck von allen Seiten ausgestrichen. Die Reinigung der entstandenen Zell-Medium-Suspension erfolgte über Filtration. Nach der Resuspendierung des Zellpellets in Zellkulturmedium, erfolgte die Aussaat der Zellen mit einer Dichte von 4-5 x 10⁴ vitale Zellen pro cm² (siehe 2.2.2.3).

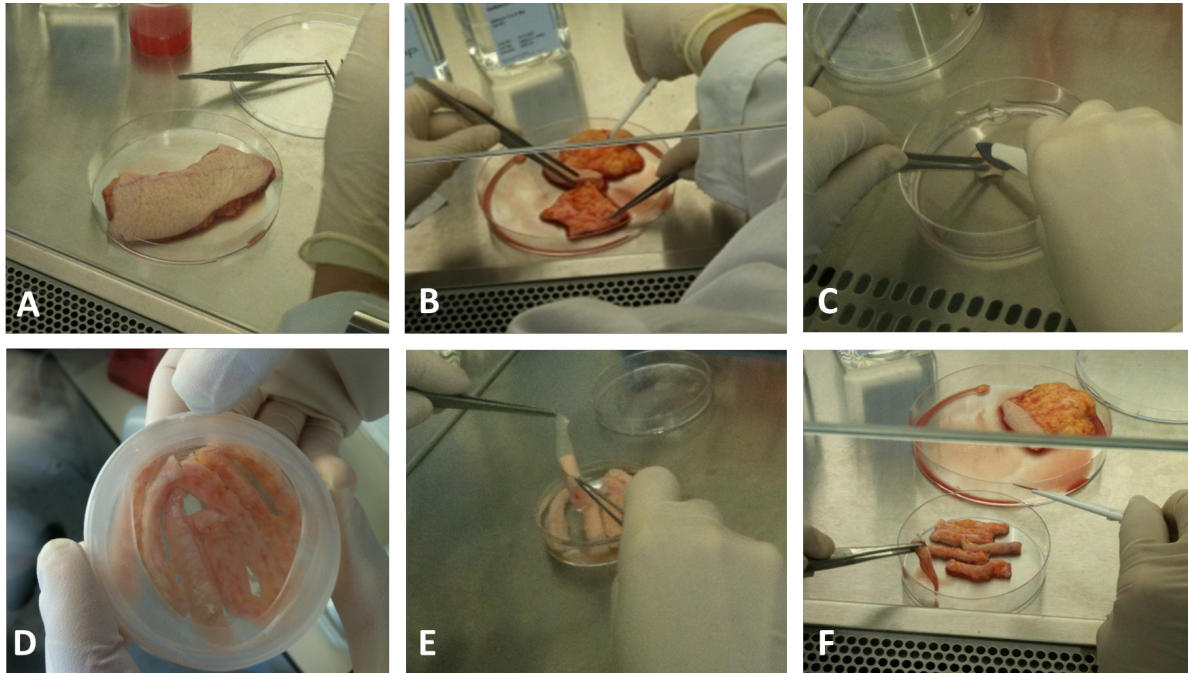


Abbildung 5: Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen. (A) Adulte Haut nach der operativen Entnahme (B) Entfernung unerwünschter Gewebereste z.B. Fett (C) Schneiden des Gewebes (D) Verdauung mit Dispase (E) Trennung von Dermis und Epidermis (F) Ausstreichen des Gewebestückes mit dem Skalpell.

2.2.2 Kultivierung der Zellen als Monolayer-Kultur (2D)

2.2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden steril, unter einer Laminar Flow Werkbank, durchgeführt. Die Morphologie wurde täglich unter dem Mikroskop untersucht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal die Woche. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert.

2.2.2.2 Passagieren

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% passagiert werden, da adhärenente Zellen aufgrund von Kontaktinhibition ihr Wachstum einstellen und es vermehrt zum Zelltod kommt. (Lindl & Gstraunthaler 2008).

Zuerst wurden die Zellen mit PBS⁻ gespült, um eine Inhibition des Trypsins durch das FBS zu vermeiden. Danach folgte eine 5 minütige Inkubation mit auf RT vorgewärmtem Trypsin/EDTA zur Ablösung der Zellen. Diese Reaktion wurde mit dem dreifachen Volumen an 10% FBS/PBS⁻ abgestoppt und bei 60 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in zelltypspezifischen Kulturmedium resuspendiert und in einer für das Experiment und Zelltyp geeigneten Zellzahl ausgesät bzw. kryokonserviert (siehe 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Das Wachstum der Zellen wurde über die Anzahl der Populationsverdopplungen ermittelt.

2.2.2.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellzählung mit Trypanblau diente auch als Vitalitätstest, da abgestorbene Zellen eine veränderte Membrandurchlässigkeit haben und Trypanblau aufnehmen können. Sie erscheinen unter dem Mikroskop blau. Bei vitalen Zellen hingegen ist die Zellmembran intakt. Trypanblau wird nicht aufgenommen und die Zellen bleiben lichtdurchlässig. Es wurden alle ungefärbten Zellen in den 4 Großquadraten gezählt und der Mittelwert pro Quadrat errechnet. Der Mittelwert wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der berechnete Wert ergibt die Zellkonzentration [$\times 10^4/\text{ml}$] in der Suspension.

Berechnung der Gesamtzellzahl pro ml in der Neubauerkammer:

Die Kantenlänge eines Großquadrates ist 1 mm und der Abstand zwischen Neubauerkammer und Deckgläschen ist 0,1 mm.

Volumen eines Großquadrates: $0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$

Für 1 ml Zellsuspension gilt: $1 \text{ ml} / 0,1 \mu\text{l} = 10\,000$

Verdünnungsfaktor: 1:10

Anzahl der ausgezählten Großquadrate: 4

Zellzahl in 1 ml = (Zellzahl/ 4) x Verdünnungsfaktor 10 x 10 000

Das Wachstum einer Zellkultur wird über die Anzahl der Populationsverdopplungen ermittelt (siehe Abb. 6). Hierfür braucht man die Zellzahl „ausgesäht“, welches der Anzahl an Zellen entspricht, die ausgesäht wurden und die Zellzahl „geerntet“, welches der Anzahl an Zellen entspricht, die bei jeder Passage gezählt werden.

$$PD = PD_{\text{alt}} + \frac{\ln \frac{\text{Zellzahl}_{\text{geerntet}}}{\text{Zellzahl}_{\text{ausgesäht}}}}{\ln 2}$$

Abbildung 6: Berechnung der Populationsverdopplungen einer Zellkultur.

2.2.2.4 Kryokonservierung

Viele primäre Zellen und Zelllinien lassen sich einfrieren und bei Bedarf wieder auftauen. Unter Kryokonservierung versteht man das Aufbewahren von Zellen in flüssigem Stickstoff. Mittels dieses Verfahrens kann die Vitalität der Zellen, über einen langen Zeitraum, aufrechterhalten werden. Als ‚Gefrierschutzmittel‘ wird hierbei DMSO verwendet. DMSO ist

bei RT zelltoxisch und wurde daher nur gekühlt verwendet. Beim Einfrierprozess verhindert DMSO die Bildung von Eiskristallen innerhalb der Zelle, die zum Zelltod führen würden.

Die Zellen wurden gezählt (siehe 2.2.2.3) und anschließend 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium in ein Einfrier Röhrchen überführt. Die Zellen wurden sofort mit Hilfe eines Cryo 1°C Freezing Containers (Firma Nalgene) mit einer definierten Abkühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute auf -80°C heruntergekühlt. Nach 24 Stunden wurde das Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Hier können die Zellen über viele Jahre aufbewahrt werden.

2.2.3 Gentransfer mittels lentiviraler Vektoren

Generell stellt ein lentiviraler Gentransfer eine Möglichkeit dar, Gene in Zellen zu überexprimieren. Lentiviren gehören zu der Gruppe der Retroviren und können im Gegensatz zu anderen Virengruppen auch mitotisch inaktive Zellen transduzieren.

2.2.3.1 Aufbau und Produktion von Lentiviren

Die Produktion der Lentiviren erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Scherr und Kollegen (Scherr & Eder 2002). Aus Sicherheitsgründen basiert die Produktion auf einem Vier-Plasmid-System (siehe Abb. 7). Ein Plasmid codiert für das Hüllprotein (pLP/VSVG). Beim G-Protein des Vesicular-Stomatitis Virus (VSV-G) handelt es sich um ein Hüllprotein, dass eine Transduktion nahezu aller Zelltypen ermöglicht. Hier spricht man von Pseudotypisierung, da die viralen Hüllproteine nicht der Proteine der natürlichen Virushülle entsprechen (HI-Virushülle). Die weiteren Plasmide bezeichnet man als Helferplasmide, da sie nur strukturelle Komponenten der Virushülle bereitstellen. Das erste Helferplasmid pLP1 codiert für die Gene gag und pol und steht unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalovirus)-Promotors. Das zweite Helferplasmid codiert für das Rev Protein, was für den Export der Virus-RNA aus dem Kern in das Cytoplasma verantwortlich ist. Das vierte Plasmid (z.B. C66SB) codiert für das eigentlich zu überexprimierende Transgen. Bei C66SB wurden Proliferationsgene unter einen konstitutiven CMV-Promotor zwischen die LTR (long terminal repeats) kloniert. Zusätzlich enthält der Transfervektor einige wichtige Viruselemente, wie z.B. das Verpackungssignal ψ oder auch RRE (Rev response element).

Zur Virusproduktion diente die Zelllinie FT 293. Hierfür wurden 5×10^6 Zellen in eine mit Poly-D-Lysin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS)-beschichteten 100-mm-Platten ausgesät. Zur Beschichtung der 100-mm-Platten wurden 3ml der Poly-D-Lysin Lösung für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit PBS⁻ gewaschen. Am nächsten Tag wurde die Transfektion der 293 FT-Zellen mit Hilfe von Polybren, was die Transfektionseffizienz steigert, mit jeweils 3 μg der vier Plasmide pLP1, pLP2, pLP/VSVG und des Vektors mit dem Transgen durchgeführt. Polybren ist ein Polykation und erleichtert durch das Abschirmen der Ladungen auf der Zelloberfläche, das Eindringen der Viruspartikel in die Zellen und steigert dadurch die Transduktionseffizienz. 24 h nach Transfektion wurde das Medium durch DMEM, ergänzt mit 10% FBS, 6 mM L-Glutamin und 10 mM Natriumbutyrat, ersetzt. Das zugesetzte Natriumbutyrat dient als Stimulans zur Virusproduktion. Ein weiterer Mediumwechsel auf serumfreies DMEM erfolgte 8 h nach der Stimulation. Am nächsten Tag wurden die virushaltigen Zellüberstände mittels eines 0,45 μm Filters von möglichen Überresten der Produzentenzellen gereinigt. Zur Konzentrierung des Virusüberstandes wurde ein Vivaspin-Filter mit einer Ausschlussgröße von 100 000 MW verwendet. Durch die Zentrifugation (300 x g) des Virusüberstands blieben die Viruspartikel in der Membran hängen und konnten in einem kleinen Restvolumen resuspendiert werden. Der konzentrierte Virusüberstand wurde in 50 μl Volumen aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Alle Schritte erfolgten unter der Benutzung von hitzeinaktiviertem FBS.

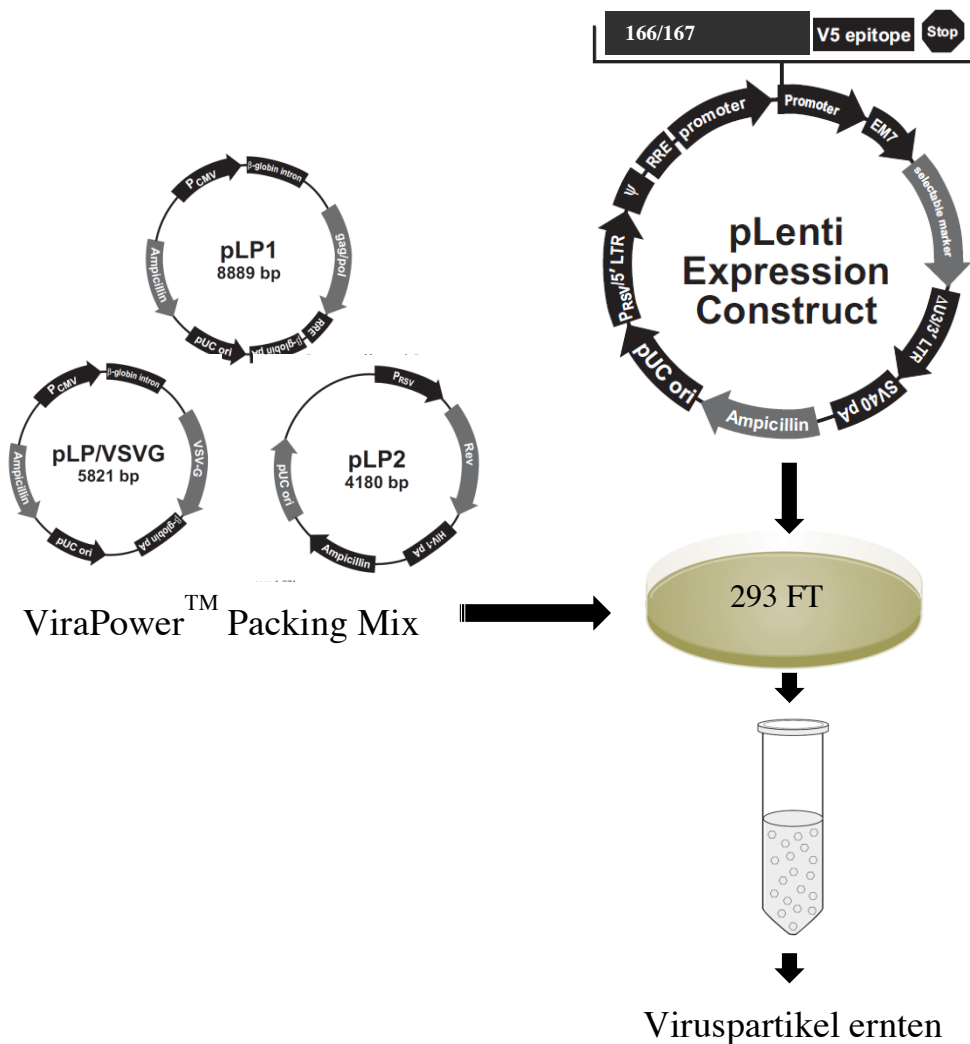


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Virusherstellung mit dem Vier-Plasmid-System (modifiziert Abbildung von http://tolls.invitrogen.com/content/sfs/manuals/virapower_lentiviral_system_man.pdf)

2.2.3.2 Titration der Virusüberstände

Der Virustiter ist ein Maß für den Gehalt an Viruspartikeln pro ml. Die Viruspartikel in einer Lösung wurde bestimmt, indem die Menge an Virus-RNA direkt, mittels quantitativer real-time PCR (qPCR), gemessen wurde. Die qPCR erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Scherr et al. (Scherr et al. 2001). Die verwendeten Primer binden in den Long terminal Repeats (LTR)- Regionen und sind daher für verschiedene virale Vektoren mit dem gleichen

„Backbone“ einsetzbar. LTRs sind lange terminale Sequenzwiederholungen viralen Ursprungs und Bindestelle für die Integrase. Daher sind LTRs essentiell für die Integration eines Transgens in das Wirtsgenom, zusätzlich enthalten sie auch regulierende Promotorelemente. LTRs flankieren in dem benutzten Vier-Plasmid-System das Transgen.

Eine Referenzstandardkurve durch Verdünnung des Vektor C66SB ($1:10^1$ bis $1:10^9$) wurde hergestellt. Das Plasmid enthält die gewünschte LTR-Region und kann daher mit den LTR-Primern amplifiziert werden. Außerdem wurden verschiedene Verdünnungen der Virussuspension (1:100, 1:1000 und 1: 10000) angefertigt. Alle Reaktionen wurden in Triplikaten nach folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

Mastermix	1x
2x QuantiFast SYBR Green	7.5 µl
LTR Primer Mix 1:20	1 µl
Nuclease freies Wasser	5.5 µl
Zu messende Probe	1 µl
	15 µl

Die qPCR Messung wurde mit Hilfe eines Qiagen Rotor-Gene nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	°C	Zeit
1	95	5 min
2	95	10 sec
3	60	30 sec
5 Goto Step 2		40x
6 Schmelzkurve		

Anschließend wurde eine Standardkurve des Vektors C66SB angefertigt (Korrelation <0.98), um die Konzentration der Partikel in der Virussuspension zu bestimmen. Dafür wurde die Konzentration des Vektor C66SB gegen den dazugehörigen gemessenen C_t -Wert aufgetragen. Mithilfe der Geradengleichung war es möglich, die gemessenen C_t -Werte der Virussuspension einer Konzentration an Vektor C66SB zuzuordnen und somit eine Aussage über die Konzentration an vorhandenen Viruspartikeln, welche C66SB enthalten, zu treffen.

2.2.3.3 Lentivirale Transduktion primärer mvEZ

Die primären mvEZ wurden in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät und am nächsten Tag mit einer MOI 100 und MOI 1000 transduziert. MOI bedeutet Multiplizität der Infektion, was ein Verhältnis von dem infektiösen Teilchen zu deren Zielzelle widerspiegelt. Sie lässt sich errechnen indem man die Viruspartikel durch die Anzahl der vorhandenen Zellen teilt. Bei einer MOI von 100, sind 100-mal so viele Viruspartikel wie Zellen in der Kultur. Zusätzlich wurden noch 6 µg/ml Polybren zur Verbesserung der Transduktionseffizienz eingesetzt (siehe 2.2.3.4). Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel. Die transduzierten mvEZ wurden in ECGM Wachstumsmedium weiterkultiviert (siehe 2.2.2).

2.2.3.4 Bestimmung der Transduktionseffizienz

Das hierfür verwendete lentivirale Konstrukt pHR⁻-GFP-SIN enthielt GFP als Markergen, so dass es möglich war die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch zu quantifizieren. Es ist nicht möglich direkt C66SB durchflusszytometrisch nachzuweisen, da keine geeigneten Antikörper für das Transgen 166/167 existieren. Lentivirale Konstrukt von GFP ist jedoch vergleichbar groß, wie das Konstrukt von C66SB. Daher die Annahme, dass die Transfektionseffizienz von einem GFP-Konstrukt mit C66SB vergleichbar ist.

Hierfür wurden primäre mvEZ in einer Dichte von $1,9 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung einer 24 Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit dem GFP-Virus in verschiedenen Verdünnungen (1:100 – 1:10⁶ Verdünnungen und MOI 100/1000) und zusätzlichen 6 µg/ml Polybren transduziert. 24 Stunden nach der Transduktion fand ein Medienwechsel statt und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Fixationlösung (2% PFA/0.5%BSA/2mM EDTA in PBS) bei 4°C gelagert. Die transduzierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre GFP-Expression hin analysiert. Als Negativkontrollen wurden in jeder Messung untransduzierte Zellen mit geführt. Um eine Aussage über die Effizienz der Transduktion zu treffen, wurden die Anzahl der transduzierten mit der Anzahl der untransduzierten Zellen verglichen.

2.2.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) stellt eine Methode zur Charakterisierung von Zellen dar. Anhand von Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften können verschiedene Zelltypen bzw. Zellcharakteristika unterschieden werden. Prinzip der Durchflusszytometrie ist die spezifische Antigen-Antikörperbindung von Fluorochromen an ausgesuchten Proteinen. Bei der FACS-Analyse passieren die Zellen in einer FACS solution Flow einzeln einen Argon-Ionen-Laser, der Licht von 488 nm emittiert. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, entstehen Streuungssignale. Man unterscheidet hierbei das „Vorwärtsstreulicht“ (forward scatter, FCS), das eine Aussage über die Größe der Zelle erlaubt und dem „Seitwärtsstreulicht“ (side scatter, SSC), das ein Maß für die Granularität ist. Mithilfe dieser Information kann man Zelltypen bzw. Populationen unterscheiden. Zusätzlich geben Emissionseigenschaften der Fluorochrome Informationen zu gewissen Eigenschaften der Zelle bzw. Oberflächenmarker von Zellen.

In dieser Arbeit wurden die mvEZs mit einem lentiviralen GFP-Vektor pHR'SINcPPT-SEW (Demaison et al. 2002) transduziert und mittels FACS-Analyse auf GFP-Expression hin untersucht. Die Zellen wurden, wie in 2.2.3.3 beschrieben, behandelt. GFP hat zwei Anregungsmaxima bei 395 nm und 475 nm. Die Emissionswellenlänge ist bei 509 nm. Durch den Vergleich der GFP-exprimierenden Zellen und der nicht-GFP-exprimierenden Zellen konnte die Transduktionseffizienz der Zellen ermittelt werden. Die Durchflusszytometrie fand am FACS Calibur Durchflusszytometer im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg statt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software.

2.2.4 Charakterisierung der upcyte[®] mvEZs

2.2.4.1 Immunzytochemie

Für das immunzytochemische Nachweisverfahren wurde mit 0.2%BSA/0.05%Tween/PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100% Methanol für 5 min fixiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen in 3% BSA/PBS für 20 min inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in

0,5%BSA/PBS⁻ für 30 min bei RT (Verdünnungen siehe Tabelle 1). Im Anschluss wurden die upcyte[®] mvEZs dreimal mit 0.2%BSA/0.05%Tween/PBS⁻ gewaschen, um nicht gebundene Erstantikörper zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper CyTM3- konjugiert Affini Pure Ziege anti-Maus IgG und eine Färbung mit DAPI 0,1 µg/ml für weitere 30 min bei RT. DAPI interkaliert in A-T reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA und somit erscheint der Zellkern blau-fluoreszierend. Zum Schluss wurden die Zellen dreimal mit 0.2%BSA/0.05%Tween/PBS⁻ gewaschen. Der Cy3-gekoppelte Sekundäntikörper absorbiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 553 nm und emittiert rotes Licht mit einer Wellenlänge von 565 nm. Die Fluoreszenzfarbstoffe können mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind, wurden alle Wasch- und Inkubationsschritte unter Lichtschutz durchgeführt. Als Positiv-Kontrollen wurden primäre mvEZs verwendet.

Tabelle 1: Endothelzellmarker.

Marker	Zelltyp	Verdünnung	Referenz
CD31/ PECAM-1	Endothelzellen, Thrombozyten, Megakaryozyten, B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile	1:300	(Grimwood et al. 1995), (DeLisser et al. 1994)
vWF/von Willebrand Faktor	Endothelzellen, Megakaryozyten	1:300	(Jaffe et al. 1973b)
eNOS/ endotheliale NOS	Endothelzellen,	1:100	(Dudzinski et al. 2006)
CD105/ Endoglin	Endothelzellen, Makrophagen, B-Lymphozyten, Synzytiotrophoblasten	1:50	(Gougos & Letarte 1988)
CD146/MCAM	Endothelzellen, humanen T-Zellen, Angioblasten, Mesenchymal Stammzellen	1:200	(Q. Li et al. 2003)
Flk-1/VEGF-Rezeptor 2	Endothelzellen	1:200	(Hanahan 1997)
CD34	Hämatopoetische Vorläuferzellen	1:100	(Delia et al. 1993), (Krause et al. 1996)
Kollagen 1	Fibroblasten, Myofibroblasten und Osteoblasten	1:200	(Gay et al. 1976)(H. Green et al. 1966)

2.2.4.2 Quantitative Real-time PCR

Die Methode der quantitativen Real-time-PCR (qRT-PCR) wurde zur Bestimmung der Expression von verschiedenen endothelzellspezifischen Markern angewandt. Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR basiert, jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen PCR-Produkte in Echtzeit zulässt. Die Quantifizierung erfolgt über Fluoreszenzmessungen, welche am Ende jedes PCR-Zyklus durchgeführt werden. Hierbei nimmt das Fluoreszenzsignal proportional mit der Menge an entstandenem PCR-Produkt zu. Eine Quantifizierung der gewonnenen PCR-Produkte kann nur während der exponentiellen Phase der PCR erfolgen. Die einfachste Möglichkeit zur Quantifizierung von PCR-Produkten ist die Verwendung von DNA interkalierenden Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder SYBR-Green I. Diese Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren in die DNA bzw. binden an doppelsträngige DNA und erhöhen somit ihre Fluoreszenz. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert deshalb mit der Menge an PCR-Produkt. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings der DNA-interkalierende Farbstoff SYBR-Green I zur Bestimmung der Expression von zellspezifischen Genen verwendet.

Für die relative Quantifizierung wird eine interne Kontrolle zur Normierung benötigt, zum Beispiel das Haushaltsgen GAPDH. Mit dem Signal werden Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgeglichen. Das Signal der idealen internen Kontrolle sollte leicht zu detektieren sein und nicht zwischen Zelltypen variieren oder auf experimentelle Konditionen reagieren. Der PCR-Zyklus, in dem die Reporterfluoreszenz erstmalig die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird durch den C_t -Wert („Cycle Threshold“) beschrieben. Der C_t -Wert wird umso eher erreicht, je mehr Ausgangs-DNA sich in der untersuchenden Probe befindet. Der Verlauf der PCR lässt sich in drei Phasen einteilen. In der ersten frühen Phase ist die Anzahl an Ausgangs-DNA begrenzt und daher die Wahrscheinlichkeit, dass sich DNA, Primer und Polymerase treffen, suboptimal. In der dritten und letzten Phase hingegen ist die Menge an PCR-Produkt so hoch, dass es zu Hemmungen der Amplifikation kommt und die Substrate annähernd verbraucht sind. In der zweiten und mittleren Phase kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des PCR-Produktes und das

Fluoreszenzsignal überschreitet signifikant die Hintergrundfluoreszenz. Hier wird der C_t -Wert detektiert (siehe Abb. 8).

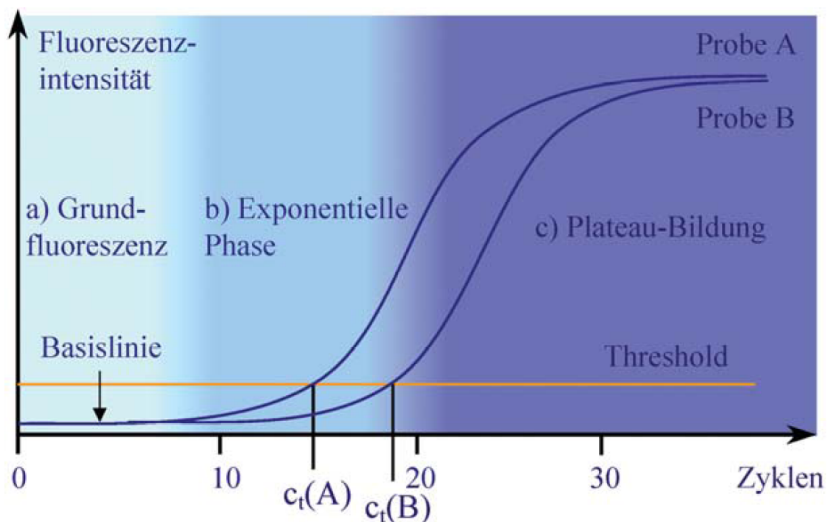


Abbildung 8: Schematische Darstellung der drei Phasen der qRT-PCR (Biospektrum 1/04 PCR-Eine Methode, drei Schritte).

Soll die absolute Kopienzahl in der Probe bestimmt werden, so kann diese mit Hilfe einer Standardkurve und deren Kurvensteigung berechnet werden. Wird lediglich ein Vergleich der n -fachen Expression zweier Gruppen benötigt, so wird die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Zuerst werden die C_t -Werte von zu untersuchendem PCR-Produkt und interne Kontrolle voneinander abgezogen und dann die beiden ΔC_t -Werte der Gruppen (z.B. primäre Zellen/upcyte[®] Zellen oder mit/ohne Wirkstoff) voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_t$ -Wert). Dieser Wert wird dann in die Gleichung (z.B. primäre Zellen zu upcyte[®] Zellen) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt. Das Ergebnis ist die n -fache Expression.

Zuerst wurde die RNA der jeweiligen Zellen mit dem RNeasy[®] Micro Kit von Qiagen isoliert und nachfolgend unter Verwendung des SuperScript[™] First-Strand Synthesis System nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben. Es wurde 1 μ g RNA je Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen:

Proben-RNA	1 µg in max. 8 µl
10 µM Oligo dT Primer	2 µl
5x first strand buffer	4 µl
0,1M DTT	2 µl
10mM dNTPs	1 µl
RNasin (RNase Inhibitor)	1 µl
SSIII RT	1 µl
H ₂ O	X µl ad 20µl

Zuerst wurde die RNA-Primer Mischung für 2 min. bei 70°C inkubiert, anschließend die weiteren Komponenten dazugegeben und für weitere 60 min bei 50°C inkubiert. Die so entstandene cDNA wurde mit Hilfe des PCR-Purification Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Die qPCR erfolgte in Triplikaten mit folgendem Reaktionsansatz:

cDNA-Template	1 µl
2x QuantiTect Fast SYBR Green MM	7.5 µl
Primermix (1:20; Forward und Reverse)	1 µl
DNase und RNase freies H ₂ O	5.5 µl

Quantitative Real-time-PCR wurde an einem Rotor-Gene (Qiagen, Hilden) mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	°C	Zeit
1	95	5 min
2	95	10 sec
3	60	30 sec
5 gehe zu Schritt 2		40x
6 Schmelzkurve		

Verwendete Marker:

Marker	Referenz
REIC/Dkk	(Tsuji et al. 2000)

2.2.4.3 Softagar-Assay

Der Softagar-Assay dient zur Analyse des verankerungsunabhängigen Wachstums. Freedman und Shin (Freedman & Shin 1974) fanden 1974 heraus, dass zwischen dem tumorbildendem Potential einer Zelle *in-vivo* und dem verankerungsunabhängigen Wachstum einer Zelle *in-vitro* ein Zusammenhang besteht. Zwar muss dies nicht für jede transformierte Zelle gelten, jedoch kann der Softagar-Assay genutzt werden, um Transformation bzw. Tumorgenizität vorherzusagen. Hier sollte gezeigt werden, dass upcyte[®] mvEZ, im Gegensatz zu HepG2 Zellen, kein verankerungsunabhängiges Wachstum zeigen.

Zuerst wurden 50 µl 0.5% (w/v) Agarose in eine 96-well Multiplatte pipettiert und 30 min bei 37°C Zeit gegeben, um Auszupolymerisieren. Die Agaroselösung wurde hergestellt durch Mischen einer 1% (w/v) Agaroselösung mit Zellkulturmedium im Verhältnis 1:1. Währenddessen wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/125 µl in vorgewärmten Zellkulturmedium verdünnt und 1:1 mit 125 µl 6% Sea[®]Prep Agarose gemischt. Von dieser Lösung wurden 50 µl auf die ausgehärtete Agarose pipettiert und für 7 Tage bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Im Verlauf wurde das Zellwachstum bzw. die Koloniebildung beobachtet und lichtmikroskopisch dokumentiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass immer dieselbe Stelle der Zellkulturplatte dokumentiert wurde.

2.2.4.4 Tube Formation Assay

Der Tube Formation Assay dient zur Untersuchung der Angiogenese (Arnaoutova et al. 2009) und beruht darauf, dass Endothelzellen, auf einer Basalmembranmatrix ausgesät, kapillarähnliche, verzweigte Strukturen ausbilden. Generell besteht die Angiogenese aus drei Teilen: der Migration, der Proliferation und der Neubildung eines Hohlraumes bzw. Gefäßes. Als einleitender Prozess migrieren die Endothelzellen, als Antwort auf angiogene Stimuli, in das umliegende Gewebe. Abschließend entwickeln die Endothelzellen kapillarähnliche Strukturen, aufgrund ihrer hohen Proliferation.

Der Assay wurde nach einem modifizierten Protokoll von Kubota et al. (Kubota et al. 1988) durchgeführt. Zunächst wurden 50 µl Matrigel[™] Basalmembran Matrix auf eine vorgekühlte

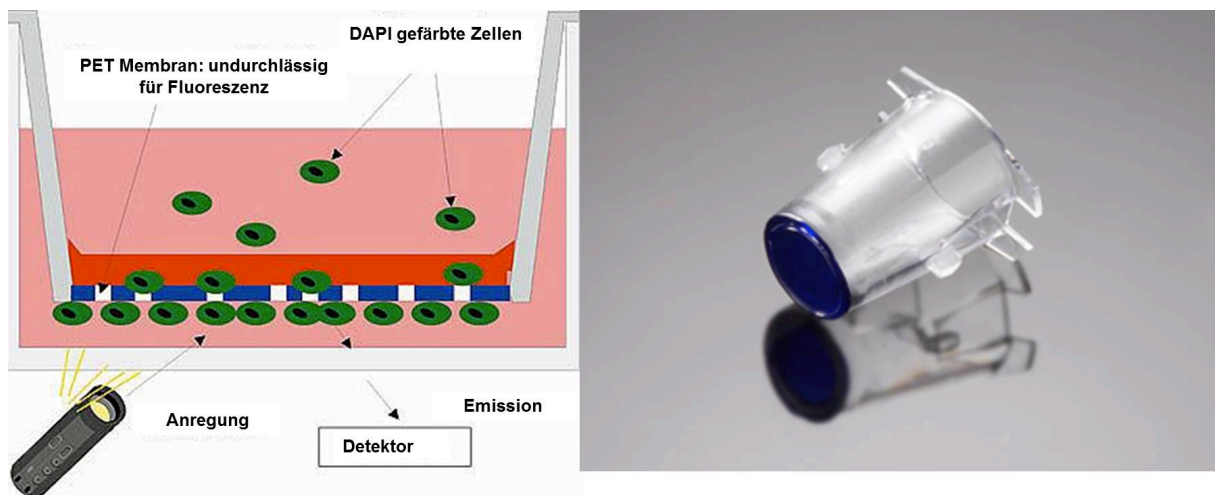
96-well Multiplatte pipettiert. MatrigelTM wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Tumor von Mäusen gewonnen und besteht aus Basalmembranproteinen, wie Laminin, Collagen IV oder auch Entactin. Zum Polymerisieren des MatrigelsTM wurde die 96-well Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in verschiedenen Dichten (4.800 Zellen/cm², 6.400 Zellen/cm², 9.600 Zellen/cm², 12.800 Zellen/cm², 15.000 Zellen/cm², 30.000 Zellen/cm², 40.000 Zellen/cm² und 50.000 Zellen/cm²) auf der Matrix ausplattiert. Als Positiv-Kontrolle wurden primäre mvEZs und HUVECs verwendet. Den Zellen wurden 24 h Zeit gegeben, das Netzwerk zu bilden. Es folgte eine Färbung mit Calcein-AM-Lösung für 2-3 min bei 37°C. Die Gefäßbildung wurde fotografisch dokumentiert. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) dienten als Positivkontrolle.

2.2.4.5 Relativer Migrationsassay

Der Migrationsassay wurde nach einem modifizierten Protokoll von Mastuygin et al. (Mastuygin et al. 2004) durchgeführt. Es wurden Plastikwaren mit folgenden Charakteristika verwendet: 96-well Platte mit passenden Inserts (FluoroBlokTM Insert von BD Bioscience siehe Abb. 9), welche einen Durchmesser von 3,2 mm und eine Membranoberfläche von 0,08 cm² besaßen. Durch das Einsetzen der Inserts wurden die Wells in eine obere und untere Kammer geteilt, wobei die Membran des Inserts die Grenzfläche darstellte. Die Membran verfügte über eine Porengröße von 1 µm. Durch die Poren erfolgte die Migration der Zellen von der oberen Kammer in die untere Kammer. Die Membran besteht aus einer Polyethylen Terephthalate (PET), welches für Fluoreszenzlicht undurchlässig ist und somit nur die Zellen auf einer Seite der Membran, durch Fluoreszenzlicht, detektiert werden können (siehe Abb. 9).

Die upcyte[®] mvEZs wurden 16 h-24 h vor Versuchsbeginn auf serumfreies Endothelzellmedium ECGM mit 0,1% BSA gesetzt. Nach der Hungerperiode (Medium ohne Serum versetzt die Zellen in eine Form des Hungerns) wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit Accutase von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden so verdünnt, dass sich 10.000 Zellen in 50 µl Migrationsmedium befanden. Als nächstes wurden die Zellsuspension in die obere Kammer einer 96-well FluoroBlokTM Insert ausgesät. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂. Anschließend wurde in die untere Kammer

des 96-well FluoroBlok™ Insert Endothelzellmedium ECGM mit 5% FBS gegeben. In den nächsten 4 Stunden erfolgte die Migration der Zellen aus der oberen in die untere Kammer. Der nächste Arbeitsschritt war die Fixierung der migrierten Zellen auf der Membranunterseite. Dazu wurden das FluoroBlok™ Insert in eine unsterile 96-well Multiwellplatte eingefügt, welche mit 3,7 % Paraformaldehyd/PBS gefüllt war. Danach wurden die fixierten Zellen mit PBS⁻ gewaschen. Um die Zellmembran durchlässig zu machen, schloss sich eine 2 min Inkubation mit eiskaltem Methanol an. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend mit dem Zellkernfarbstoff DAPI/PBS 1:10.000 für 10 min RT gefärbt. Abschließend wurden die Proben dreimal mit PBS⁻ gewaschen, um den ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Der Grad an Migration der Zellen wird über einen Vergleich der vorhandenen Zellen auf der Ober- bzw. Unterseite der Membran ermittelt. In diesem Versuch wurden primäre mvEZs als Positiv-Kontrolle verwendet.



(A)

(B)

Abbildung 9: (A) schematischer Aufbau des relativen Zell-Migration-Assay (www.pro-4-pro.com) (B) FluoroBlok™ Insert (www.bioscience.com)

2.2.4.6 Sprouting-Assay

Der Sprouting Assay wurde nach einem modifizierten Protokoll von Korff und Augustin (Korff & Augustin 1999) durchgeführt. Endothelzellen bilden unter speziellen Kulturbedingungen Sphäroide aus. Diese wurden ü.N. auf einer Kollagenbasis kultiviert, wonach sich von den Sphäroiden aus dreidimensionale, gefäßähnliche Triebe (engl.: sprouts) ausbildeten. Diese Eigenschaft ist ein weiteres Charakteristikum, das zum Vergleich von upcyte[®] mvEZ mit primären mvEZ oder humanen Fibroblasten (NHDF) verwendet wurde (Metzger et al. 2011).

2.2.4.6.1 Herstellung der Sphäroide

Zuerst wurde eine 1% Agaroselösung in H₂O hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert. Diese Lösung wurde in der Mikrowelle geschmolzen und es wurden jeweils 50 µl der flüssigen Agarose verwendet, um ein 96 Well zu beschichten. Die Platte wurde für 1,5 Stunden ausgekühlt, bevor sie verwendet wurde. Die Endothelzellen wurden geerntet und gezählt. 5.000 und 10.000 Zellen wurden in je 100 µl Endothelzellmedium ECGM verdünnt und pro 96-well ausgesät. Es folgte eine Inkubation für 24 h bei 37°C, 5% CO₂. Unter diesen Bedingungen formten die Zellen Sphäroide. Es wurden einerseits Sphäroide von NHDF und primären mvEZ als Positivkontrolle hergestellt und andererseits von upcyte[®] mvEZ zur Überprüfung der Eigenschaft der Sphäroidbildung bzw. Ausbildung von Sprouts. Außerdem wurden auch Sphäroide von allen Zelltypen in Ko-Kultur hergestellt.

2.2.4.6.2 Durchführung des Sprouting Assay

Nach 24 Stunden wurden die gebildeten Sphäroide mit einer Pipette vorsichtig geerntet und in ein 15 ml Falcon überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min. bei 216 x g. Die Sphäroide wurden in 50 µl Methylzellulose Stocklösung resuspendiert. Die Methylzellulose Stocklösung bestand aus dem Endothelzellmedium ECGM, dem 2% (vol/vol) FBS und ca. 1% (wt/vol) Methylzellulose zugesetzt war. Anschließend wurden die Sphäroide in 200 µl Kollagengel eingebettet. Die Methylzellulose verhindert das Absinken der Sphäroide nach

dem Gießen der Gele. Das Kollagengel bestand aus Rattenschwanzkollagen (2 mg/ml) und PBS. Die Einstellung der Kollagenstammlösung auf pH 7,4 erfolgte mit 1N NaOH. Die Zell-Kollagen Mischung wurde auf eine vorgewärmte 24 Well Multiwellplatte ausgesät und durfte für 20 min bei 37°C, 5% CO₂ polymerisieren. Danach wurden 250 µl Medium mit 25 ng/ml VEGF auf jedes Well gegeben. Nach 24 h Inkubation wurden die Gele unter einem Lichtmikroskop untersucht und auf Sproutbildung hin analysiert.

2.2.4.7 Zelluläre Aufnahme von LDL

Endothelzellen besitzen die spezielle Fähigkeit acetyliertes Lipoprotein niedriger Dichte aufzunehmen (LDL) (Goldstein & Brown 1977). Zur Markierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff 1,1'-dioctadecyl-3,3,3', 3'-tetramethylindo-carbocyanine (Dil) verwendet. Dil-Ac-LDL wird von Endothelzellen oder Makrophagen durch den „scavenger cell pathway“ aufgenommen und in der Zelle wird Dil durch lysosomale Enzyme abgespalten und in der lysosomalen Membran angereichert.

Dafür wurden die Zellen mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² auf Kollagen beschichteten 8-well Lab-Tek™ II Chamber Slides™ ausgesät und für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden sie mit 10-15 µg/ml Dil-Ac-LDL in ECGM Medium verdünnt für 4 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit PBS⁻ gewaschen und mit eiskalten 70% Ethanol/Aceton 1:1 für 5 min fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung des Zellkerns mit 1 µg/ml DAPI/PBS für 30 min bei 37°C, 5% CO₂. Die Proben wurden mit Mowiol eingedeckelt und die LDL-Aufnahme wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert.

2.2.4.8 Lektinfärbung

Lektine sind komplexe Proteine, die terminale Zuckerreste von Glykokonjugaten an der Zellmembran binden (Boyd & Shapleigh 1954). Sie besitzen meist zwei Zuckerbindestellen und können dadurch Zellen agglutinieren, ähnlich wie bei einer Antikörper-Antigen Reaktion. Lektine stellen ein äußerst nützliches Werkzeug in der Biochemie dar, da sie aufgrund ihrer Spezifität für bestimmte Zuckerstrukturen, z.B. für Isolation und Identifizierung von Zellen oder auch immunozyto- und histochemischen Analysen, geeignet sind. In der vorliegenden Arbeit wurde *Ulex europaeus* agglutinin I Lektin (UEA I Lektin) verwendet. Dieses Lektin bindet spezifisch *alpha* L-Fucose-tragende Glykokonjugate und ist ein wichtiger Endothelzellmarker (Holthöfer et al. 1982). Zur Detektion trägt es einen fluoreszierenden Marker, das Fluorescein Isothiocyanat FITC (Excitation 495 nm/ Emission 521 nm).

Die Endothelzellen wurden zur Färbung in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² auf eine 48-well Multiplatte ausgesät und für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zunächst mit PBS⁻ gewaschen und anschließend mit eiskalten 70% Ethanol/Aceton 1:1 für 5 min fixiert. Es folgten weitere drei Waschschrte mit PBS⁻. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen in 1% BSA/PBS⁻ für 1 h inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschrte mit PBS⁻. Als nächstes wurden die Zellen mit UEA I Lektin-FITC 1:50 in PBS⁻ verdünnt (finale Konzentration 20 µg/ml) für 1 h bei 37°C, 5% CO₂ im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach dreimal mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend erfolgte eine Färbung des Zellkerns mit 1 µg/ml DAPI/PBS⁻ für 30 min bei 37°C, 5% CO₂. Zur Kontrolle der Spezifität wurden primäre mvEZs im Vergleich zu upcyte[®] mvEZs gefärbt. Die Proben wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet.

2.2.5 3D-Kultivierung der Zellen

Die Versuche zur 3D Zellkultivierung in dem biologisch vaskularisierten Scaffold wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Iris Dally vom Fraunhofer IGB Stuttgart durchgeführt und veröffentlicht (Scheller et al. 2012).

2.2.5.1 Herstellung der biologischen vaskularisierten Matrix (BioVaSc)

2.2.5.1.1 Explantation

Die für diese Arbeit verwendeten porcinen Jejunalsegmente wurden aus Schweinen der Deutschen Landrasse entnommen. Die Tiere stammen aus einer Schweinezucht im Landkreis Sigmaringen und waren zum Zeitpunkt der Explantation ca. 6 Wochen alt und 10-15 kg schwer. Vor der Tötung hatten die Tiere mindestens eine Ruhephase von 24 h. Es wurde darauf geachtet, dass bei der Explantation des Jejunalsegmente das versorgende Gefäßsystem mit arteriellem Zufluss und venösem Rückfluss erhalten blieb. Die durchgeführten Organentnahmen fielen unter den 3. Abschnitt des Tierschutzgesetzes „Töten von Tieren“ (§4 Abs. 3 TierSchG „Töten von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken“) und waren weder anzeige- noch genehmigungspflichtig. Dennoch wurden alle Entnahmen in regelmäßigen Abständen dem Regierungspräsidium Tübingen, durch den zuständigen Tierschutzbeauftragten, mitgeteilt. Außerdem wurden die Organe der Tiere nicht ausschließlich für die, in dieser Arbeit durchgeführten Versuche getötet, sondern innerhalb des Universitätsklinikums Tübingen, der Universität Würzburg und des Fraunhofer IGB zeitgleich für weitere Experimente verwendet.

2.2.5.1.2 Azellularisierung

Die Azellularisierung der Jejunalsegmente erfolgte nach einer modifizierten Methode von Meezan *et al.* (Meezan et al. 1975). Im Anschluss an die Explantation wurde die BioVaSc gründlich gespült und ü. N. in PBS⁺ mit 1% Gentamycin, Streptomycin und Penicillin bei 4°C aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde der arterielle Gefäßstiel mit einem Bioreaktorsystem verbunden und mit 500 ml 3% Natriumdesoxycholat für chemische Azellularisierung perfundiert. Das Natriumdesoxycholat führt dabei zur Zelllyse im Gewebe. Der Druck wurde

auf 80 mm Hg eingestellt, um das Gefäßsystem nicht zu zerstören. Auch das Lumen des Gewebes wurde mit 3% Natriumdesoxycholat durchströmt solange die 500 ml durch das Gefäßsystem gepumpt wurden. Anschließend wurde das azellularisierte Darmsegment mit 1000 ml PBS⁺ bei einem Druck von 100 mm Hg gespült, um alle Zellreste zu entfernen. Das Trägermaterial wurde ü.N. bei 4°C in Natriumdesoxycholat gelagert. Am darauf folgenden Tag wurde das Scaffold erneut an das Bioreaktorsystem angeschlossen und mit 2.000 ml PBS⁺ gespült, um das zellschädigende Natriumdesoxycholat vollständig aus dem System zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde das azellularisierte Scaffold mit 150 ml DNaseI (60 mg in PBS⁺) und 1% Gentamycin, Streptomycin und Penicillin erneut ü. N. bei 4°C inkubiert. Zum Schluss wurde die BioVaSc für drei Tage in PBS⁺ mit 1% Gentamycin, Streptomycin und Penicillin gewaschen, um alle restlichen Chemikalien zu entfernen. Die Waschlösung wurde am ersten Tag zweimal gewechselt. Die Sterilisation der BioVaSc erfolgte ü.N. durch Bestrahlung bei 25 kGy in gekühltem PBS⁺ (BBF Sterilizations Service GmbH, Rommelshausen, Germany). Bis zur Verwendung lässt sich die Matrix bei 4°C lagern und sollte, vor der Besiedlung mit Zellen, am besten ü.N. im später verwendeten Medium inkubiert werden. Zur Überprüfung der Azellularisierung wurde ein Stück des Scaffolds für 2 Stunden in Histofix inkubiert und in Paraffin für weitere histologische Analysen eingebettet. Es wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Zusätzlich wurde die Feugen Reaktion eines DNA-Färbe-Kit, als Hinweis auf mögliche zurückgebliebene DNA-Reste, verwendet.

2.2.5.2 Besiedlung der BioVaSc

Die Besiedelung des Gefäßsystem der BioVasC mit upcyte[®] mvEZ erfolgte in zwei Schritten. Es wurden 20-30 Mio. Zellen verwendet. Im ersten Schritt wurde die BioVaSc über den arteriellen Zufluss besiedelt. Nach einer 2 stündigen Ruhephase, in der die Zellen adhäreren konnten, erfolgte in einem zweiten Schritt die Besiedlung über den venösen Zufluss. Auch hier folgte eine 2 stündige Ruhephase, damit die Zellen adhäreren konnten. Im Anschluss wurden die Zellen ü.N. mit einem pulsierenden Perfusionsdruck von 20 mm Hg (Amplitude +/- 10 mm Hg) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Druck schrittweise über 7 Stunden auf 100 mm Hg (Amplitude +/- 20 mm Hg) erhöht. Die Gewebekultur wurde über 14 Tage in

Endothelzellmedium ECGM mit 1% Gentamycin bei 37°C, 5% CO₂ in einem speziell dafür entwickeltem Bioreaktor inkubiert (siehe Abb. 10). Ein Mediumwechsel wurde alle 3-4 Tage durchgeführt. Um optimal Kulturbedingungen zu gewährleisten, wurden Parameter, wie Temperatur, Gasaustausch, Pumpleistung und Druck im Bioreaktor Computer, überwacht (Hewlett-Packhard, Böblingen; Software: Measure foundry, Data Translation, Bietigheim-Bissingen).

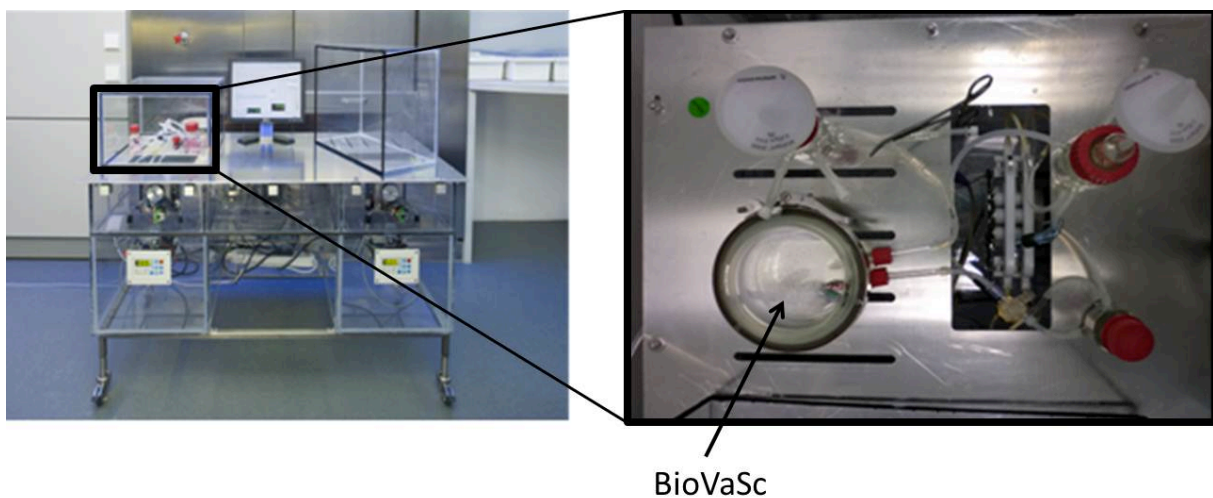


Abbildung 10: Reaktorwagen. (IGB Fraunhofer Stuttgart)

2.2.5.3 Zellcharakterisierung in der BioVaSc

2.2.5.3.1 Hämatoxilin-Eosin Färbung

Nach 14 Tagen im Bioreaktor wurde die mit Zellen besiedelte BioVaSc für 2 Stunden in Histofix inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben in Paraffin eingebettet und für weitere histologische Analysen verwendet. Die Hämatoxilin-Eosin Färbung wurde nach einem Standardprotokoll des Fraunhofer IGB Stuttgart durchgeführt.

Die Hämatoxilin-Eosin Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die dazu dient die Besiedlung von Gewebe bzw. Matrices mit Zellen zu überprüfen. Hämatoxilin färbt saure bzw. basophile Strukturen, wie z.B. die DNA im Zellkern, blau. Eosin hingegen färbt basische bzw.

acidophile Strukturen, wie z.B. kollagene Fasern, rot. Hämatoxylin in einer Komplexverbindung mit positiven Aluminiumionen bezeichnet man als Hämalaun. Die Paraffinschnitte müssen vor der Färbung zunächst entparaffinisiert werden. Die ausführliche Beschreibung der Hämatoxylin-Eosin Färbung befindet sich in Tabelle 2.

Tab. 2: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin Färbung.

Arbeitsschritte	Zeit	Bemerkung
Paraffinschnitte in den Wärmeschrank	1 h	Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!
Xylol I	10 min.	Entparaffinierung und Rehydrierung
Xylol II	10 min.	
Schnitte in Ethanol 96% I auf- und abtauchen	3x	
Schnitte in Ethanol 96% II auf- und abtauchen	3x	
Schnitte in Ethanol 70% auf- und abtauchen	3x	
Schnitte in Ethanol 50% auf- und abtauchen	3x	
Spülen der Schnitte mit VE-Wasser	1x	
Inkubation der Schnitte in Hämalaun-Lösung	8 min.	Färbung der Zellkerne
Spülen der Schnitte unter fließendem VE-Wasser bis die Lösung klar erscheint	1x	
Kurz in 0,25% HCl- 50%Alkohol	2x	Differenzierung des Hämalaun-Farbstoffes
Spülen der Schnitte mit VE-Wasser	1x	
Spülen der Schnitte in Leitungswasser	5 min.	Bläuen, pH-Umschlag

Inkubation der Schnitte mit 1% Eosin	1 min.	
Spülen der Schnitte unter fließendem VE-Wasser bis die Lösung klar erscheint	Ca. 3 min.	
Kurz eintauchen der Schnitte in 70% Ethanol	2x	Entwässern, aufsteigende Alkoholreihe
Ethanol 96%	2 min.	
2-Propanol I	5 min.	
2-Propanol II	5 min.	
Xylol I	5 min.	
Xylol II	5 min.	
Eindeckeln der Schnitte mit nicht wässrigem Eindeckmittel		

2.2.5.3.2 Antikörperfärbung

Zur immunhistochemischen Charakterisierung wurden verschiedene endothelzellspezifische Marker wie CD31, vWF und eNOS verwendet. Die Antikörperfärbung wurde nach einem Standardprotokoll des Fraunhofer IGB Stuttgart durchgeführt (siehe Abb. 11). Vor der Färbung mussten die Schnitte entparaffinisiert werden, um Bindungsstellen für die Antikörper wieder freizulegen und spezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Außerdem musste noch eine Demaskierung der Epitope durchgeführt werden, da, durch Formalinfixierung der in paraffineingebetten Gewebe, Veränderungen der antikörperspezifischen Epitope auf der Oberfläche der Zellen auftreten. Es kommt zu einer formalininduzierten Bildung von Quervernetzungen innerhalb bzw. zwischen Proteinen. Durch diese Konformationsveränderung kommt es zu dem partiellen oder sogar vollständigen Verlust der Immunreaktivität. Man spricht von einer Maskierung des Antigens bzw. Epitops (Werner et al. 2000). Das Epitop kann von dem zugehörigen Antikörper nicht mehr erkannt werden. Durch Antigendemaskierung kann die Quervernetzung teilweise wieder rückgängig gemacht werden. Es gibt zwei Möglichkeiten um die Epitope wieder herzustellen. Einerseits die Permeabilisierung des Gewebes durch proteolytischen Aufschluss, z.B mit Pronase oder

andererseits eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit verschiedenen zusammengesetzten Pufferlösungen (Ology 2009). Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase und unspezifische Bindungsstellen geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 min. RT. Zur Überprüfung der Färbung sind eine Isotypkontrolle und eine Positivkontrolle mitzuführen. Die Antikörperfärbung wurde mit dem ADVANCE™ HRP Kit von DAKO sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Schnitte zuerst mit einem Sekundärantikörper, der mit Horseradish Peroxidase HRP markiert war, inkubiert. Durch die nachfolgende Zugabe des Chromogens, kam es zum Farbumschlag, der die Antikörperfärbung sichtbar machte. Die Schnitte wurden danach mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Isomount® und einem Deckglas eingedeckelt. So stellen sich, unter dem Mikroskop, die Zellkerne blau dar und die Bereiche, in denen eine Antikörperbindung stattgefunden hat, braun-rot.

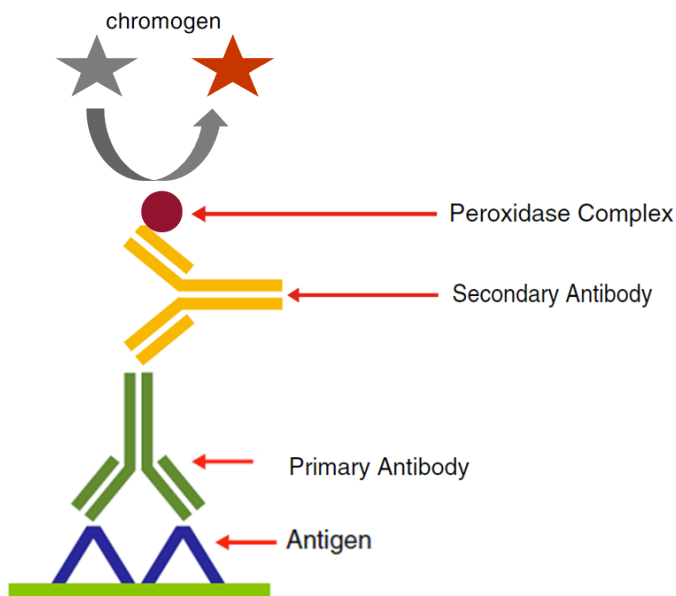


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Immunhistochemie.

2.2.5.3.3 Lebend-Tod-Färbung

Die sogenannte Lebend-Tod-Färbung ist eine zweifarbige, auf Fluoreszenz basierende Methode und bietet die Möglichkeit zur Beurteilung der Vitalität von Zellen. Die Methode kann verwendet werden zur Bestimmung der Besiedlungseffizienz von verschiedenen Matrices oder auch zur Vitalitätsbestimmung von Zellen, z.B. im Gewebe. Für diese Methode wird ein Lösungsgemisch aus Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) eingesetzt. Der Vitalfarbstoff Fluoresceindiacetat wird in einer Zelle von der Zellmembran-Esterase zu einem grün fluoreszierenden Produkt umgesetzt und ist somit ein Indikator für lebende Zellen. Propidiumiodid dringt hingegen ausschließlich durch die permeabilisierte Zellwand toter Zellen ein. PI erzeugt eine rot-orangene Kernfärbung der Zellen (Lindl & Gstraunthaler 2008). Somit erscheinen nach der Färbung lebende Zellen als grün- und tote Zellen als rot-fluoreszierend.

Für die Färbung wurde ein Teil der Matrix in Basalmedium, welches mit 4 µl FDA und 25 µl PI supplementiert war, für 7 min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS⁺ gewaschen und dann mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Messung erfolgte mit dem Filter I3 für FDA (Excitation: BP 450-490; Emission: 510) und dem Filter A für PI (Excitation: BP 340-380; Emission: 400).

2.2.5.3.4 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitätstest und dient als Nachweis der Zellviabilität (Mosmann 1983). Die Methode beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum blau-violett gefärbten, wasserunlöslichen Formazan. Die Reduktion erfolgt nur in lebenden Zellen, in Abhängigkeit von Enzymen im Endoplasmatischen Retikulum und der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase. Eine Schädigung der Zelle führt zu einer verminderten Formazanbildung.

Zur Beurteilung der Zellviabilität wurde ein Stück, der mit Zellen besiedelten BioVaSc für 3 Stunden in Medium mit 1 mg/ml MTT inkubiert. Im Anschluss wurde die Matrix mit PBS⁺ gewaschen und unter dem Lichtmikroskop analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 2D- Kultivierung und Charakterisierung der mikrovaskulären Endothelzellen

3.1.1 Isolation primärer mikrovaskulärer Endothelzellen

Wie in 2.2.1 beschrieben, erfolgte die Isolation der mikrovaskulären Endothelzellen aus einer humanen adulten Hautbiopsie. Das Ergebnis der Zellisolation war eine einheitliche Kultur an mikrovaskulären Endothelzellen. Die frisch isolierten Zellen adhärirten nach 3-4 Stunden und wurden in einer Dichte von $4-5 \times 10^4$ vitale Zellen pro cm^2 ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage. Die primären Zellen haben eine Generationszeit von 56-84 Stunden. In Abhängigkeit von der Zelldichte unterschied sich die Morphologie der mikrovaskulären Endothelzellen. Vereinzelte mvEZ wiesen eine spindelförmige längliche Morphologie auf (siehe Abb. 12 A), dagegen zeigten konfluent gewachsene primäre mvEZ die typische pflastersteinartige Morphologie (siehe Abb. 12 B). Primäre mvEZ wuchsen in kleinen Inseln, deren Ränder scharf abgegrenzt waren. Bei der Isolierung und Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen ist vor allem die Kontamination durch andere Zelltypen, wie Fibroblasten, Perizyten und glatten Muskelzellen ein Problem (Hewett & Murray 1993). Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos der Kultur mit Fremdzellen, wurden die primären Zellen in einem selektiven Endothelzellmedium (ECGM, PromoCell) kultiviert, welches nur das Wachstum von Endothelzellen unterstützte. Wenn es jedoch in seltenen Fällen zu einer Kontamination mit Fremdzellen kam, wurde die Kultur für 10-15 min. mit Versene[®] (PBS⁻/EDTA) inkubiert, was zur Dissoziation der Fremdzellen führte.

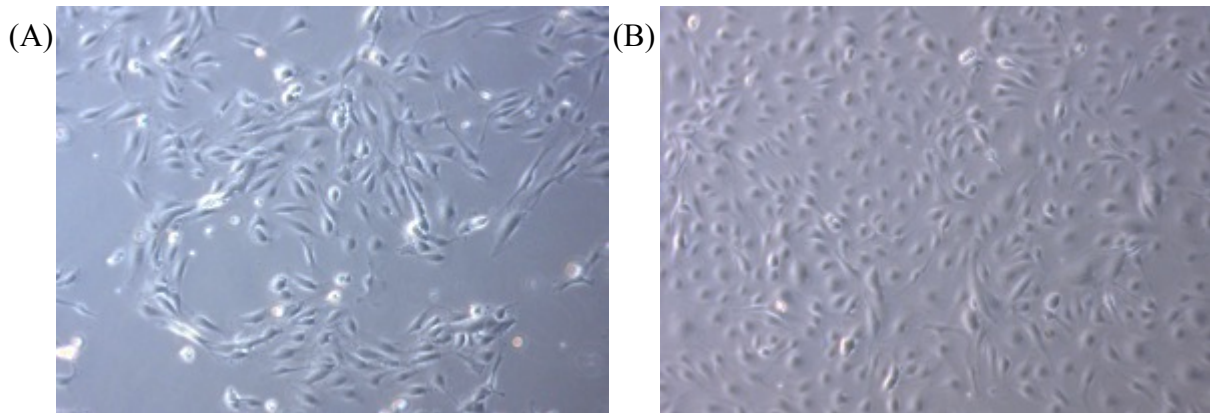
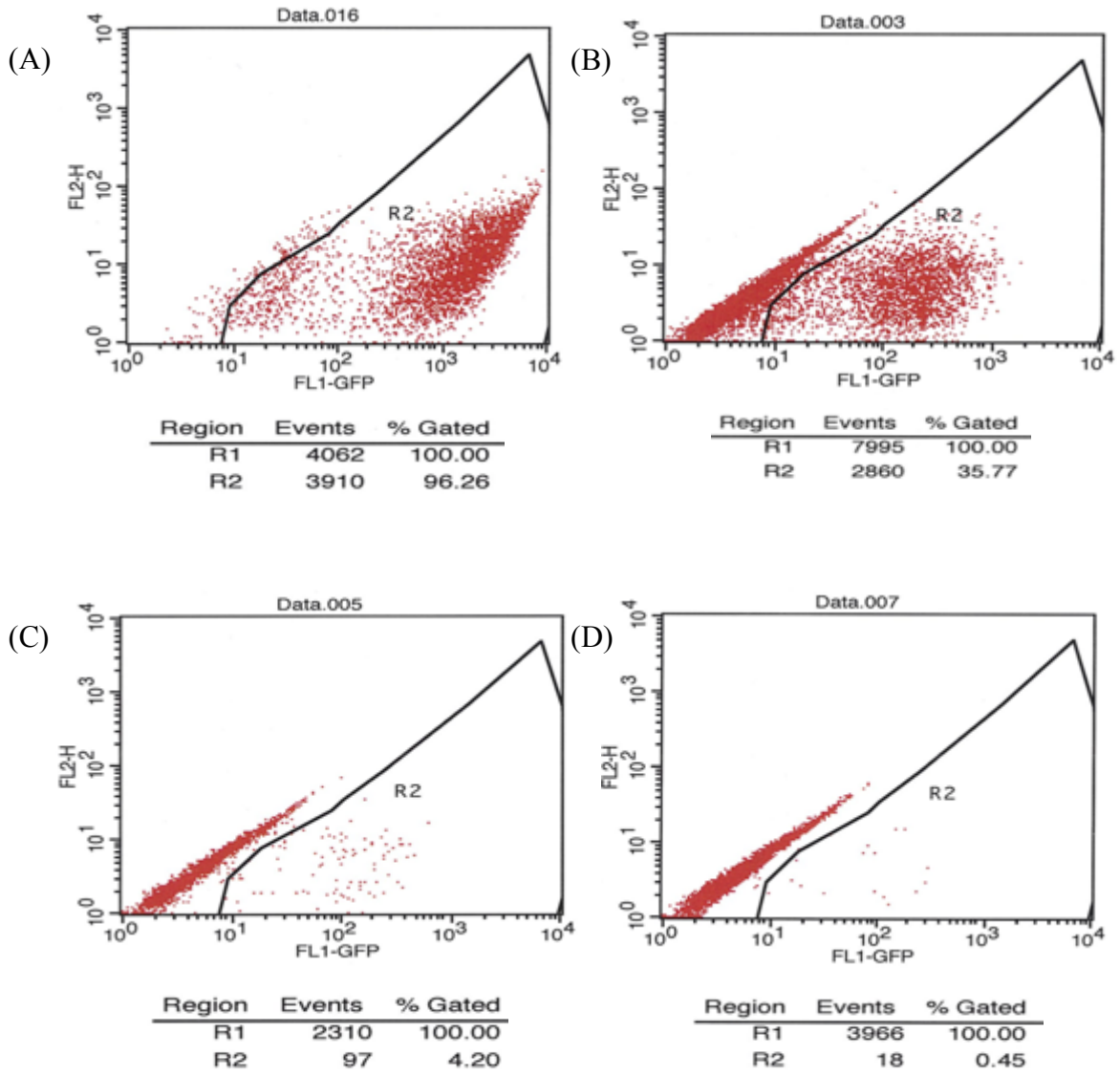


Abbildung 12: Morphologie primärer mikrovaskulärer Endothelzellen. (A) vereinzelte, proliferierende mvEZ zeigen eine spindelförmige Morphologie (B) konfluent gewachsene primäre mvEZ zeigen typische pflastersteinartige Morphologie. Vergrößerung 200x

3.1.2 Transduktionseffizienz

Die upcyte[®] Technologie beruht auf dem Einbringen proliferations-induzierender Faktoren in primäre Zellen via lentiviralen Transduktion und induziert damit eine erweiterte Proliferationsfähigkeit. Das Wissen über die Effizienz der Transduktion ist wichtig, damit die richtige Menge an Virus eingesetzt werden kann, um die gewünschte Erweiterung der Proliferation von primären Zellen zu erreichen. Daher wurde zuerst die Transduktionseffizienz bei den hier verwendeten primären mvEZ ermitteln, um bei der Anwendung der upcyte[®] Technologie den maximalen Erfolg zu erzielen. Die Durchflusszytometrie ermöglichte eine quantitative Aussage über den Anteil an transduzierten fluoreszenzmarkierten Zellen der Endothelzellpopulation (hier GFP). Die mikrovaskulären Endothelzellen wurden 48h nach der Transduktion mit dem lentiviralen GFP-Konstrukt pHR`-GFP-SI geerntet, fixiert und anschließend durchflusszytometrisch auf GFP-Expression analysiert. Die Transduktion der Zellen wurde mit verschiedenen Verdünnungen (1:100 – 1:10⁶, MOI 100 und MOI 1.000) des GFP-Konstrukts durchgeführt. Die Verdünnungen MOI 100/MOI 1000 beruhen auf dem mittels Real-time qPCR ermittelten Virustiter des GFP-Konstrukts pHR`-GFP-SIN von 1,5 x 10¹¹ Viruspartikel pro ml. Demnach entspricht MOI 100 einer Verdünnung von 1: 7,8 x 10⁴ und MOI 100 einer Verdünnung von 1: 7,8 x 10³ des Virus pHR`-GFP-SIN. Die Messung

erfolgte in Duplikaten. Als Kontrolle dienten unbehandelte primäre mvEZ. Die Zellen wurden bis zu dreimal transduziert, um den Einfluss mehrfacher Transduktionen auf den upcyte[®] Prozess zu analysieren.



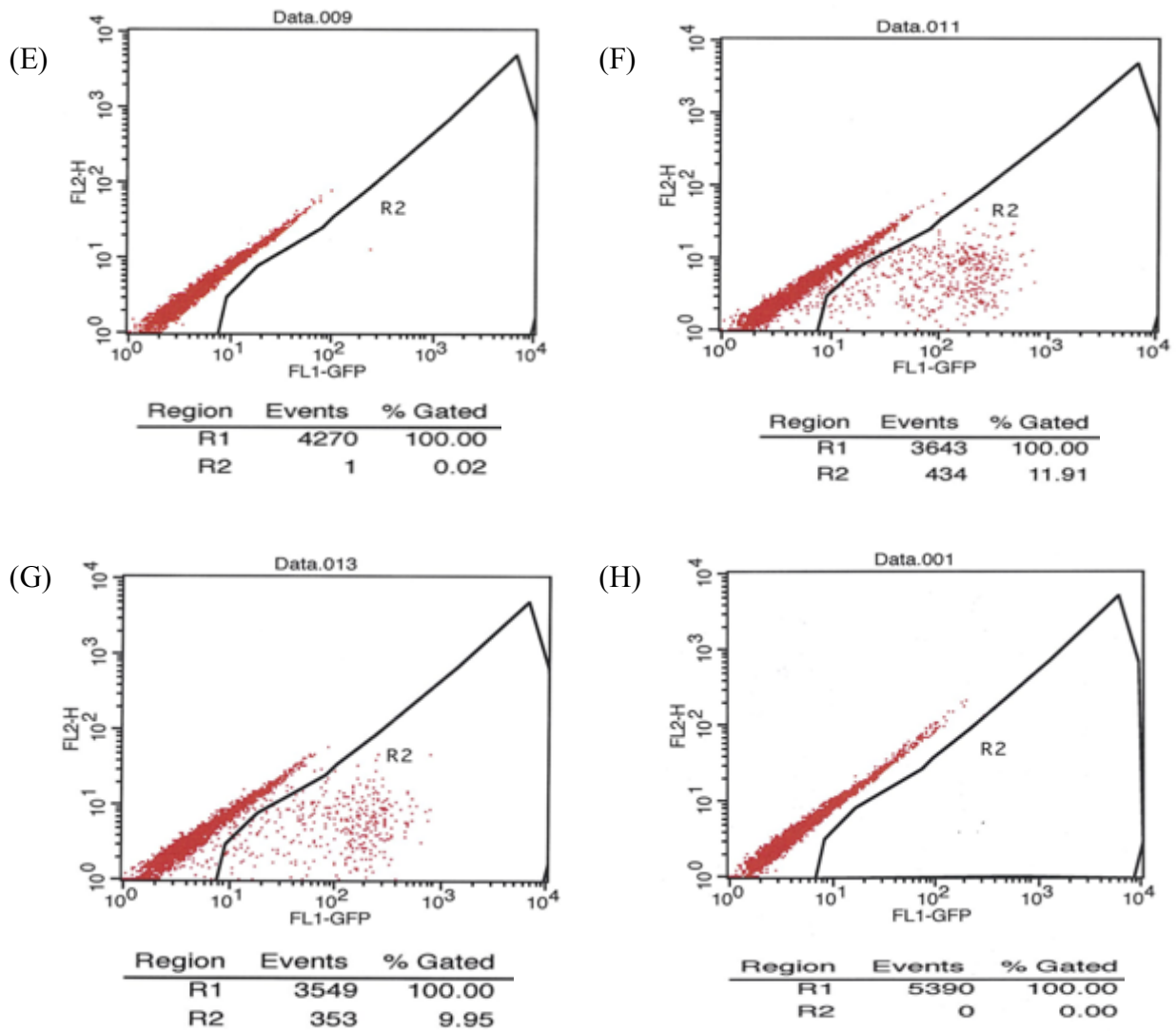


Abbildung 13: FACS-Daten der ersten Transduktion (R2= Prozentsatz an transduzierten Zellen). (A) GFP-Virus Verdünnung 1: 100 (B) GFP-Virus Verdünnung 1: 1000 (C) GFP-Virus Verdünnung 1: 10^4 (D) GFP-Virus Verdünnung 1: 10^5 (E) GFP-Virus Verdünnung 1: 10^6 (F) Anzahl an Viruspartikeln pro Zelle MOI 100 (G) Anzahl an Viruspartikeln pro Zelle MOI 1000 (H) untransduzierte primäre mvEZ.

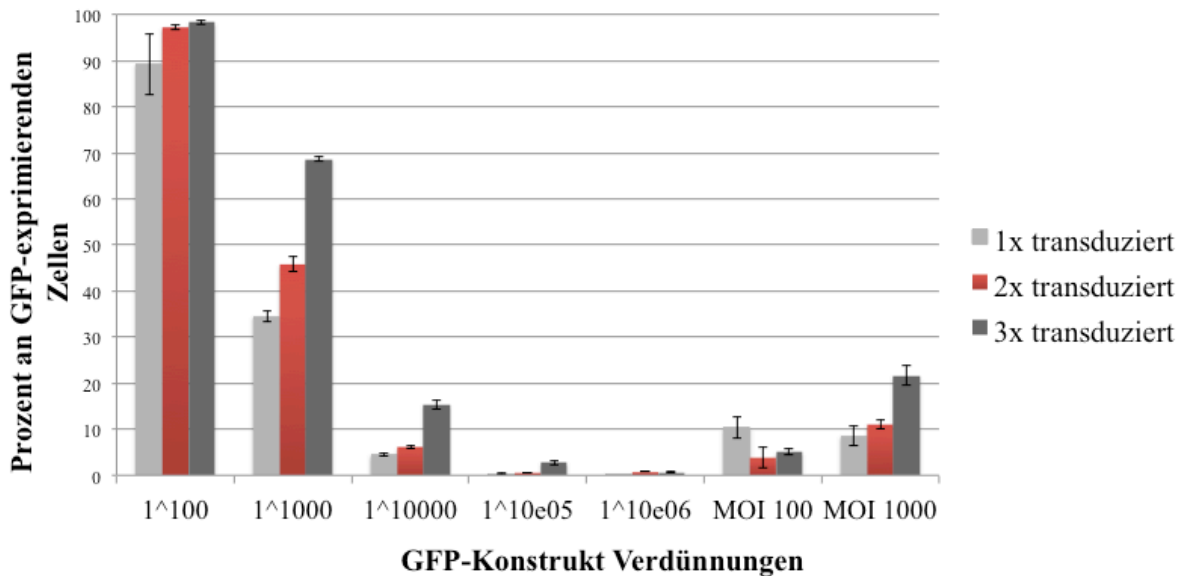


Abbildung 14: Vergleich der Transduktionseffizienz bei verschiedenen Virusverdünnungen und unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen der Transduktion. Mit zunehmender Verdünnung des Viruskonstrukts bei der Transduktion nimmt der Prozentsatz an GFP-positiven Zellen ab (1¹⁰⁰- 1^{10⁶}). Mehrmaliges Transduzieren erhöht die Anzahl an GFP-positiven Zellen.

Die Analyse der Daten zeigte, dass mit zunehmender Verdünnung des GFP-Konstrukts, auch die Zahl der GFP-positiven Zellen abnimmt (siehe Abb. 13 und 14). In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der ersten Transduktion von primären mvEC abgebildet. Die Daten zeigen, dass der Prozentsatz (R2) an GFP-positiven Zellen mit zunehmender Verdünnung abnimmt (siehe Abb. 13 A-G). Ab einer Verdünnung von 1: 10⁴ sind weniger als 5% der mvEC positiv für GFP. Mehrmaliges Transduzieren erhöht die Anzahl der GFP-positiven Zellen (siehe Abb. 14). Eine Transduktionseffizienz von erfahrungsgemäß 10-20% ist für die upcyte[®] Technologie ideal. Kumar et al. beschreibt den Zusammenhang zwischen Virustiter und Vektorlänge wie folgt „der Virustiter sinkt semi-logarithmisch mit zunehmender Vektorlänge“ (Kumar et al. , 2001). Der GFP Vektor ist 1,2-fach größer als der Vektor, welcher die upcyte[®]-Genkombination trägt und lässt sich deshalb nur halb so effizient transduzieren. Somit entspricht eine Transduktionseffizienz von 11,91% GFP-positiven Zellen, einer Transduktionseffizienz von 23,83% an upcyte[®]-transduzierten Zellen. Somit kann die

Verwendung einer MOI 100/ MOI 1000 sowie zweimaliges transduzieren als optimal für die Generierung von upcyte[®] mvEZ betrachtet werden.

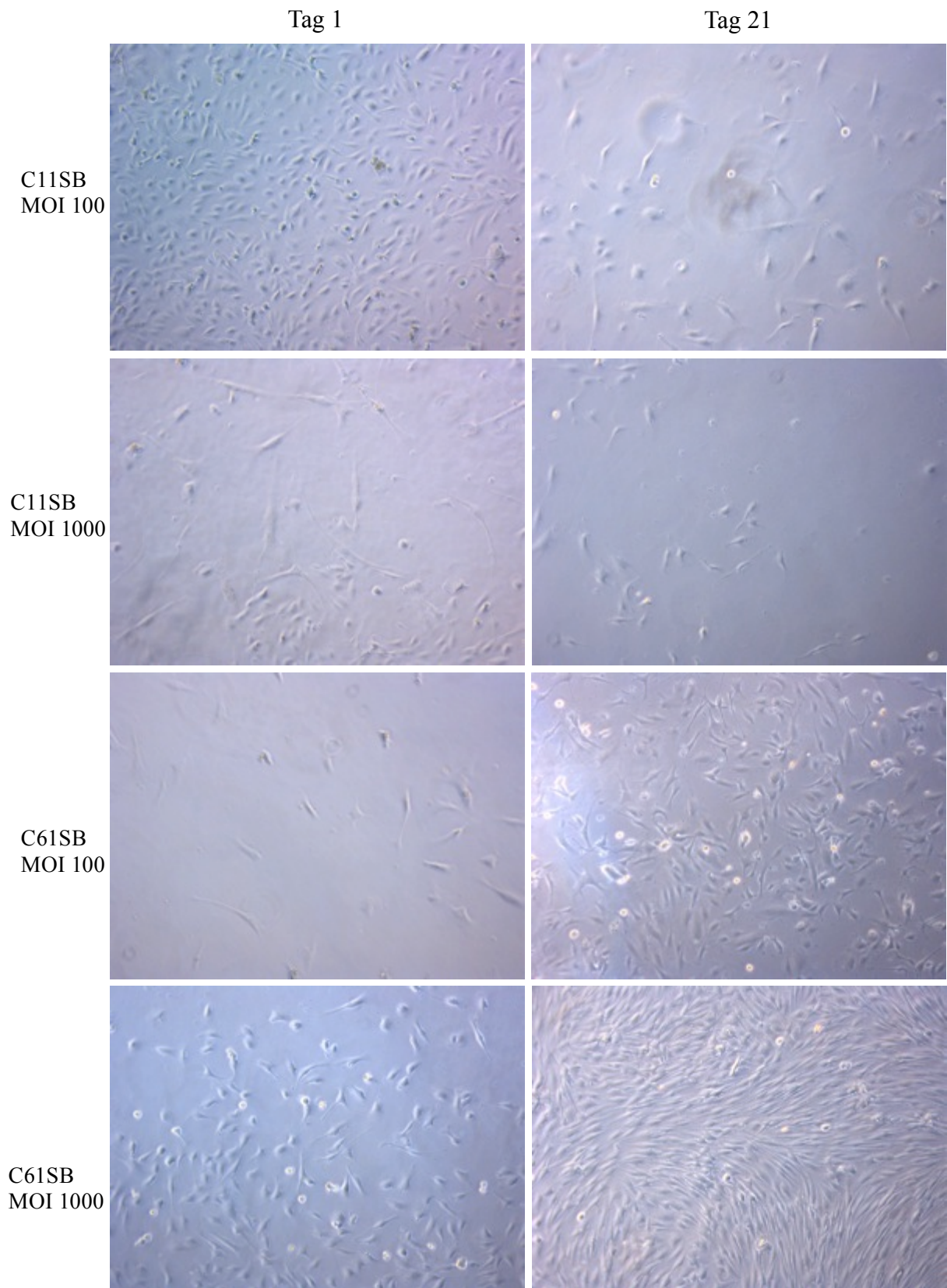
3.1.3 Upcyte[®] Technologie

Die upcyte[®] Technologie ist eine Methode zur Generierung von quasi-primärer Zellen. Durch die lentivirale Transduktion von proliferationsfördernden Genen, sind die primären Zellen in der Lage bis zu 20-40 Populationsverdopplungen durchzuführen und dabei ihre Primärzellmerkmale zu erhalten. Zur Etablierung der upcyte[®] Technologie auf mvEZ mussten erstmals die optimalen Bedingungen für diesen Zelltyp etabliert werden. Außerdem war zu überprüfen, ob die Zellen trotz ihrer erweiterten Proliferationskapazität, ihre Primärzellmerkmale weiter zeigten.

Die Faktoren 166 und 167 sind geeignete proliferationsfördernden Gene der Firma Medicyte GmbH. Es gibt verschiedene Ausführungen des lentiviralen Konstrukts (C11SB, C66SB und C61SB). Durch die Ermittlung der Transduktionseffizienz auf primären mvEZ mithilfe eines GFP-Konstrukts (siehe 2.2.3.4), konnten die zu analysierenden Bedingungen eingeschränkt werden. Insgesamt wurden 6 Bedingungen an primären mvEZ ausgetestet:

Tabelle 3: Verschiedene Bedingungen zur Etablierung des upcyte[®] Prozesses auf primären mvEZ.

Konstrukt	Viruspartikelanzahl pro zu transduzierende Zelle	Wiederholung der Transduktion	Zellen
C66SB	MOI 100	2x transduzieren	Frisch isoliert
	MOI 1000		Frisch isoliert
C61SB	MOI 100		Frisch isoliert
	MOI 1000		Frisch isoliert
C11SB	MOI 100		Frisch isoliert
	MOI 1000		Frisch isoliert



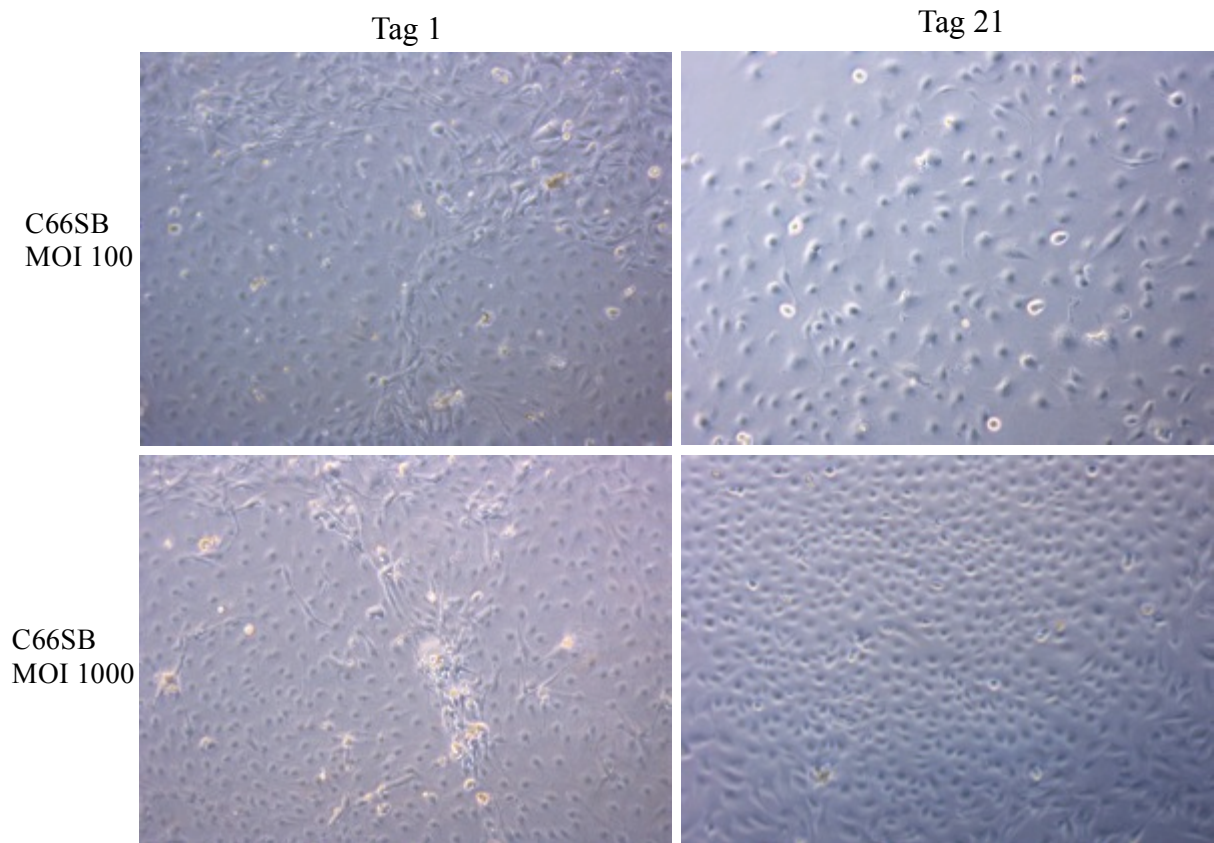


Abbildung 15: Aufnahmen von mikrovaskulären Endothelzellen an Tag 1 und Tag 21 nach doppelter Transduktion mit verschiedenen viralen Konstrukten. An Tag 1 konnte noch keine Aussage über den Erfolg der Induktion der Proliferation getroffen werden. Allerdings gab es Unterschiede in der Verträglichkeit des Transduktionsprozesses. An Tag 21 unterschieden sich die verschiedenen Bedingungen in ihrer Morphologie und es war eine Bewertung des Erfolgs der Transduktion möglich. Vergrößerung 200x

Am Tag 1 nach der Behandlung der Zellen konnte man noch keine Aussage über den Erfolg der Induktion der Proliferation treffen. Allerdings waren die Zellen, welche mit den Bedingungen C11SB MOI 1000 und C61 SB MOI 100 transduziert worden waren deutlich gestresst. Bei beiden Bedingungen waren nur noch vereinzelt Zellen auf der Zellkulturplatte und die Zellen zeigten im Vergleich zu den anderen Bedingungen eine extrem längliche Form. Am Tag 21 nach der Transduktion waren deutliche Unterschiede in der Morphologie zwischen den verschiedenen Bedingungen sichtbar (siehe Abb. 15). C11SB MOI 100 zeigte von Beginn an ein langsames Wachstum und es waren nur vereinzelt Zellen auf der Zellkulturplatte. Bei

jedem Mediumwechsel waren viel tote Zellen sichtbar. C11SB MOI 1000 erholten sich auch bis zu Tag 21 nicht. Die Zellen wuchsen nie bis zur Konfluenz, da zahlreiche Zellen abstarben und sich von dem Zellkulturflaschenboden ablösten. C61SB MOI 100 erholte sich von dem Transduktionsprozess und proliferierten. Allerdings hatten die Zellen am Tag 21 eine veränderte Morphologie. Auch im konfluenten Zustand zeigten sie nicht die Endothelzell-spezifische plastersteinartige Morphologie, sondern waren durch sternförmige Zellfortsätze gekennzeichnet. Auch C61SB MOI 1000 zeigte am Tag 21 im konfluenten Zustand nicht die Endothelzell-spezifische pflastersteinartige Morphologie. Die Zellen hatten einen langgestreckten Zellkörper und eine fibroblasten-ähnliche Morphologie. C66SB MOI 100/MOI 1000 zeigten am Tag 21 die für mvEZ typische kuglig, runde, pflastersteinartige Morphologie und eine Generationszeit zwischen 42h und 56h. Allgemein ist der upcyte[®] Prozess bei mvEZ erfolgreich, wenn der jeweilige Donor alle unter 1.1.4 definierten Charakteristika (erweiterte Proliferationsfähigkeit, Expression endothelzellspezifischer Marker, UEA I Färbung, Aufnahme von Dil-AC-LDL, Fähigkeit zur Migration und zur Ausbildung von luminären, verzweigten Zellformationen), vergleichbar zu primären mvEZ, zeigt. Die vielversprechendsten Bedingungen bezogen auf die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen waren C66SB MOI 100 und MOI 1000 bei zweimaliger Transduktion der primären mvEZ und wurden von diesem Zeitpunkt an zur Generierung aller upcyte[®] mvEZ Donoren verwendet. Erleichternd kam hinzu, dass die primären Zellen nach der Isolation kryokonserviert werden konnten und somit der Zeitpunkt des upcyten flexibler gestaltet werden konnte.

3.1.4 Charakterisierung

3.1.4.1 Wachstumsverhalten

Das Wachstumsverhalten ist ein Kriterium zur Beurteilung des Erfolges des upcyte[®] Prozesses und somit der Generierung von upcyte[®] mvEZ mit erweiterter Proliferationsfähigkeit. Primäre mvEC teilen sich *in vitro* durchschnittlich 15-mal und haben eine Generationszeit zwischen 56h und 84h. Dabei ist es wichtig, dass sie stets im konfluenten Zustand die pflastersteinartige Gestalt zeigen. Abbildung 16 zeigt die Wachstumskurve von upcyte[®] mvEZ im Vergleich zu primären mvEZ. Im Gegensatz zu den primären mvEZ, die nach ungefähr 15 Populationsverdopplungen ihr Wachstum einstellten, teilten sich upcyte[®] mvEZ 27 mal bevor sie seneszent wurden. Das waren durchschnittlich 15 zusätzliche Teilungen, sodass es möglich ist 3×10^4 fach mehr Zellen des gleichen Spenders zu generieren im Vergleich zu primären mvEZ. Das bedeutet beispielsweise bei einer Ausbeute von 10.000 primäre Zellen können im Vergleich am Ende 3×10^8 upcyte[®] mvEZs generieren werden. Die Zellen stellten ihr Wachstum nach den 27 Populationsverdoppelungen ein und gingen in die Seneszenz, was das Erreichen der Plateau-Phase in der Wachstumskurve (siehe Abb. 16) und eine Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase Färbung klar zeigte (siehe Abb. 17).

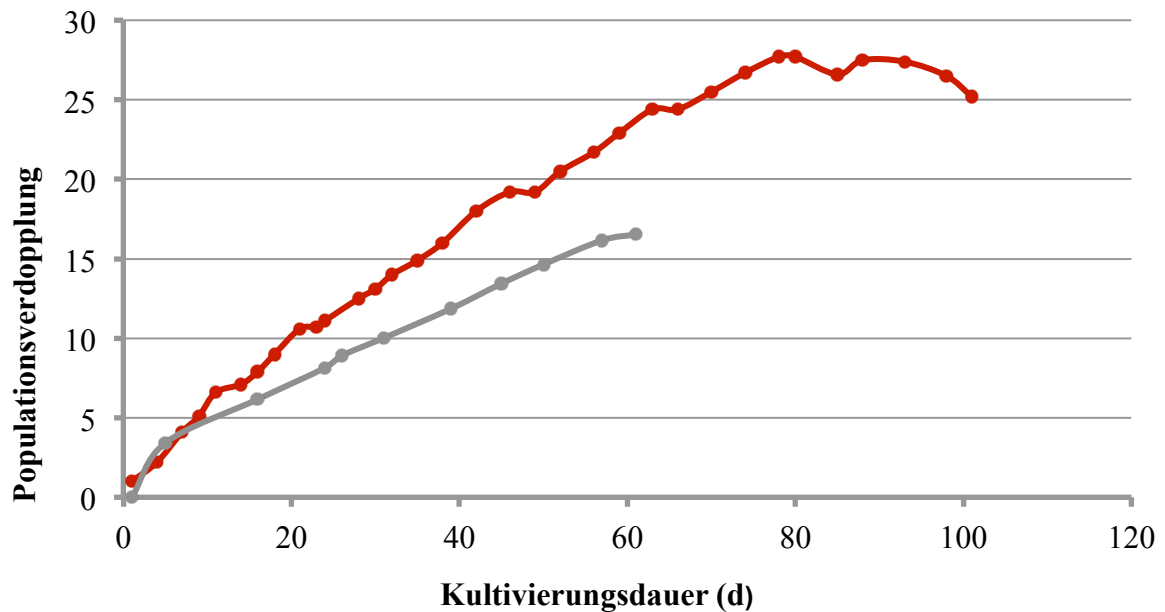


Abbildung 16: Wachstumskurven von primäre mvEZ (grau) und upcyte[®] mvEZ (rot) im Vergleich. Primäre mvEZ stellen ihren Wachstum nach durchschnittlich 15 Populationsverdopplungen ein. Upcyte[®] mvEZ teilen sich durchschnittlich zusätzliche 15 mal und erreichen dann ihre Plateauphase. Sie gehen in die Seneszenz.

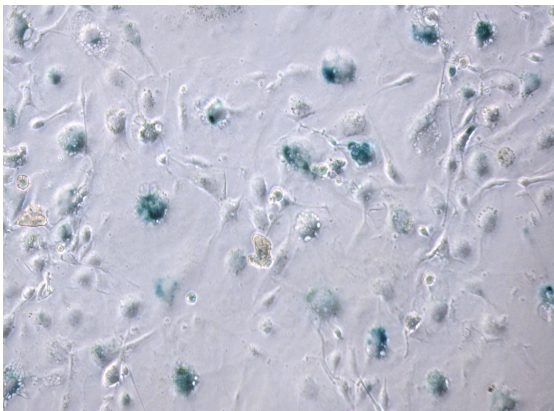


Abbildung 17: Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase Färbung von upcyte[®] mvEZ (PV 27,4). Durch die seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase wird das Substrat XGAL umgewandelt. Durch anschließende Oxidation durch Luftsauerstoff wird das Produkt in einen tiefblauen Indigo-Farbstoff umgesetzt. Seneszente upcyte[®] mvEZ erscheinen blau.

Ähnlich wie primäre mvEZ haben upcyte[®] mvEZ eine Generationszeit zwischen 42h und 56h. Beide Zelltypen wuchsen in Plastik-Zellkulturflaschen und benötigten keine spezielle Beschichtung. Während der Proliferation wiesen sie eine längliche Morphologie aus und zeigten, sobald sie konfluent wurden, die typische plastersteinartige Gestalt (siehe Abb. 18). Die ermittelte optimale Aussaatdichte der upcyte[®] mvEZ betrug 3.000 Zellen/cm². Bei dieser Aussaatdichte mussten die upcyte[®] Zellen zweimal pro Woche passagiert werden und es wurden durchschnittlich 10.000 Zellen/cm² geerntet. Upcyte[®] mvEZ ließen sich ohne Funktionsverlust wiederholt kryokonservieren und auftauen. In Abbildung 18 ist deutlich zu erkennen, dass sich bei primären mvEZ die Morphologie in der späten PV verändert. Die Zellen sind sehr länglich und runden sich auch in hoher Dichte nicht ab. Die Proliferation ist deutlich verlangsamt. Bei den upcyte[®] mvEZ hingegen ist selbst bei PV 27 noch die plastersteinartige Morphologie bei hoher Zelldichte erhalten.

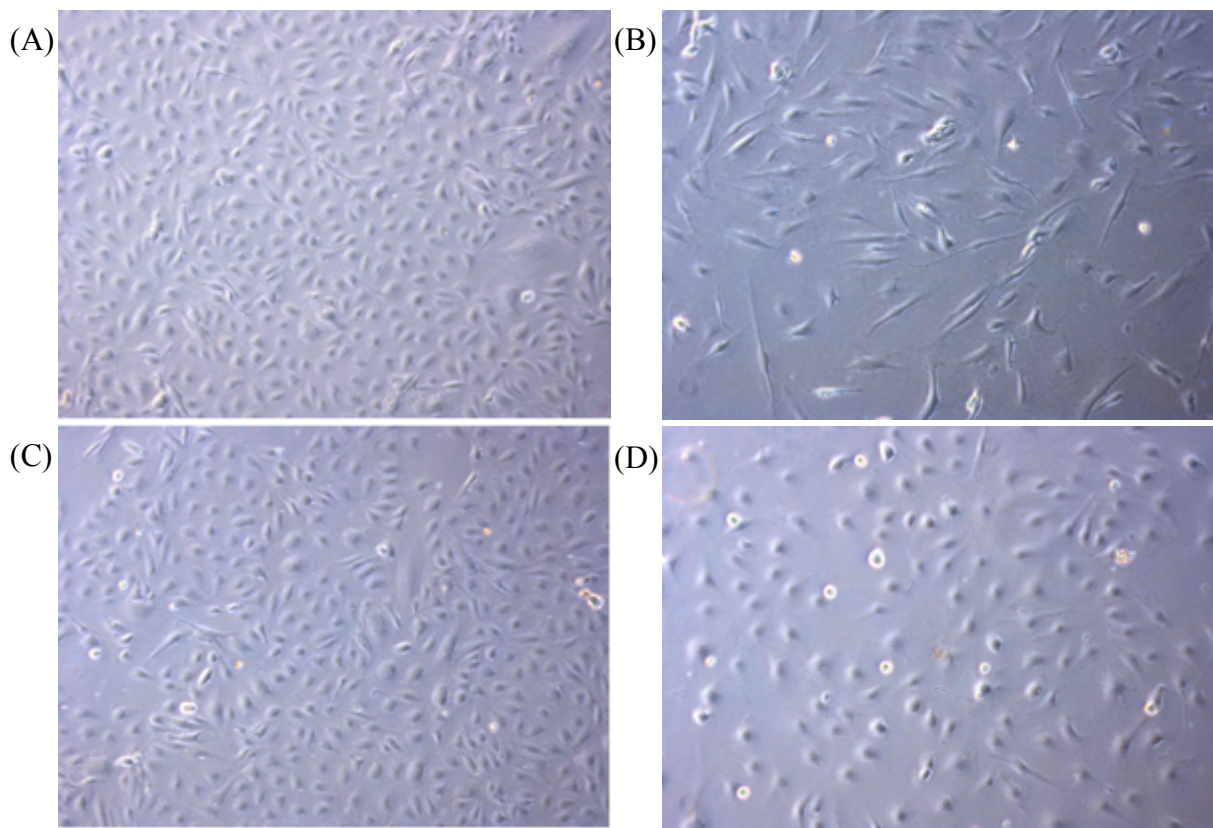


Abbildung 18: Morphologie der mvEZ. (A) primäre mvEZ PV 3 (B) primäre mvEZ PV 10,1 (C) upcyte[®] mvEZ PV 3,4 (D) upcyte[®] mvEZ PV 27,6. Vergrößerung 200x

3.1.4.2 Immunzytochemie

Die Expression endothelzellspezifischer Antigene wurde als weiteres Kriterium zur Beurteilung des Differenzierungsstatus der upcyte[®] mvEZ im Vergleich zu primären mvEC herangezogen. Die Expression der Antigene wurde zu einem frühen (PV 5-10), mittleren (PV 10-20) und einem späten Zeitpunkt (PV 20-30) der Kultur durchgeführt und mit der Expression der Antigene von primären mvEZ verglichen. Als spezifische Marker für mvEZ wurden CD31, vWF, eNOS, CD105, CD146 und VEGFR-2 verwendet. CD31 ist ein transmembranes Glykoprotein und wird vorwiegend entlang der Zell-Zell-Kontakte exprimiert. vWF ist das Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktor VIII und wird in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. vWF weist eine granuläre, perinukleäre Verteilung auf. eNOS wird generell eher schwach exprimiert und ist entweder über einen Lipid-Anker an der Zellmembran oder nach Aktivierung z.B. durch VEGF im Golgi-Apparat zu finden. CD146 und CD105 sind jeweils Oberflächenmarker von Endothelzellen. VEGFR-2 liegt entweder membrangebunden oder löslich vor. Alle Marker wurden in gleichem Maße von primären und upcyte[®] mvEZ exprimiert. In Abbildung 19 ist die Expression von CD31, vWF und eNOS zu einem frühen, späten und mittleren Zeitpunkt im Vergleich zu der Expression dieser Marker in primären mvEZ zu sehen. Die upcyte[®] mvEZ sind positiv für CD31 (A, D, G), vWF (B, E, H) und eNOS (D, F, I) gefärbt (rot). Die Expression der Marker ist mit denen der primären mvEZ vergleichbar (J, K, L). In Abbildung 20 sind die Färbungen von CD105 (M, P), CD146 (N, Q) und VEGFR-2 (O, R) abgebildet. Auch hier sind die upcyte[®] mvEZ positiv für alle Antigene und vom Expressionlevel her mit primären mvEZ vergleichbar (S, T, U). Um eine Kontamination mit Fremdzellen auszuschließen, wurden zusätzlich CD34 und Kollagen 1 als Negativmarker überprüft. Kollagen 1 wird in Fibroblasten, Myofibroblasten und Osteoblasten exprimiert (Gay et al. 1976; Green et al. 1966) und CD34 in adulten Stammzellen bzw hämatopoetischen Vorläuferzellen (Delia et al. 1993; Krause et al. 1996). Weder CD34 noch Kollagen 1 wurden von primären oder upcyte[®] mvEZs exprimiert und somit konnte eine Kontamination mit Fremdzellen ausgeschlossen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau.

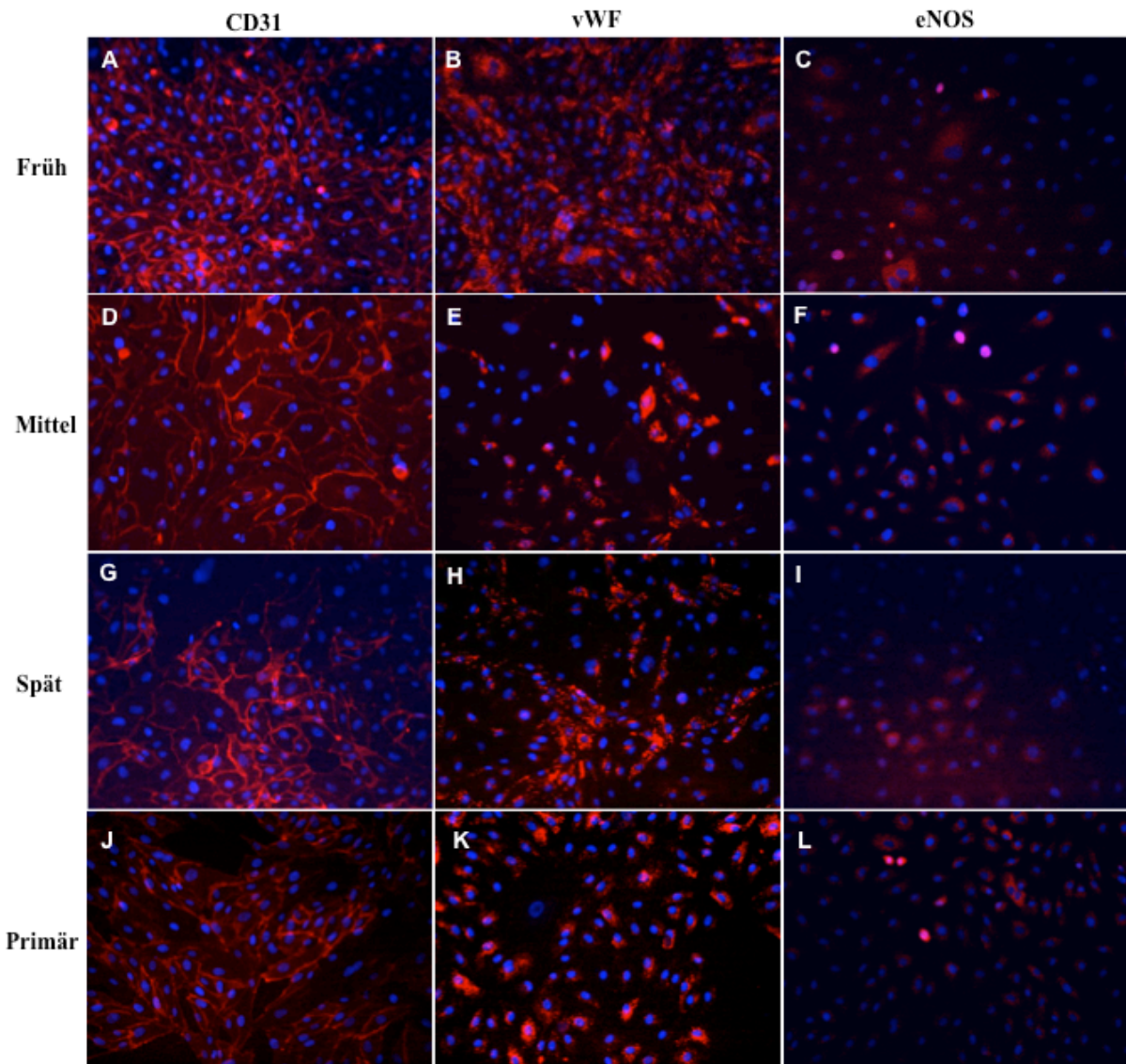


Abbildung 19: Immunzytochemie Färbungen von upcyte[®] mvEZ mit verschiedenen Endothelzellspezifischen Marker (CD31, vWF und eNOS) im Vergleich zu primären mvEZ. (A-C) frühe PV (PV 5- 10) (D-F) mittlere PV (PV 10-20) (G-I) späte PV (PV 20-30) (J-L) primäre mvEZ. Upcyte[®] mvEC wurden positiv für CD31 (A, D, G), vWF (B, E, H) und eNOS (D, F, I) im Vergleich zu primären mvEZ gefärbt (J, K, L) (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Vergrößerung 200x

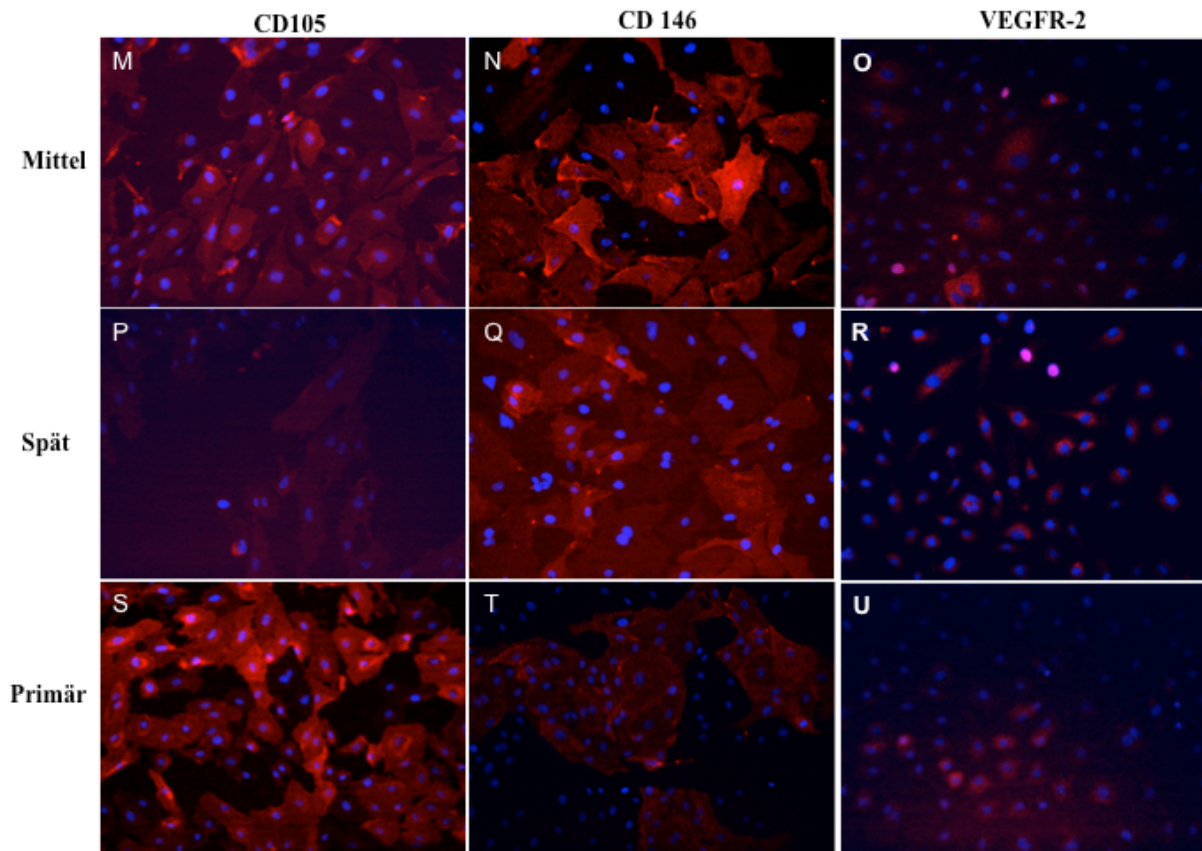


Abbildung 20: Immunzytochemie Färbungen von upcyte[®] mvEZ mit verschiedenen Endothelzellspezifischen Marker (CD105, CD146 und VEGF-R2) im Vergleich zu primären mvEZ. (M-O) mittlere PV (PV 10-20) (P-R) späte PV (PV 20-30) (S-U) primäre mvEZ. Upcyte[®] mvEC wurden positiv für CD105 (M,P), CD146 (N, Q) und VEGF-R2 (O, R) im Vergleich zu primären mvEZ gefärbt (S, T, U) (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. Vergrößerung 200x

3.1.4.3 *Ulex europaeus* agglutinin I Lektinfärbung

Die Färbung mit *Ulex europaeus agglutinin I* Lektin ist ein typisches Merkmal von Endothelzellen und stellt somit eine weitere Anforderung an die upcyte[®] mvEZ dar. In Abbildung 21 sind die UEA I Färbung von einer frühen PV (PV 5,4), einer mittleren PV (PV 14,1) und einer späten PV (PV 24,4) von upcyte[®] mvEZs dargestellt. Das FITC konjugierte Lektin *Ulex europaeus agglutinin* bindet spezifisch an L-Fucosereste von Kohlenhydratstrukturen der Endothelzellen. Mehr als 95% der Zellen in Abbildung 21 sind positiv für UEA I gefärbt (grün). Die positive UEA I Färbung der upcyte[®] mvEZ ist vergleichbar mit der Färbung von primären mvEZs. Die Zellkerne fluoreszieren durch die Interkalation von DAPI in die DNA blau. UEA I zeigt eine granuläre Fluoreszenz mit hoher Intensität in der Kernnähe.

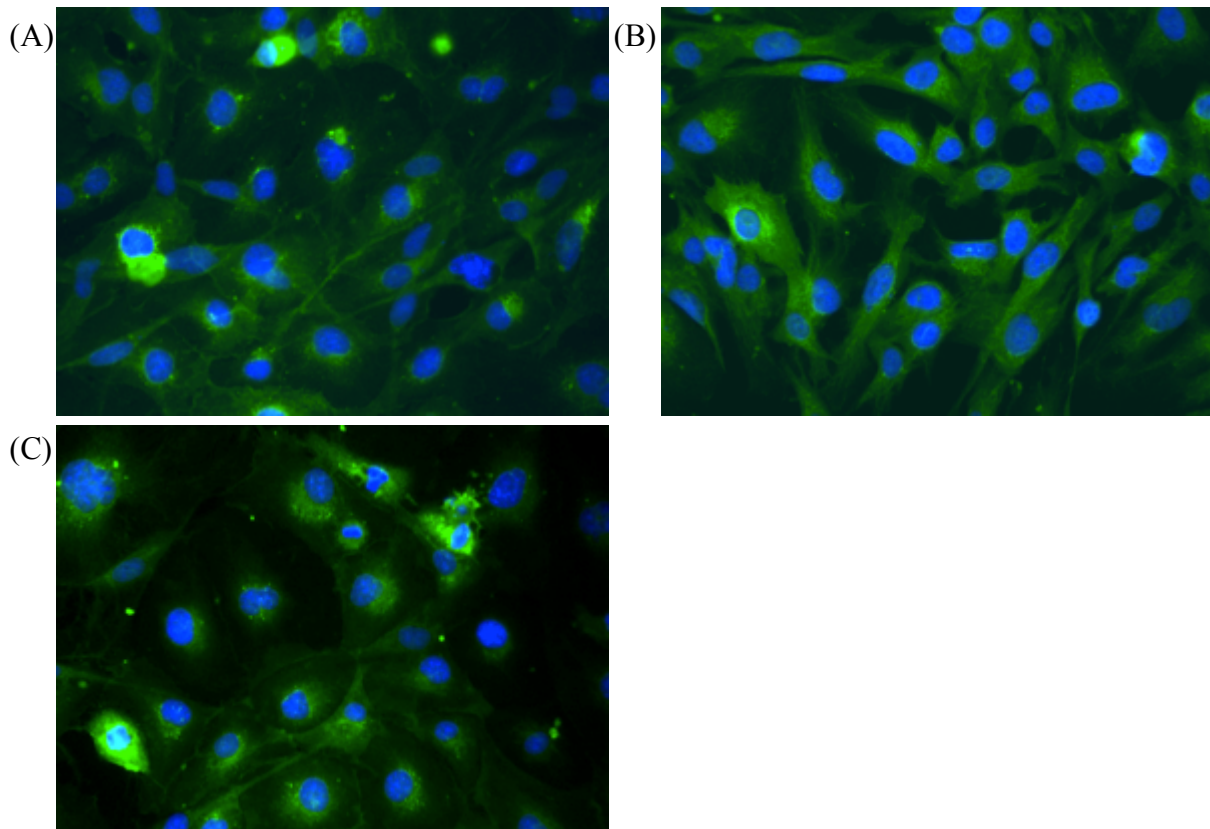


Abbildung 21: *Ulex europaeus agglutinin I* Färbung von upcyte[®] mvEZ. (A) frühe PV 5,4 (B) mittlere PV 14,1 (C) späte PV 24,4. Vergrößerung 400x

3.1.4.4 Zelluläre Aufnahme von LDL

Die zelluläre Aufnahme von LDL ist eine Charakteristikum von Endothelzellen und muss, um ihren Primärzellcharakter zu unterstreichen, ebenfalls von upcyte[®] mvEZ erfüllt werden. Sowohl primäre als auch upcyte[®] mvEZ zeigten eine starke Aufnahme des fluoreszenzmarkierten und acetylierten Dil-Ac-LDL. Nahezu 98% der Zellen waren positiv für Dil-Ac-LDL (grün) gefärbt (siehe Abb. 22). Die Färbung der Aufnahme von Dil-Ac-LDL hatte eine punktuelle perinukleäre Verteilung. Die Zellkerne fluoreszieren durch die Interkalation von DAPI in die DNA blau. Die Hintergrundfluoreszenz war sehr schwach.

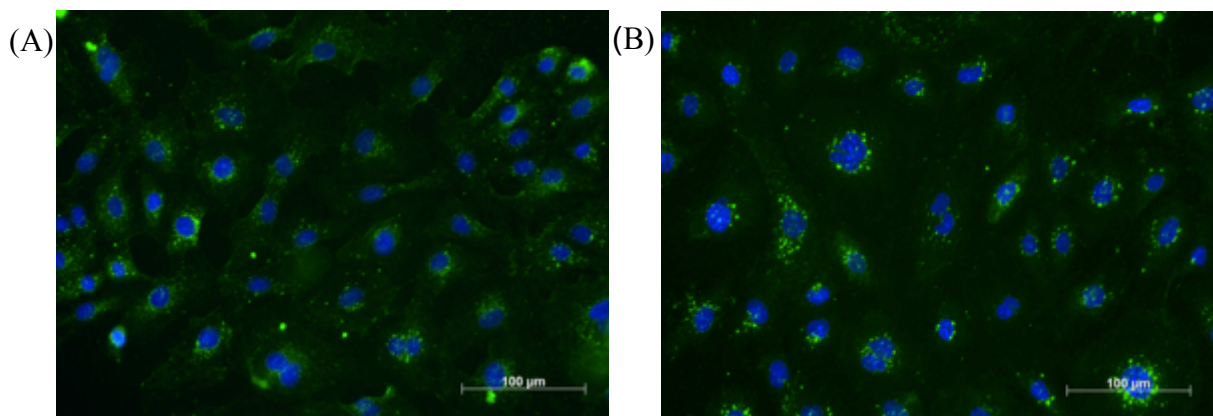


Abbildung 22: Zelluläre Aufnahme von LDL. (A) primäre mvEZ PV 7 (B) upcyte[®] mvEZ PV 21. Vergrößerungsbalken: 100 µm.

3.1.4.5 Relativer Migrationsassay

Die Angiogenese beschränkt sich auf den Bereich des mikrovaskulären Gefäßsystems und mvEC sind maßgeblich an der Bildung neuer Gefäße beteiligt. Proliferation, Migration und Ausbildung von luminären, verzweigten Zellformationen sind die zentralen Prozesse der Angiogenese. Der relative Migrationsassay soll die Fähigkeit der upcyte[®] mvEZ zur Migration im Vergleich zu primären mvEZ zeigen. In Abbildung 23 ist die Migration durch eine Membran bestehend aus Polyethylen Terephthalate (PET) mit einer Porengröße von 1µm

(siehe 2.2.4.5) dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Nur Zellen, die durch die Membran aktiv migriert sind, waren sichtbar, da die PET Membran undurchlässig für Fluoreszenzlicht ist. Primäre mvEZ und upcyte[®] mvEZ wanderten in Richtung des Lockstoffes FBS (siehe Abb. 23), welcher lediglich in das Medium der unteren Kammer beigemischt war. Wenn kein Lockstoff in das Medium der unteren Kammer beigemischt war (siehe Abb. 23 B, D), konnten keine Zellen auf der Unterseite der Membran detektiert werden. Beide Zelltypen migrierten in Richtung des Lockstoff FBS. Es migrierten mehr upcyte[®] mvEZ zum Lockstoff FBS hin als primäre mvEZ.

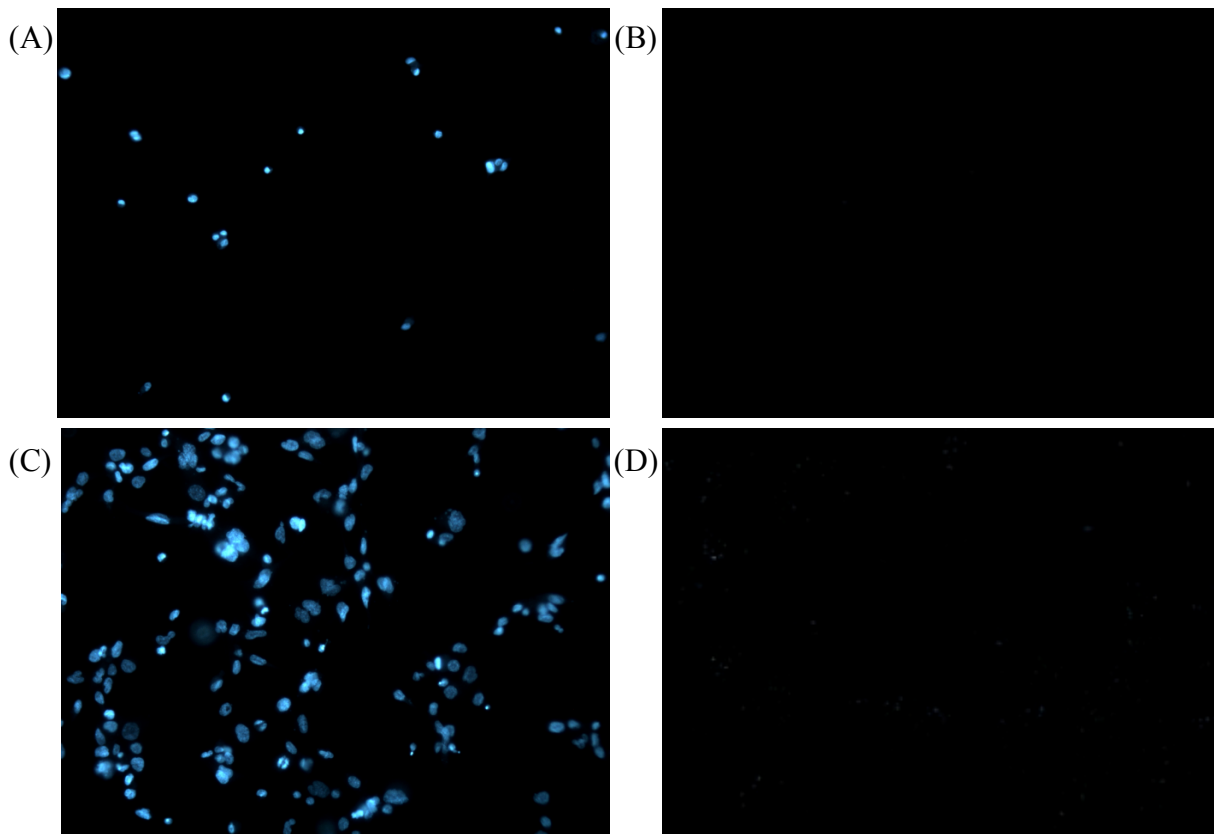


Abbildung 23: Relativer Migrationsassay. (A) primäre mvEZ PV 5 mit FBS (B) primäre mvEZ PV 5 ohne FBS (C) upcyte[®] mvEZ PV 18 mit FBS (D) upcyte[®] mvEZ PV 18 ohne FBS. Vergrößerung 200x

3.1.4.6 Sprouting-Assay

Der Sprouting-Assay ist ein *in-vitro* Modell, welches den angiogenen Invasionsvorgang beschreibt. Diese Eigenschaft ist ein weiteres Charakteristikum, das zum Vergleich von upcyte[®] mvEZ mit primären mvEZ verwendet wurde. Zur Bestimmung der Kapillarsprossung wurden Sphäroide aus verschiedenen Zelltypen (siehe Abb. 24) mit definierter Zellzahl (5.000 Zellen/Sphäroid) in ein Kollagengel eingebettet. Durch die Stimulation mit VEGF kam es zu einer ausgeprägten, radialen Aussprossung von Kapillaren durch die Invasion der Zellen in die umgebene Kollagenmatrix (siehe Abb. 25). Im Gegensatz zu vielen 2D-Untersuchungen, ahmt der Sprouting-Assay die *in-vivo* Situation realistischer nach, da hier ein dreidimensionales Wachstum der kapillaren Strukturen aus Endothelzellen in die Matrix ermöglicht wird.

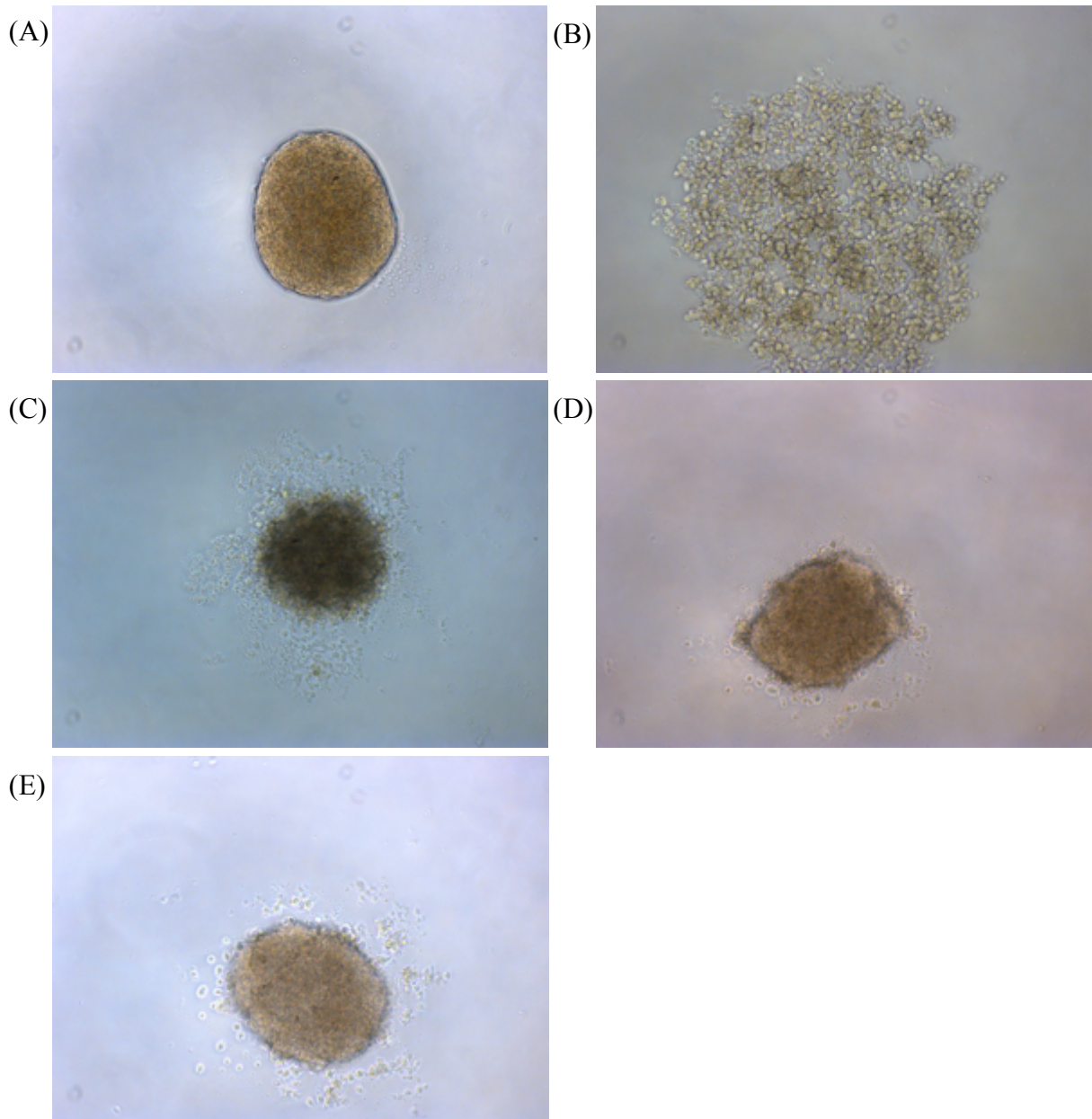


Abbildung 24: Sphäroide (5.000 Zellen). **(A)** Normal human dermal Fibroblasten NHDF P 4 **(B)** primäre mvEZ P 4 **(C)** upcyte[®] mvEZ PV 30 **(D)** NHDF/primäre mvEZ 50:50 **(E)** NHDF/upcyte[®] mvEZ 50:50. Vergrößerung 100x

In Abbildung 25 ist zu sehen, dass normale humane dermale Fibroblasten NHDF (A), primäre mvEZ (B), upcyte[®] mvEZ (C) und auch die Ko-Kulturen NHDF/primäre mvEZ (D) und

NHDF/upcyte[®] mvEZ in einer Kollagenmatrix ähnliche radiale, kapillarähnliche Aussprossungen bilden.

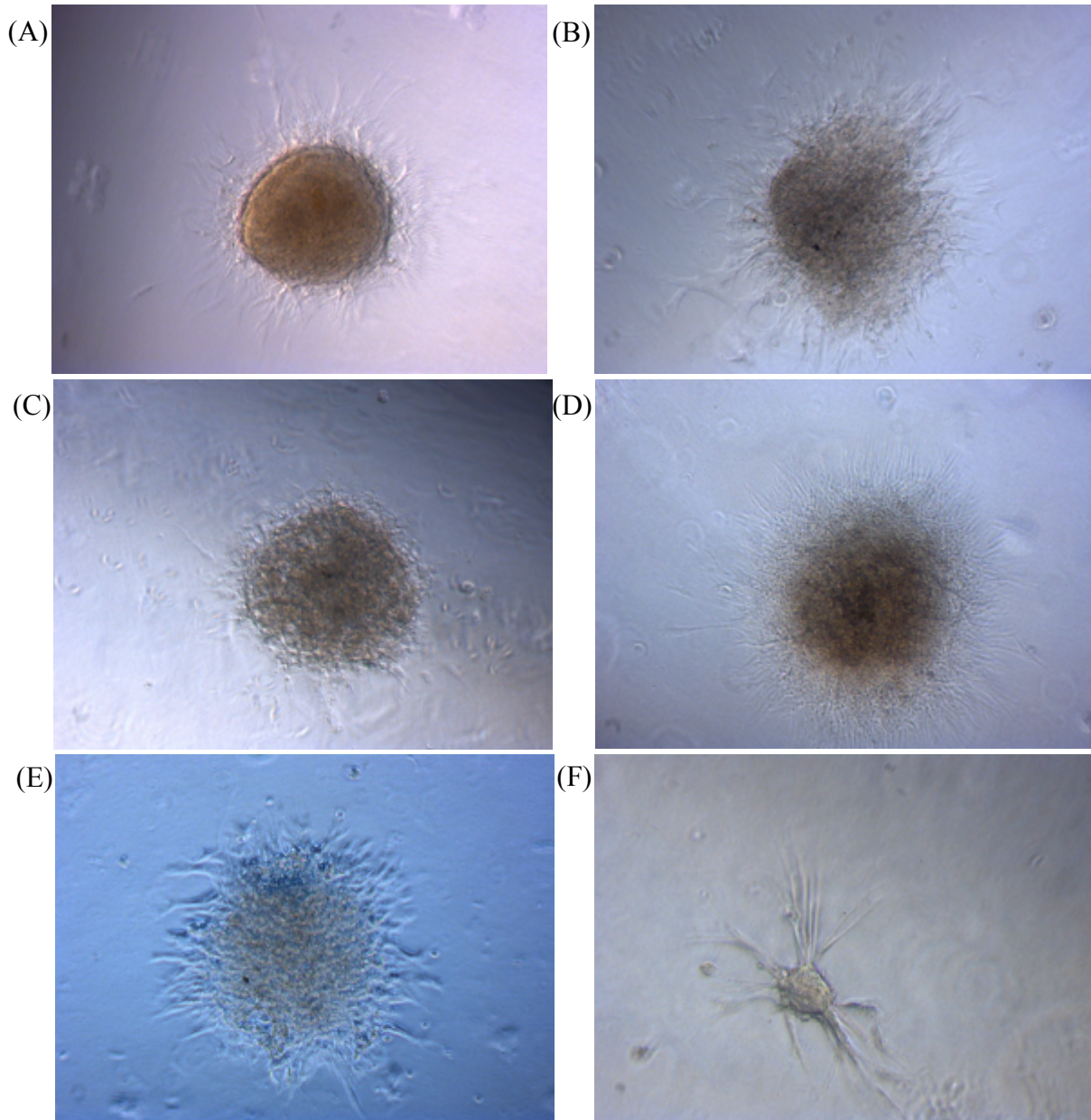


Abbildung 25: Repräsentative Aufnahmen der endothelialen Sprossung von Sphäroiden nach 24h. (A) NHDF P 4 (B) primäre mvEZ P 4 (C) upcyte[®] mvEZ PV 30 (D) NHDF/primäre mvEZ 50:50 (E) NHDF/upcyte[®] mvEZ 50:50 (F) NHDF/upcyte[®] mvEZ 50:50 Vergrößerung 200x. Vergrößerung 100x

3.1.4.7 Tube Formation Assay

Die Bildung kapillarähnlicher Zellformation ist ein wichtiger Teilprozess der Angiogenese *in-vivo* und wird von mikrovaskuläre Endothelzellen ausgeführt. Der Tube Formation Assay ermöglicht die *in-vitro* Untersuchung dieses Charakteristikum von primären mvEZ. Daher ist es ein wichtiges Kriterium, das Endothelzellen erfüllen müssen. Die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen *in-vitro*, ist ein Hinweis auf die Fähigkeit der Ausbildung von luminären Zellformationen bzw. Gefäßen *in-vivo*. Abbildung 26 zeigt einen Vergleich von primären mvEZ, HUVEC und upcyte[®] mvEZ bezüglich ihrer Fähigkeit kapillarähnliche Strukturen auszubilden. Die Zellen begannen nach 2h mit der Formation und nach 8h war ein komplettes Netzwerk an Kapillaren gebildet. Das Netzwerk bestand aus zentralen Lumina, welche von Endothelzellen umgeben waren. Primäre mvEZ (siehe Abb. 26 A), HUVEC (siehe Abb. 26 B) und upcyte[®] mvEZ (siehe Abb. 26 C, D) besitzen alle vergleichbare Fähigkeiten zur Bildung von kapillarähnlichen, verzweigten Strukturen auf einer Basalmembranmatrix.

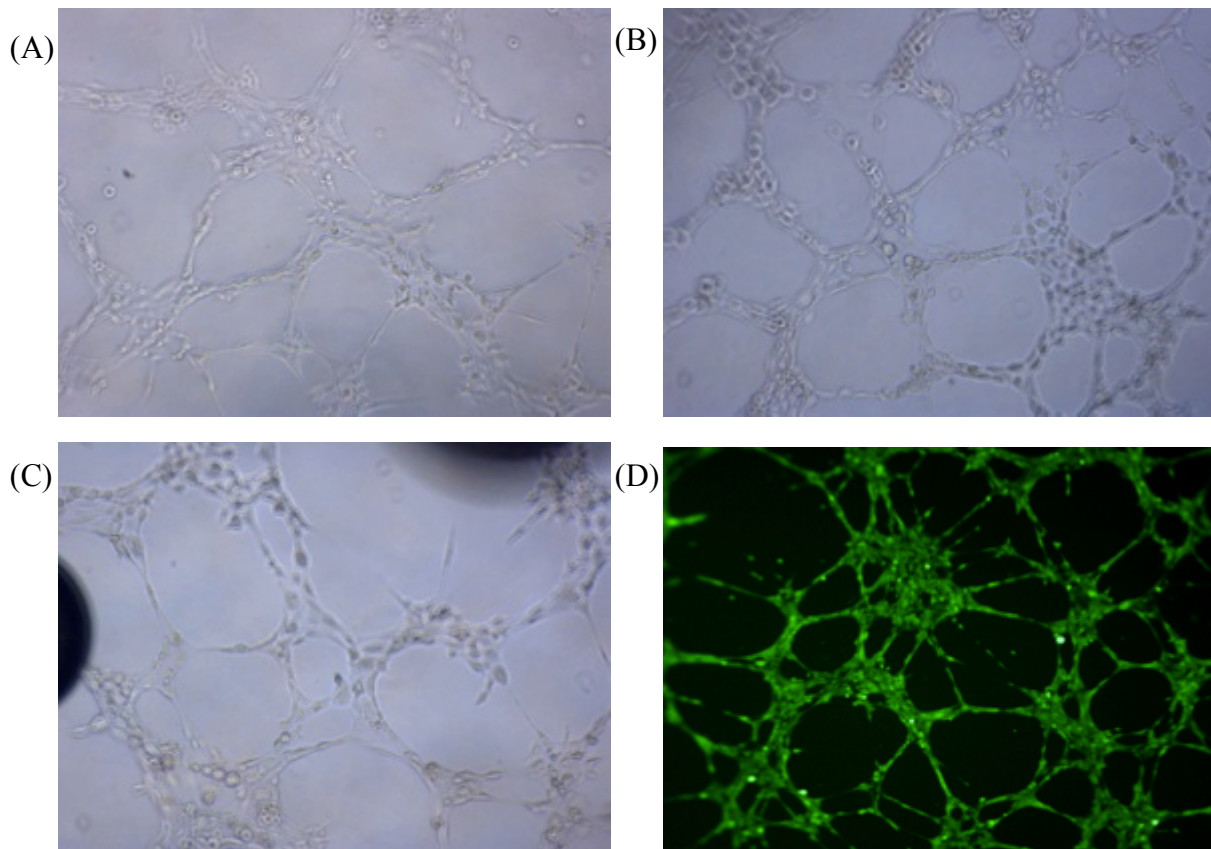


Abbildung 26: Tube formation Assay (50 000 Zellen/cm²). (A) Primäre mvEZ PV 9 (B) HUVEC PV 17,2 (C) Upcyte[®] mvEZ PV 19 (D) Upcyte[®] mvEZ PV 19 Calcein-Färbung . Vergrößerung 200x

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass primäre mvEZ maßgeblich an dem Prozess der Ausbildung neuer Gefäße aus einem bestehenden Kapillarnetz beteiligt sind. Zentrale Prozesse sind die Migration bzw. Invasion der Zellen, die Proliferation der Zellen und die Bildung luminärer Zellformationen. Daher müssen upcyte[®] mvEZ alle diese Aufgaben erfüllen, um vergleichbar mit primären mvEZ zu sein. Upcyte[®] mvEZ zeigen eine erweiterte Proliferationsfähigkeit (siehe 1.1.4.1), Migrieren in Richtung eines Lockstoffes (siehe 1.1.4.5), besiedeln eine künstliche extrazelluläre Matrix und bilden wie hier beschrieben netzartige, kapillarähnliche Strukturen aus. Upcyte[®] mvEZ zeigen alle Merkmale, die für die Angiogenese wichtig sind. Daher können upcyte[®] mvEZ als alternative Zellquelle für die Optimierung der Prevascularisierung von Transplantaten oder *in-vitro* Textsystemen genutzt werden. Vorteile von upcyte[®] mvEZ sind ihre erweiterte Proliferationsfähigkeit bei Erhalt der Primärzellmerkmalen und die leichtere Handhabung.

3.1.5 Abgrenzung zu Zelllinien

3.1.5.1 Dkk/Reic Expression

Humane primäre Zellen teilen sich *in-vitro* nur begrenzt und gehen danach in die Seneszenz. Das ist der physiologische Prozess der Zellalterung (Hayflick & Moorhead, 1961). Tsuji et al. (Tsuji et al. 2000) fand 1999 heraus, dass die Expression des Differenzierungsmarker REIC/Dkk (REIC= Reduced Expression in Immortalized Cells) in immortalisierten Zellen und Tumorzelllinien stark reduziert war. Gesunde humane Primärzellen hingegen zeigten ein wesentlich höheres Expressionslevel. Die Analyse des REIC/Dkk Gens wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der *Real-time* qPCR durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine quantitative Aussage zur veränderten Genexpression in den verschiedenen Zelltypen zu treffen anhand ihres Genexpressionslevels. Das Expressionsniveau der REIC/Dkk mRNA von upcyte[®] mvEZ war vergleichbar mit dem Expressionsniveau der REIC/Dkk mRNA in primären mvEZ (siehe Abb. 27). Upcyte[®] mvEZ zeigten eine unverändert hohe Expression von REIC/Dkk bis hin zu PV 27. Betrachtete man upcyte[®] mvEZ einer frühen PV (PD 5,4), war das Expressionsniveau bei 0,85-fachen des Expressionsniveau von primären mvEZ. Bei einer mittleren PV (PV 14,4) lag das Expressionsniveau bei dem 1,21 fachen und bei einer späten PV (PV 24,4) lag es beim 0,75-fachen des Expressionsniveau von primären Zellen.

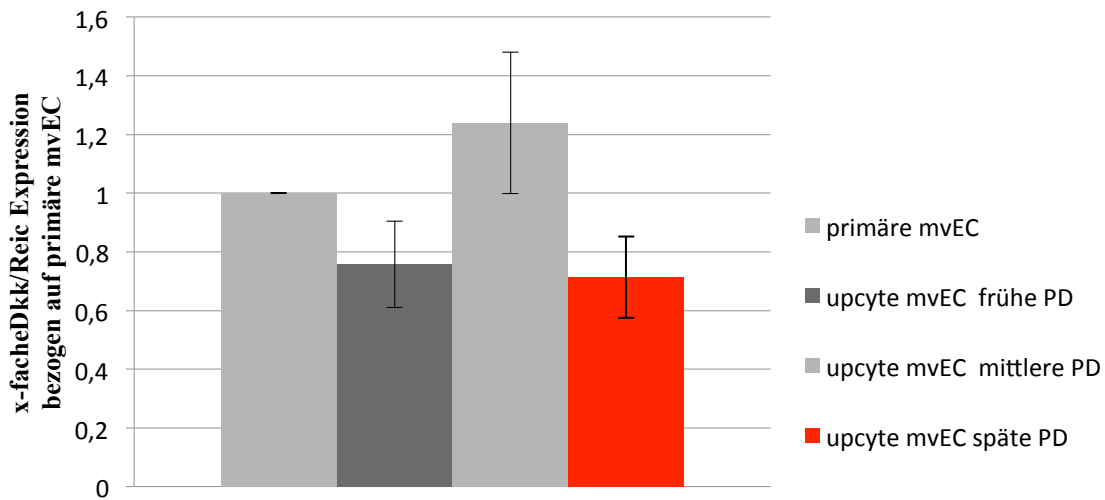


Abbildung 27: Expression des Differenzierungsmarker Dkk/Reic in verschiedenen PVs von upcyte[®] mvEZ. Die Expression der upcyte[®] mvEZ steht im Verhältnis zu der Expression bei primären mvEZ (GAPDH normalisiert).

3.1.5.2 Softagar-Assay

Der Softagar-Assay dient zur Analyse des verankerungsunabhängigen Wachstums und kann dazu genutzt werden, die Transformation einer Zelle vorherzusagen. Immortalisierte Zellen und Tumorzelllinien zeigen ein verankerungsunabhängiges Wachstum und bilden Zellkolonien ohne Kontakt zum Untergrund. Primäre Zellen hingegen zeigen kein Wachstum ohne Kontakt zum Untergrund. Sie proliferieren *in-vitro* nur auf einer soliden Unterfläche, bilden einen einschichtigen Zellrasen und stellen ihr Wachstum ein, sobald sie sich berühren. Sie sind kontaktinhibiert. Auch upcyte[®] mvEZ zeigten kein verankerungsunabhängiges Wachstum und waren kontaktinhibiert. Daher ist der Softagar-Assay eine weitere Möglichkeit, um den Primärzellcharakter der upcyte[®] mvEZ zu analysieren. Bei der Untersuchung wurden die Zellen in einen Softagar eingegossen und für 7 Tage auf Koloniewachstum (siehe Abb. 28) untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass die Hepatozyten Zelllinie HepG2 bereits am Tag 2 proliferierte und dreidimensionale Kolonien bildet. Im Gegensatz dazu zeigten die upcyte[®] mvEZ keinen Wachstum und auch nach 7 Tagen waren nur Einzelzellen erkennbar. Viele Zellen starben ab.

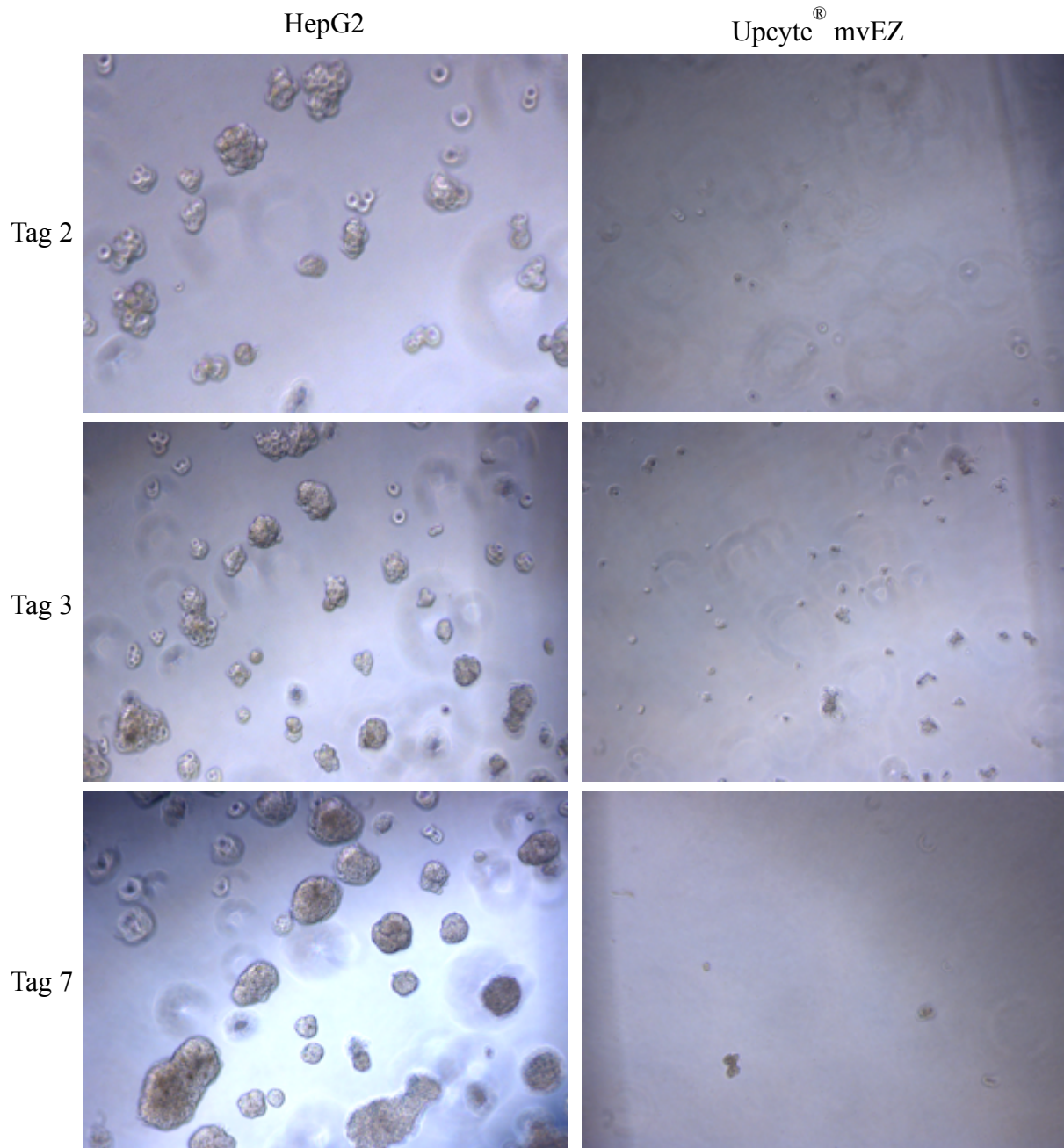


Abbildung 28: Softagar-Assay. HepG2 wachsen ohne Kontakt zum Untergrund innerhalb von 7 Tagen zu deutlichen dreidimensionalen Kolonien. Bei upcyte[®] mvEZ kommt es ohne Kontakt zum Untergrund zu keinem Koloniewachstum. Vergrößerung 200x

3.2 3D- Kultivierung und Wiederbesiedlung des Gefäßsystems der BioVaSc mit upcyte[®] mvEZ

3.2.1 Wiederbesiedlung der vaskularisierten Matrix mit upcyte[®] mvEZ

Das entnommene porcine Jejunalsegment wurde zunächst, wie in 2.2.5.1.2 beschrieben, von Zellen befreit. Die Azellularisierung wurde mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E Färbung) und Feugen Färbung überprüft. Bei der H&E Färbung werden saure Strukturen, wie die DNA oder das endoplasmatische Retikulum, blau gefärbt und basische Strukturen, wie Zellplasmaproteine, rot. Bei der Feugen Reaktion wird DNA rotviolette gefärbt. In Abbildung 29 wurden histologische Schnitte des porcine Jejunalsegment nach der Azellularisierung einer Feugen Färbung (siehe Abb. 29 A) und einer H&E Färbung (siehe Abb. 29 B) unterzogen. Beide Färbungen zeigten, dass lediglich ein paar Zellreste bzw. DNA Reste detektierbar waren und somit die Azellularisierung erfolgreich war.

Die Wiederbesiedlung der vaskularisierten Matrix erfolgte wie in 2.2.5.2 beschrieben. Für die Wiederbesiedlung wurden upcyte[®] mvEZ verwendet, welche alle Anforderungskriterien die unter 3.1 aufgelistet sind, erfüllten. Die Zellen wurden zuerst über den arteriellen Zufluss zugeführt und hatten 2h Zeit zu adhäreren. Danach folgte eine Besiedlung über den venösen Zufluss und die Zellen hatten weitere 2h Zeit. Anschließend wurde eine langsame Perfusion (Mittelwert 30 mmHg mit einer Amplitude von circa 10 mmHg) über Nacht gestartet. Am nächsten Tag wurde die Perfusion schrittweise auf 100 mmHg mit einer Amplitude von 20 mmHg erhöht. Die Analyse der Wiederbesiedlung findet in den nachfolgenden Abschnitten statt.

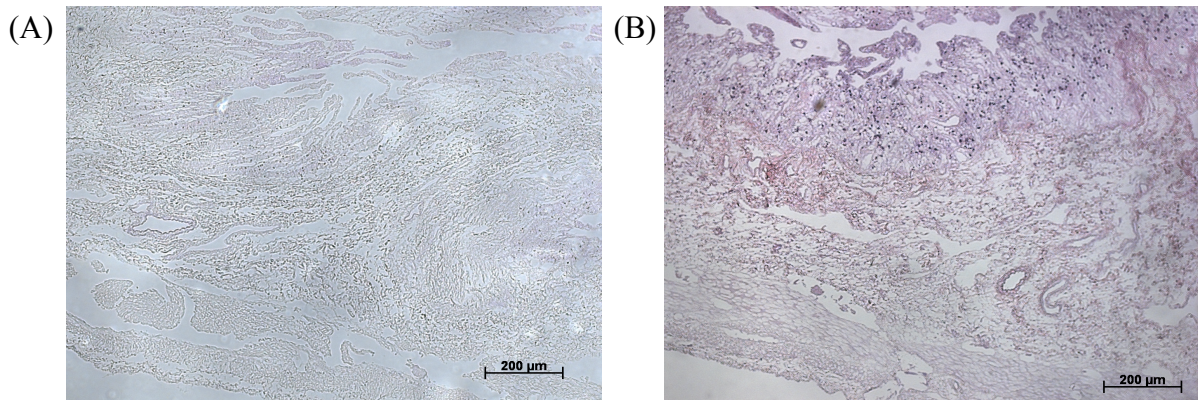


Abbildung 29: Mikroskopische Betrachtung der Azellularisierung. (A) Feugen Färbung (B) H&E Färbung. Vergrößerungsbalken: 200 µm

3.2.2 Mikroskopische Bewertung der Besiedlung nach Versuchsende

Nach Ende der Kulturzeit der wiederbesiedelten BioVaSc im Bioreaktor wurde das Gewebe entnommen und ein Teil der Matrix wie in 2.2.5.3.1 beschrieben in Paraffin eingebettet. Danach wurden histologische Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung ist eine Übersichtsfärbung, welche saure Strukturen (Zellkerne bzw. DNA oder das endoplasmatische Retikulum) blau und basische Strukturen (Zellplasmaproteine oder Kollagenfasern) rot färbt. Nach Versuchsende waren morphologisch vital aussehende Zellen detektierbar (blau). In Abbildung 30 ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen (blau) die Gefäße wiederbesiedelt haben. Die upcyte[®] mvEZ kleideten die Gefäßwände einschichtig aus (siehe Abb.30 B). Wenige Zellen waren auch in das Darmlumen und in die Matrix migriert (siehe Abb. 30 F).

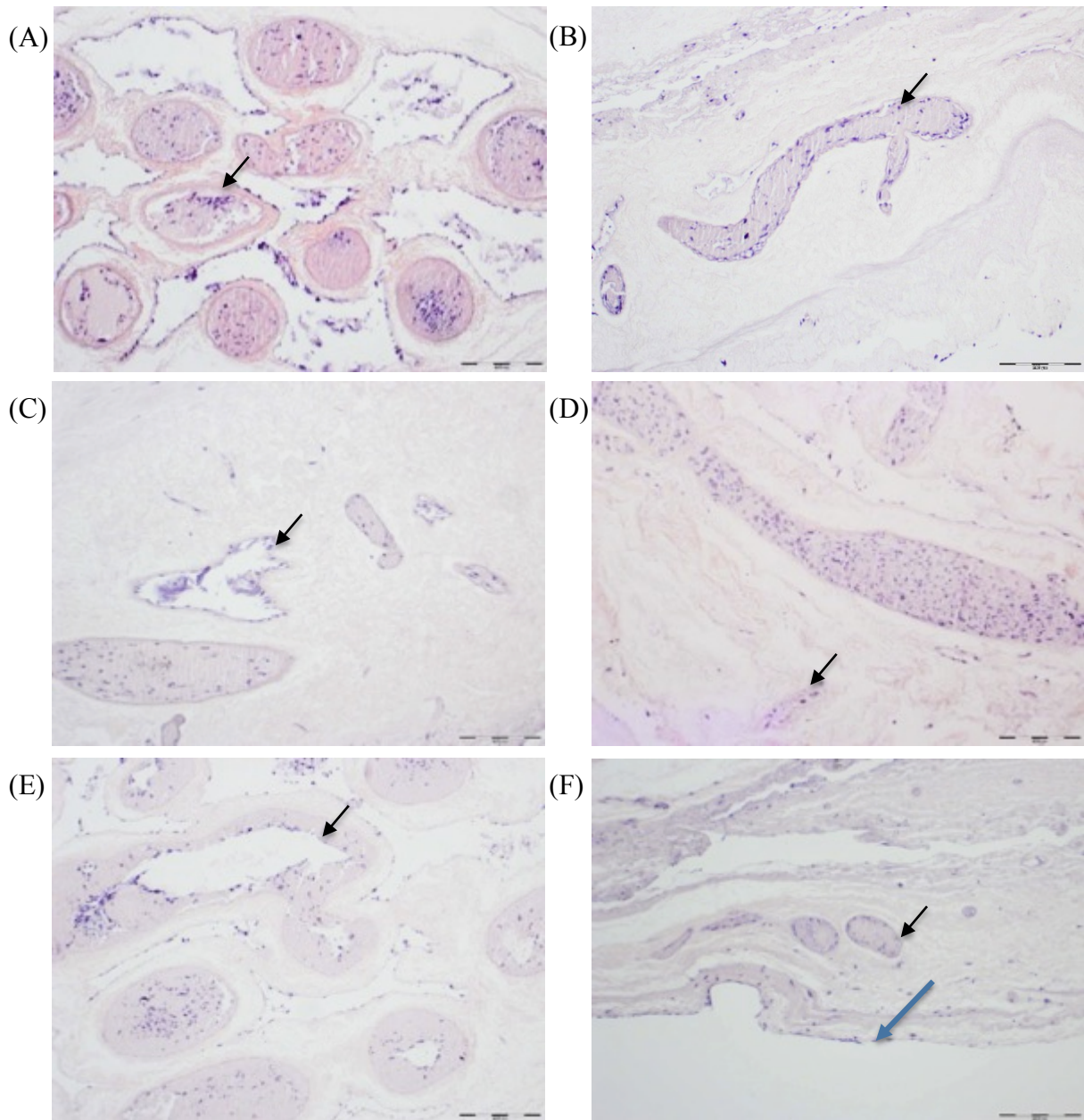


Abbildung 30: Mikroskopische Betrachtung histologischer Schnitt der wiederbesiedelten BioVaSc nach Versuchsende. (A-F) H&E Färbung. Upcyte® mvEZ (blau) besiedelten die Gefäße wieder. Sie kleideten die Gefäßwände einschichtig aus (schwarze Pfeile). Wenige der Zellen waren auch in das Darmlumen der Matrix migriert (blauer Pfeil). Vergrößerung: 100x

Zusätzlich wurde ein Teil der Matrix zur Beurteilung der Zellviabilität für 3 Stunden in Medium mit MTT inkubiert (siehe 2.2.5.3.4). Im Anschluss wurde die Matrix lichtmikroskopisch analysiert. Die Bilder des MTT-Tests wurden durch die Matrix aufgenommen. Der Zellviabilitätstest mit MTT beruht darauf, dass vitale Zellen das gelbe MTT in blaues Formazan metabolisieren. Lebende Zellen erscheinen blau. In Abbildung 31 sind die Gefäße der BioVaSc deutlich blau gefärbt, d.h. die Gefäße sind mit metabolisch aktiven, vitalen upcyte[®] mvEZ besiedelt.

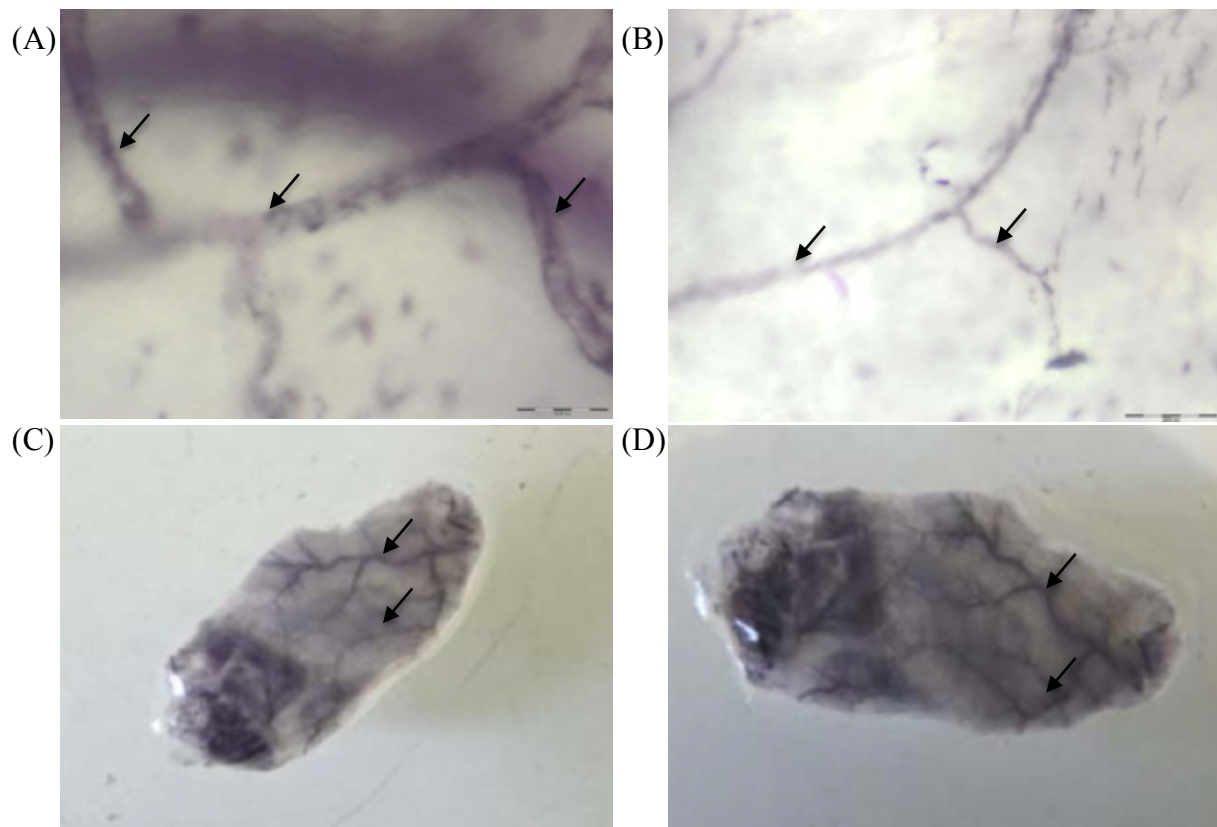


Abbildung 31: Mikroskopische Betrachtung der wiederbesiedelten BioVaSc nach Versuchsende (A-B) MTT-Test Vergrößerungsbalken 50 µm (C-D) MTT-Test auf eine Stück der BioVaSc. Die Gefäße sind mit vitalen, metabolisch aktiven Zellen wiederbesiedelt (schwarze Pfeile).

3.2.3 Immunhistologische Bewertung der Besiedlung

Die Besiedlung des Gefäßsystems bzw. die upcyte[®] mvEZ wurden nach Versuchsende immunhistologisch überprüft. Analysiert wurde die Expression von endothelzellspezifischen Expressionsmarkern wie CD31, vWF und eNOS. Die Zellen wurden ebenfalls vor Versuchsstart auf die Expression der selben Marker überprüft (siehe 3.1.4.2) und nur zur Wiederbesiedlung verwendet, wenn sie eine mit primären mvEZ vergleichbare Expression zeigten. Ein Teil der wiederbesiedelten BioVaSc wurde dafür wie in 2.2.5.3.1 beschrieben in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte davon angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit Antikörpern gegen CD31, vWF und eNOS immunhistologisch gefärbt, um den Differenzierungsstatus der Zellen zu überprüfen. Die upcyte[®] mvEZ zeigten auch nach zweiwöchiger Kultur im Bioreaktor die endothelzellspezifischen Expressionsmarker CD31 (siehe Abb. 32 B), vWF (siehe Abb. 32 A) und eNOS (siehe Abb. 32 C). Auch bei dieser Färbung wurde deutlich, dass die upcyte[®] mvEZ das Gefäßsystem der BioVaSc effizient wiederbesiedelt hatten. Die Zellkerne stellten sich unter dem Mikroskop blau dar und die Bereiche, in denen eine Antikörperbindung stattgefunden hat, braun-rot. In Abbildung 32 wird deutlich, dass die upcyte[®] Zellen die Gefäße auskleiden, da im Bereich der Gefäßwand eine braun-rot Färbung erkennbar ist.

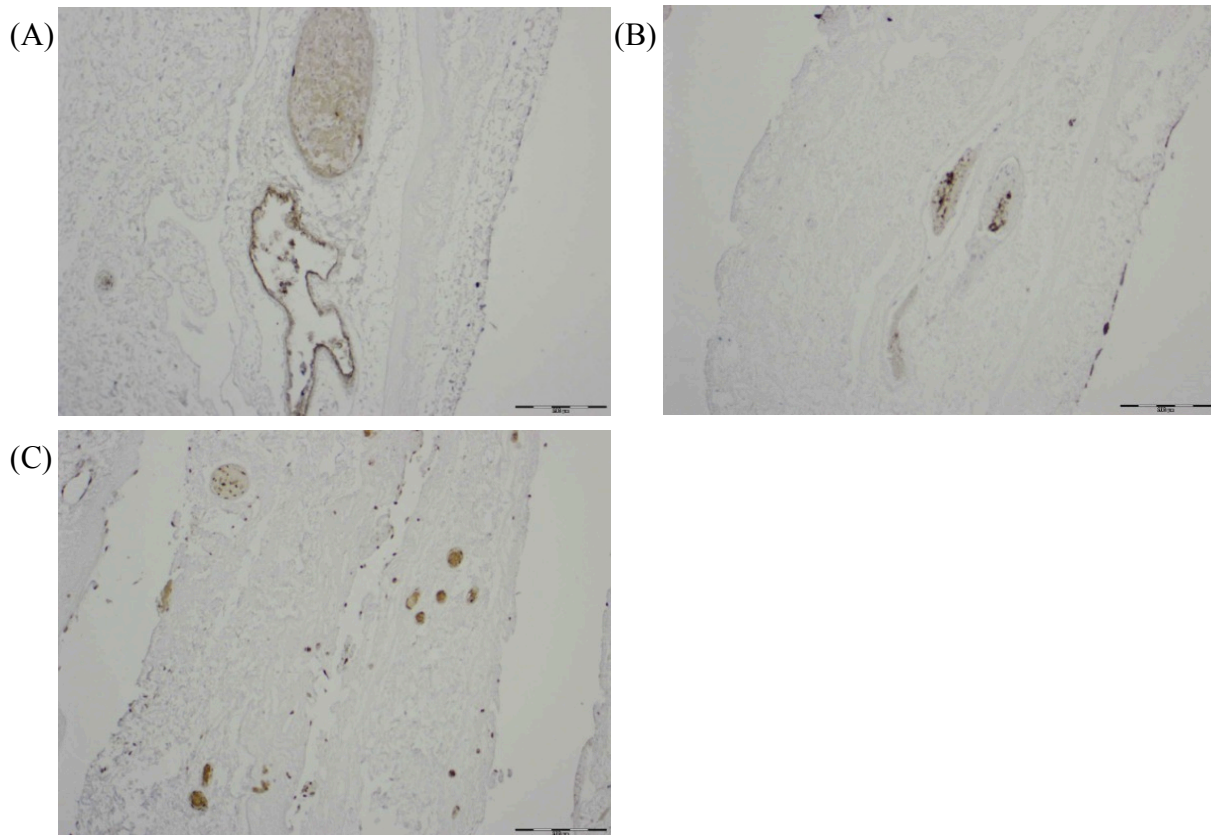


Abbildung 32: Mikroskopische Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten, wiederbesiedelten BioVaSc nach Versuchsende. (A) vWF (B) CD31 (C) eNOS. Positive Antikörperfärbung stellt sich rot-braun dar (schwarze Pfeile). Vergrößerung 100x

3.2.4 Histologische Analyse der Besiedlung mittels Fluoreszenzmarkierung der Zellen

Die sogenannte Lebend-Tod-Färbung ist eine zweifarbige, auf Fluoreszenz basierende Methode und bietet die Möglichkeit die Viabilität der Zellen zu bestimmen. Dabei werden Fluoresceindiacetat und Propidiumjodid verwendet. Fluoresceindiacetat wird von vitalen Zellen in Fluoresceinum gewandelt, welches grün fluoresziert. Propidiumjodid hingegen ist in der Lage die Zellmembran von toten Zellen zu überwinden und in die DNA zu interkalieren. Tote Zellen leuchten rot. Die Lebend-Tot Färbung (siehe Abb. 33) ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass die Blutgefäße der BioVaSc mit lebenden Zellen wiederbesiedelt wurden (grün) und nur wenige Zellen abgestorben waren (rot). In Abbildung 33B kann man auch eine

Kapillarsprossung aus einem bestehenden Gefäß der BioVaSc beobachten. Die upcyte[®] mvEZ wanderten in das Intersitium und bildeten luminäre Zellformationen, aus denen neue Gefäße reiften.

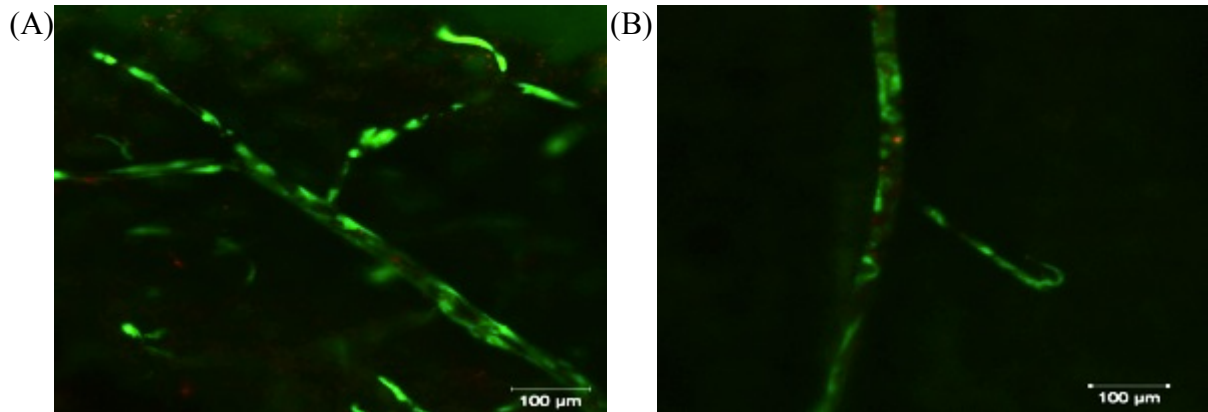


Abbildung 33: Lebend-Tot Färbung der wiederbesiedelten BioVaSc nach Versuchsende. (A-B) Lebend-Tot Färbung. Vergrößerungsbalken: 100 µm

4. Diskussion

Das Arbeitsgebiet Tissue Engineering beschäftigt sich mit dem Nachzüchten von natürlichem Gewebe *ex-vivo*, die *in-vivo* die Organfunktion wieder herstellen bzw. ersetzen. Es ist ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet zwischen Naturwissenschaftlern, Medizinerinnen und Ingenieuren. Im Fokus steht die Aufklärung der physiologischen Mechanismen des jeweiligen Gewebe und die Entwicklung von Strategien zur Behandlung von Organversagen bzw. Organverlust (Fuchs et al. 2001; Atala 2004). Es werden Heilungsprozesse unterstützt, nicht funktionsfähiges Gewebe regeneriert oder zerstörtes Gewebe ersetzt. Ein weiteres Anwendungsgebiet für Tissue Engineering Konstrukte ist der Einsatz als *in-vitro* Testsysteme für pharmakologische, toxikologische, kosmetische oder Grundlagenforschung (Schanz et al. 2012). Tissue Engineering rückt durch den akuten Spenderorganmangel in Deutschland immer mehr in das Blickfeld der Öffentlichkeit. Bisher konnten nur artifizielle Gewebekonstrukte unter 200 µm Dicke hergestellt werden wie zum Beispiel Haut oder avaskuläre Strukturen wie zum Beispiel Knorpel. Hier reicht die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Zellen alleine durch Diffusion aus (Folkman & Hochberg 1973; Kannan et al. 2005). Bei dickeren Gewebekonstrukten ist die Versorgung der Zellen durch Diffusion unzureichend und ein Blutgefäßsystem muss aufgebaut und integriert werden (Kneser et al. 2006; Arosarena 2005). Hierfür müssen Strategien zur Prävascularisierung der artifiziellen Gewebe entwickelt werden, um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im gesamten Konstrukt zu gewährleisten (Novosel et al. 2011). Dabei ist es unerlässlich eine geeignete Zellquelle zu erschließen und die Funktionalität der Zellen zu gewährleisten.

4.1 2D-Kultivierung und Charakterisierung der Zellen

4.1.1 Zellisolation

Die Zellisolationmethode mit einer Kombination aus Dispase und Trypsin war effizient für die Isolation von für mikrovaskuläre Endothelzellen. Die Zellausbeute war abhängig von der Größe der Biopsie und es gab keine Probleme mit der Sterilität. Kontamination mit Fibroblasten, Perizyten oder anderen Fremdzellen traten selten auf und konnten mit der Behandlung von Versene[®] (PBS⁻/EDTA) während der Subkultivierung entfernt werden. Bindegewebszellen reagieren empfindlicher als Endothelzellen auf PBS⁻/EDTA und lösen sich daher schneller von der Zellkulturflasche. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um Kontaminationen mit Bindegewebszellen zu entfernen. Die Kontamination von Fremdzellen ist das Hauptproblem bei der Isolation von primären mvEZ. Es gibt verschiedene Methoden um Kontaminationen zu entfernen (Lou et al. 1998; Scott & Bicknell 1993), wie die Verwendung von selektivem Medium (Gitlin & D'Amore 1983), die Behandlung mit Trypsin (Rupnick et al. 1988), die mechanische Entfernung (Marks et al. 1985), die Fluoreszenzmarkierung endothelzellspezifischer Marker mit anschließender Zellsortierung mittels FACS (Carley et al. 1992) oder auch die Zellsortierung mit UEA I-markierten magnetischen Perlen (Grimwood et al. 1995; Jackson et al. 1990).

Bei der hier verwendeten Technik, der Trennung von Dermis und Epidermis, konnte bereits ein Teil der nicht erwünschten Zellen wie Keratinozyten oder auch Melanozyten aus der mvEZ Fraktion entfernt werden. Dadurch wurde die Reinheit der Kultur deutlich verbessert. Die Dispase trennte nicht nur Dermis und Epidermis, sondern lockerte auch das Gewebe der Dermis auf, sodass der Prozess des Gewebeaustreichens vereinfacht wurde. Aus dem weichen, aufgelockerten Gewebe ließen sich durchschnittlich 5×10^5 vitale mvEZ pro 4 cm^2 isolieren. Verglichen mit anderen Isolationstechniken, wie z.B. mit Trypsin/EDTA, ist die Verwendung von Dispase schonender für die Zellen (Roberts & Brunt 1985; Thilo et al. 1980). Dispase ist eine Protease aus dem Bakterium *Bacillus polymyxa* und schneidet Fibronektin und Kollagen VI. Sie trennt, auch bei langen Inkubationszeiten von bis zu 1 Stunde, die Zellen aus ihrem Kollagengerüst, ohne die Zellen dabei zu beschädigen. Trypsin hingegen greift nach zu langer Inkubation auch intrazelluläre Proteine an und schädigt somit die Zellen. Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet selektiv Peptidbindungen nach Lysin,

Arginin und modifiziertem Cystein (Lindl 2002; Stein et al. 2010). Normand und Karasek konnten bei der Verwendung von Trypsin eine stärkere Kontamination von nicht-endothelialen Zellen wie dendritische Zellen beobachtenden (Normand & Karasek 1995). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit für die Isolation der empfindlichen primären humanen mvEZ eine Kombination aus langer Inkubation mit Dispase und kurzer Inkubation von Trypsin angewandt. Die frisch isolierten Zellen wurden in einem für mikrovaskuläre Endothelzellen selektiven Medium kultiviert. Der Wachstum der Endothelzellen wurde durch im Medium enthaltene Zusätze begünstigt (Klagsbrun & D'Amore 1991). Eine mögliche Verbesserung bzw. Bestätigung der Reinheit würde durch einen weiteren Selektionsschritt mittels Fluoreszenzmarkierung eines mvEZ spezifischen Marker mit anschließender Zellsortierung im FACS erreicht werden.

4.1.2 Transduktionseffizienz

Lentiviraler Gentransfer ist ein gängiges Werkzeug in der Biotechnologie um Transgene in Zellen einzubringen und zu exprimieren. Lentiviren haben einen ausgeprägten Tropismus und transduzieren auch mitotisch inaktive Zellen. Außerdem integrieren lentivirale Vektoren fest in das Wirtsgenom und gewährleisten daher eine dauerhafte Expression des transferierten Gens. Auf der einen Seite ist die feste Integration in das Wirtsgenom ein Vorteil auf der anderen Seite birgt sie die Gefahr einer insertionalen Mutagenese in der Empfängerzelle. Es kann durch die Integration in das Wirtsgenom zu einer unnatürlichen Aktivierung benachbarter Gene kommen und die Zelle kann entarten (Pauwels et al. 2009; Gray 1991). Aufgrund der gesicherten dauerhaften Expression des transferierten Gens wurde in dieser Arbeit ein lentivirales System etabliert und für die Transduktion der upcyte[®] Gene in primären mikrovaskulären Endothelzellen verwendet. Zur Bestimmung des Virustiters unterscheidet man prinzipiell zwischen funktionaler und partikel-basierter Messmethode. Bei der funktionalen Messmethode werden Zielzellen mit unterschiedlichen Verdünnungen von Virusüberstand transduziert und anschließend die Häufigkeit der transduzierten Zellen über die Expression eines viral exprimierten Markergens bzw. über die Anzahl der lentiviralen Integrationen analysiert. Ein häufig verwendetes Markergen ist GFP, das für das grün fluoreszierende Protein kodiert, über das die Anzahl erfolgreich transduzierter Zellen mittels FACS leicht quantifiziert werden kann. Bei der partikel-basierten Methode wird die Anzahl

der viralen Partikel über die Messung der Hüllproteine oder der viralen RNA bestimmt. Diese Methode ist zwar schneller, gibt aber keine Auskunft über die Anzahl der funktionellen Partikel.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Titer des für den upcyte[®] Prozess verwendeten lentiviralen Vektors C66SB durch die Quantifizierung der viralen RNA mittels quantitativer PCR bestimmt. Um einen Hinweis auf den funktionalen Titer des C66SB zu erhalten, wurde in einem parallel durchgeführten Experiment primäre mvEZs mit dem lentiviralen Vektor (pHR'-GFP-SIN), der für GFP kodiert ansonsten aber das gleiche Vektor-Rückgrat wie C66SB aufweist, transduziert. Bei der Viruspartikelmenge MOI 100 wurde eine Transduktionseffizienz von 11.91% GFP-positiver Zellen erzielt. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Vektoren besteht in der Länge. Durch die unterschiedliche Expressionskassette ist der GFP-Vektor pHR'-GFP-SIN mit 9790 bp 1,2fach größer als der upcyte[®] Vektor C66SB (7891 bp). Kumar et al. beschreibt den Zusammenhang zwischen Virustiter und Vektorlänge wie folgt: „der Virustiter sinkt semi-logarithmisch mit zunehmender Vektorlänge“ (Kumar et al. 2001). Der C66SB Vektor müsste demnach doppelt so effizient sein, sprich bei der gegebenen Menge an Viruspartikeln ca. 24% der Zellen transduzieren. Mithilfe eines Fusionkonstrukt von den upcyte[®] Genen und einem Reporter gen, wie zum Beispiel GFP könnte der funktionale Titer direkt mit dem später verwendeten lentiviralen Konstrukt ermittelt werden. Der Umweg über den lentiviralen Vektor pHR'-GFP-SIN wäre dann nicht nötig.

4.1.3 Charakterisierung der upcyte[®] mvEZ

Das Problem bei der Verwendung von humanen primären mvEZ ist ihre geringe Verfügbarkeit und der oft schnelle Verlust ihrer typischen Endothelzellmarker *in-vitro* (Unger et al. 2002; Richard et al. 1998). Nach wie vor stellt die Isolierung und die Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen in Reinkultur eine Herausforderung dar (Winiarski et al. 2011; Unger et al. 2002). Die Ausbeute an Zellen bei der Isolierung reicht meist nicht aus, um Trägermaterialien zu vaskularisieren (Kim & von Recum 2008) oder standardisierte *in-vitro* Testsystemen aufzubauen (Unger et al. 2002). Zusätzlich ist aufgrund unterschiedlicher Spender von primären Zellen keine Standardisierung möglich. Primäre humane mvEZ haben

zudem eine sehr limitierte Proliferationskapazität und stellen ihren Wachstum nach durchschnittlich 15 Zellteilungen ein (Kim & von Recum 2008; Karasek 1989). Dazu kommt, dass die primären Zellen innerhalb kurzer Zeit dedifferenzieren und ihren Primärzellcharakter *in-vitro* verlieren (Fodor 2003; Unger et al. 2002). Diese Probleme gestalten den Einsatz von humanen primären mvEZ sowohl im Tissue Engineering als auch in der Entwicklung von *in vitro* Testsystemen schwierig. Die upcyte[®] Technologie bietet hierfür einen Lösungsansatz. Upcyte[®] mvEZ haben eine erweiterte Proliferationsfähigkeit und teilen sich bis zu 27 mal, bevor sie seneszent werden. Im Vergleich dazu teilen sich humane primäre mvEZ nur 15 mal bevor sie in die Seneszenz gehen (Kim & von Recum 2008; Ades et al. 1992). Durch die zusätzlichen möglichen 15 Populationsverdopplungen können 3×10^4 fach so viele upcyte[®] mvEZ im Vergleich zu primären mvEZ von einem Spender generiert werden. Der wichtigste Punkt bei der Generierung von upcyte[®] mvEZs ist, dass sie ihre endothelzellspezifischen Merkmale *in-vitro* nicht verlieren. Upcyte[®] mvEZ haben eine Generationszeit von 42h bis 56h im Vergleich zu 56h bis 84h bei primären mvEZs. Daher haben upcyte[®] mvEZ einen Wachstumsvorteil gegenüber Primärzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass upcyte[®] mvEZ bezüglich ihrer Morphologie, der Expression endothelzellspezifischer Marker und auch in ihrer biologischen Funktionalität sehr gut mit primären mvEZ vergleichbar sind und eine echte Alternative zu diesen darstellen. Während der Proliferation zeigten die upcyte[®] Zellen eine längliche Morphologie und sobald sie konfluent gewachsen waren, nahmen sie die für primäre mvEZ typische plastersteinartige Gestalt an (Folkman et al. 1979; Manconi et al. 2000). Upcyte[®] mvEZ sind einfach in der Handhabung. Die Zellen wachsen auf unbeschichteten Plastik-Zellkulturplatten, sind kryokonservierbar und benötigen nur 5% fötales Kälberserum. In der Literatur wird beschrieben, dass primäre mvEZ bis zu 30% Serum benötigen, um *in vitro* zu wachsen (Karasek 1989; Swerlick et al. 1992). Davison und Kollegen isolierte dermale mvEZ aus humaner Vorhaut und definierte 50% human Serum und Fibronectin beschichtete Platten als optimale Kulturbedingungen für eine maximale Proliferationsrate (Davison et al. 1980). Für den Einsatz im Tissue Engineering sollten die Zellen möglichst in einem chemisch definierten Medium kultiviert werden, da tierische Seren potentiell Risiko für Infektionen und immunologische Reaktionen mit sich bringen. Upcyte[®] mvEZ werden zur Zeit mit nur sehr wenig fötalem Kälberserum kultiviert. In weiterführenden Experimenten soll

auf chemisch definiertes Medium gewechselt werden und so den Einsatz im Tissue Engineering zu erleichtern.

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung der Qualität von upcyte[®] mvEZ im Vergleich zu primären mvEZ ist die Expression typischer Endothelzellmarker. Die Glykoproteine, vWF und CD31, werden überwiegend von Endothelzellen exprimiert (Jaffe et al. 1973; Grimwood et al. 1995; DeLisser et al. 1994). Die Expression beider Glykoproteine konnten bei upcyte[®] mvEZ detektiert werden. CD31 wurde vorwiegend in interzellulären Domänen der Endothelzellen angereichert (Muller et al. 1989) und vWF zeigte eine granuläre perinukleäre Verteilung (Jaffe 1977). Upcyte[®] mvEZ exprimierten weitere endothelzellspezifische Schlüssel-moleküle wie eNOS (Dudzinski et al. 2006), CD105 (Gougos & Letarte 1988), CD146 (Q. Li et al. 2003) und VEGFR-2 (Hanahan 1997; Hewett & Murray 1996). Die Expression der Marker wurde zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft und konnte bis in hohe PV (PV 20-30) der upcyte[®] mvEZ Kultur nachgewiesen werden. Primäre mvEZ zeigten in der Expression der Marker in höheren PVs einen quantitativen Unterschied. Sie exprimierten die Marker vergleichbar zu upcyte[®] mvEZ bis PV 10, dann konnte eine Abnahme in der Expression beobachtet werden. Primäre mvEZs wuchsen ab PV 10 langsamer und verändern ihre Morphologie. Das spiegelt den normalen Prozess der Zellalterung wider (Erusalimsky & Skene 2009; Herrera et al. 2010). Primäre mvEZ haben eine geringe Lebensspanne und verlieren ihre spezifischen Expressionsmarker *in-vitro* (Kim & von Recum 2008; Fodor 2003). Bei der Verwendung von Expressionmarkern zur Charakterisierung der Zellen muss bedacht werden, dass sie teilweise auch von anderen Zelltypen exprimiert werden. Nur durch ein Set an Markern lässt sich ein Zelltyp einwandfrei identifizieren. Der vWF wird beispielsweise auch in Megakaryozyten exprimiert (Gebrane-Younes et al. 1988). Wichtig für die Qualität der Zellen ist, dass sie in Monokultur vorliegen und nicht mit Fremdzellen kontaminiert sind. Zum Ausschluss einer Kontamination wurde weiterhin die Expression von CD34 (Krause et al. 1996) und Kollagen I überprüft. CD34 ist ein Marker für Hämatopoetische Stammzellen und Endothelvorläuferzellen. Kollagen I wird in Fibroblasten, Myofibroblasten und Osteoblasten exprimiert und dient hier zum Ausschluss einer Kontamination mit Fibroblasten (Gay et al. 1976; Green et al. 1966). Beide Marker konnten bei den upcyte[®] mvEZ nicht detektiert werden. Eine weitere Endothelzellspezifische Eigenschaft ist die Bindung von *Ulex europaeus agglutinin I* Lektin an die alpha-L-Fucose enthaltene Kohlenhydratstrukturen von mvEZs. Dieses Merkmal von primären mvEZs soll

noch spezifischer und sensitiver als vWF zu bewerten sein (Jackson et al. 1990). Über 95% der upcyte[®] mvEZ waren positiv für UEA I gefärbt, was die Vergleichbarkeit von upcyte[®] und primären mvEZ unterstreicht. Auch hier wurden Zellen verschiedener PVs überprüft und auch upcyte[®] mvEZs aus hohen PVs (PV 24,4) zeigten die typische Färbung. Die Untersuchung der Morphologie, Proliferationskapazität und der zellspezifischen Marker dienen der Qualitätskontrolle der upcyte[®] mvEZ für ihre weitere Verwendung z. B. in *in-vitro* Testsystemen. Durch eine FACS Analyse könnten die Ergebnisse, die durch immunzytochemische Färbungen generiert worden sind, noch untermauert werden. Gerade zur Überprüfung der Reinkultur wäre die FACS Analyse ein gutes Werkzeug (Lou et al. 1998). Durch Markierung der Zellen mit endothelzellspezifischen Markern, wie zum Beispiel CD31 und vWF, und anschließender Zellsortierung mit dem FACS, werden Fremdzellen aussortiert.

Zusätzlich zu Morphologie, Proliferationskapazität und zellspezifischen Markern, sollten upcyte[®] mvEZ auch einige funktionelle Eigenschaften mit primären mvEZ teilen, wie zum Beispiel die Aufnahme von Dil-markiertem acetyliertem Low Density Lipoprotein (Dil-Ac-LDL) (Voyta et al. 1984) oder die Fähigkeit den Prozess der Angiogenese zu unterstützen. Hierzu gehören die Ausbildung von kapillarähnlichen, verzweigten Strukturen auf einer Basalmembranmatrix sowie die Fähigkeit zur Migration. Primäre mvEZ und upcyte[®] mvEZ konnten Dil-Ac-LDL gleichermaßen aufnehmen. Nahezu alle Zellen *in-vitro* zeigten diese Fähigkeit.

Primäre mvEZ sind maßgeblich an der Ausbildung neuer Gefäße aus einem bestehenden Kapillarnetz beteiligt. Die Angiogenese beschränkt sich auf den Bereich des mikrovaskulären Systems (Jackson & M. Nguyen 1997; Staton et al. 2009). Zentrale Prozesse sind die Migration bzw. Invasion der Zellen in das Interstitium, die Proliferation der Zellen und die Bildung luminärer, verzweigter Zellformationen (Carmeliet 2000; Folkman & Shing 1992). Daher müssen upcyte[®] mvEZ alle diese Aufgaben erfüllen, um mit primären mvEZ vergleichbar zu sein. Ein wichtiger Teilprozess der Angiogenese ist die bereits erwähnte Ausbildung von luminären, verzweigten Zellformationen bzw. Gefäßen *in-vivo*. Dieser Prozess wird *in-vitro* durch den sogenannten Tube Formation Assay nachgeahmt. Hierbei bilden auf einer Basalmembranmatrix ausplattierte primäre mvEZ kapillarähnliche, verzweigte Strukturen (Arnaoutova et al. 2009; Lawley & Kubota 1989). Außerdem zeigt der

Versuch auch die Fähigkeit der Adhäsion, Migration, Differenzierung und den Zusammenschluss der Zellen (Staton et al. 2009). Upcyte[®] mvEZs bilden im gleichen Maße kapillarähnliche, verzweigte Zellformationen wie primäre mvEZs. Die Wahl der Matrix ist, da sie Einfluss auf die Differenzierung der Zellen hat, entscheidend (Auerbach et al. 1991). Bei der Kultur von Endothelzellen auf Kollagen I und III beschichteten Platten proliferieren die Zellen und bilden nur noch gelegentlich kapillarähnliche Strukturen. Im Gegensatz dazu proliferieren Endothelzellen auf Kollagen IV und V beschichteten Platten nur gering und bilden verstärkt kapillarähnlichen Strukturen (Madri & Williams 1983). Die vom Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom gewonnen Basalmembran Matrix (MatrigelTM) ist die leistungsfähigste Matrix zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen. Ein Nachteil des Tube Formation Assay ist die Abhängigkeit der Zelldifferenzierung von der gewählten Matrix und somit die geringe Vergleichbarkeit bei der Verwendung unterschiedlicher Matrices der Methoden. Ein weiterer Punkt, den man bei dieser Methode unabhängig von der ausgewählten Matrix beachten muss, ist dass auch andere Zelltypen wie humane Fibroblasten oder Glioblastoma-Zellen in der Lage sind auf einer Basalmembranmatrix kapillarähnliche Strukturen auszubilden (Donovan et al. 2001; Vernon et al. 1992). Um ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten, sollte daher der Tube Formation Assay nur mit einer vorher definierten, reinen Zellpopulation durchgeführt werden. Zusätzlich sollten mehrere *in-vitro* Angiogenese Assays miteinander kombiniert werden, um verschiedene Teilprozesse der Angiogenese abzudecken und um die Ergebnisse zu bestätigen. Eine weitere Untersuchung zur Überprüfung der Fähigkeit luminären, verzweigten Zellformationen bzw. Gefäßen *in-vivo* auszubilden ist der Sprouting Assay. Der Sprouting-Assay ist ein *in-vitro* Modell für den angiogenen Migrationsvorgang (Metzger et al. 2011; Korff & Augustin 1999). Im Vergleich zum Tube Formation Assay wird hier die Ausbildung dreidimensionaler luminären Zellformationen in einer Kollagenmatrix untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Sphäroide aus primären mvEZs, NHDF und upcyte[®] mvEZs gebildet. Durch die Stimulation mittels VEGF bildeten die Zellen radiale, dreidimensionale Aussprossungen. Dieser Assay ahmt die *in-vivo* Situation sehr gut nach, da hier dreidimensionaler, kapillarähnlicher Wachstum überprüft wird. Viele Angiogenese Assays bieten nur die Möglichkeit zweidimensionale Untersuchungen durchzuführen. Bei dreidimensionalen Assays gilt es zu beachten, dass die Gelmatrix relativ dünn sein muss, um eine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen im Inneren sicherzustellen (Staton et al. 2009). Ein andere Ansatz überschichtete eine Einzelschicht an Endothelzellen mit Kollagen oder Fibrin (Chalupowicz et al. 1995). Hoying und Kollegen schlossen frisch isolierte

Mikrogefäße in ein Kollagengel ein (Hoying et al. 1996) und beobachteten das herauswachsen von Kapillaren. Pepper und Kollegen beschrieb 1991 (Pepper et al. 1991) das erste Mal das Einbetten von Endothelzellaggregaten in ein Kollagengel zur Untersuchung der Angiogenese *in-vitro* (Korff & Augustin 1998). Dieser Assay wurde in den folgenden Jahren modifiziert, indem die Endothelzellen auf Mikroperlen (Nehls & Drenckhahn 1995) oder auf einem Nylonnetz (Vernon & Sage 1999) kultiviert wurden und so die Angiogenese verbessert werden sollte. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete dreidimensionale *in-vitro* Angiogenese Assay basiert auf dem von Korff und Augustin 1998 entwickelten Sphäroid-Modell (Korff & Augustin 1998). Im Gegensatz zu in Kollagengele eingebettete Einzelzellen, die in die Apoptose gingen (Pollman et al. 1999), bildeten die Endothelzellsphäroide radiale, kapillarähnliche Aussprossungen (Korff & Augustin 1999). Die Sphäroide können in definierter Zellzahl hergestellt werden, auch mit großen Zellzahlen. Ein Vorteil aller auf Endothelzellaggregaten-basierenden Untersuchungen zur Angiogenese ist die Möglichkeit fokal die Aggregate in ein Gel einzubetten, die Invasion der Zellen in die künstliche Extrazellulärematrix zu beobachten und letztendlich die Formation luminärer komplexer Strukturen (Korff & Augustin 1999).

Ein weiterer Teilprozess der Gefäßbildung aus einem bestehenden Kapillarnetz ist die Migration der Zellen (Mastyugin et al. 2004). Die Neigung der upcyte[®] mvEZ im relativen Migrationsassay zur Wanderung in Richtung eines Lockstoffes (Chemotaxis) ist größer als die von primären mvEZs. Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Migrationseffizienz könnte darauf beruhen, dass die Zellen von verschiedenen Spendern isoliert wurden. Der hier verwendete relative Migrationsassay ist eine Abwandlung des Boyden Kammer Experiments (Boyden 1962). Anstatt des Transfilters wurde hier eine Fluoreszenzlicht-undurchlässige Polyethylene-terephthalate Membran verwendet. Bei der einfachen Boyden-Kammer mussten die migrierten Zellen mikroskopisch ausgezählt werden. Durch die hier verwendete Fluoreszenzlicht-undurchlässige Membran können nur die migrierten Endothelzellen in der unteren Kammer, nach Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, detektiert werden. Der Vorteil ist die vereinfachte computerbasierte Auswertung. Allerdings sind die Nachteile der fehlenden Informationen über den genauen Aufbau des Lockstoffgradienten und die fehlende Überwachung der Zellbewegung während des Experimentes bei beiden Methoden vorhanden. Der sogenannte Scratch Assay ermöglicht die Überwachung der Zellbewegung während des Experimentes. Er spiegelt eines der Schlüsselereignisse bei der Wundheilung *in-vivo* dar

(Wong & Gotlieb 1984). Hierbei wird mit einem Schaber eine Schneise in eine konfluente Einzelschicht an Zellen gekratzt, wodurch eine zellfreie Fläche entsteht. Anschließend migrieren die Zellen in die zellfreie Fläche und das Migrationsverhalten der Zellen kann bewertet werden (Auerbach et al. 1991). Ein Nachteil ist, dass es sich hier um einen zweidimensionalen Assay handelt und die Zellen durch das Schaben verletzt werden.

Es wurden *in-vitro* ein Vielzahl verschiedener Untersuchungen zur Angiogenese entwickelt und die Wahl der Methode hängt von der jeweiligen Fragestellung ab (Staton et al. 2009). Das Problem bei der Mehrheit an *in-vitro* Angiogenese Untersuchungen ist, dass sie sich nur auf die Endothelzellen konzentrieren und dabei andere Zelltypen, wie beispielsweise Perizyten oder glatte Muskelzellen, Kontakt zur Extrazellulärenmatrix oder auch den Blutfluss vernachlässigen (Staton et al. 2009). Meist reflektieren diese Assays auch nur Teilprozesse der Angiogenese (Korff & Augustin 1999). Eine weitere Verbesserung für *in-vitro* Angiogenese Assays wäre die Verwendung von Endothelzellen, isoliert aus dem Zielgewebe der zu untersuchenden Erkrankung, wie z.B. die Verwendung von mikrovaskulären Endothelzellen aus der Brust bei Untersuchungen über Brustkrebs (Staton et al. 2009). *In-vitro* Angiogenese Assays sind einerseits wichtig für die Identifizierung von pro-angiogenen Faktoren, andererseits aber auch zur Identifizierung anti-angiogener Faktoren (Auerbach et al. 1991). Pro-angiogene Faktoren sind besonders wichtig für die Gefäßneubildung zum Beispiel bei Wundheilung, aber auch bei der Förderung von Prävascularisierung von Transplantaten im Bereich des Tissue Engineering (Gilmore et al. 2012; Costin et al. 2012). Anti-angiogene Faktoren rücken zur Hemmung der Angiogenese bei Tumorwachstum immer mehr in den Fokus der Krebstherapie (Zulato et al. 2012; Mackey et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden Assays verwendet, die Teilprozesse der Angiogenese, wie die Migration, die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen auf einer Basalmembranmatrix und die Bildung luminärer, dreidimensionaler Zellformationen überprüfen.

Upcyte[®] mvEZ erfüllen zahlreiche Qualitätsansprüche an primäre mvEZ, die in der aktuellen Literatur beschrieben sind und stellen daher eine gute Alternative zu primären mvEZ dar. Gründe dafür sind ihre erweiterte Proliferationsfähigkeit bei gleichzeitiger Beibehaltung der Primärzeleigenschaften, das leichte Handhabung, ihr schnellerer Generationszyklus und die Möglichkeit eine große Anzahl von mvEZs eines Spenders generieren zu können. Sie stellen nach 20-40 Populationsverdopplungen ihren Wachstum ein, zeigen keinen Wachstum auf

Softagar und exprimieren REIC/Dkk vergleichbar zu primären mvEZ, was upcyte[®] mvEC deutlich von Zelllinien abgrenzt. Upcyte[®] mvEZ migrieren in Richtung eines Lockstoffs, besiedeln eine künstliche Extrazellulärematrix und bilden, netzartige, kapillarähnliche Strukturen auf einer Basalmembranmatrix aus. Upcyte[®] mvEZ eignen sich somit für die Etablierung und Standardisierung von *in-vitro* Testsystemen oder auch für die Optimierung der Vaskularisierung von Transplantaten oder *in-vitro* Testsystemen verwendet werden.

4.2 Abgrenzung zu Zelllinien

Der Differenzierungsmarker REIC/Dkk3 ist ein sekretorisches Protein, welches in immortalisierten Zellen (z.B. KMST-6) und Tumorzelllinien (z.B. Hep3, HeLa etc.) im Vergleich zu human primären Zellen in der Expression stark vermindert ist (Tsuji et al. 2000). REIC/Dkk3 ist ein Tumorsuppressor (Tsuji et al. 2000; Du et al. 2011). Die geringere Expression von REIC/Dkk3 steht im Zusammenhang mit Immortalisierung und Krebsentwicklung (Lin et al. 1992; Nusse & Varmus 1992; Brown et al. 1986). Sakaguchi und Kollegen fanden 2011 heraus, dass REIC/Dkk3 ein mögliches Therapeutikum gegen Krebs sein könnte. Eine Überexpression von REIC/Dkk3 führt zum selektiven Zelltod von Krebszellen (Masakiyo Sakaguchi et al. 2011). Upcyte[®] mvEZ exprimierten REIC/Dkk3 vergleichbar mit gesunden humanen primären mvEZ. Dies unterstützt die Aussage, dass upcyte[®] mvEZ Primärzellcharakter aufweisen. Upcyte[®] mvEZ grenzen sich durch dieses Merkmal klar von immortalisierten Zellen oder Tumorzelllinien ab.

Die Tatsache, dass upcyte[®] mvEZ im Softagar keine Kolonien bilden, unterstreicht zusätzlich den Unterschied zu Zelllinien. Der Softagar-Assay ist ein Werkzeug zur Analyse verankerungsunabhängigen Wachstums. Dieses Wachstum wird typischerweise von Tumorzelllinien bzw. transformierten Zellen gezeigt und dient dazu, Transformation bzw. Tumorigenität der Zellen vorherzusagen (Freedman & Shin 1974; Macpherson & Montagnier 1964). Die Tumorzelllinie HepG2 wurde aus einem Patienten mit Leberzellkarzinom isoliert und etabliert (Knowles et al. 1980). Diese Zellen zeigen ein verankerungsunabhängiges Wachstum und bilden im Softagar-Assay Kolonien ohne Kontakt zum Untergrund aus. HepG2 dienten in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle. Upcyte[®] mvEZ hingegen

zeigten kein verankerungsunabhängiges Wachstum im Softagar, das heisst sie waren nicht in der Lage im Softagar zu wachsen. Upcyte[®] mvEZ wachsen *in-vitro* nur auf einer soliden Unterfläche und hören auf zu proliferieren, sobald sie sich gegenseitig berühren. Sie sind kontaktinhibiert. Somit zeigen upcyte[®] mvEZ keinen transformierten Phänotyp. In der vorliegenden Arbeit reichte die qualitative Aussage über die Fähigkeit der Zellen Kolonien im Softagar zu bilden aus. Es gibt jedoch viele Fragestellungen bei denen eine zytochemische und zytologische Analyse notwendig ist (Beckmann et al. 1976). Immortalisierte Zellen proliferieren unbegrenzt, allerdings unter Verlust vieler zelltypischer Eigenschaften. Außerdem erreichen die Zellen *in-vitro* eine hohe Dichte (Alberts et al. 2002). Upcyte[®] mvEZs proliferieren im Vergleich dazu bis maximal 20-40 PVs und stellen danach ihren Wachstum. Upcyte[®] mvEZ exprimieren REIC/Dkk3 vergleichbar zu primären mvEZs und zeigen kein verankerungsunabhängiges Wachstum. All diese Merkmale unterstreichen den Primärzellcharakter der upcyte[®] mvEZ und unterscheiden sie von immortalisierten Zellen und Tumorzelllinien.

4.3 Kultivierung der upcyte[®] mvEZ in der biologisch vaskularisierten Matrix

Die biologische vaskularisierte Matrix (BioVaSc) besteht aus einem Stück Schweinedünndarm mit intaktem Gefäßsystem. Diese Matrix wird chemisch von Schweinezellen befreit. Die daraus resultierende, azellularisierte Matrix besitzt ein intaktes Gefäßsystem mit einer Zuflussarterie und einer Abflussvene. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen I und III (Mertsching et al. 2005; Schanz et al. 2010). Die BioVaSc kombiniert die Vorteile eines erhaltenen Gefäßsystems mit den Vorteilen der Verwendung einer azellularisierten Matrix aus natürlichen Bestandteilen wie Kollagen. Das intakte Gefäßsystem ermöglicht eine optimierte Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, bei gleichzeitigem Abtransport von Stoffwechselprodukten der Zellen. Bei der Transplantation kann das Gefäßsystem der BioVaSc mit dem Gefäßsystem des Patienten verbunden werden, wodurch das transplantierte Gewebestück von Anfang an ausreichend versorgt wird (Mertsching et al. 2009). So wird die Vitalität und Funktionalität der kultivierten Zellen gewährleistet und größerer Organstrukturen können aufgebaut werden (Mertsching et al. 2005). Die Versorgung des transplantierten Gewebekonstrukts alleine durch das Gefäßsystem

das Patienten würde nicht ausreichen, um auch die Zellen im Inneren des Transplantats von Beginn an optimal zu versorgen (Walles et al. 2003; Levenberg & Langer 2004). Biologische, azellularisierte Matrices besitzen sehr gute Eigenschaften hinsichtlich der Anhaftung, der Vitalität und der Funktionalität der besiedelten Zellen (Schanz et al. 2012). Die Struktur, die Zusammensetzung und die biomechanischen Eigenschaften der azellularisierten Matrix bleiben verglichen zu der natürlichen Extrazellulärenmatrix erhalten und tragen daher maximal zu der Entstehung eines funktionellen Gewebes bei (Hoshiba et al. 2010). Bei der herkömmlichen allogenen Transplantation ist eines der Hauptprobleme die Abstoßung des Transplantates durch den Empfängerorganismus, was eine lebenslange Gabe von Immunsuppressiva unumgänglich macht (Song & Ott 2011; Feldman 1969). Der Grund der Abstoßungsreaktion liegt an den verschiedenen Oberflächenstrukturen der Zellen, insbesondere der verschiedenen Histokompatibilitäts-Antigene der Zellmembran von Empfänger- und Spenderorganismus (Benichou et al. 2011; Nagy 2012). Das Immunsystem des Empfängerorganismus wird aktiviert und stößt das Transplantat ab. Die Oberflächenstruktur der Zelle wird genetisch festgelegt und unterscheidet sich von Individuum zu Individuum. Die dauerhafte Gabe von Immunsuppressiva schwächt auch die Abwehr des Empfängerorganismus für virale, bakterielle und fungale Infektionen. Azellularisierte Matrices haben den Vorteil, dass ihr natürlicher Aufbau aus Komponenten der Extrazellulärenmatrix erhalten bleibt und somit die Gefahr einer Immunreaktion des Empfängerorganismus verringert wird. Die Komponenten der Extrazellulärenmatrix sind hochkonservierte Proteine (Hutter et al. 2000). Bisher wurden azellularisierte Matrices erfolgreich für therapeutische Zwecke verwendet (Badylak 2002) und es konnte auf die Gabe von Immunsuppressiva verzichtet werden. Jedoch sollten azellularisierte Matrices auf ihre Immunogenität in klinisch-relevanten *in-vitro* Modellen weiter untersucht werden (Song & Ott 2011). Mertsching et al. besiedelten die Oberfläche der azellularisierten Matrix mit autologen Zellen, um ganz sicher zugehen, dass es zu keiner Immunreaktion des Empfängerorganismus gegenüber des Transplantats kam (Heike Mertsching et al. 2009).

Die verwendete biologisch vaskularisierte Matrix stellt eine Modifizierung der kommerziell erhältlichen Small Intestinal Submucosa (SIS) dar. Die SIS ist ein biokompatibles System und ermöglicht die Migration und die Differenzierung der Zellen (Hodde 2002). Der Vorteil der BioVaSc gegenüber der SIS ist ihr zusätzliches intaktes Gefäßsystem (Mertsching et al. 2005). Zusätzlich wurde ein automatisierter Bioreaktor entwickelt, der für die Perfusion der BioVaSc

mit frischem Nährmedium als Blutersatz sorgte. Die Parameter der Perfusion wurden mit Hilfe von Computersimulationen und mathematischen Modell im Bioreaktor optimiert, sodass die natürliche Situation wie zum Beispiel Blutdruck oder auch Temperatur realitätsnah imitiert werden konnte (Mertsching et al. 2009). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit das ehemalige Darmlumen ebenso wie das Blutgefäßsystem der BioVaSc mit den entsprechenden Zellen zu besiedeln und so ein vaskularisiertes Gewebekonstrukt zu generieren (Schanz et al. 2012). Die vaskularisierte BioVaSc kann zum Aufbau verschiedener Testgewebe verwendet werden, wie zum Beispiel leber-ähnlichem Gewebe (Linke et al. 2007) oder auch *in-vivo* (Mertsching et al. 2009). Der Einsatz der BioVaSc wurde bereits klinisch erprobt. 2004 führten Macchiarini und Kollegen erstmalig eine tracheobronchiale Rekonstruktion basierend auf der biologisch vaskularisierten Matrix in einen Patienten durch. Das Transplantat förderte die Gewebebildung und erzeugte keine auffällige Immunreaktion (Macchiarini et al. 2004). Wegen der Vergleichbarkeit zur SIS, welche bereits erfolgreich transplantiert wurde, war Förderung der Gewebebildung und die unauffällige Immunreaktion auch bei der Transplantation der BioVaSc erwartet worden (Lantz et al. 1993; Musahl et al. 2004). Die biologisch vaskularisierte Matrix könnte eine Lösung für die Limitierung der Herstellung größerer Organtransplantaten wegen mangelnder Zellversorgung im Inneren des Transplantates sein. Die ersten Versuche der Wiederbesiedlung des Gefäßsystems der BioVaSc mit Endothelzellen wurden 2005 von Mertsching et al. unternommen. Hierbei konnte allerdings keine komplette Wiederbesiedlung des Gefäßsystems erreicht werden, sondern nur eine unvollständige Auskleidung der Gefäße mit Endothelzellen (Mertsching et al. 2005). Für die Anwendung des Transplantats *in-vivo* ist eine funktionale und komplette Auskleidung der Gefäße wichtig, um die Gefahr der Thrombose so gering wie möglich zu halten (Ribatti et al. 2002; Amiel et al. 2006). Zur Verbesserung der Methode bzw. der Besiedlungseffizienz wurden die Gefäße mit CCN1 beschichtet. CCN1 verbesserte den Wiederbesiedlungsprozess mit HUVEC, jedoch wurde auch hier keine vollständige Auskleidung des Gefäßsystems mit Endothelzellen erreicht (Bär et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Wiederbesiedlung der BioVaSc mit upcyte[®] mvEZs eine komplette Auskleidung der Gefäße angestrebt. Zunächst wurde die Azellularisierung der Matrix bestätigt. Der Azellularisierungsprozess ist durchaus ein kritischer Punkt bei der Verwendung xenogener Matrices im Tissue Engineering. Schon wenige xenogene Zellreste könnten zu einer Abstoßung des Transplantates führen (Badylak & Gilbert 2008). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein zusätzlicher DNA Verdau durchgeführt, um

sicherzugehen, dass jegliche Fremd-DNA entfernt wurde. Durch die erweiterte Proliferationsfähigkeit der upcyte[®] mvEZ gegenüber primären mvEZ war es möglich die BioVaSc mit einer ausreichenden Anzahl an upcyte[®] mvEZ eines Spenders wieder zu besiedeln. Erst nach Bestätigung des Differenzierungsstatus der upcyte[®] mvEZ wurde die Wiederbesiedlung der BioVaSc mit 20-30 Mio. upcyte[®] mvEZs durchgeführt. Die Matrix wurde nach zwei wöchiger Kulturzeit im Bioreaktor in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt. Zunächst wurde die Besiedlungseffizienz der Matrix mittels einer histologischen H&E Färbung untersucht. In der H&E Färbung war deutlich zu erkennen, dass die upcyte[®] mvEZ die Gefäße einschichtig auskleideten. Allerdings migrierten die Zellen in geringem Ausmaß auch in das Lumen der BioVaSc. Eventuell könnte das durch eine Verringerung der Anzahl an Zellen zur Wiederbesiedlung oder auch durch Veränderung des Wiederbesiedlungsprozesses verhindert werden. Auch in den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurde keine komplette Auskleidung des Gefäßsystem der BioVaSc mit upcyte[®] mvEZ erreicht. In weiteren Experimenten könnte man überprüfen, ob eine Beschichtung des Gefäßsystems mit CCN1 eine Verbesserung der Besiedlung mit sich bringen würde. Die Wiederbesiedlung mit upcyte[®] mvEZ wurde nach Versuchsende immunhistologische überprüft. Die upcyte[®] mvEZ exprimierten die endothelzellspezifischen Marker CD31, vWF und eNOS, was ihren Differenzierungsstatus auch nach der Besiedlung bestätigte. Zusätzlich konnte mit dem MTT Test und der Lebend-Tod Färbung gezeigt werden, dass die Zellen nach der Wiederbesiedlung vital und metabolisch aktiv waren. Bei der Auswertung der Lebend-Tod Färbung waren Ansätze von Kapillarsprossungen aus dem bestehenden Kapillarnetz der BioVaSc zu beobachten. Die grün fluoreszierenden vitalen Zellen bildeten eine kleine luminäre Zellformation in Form einer Schlinge am Ende eines Gefäßes aus, aus welchen neue Gefäße reifen (Carmeliet 2000).

Die Vorteile der upcyte[®] mvEZ gegenüber der Verwendung von primären mvEZ zur Wiederbesiedlung der BioVaSc ist ihre leichte Verfügbarkeit, ihre erweiterte Proliferationsfähigkeit und die damit verbundene Möglichkeit zur Generierung 3×10^4 fach mehr upcyte[®] mvEZ des gleichen Spenders und somit eine bessere Standardisierbarkeit des Systems. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass die upcyte[®] mvEZ ohne Funktionsverlust kryokonserviert werden können und bei Bedarf expandiert, eingefroren und wieder aufgetaut werden bringt auch eine Zeitersparnis mit sich, da upcyte[®] mvEZ einen Wachstumsvorteil

gegenüber den primären mvEZs haben und somit in kürzer Zeit die benötigte Anzahl an Zellen generiert werden können.

4.4 Einordnung der upcyte[®] mvEZ in den aktuellen Stand des Tissue Engineering

Der aktuelle Fokus im Tissue Engineering liegt auf der Vaskularisierung von artifiziellen Gewebekonstrukten, da nur so die Limitierung des Sauerstoff- und Nährstofftransport überwunden werden kann und größere Gewebekonstrukte *in-vitro* aufgebaut werden können (Lovett et al. 2009). Generell unterscheidet man zwei Strategien zur Vaskularisierung von artifiziellen Gewebekonstrukten. Die Vaskularisierung des Transplantates *in-vivo* oder eine Prävaskularisierung des Transplantats *in-vitro*. Bei der *in-vivo* Vaskularisierung werden Trägermaterialien mit angiogenen Stimuli wie dem Vascular Endothelial Growth Factor VEGF (Zisch et al. 2003) oder auch dem Platelet Derived Growth Factor PDGF (Andrae et al. 2008) kombiniert und dadurch versucht eine schnellere Vaskularisierung des Transplantats durch das Empfängergefäßsystem zu erreichen (N C Rivron et al. 2008; Lovett et al. 2009). Faktoren wie VEGF sind *in-vivo* mit der Extrazellulärenmatrix assoziiert und schützen dort vor proteolytischem Abbau, stabilisieren und unterstützen die Gefäßneubildung (Zisch et al. 2003). Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Vaskularisierung *in-vivo* ist die Optimierung der Struktur des Trägermaterial, da diese den Aufbau eines Gefäßsystems unterstützen kann. Es können Sauerstoffgradient, Flussrate, Zellformationen und Angiogenese durch das Trägermaterial beeinflusst werden (Lovett et al. 2009). Trägermaterialien mit Mikrokanälen verbessern den Fluss des Blutes und steigern durch höhere Sauerstoffkonzentration die Zellvitalität (Nazhat et al. 2007). 2006 zeigten Radisic und Kollegen eine Verbesserung der Versorgung der Zellen im Inneren des Transplantates durch Verwendung eines Trägermaterials mit Kanälen, Sauerstoff-Trägerstoffen und Ko-Kulturen (Radisic et al. 2006). Ein Nachteil der *in-vivo* Vaskularisierung ist die mangelnde Versorgung der Zellen im Inneren des Transplantates in der ersten Zeit nach der Transplantation und der damit einhergehenden Gefahr des Absterbens des Transplantats. Das Einwachsen des Empfängergefäßsystems in das transplantierte Gewebekonstrukt dauert bis zu zwei Wochen und es kommt insbesondere zu Beginn zu einer Mangelversorgung der Zellen im Inneren (Rouwckema et al. 2006; Rivron et al. 2008). Eine weitere vielversprechende Methode zur Vaskularisierung *in-vivo* ist die

Verwendung einer arterio-venösen Gefäßschleife (Kneser et al. 2006). Die künstliche Gefäßschleife verbindet Arterie und Vene (daher AV-Loop) mit Hilfe eines Überbrückungsstücks aus einer natürlichen Vene. Der AV-Loop selbst ist eingebettet in eine Fibrinmatrix, in die die neu gebildeten Blutgefäße einwachsen können (Bleiziffer 2012). Die Fibrinmatrix und die Gefäßschleife werden von einer Trennkammer aus Teflon umschlossen. Diese kann in den lebenden Organismus eingepflanzt werden und über die Enden des AV-Loops an den Empfängerblutkreislauf angeschlossen werden. In der Trennkammer können auch Trägermaterialien z.B. Knochenersatzmaterial eingebracht werden, welche vaskularisiert werden sollen. Das künstliche Gewebe wächst abgekapselt in einer Art *in-vivo* Bioreaktor. 2006 konnten Kneser und Kollegen erstmalig die Vaskularisierung eines Knochenersatzmaterials durch die Verwendung eines AV-Loops in Ratten zeigen (Kneser et al. 2006).

Bei der *in-vitro* Prävaskularisierung gibt es verschiedene Ansätze das Transplantat mit einem Gefäßsystem zu kombinieren. Im Optimalfall ist eine Anastomose mit dem Empfängergefäßsystem möglich, um das Gewebekonstrukt von Beginn an optimal zu versorgen. Eine Möglichkeit ist zum Beispiel die Verwendung von Hohlfasern. Hohlfasern können aus verschiedenen Materialien wie z.B. Polyethersulfon oder Polypropylen synthetisch hergestellt werden und in ein dreidimensionales Trägermaterial eingearbeitet werden (Bettahalli et al. 2011). Dort dient die Hohlfaser als künstliches Gefäß und versorgt das dreidimensionale System mit Sauerstoff und Nährstoffen (Bettahalli et al. 2011). Unger und Kollegen zeigten 2005 die Fähigkeit von verschiedenen Endothelzellen Hohlfasern zu besiedeln und die Angiogenese zu fördern (Unger et al. 2005). Ein weiterer innovativer Ansatz ist die Arbeit von Miller und Kollegen (Miller et al. 2012). Hier wird ein dreidimensionales zylindrisches Netzwerk aus Glasfasern mit einem 3D-Drucker hergestellt und mit einem Extrazellulärmatrix-Ersatz aus Glucose, Succrose, Dextran und Zellen z.B. Hepatozyten verkapselt. Das Netzwerk aus Glasfasern wird durch die Perfusion mit Zellkulturmedium aufgelöst und es bleiben Kanäle zur Zellversorgung zurück. Eine Lösung mit Endothelzellen wird durch die Kanäle gepumpt, die Zellen verankern sich im Gewebe und üben ihre Funktion als Barriere zwischen „Blut“ und Gewebe aus. Ein großer Vorteil dieses Systems ist die automatische Herstellung durch einen 3D-Drucker und die Verwendung von Endothelzellen, welche auf natürliche Art und Weise die Angiogenese fördern (Forgacs 2012). Eine weitere Möglichkeit zur Prävaskularisierung zeigte Rouwkema und Kollegen 2006. Sie

erzeugten Ko-Spheroide aus Endothelzellen und Mesenchymalen Stammzellen und zeigten die Formation eines dreidimensionalen prävaskularisierten Netzwerks für die Knochenregeneration (Rouwkema et al. 2006). Allerdings ist hier die Möglichkeit einer Verbindung mit dem Empfängergefäßsystem noch zu zeigen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete dezellularisierte natürliche Trägermaterial mit erhaltenen Gefäßsystem ist ein weiterer vielversprechender Ansatz zur Prävaskularisierung (Mertsching et al. 2005). Die Vorteile hierbei sind das erhaltene Gefäßsystem und der Aufbau aus natürlichen Extrazellulärmatrixbestandteilen. Die *in-vitro* Prävaskularisierung ist das Mittel der Wahl zur Generierung eines Gefäßsystems im Tissue Engineering, da im Gegensatz zur *in-vivo* Vaskularisierung die Versorgung des Transplantats von Beginn an gewährleistet ist.

Die Wahl der Zellquelle für die *in-vitro* Vaskularisierung ist entscheidend für den Erfolg des Ansatzes. Grundsätzlich gibt es vier Quellen für Zellen. Primäre Zellen sind für den Aufbau eines vaskularisierten Systems *in-vitro* geeignet. Allerdings besitzen sie ein eingeschränktes Proliferationspotential, verlieren nach wenigen Populationsverdopplungen *in-vitro* ihren Primärzellcharakter oder sind *ex-vivo* nicht kultivierbar wie z.B. Hepatozyten (Fodor 2003; Unger et al. 2002). Jedoch können die Zellen meist vom zu behandelnden Patienten isoliert werden und bergen deshalb ein geringes Risiko für eine Abstoßung des Transplantats. So konnte gezeigt werden, dass die Besiedlung einer azellularisierten Arterie vom Schwein mit autologen primären Endothelzellen zu einem funktionellen Blutgefäß führt und später zum Beispiel für Bypass-Operationen verwendet werden könnte (Amiel et al. 2006). Die zweite mögliche Zellquelle sind Stammzellen. Hier unterscheiden sich embryonale Stammzellen von adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind in der Lage sich in nahezu jeden Zelltyp des Organismus zu entwickeln (pluripotent) (Thomson et al. 1998). Sie besitzen großes Proliferationspotential, spielen jedoch aus ethischen Gründen keine große Rolle im Tissue Engineering (McLaren 2001; Griffith 2002). Adulte Stammzellen sind dagegen multipotent und werden aus somatischem Gewebe wie z.B. Knochenmark oder Fett isoliert (Naderi et al. 2011). Adulte Stammzellen können zwar einfacher isoliert werden, allerdings ist ihr Differenzierungsstatus oft unklar. Sie verfügen über ein geringeres Differenzierungspotential im Vergleich zu embryonalen Stammzellen, daher ist das Risiko für maligne Entartung geringer. Ein Nachteil dieses Zelltyp ist die geringe Anzahl dieser Zellen im menschlichen Organismus und ein Mangel an Identifikationsmarkern zur Isolation bzw. zur Charakterisierung der Zellen, wie zum Beispiel bei den Mesenchymalen Stammzellen

(Arosarena 2005). Eine Stufe weiter differenziert sind die Vorläuferzellen, welche von den adulten Stammzellen abstammen und in ihrer Funktionalität schon weiter spezialisiert sind. Endothelvorläuferzellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und sind die Basis für viele Versuche Trägermaterialien *in-vitro* zu prävascularisieren (Asahara et al. 1999; Usami et al. 2009). Allerdings gilt auch für diesen Zelltyp der Nachteil der geringen Verfügbarkeit und der Mangel an Identifikationsmarkern (Arosarena 2005). Seebach und Kollegen zeigte kürzlich die Verbesserung der frühen Vaskularisierung eines Defekts kritischer Größe im Oberschenkelknochen der Ratte durch Ko-Kultur von Endothelvorläuferzellen und Mesenchymalen Stammzellen (Seebach et al. 2012). Dieser Erfolg ist überwiegend auf die Abgabe von pro-angiogenen Faktoren durch die Endothelvorläuferzellen zurückzuführen. Die dritte mögliche Zellquelle im Tissue Engineering sind die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS). iPS sind künstlich reprogrammierte somatische Zellen, die dadurch wieder einen embryonalen Stammzell-ähnlichen Phänotyp annehmen (Takahashi et al. 2007; Takahashi & Yamanaka 2006). Diese Zellen haben das Potential in alle drei Keimblätter zu differenzieren (Takahashi et al. 2007). 2008 konnte die Differenzierung von iPS in Richtung Herzzellen gezeigt werden (Yuasa & Fukuda 2008; Schenke-Layland et al. 2008) und 2009 folgte die Differenzierung von iPS-Zellen in Richtung Neuronen (Chamberlain et al. 2008). 2009 zeigten auch Song und Kollegen die Möglichkeit humane iPS-Zellen in Hepatozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren (Song et al. 2009). Die Vorteile bei der Verwendung von iPS sind ihre leichte und ausreichende Verfügbarkeit und die fehlende immunologische Reaktion. Generell ist der Einsatz von iPS-differenzierten Zellen in der Klinik genau zu beobachten, da die Zellen viral reprogrammiert wurden. Somit könnte ein tumorogenes Risiko von den Zellen ausgehen, was den Einsatz in der Klinik verhindern würde (Zhang et al. 2012). Bisher wird das tumorogene Risiko von erfolgreich reprogrammierten iPS sehr gering eingeschätzt (Huang et al. 2011). Zusätzlich wurden Alternativen zur viralen-integrativen Reprogrammierung der somatischen Zellen entwickelt, welche das Risiko für den Patienten stark verringern. Die nicht integrativen Methoden der Reprogrammierung verwenden rekombinate Proteine (Zhou et al. 2009), microRNA (Mallanna & Rizzino 2010), episomale Vektorsysteme oder auch RNA-basierte Viren (Si-Tayeb et al. 2010). Zelllinien stellen theoretisch die vierte mögliche Zellquelle dar. Zelllinien haben praktisch eine uneingeschränkte Proliferationskapazität (Ades et al. 1992). Jedoch bergen sie eine große Mutationsgefahr und bilden leicht Tumore. Zusätzlich sind ihre Eigenschaften substantiell verändert und sie sind nur in wenigen Eigenschaften vergleichbar

zu primären Zellen (Unger et al. 2002). Zelllinien verändern ihren Phänotyp auch noch *in-vitro* über viele Jahre hinweg. So konnte die Zelllinie humane dermal mikrovaskuläre Endothelzellen HMEC-1 1992 noch kapillarähnliche Strukturen ausbilden (Ades et al. 1992) und 12 Jahre später hatte sie diese Eigenschaft verloren (Nisato et al. 2004). Daher sind sie als Zellquelle für das Tissue Engineering ungeeignet. Sie spielen aber eine wichtige Rolle für extrakorporale Systeme oder auch *in-vitro* Testsysteme. Extrakorporale Systeme finden zum Beispiel Anwendung bei einer Leberfunktionsstörung. Prinzipiell gibt es maschinelle oder bioartifizielle Verfahren zur Unterstützung der geschädigten Leber des Patienten. Die Bioartificial Liver (BAL) ist ein Beispiel für ein solches bioartifizielleres Verfahren. Das BAL System ist ein Bioreaktor mit z.B. der Hepatozytenzelllinie HepRG kombiniert, welcher Teilfunktionen der Leber übernimmt wie bspw. Ammoniumelimination, Harnstoffproduktion, Laktatabbau und 6 β -Hydroxylierung von Testosteron (Nibourg et al. 2012; Carpentier et al. 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten upcyte[®] mvEZ stellen eine weitere neue mögliche Zellquelle für die Generierung prävascularisierter Trägermaterialien im Tissue Engineering dar und sind eine Alternative zu primären mvEZ. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen eine erweiterte Proliferationsfähigkeit besitzen und dadurch war es möglich 3×10^4 fach mehr upcyte[®] mvEZ eines Spenders zu generieren. Die gute und ausreichende Verfügbarkeit der Zellen macht sie für die Standardisierung von *in-vitro* Testsystemen interessant. Upcyte[®] mvEZ zeigen zahlreiche Primärzellmerkmale von mikrovaskulären Endothelzellen, die in der Literatur beschrieben sind. Diese Ergebnisse zeigen den quasi-primären Phänotyp der upcyte[®] mvEZs. Upcyte[®] mvEZ im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien zeigen keinen Wachstum im Softagar, stellen ihren Wachstum nach 20-40 Populationsverdopplungen ein und haben keine reduzierte Expression von REIC/Dkk. Dadurch wird der Unterschied zu immortalisierten Zellen verdeutlicht. In der vorliegenden Arbeit konnte die Wiederbesiedlung der biologisch vaskularisierte Matrix mit upcyte[®] mvEZ vergleichbar zu primären mvEZ gezeigt werden. Upcyte[®] mvEZ bieten zusätzlich einige technische Vorteile. Sie sind einfach in der Handhabung und lassen sich ohne Funktionsverlust kryokonservieren. Auch hier sind die bereits oben erwähnten Vorteile wie erweiterte Proliferationsfähigkeit, die gute Verfügbarkeit sind Vorteile gegenüber primären mvEZ. Die Verwendung der upcyte[®] mvEZ bringt auch eine Zeitersparnis mit sich, da keine primären Zellen isoliert werden müssen und die Zellen einen schnelleren Wachstum als primäre mvEZ aufweisen. Humane primäre

mikrovaskuläre Endothelzellen können patientenspezifisch aus einer kleinen Haut-Biopsie isoliert werden und können anschließend geupcytet werden. Durch die Verwendung autologer upcyte[®] mvEZs wäre die Gefahr einer Immunreaktion bei einer Transplantation gering. Allerdings wurde bei der Generierung der upcyte[®] mvEZs wie auch bei iPS-Zellen ein virales System verwendet, um die erweiterte Proliferationsfähigkeit zu erreichen. Deshalb müssen intensive Sicherheitsüberprüfungen vor dem Einsatz *in-vivo* durchgeführt werden. Zusätzlich sollten Alternativen zu der virusbasierenden integrativen Veränderung der Zellen bei dem upcyte Prozess gefunden werden. Entsprechend der Alternativen bei der Reprogrammierung der iPS könnten rekombinate Proteine oder auch RNA-basierte Viren verwendet werden.

Neben dem Einsatz von prävascularisierten Gewebekonstrukten *in-vivo*, steigt der Bedarf an prävascularisierten Gewebekonstrukten für *in-vitro* Testsysteme in der pharmakologischen, toxikologischen und auch in der Grundlagenforschung (Schanz et al. 2012). Aktuell werden am Fraunhofer IGB Stuttgart und am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin in Würzburg verschiedene Modelle basierend auf der mit Endothelzellen wiederbesiedelten BioVaSc aufgebaut. Mit diesen 3D-Testsystemen können verschiedene ADMET-Kriterien (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) *in-vitro* untersucht werden und so bereits in einem frühen Stadium der Wirkstoffentwicklung relevante Aussagen über zu erwartende *in-vivo-Effekte* gemacht werden (Fraunhofer IGB 2012). In der Entwicklung befindet sich ein Darmtestsystem zur zukünftigen Untersuchung der Resorption, Toxizität und Bioverfügbarkeit oral eingenommener Wirkstoffe, sowie ein vaskularisiertes Lebermodell zur Untersuchung Biotransformationsmechanismen von Medikamenten. Desweiteren wird ein Tracheamodell zur Untersuchung der Resorption, Biokompatibilität und Toxizität von Stoffen, vor allem Aerosole und verschiedene Tumormodelle zur Untersuchung neuer Krebsmedikamente und Krebstherapien aufgebaut. Für diese Systeme könnte die erfolgreiche Wiederbesiedlung mit upcyte[®] mvEZ besonders hilfreich sein, da die Zellen Primärzellcharakteristika zeigen und gleichzeitig in großen Mengen verfügbar sind. Gerade in der Kosmetikbranche ist das Interesse an *in vitro* Testsystemen seit der neuen EU-Kosmetikrichtlinie (2003/15/EU) extrem gestiegen. Seit 1998 sind in Deutschland und seit 2004 in der Europäischen Union (EU) Tierversuche für Kosmetika verboten. Zusätzlich dürfen ab 2013 keine Kosmetika die an Tieren getestet worden sind in die EU eingeführt werden. Für einen zusätzlichen Bedarf an Alternativen zu Tierversuchen führte 2007 die neue EU-Chemikalienverordnung, die besagt das sämtliche

Chemikalien auf Toxizität zu prüfen sind. Es handelt sich um rund 30.000 Chemikalien, die bisher nur mit einem hohen Aufwand an Kosten und Zeit und anhand von Tierversuchen zu bewältigen sind. Pharmazeutische Unternehmen haben ein stetig steigendes Interesse an *in-vitro* Testsystemen, da alle neuen Medikamente und Wirkstoffe für die Anwendung im Menschen auf ihre Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit zu testen sind. Tierversuche sind dabei teuer und zeitaufwändig. Zusätzlich sind die Ergebnisse wegen der artspezifischen Unterschiede nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar (Schanz et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Assay als Alternative zu Tierversuchen entwickelt. Das Angiogenese Tube Formation Kit der Firma Medicyte GmbH wurde mit Hilfe von upcyte[®] mvEZ generiert und standardisiert. Dieses Kit liefert schnelle, reproduzierbare Ergebnisse, ist einfach in der Handhabung und ermöglicht die Untersuchung vieler Substanzen gleichzeitig. Jain und Kollegen forderten schon 1997 die Entwicklung eines Angiogenese Assays, der diese Kriterien erfüllte (Jain et al. 1997). Mithilfe dieses Kits können Substanzen identifiziert werden, die pro- oder anti-angiogene Wirkung zeigen. Pro-angiogene Faktoren werden für die Wundheilung oder zum Beispiel für die Verbesserung der Gefäßneubildung bei Transplantationen gesucht. Anti-angiogene Faktoren werden vor allem für die Krebstherapie verwendet, um die Vaskularisierung eines Tumors zu verhindern (Auerbach et al. 1991). Teile dieser Arbeit wurden 2012 in Tissue Engineering Part C unter „Upcyte microvascular endothelial cells repopulate decellularized scaffold“ veröffentlicht.

Abschließend könnte die Vaskularisierung der BioVaSc in weiteren Experimenten durch die Wiederbesiedlung mit mehreren Zelltypen optimiert werden. Der heutige Stand im Tissue Engineering zeigt eine Verbesserung der Vaskularisierung durch Ko-Kultur von Endothelzellen mit Perizyten, Fibroblasten oder glatten Muskelzellen. Die Ko-Kultur dieser Zelltypen ist der natürlichen Mikroumgebung im Körper ähnlich. In der Natur bilden die Endothelzellen die luminären Strukturen, welche dann durch Perizyten bzw. glatten Muskelzellen stabilisiert werden (Rivron et al. 2008). Kürzlich zeigte Wang und Kollegen das die Ko-Kultur von Endothelzellen und glatten Muskelzellen zu einer verbesserten Vaskularisierung der SIS in der Maus führte (Wang et al. 2012). Ein anderes Beispiel zeigt, dass die Ko-Kultur von Endothelzellen und Mesenchymalen Stammzellen eine verstärkte Knochendifferenzierung auslöst, was durch die höhere Expression der Alkalinen Phosphatase gezeigt wurde (Rouwkema et al. 2006).

Zusammenfassung

In dieser vorliegenden Arbeit konnten upcyte[®] mvEZ als Alternative zu primären mvEZ etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen eine erweiterte Proliferationsfähigkeit besitzen und es dadurch möglich ist 3×10^4 fach mehr upcyte[®] mvEZ eines Spenders zu generieren. Die gute und ausreichende Verfügbarkeit der Zellen macht sie für die Standardisierung von *in-vitro* Testsystemen interessant. Upcyte[®] mvEZ besitzen zahlreiche Primärzellmerkmale von mikrovaskulären Endothelzellen, die in der Literatur beschrieben sind. Diese Ergebnisse bestätigen den quasi-primären Phänotyp der upcyte[®] mvEZs. Upcyte[®] mvEZ im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien bilden keine Kolonien im Softagar, stellen ihren Wachstum nach 20-40 Populationsverdopplungen ein und haben keine reduzierte Expression von REIC/Dkk. Dadurch wird der Unterschied zu immortalisierten Zellen verdeutlicht. Upcyte[®] mvEZ stellen eine weitere neue mögliche Zellquelle für die Generierung prävasikularisierter Trägermaterialien im Tissue Engineering dar. In der vorliegenden Arbeit konnte die Wiederbesiedlung der biologisch vaskularisierte Matrix mit upcyte[®] mvEZ vergleichbar zu primären mvEZ gezeigt werden. Upcyte[®] mvEZ bieten zusätzlich einige technische Vorteile. Sie sind einfach in der Handhabung und lassen sich ohne Funktionsverlust kryokonservieren. Auch hier sind die bereits oben erwähnten Vorteile wie erweiterte Proliferationsfähigkeit, die gute Verfügbarkeit sind Vorteile gegenüber primären mvEZ. Die Verwendung der upcyte[®] mvEZ bringt auch eine Zeitersparnis mit sich, da keine primären Zellen isoliert werden müssen und die Zellen ein schnelleres Wachstum als primäre mvEZ aufweisen. Humane primäre mikrovaskuläre Endothelzellen können patientenspezifisch aus einer kleinen Haut-Biopsie isoliert werden und anschließend mit der upcyte[®] Technologie behandelt werden. Durch die Verwendung autologer upcyte[®] mvEZs wäre die Gefahr einer Abstoßungsreaktion bei einer Transplantation gering.

Fazit: In der vorliegenden Arbeit wurde somit ein neues, innovatives System für die Generierung einer perfundierten, mit Endothelzellen wiederbesiedelten Matrix für künstliches Gewebe *in-vitro* entwickelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass upcyte[®] mvEZ vergleichbar zu primären mvEZs sind und somit eine geeignete Alternative für die Generierung prävasikulierter Trägermaterialien und Aufbau von *in-vitro* Testsystemen darstellen.

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit etablierten upcyte[®] mvEZ stellen eine Alternative zu primären mvEZ dar. Ein Vielzahl an Anwendungen der upcyte[®] mvEZ ist denkbar. Einerseits für den Aufbau von *in-vitro* Testsystemen oder für die Prävaskularisierung von Tissue Engineering Transplantaten.

Die upcyte[®] Technologie ist bei weiteren Zelltypen anwendbar und somit können autologe mvEZ von Patienten generiert werden. Das Risiko der Verwendung von viralen-integrativen Methoden wie bei der upcyte[®] Technologie, könnte durch alternative, nicht integrative Methoden, wie zum Beispiel rekombinate Proteine, microRNA, episomale Vektorsysteme oder auch RNA-basierte Viren, verringert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues, innovatives System für die Generierung einer perfundierten, mit Endothelzellen wiederbesiedelten Matrix für künstliches Gewebe *in-vitro* entwickelt. Die upcyte[®] mvEZ waren in ihrer Effizienz der Wiederbesiedlung der BioVaSc mit primären mvEZ vergleichbar. Allerdings zeigen die upcyte[®] mvEZ einige technische Vorteile und somit war die Wiederbesiedlung der BioVaSc mit upcyte[®] mvEZ erleichtert. Aktuell werden verschiedene Modelle basierend auf der mit Endothelzellen wiederbesiedelten BioVaSc aufgebaut. Für diese Systeme könnte die erfolgreiche Wiederbesiedlung mit upcyte[®] mvEZ aus den oben erwähnten Gründen besonders hilfreich sein. Denkbar wäre die Verwendung der upcyte[®] mvEZ für die Vaskularisierung des in der Entwicklung befindlichen Darmtestsystems für zukünftigen Untersuchung der Resorption, Toxizität und Bioverfügbarkeit oral eingenommener Wirkstoffe, sowie für die Vaskularisierung des Lebermodell zur Untersuchung von Biotransformationsmechanismen von Medikamenten. Des Weiteren wäre die Vaskularisierung des Tracheamodells mit upcyte[®] mvEZ zur Untersuchung der Resorption, Biokompatibilität und Toxizität von Stoffen, vor allem von Aerosolen interessant. Darüber hinaus könnte die upcyte[®] mvEZs in verschiedenen Tumormodellen zur Untersuchung neuer Krebsmedikamente eingesetzt werden.

In weiterführenden Arbeiten könnte der Einfluss einer Beschichtung des Gefäßsystem der BioVaSc mit CCN1 auf die Effizienz der Wiederbesiedlung mit upcyte[®] mvEZ untersucht werden. So könnte möglicherweise eine komplette Wiederbesiedlung der BioVaSc erreicht werden. Darüber hinaus könnten Ko-Kulturen von upcyte[®] mvEZ und anderen Zellen die Vaskularisierung verbessern. Kürzlich konnte von Wang und Kollegen gezeigt werden, dass

eine Ko-Kultur von Endothelzellen und glatten Muskelzellen die Vaskularisierung der SIS *in-vivo* verbesserte. Des Weiteren zeigten erste Versuche zur Ko-Kultur von upcyte[®] mvEZ und upcyte[®] Hepatozyten vielversprechende Ergebnisse. In weiterführenden Experimenten soll der positive Effekt der Ko-Kultur auf die Eigenschaften der Hepatozyten genau untersucht werden. Der Aufbau eines dreidimensionalen Ko-Kultur Modells zwischen upcyte[®] mvEZ und upcyte[®] Hepatozyten für Cytochrom-Induktion CYP Studien für zum Beispiel pharmazeutischer Wirkstoffe wäre denkbar. CYP spielen eine wichtige Rolle bei Phase I Verstoffwechslung pharmazeutischer Wirkstoffe.

Upcyte[®] mvEZ könnten für die *in-vitro* Prävaskularisierung verschiedener Trägermaterialien getestet werden. Die dreidimensionale Kultivierung von Zellen verbesserte die Zelleigenschaften und ahmt die Mikroumgebung im Körper besser nach (Griffith & Swartz 2006; Elliott & Fan Yuan 2011). Der Bedarf an vaskularisierten, humanen, dreidimensionalen, *in-vitro* Gewebemodellen für die Arzneimittelentwicklung ist hoch (Elliott & Fan Yuan 2011). Upcyte[®] mvEZ sind generell für den Aufbau solcher *in-vitro* Testsystemen geeignet. Vorstellbar wäre zum Beispiel der Aufbau eines Blut-Hirn-Schranke Modells mit upcyte[®] mvEZ. Yang und Kollegen etablierten ein solches Modell 2011 mit mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Gehirn (Z.-H. Yang et al. 2011). Oder auch der Aufbau einer künstlichen Lebermodells aus upcyte[®] mvEZ und upcyte[®] Hepatozyten wäre ein zukünftiger Ansatz. Die upcyte[®] mvEZ ermöglichen die Standardisierung eines Testsystems, da sie in großen Mengen eines Spenders verfügbar sind und es somit zu keinen Spender-zu-Spender Varianzen bei den Ergebnissen kommt.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, R.H. & Alitalo, K., 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(6), pp.464–78.
- Ades, E.W. et al., 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of investigative dermatology*, 99(6), pp.683–90.
- Aird, W.C., 2007a. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research*, 100(2), pp.158–73.
- Aird, W.C., 2007b. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation research*, 100(2), pp.174–90.
- Amiel, G.E. et al., 2006. Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells. *Tissue engineering*, 12(8), pp.2355–65.
- Andonegui, G. et al., 2003. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *The Journal of clinical investigation*, 111(7), pp.1011–20.
- Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C., 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development*, 22(10), pp.1276–312.
- Anon, 2012. Deutsche Stiftung für Organtransplantation. Available at: <http://www.dso.de/>
- Anon, 2008. Grundlagen der Molekularen Medizin. Available at: <http://ebooks.ub.uni-muenchen.de/16697/>
- Anon, 2002. Molecular Biology of the Cell. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- Antonarakis, E.S. & Carducci, M.A., 2012. Targeting angiogenesis for the treatment of prostate cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(4), pp.365–76.
- Arnaoutova, I. et al., 2009. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 12(3), pp.267–74.
- Arosarena, O., 2005. Tissue engineering. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 13(4), pp.233–41.
- Asahara, T. et al., 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research*, 85(3), pp.221–8.

- Atala, A., 2004. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation research*, 7(1), pp.15–31.
- Auerbach, R., Auerbach, W. & Polakowski, I., 1991. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacology & therapeutics*, 51(1), pp.1–11.
- Ausprunk, D.H. & Folkman, J., 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular research*, 14(1), pp.53–65.
- BENNETT, H.S., LUFT, J.H. & HAMPTON, J.C., 1959. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *The American journal of physiology*, 196(2), pp.381–90.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E., 1954. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). *Blood*, 9(12), pp.1194–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13208769> [Accessed June 26, 2012].
- BOYDEN, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of experimental medicine*, 115, pp.453–66.
- Bader, A. et al., 1998. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 14(3), pp.279–84.
- Badylak, Stephen F, 2002. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in cell & developmental biology*, 13(5), pp.377–83.
- Badylak, Stephen F & Gilbert, T.W., 2008. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in immunology*, 20(2), pp.109–16.
- Bajada, S. et al., 2008. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(4), pp.169–83.
- Bauer, H.C. et al., 2011. New aspects of the molecular constituents of tissue barriers. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 118(1), pp.7–21.
- Beckmann, H. et al., 1976. Cytologie and cytochemistry of colony cells in soft agar gel culture from normal and leukemic bone marrow. *Hämatologie und Bluttransfusion*, 19, pp.21–32.
- Benichou, G. et al., 2011. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. *Immunotherapy*, 3(6), pp.757–70.
- Bentley, G. et al., 2003. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 85(2), pp.223–30.

- Bettahalli, N.M.S. et al., 2011. Integration of hollow fiber membranes improves nutrient supply in three-dimensional tissue constructs. *Acta biomaterialia*, 7(9), pp.3312–24.
- Binder, S. et al., 2002. Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: a pilot study. *American journal of ophthalmology*, 133(2), pp.215–25.
- Black, A.F. et al., 1998. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(13), pp.1331–40.
- Bleiziffer, O., 2012. Erforschung der Blutgefäßneubildung. Available at: http://www.uk-erlangen.de/e467/e583/e24068/e24198/index_ger.html.
- Bodnar, A.G. et al., 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), pp.349–52.
- Braspenning J, Holder S, K.J., 2010. upcyte-Patent.
- Briscoe, D.M. et al., 1999. The allogeneic response to cultured human skin equivalent in the hu-PBL-SCID mouse model of skin rejection. *Transplantation*, 67(12), pp.1590–9.
- Brittberg, M. et al., 2001. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clinical orthopaedics and related research*, (391 Suppl), pp.S337–48.
- Brittberg, M. et al., 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine*, 331(14), pp.889–95.
- Brown, A.M. et al., 1986. A retrovirus vector expressing the putative mammary oncogene int-1 causes partial transformation of a mammary epithelial cell line. *Cell*, 46(7), pp.1001–9.
- Burkard, A. et al., 2012. Generation of proliferating human hepatocytes using upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*.
- Bär, A. et al., 2010. The pro-angiogenic factor CCN1 enhances the re-endothelialization of biological vascularized matrices in vitro. *Cardiovascular research*, 85(4), pp.806–13.
- Caligaris-Cappio, F. et al., 1987. Phenotypic, cytogenetic and molecular characterization of a new B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cell line. *Leukemia research*, 11(7), pp.579–88.
- Campochiaro, P.A., 2004. Ocular neovascularisation and excessive vascular permeability. *Expert opinion on biological therapy*, 4(9), pp.1395–402.
- Carley, W.W., Niedbala, M.J. & Gerritsen, M.E., 1992. Isolation, cultivation, and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 7(6), pp.620–30.

- Carmeliet, P., 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), pp.389–95.
- Carmeliet, P. & Jain, R K, 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), pp.249–57.
- Carpenter, G. & Cohen, S., 1979. Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*, 48, pp.193–216.
- Carpentier, B., Gautier, A. & Legallais, C., 2009. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut*, 58(12), pp.1690–702.
- Chalupowicz, D.G. et al., 1995. Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. *The Journal of cell biology*, 130(1), pp.207–15.
- Chamberlain, S.J., Li, X.-J. & Lalande, M., 2008. Induced pluripotent stem (iPS) cells as in vitro models of human neurogenetic disorders. *Neurogenetics*, 9(4), pp.227–35.
- Cherubino, P. et al., 2003. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong)*, 11(1), pp.10–5.
- Chrobak, K.M., Potter, D.R. & Tien, J., 2006. Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro. *Microvascular research*, 71(3), pp.185–96.
- Colton, C.K., 1995. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell transplantation*, 4(4), pp.415–36.
- Conconi, M.T. et al., 2010. Effects on in vitro and in vivo angiogenesis induced by small peptides carrying adhesion sequences. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 16(7), pp.349–57.
- Costin, G.-E., Birlea, S.A. & Norris, D.A., 2012. Trends in wound repair: cellular and molecular basis of regenerative therapy using electromagnetic fields. *Current molecular medicine*, 12(1), pp.14–26.
- Deleu, J. & Trueta, J., 1965. Vascularisation of bone grafts in the anterior chamber of the eye. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 47, pp.319–29.
- Davison, P.M., Bensch, K. & Karasek, M.A., 1980. Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture. *The Journal of investigative dermatology*, 75(4), pp.316–21.
- DeLisser, H.M., Newman, P.J. & Albelda, S.M., 1994. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunology today*, 15(10), pp.490–5.
- Deacon, T. et al., 1997. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nature medicine*, 3(3), pp.350–3.

- Delia, D. et al., 1993. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*, 81(4), pp.1001–8.
- Demaison, C. et al., 2002. High-Level Transduction and Gene Expression in Hematopoietic Repopulating Cells Using a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Lentiviral Vector Containing an Internal Spleen Focus Forming Virus Promoter. *Human Gene Therapy*, 13(7), pp.803–813.
- Desbois-Mouthon, C. et al., 2000. Insulin-mediated cell proliferation and survival involve inhibition of c-Jun N-terminal kinases through a phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1-dependent pathway. *Endocrinology*, 141(3), pp.922–31.
- Donovan, D. et al., 2001. Comparison of three in vitro human “angiogenesis” assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis*, 4(2), pp.113–21.
- Dorotka, R. et al., 2005. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials*, 26(17), pp.3617–29.
- Du, G. et al., 2011. Expression of REIC/Dkk-3 in normal and hyperproliferative epidermis. *Experimental dermatology*, 20(3), pp.273–7.
- Dudzinski, D.M. et al., 2006. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 46, pp.235–76.
- Durham, J.T. & Herman, I.M., 2011. Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Current diabetes reports*, 11(4), pp.253–64.
- Elliott, N.T. & Yuan, Fan, 2011. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(1), pp.59–74.
- Elshal, M.F. et al., 2005. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*, 106(8), pp.2923–4.
- Erbs, S. et al., 2005. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circulation research*, 97(8), pp.756–62.
- Erusalimsky, J.D. & Skene, C., 2009. Mechanisms of endothelial senescence. *Experimental physiology*, 94(3), pp.299–304.
- Feldman, J.D., 1969. Graft rejection. *Archives of internal medicine*, 123(6), pp.713–8.
- Fink, J.S. et al., 2000. Porcine xenografts in Parkinson’s disease and Huntington’s disease patients: preliminary results. *Cell transplantation*, 9(2), pp.273–8.

- Fodor, W.L., 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, p.102.
- Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285(21), pp.1182–6.
- Folkman, J., Haudenschild, C.C. & Zetter, B.R., 1979. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), pp.5217–21.
- Folkman, J. & Hochberg, M., 1973. Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal of experimental medicine*, 138(4), pp.745–53.
- Folkman, J. & Shing, Y., 1992. Angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 267(16), pp.10931–4.
- Forgacs, G., 2012. Tissue engineering: Perfusable vascular networks. *Nature Materials*, 11(9), pp.746–747.
- Form, D.M., Pratt, B.M. & Madri, J.A., 1986. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 55(5), pp.521–30.
- Freedman, V.H. & Shin, S.I., 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*, 3(4), pp.355–9.
- Fuchs, J.R., Nasser, B.A. & Vacanti, J.P., 2001. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *The Annals of thoracic surgery*, 72(2), pp.577–91.
- Gay, S. et al., 1976. Simultaneous synthesis of types I and III collagen by fibroblasts in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), pp.4037–40.
- Gebrane-Younes, J. et al., 1988. Weibel-Palade bodies in pig megakaryocytes. *Biological structures and morphogenesis*, 1(2), pp.58–62.
- Gilmore, L. et al., 2012. Arginine functionalization of hydrogels for heparin binding—a supramolecular approach to developing a pro-angiogenic biomaterial. *Biotechnology and bioengineering*.
- Gitlin, J.D. & D'Amore, P.A., 1983. Culture of retinal capillary cells using selective growth media. *Microvascular research*, 26(1), pp.74–80.
- Goldstein, A.S. et al., 2001. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22(11), pp.1279–88.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S., 1977. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism: clinical and experimental*, 26(11), pp.1257–75.

- Gospodarowicz, D., Mescher, A.L. & Birdwell, C.R., 1978. Control of cellular proliferation by the fibroblast and epidermal growth factors. *National Cancer Institute monograph*, (48), pp.109–30.
- Gospodarowicz, D. & Moran, J.S., 1976. Growth factors in mammalian cell culture. *Annual review of biochemistry*, 45, pp.531–58.
- Gougos, A. & Letarte, M., 1988. Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(6), pp.1934–40.
- Grau, G.E. & Lou, J., 1993. TNF in vascular pathology: the importance of platelet-endothelium interactions. *Research in immunology*, 144(5), pp.355–63.
- Gray, D.A., 1991. Insertional mutagenesis: neoplasia arising from retroviral integration. *Cancer investigation*, 9(3), pp.295–304.
- Green, H., Goldberg, B. & Todaro, G.J., 1966. Differentiated cell types and the regulation of collagen synthesis. *Nature*, 212(5062), pp.631–3.
- Griffioen, A.W. & Molema, G., 2000. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological reviews*, 52(2), pp.237–68.
- Griffith, L.G., 2002. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, pp.83–95.
- Griffith, L.G. & Naughton, G., 2002. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), pp.1009–14.
- Griffith, L.G. & Swartz, M.A., 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(3), pp.211–24.
- Grimwood, J., Bicknell, R. & Rees, M.C., 1995. The isolation, characterization and culture of human decidual endothelium. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(8), pp.2142–8.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, pp.585–621.
- Hacker, M.C. & Mikos, Antonios G, 2006. Trends in tissue engineering research. *Tissue engineering*, 12(8), pp.2049–57.
- Hahn, W.C., 2002. immortalization and transformation of human cells. *Molecules and cells*, 13(3), pp.351–61.
- Hanahan, D., 1997. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5322), pp.48–50.

- Hanna, J. et al., 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), pp.1920–3.
- Harrison, M.A. & Rae, I.F., 1997. *General Techniques of Cell Culture*, Available at: http://books.google.com/books?hl=de&lr=&id=P_-Mkis9lo0C&pgis=1
- Herrera, M.D. et al., 2010. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing research reviews*, 9(2), pp.142–52.
- Hewett, P.W. & Murray, J.C., 1996. Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 221(3), pp.697–702.
- Hewett, P.W. & Murray, J.C., 1993. Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 29A(11), pp.823–30.
- Hirschi, K K & D'Amore, P.A., 1996. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular research*, 32(4), pp.687–98.
- Hirschi, Karen K et al., 2002. Vascular assembly in natural and engineered tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, pp.223–42.
- Hodde, J., 2002. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue engineering*, 8(2), pp.295–308.
- Holthöfer, H. et al., 1982. Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(1), pp.60–6.
- Hopfer, U. et al., 1996. Immortalization of epithelial cells. *The American journal of physiology*, 270(1 Pt 1), pp.C1–11.
- Hoshiba, T. et al., 2010. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert opinion on biological therapy*, 10(12), pp.1717–28.
- Hoying, J.B., Boswell, C.A. & Williams, S.K., Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 32(7), pp.409–19.
- Huang, P. et al., 2011. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 475(7356), pp.386–9.
- Hutmacher, D W, 2001. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 12(1), pp.107–24.
- Hutmacher, Dietmar W & Singh, H., 2008. Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture. *Trends in biotechnology*, 26(4), pp.166–72.

- Hutter, H. et al., 2000. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5455), pp.989–94.
- IGB, F., 2012. Dreidimensionale organoide Testsysteme- Alternativen zu Tierversuchen.
- Iruela-Arispe, M.L. & Dvorak, H.F., 1997. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thrombosis and haemostasis*, 78(1), pp.672–7.
- Irving, M.G. et al., 1984. Characterization and culture of sinusoidal endothelium from normal rat liver: lipoprotein uptake and collagen phenotype. *Gastroenterology*, 87(6), pp.1233–47.
- Jackson, C.J. et al., 1990. Binding of human endothelium to *Ulex europaeus* I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *Journal of cell science*, 96 (Pt 2), pp.257–62.
- Jackson, C.J. & Nguyen, M., 1997. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(10), pp.1167–77.
- Jaffe, E.A., 1977. Endothelial cells and the biology of factor VIII. *The New England journal of medicine*, 296(7), pp.377–83.
- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. & Nachman, R.L., 1973a. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 52(11), pp.2757–64.
- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. & Nachman, R.L., 1973b. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 52(11), pp.2757–64.
- Jain, R K et al., 1997. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nature medicine*, 3(11), pp.1203–8.
- Jain, Rakesh K et al., 2005. Engineering vascularized tissue. *Nature biotechnology*, 23(7), pp.821–3.
- Kadohama, T. et al., 2007. Effects of different types of fluid shear stress on endothelial cell proliferation and survival. *Journal of cellular physiology*, 212(1), pp.244–51.
- Kannan, R.Y. et al., 2005. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials*, 26(14), pp.1857–75.
- Karasek, M.A., 1989. Microvascular endothelial cell culture. *The Journal of investigative dermatology*, 93(2 Suppl), p.33S–38S.
- Kerbel, R S, 2000. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 21(3), pp.505–15.

- Khan, F., Galarraga, B. & Belch, J.J.F., 2010. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(5), pp.253–61.
- Kim, S. & von Recum, H., 2008. Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 14(1), pp.133–47.
- Kirsner, R.S., Falanga, V. & Eaglstein, W.H., 1998. The development of bioengineered skin. *Trends in biotechnology*, 16(6), pp.246–9.
- Klagsbrun, M. & D'Amore, P.A., 1991. Regulators of angiogenesis. *Annual review of physiology*, 53, pp.217–39.
- Kloss, F.R. et al., 2007. Nanocrystalline diamond--an excellent platform for life science applications. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 7(12), pp.4581–7.
- Kneser, U. et al., Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(1), pp.7–19.
- Knowles, B.B., Howe, C.C. & Aden, D.P., 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science (New York, N.Y.)*, 209(4455), pp.497–9.
- Korff, T. & Augustin, H.G., 1998. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *The Journal of cell biology*, 143(5), pp.1341–52.
- Korff, T. & Augustin, H.G., 1999. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *Journal of cell science*, 112 (Pt 1, pp.3249–58.
- Krause, D.S. et al., 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87(1), pp.1–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8547630> [Accessed July 10, 2012].
- Kreuz, P.C. et al., 2011. Repair of focal cartilage defects with scaffold-assisted autologous chondrocyte grafts: clinical and biomechanical results 48 months after transplantation. *The American journal of sports medicine*, 39(8), pp.1697–705.
- Kreuz, P.C. et al., 2009. Treatment of focal degenerative cartilage defects with polymer-based autologous chondrocyte grafts: four-year clinical results. *Arthritis research & therapy*, 11(2), p.R33.
- Krieg, T. & LeRoy, E.C., 1998. Diseases of the extracellular matrix. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 76(3-4), pp.224–5.
- Kubota, Y. et al., 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of cell biology*, 107(4), pp.1589–98.

- Kumar & L, R., 2009. Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition.
- Kumar, M. et al., 2001. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Human gene therapy*, 12(15), pp.1893–905.
- Kuroyanagi, Y. et al., 1993. A cultured skin substitute composed of fibroblasts and keratinocytes with a collagen matrix: preliminary results of clinical trials. *Annals of plastic surgery*, 31(4), pp.340–9; discussion 349–51.
- Köhler, G. & Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), pp.495–7.
- Langer, R & Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), pp.920–6.
- Lantz, G.C. et al., Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 6(3), pp.297–310.
- Lawley, T.J. & Kubota, Y., 1989. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *The Journal of investigative dermatology*, 93(2 Suppl), p.59S–61S.
- Lechleitner, T. et al., 2008. The surface properties of nanocrystalline diamond and nanoparticulate diamond powder and their suitability as cell growth support surfaces. *Biomaterials*, 29(32), pp.4275–84.
- Lenk, K. et al., 2005. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. *European heart journal*, 26(18), pp.1903–9.
- Levenberg, S. et al., 2002. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), pp.4391–6.
- Levenberg, S. & Langer, Robert, 2004. Advances in tissue engineering. *Current topics in developmental biology*, 61, pp.113–34.
- Li, Q. et al., 2003. Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *The Journal of pathology*, 201(2), pp.296–302.
- Liebsch, M. et al., 2011. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Archives of toxicology*, 85(8), pp.841–58.
- Lightfoot, E.N., 1974. Transport phenomena and living systems: Biomedical applications of momentum and mass transfer. *John Wiley, New York*.

- Lin, T.P. et al., 1992. Role of endocrine, autocrine, and paracrine interactions in the development of mammary hyperplasia in Wnt-1 transgenic mice. *Cancer research*, 52(16), pp.4413–9.
- Lindl, T., 2002. *Zell-Und Gewebekultur: Einführung In die Grundlagen Sowie Ausgewahlte Methoden Und Anwendungen*, Spektrum, Akad. Verlag.
- Lindl, T. & Gstraunthaler, G., 2008. *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank (German Edition)*, Spektrum Akademischer Verlag. Available at: <http://www.amazon.com/Zell-Gewebekultur-Grundlagen-Laborbank-Edition/dp/3827417767>
- Linke, K. et al., 2007. Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue engineering*, 13(11), pp.2699–707.
- Liu, W.F. & Chen, C.S., 2005. Engineering biomaterials to control cell function In this review , we highlight some of the recent advances in. , 8(12), pp.28–35.
- Lou, J.N. et al., 1998. An improved method for isolation of microvascular endothelial cells from normal and inflamed human lung. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 34(7), pp.529–36.
- Lovett, M. et al., 2009. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 15(3), pp.353–70.
- L’Heureux, N. et al., 2006. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature medicine*, 12(3), pp.361–5.
- L’Heureux, N., McAllister, T.N. & de la Fuente, L.M., 2007. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *The New England journal of medicine*, 357(14), pp.1451–3.
- Macpherson, I. & Montagnier, L., 1964. Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology*, 23, pp.291–4.
- Macchiarini, P. et al., 2004. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 128(4), pp.638–41.
- Mackey, J.R. et al., 2012. Controlling angiogenesis in breast cancer: A systematic review of anti-angiogenic trials. *Cancer treatment reviews*, 38(6), pp.673–88.
- Madri, J.A. & Williams, S.K., 1983. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *The Journal of cell biology*, 97(1), pp.153–65.
- Mallanna, S.K. & Rizzino, A., 2010. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Developmental biology*, 344(1), pp.16–25.

- Malvankar, S.M. & Khan, W.S., 2012. An overview of the different approaches used in the development of meniscal tissue engineering. *Current stem cell research & therapy*, 7(2), pp.157–63.
- Manconi, F., Markham, R. & Fraser, I.S., 2000. Culturing endothelial cells of microvascular origin. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology*, 22(2-3), pp.89–99.
- Maragoudakis, M.E., 2000. Angiogenesis in health and disease. *General pharmacology*, 35(5), pp.225–6.
- Marks, R.M., Czerniecki, M. & Penny, R., 1985. Human dermal microvascular endothelial cells: an improved method for tissue culture and a description of some singular properties in culture. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association*, 21(11), pp.627–35.
- Martin, I., Wendt, D. & Heberer, M., 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 22(2), pp.80–6.
- Mastyugin, V. et al., 2004. A quantitative high-throughput endothelial cell migration assay. *Journal of biomolecular screening*, 9(8), pp.712–8.
- Mazariegos, G.V. et al., 2002. First clinical use of a novel bioartificial liver support system (BLSS). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2(3), pp.260–6.
- McLaren, A., 2001. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, 414(6859), pp.129–31.
- Meezan, E. et al., 1975. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life sciences*, 17(11), pp.1721–32.
- Mertsching, H & Hansmann, J, 2009. Bioreactor technology in cardiovascular tissue engineering. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 112, pp.29–37.
- Mertsching, H., 2006. Vaskularisierte Trägersysteme für in vitro Testsysteme. In *Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt. Tagungsband*. pp. 47 – 55.
- Mertsching, Heike et al., 2005. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*, 26(33), pp.6610–7.
- Mertsching, Heike et al., 2009. Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation*, 88(2), pp.203–10.
- Metzger, W. et al., 2011. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy*, 13(8), pp.1000–12.

- Mignatti, P. & Rifkin, D.B., 1996. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme & protein*, 49(1-3), pp.117–37.
- Miller, J.S. et al., 2012. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nature materials*, 11(9), pp.768–74.
- Miller-Kasprzak, E. & Jagodziński, P.P., 2007. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 55(4), pp.247–59.
- Minuth, W.W., Strehl, R. & Schumacher, K., 2004. Tissue factory: conceptual design of a modular system for the in vitro generation of functional tissues. *Tissue engineering*, 10(1-2), pp.285–94.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), pp.55–63.
- Muller, W.A. et al., 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *The Journal of experimental medicine*, 170(2), pp.399–414.
- Musahl, V. et al., 2004. The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament--a functional tissue engineering study in rabbits. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 22(1), pp.214–20.
- Naderi, H., Matin, M.M. & Bahrami, A.R., 2011. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *Journal of biomaterials applications*, 26(4), pp.383–417.
- Nagy, Z.A., 2012. Alloreactivity: an old puzzle revisited. *Scandinavian journal of immunology*, 75(5), pp.463–70.
- Navsaria, H.A. et al., 1995. Culturing skin in vitro for wound therapy. *Trends in biotechnology*, 13(3), pp.91–100.
- Nazhat, S.N. et al., 2007. Controlled microchannelling in dense collagen scaffolds by soluble phosphate glass fibers. *Biomacromolecules*, 8(2), pp.543–51.
- Nehls, V. & Drenckhahn, D., 1995. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvascular research*, 50(3), pp.311–22.
- Nelson, T.J. et al., 2010. Induced pluripotent stem cells: advances to applications. *Stem cells and cloning : advances and applications*, 3, pp.29–37.
- Nguyen, L.H. et al., 2012. Vascularized Bone Tissue Engineering: Approaches for Potential Improvement. *Tissue engineering. Part B, Reviews*.

- Nibourg, G.A.A. et al., 2012. Perfusion flow rate substantially contributes to the performance of the HepaRG-AMC-bioartificial liver. *Biotechnology and bioengineering*.
- Nisato, R.E. et al., 2004. Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span. *The American journal of pathology*, 165(1), pp.11–24.
- Nomi, M. et al., 2006. Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering. *Current stem cell research & therapy*, 1(3), pp.333–43.
- Normand, J. & Karasek, M.A., 1995. A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 31(6), pp.447–55.
- Novosel, E.C., Kleinhans, C. & Kluger, P.J., 2011. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 63(4-5), pp.300–11.
- Nusse, R. & Varmus, H.E., 1992. Wnt genes. *Cell*, 69(7), pp.1073–87.
- O'Connor, 1981. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*, 1(8211), pp.75–8.
- O'Reilly, M. et al., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2), pp.277–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008168> [Accessed August 4, 2012].
- O'Reilly, M.S., 1997. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS*, 79, pp.273–94.
- Parenteau, N.L. et al., 1992. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology*, 9(1-3), pp.163–71.
- Patan, S., 2004. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer treatment and research*, 117, pp.3–32.
- Pauwels, K. et al., 2009. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Current gene therapy*, 9(6), pp.459–74.
- Pepper, M S et al., 1991. Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation in vitro: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta. *Journal of cellular physiology*, 146(1), pp.170–9.
- Petzelbauer, P. et al., 1993. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(9), pp.5062–72.
- Pollman, M.J., Naumovski, L. & Gibbons, G.H., 1999. Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *Journal of cellular physiology*, 178(3), pp.359–70.

- Pries, A.R. & Kuebler, W.M., 2006. Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*, (176 Pt 1), pp.1–40.
- Pries, A.R., Secomb, T.W. & Gaehtgens, P., 2000. The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 440(5), pp.653–66.
- Pusch, J. et al., 2011. The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine. *Biomaterials*, 32(30), pp.7469–78.
- Radisic, M. et al., 2006. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds. *Tissue engineering*, 12(8), pp.2077–91.
- Ratcliffe, A. & Niklason, L.E., 2002. Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, pp.210–5.
- Ribatti, D. et al., 2002. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *Journal of hematotherapy & stem cell research*, 11(1), pp.81–90.
- Richard, L., Velasco, P. & Detmar, M., 1998. A simple immunomagnetic protocol for the selective isolation and long-term culture of human dermal microvascular endothelial cells. *Experimental cell research*, 240(1), pp.1–6.
- Richardson, T.P. et al., 2001. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nature biotechnology*, 19(11), pp.1029–34.
- Rivron, N C et al., 2008. Engineering vascularised tissues in vitro. *European cells & materials*, 15, pp.27–40.
- Roberts, G.P. & Brunt, J., 1985. Identification of an epidermal cell-adhesion glycoprotein. *The Biochemical journal*, 232(1), pp.67–70.
- Robotin-Johnson, M.C. et al., 1998. An experimental model of small intestinal submucosa as a growing vascular graft. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 116(5), pp.805–11.
- Rosso, F. et al., 2005. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *Journal of cellular physiology*, 203(3), pp.465–70.
- Rouwkema, Jeroen, de Boer, Jan & Van Blitterswijk, Clemens A, 2006. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue engineering*, 12(9), pp.2685–93.
- Rouwkema, Jeroen, Rivron, Nicolas C & van Blitterswijk, Clemens A, 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 26(8), pp.434–41.
- Rupnick, M.A., Carey, A. & Williams, S.K., 1988. Phenotypic diversity in cultured cerebral microvascular endothelial cells. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association*, 24(5), pp.435–44.

- Sabolinski, M.L. et al., 1996. Cultured skin as a “smart material” for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials*, 17(3), pp.311–20.
- Sakaguchi, Masakiyo, Huh, N.-H. & Namba, Masayoshi, 2011. A novel tumor suppressor, REIC/Dkk-3 gene identified by our in vitro transformation model of normal human fibroblasts works as a potent therapeutic anti-tumor agent. *Advances in experimental medicine and biology*, 720, pp.209–15.
- Sanford, G.L. & Harris-Hooker, S., 1990. Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(11), pp.2912–8.
- Sanz-Rodriguez, F. et al., 2004. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), pp.32858–68.
- Schanz J, Walles H, W.T., 2012. Tissue Engineering- Menschliches Gewebe aus dem Labor J. Bruns, ed. *GIT Labor-Fachzeitschrift*.
- Schanz, J. et al., 2009. Experimental tracheal patching using extracellular matrix scaffolds. *The Annals of thoracic surgery*, 87(4), pp.1321–2; author reply 1322–3.
- Schanz, J. et al., 2010. Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *Journal of biotechnology*, 148(1), pp.56–63.
- Scheller, K. et al., 2012. Upcyte[®] microvascular endothelial cells repopulate decellularized scaffold. *Tissue engineering. Part C, Methods*.
- Schenke-Layland, K. et al., 2008. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(6), pp.1537–46.
- Scherr, M et al., 2001. Quantitative determination of lentiviral vector particle numbers by real-time PCR. *BioTechniques*, 31(3), pp.520, 522, 524, passim.
- Scherr, Michaela & Eder, M., 2002. Gene transfer into hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Current gene therapy*, 2(1), pp.45–55.
- Schneeberger, E.E. & Lynch, R.D., 1984. Tight junctions. Their structure, composition, and function. *Circulation research*, 55(6), pp.723–33.
- Schofield, R., 1979. The pluripotent stem cell. *Clinics in haematology*, 8(2), pp.221–37.
- Schumacher, J.M. et al., 2000. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*, 54(5), pp.1042–50.
- Scott, P.A. & Bicknell, R., 1993. The isolation and culture of microvascular endothelium. *Journal of cell science*, 105 (Pt 2, pp.269–73.

- Seebach, C. et al., 2012. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularisation of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell transplantation*.
- Shay, Jerry W & Wright, Woodring E, 2005. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), pp.867–74.
- Shin’oka, T., Imai, Y. & Ikada, Y., 2001. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *The New England journal of medicine*, 344(7), pp.532–3.
- Si-Tayeb, K. et al., 2010. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC developmental biology*, 10, p.81.
- Skalak, T C & Price, R.J., 1996. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 3(2), pp.143–65.
- Skalak, Thomas C, Angiogenesis and microvascular remodeling: a brief history and future roadmap. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 12(1), pp.47–58.
- Song, J.J. & Ott, H.C., 2011. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in molecular medicine*, 17(8), pp.424–32.
- Song, Z. et al., 2009. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell research*, 19(11), pp.1233–42.
- Springer, M.L. et al., 1998. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Molecular cell*, 2(5), pp.549–58.
- Staton, C.A., Reed, M.W.R. & Brown, Nicola J, 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology*, 90(3), pp.195–221.
- Stein, G.S. et al. eds., 2010. *Human Stem Cell Technology and Biology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Stock, U.A. & Vacanti, J.P., 2001. Tissue engineering: current state and prospects. *Annual review of medicine*, 52, pp.443–51.
- Straus, D.S., 1984. Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. *Endocrine reviews*, 5(2), pp.356–69.
- Strehl, R. & Minuth, K.S.W.W., 2002. *Von der Zellkultur zum Tissue engineering*, Pabst, Wolfgang Science.
- Swerlick, R.A. et al., 1992. Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(1), pp.78–83.

- Takahashi, K. et al., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), pp.861–72.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp.663–76.
- Terai, S. et al., 2002. A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *Journal of gastroenterology*, 37 Suppl 1, pp.162–3.
- Thilo, D.G. et al., 1980. Isolation of human venous endothelial cells by different proteases. *Artery*, 8(3), pp.259–66.
- Thomson, J.A. et al., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), pp.1145–7.
- Thude, S. et al., 2008. Testsysteme für die Entwicklung von Tumordiagnoseverfahren. *Endoskopie heute*, 21(03), pp.191–194.
- Tibell, A. et al., 1994. Pig-to-human islet transplantation in eight patients. *Transplantation proceedings*, 26(2), pp.762–3.
- Tran, N. et al., 2003. Autologous cell transplantation and cardiac tissue engineering: potential applications in heart failure. *Biorheology*, 40(1-3), pp.411–5.
- Tremolada, G. et al., 2012. The role of angiogenesis in the development of proliferative diabetic retinopathy: impact of intravitreal anti-VEGF treatment. *Experimental diabetes research*, 2012, p.728325.
- Tsuji, T. et al., 2000. A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 268(1), pp.20–4.
- Unger, R.E. et al., 2002. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular research*, 64(3), pp.384–97.
- Unger, R.E. et al., 2005. Vascularization and gene regulation of human endothelial cells growing on porous polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes. *Biomaterials*, 26(17), pp.3461–9.
- Usami, K. et al., 2009. Composite implantation of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells enhances tissue-engineered bone formation. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 90(3), pp.730–41.
- Vandewoude, S. & Rollin, B.E., 2009. Practical considerations in regenerative medicine research: IACUCs, ethics, and the use of animals in stem cell studies. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 51(1), pp.82–4.

- Vernon, R.B. et al., 1992. Reorganization of basement membrane matrices by cellular traction promotes the formation of cellular networks in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 66(5), pp.536–47.
- Vernon, R.B. & Sage, E.H., 1999. A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices. *Microvascular research*, 57(2), pp.118–33.
- Voyta, J.C. et al., 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *The Journal of cell biology*, 99(6), pp.2034–40.
- de Vries, C. et al., 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5047), pp.989–91.
- Walles, T. et al., 2004. Expansion of chondrocytes in a three-dimensional matrix for tracheal tissue engineering. *The Annals of thoracic surgery*, 78(2), pp.444–8; discussion 448–9.
- Walles, T. et al., 2003. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials*, 24(7), pp.1233–9.
- Wang, S., Qu, X. & Zhao, R.C., 2011. Mesenchymal stem cells hold promise for regenerative medicine. *Frontiers of medicine*, 5(4), pp.372–8.
- Wang, Z. et al., 2012. Rapid vascularization of tissue-engineered vascular grafts in vivo by endothelial cells in co-culture with smooth muscle cells. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 23(4), pp.1109–17.
- Werner, M. et al., 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology*, 24(7), pp.1016–9.
- Wernig, M. et al., 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), pp.5856–61.
- Winiarski, B.K. et al., 2011. An improved and reliable method for isolation of microvascular endothelial cells from human omentum. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 18(8), pp.635–45.
- Wong, M.K. & Gotlieb, A.I., 1984. In vitro reendothelialization of a single-cell wound. Role of microfilament bundles in rapid lamellipodia-mediated wound closure. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 51(1), pp.75–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6376946> [Accessed August 31, 2012].
- Woodcock, T.E. & Woodcock, T.M., 2012. Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy. *British journal of anaesthesia*, 108(3), pp.384–94.

- Yang, J. et al., 1999. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *The Journal of biological chemistry*, 274(37), pp.26141–8.
- Yang, Z.-H. et al., 2011. An in vitro transport model for rapid screening and predicting the permeability of candidate compounds at blood-brain barrier. *Journal of Asian natural products research*, 13(12), pp.1087–97.
- Yuasa, S. & Fukuda, K., 2008. Recent advances in cardiovascular regenerative medicine: the induced pluripotent stem cell era. *Expert review of cardiovascular therapy*, 6(6), pp.803–10.
- Zhang, Z. et al., 2012. Generation, characterization and potential therapeutic applications of mature and functional hepatocytes from stem cells. *Journal of cellular physiology*.
- Zhou, H. et al., 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*, 4(5), pp.381–4.
- Zhou, M. et al., 2012. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 100(1), pp.111–20.
- Zisch, A.H. et al., 2003. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(15), pp.2260–2.
- Zisch, A.H., Lutolf, M.P. & Hubbell, J.A., Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 12(6), pp.295–310.
- Zulato, E. et al., 2012. Metabolic effects of anti-angiogenic therapy in tumors. *Biochimie*, 94(4), pp.925–31.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Einleitung

Abb. 1 Zyklus des Tissue Engineering

Abb. 2 Aufbau eines Blutgefäßes

Referenz: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19194.htm>

Abb. 3 Verschiedene Gefäßtypen

Referenz: [http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icv/
cardiovascularsystemppt.htm](http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icv/cardiovascularsystemppt.htm)

Abb. 4 Schematische Darstellung der upcyte[®] Technologie

Methoden

Abb. 5 Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen

Abb. 6 Berechnung der Populationsverdopplungen einer Zellkultur

Abb. 7 Schematische Darstellung der Virusherstellung mit dem Vier-Plasmid-System
Referenz: modifiziert Abbildung von
[http://tolls.invitrogen.com/content/sfs/manuals/virapower_lentiviral_system_man.
pdf](http://tolls.invitrogen.com/content/sfs/manuals/virapower_lentiviral_system_man.pdf)

Abb. 8 Schematische Darstellung der drei Phasen der qRT-PCR
Referenz: Biospektrum 1/04 PCR-Eine Methode

Abb. 9 Schematischer Aufbau des relativen Zell-Migration-Assay
Referenz: www-pro-4-pro.com
FluoroBlok[™] Insert
Referenz: www.bioscience.com

Abb. 10 Reaktorwagen
Referenz: IGB Fraunhofer Stuttgart

Abb. 11 Schematische Darstellung der Immunhistochemie

Ergebnisse

- Abb. 12 Morphologie primärer mikrovaskuläre Endothelzellen
- Abb. 13 FACS-Daten der ersten Transduktion
- Abb. 14 Vergleich der Transduktionseffizienz
- Abb. 15 Aufnahmen von mikrovaskulären Endothelzellen an Tag 1 und Tag 21 nach doppelter Transduktion mit verschiedenen viralen Konstrukten
- Abb. 16 Wachstumskurven von primäre mvEZ und upcyte[®] mvEZ
- Abb. 17 Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase Färbung von upcyte[®] mvEZ
- Abb. 18 Morphologie der mvEZ
- Abb. 19 Immunzytochemie Färbungen 1 von upcyte[®] mvEZ
- Abb. 20 Immunzytochemie Färbungen 2 von upcyte[®] mvEZ
- Abb. 21 *Ulex europaeus agglutinin I* Färbung
- Abb. 22 Zelluläre Aufnahme von LDL
- Abb. 23 Relativer Migrationsassay
- Abb. 24 Sprouting-Assay: Sphäroide
- Abb. 25 Sprouting-Assay: Representative Aufnahmen der endothelialen Sprossung von Sphäroiden nach 24h
- Abb. 26 Tube formation Assay
- Abb. 27 Expression des Differenzierungsmarker REIC/Dkk in verschiedenen PVs von upcyte[®] mvEZ
- Abb. 28 Softagar-Assay
- Abb. 29 Mikroskopische Betrachtung der Azellularisierung
- Abb. 30 Mikroskopische Betrachtung histologischer Schnitt der rebesiedelten BioVaSc nach Versuchsende (H&E Färbung)
- Abb. 31 Mikroskopische Betrachtung der rebesiedelten BioVaSc nach Versuchsende (MTT- Test)
- Abb. 32 Mikroskopische Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten, rebesiedelten BioVaSc nach Versuchsende

Abb. 33 Lebend-Tot Färbung der rebesiedelten BioVaSc nach Versuchsende

Tabellen

Tab. 1 Endothelzellmarker

Tab. 2 Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin Färbung

Tab. 3 Bedingungen zur Etablierung des upcyte[®] Prozesses auf primären mvEZ

8. Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen ein herzlichen Dank.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Walles für die wertvollen Ratschläge und das entgegengebrachte Vertrauen, sowie die Unterstützung während meiner Promotionszeit und für die Übernahme des Referats bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Krohne zu bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Weiterhin möchte ich mich bei der Firma Medicyte GmbH für die Möglichkeit meine Doktorarbeit bei ihnen durchzuführen bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank Dr. Braspenning für die fachliche Betreuung vor Ort. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Nadja Hartmann, Nicola Hewitt, Bernhard Münst und Stefan Heinz für die Hilfe bei allen Fragen rund um meine Doktorarbeit bedanken.

Großer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walles am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin in Würzburg, die mir jederzeit bei allen Anliegen geholfen haben.

Großer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Zellsysteme am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, die mir jeder Zeit unterstützen zur Seite standen. Besonders hervorheben möchte ich, Iris Dally, die zusammen mit mir die Veröffentlichung geschrieben hat und die Versuche zur BioVaSc durchführt hat. Außerdem möchte ich, Markus Schandar recht herzlich Danken für die Versorgung mit Hautbiopsien.

Herzlichen Dank auch an die komplette Arbeitsgruppe der Firma Medicyte GmbH für Arbeitserleichterungen jeglicher Art und die gute Arbeitsatmosphäre. Besonders geht mein Dank an Astrid Nörenberg, die während der Zeit eine echte Freundin wurde.

Ein Dank geht auch an das komplette Konsortium des EU-Projekt VascuBone für die stets konstruktiven Diskussionen und Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Und nicht zuletzt Danke ich meiner Familie, die mir in meinem Leben alles ermöglicht haben und in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Und weil ich nicht das wäre was ich bin ohne meine Freunde: Danke auch an meine Mädels die immer für mich da sind.

Und ganz zum Schluß möchte ich mich bei meinem Allerbesten bedanken, der einfach dafür gesorgt hat das ich glücklich bin und mich in meinem Tuen bestärkt hat.

