

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-,  
Plastische und Wiederherstellungschirurgie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Meffert

**Kokultur von mesenchymalen Stammzellen aus  
humanem Fettgewebe und mikrovaskulären  
Endothelzellen**

—  
**Ausgewählte Aspekte in einem  
3D Sphäroid-Modell**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
**Markus Nestmeyer**  
aus Nürtingen

Würzburg, August 2014



Referent: Prof. Dr. Torsten Blunk

Korreferent: Prof. Dr. Norbert Schütze

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2015

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Weißes Fettgewebe in der Forschung	2
1.2	Fettgewebe und seine Funktion	3
1.3	Adipozytäre Entwicklung und Differenzierung	5
1.4	Gefäßentwicklung im weißen Fettgewebe	7
1.5	In vitro Kultivierung	8
1.6	3-dimensionale Kokultivierung von ASC und MVEC	10
1.7	Fraktionierung von Zellgemischen mittels MACS	12
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1	Material	17
3.2	Methoden	21
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
4.1	Kokultivierung von ASC und MVEC	29
4.2	Zellfraktionierung mittels MACS	32
4.3	Immunhistochemische Färbung von aktivem $\beta$ -Catenin in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden	42

<b>5</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>45</b>
5.1	Herstellung und Durchführung 2- und 3-dimensionaler Kulturen . . . . .	46
5.2	Zellfraktionierung mittels MACS . . . . .	47
5.3	Genexpressionsanalyse . . . . .	51
5.4	Immunhistochemische Färbung auf aktives $\beta$ -Catenin . . . . .	55
5.5	Abschlussbetrachtung . . . . .	59
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Literatur- u. Abbildungsverzeichnis</b> . . . . .	<b>63</b>
7.1	Literaturverzeichnis . . . . .	64
7.2	Abbildungsverzeichnis . . . . .	73
<b>8</b>	<b>Anhang</b> . . . . .	<b>74</b>
	Liste der verwendeten Abkürzungen . . . . .	75
	Danksagung	
	Lebenslauf	



# Kapitel 1

## Einleitung

## 1.1 Weißes Fettgewebe in der Forschung

Die Erforschung des weißen Fettgewebes begründet sich im Wesentlichen aus zwei Motivationen: Zum einen aus der stark gestiegenen Prävalenz der Adipositas und den mit ihr einhergehenden Gesundheitsproblemen und der Hoffnung auf bessere Behandlungsmöglichkeiten durch besseres Verständnis der Physiologie, zum anderen – im Bereich des Tissue Engineering – aus dem Interesse in Zukunft *in vitro* gezüchtetes Fettgewebe zur Weichteildefektdeckung nutzen zu können.

In den Vereinigten Staaten von Amerika waren in den Jahren 2003/2004 32,9% der erwachsenen Bevölkerung, sowie 17% der Jugendlichen im Alter von 12 bis 19 Jahren adipös [1]. Mit der Adipositas assoziierte schwerwiegende Krankheiten verleihen diesen Zahlen zusätzlich Gewicht. So ist es heute unumstritten, dass mit der Adipositas ein erhöhtes Risiko für Diabetes, Bluthochdruck, Dyslipidämie, Atherosklerose und somit letztendlich auch für die koronare Herzkrankheit, Schlaganfälle, Steatosis Hepatis, Gelenkarthrosen, COPD und sogar verschiedenen Krebsformen einhergeht [2–5]. Obwohl heute viele Behandlungsmöglichkeiten der Adipositas bekannt sind, stellt die effektive und andauernde Therapie aber noch immer eine Herausforderung dar [1] und medikamentöse Therapien sind auch heute noch wenig effizient und nebenwirkungsreich [6]. Dies liegt nicht zuletzt an der Tatsache, dass es zwar bekannt ist, dass Fettgewebe über Hormone mit umgebendem Gewebe kommuniziert, die genauen Mechanismen dieser Kommunikation aber weiterhin nur unzureichend bekannt sind [7].

Tissue-Engineering-Techniken versprechen neuartige Lösungen um den Problemen der derzeitigen Möglichkeiten Weichteildefekte zu decken zu begegnen [8]. So erhofft man sich, zukünftig Fettgewebe *in vitro* züchten zu können, um es später in Weichteildefekte implantieren zu können und so Abstoßungsreaktionen, Defekte an Transplantatentnahmestellen, ungünstige Formverhältnisse, etc. vermeiden zu können [8]. Dennoch stellt es heutzutage noch immer ein großes Problem dar, in 3-dimensionalen Kulturen die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen zu

gewährleisten [8]. Dieses Problem trifft besonders größere Gewebe-Grafts. Zwar gibt es Ansätze über spezielle Scaffold-Designs, die Applikation von angiogenen Faktoren oder über mikrochirurgische Gefäßeinpflanzung diesem Problem entgegenzutreten. Aber bis heute ist jeder dieser Lösungsversuche nachteilsbelastet und zum Heranzüchten von künstlichem WAT und dessen Implantation beim Menschen ungeeignet [9]. Obwohl Adipose Tissue Engineering bereits einen weiten Weg zurückgelegt hat, bedarf es noch weiterer Forschung um eines Tages größere Konstrukte zur Implantation erzeugen zu können.

Sowohl für die Erforschung der Adipositas als auch für das Adipose-Tissue-Engineering ist ein weiteres Verständnis bezüglich der Kommunikation bzw. Versorgung des Fettgewebes also von großer Bedeutung. Um dies zu erreichen bedarf es Modellen, welche die Komplexität des Gewebes besser abbilden als herkömmliche Zellkulturen.

## 1.2 Fettgewebe und seine Funktion

Menschliches Fettgewebe wird unterteilt in braunes (BAT) und weißes Fettgewebe (WAT). Braunes Fettgewebe findet man vor allem bei Neugeborenen [10]. Es kann über eine Kurzschlussverbindung in der Atmungskette Wärme erzeugen und dient so zur Thermoregulation [11]. Beim Erwachsenen existieren noch Reste des braunen Fettgewebes im vorderen Nackenbereich [12]. Der überwiegende Fettvorrat im Erwachsenenkörper besteht jedoch aus weißem Fettgewebe [10].

Aufgrund des nahezu ausschließlichen Auftretens von weißem Fettgewebe im Erwachsenenkörper ist dies Gegenstand intensiver Forschung. Die Verteilung des weißen Fettgewebes im Körper ist beim Erwachsenen jedoch in Gesamtmenge und Verteilungsmuster sehr unterschiedlich und von sehr vielen Faktoren abhängig. Dazu gehören unter anderem Alter, Herkunft, Lebensumstände und Umwelteinflüsse[13]. 80% des Fetts im menschlichen Körper liegt subkutan, nur ein relativ kleiner Teil von etwa 20% liegt in Nachbarschaft zu inneren Organen [10]. Dennoch ist dieses

Viszeralfett von besonderer gesundheitlicher Bedeutung, da ihm eine wesentliche Rolle im Entstehungsprozess vieler adipositasbedingten Erkrankungen beigemessen wird [14]. Obwohl Fettgewebe natürlich hauptsächlich aus reifen Fettzellen besteht, gehören dem Fettgewebe noch viele andere Zelltypen und Strukturen an, welche die vielfältige Funktionalität dessen erst ermöglichen. Dazu gehören mesenchymale Stammzellen als Vorläuferzellen, Endothelien, Extrazellulärmatrix und andere. Während man lange Zeit davon ausging, dass die Funktion des WAT sich auf das Speichern von Energie und Wärmeisolation beschränkt, weiß man heute, dass weißes Fettgewebe ein physiologisch komplexes Gewebe ist, welches vielfältige Aufgaben im menschlichen Körper besitzt [15–17]. So entdeckte man in Adipozyten die Sekretion von diversen Hormonen und Zytokinen wie Leptin, Adipsin, ASP, Angiotensinogen, Adiponectin und weiteren [16–18]. Diese wiederum erfüllen autokrine, parakrine und endokrine Funktionen [18]. Leptin beispielsweise dient als Feedbackhormon, indem es im Gehirn eine Verminderung der Nahrungsaufnahme und eine Erhöhung der körperlichen Aktivität bewirkt [19]. Adiponectin wirkt protektiv gegen adipositasassoziierte Erkrankungen. Ein erniedrigter Adiponectin-Spiegel tritt bei Adipositas auf und wird mit einer erhöhten Prävalenz von Typ-2 Diabetes in Verbindung gebracht [20]. Andere Faktoren greifen in den Energiehaushalt und die Blutdruckregulierung ein [18]. So ist weißes Fettgewebe ein endokrin aktives Gewebe, welches auf vielfältige Art und Weise mit sich und seiner Umwelt kommuniziert und aufgrund dessen einen höchst interessanten Ansatzpunkt für pharmakologische Therapiemöglichkeiten darstellt. Um einen solchen Ansatz besser verfolgen zu können ist ein genaueres Verständnis der Physiologie des WAT jedoch unabdingbar.

## 1.3 Adipozytäre Entwicklung und Differenzierung

Die Entwicklung von Adipozyten beginnt bei pluripotenten Stammzellen. Aus ihnen entstehen multipotente mesenchymale Stammzellen [21]. Aus diesen wiederum entwickeln sich über Adipoblasten zunächst Präadipozyten und im terminalen Differenzierungsschritt die reifen Adipozyten [21]. Der terminale Differenzierungsschritt wird durch eine komplexe Kaskade an Transkriptionen gesteuert [21]. Hierbei spielen der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) und das CCAAT-enhancer Binding Protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) eine spezielle Rolle [9, 21, 22]. Diese beiden Transkriptionsfaktoren stellen den Kern der adipogenen Regulierung dar [23] und bis heute ist kein Faktor bekannt, welcher in Abwesenheit von PPAR $\gamma$  die Adipogenese induziert [21]. Wir wissen heute immer mehr über die terminale Transkriptionskaskade, welche das Ende des adipogenen Differenzierungsweges darstellt. Weniger wissen wir aber über die Regulierungsvorgänge, welche zuvor ablaufen und welche den Beginn der Kaskade überhaupt ermöglichen, indem sie sie verstärken oder blockieren [22]. Auch kennen wir viele Faktoren, die *in vitro* die Adipogenese beeinflussen [21].

Für Zellkultursysteme existiert eine ganze Reihe von Induktionsmechanismen um die Adipogenese zu starten. Ein häufig gebräuchliches Induktionsschema beruht auf einer 2-tägigen Induktion mit Insulin, Dexamethason, Indometacin und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) [9]. Alle diese Stoffe bewirken direkt oder indirekt eine Verstärkung von PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  und so eine adipogene Induktion (Abb. 1.1) [9].

Dies zeigt, wie vielfältig die Adipogenese beeinflusst wird. So beeinflussen auch viele andere Proteine die Adipogenese *in vivo* [21]. Einer dieser Faktoren ist der Wnt-Signalweg. Im kanonischen Wnt-Signalweg bewirkt eine Bindung von Wnt-Proteinen an den Frizzled Rezeptor in der Zellmembran eine Signaltransduktion zu Dishevelled (Dsh) und Axin, welches normalerweise im Zusammenspiel mit APC und Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) anfallendes  $\beta$ -Catenin abbaut (Abb. 1.2) [26].

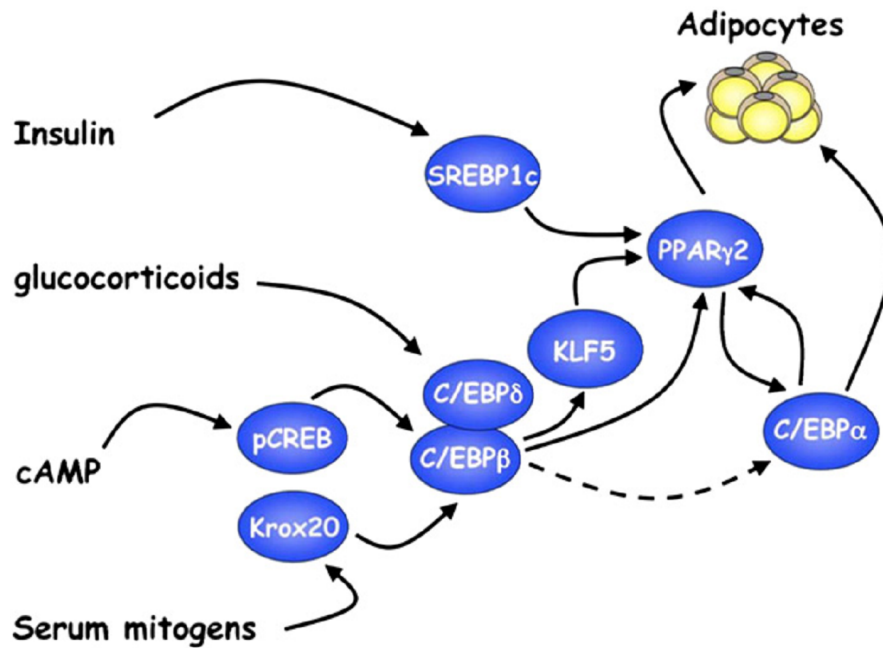


Abbildung 1.1: Die Adipogenese wird durch eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren reguliert. Über verschiedene Ansatzpunkte innerhalb dieser Kaskade können Induktoren PPAR $\gamma$  aktivieren. PPAR $\gamma$  wiederum induziert die Expression von C/EBP $\alpha$ . Beide zusammen bewirken eine verstärkte Adipogenese [24]. Die hier verwendeten Induktoren waren Insulin, Dexamethason, Indometacin und IBMX. Für detaillierte Informationen über die molekulare Induktionskaskade der Adipogenese sei auf [25] und [21] verwiesen. (Abbildung aus [25])

Durch die Signaltransduktion wird der Abbau von  $\beta$ -Catenin unterbunden – anfallendes  $\beta$ -Catenin akkumuliert [26]. Das angehäuften  $\beta$ -Catenin interagiert mit T-cell Factor (Tcf) und beeinflusst so die Transkription [26]. Es konnte gezeigt werden, dass einerseits Wnt/ $\beta$ -Catenin durch Blockade von PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  die Adipogenese inhibiert, andererseits eine Unterbrechung des Wnt-Pathways zu einer spontanen Adipogenese in Präadipozyten und mesenchymalen Vorläuferzellen führt [21, 27–31]. Es wird vermutet, dass der Wnt-Signalweg auch über parakrine Signalvermittlung an der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen beteiligt ist. So reagierten ASC mit verstärktem Wnt-Signaling, nachdem man sie durch Endothelzellen konditioniertem Medium aussetzte [32].

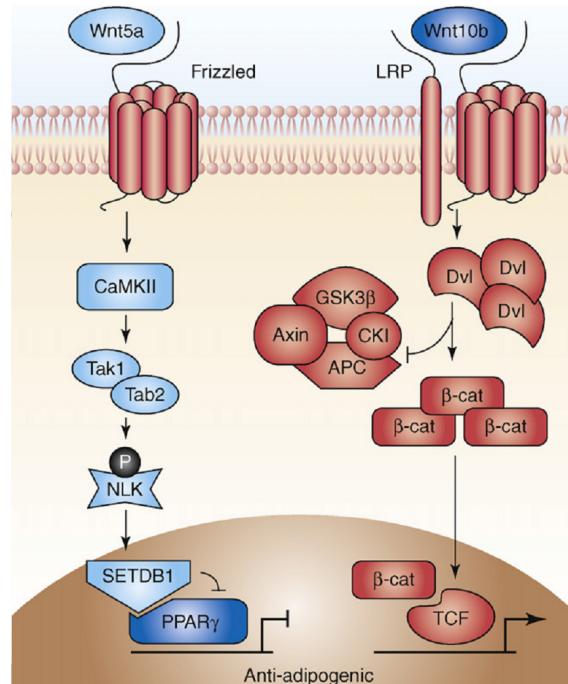


Abbildung 1.2: Der kanonische Wnt-Signalweg (rechts). (Abbildung aus [27])

## 1.4 Gefäßentwicklung im weißen Fettgewebe

Menschliches weißes Fettgewebe ist stark vaskularisiert, denn jede Fettzelle hat Kontakt zu mindestens einer Kapillare [33]. Da weißes Fettgewebe starken physiologischen Größenschwankungen unterliegt, ist eine funktionierende Angiogenese sehr wichtig [34]. Wachstum von weißem Fettgewebe *in vivo* ist immer auch mit einem Gefäßwachstum verknüpft [35]. Im Falle von der *in vivo* selteneren Hyperplasie geschieht dies über Neovaskularisierung. Im Falle der *in vivo* deutlich häufigeren adipozytären Hypertrophie, also der zellulären Größenzunahme bei gleichbleibender Gesamtzahl, geschieht dies über kapilläres Remodelling [35]. Neovaskularisierung kann in zwei Arten unterteilt werden: Als Vaskulogenese bezeichnet man die Neuentstehung von Gefäßen und ihren Endothelzellen aus ihren Progenitorzellen [36, 37]. Die Vaskulogenese wird meist zunächst mit der embryonalen Entwicklung in Verbindung gebracht. Als Angiogenese bezeichnet man das Auswachsen von Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen [36, 37]. Diese Art der Gefäßentwicklung wird *in vivo* häufig als

Reaktion auf hypoxische Bedingungen, wie sie z.B. bei Tumoren entstehen, beobachtet [38]. Während man lange Zeit davon ausging, dass die Entstehung von Gefäßen in adultem menschlichen Fettgewebe vor allem auf Angiogenese zurückzuführen ist, vermutet man heute, dass sowohl die Angiogenese als auch die Vaskulogenese bei der Gefäßbildung beteiligt sind [37]. Die Steuerung des Gefäßaufbaus geschieht durch eine Reihe von Signalmolekülen, welche entsprechend der aktuellen Bedingungen zumeist parakrin ausgeschüttet werden [39]. Es ist heute weitgehend akzeptiert, dass der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und sein zugehöriger Rezeptor am meisten zur Angiogenese in weißem Fettgewebe beiträgt [33]. Aber auch viele andere Stoffe konnten als die Angiogenese beeinflussend identifiziert werden, so z.B. Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), Angiopoietin-2 (Ang-2), Leptin, Adiponectin und andere [33].

## 1.5 In vitro Kultivierung

Die In-Vitro-Kultur von Zellen beschränkt sich in der Forschung zumeist auf 2-dimensionale Systeme, in welchen Zellen auf einer künstlichen, ebenen Oberfläche in einer oder wenigen Schichten kultiviert werden. Da Zellen im lebenden Organismus jedoch in komplexer 3-dimensionaler Anordnung vorliegen, sind 2-dimensionale Systeme in ihrer Aussagekräftigkeit begrenzt [40]. Weder kann die Rolle der Extrazellulärmatrix (ECM) ausreichend simuliert werden, noch bestehen enge Zellnachbarschaften in einem solchen Ausmaß wie in einem 3-dimensionalen System. Dies betrifft nicht nur die direkten Zell-Zell Kontakte, sondern beispielsweise auch die Interaktion zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix. Auch eine mögliche Beeinträchtigung der parakrinen Signalübertragung sollte bedacht werden. Aus diesem Grund kommt 3-dimensionalen Systemen – besonders in der Grundlagenforschung – eine immer größere Bedeutung zu. So ermöglicht die 3-dimensionale Zellkultur, eine Lücke zwischen dem stark vereinfachten 2-dimensionalen System und einem hochkomplexen Organismus zu schließen [41]. Das 3-dimensionale Kulturmodell simuliert



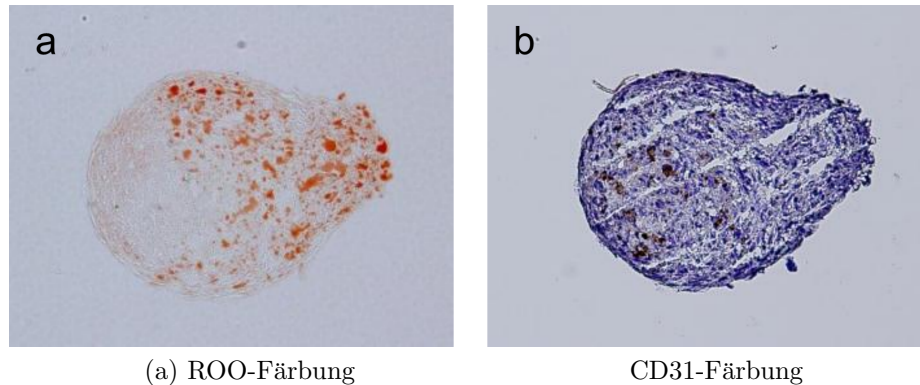
eine realitätsnähere Zellmorphologie und –adhäsionsmechanismen [41]. Zudem wird die darin gebildete Extrazellulärmatrix in anderer Konformation gebildet, was unter anderem Auswirkungen auf die Zellstabilität sowie auf die Diffusion von Signalmolekülen hat [42]. Die Extrazellulärmatrix bindet viele Effektorproteine, wie Wachstumsfaktoren und Enzyme, definiert und stabilisiert so deren Gewebekonzentrationen [42, 43]. Dies trifft auch auf die Extrazellulärmatrix des weißen Fettgewebes zu, in welchem sie unter anderem die Differenzierung und die Speicherung von Fett beeinflusst [44].

3-dimensionale Kulturen lassen sich unterscheiden in einerseits Scaffold-basierte Modelle, in denen die Zellen in einen geformten Zellträger eines bestimmten Materials eingebracht werden und sich dort anhaften und andererseits in trägerlose Modelle. Scaffold-basierte Modelle bieten den Vorteil, dass die plastische Form der Kultur relativ einfach angepasst werden kann und selbst größere Zellverbände in einem einzelnen ausgedehnten Konstrukt kultiviert werden können [45]. Allerdings bestehen bei der Verwendung von Scaffolds auch Nachteile. So beeinflussen die Scaffold-Materialien die Zellkultur [45]. Zudem variieren sie in ihrer Fähigkeit Gewebebedingungen nachzuahmen [41]. Zusätzlich besteht in größeren Zellverbänden ein Versorgungsproblem mit Nährstoffen und Sauerstoff [41], wodurch es zur Ausbildung von Gradienten kommen kann. Durch einen solchen Konzentrationsgradienten durch unterschiedlich gute Versorgung können wiederum unterschiedliche Genexpressionen an verschiedenen Stellen eines Zellverbandes resultieren. Deshalb ist eine solche Situation für die Grundlagenforschung zu vermeiden. Die andere Gruppe der 3-dimensionalen Kulturmodelle umfasst Kulturen, die ohne Trägerstoffe auskommen. Multizelluläre Sphäroidmodelle versprechen eine geringere Beeinflussung durch exogenes Material, stattdessen erhofft man sich durch sie eine realitätsgetreuere Simulation von *in vivo* Verhältnissen durch direkte Zell-Zell-Kontakte. Sie können durch ihre verminderte Größe eine relativ zuverlässige Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleisten, zudem sind sie leicht in größeren Dimensionen herzustellen [9]. So unterliegen Sphäroide, was ihre Anwendung in der Grundlagenforschung angeht, deutlich weniger Restriktionen [9].

## 1.6 3-dimensionale Kokultivierung von ASC und MVEC

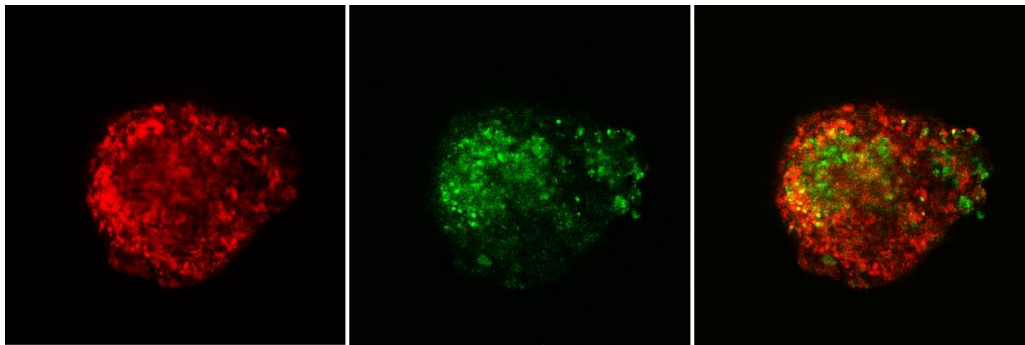
Die Erforschung von Adipozyten beschränkte sich lange Zeit auf Präadipozyten von Mäusen, verschob sich aber in den letzten Jahren zunehmend in Richtung menschlicher Präadipozyten und mesenchymalen Stammzellen [9, 21, 22]. Muhr etablierte in seiner Dissertation ein 3-dimensionales Kulturverfahren, mit welchem es möglich war, mesenchymale Stammzellen von menschlichem Fettgewebe (ASC) und mikrovaskuläre Endothelzellen (MVEC) in Sphäroiden zu kokultivieren [9]. Dazu wurde nach dem sog. Liquid-Overlay Verfahren (Abb. 3.1, S. 23) [46] in Agarose-beschichteten Wells – in einem für die Bedürfnisse beider Zellarten angepasstem Medium – durch konstante kreisende Bewegungen kleine, kugelförmige Sphäroide generiert [9]. Diese 3-dimensionale Kokultivierung ermöglichte, Interaktionen zwischen den beiden Zelltypen im 3-dimensionalen Rahmen zu untersuchen und mit 3-dimensionalen Monokulturen und auch 2-dimensionalen Kulturen zu vergleichen. So konnte gezeigt werden, dass in Kokultur-Sphäroiden aus ASC und MVEC während der adipogenen Differenzierung der ASC weniger Lipide eingelagert werden als in ASC-Monokultur-Sphäroiden. Während in den ASC-Monokultur-Sphäroiden die Lipidverteilung homogen war, wurde in den Kokultur-Sphäroiden eine deutliche Reduktion der Triglyceridsynthese in bestimmten Arealen beobachtet [9]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die ASC und MVEC in Kokultur-Sphäroiden ein inhomogenes Verteilungsmuster aufzeigten. So lagerten sich MVEC innerhalb der Sphäroide nach längerer Kulturdauer in kleinen Gruppen zusammen. Es war auch erkennbar, dass die Lipideinlagerung bevorzugt in jenen Arealen der Sphäroide auftrat, welche weniger MVEC enthielten, bzw. dass die lokale Inhibition der Triglycerideinlagerung in der Umgebung der MVEC zu verzeichnen war (Abb. 1.3).

Es wurde vermutet, dass der zuvor genauer erläuterte kanonische Wnt-Signalweg mit der partiellen Unterdrückung der Adipogenese zusammenhängen könnte [9]. Bereits Rajashekhar hatte 2008 festgestellt, dass ASC schon bei Kultivierung in



(a) ROO-Färbung

CD31-Färbung



(b) Zellverteilung in adipogen induzierter ASC-MVEC Kokultur. ASC rot, MVEC grün

Abbildung 1.3: Muhr konnte in ASC-MVEC-Kokultursphäroiden eine deutliche Gruppierung von Endothelzellen feststellen. Triglyceridspeicherung fand vor allem in jenen Bereichen der Sphäroide statt, welche besonders wenig Endothelzellen enthielten. Oben: Red-Oil-O Färbung (links, Triglyceride rot) und CD31 Färbung mit Hematoxylin (rechts, Endothelzellen braun; Zellkerne blau) in Konsekutivschnitten am ASC-MVEC-Kokultursphäroid. Unten: Fluoreszenzfärbung. ASC wurden rot markiert (links), MVEC wurden grün markiert (mitte). Rechts wurden beide Bilder übereinandergelagert. (Abbildung aus [9])

EC-konditioniertem Medium viele Wnt-spezifische Gene verstärkt exprimieren [32]. Allerdings gibt es bislang keine direkte Darstellung des aktiven Wnt-Signalweges und seiner Lokalisation in 3-dimensionaler Kokultur von ASC und MVEC.

Muhr untersuchte auch die Genexpression verschiedener Gene von ASC in 3-dimensionaler Mono- und Kokultur, unter anderen auch Angiopoietin-2, Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und Leukemia inhibitory factor [9]. Diese Gene sind alle bei der Angiogenese beteiligt [47–50]. Aguirre und Kollegen konnten 2010 zeigen, dass Stammzellen des Knochenmarks und dem Knochenmark entstammende endotheliale Vorläuferzellen in 2-dimensionaler Kokultur Angiopoietin-1 und Interleukin-1 $\beta$  hochregulieren [9, 51]. Allerdings wurden in diesem Experiment die

Zellen vor der Messung nicht getrennt, sodass die Werte keinem Zelltyp zugeordnet werden konnten. In 3-dimensionaler ASC-MVEC-Kokultur wurde von Muhr die Expression der vier genannten Gene auf Seite der ASC analysiert [9]. Die Expression dieser Gene in der Fraktion der MVEC ist bisher aber nicht bekannt. Um eine Veränderung der Genexpression in Kokulturen adäquat beurteilen zu können, muss jedoch die Expression von beiden Zelltypen analysiert werden. Hierfür wird zudem eine zuverlässige Methode zur Trennung der Zellen aus ASC-MVEC-Kokulturen in ihre Fraktionen benötigt, welche es ermöglicht, beide Zellfraktionen aus einer Probe zu isolieren.

## 1.7 Fraktionierung von Zellgemischen mittels MACS

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ist eine Methode, um einzelne Zellfraktionen aus einem Zellgemisch zu isolieren oder zu entfernen. Hierbei werden magnetische Beads eingesetzt, welche mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenproteine einer Zellfraktion bestückt sind. Werden diese Beads einem Zellgemisch zugegeben, so binden sie mit ihren Antikörpern an ihre Zielzellen. Mittels eines Magnets kann diese Zellfraktion nun von den restlichen Zellen des Gemisches getrennt werden. In der Untersuchung von ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden kam MACS bereits zum Einsatz, um die MVEC zu entfernen (mit magnetischen Beads, an die Antikörper gegen den MVEC-Marker CD31 gebunden waren) und so die ASC-Fraktion zu isolieren und im Vergleich mit ASC aus Monokulturen auf Genexpression zu untersuchen [9]. Allerdings wurde bislang allein die ASC-Fraktion auf ihre Genexpression untersucht. Um Ergebnisse aus Versuchen in Kokulturen besser interpretieren zu können, wäre es jedoch von Interesse, beide Zellfraktionen einer Kokultur untersuchen zu können. Ein Protokoll, welches die Weiterverwendung sowohl der ASC als auch der MVEC erlaubt, existierte bislang allerdings nicht.

# Kapitel 2

## Fragestellung

Humanes Fettgewebe ist stark vaskularisiert, Adipogenese und Angiogenese hängen sehr stark miteinander zusammen [33–35]. Sowohl für die Adipositasforschung als auch für die Zukunft von Adipose Tissue Engineering ist ein näheres Verständnis vom Zusammenspiel von Adipozyten und Endothelzellen deshalb von großer Wichtigkeit. 3-dimensionale Zellkulturmodelle tragen in zunehmendem Maße zur Aufklärung von physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhängen bei. Muhr konnte 2013 ein Sphäroidmodell zur trägerlosen 3-dimensionalen Kokultivierung von ASC und MVEC etablieren [9].

## **Etablierung eines Protokolls zur Isolation von ASC und MVEC aus ASC-MVEC-Kokulturen**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Voraussetzung zu schaffen, die Genexpression der beiden im Kokultur-Sphäroid-Modell beteiligten Zelltypen getrennt voneinander analysieren zu können. Hierfür sollte ein Protokoll zur Fraktionierung mittels MACS etabliert werden, welches es ermöglicht, sowohl ASC als auch MVEC aus einer Kokultur weiter zu analysieren. Die Fraktionierung sollte mittels magnetischer Beads, an welche Antikörper gegen CD31 (Marker für MVEC) gekoppelt waren, durchgeführt werden. Hierzu sollte untersucht werden, welches Verhältnis von Beads : MVEC für diese Trennung am vorteilhaftesten ist, um beide Zellfraktionen frei von Verunreinigungen zu isolieren (Kapitel 4.2.1). Eine Etablierung dieses Protokolls erlaubt, erhaltene Daten über ASC in ASC-MVEC-Kokulturen anhand von Daten über beteiligte MVEC besser einschätzen zu können. Um die sich aus der Fraktionierung ergebenden Möglichkeiten zu demonstrieren, sollte exemplarisch die Expression von vier Angiogenese-assoziierten Genen in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden analysiert werden. In bisherigen Arbeiten war nur die Expression in ASC aus den Kokulturen analysiert worden. Nun sollte mittels des neu etablierten Protokolls zusätzlich zur Untersuchung der Genexpression in ASC gleichzeitig die Genexpression in MVEC analysiert werden (Kapitel 4.2.2).

## Darstellung des aktivierten Wnt-Signalwegs in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, der Hypothese über die Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der Steuerung der Adipogenese durch Endothelzellen innerhalb von ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden nachzugehen. Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Speicherung von Triglyceriden in unmittelbarer Umgebung von Endothelzellen innerhalb von ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden inhibiert wird [9]. Um die mögliche Beteiligung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs an diesem Effekt zu untersuchen, sollte der aktive Wnt-Signalweg innerhalb des Kokultur-Sphäroids sichtbar gemacht werden. Es sollte untersucht werden, ob der Wnt-Signalweg in ähnlicher Weise lokal betont aktiviert wird. Wichtig war hierbei, nicht den Wnt-Signalweg im allgemeinen, sondern sein aktives Endprodukt – das *aktive*  $\beta$ -Catenin – sichtbar zu machen. Hierfür wurde eine immunhistochemische Färbung verwendet, mit welcher die Verteilung des aktiven  $\beta$ -Catenins in Kokultur-Sphäroiden im Vergleich zu Monokultur-Sphäroiden mittels mikroskopischer Bildgewinnung beobachtet werden konnte (Kapitel 4.3).

# **Kapitel 3**

## **Material und Methoden**



### 3.1 Material

1%Penicillin/Streptomycin	Invitrogen / Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
12-Tube-Magnet	Qiagen (Hilden, Deutschland)
3,3'-Diaminobenzidin/Urea-Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
3-Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Anti-Active- $\beta$ -Catenin, clone 8E7	Millipore (Billerica, MA, USA)
ASC: Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue (hMSC-AT-c)	PromoCell (Heidelberg, Deutschland; lot 8073006.12)
Chemikalien, soweit nicht anderweitig erwähnt	Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland)
CO2-Inkubator NU5510E	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Cytospin-Gerät „Cytospin 4“	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DiluentC For General Membrane Labeling	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DynaBeads CD31 Endothelial Cell	Invitrogen / Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

EGM-2 BulletKit	Lonza (Basel, Schweiz). Besteht aus Endothelial Basal Medium 2 (EBM 2), 5% FBS, Hydrocortison, Fibroblast Growth Factor 2 (FGF 2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin-like Growth Factor 1 (IGF 1), Ascorbinsäure, Epidermal Growth Factor (EGF), Gentamycin/Amphotericin-B (GA-1000)
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA; lot 40A0044K)
Glycergel Mounting Medium	Dako (Glostrup, Denmark)
Homo Sapiens Colon Colorectal Adenocarcinoma Cells LS174T p8	Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. Otto (Chirurgie II, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt.
Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Indometacin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Insulin	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
JabRef	<a href="http://jabref.sourceforge.net">jabref.sourceforge.net</a>
Kamera DP71	Olympus (Tokio, Japan)
Kamera DS-5M	Nikon (Tokio, Japan)
Kryotom CM3050S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X-Editor TeXworks 2013	<a href="http://www.tug.org/texlive/">http://www.tug.org/texlive/</a>

Mastercycler Gradient Thermal Cycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mayer's Hematoxylin Solution	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Membranfarbstoffe PKH26 und PKH67	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Mesa Green qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay-No ROX	Eurogentec (Köln, Deutschland)
Methylenblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Mikroskop BX51	Olympus (Tokio, Japan)
Mikroskop DM IRB	Leica (Wetzlar, Deutschland)
MVEC: Human Dermal Microvascular Endothelial Cells	Lonza (Basel, Schweiz; lot 0000122821)
NanoDrop ND-2000 UV/Vis-Spektralphotometer	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Neubauer Improved Zählkammer	HBG (Giessen-Lützellinden, Deutschland; 0,100 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup> )
Office 2013	Microsoft (Redmond, USA)
Phosphatpuffersalzlösung Dulbecco's PBS (1x)	PAA (Pasching, Österreich)
Plastikware	Greiner (Frickenhausen, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP P0161	Dako (Glostrup, Denmark)

Preadipocyte Growth Medium 2 (PGM2)	Lonza (Basel, Schweiz). Besteht aus 89% Preadipocyte Basal Medium 2 (PBM 2), 10% Fetales Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg.
Primer: QuantiTect Primer Assays HS_ANGPT2_1_SG, HS_IL1B_1_SG, HS_IL6_1_SG, HS_LIF_1_SG	Qiagen (Hilden, Deutschland)
REAL Antibody Diluent	Dako (Glostrup, Denmark)
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RT-PCR Gerät: DNA Engine Opticon 2	Bio-Rad (München, Deutschland)
SPSS 22	IBM (Armonk, USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Trizol	Invitrogen / Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
0.25% Trypsin/EDTA	Invitrogen / Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Ultra Tiefkühlschrank –80 °C	Thalheimer (Ellwangen, Deutschland)
Zentrifuge 1-14	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Biofuge fresco	DJB (Buckinghamshire, England)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellexpansion und Auszählung

Das PGM 2 und das EGM 2 wurden vorbereitet und auf 37 °C erwärmt. 1.000.000 ASC (Passage 2) und 1.000.000 MVEC (Passage 2) wurden aufgetaut und in 35 mL Medium auf je eine T175 Zellkulturflasche verteilt (5714 Zellen/cm<sup>2</sup>). Die Flaschen wurden fünf Tage lang bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Medienwechsel erfolgte am Tag nach der Aussaat, sowie nach weiteren 3 Tagen.

Um den Kultivierungsbedürfnissen sowohl der MVEC als auch der ASC gerecht zu werden, wurde ab dem Ende der Zellexpansion zur weiteren Verarbeitung ein Kokultur-Medium verwendet, welches einer 1:1 Mischung von PGM 2 und EGM 2 entsprach. Dem EGM 2 wurde aber hier kein EGF zugesetzt – wie es üblicherweise der Fall ist – da in früheren Versuchen ein negativer Effekt des EGF auf die Adipogenese der ASC festgestellt worden war [9].

Nach Beendigung der Expansion wurden die Zellen mit 5 mL Trypsin (5 min) abgelöst. Mit 10 mL Kokultur-Medium wurde die Trypsinisierung gestoppt. Die ASC und MVEC wurden in je ein Probenröhrchen gegeben und zentrifugiert (311 g; 10 min). Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit 12 mL Kokultur-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und Zellsuspensionen mit den benötigten Zellkonzentrationen angefertigt.

### 3.2.2 Zellmarkierung mittels PKH-Farbstoffen

In der Etablierung einer Fraktionierung von Zellsuspensionen mittels MACS mussten ASC und MVEC eindeutig identifiziert werden, um die Effektivität der Zellfraktionierung mittels DynaBeads evaluieren zu können. Um dies zu erreichen, wurde die Zellmembran-Färbung mit PKH-Farbstoffen angewendet. Fluoreszente PKH-

Farbstoffe lagern sich mit ihren langen aliphatischen Ketten in die Zellmembran ein und eignen sich so sehr gut um Zellen zu markieren. Hierzu wurden die Zellen bei 311 g zentrifugiert, mit 10 mL PBS resuspendiert, erneut bei 311 g zentrifugiert und in 0,5 mL 0,4% PKH26/DiluentC bzw. PKH67/DiluentC aufgenommen. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Färbeprozess mit 1 mL Serum abgestoppt, 2 mL Medium zugegeben und 3 mal mit 10 mL PBS gewaschen. Die Zellen waren nun fluoreszent markiert und konnten mikroskopisch einwandfrei anhand ihrer Lichtemission (PKH26: 567 nm / rot; PKH67: 504 nm / grün) identifiziert werden. Sie waren nun bereit zur Kokultivierung und anschließender Fraktionierung mittels MACS.

### **3.2.3 2D Kokultur**

Um die Fraktionierung von ASC und MVEC in zwei reine Gruppen zu etablieren wurden zuvor PKH-gefärbte ASC und MVEC 2-dimensional kokultiviert. Hierfür wurden die Zellen auf 12-Well-Platten (2 mL pro Well) mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  verteilt und bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  in Kokultur-Medium inkubiert. An den Tagen der Probenentnahme wurden die Zellen mit Trypsin (0,5 mL pro well, 5 min) abgelöst. Die Trypsinisierung wurde mit 50  $\mu\text{L}$  bovinem Serumalbumin gestoppt. Die Zellsuspensionen wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und zentrifugiert (500 g, 7 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets mit 1 mL PBS/0,1% BSA resuspendiert und waren nun zur weiteren Verarbeitung bereit.

### **3.2.4 3D Mono- und Kokultur**

Um die Verteilung von aktivem  $\beta$ -Catenin im ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroid zu untersuchen, sowie zur Genexpressionsanalyse ihrer Zellfraktionen mittels PCR, wurden ASC-Monokultur- und ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide nach der Liquid-Overlay-Methode hergestellt [9, 46]. Hierfür wurden die Zellen in 96-Well-Plates,

welche mit 1,5% Agarose vorbeschichtet wurden, pipettiert. Pro Well wurden 5.000 Zellen in Kokultur-Medium (200  $\mu$ L) eingebracht (Abb. 3.1). Nur die inneren 60 Wells der 96 vorhandenen wurden befüllt. Die äußeren 36 Wells wurden zum Kondensationsschutz mit jeweils 100  $\mu$ L PBS / 1% Penicillin/Streptomycin gefüllt. Die befüllten Wellplates wurden auf einem Schüttler im Inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. So lagerten sich die Zellen zu Zellsphäroiden zusammen.

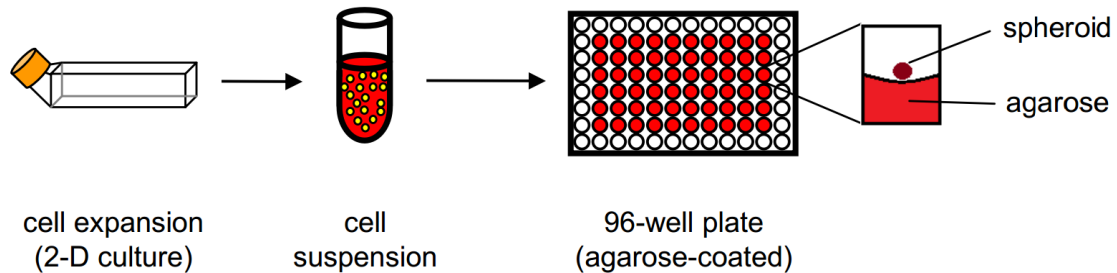


Abbildung 3.1: Herstellung von ASC-Monokultur- und ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden nach der Liquid-Overlay-Methode (Abbildung aus [46]). Nach dem Trypsinisieren wurden die Zellen gezählt und in Agarose-beschichtete Wells gegeben. Die Wellplates wurden unter ständigem Kreisen inkubiert und die Zellen lagerten sich so zu Zellsphäroiden zusammen.

Für die Analyse der Genexpression wurden die Sphäroide für 1 bzw. 2 Tage in Kokultur-Medium kultiviert. An den Tagen der Probenentnahme wurde der Inhalt von je 30 Wells in eine mit PBS bedeckte Petrischale gegeben. Mit einer Pasteurpipette mussten nun die Sphäroide aus den Petrischalen extrahiert und in 2 mL-Reaktionsgefäße gegeben werden (Pooling). In diesen erfolgte nun eine möglichst restlose Entfernung der überstehenden Flüssigkeit.

Für die Färbung von Kryoschnitten auf aktives  $\beta$ -Catenin wurden die Zellen nach zwei Tagen Kultur in Kokultur-Medium adipogen induziert. Hierzu wurde an Tag 2 die Hälfte des Mediums abgesaugt und mit Kokultur-Medium ersetzt, welchem Induktoren zugesetzt waren. Dies resultierte in einer Endkonzentration von 1.7  $\mu$ M Insulin, 1  $\mu$ M Dexamethason, 200  $\mu$ M Indometacin und 500  $\mu$ M 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX). Zwei Tage nach Induktionsbeginn wurde die Induktion beendet, indem 3 mal die Hälfte des Mediums abgesaugt wurde und durch Kokultur-Medium mit 1.7  $\mu$ M Insulin ersetzt wurde. Mit diesem Kokultur-Medium + 1.7  $\mu$ M Insulin wurde die Kultur nun für weitere 3 Tage fortgeführt. Am Tag der Probenentnahme wurden die Sphäroide – wie zuvor beschrieben – gepoolt, indem der Inhalt

von je 30 Wells in eine mit PBS befüllte Petrischale gegeben, mit einer Pasteurpipette extrahiert und in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt wurde. Die überstehende Flüssigkeit wurde entfernt.

### **3.2.5 Dissoziation der 3D-Sphäroide**

Um die Zellen der Sphäroide fraktionieren und mittels PCR analysieren zu können, mussten die Sphäroide zunächst dissoziiert werden. Hierfür wurden sie nach dem Pooling im Reaktionsgefäß 3 mal mit je 2 mL PBS gewaschen, um anhaftendes Medium so gründlich wie möglich zu entfernen und so die Trypsinisierung zu ermöglichen. Die gereinigten Sphäroide konnten nun mit 0,5 mL 0,25% Trypsin/EDTA dissoziiert werden. Dazu war es nötig, die Reaktionsgefäße auf einem Schüttler im Inkubator ständig in Bewegung zu halten. Nach 15 min wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 50  $\mu$ L Serum beendet. Es lag nun ein homogenes Zellgemisch vor, welches mittels MACS weiter verarbeitet werden konnte.

### **3.2.6 Zellfraktionierung mit MACS**

In dieser Arbeit sollte ein Protokoll erarbeitet werden, welches erlaubt, sowohl ASC als auch MVEC aus Kokulturen zu isolieren, und somit deren getrennte Weiterverarbeitung ermöglicht. Um dies zu erreichen wurde Magnetic-activated cell sorting (MACS) mittels DynaBeads mit Antikörpern gegen das Oberflächenprotein CD31 verwendet. Die vorbereiteten DynaBeads mit einer Menge im Bereich von 0.1 bis 50 Stück pro MVEC wurden jeder Probe zugegeben und für 20 min bei 4 °C konstant durchmischt. Nun wurden die Reaktionsgefäße in den 12-Tube-Magnet von Qiagen gestellt. Während einer zweiminütigen Wartezeit lagerten sich die Beads mit den CD31+ Zellen an den Rand der Reaktionsgefäße ab. Noch während die Reaktionsgefäße am Magneten standen konnte nun der Überstand mit den CD31– Zellen mittels Pipetten in neue Reaktionsgefäße gegeben werden. Um in der Ent-



wicklung des Separationsprotokolls sicherzustellen, dass in den jeweiligen Fraktionen keine Zellverunreinigungen zurückblieben, mussten die Trennprozeduren mehrmals wiederholt werden. Der Wiederholungsschritt für die CD31<sup>-</sup> Zellen beinhaltete ein erneutes Überführen des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß nach 2 min Verweildauer am Magneten. Der Wiederholungsschritt der CD31<sup>+</sup> Zellen beinhaltete das Abpipettieren des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets nach 2 min Verweildauer am Magneten. Zur Überprüfung des Trennungserfolgs wurden die Zellfraktionen mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht, mit DAPI Mounting Medium benetzt und mikroskopisch auf Verunreinigungen untersucht.

### **3.2.7 RNA Isolierung, quantitative real time RT-PCR**

Zur Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR musste zunächst die RNA der Proben isoliert werden und anschließend daraus cDNA erstellt werden. Die zuvor fraktionierten Zellen wurden hierfür bei 500 g zentrifugiert, in 1 mL Trizol aufgenommen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am darauffolgenden Tag wurde den Proben nach dem Auftauen 200  $\mu\text{L}$  Chloroform zugegeben. Nach Vortex (15 s) und Zentrifugieren (13.000 RPM,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 min) trennte sich der Inhalt in zwei Phasen. Die obere, flüssige Phase wurde extrahiert und in 500  $\mu\text{L}$  Isopropanol gegeben. Die Proben wurden erneut mittels Vortex durchmischt, zentrifugiert (13.000 RPM,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 800  $\mu\text{L}$  Ethanol 70% resuspendiert. Erneut folgte Vortex und Zentrifugieren (13.000 RPM,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min). Das Ethanol wurde abgesaugt und die Proben für 30 min zum Trocknen ausgelegt. Zuletzt wurden die Pellets in 25  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und für 10 min auf  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

Mit einer NanoDrop-Messung wurde in einem Probetröpfchen spektralphotometrisch die RNA-Konzentration und -Reinheit (260/280nm Ratio) festgestellt. In PCR-Reaktionsgefäßen wurde ein Primer-mix (48% 5x Buffer, 14%  $\text{MgCl}_2$ , 12% dNTP, 12% RP, 12% RT, 2,4% RNasin) und  $\text{H}_2\text{O}$  den Proben zugegeben (RNA Konzentration 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Ein thermischer Cycler verarbeitete die Proben für 1,5 Std. Danach musste die neu entstandene cDNA in Wasser verdünnt werden.

Auf 8-Well-Strips wurden alle 96 Wells mit 22,5  $\mu\text{L}$  des Primer-Mix (56% Sybr Green, 36%  $\text{H}_2\text{O}$ , 11% Primer) und 2  $\mu\text{L}$  cDNA Lösung versehen. Alle Wells wurden in einem DNA Engine Opticon 2 System über 30 Zyklen verarbeitet. Die Ergebnisse wurden nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode ausgewertet. Die erhaltenen Werte wurden auf die  $\beta$ -Actin-Expression normalisiert. Des Weiteren wurden sie auf die Werte am Tag 1 der ASC-Monokultur (ASC-Fraktion, Abb. 4.7, S. 39) bzw. der ASC-MVEC-Kokultur (MVEC-Fraktion, Abb. 4.8, S. 40) normalisiert.

### **3.2.8 Immunhistochemische Färbung von aktivem $\beta$ -Catenin in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden**

In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob und in welchen Regionen von 3-dimensionalen ASC-Mono- und ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden der Wnt-Signalweg aktiviert war. Um dies zu erreichen wurde eine immunhistochemische Färbung auf aktives  $\beta$ -Catenin, welches bei aktiviertem Wnt-Signalweg anfällt, verwendet.

Hierzu wurden Mono- und Kokultur Sphäroide kultiviert, welche ab dem 2. Tag nach Aussaat adipogen induziert wurden. Fünf Tage nach Beginn der Induktion wurden die Sphäroide gepoolt, in PBS gewaschen und für 10 min in Aceton fixiert. Nun folgte 3 mal Waschen in PBS und die Färbung mit Methylblau (5 min). Nach erneutem 3 mal Waschen in PBS konnte den Sphäroiden in kleinen Ausgussformen Tissue Tek zugegeben werden. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeit mit eingegossen wurde, sodass später keine Eiskristalle entstehen konnten. Mit einem Plastikstäbchen wurden die Sphäroide in die Mitte des TissueTek-Blockes verschoben. Diese Blöcke wurden nun in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Mit einem Kryotom wurden die Blöcke in 6  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte aufgearbeitet und auf Objektträger aufgetragen. Zuerst wurden die Präparate für 20 min bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  in Aceton fixiert. Nach 3 mal Waschen in PBS-Lösung wurde 0,3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ /PBS für 7 min zugegeben. Nun musste erneut 3 mal mit PBS gewaschen werden. Es erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (Anti-

Active- $\beta$ -Catenin) mit einer Verdünnung von 1:5 und dessen Inkubation bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Präparate erneut 3 mal in PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper (Pcl rabbit anti-mouse HRP P0161) wurde mit einer Verdünnung von 1:100 für 1 Std zugegeben. Nach erneutem 3 mal Waschen in PBS konnte nun 3,3'-Diaminobenzidin/Urea-Wasserstoffperoxid zugegeben werden. Sobald die Färbung erfolgte wurde nach 3 mal Waschen in PBS mit Hämatoxylin gegengefärbt (1 min + 5 min fließendes Wasser). Nun wurden die Präparate mit erwärmtem Glycergel Mounting Medium und einem Deckglas verschlossen und bei -20 °C aufbewahrt. Als Positivkontrolle diente eine Monokulturgruppe, welche mit 25 mM LiCl im Medium behandelt wurde (Induktion des Wnt-Signalwegs) und so einen erhöhten Active- $\beta$ -Catenin Spiegel aufwies [52]. Als Negativkontrolle diente eine mit Lithium induzierte Gruppe, welche ohne Primärantikörper behandelt wurde.

Um die Färbung zu etablieren wurden Zellen vom Typ Homo Sapiens Colon Colorectal Adenocarcinoma LS174T p8 verwendet, deren Wnt-Signalweg verstärkt aktiviert ist [53]. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. Otto (Chirurgie II, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden analog der Auszählung der ASC und der MVEC zunächst trypsinisiert und gezählt. Mittels Cytospin wurden je 65.000 Zellen auf Objektträger aufgetragen. Diese Proben wurden analog des obigen Protokolls immunhistochemisch gefärbt, wobei der primäre Antikörper hier in der Konzentration 1:50 verwendet wurde.

### 3.2.9 Statistik

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden als geometrische Mittelwerte plus deren Standardabweichungen dargestellt. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mittels unabhängigen t-Tests auf Signifikanz untersucht. Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet: \*:p<0.05, \*\*:p<0.01

# Kapitel 4

## Ergebnisse

## 4.1 Kokultivierung von ASC und MVEC

Um die Ziele dieser Arbeit bearbeiten zu können, mussten zunächst 2-dimensionale Kokulturen in Wellplates und 3-dimensionale Sphäroid-Kulturen etabliert werden. 2-dimensionale Kokulturen wurden erstellt, um die Trennung von Zellgemischen mittels MACS zu etablieren. 3-dimensionale Sphäroide wurden benötigt, um die Anwendung dieses Trennungsprotokolls in der Genanalytik zu demonstrieren und um die Verteilung des aktiven  $\beta$ -Catenins innerhalb der Sphäroide untersuchen zu können.

### 4.1.1 2D Kultur

Im 2-dimensionalen Versuchsaufbau wurden Zellen mit 10.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  in Wells ausgesät. Im Verlauf der 2 Tage andauernden Kultivierung nahm die Zelldichte zu. Die Kokulturen zeigten eine gruppierte Anordnung der Zellen mit sowohl – für ASC typischem – länglichem Erscheinungsbild als auch mit rundlich auslaufendem Erscheinungsbild, welches eher für MVEC typisch ist (Abb. 4.1).

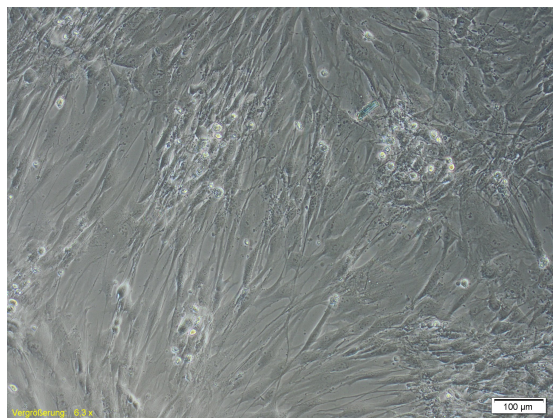


Abbildung 4.1: 2-dimensionale Kokultur von ASC und MVEC nach 2 Tagen Kultivierung. Es wurden 10.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  in Wells kultiviert. Zu sehen waren Zellinseln mit länglichem Erscheinungsbild und rundlich auslaufende Zellen.

### 4.1.2 3D-Kultur

Im 3-dimensionalen Versuchsaufbau wurden Sphäroide mit jeweils 5000 Zellen erzeugt. Hierzu wurden die Zellgemische in agarosebeschichtete 96-Well-Plates auf einen Schüttler gegeben (s. Abb. 3.1, S. 23). Etwa einen Tag nach Aussaat lagerten sich die Zellen zu kleinen Sphäroiden von 150 - 200  $\mu\text{m}$  zusammen (Abb. 4.2). Während am ersten Tag die Sphäroide noch einen etwas lockereren und inhomogeneren Randbereich aufwiesen, schien dieser am zweiten Tag deutlich glatter und homogener, was das Sphäroid etwas fester erscheinen ließ. Auffällig war auch, dass Kokultur-Sphäroide deutlich kleiner waren als Monokultur-Sphäroide. Zudem befand sich im Umfeld von Kokultur-Sphäroiden wesentlich mehr loses Zellmaterial als im Umfeld von Monokultur-Sphäroiden. Nach ein bzw. zwei Tagen Kultur konnten die Sphäroide durch Behandlung mit Trypsin (0,25%, 15 min) in Einzelzellen dissoziiert werden. Nach drei Tagen Kultur wurden die Sphäroide so fest, dass sie sich mittels Trypsin nicht mehr dissoziieren ließen. Auch nach längerer Behandlung mit Trypsin waren die Sphäroide höchstens in grobe Fragmente mit umgebender Zellsuspension zerfallen. Eine homogene Dissoziation war jedoch nicht mehr möglich.

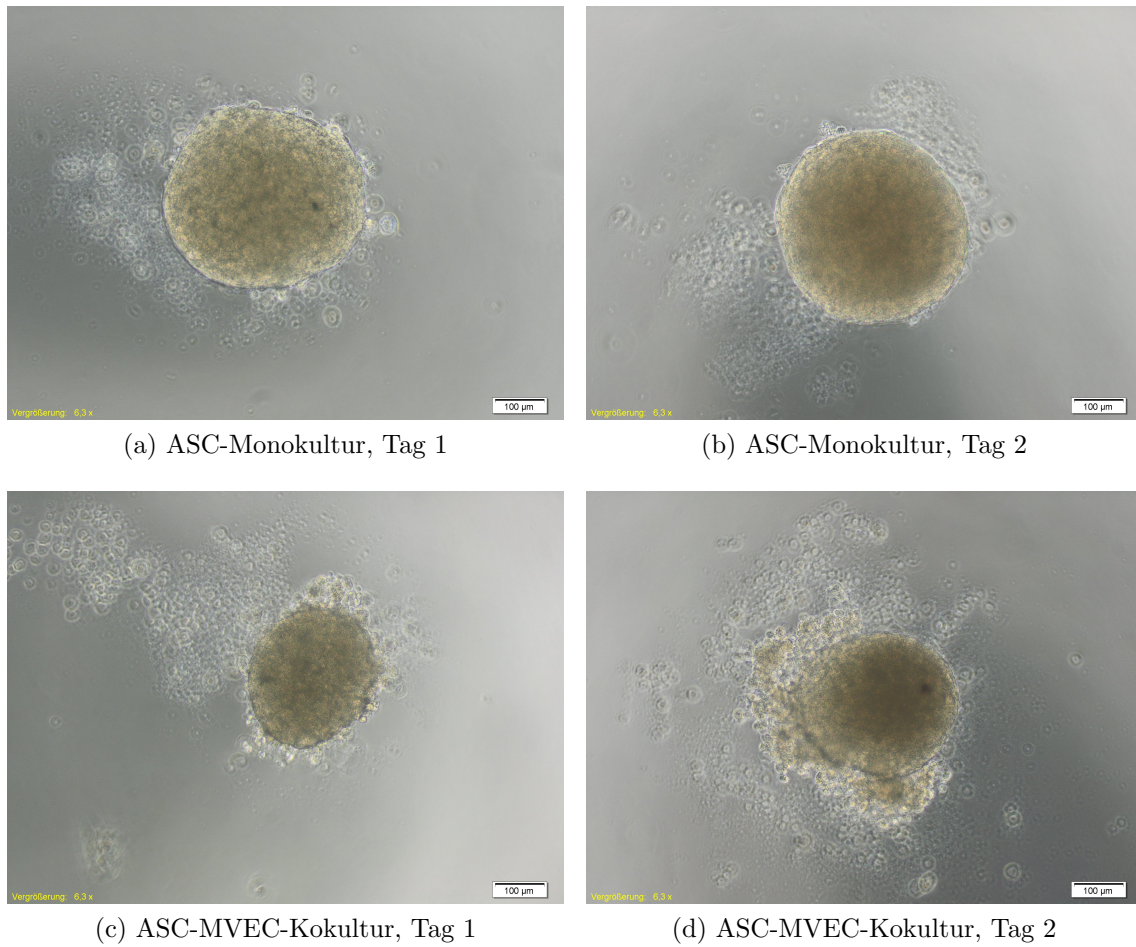


Abbildung 4.2: ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide und ASC-Monokultur-Sphäroide nach einem bzw. zwei Tagen Kultivierung. Die Sphäroide wurden nach der Liquid-Overlay-Methode mit jeweils 5.000 Zellen pro Sphäroid kultiviert. Kokulturen waren kleiner und von mehr Zellmaterial umgeben als Monokulturen.

## 4.2 Zellfraktionierung mittels MACS

### 4.2.1 Entwicklung des Protokolls zur Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung mittels MACS wurde bei ASC-MVEC-Gemischen bereits zuvor angewendet um über eine Entfernung der MVEC die ASC zu isolieren. In dieser Arbeit sollte diese Fraktionierung dahingehend optimiert werden, eine gleichzeitige Isolation von ASC *und* MVEC aus demselben Zellgemisch zu ermöglichen. Hierfür musste sichergestellt werden, dass jede Zellfraktion auch sicher frei von Verunreinigungen durch Zellen der anderen Fraktion war. Nach ersten Versuchen, die Fraktionierung nach Herstellerangaben mittels MACS zu etablieren, zeigten sich jedoch Verunreinigungen der CD31+ Fraktionen (MVEC) durch CD31- Zellen (ASC).

Da für die Verwendung der Beads herstellerseitig eine Minimalmenge der zu verwendenden Beads angegeben wurde, war das Verhältnis Beads : MVEC zunächst sehr hoch. Details hierzu werden im Diskussionsteil erörtert (Kap. 5.2, S. 47). Aufgrund voriger Erfahrungen mit der Verwendung von DynaBeads war bekannt, dass die vom Hersteller angegebene Minimalkonzentration für sehr kleine Proben unterschritten werden konnte [9].

Ziel war, die Effektivität der Trennung mit unterschiedlicher Anzahl an Beads pro MVEC zu evaluieren und so später das effektivste Verhältnis von Zellen und Beads anzuwenden. Hierzu wurden zunächst ASC mit PKH67 (grün) und MVEC mit PKH26 (rot) markiert, gemischt und nachfolgend in 2D-Kokultur kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen trypsiniert und mit 0.1, 1, 10 und 50 Beads pro MVEC fraktioniert. Die Fraktionsprodukte wurden mikroskopisch auf Zellverunreinigungen kontrolliert. Um ein besseres Verständnis der so gewonnenen Übersichtsaufnahmen zu ermöglichen, wurden ausgewählte Strukturen in Abb. 4.3 vergrößert dargestellt.



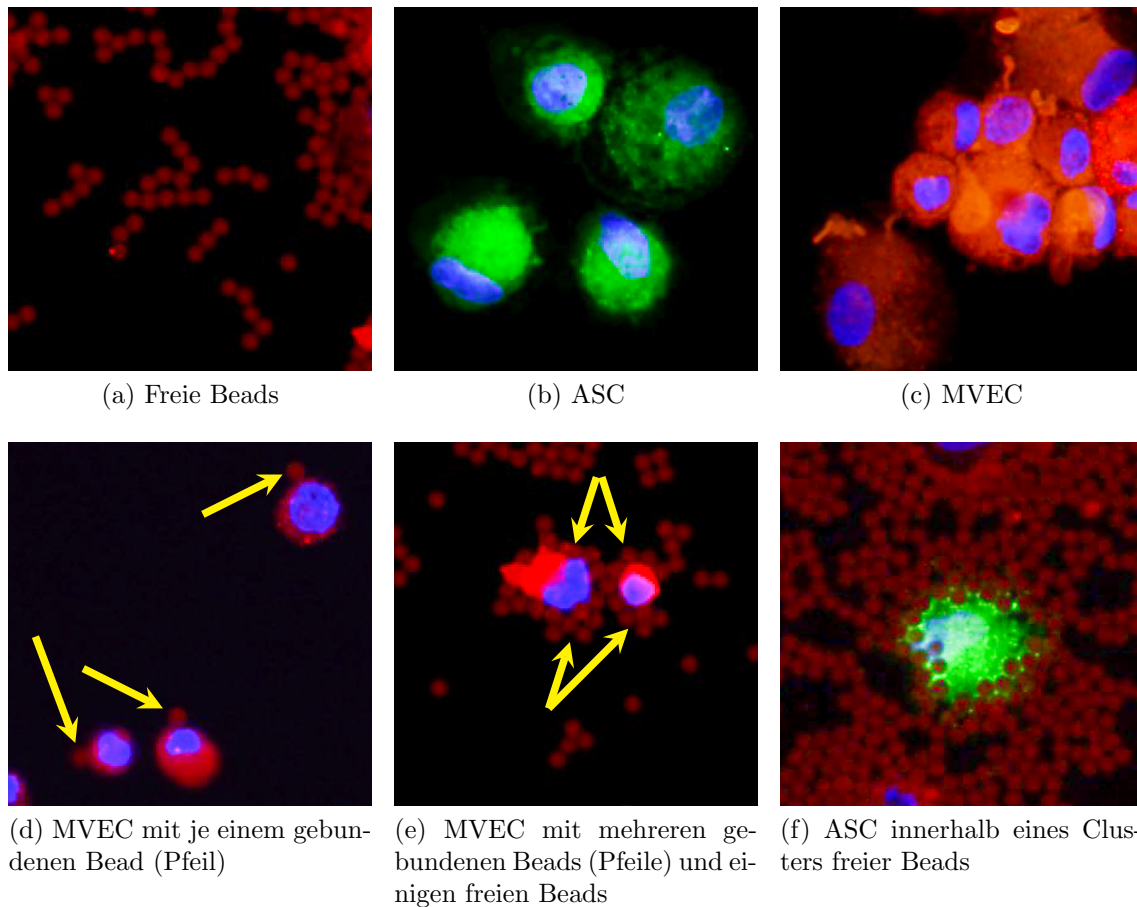


Abbildung 4.3: Beispielhafte Darstellungen von Strukturen innerhalb der Zellfraktionen. Um die Bewertung der folgenden Übersichtsgrafiken zu erleichtern, sind hier exemplarisch Vergrößerungen der vorzufindenden Strukturen gezeigt. Mittels PKH-Zellfärbung wurden ASC grün und MVEC rot gefärbt. Zellkerne wurden blau gefärbt. Beads erscheinen dunkel rötlich.

#### Vor der Fraktionierung (Abb. 4.4)

Vor der Durchführung der Fraktionierung wurden Übersichtsaufnahmen der Zellsuspensionen mit den zugegebenen Beads angefertigt. Bei 50 Beads pro MVEC war ein sehr hoher Anteil ungebundener Beads auffällig (Abb. 4.4a). Diese waren so zahlreich, dass einige MVEC nur noch an ihren (noch leuchtstärkeren) blauen, DAPI-gefärbten Zellkernen zu erkennen waren. Bei kleineren Konzentrationen waren hingegen alle Beads gebunden (Abb. 4.4b-d), wobei die Anzahl gebundener Beads pro Zelle mit geringeren Konzentrationen abnahm.

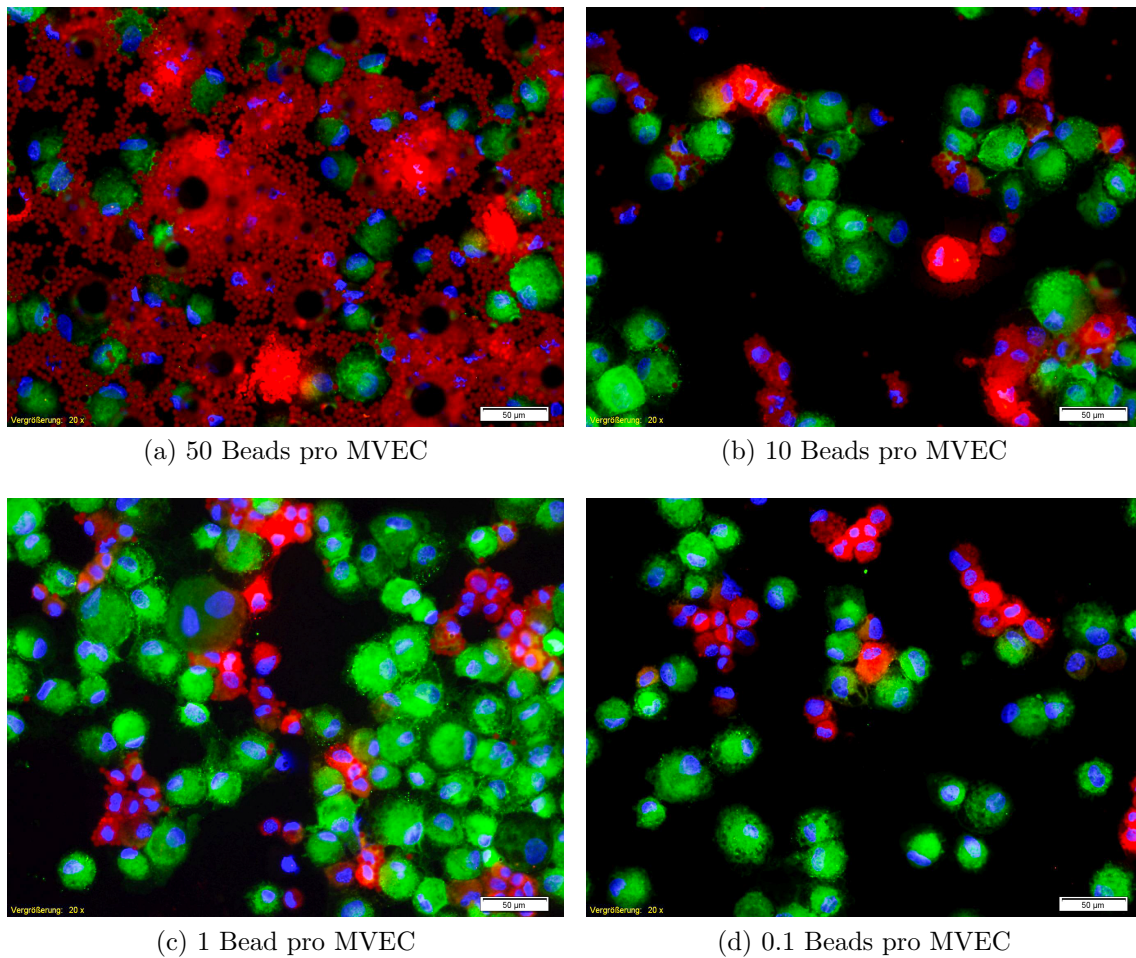


Abbildung 4.4: Untersuchung des Verhältnisses von Beads : MVEC, Zustand *vor* Fraktionierung. Zellen wurden mit PKH-Farbstoffen markiert und für zwei Tage 2-dimensional kultiviert. Nach Trypsinisierung der Zellen wurden der Zellsuspension die Beads zugegeben. Zellkerne wurden blau gefärbt. Zu sehen sind MVEC (rot) und ASC (grün), sowie freie und gebundene Beads (dunkelrot). Zum besseren Verständnis dieser Übersichtsaufnahmen sei auf die Vergrößerungen ausgewählter Strukturen in Abb. 4.3 verwiesen.

**ASC-Fraktion (Abb. 4.5)**

Nach einmaliger Durchführung der Fraktionierungsprozedur (s. Kap. 3.2.6, S. 24) konnte bei keinem Verhältnis von Beads : MVEC eine reine ASC-Fraktion erhalten werden. Nach zweimaliger Durchführung der Fraktionierungsprozedur zeigten sich in der ASC-Fraktion bei Verwendung von 50 und 10 Beads pro MVEC keine Verunreinigungen (Abb. 4.5a+b). Wurden jedoch nur 1 oder 0,1 Beads pro MVEC verwendet (Abb. 4.5c+d), so verblieben einzelne MVEC als Verunreinigung in der ASC-Fraktion.

**MVEC-Fraktion (Abb. 4.6)**

Zur Isolierung der MVEC-Fraktion musste die Fraktionierungsprozedur (s. Kap. 3.2.6, S. 24) insgesamt 5 Mal durchgeführt werden, um reine Fraktionen zu erhalten. Bei weniger Trennschritten entstand bei keinem Verhältnis von Beads : MVEC eine reine Fraktion.

Dabei zeigte sich in der MVEC-Fraktion bei 50 Beads pro MVEC wieder der sehr hohe Anteil ungebundener Beads (Abb. 4.6a), sodass einige MVEC nur noch an ihren Zellkernen zu erkennen waren, deren DAPI-Färbung deutlich leuchtstärker war als die PKH-Farbstoffe. Zudem waren hier vereinzelt in Clustern von freien Beads eingeschlossene ASC zu finden. Bei kleineren Konzentrationen waren keine freien Beads und auch keine Verunreinigungen durch ASC mehr zu sehen (Abb. 4.6b-d). Allerdings nahm die Ausbeute an isolierten MVEC mit geringeren Konzentrationen stetig ab, sodass bei 0,1 Beads pro MVEC nur noch vereinzelt MVEC isoliert wurden (Abb. 4.6d). Lediglich bei 10 Beads pro MVEC waren weder Verunreinigungen zu beobachten noch war die Ausbeute vermindert (Abb. 4.6b).

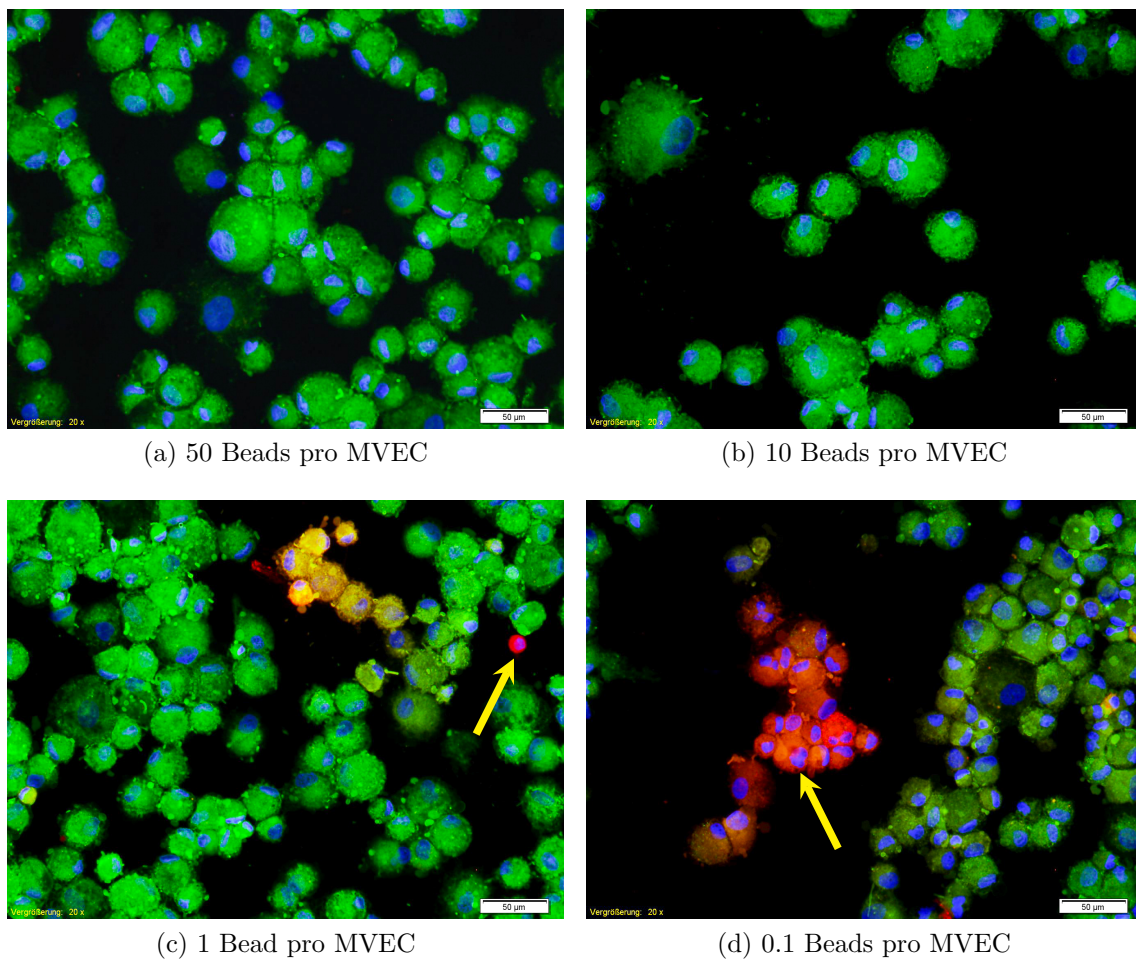


Abbildung 4.5: Untersuchung des Verhältnisses von Beads : MVEC, Fraktion der ASC. Zu sehen sind ASC (grün), welche mit verschiedenen Beads-Konzentrationen von MVEC (rot) befreit wurden. Nach zweimaliger Durchführung der Fraktionierungsprozedur entstand bei 50 und 10 Beads pro MVEC ein perfektes Ergebnis ohne Verunreinigungen. Bei 1 und 0.1 Beads pro MVEC blieben MVEC (rot, Pfeile), welche nicht von Beads besetzt waren, in den ASC Fraktionen zurück. Zum besseren Verständnis dieser Übersichtsaufnahmen sei auf die Vergrößerungen ausgewählter Strukturen in Abb. 4.3 verwiesen.



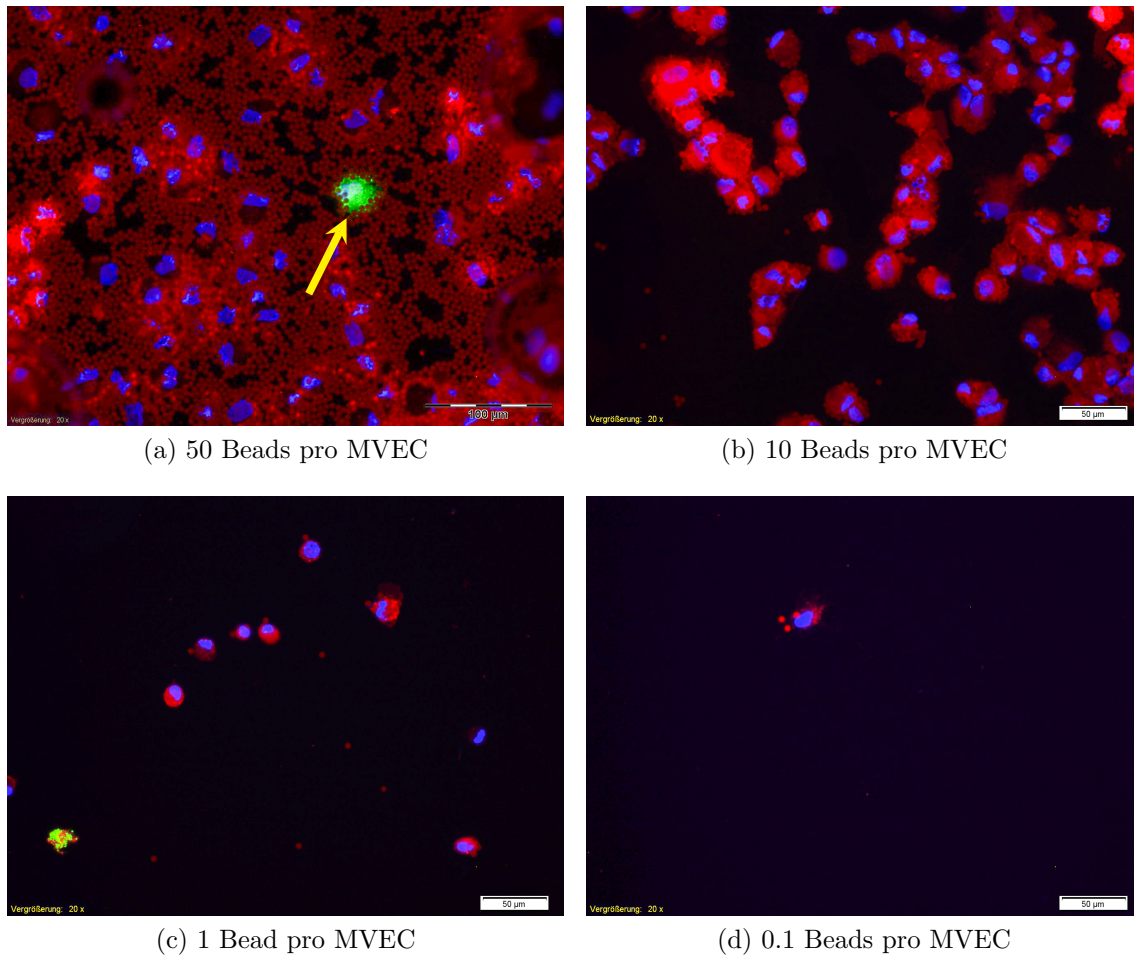


Abbildung 4.6: Untersuchung des Verhältnisses von Beads : MVEC, Fraktion der MVEC. Hier zu sehen sind die mit verschiedenen Beads-Konzentrationen abgetrennten MVEC (rot), welche mit Beads (dunkelrot) behaftet sind. Nach fünfmaliger Durchführung der Fraktionierungsprozedur konnte bei 10 Beads pro MVEC ein sehr gutes Trennungsergebnis ohne Verunreinigungen erreicht werden. Bei 50 Beads pro MVEC waren die MVEC durch massiven Überschuss an Beads nur noch schwer zu erkennen. Auffällig ist eine Verunreinigung mit vereinzelt ASC (grün, Pfeil). Mit 1 und 0.1 Beads pro MVEC sieht man eine deutlich verminderte Anzahl an gewonnenen Zellen. Zum besseren Verständnis dieser Übersichtsaufnahmen sei auf die Vergrößerungen ausgewählter Strukturen in Abb. 4.3 verwiesen.

## Zusammenfassung

In der Gesamtschau der erhaltenen Ergebnisse erwies sich die Trennung mit 10 Beads pro MVEC im Zellgemisch deutlich am vorteilhaftesten. Die ASC-Fraktion war nach zweimaliger, die MVEC-Fraktion nach fünfmaliger Durchführung der Fraktionierungsprozedur frei von Zellverunreinigungen und die Gesamtzahl an gewonnenen MVEC war nicht vermindert.

### 4.2.2 Anwendung der Zellfraktionierung: Genexpressionsmuster von ASC und MVEC in 3D Kultur

Im vorigen Abschnitt konnte erfolgreich ein Protokoll etabliert werden, welches es erlaubt, gleichzeitig sowohl ASC als auch MVEC aus einer Kokultur zu isolieren. Zur Demonstration eines Anwendungsgebietes hierfür wurde dieses Protokoll angewendet, um eine Genexpressionsanalyse an diesen beiden Zellfraktionen durchzuführen. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits beobachtet werden, dass in ASC bei Kokultivierung in ASC-MVEC-Sphäroiden die Expression der Gene Angiopoietin-2, Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und Leukemia Inhibitory Factor gegenüber der Kultivierung in ASC-Monokultur-Sphäroiden erhöht war [9]. Hier sollte nun zusätzlich untersucht werden, wie sich die Genexpression innerhalb der kokultivierten MVEC verhielt. Hierfür wurden ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide kultiviert. Nachdem die Kulturzeit vorüber war, wurden die Sphäroide gepoolt und durch Verwendung von Trypsin dissoziiert. Die so entstandenen Zellsuspensionen wurden mit der zuvor etablierten Menge an magnetischen Beads versehen und in ihre Zellfraktionen aufgetrennt. Nun wurde mittels RT-PCR die Genexpression in den einzelnen Zellfraktionen untersucht. Zum Vergleich wurden ASC-Monokultur-Sphäroide kultiviert und ebenfalls mittels RT-PCR untersucht.

In der Fraktion der ASC konnte in ASC-MVEC-Kokulturen – verglichen mit ASC-Monokulturen – vor allem an Tag 1 eine signifikant verstärkte Expression der

Gene Angiopoietin-2, Interleukin-6 und Leukemia Inhibitory Factor festgestellt werden (Abb. 4.7). Diese Erhöhung relativierte sich jedoch nach einem weiteren Tag Kultur. Die Veränderung von Tag 1 zu Tag 2 war bei allen Genen auf Seite der ASC recht klein. Lediglich die Expression von Interleukin-6 wurde in ASC sowohl aus Kokulturen als auch aus Monokulturen signifikant verringert.

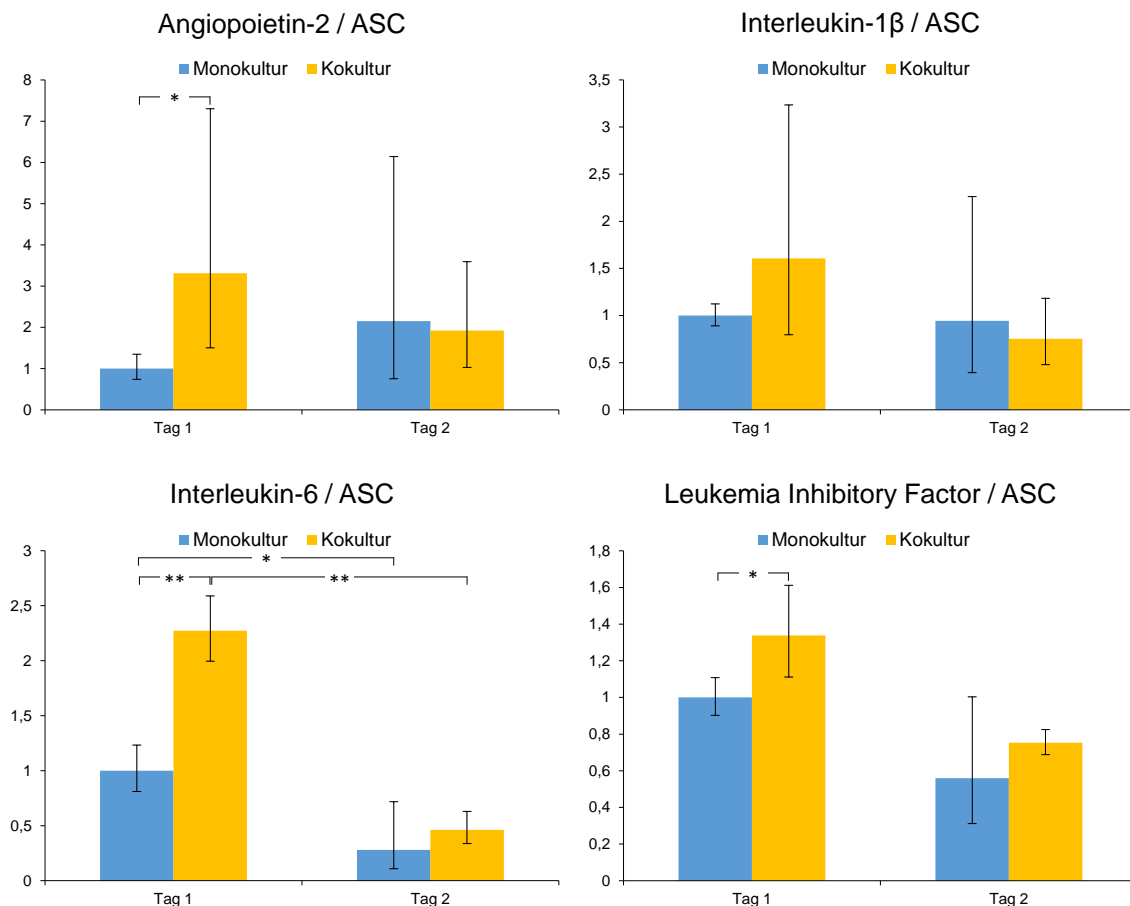


Abbildung 4.7: Genexpression in ASC in ASC-Monokultur- und ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden. Es wurden die einzelnen Fraktionen von ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden und ASC-Monokultur-Sphäroiden entsprechend dem zuvor etablierten Protokoll getrennt und mittels RT-PCR untersucht (n=5). Normalisiert wurde zunächst auf die Expression des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin, danach auf Tag 1 der Monokulturen. Signifikanzniveaus: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$

In der Fraktion der MVEC konnte für alle Gene eine signifikante Steigerung der Expression beobachtet werden (Abb. 4.8). Am kleinsten fiel dieser Effekt bei Interleukin-6 (3-fach) aus. Am deutlichsten zu beobachten war er bei Leukemia Inhibitory Factor (16-fach).

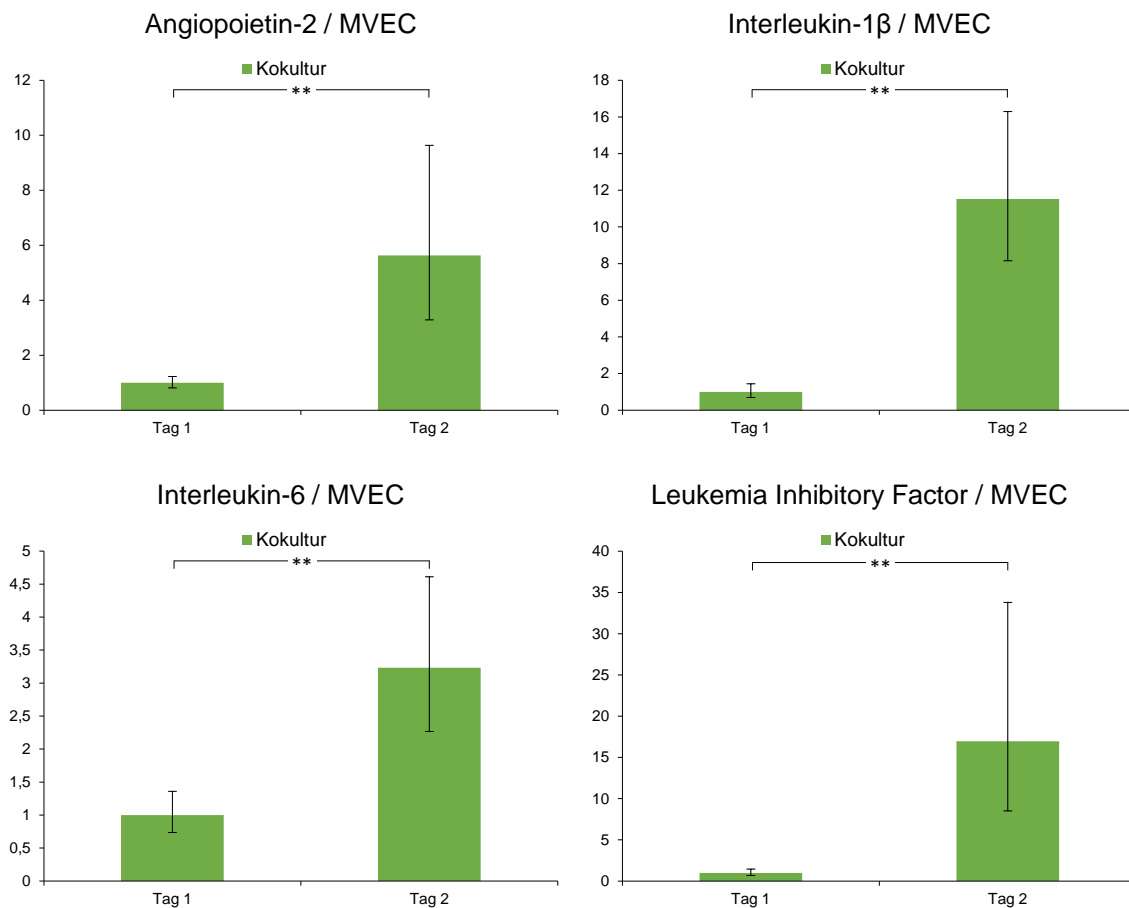


Abbildung 4.8: Genexpression in MVEC in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden. Die MVEC-Fraktion wurde aus ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden nach erfolgreicher Fraktionierung mittels RT-PCR auf die Expressionsstärke von vier Genen untersucht (n=5). Normalisiert wurde zunächst auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin, dann auf Tag 1. Signifikanzniveaus: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$

Um die gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Genexpression in ASC und MVEC besser einordnen zu können, wurde eine zusätzliche Gegenüberstellung der Genexpression innerhalb beider Kokultur-Fraktionen erstellt (Abb. 4.9). Ausdrücklich sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Genexpressionen in den unterschiedlichen Zelltypen nicht direkt vergleichbar sind, da sie nur auf die Expression des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin in den jeweiligen Zelltypen normalisiert werden können. Dennoch



ermöglicht diese Darstellung, die Größenverhältnisse der Genexpressionen grob vergleichbar einschätzen zu können. So konnte gezeigt werden, dass die Expression der vier Gene in MVEC zwar an Tag 1 etwa auf demselben Niveau lagen wie in ASC. An Tag 2 jedoch erhöhte sich die Expression aller vier Gene in der MVEC-Fraktion weit über das Niveau der Expression in den ASC-Fraktionen.

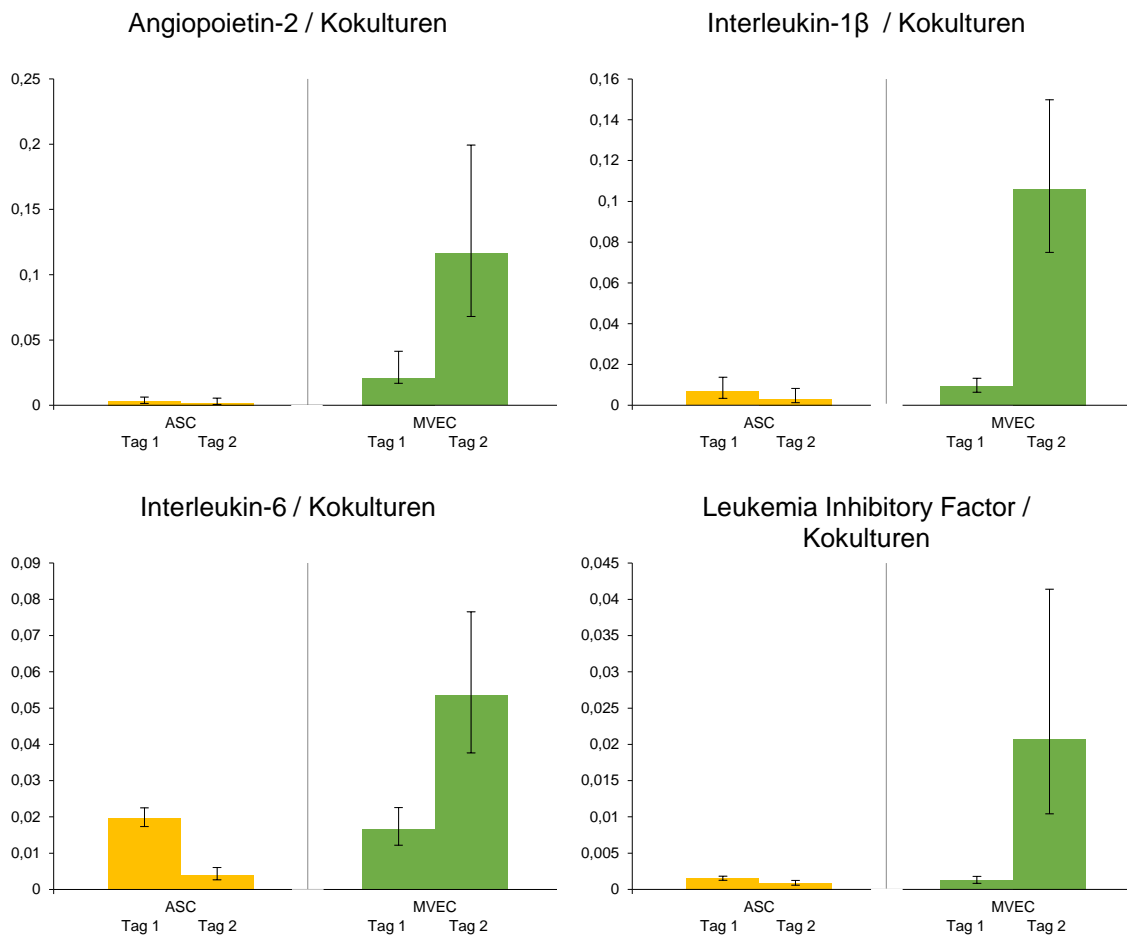


Abbildung 4.9: Genexpression in ASC und MVEC in Kokultur. Die Genexpression (Daten aus Abb. 4.7 und 4.8) wurde hier nochmals innerhalb der Kokulturen in Relation dargestellt ( $n=5$ ). Die aufgetragenen Werte entsprechen der zu  $\beta$ -Actin relativen Expression, wurden jedoch hier nicht weiter normalisiert.

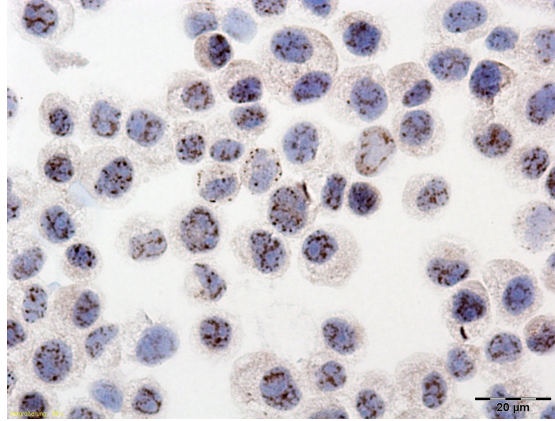
### 4.3 Immunhistochemische Färbung von aktivem $\beta$ -Catenin in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden

Muhr beobachtete 2013 in ASC-MVEC-Kokultursphäroiden, dass die Triglyceridspeicherung teilweise lokal unterdrückt wurde, während in ASC-Monokultur-Sphäroiden dieses Phänomen nicht auftrat, d.h. eine homogen verteilte Triglyceridspeicherung beobachtet wurde [9]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass an der partiellen Unterdrückung der Adipogenese bzw Triglyceridsynthese in den Kokulturen der Wnt-Signalweg beteiligt war. Um erste Untersuchungen zu dieser Hypothese anzustellen, wurde in dieser Arbeit eine immunhistochemische Färbung an Gefrierschnitten der Mono- und Kokultur-Sphäroide auf aktives  $\beta$ -Catenin durchgeführt. Aktives  $\beta$ -Catenin entsteht im letzten Schritt des kanonischen Wnt-Signalwegs. Wird dieser aktiviert, fällt durch verminderten Abbau vermehrt aktives  $\beta$ -Catenin an.

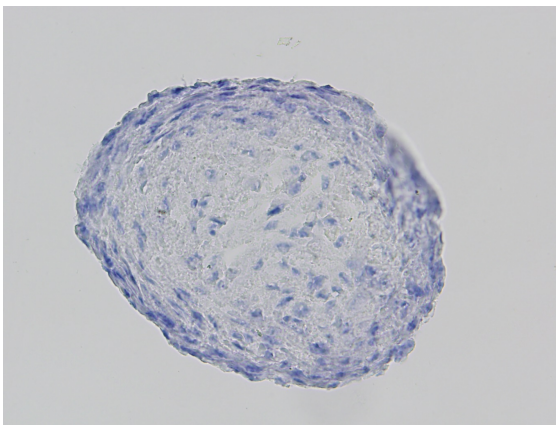
Zunächst wurde die Färbung an LS174T-Zellen getestet, deren Wnt-Signalweg bekanntermaßen verstärkt aktiviert ist (Abb. 4.10a) [53]. Zur Darstellung von Zellkernen wurde zusätzlich mit Hematoxylin gefärbt. Zu sehen waren gruppierte, punktförmige Anreicherungen von aktivem  $\beta$ -Catenin im Bereich der Zellkerne, nicht jedoch im Zellplasma. Als Kontrollproben wurden ASC-Monokultur-Sphäroide verwendet, deren Wnt-Signalweg ubiquitär mittels LiCl aktiviert wurde (Abb. 4.10b+c) [52]. Wie erwartet blieb die Braunfärbung in der Negativkontrolle, welche ohne Primärantikörper behandelt wurde, aus. In der Positivkontrolle zeigte sich – wie erwartet – eine ubiquitäre, wenn auch nicht ganz gleichmäßige Färbung.

Im Ergebnis der untersuchten Proben zeigten ASC-Monokulturen bis auf Randbereiche keine nennenswerte Braunfärbung, wohingegen einige der untersuchten Kokultur-Sphäroide deutliche, regional betonte Färbung aufwiesen (Abb. 4.11). Insgesamt konnte in 7 von 14 untersuchten Kokultur-Sphäroid-Schnitten eine ent-

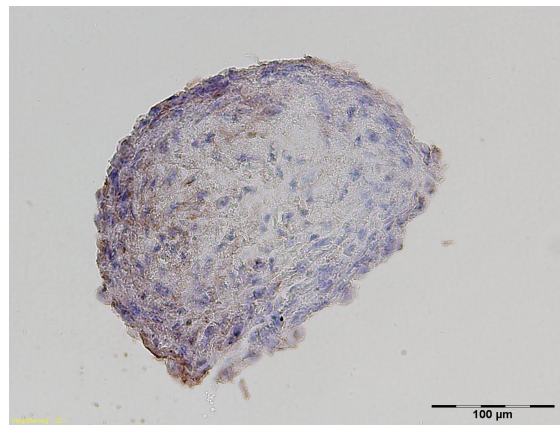
sprechende Färbung dargestellt werden, während in der Gruppe der Monokultur-Sphäroid-Schnitte keiner der 18 Untersuchten eine dementsprechende Färbung aufwies.



(a) Etablierung: LS174T Zellen



(b) Negativkontrolle: ASC-Monokultur mit LiCl, ohne Primär-Antikörper



(c) Positivkontrolle: ASC-Monokultur mit LiCl

Abbildung 4.10: Etablierung und Kontrolle der immunhistochemischen Färbung auf aktives  $\beta$ -Catenin (braun). Die Färbung wurde an Zellen vom Typ Homo Sapiens Colon Colorectal Adenocarcinoma LS174T etabliert. Als Kontrollgruppen dienten ASC-Monokultur-Sphäroide, deren Wnt-Signalweg mittels LiCl aktiviert wurde. In der Negativkontrolle wurde die Färbeprozedur ohne Primärantikörper durchgeführt.

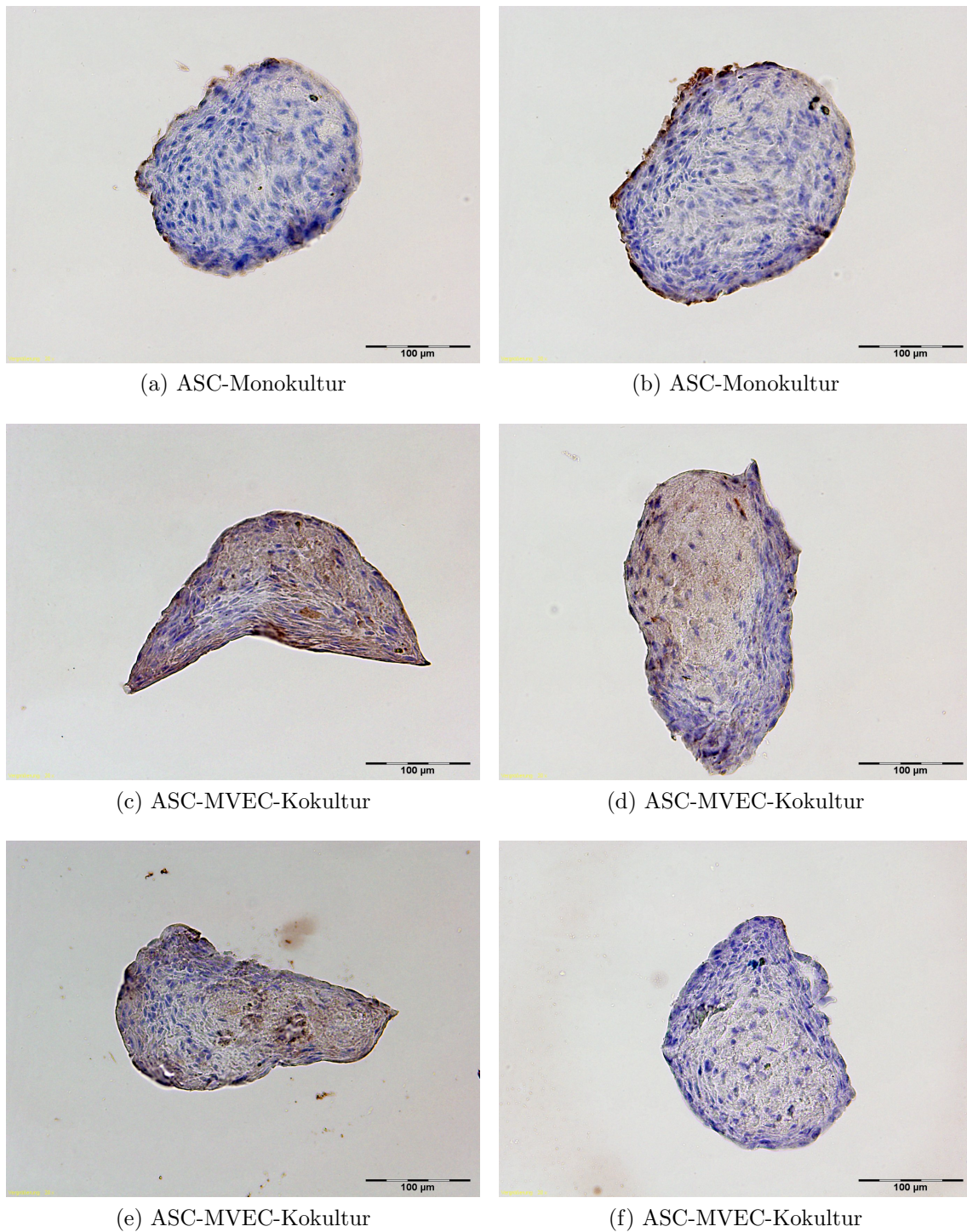


Abbildung 4.11: Immunhistochemische Färbung auf aktives  $\beta$ -Catenin in ASC-Mono- und ASC-MVEC-Kokultursphäroiden. Während sich in ASC-Monokultur-Sphäroiden keine nennenswerte Färbung darstellte (a+b), fand sich in der Hälfte der untersuchten Kokultursphäroide ein regional betontes Färbungsmuster (c-e).

# Kapitel 5

## Diskussion

Im Laufe der letzten Jahre erlangten 3D Kulturen immer größere Bedeutung in der regenerativen Medizin, aber auch in der Grundlagenforschung in der Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhängen. Ausgehend von Muhrs Etablierung eines Sphäroid-Modells für die Kokultur von ASC und MVEC [9] sollten in dieser Arbeit ausgewählte Aspekte dieser 3-dimensionalen Kokultur untersucht werden. Der Fokus lag hierbei zum einen auf der Zellfraktionierung, welche es erlauben sollte, die Kokulturen in ihre beiden Zellfraktionen zu zerlegen und diese somit weiteren Untersuchungen, wie beispielsweise PCR, zugänglich zu machen. Zum anderen lag der Fokus auf der Darstellung des aktiven Wnt-Signalwegs innerhalb der ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide, um der Hypothese einer Beteiligung dessen an der Steuerung der Adipogenese nachzugehen.

## 5.1 Herstellung und Durchführung 2- und 3-dimensionaler Kulturen

2-dimensionale ASC-MVEC-Kokulturen wurden erfolgreich hergestellt und über 2 Tage kultiviert (Kapitel 4.1.1, S. 29). Über die Zeit der Kultivierung nahm die Konfluenz zu. Das Erscheinungsbild der Zellen entsprach der typischen Morphologie von ASC und MVEC [10, 54]. Es konnte eine gruppierte Anordnung der Zellen beobachtet werden.

In 3-dimensionaler Kulturtechnik konnten nach der Liquid-Overlay-Methode erfolgreich ASC-Monokultur- und ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide von 150 – 200  $\mu\text{m}$  Größe hergestellt werden (Kapitel 4.1.2, S. 30). Während der Kultivierung wurden vor allem die Randgebiete der Sphäroide homogener. Im Vergleich mit den Monokultur-Sphäroiden war die deutlich reduzierte Größe der Kokultur-Sphäroide auffällig. Dieser Größenunterschied wurde bereits 2013 von Muhr beobachtet und von ihm auf die geringere Zellgröße von endothelialen Zellen sowie auf ihr unterschiedliches Aggregationsverhalten zurückgeführt [9]. Außerdem konnte er beobachten, dass



sich das Verhältnis von MVEC und ASC bei fortschreitender Kultivierungsdauer zunehmend zugunsten der ASC verschob, sodass der relative Anteil von MVEC abnahm [9]. Zu der Größenminderung der Kokultur-Sphäroide trug auch der deutliche Verlust an lockerem Zellmaterial bei, welcher bei der Durchführung dieser Arbeit an beiden Tagen nach Aussaat zu beobachten war und bei Monokultur weniger ausgeprägt auftrat. Angesichts der Tatsache, dass in einigen Untersuchungen festgestellt wurde, dass MVEC sich verstärkt am Rand von Kokulturen ablagerten, erschien es wahrscheinlich, dass die Sphäroide umgebendes, lockeres Zellmaterial bevorzugt auf Endothelzellen im Randbereich zurückzuführen war. So konnte von MVEC gezeigt werden, dass sie in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden vor allem in der ersten Phase der Sphäroid-Formierung den Hauptteil der Sphäroidränder ausmachten [9]. Dies stand im Einklang mit entsprechenden Beobachtungen von Wenger et al., nach welchen sich in Kokulturen von humanen Osteoblasten und humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) sich die HUVEC bevorzugt in den Randbereichen angesiedelt hatten [55]. Die geringe Aggregationsfähigkeit der MVEC war auch der Grund, warum sich das Herstellen von 3-dimensionalen MVEC-Monokulturen sehr schwierig gestaltet hätte. Es gab zwar aufwändige Protokolle zur Erzeugung von Endothelzell-Monokultur-Sphäroiden für HUVEC und BAEC [56]. Die Etablierung für MVEC hätte aber den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zusätzlich mit 3-dimensionalen MVEC Monokulturen vergleichen zu können, wären also weitere Experimente vonnöten.

## 5.2 Zellfraktionierung mittels MACS

Mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) können einzelne Zellfraktionen aus einem Zellgemisch isoliert oder entfernt werden. Hierbei werden magnetische Beads eingesetzt, welche mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenproteine einer Zellfraktion bestückt sind. Mit einem Magneten kann nun diese Zellfraktion

vom Rest des Gemisches getrennt werden. Dabei wird zwischen mehreren Arten der Trennung unterschieden. Bei einer positiven Isolation ist das Ziel, die mit Beads besetzte abgetrennte Zellfraktion von anderen Zellen zu trennen und zu reinigen. Ist das Ziel, die Zellsuspension von Bead-gebundenen Zellen zu befreien, so spricht man von einer Depletion. Werden mittels einem oder mehrerer Depletionsschritte alle Zellfraktionen bis auf eine entfernt, so spricht man von einer negativen Isolation dieser Zellen. Bei der Untersuchung von ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden kam diese Methode bereits zum Einsatz um ASC aus den Kulturen isolieren und sie so mit ASC aus Monokultur-Sphäroiden vergleichen zu können. Hierfür wurden Beads mit Antikörpern gegen CD31 verwendet, welche an MVEC binden. Die Zellsuspensionen wurden MVEC-*depletiert* und die verbliebenen ASC somit *negativ isoliert*. Allerdings wurde allein die ASC-Fraktion auf ihre Genexpression untersucht. Die MVEC-Fraktion wurde in damaligen Versuchen verworfen. Eine Verunreinigung der MVEC-Fraktion war deshalb nicht relevant. Um Ergebnisse aus Versuchen in Kokulturen besser interpretieren zu können, ist es jedoch von Interesse, beide Zellfraktionen einer Kokultur untersuchen zu können.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Methode zur Trennung eines Gemisches aus ASC und MVEC mittels MACS zu erarbeiten, welche es erlaubt, beide Zellfraktionen weiterzuverwenden. Der Anspruch an die Zellfraktionierung war also eine verunreinigungsfreie *Positiv-Isolation* von MVEC, sowie gleichzeitig aus denselben Proben eine verunreinigungsfreie *Negativ-Isolation* von ASC zu erreichen.

Bei der Trennung der Kokultur-Proben nach dem für die Isolation von ASC verwendeten Protokoll ergab sich das Problem von verunreinigten MVEC-Fractionen. So fanden sich in der positiv isolierten MVEC-Fraktion einzelne ASC.

Üblicherweise wird – um Zellverunreinigungen zu vermeiden – bei *negativ-Isolation* mittels MACS eine höhere Anzahl von Beads pro Zelle angewendet. Bei *positiv-Isolation* wird ein geringeres Verhältnis von Beads pro Zelle verwendet. Da in diesen Versuchen beide Isolationstypen gleichzeitig erfolgen sollten, musste das richtige Verhältnis von Beads pro Zelle zuerst etabliert werden. Der Hersteller der Beads, Invitrogen, gab für  $10^8$  Zellen ein Verhältnis von Beads : Zellen von 0,1 (Iso-



lation) bzw. 0,2 (Depletion) an. [57]. Zusätzlich wurde für die Verwendung von DynaBeads, unabhängig von der Zellmenge, eine Minimalkonzentration von  $10^7$  Beads pro mL angegeben [57]. Im Vergleich zum von Invitrogen intendierten Einsatzspektrum sollten die DynaBeads jedoch in dieser Arbeit für verhältnismäßig kleine Zellmengen von 150.000 Zellen pro Sphäroid-Gruppe angewendet werden. Hiervon wiederum enthielten ASC-MVEC-Kokultur-Gruppen je 75.000 MVEC. Die Verwendung der vom Hersteller angegebenen Mindestmenge der DynaBeads hätte in den hier verarbeiteten Proben ein Verhältnis von 133 Beads pro MVEC bedeutet.

Bezüglich der Verunreinigungen der MVEC-Fractionen durch ASC ergab sich also die Vermutung eines Zusammenhangs mit dem massiven Überschuss an Beads. Dieser konnte schon bei einer Konzentration von 50 Beads pro MVEC deutlich dargestellt werden (Abb. 4.4a, S. 34 und 4.6a, S. 37). Hier waren die mit Beads besetzten MVEC umgeben von großen Mengen freier, also ungebundener Beads, welche sich wiederum in Cluster zusammenlagerten. Eine mögliche Erklärung für die Verunreinigung der MVEC-Fraktion mit ASC wäre ein Einschluss von ASC in Clustern von zusammengelagerten freien Beads. Auch ohne direkte Bindung an Beads könnten ASC so mit diesen freien Beads in die MVEC-Fraktion gelangen. Diese Vermutung ließ sich durch die Tatsache stützen, dass mit weniger Beads pro MVEC keine Verunreinigungen der MVEC-Fraktion mehr auftraten. Zudem muss erwähnt werden, dass der Trennschritt der MVEC-Fraktion jeweils 5 mal durchgeführt werden musste um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten (Details zu den Trennschritten sind Kapitel 3.2.6, S. 24 zu entnehmen.). Folgt man der Vermutung, dass ASC in Clustern von freien Beads festgehalten werden, so entstände mit jedem Wiederholungsschritt die Chance auf ein Aufbrechen der Cluster und einer Freigabe eingeschlossener ASC.

Auf der Seite der ASC-Fraktion (Abb. 4.5, S. 36) traten Verunreinigungen bei Verwendung von 1 Bead pro MVEC und weniger auf. Dies ließ sich durch verringerte Verfügbarkeit von Beads erklären. Bei einer solch geringen Zahl an Beads stand nicht jedem MVEC ein Bead zur Verfügung. MVEC, welche nicht mit einem Bead besetzt waren, wurden bei der Fraktionierung nicht erfasst und verblieben so in der ASC-Fraktion. Wurde ein ausreichend hohes Verhältnis von Beads : MVEC gewählt,

so genügten im Gegensatz zur MVEC Fraktion bereits zwei Trennschritte, um ein optimales Trennergebnis zu erzielen.

Es konnte erfolgreich ein für die verwendeten Zellmengen funktionierendes Verhältnis von 10 Beads pro MVEC etabliert werden. In diesem Verhältnis waren weder die ASC-Fraktion noch die MVEC-Fraktion verunreinigt. Das Verwenden der vom Hersteller empfohlenen Mindestmenge war für den Erfolg der Fraktionierung und zwar in besonderem Maße für die Fraktion der positiv isolierten MVEC schädlich. Zwar bestünde theoretisch die Möglichkeit der Verwendung von größeren Zellmengen um der Minimalkonzentration gerecht zu werden. Allerdings hätte dies bei 5000 Zellen pro Sphäroid einen extrem großen Aufwand bedeutet. Denn in größeren Sphäroiden entstehen Konzentrationsgradienten, sodass eine Erhöhung der Zellzahlen nur mittels erhöhter Anzahl an Sphäroiden zu erreichen gewesen wäre. Schon in den Versuchen zur Genexpressionsanalyse (Kapitel 4.2.2, S. 38) wurden 10 96er-Wellplates benötigt. Um für die vom Hersteller angegebene Minimalmenge genügend Zellen zu erhalten wären hunderte Wellplates vonnöten gewesen. Dies ist praktisch nicht leistbar. Mittels diesem Protokoll war es nun möglich sowohl ASC als auch MVEC aus derselben Kokultur zu gewinnen ohne Verunreinigungen in Kauf nehmen und ohne die Zellmengen extrem erhöhen zu müssen. Dies ermöglicht es in Zukunft, Ergebnisse aus Versuchen mit ASC-MVEC-Kokulturen besser interpretieren und vergleichen zu können.

Alternativ zur Zellfraktionierung mittels MACS hätte auch eine Fraktionierung mittels Durchflusszytometrie (FACS) angewandt werden können. Die Entscheidung zur Fraktionierung mittels MACS fiel aufgrund einfacherer Durchführbarkeit direkt am Arbeitsplatz sowie geringerem Kostenaufwand.

Abschließend muss noch erwähnt werden, dass prinzipiell auch ASC CD31 exprimieren können. Da die verwendeten Beads an CD31 binden, würden auch solche CD31+ ASC zusammen mit MVEC isoliert werden. Allerdings sind für die Ausbildung von CD31 auf ASC sehr spezifische Bedingungen erforderlich [58]. Die hier eingesetzten ASC wurden auf ihren CD31-Status überprüft, welcher negativ war. Zudem wurden die Zellfraktionen noch vor Kokultivierung und unabhängig von ih-

rem CD31-Status mittels Membranfarbstoffen markiert. CD31+ ASC wären somit unabhängig vom Verhältnis Beads : Zelle als Verunreinigung in der Fraktion der MVEC zu sehen gewesen.

## 5.3 Genexpressionsanalyse

Wie oben beschrieben konnte ein Protokoll zur Fraktionierung mittels MACS etabliert werden, welches erlaubte, beide Zellfraktionen von ASC-MVEC-Kokulturen einzeln weiterverarbeiten zu können. Beispielhaft sollte nun gezeigt werden, welche Möglichkeiten dieses Protokoll in der Untersuchung der Genexpression dieser Zellen eröffnet. In Muhrs Arbeit von 2013 wurden in der ASC-Fraktion 3-dimensionaler ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide – verglichen mit ASC aus ASC-Monokultur-Sphäroiden – angestiegene Expressionen von Angiopoietin-2, Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und Leukemia Inhibitory Factor festgestellt [9].

Diese angestiegenen Expressionen konnten sowohl mit als auch ohne adipogene Induktion beobachtet werden. In den hier durchgeführten Versuchen zur weiteren Untersuchung dieser Gene wurde deshalb auf eine adipogene Induktion der Kulturen verzichtet. Während zuvor ein TaqMan Low Density Array (LDA) verwendet wurde, wurde hier aufgrund der kleineren Menge an zu untersuchenden Genen und Gruppen auf das übliche Verfahren der RT-PCR zurückgegriffen. Besonderes Augenmerk sollte in dieser Arbeit auf die Zeit kurz nach Kulturbeginn gelegt werden, da in der vorigen Studie die angestiegene Expression der vier Gene bereits zum frühesten Zeitpunkt, am Tag 2 nach Kulturbeginn, festgestellt werden konnte. Deshalb sollte in dieser Arbeit bereits der erste Tag nach Kulturbeginn untersucht werden, wohingegen auf die Untersuchung der Gruppen nach längerer Kulturdauer verzichtet wurde. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich die Expression dieser Gene auf der Seite der kokultivierten MVEC verhielt, welche vorher nicht Untersuchungsgegenstand waren. Das zuvor erarbeitete Protokoll zur Fraktionierung mittels MACS ermöglichte nun auch die Untersuchung der MVEC.

Um die Genexpression mit den eben genannten Zielen zu untersuchen wurden erfolgreich 3-dimensionale ASC-Mono- und ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide erstellt (Kap. 4.1.2, S. 30), welche ohne Induktion nach 1 bzw. 2 Tagen Kultur geerntet, gepoolt und dissoziiert wurden. Die so erhaltenen Zellgemische wurden mittels MACS (Kapitel 4.2.1, S. 32) erfolgreich in zwei reine Fraktionen aufgetrennt. Diese Fraktionen wurden per real-time RT-PCR auf ihre Expression der vier Zielgene untersucht.

Die so erhaltenen PCR-Daten zeigten an Tag 1 eine signifikant verstärkte Expression von Angiopoietin-2, Interleukin-6 und Leukemia Inhibitory Factor in ASC aus Kokulturen gegenüber denen aus Monokulturen (Abb. 4.7, S. 39). Allerdings lagen die Werte näher beieinander als erwartet. Am zweiten Tag der Kultur relativierten sich die Unterschiede in der Genexpression weitgehend. Die Veränderung von Tag 1 zu Tag 2 war bei allen Genen auf Seite der ASC recht klein. Lediglich die Expression von Interleukin-6 wurde in ASC sowohl aus Mono-, als auch aus Kokulturen signifikant verringert.

Auffällig war, dass die vier Gene in den ASC aus Kokulturen im Vergleich zu denen aus Monokulturen in dieser Arbeit nur am ersten Kulturtag erhöht waren. Muhr beobachtete diese unterschiedlich starke Expression am zweiten Kulturtag [9], an welchem in der hier durchgeführten Arbeit keine signifikant unterschiedlichen Expressionen festgestellt werden konnten. Da nicht klar ist, warum dieser Unterschied bestand, sollte dem in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

Eine mögliche Erklärung besteht in der Verwendung von MVEC unterschiedlicher Passagen. Während in dieser Arbeit MVEC der Passage 2 verwendet wurden, verwendete Muhr MVEC der Passage 3-4 [9].

Höchst interessant war jedoch das Ergebnis auf der Seite der MVEC aus Kokultur-Sphäroiden (Abb. 4.8, S. 40). Hier war in allen vier untersuchten Genen eine signifikante Steigerung von Tag 1 auf Tag 2 zu beobachten.

Um die gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Genexpression in ASC und MVEC besser einordnen zu können wurde eine zusätzliche Gegenüberstellung der Genexpression innerhalb beider Kokultur-Fraktionen erstellt (Abb. 4.9, S. 41). Diese Diagramme sollten einen groben Vergleich der Expressionsniveaus beider Zellfraktionen

ermöglichen. Die Genexpression wurde für jeden Zelltyp jeweils auf  $\beta$ -Actin normalisiert. Obwohl im zellübergreifenden Vergleich von Expressionsstärken keine konkreten Aussagen möglich waren, konnte so beobachtet werden, dass die Expression der vier Gene in MVEC an Tag 2 auf einem weit höheren Niveau als in ASC lag. Die Expression auf Seite der ASC lag an beiden Tagen eher im Bereich wie die der MVEC am ersten Kulturtag.

Angiopoietin-2 werden bei der Angiogenese ähnliche Aufgaben wie dem verwandten Angiopoietin 1 zugeschrieben [59, 60]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese, da es bei Anwesenheit von VEGF Gefäßwachstum fördern kann, indem es endothelial-periendotheliale Zellinteraktionen schwächt, die ECM degradiert und so eine Endothelzell-Migration und -Proliferation ermöglicht [9, 33, 61, 62]. Deshalb ist Angiopoietin-2 auch als Ziel für die antiangiogene Therapie von Tumoren interessant [63]. Interleukin- $1\beta$  und Interleukin-6 sind vor allem für ihre Funktionen in der Regelung von Entzündungsreaktionen bekannt [64, 65]. Traditionell werden beide Proteine als Aktivatoren der Akute-Phase-Proteine gesehen. Interleukin- $1\beta$  triggert unter anderem die Interleukin-6 Synthese [66, 67], sodass eine Erhöhung des Interleukin- $1\beta$  meist auch eine Erhöhung des Interleukin-6 Spiegels bewirkt. Interleukin-6 besitzt diverse Funktionen in Angiogenese und vaskulärem Remodeling [49]. Es induziert in sehr vielen Zelllinien die Expression von VEGF [68]. Es stimuliert endotheliale Progenitorzellen zur Angiogenese in vitro [49]. Leukemia Inhibitory Factor inhibiert in vitro die Angiogenese [50]. Es wird angenommen, dass LIF als Regulator überschießende Angiogenese verhindert und so die mikrovaskuläre Gefäßdichte reguliert [69]. In kardialen Stammzellen wurde beobachtet, dass LIF die Expression von endothelzell-spezifischen Genen wie CD31 induziert [70]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass LIF in 3T3-L1 Adipozyten die Akkumulation von Triglyceriden verringerte [71].

Alle vier untersuchten Gene spielen also eine Rolle in der Angiogenese. Die von Tag 1 zu Tag 2 signifikant verstärkte Expression dieser Gene in den MVEC-Fractionen aus ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden spricht also für eine angiogenetische Aktivität dieser Zellen. Dies deckt sich mit Beobachtungen, dass Endothelzellen

in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden sich netzartig organisierten und lumenartige Strukturen bildeten [9]. Eine ähnliche Beobachtung machte Wenger et al. 2005 mit kokultivierten HUVEC und menschlichen Fibroblasten (hFB) im Sphäroidmodell [72]. Auch hier bildeten sich lumenartige Aussprossungen. Eine verstärkte Expression der untersuchten Gene in MVEC bei Kokultivierung steht also angesichts ihrer Funktion in der Angiogenese im Einklang mit bestehenden Erwartungen. Um diesen Beobachtungen weiter nachzugehen, könnten weitere Schlüsselgene der Angiogenese in MVEC bei 3-dimensionaler Kokultivierung untersucht werden. Beispielsweise VEGF und Angiopoietin 1 seien hier zu erwähnen; Eine erhöhte Expression dieser Gene würde sehr für eine verstärkte Angiogenese sprechen.

Doch haben diese Gene nicht nur auf die Angiogenese Einfluss. Es ist auch bekannt, dass Interleukin-6 auf 3T3-L1 Adipozyten die Insulinresistenz steigert [73]. Wie zuvor beschrieben induziert Interleukin-1 $\beta$  die Produktion von Interleukin-6. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass hohe lokale Konzentrationen von Interleukin-6 die Leptin-Produktion und den Leptin-Stoffwechsel im menschlichen Fettgewebe modulieren können [74]. Leukemia Inhibitory Factor reduziert die Triglyceridakkumulation in 3T3-L1 Adipozyten [71]. Die untersuchten Gene spielen also nicht nur in der Angiogenese eine wichtige Rolle, sondern beeinflussen auch die Adipogenese. Es scheint deshalb wahrscheinlich, dass die vier untersuchten Gene zumindest mittelbar an der Steuerung der Adipogenese beteiligt sind. Dies ist zu Bedenken, wenn in weiteren Versuchen Adipogenese im Kontext mit Endothelzellen weiter untersucht werden soll.

Zudem ist weiterhin unbekannt, inwieweit eine erhöhte Konzentration dieser Gene in einer Zellfraktion die Entwicklung der anderen Zellfraktion beeinflusst. Eine Möglichkeit dieser Frage nachzugehen, wäre die Untersuchung von Monokulturen, welchen einzelne Stoffe im Kulturmedium zugesetzt wurden. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Verwendung von konditioniertem Medium. Allerdings ist konditioniertes Medium immer vielfältig beeinflusst, sodass sich die provozierten Effekte auf darin kultivierte Zellen kaum einem bestimmten Faktor zuordnen ließen.

Weiterhin von Interesse wäre ein direkter Vergleich der hier erlangten Ergebnis-

se mit entsprechenden 2-dimensionalen Kulturen. So könnten weitere Erkenntnisse über den Effekt des Kulturmodells bezüglich der zellulären Differenzierung erlangt werden.

## 5.4 Immunhistochemische Färbung auf aktives $\beta$ -Catenin

In der Literatur sind die Effekte von Endothelzellen auf die Adipogenese von ASC in Kokultur vorwiegend in 2-dimensionalen Kulturbedingungen beschrieben. Die Beobachtungen diesbezüglich waren widersprüchlich, da sowohl von einer Zunahme [75], als auch von einer Abnahme [32] der Adipogenese von ASC in Kokultur berichtet wurde. In 3-dimensionaler Kulturumgebung berichtete Lai et al. 2009, dass in Kollagen-Gel Kokultur von 3T3-L1 Präadipozyten und humanen Endothelzellen aus Nabelschnur-Venen (HUVEC) bei einem Verhältnis Präadipozyten : HUVEC von 9 : 1 die Triglyceridkonzentration 3,4-fach höher als bei einer reinen Präadipozyten-Monokultur war [76]. Anders als in vorangegangenen Studien verwendete Kultursysteme verfügt das Sphäroid-Modell über direkte Zell-Zell-Kontakte und eine 3-dimensionale Kulturumgebung, was *in vivo* Bedingungen deshalb sehr viel näher kommt [9]. Durch Verwendung dieses Kultursystems konnte Saleh et al. 2011 bei Kokultivierung von HUVEC und MSC in Sphäroiden beobachten, dass HUVEC die adipogene Differenzierung und Proliferation von MSC vermindern [77]. Muhr konnte später in adipogen induzierten ASC-MVEC-Kokultursphäroiden beobachten, dass im Vergleich zu ASC-Monokultur-Sphäroiden die Adipogenese vermindert war [9]. Dies erhärtete Vermutungen, dass Endothelzellen die Entwicklung der mesenchymalen Zellen grundlegend beeinflussen können. So konnte auch beobachtet werden, dass in ASC-MVEC-Kokultursphäroiden die Speicherung von Triglyceriden in unmittelbarer Umgebung von Endothelzellen inhibiert wird (Abb. 1.3, S. 11) [9]. Bezüglich einer Reduktion der Adipogenese durch Endothelzellen wurde mehrfach

vermutet, dass der Wnt-Signalweg involviert sei [9, 32, 77]. Die Tatsache, dass Endothelzellen eine endogene Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs aufweisen ist bekannt [78]. Außerdem weiß man, dass der Wnt-Signalweg die Adipogenese inhibiert [27, 79].

In dieser Arbeit sollte daher auch der Hypothese, dass in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden über den Wnt-Signalweg die Triglyceridspeicherung lokal verringert wird, nachgegangen werden. Hierfür wurden ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroide und ASC-Monokultur-Sphäroide kultiviert (Kap. 4.1.2, S. 30) und adipogen induziert. Diese Sphäroide wurden in Schnitten aufgearbeitet, an welchen die immunhistochemische Färbung auf aktives  $\beta$ -Catenin folgte (Kap. 4.3, S. 42). Aktives  $\beta$ -Catenin stellt den letzten Schritt des kanonischen Wnt-Signalwegs dar (Abb. 1.2, S. 7). Eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs unterbindet den Abbau von  $\beta$ -Catenin und bewirkt somit eine Anhäufung dessen.

Es konnte in 50% der Schnitte von ASC-MVEC-Kokultursphäroiden aktives  $\beta$ -Catenin lokal begrenzt nachgewiesen werden. Das heißt, dass der Wnt-Signalweg regional betont aktiviert war (Abb. 4.11, S. 44). Demgegenüber konnten bei keinem der ASC-Monokultursphäroide erhöhte Konzentrationen von aktivem  $\beta$ -Catenin dargestellt werden.

Wie bereits zuvor erwähnt ist bekannt, dass im ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroid sowohl die Triglyceridspeicherung als auch MVEC regional konzentriert auftreten. Setzt man eine Inhibierung der Triglyceridsynthese durch MVEC mittels des Wnt-Signalwegs voraus, so wäre ein Verteilungsmuster des aktiven  $\beta$ -Catenins ähnlich dem der CD31+ Zellen in Abbildung 1.3 (S. 11) zu erwarten. Hier waren MVEC in ASC-MVEC-Kokultursphäroiden vor allem regional gruppiert in zentralen Anteilen der Sphäroide lokalisiert [9]. Und tatsächlich konnte in den Experimenten dieser Arbeit eben jenes regional betonte Verteilungsmuster auch für aktives  $\beta$ -Catenin beobachtet werden (Abb. 4.11, S. 44). 2011 konnten Saleh et al. ähnliche Beobachtungen bei MSC-HUVEC-Kokultur-Sphäroiden machen [77]. Fluoreszenz-immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass in MSC-HUVEC-Kokulturen Areale mit erhöhten Konzentrationen von aktivem  $\beta$ -Catenin deckungsgleich mit



dem Verteilungsmuster der CD31+ waren. In der Vergleichsgruppe mit adulten humanen dermalen Fibroblasten (HDFa) anstatt HUVEC waren keine erhöhten Konzentrationen von aktivem  $\beta$ -Catenin zu beobachten. Diese Areale, welche reich an CD31+ und aktivem  $\beta$ -Catenin waren, zeigten sich vorzugsweise randbetont lokalisiert. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu den Beobachtungen dieser Arbeit, in denen jene Areale eher zentral betont auftraten, da die verwendeten Zelltypen zwar ähnlich, aber dennoch nicht gleich waren. HUVEC sind die *in vitro* am häufigsten verwendeten Endothelzelltypen [77]. Während diese von makrovaskulärem Ursprung sind, entstammen die in dieser Arbeit verwendeten MVEC von Kapillaren, sind also mikrovaskulären Ursprungs. Endothelzellen sind eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, welche unterschiedlich auf verschiedene Stimuli reagieren.

Dickkopf-Related Protein 1 (DKK1) ist ein anerkannter Inhibitor des Wnt-Signalwegs [80]. Saleh et al. konnten 2011 mittels der Zugabe von DKK1 zeigen, dass in den zuvor erwähnten Versuchen mit MSC-HUVEC-Kokultur-Sphäroiden keine erhöhten Konzentrationen von aktivem  $\beta$ -Catenin mehr nachweisbar waren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe von DKK1 die Reduktion der Triglyceridspeicherung aufgehoben wurde. Interessant wäre es diese Versuche im Modell mit ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden nachzuvollziehen, um die bis jetzt gemachten Beobachtungen zur Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der Steuerung der Triglyceridspeicherung in ASC-MVEC-Kokultursphäroiden weiter zu festigen.

Bezüglich der präsentierten Ergebnisse ist die recht hohe benötigte Konzentration des verwendeten primären Antikörpers in 3-dimensionaler Umgebung zu erwähnen. So mussten die Schnitte der 3-dimensionalen Kulturen mit der primären Antikörperkonzentration von 1:5 behandelt werden. Üblicherweise ist bei hohen Konzentrationen des primären Antikörpers eine hohe Rate an Fehlfärbungen zu erwarten. Allerdings wären im Falle von unspezifischen Färbungen alle untersuchten Gruppen unspezifisch gefärbt. In diesem Falle jedoch war kein einziger der 18 untersuchten Monokultur-Schnitte abgesehen von unspezifischen Rückständen im Randbereich gefärbt. Hingegen waren alle Positivkontrollen sowie die Hälfte der Kokulturschnitte gefärbt. Angesichts der erzielten Ergebnisse ist eine unspezifische Färbung

deshalb als äußerst unwahrscheinlich anzusehen.

Die Tatsache, dass die regionale Betonung des aktiven Wnt-Signalwegs nur in der Hälfte der untersuchten Schnitte zu beobachten war, ist bei Berücksichtigung der erwarteten lokal begrenzten Verteilung im Sphäroid sehr plausibel. So ist es wahrscheinlich, dass in einigen Schnitten die regionale Wnt-Aktivierung außerhalb der Schnittebene lag und somit nicht darstellbar war. Nimmt man an, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs sich auf eine Region des Kokultur-Sphäroids beschränkt, so ist eine Darstellung dieser Region in jedem Schnitt sehr unwahrscheinlich.

Nach Abschluss der experimentellen Arbeit dieser Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe in weiteren Versuchen zur Beteiligung des Wnt-Signalwegs die Moleküle Wnt 1, 4, 10a deutlich erhöht in Kokulturen gegenüber Monokulturen – sowohl immunhistochemisch, als auch auf RNA-Ebene mittels PCR – nachgewiesen. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse macht dies eine Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der lokalen Reduktion der Adipogenese sehr wahrscheinlich.

Weitere Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass der Wnt-Signalweg nicht nur eine Verringerung der Adipogenese in ASC bewirkt [21, 79], sondern sehr wahrscheinlich auch an der Regulierung weiterer Wege der Zelldifferenzierung beteiligt ist [31, 81]. So konnten z.B. Bennett et al. 2002 in 3T3-L1 Präadipozyten durch Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs die Osteoblastogenese stimulieren und die Adipogenese inhibieren [31, 79].

Rajashekhar et al. konnten 2008 zeigen, dass ASC mit verstärktem Wnt-Signalling reagieren, nachdem man sie durch Endothelzellen konditioniertem Medium aussetzte [32]. Allerdings wiesen die einzelnen Wnt Gene ein anderes Verteilungsmuster auf als bei direkter Kokultivierung. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Zugabe von rekombinantem Wnt-Ligand auch ohne Anwesenheit von Endothelzellen eine verringerte Differenzierung von ASC bewirkte. Dies spricht dafür, dass zumindest ein Teil der durch Endothelzellen vermittelten Reduktion der Adipogenese über andere Kommunikationsmechanismen als über Zell-Zell-Kontakte stattfindet [9, 32]. Eine Erklärung für die dennoch zu beobachtende *lokale* Erhöhung von aktivem  $\beta$ -Catenin in 3-dimensionalen ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden wäre z.B. eine

sehr dichte Extrazellulärmatrix, welche einen effektiven Weitertransport der Faktoren verhinderte. Ebenfalls denkbar wäre eine schnelle Aufnahme durch umgebendes Gewebe, sowie ein schneller Zerfall oder Umbau der Faktoren. Weitere Untersuchungen sind also an dieser Stelle notwendig, um herauszufinden, warum die ASC durch MVEC, unter Beteiligung des Wnt-Signalwegs in erster Linie lokal beeinflusst werden.

## 5.5 Abschlussbetrachtung

In dieser Arbeit konnte ein Protokoll entwickelt werden, welches es erlaubt, ASC-MVEC-Kokulturen mittels MACS in ihre verschiedenen Zelltypen aufzutrennen. Es ermöglicht auch für kleine Zellmengen, beide Zellfraktionen einer ASC-MVEC-Kokultur verunreinigungsfrei zu isolieren und weiterzuverwenden. Eine beispielhafte Anwendung wurde mit der Genexpressionsanalyse von vier Genen in ASC und MVEC aus gemeinsamer Sphäroid-Kokultur demonstriert. Desweiteren konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden – anders als in ASC-Monokultur-Sphäroiden – lokal betont aktiviert ist. In Zusammenschau mit weiteren aktuellen Forschungsergebnissen macht dies eine Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der Steuerung der Adipogenese innerhalb von ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden sehr wahrscheinlich. Hier konnte ein Beitrag zur Erforschung des Zusammenspiels von ASC und MVEC in Kokultur geleistet werden. Diese Ergebnisse unterstreichen auch weiter die Wichtigkeit von 3-dimensionalen Kulturmodellen in der Adipositasforschung und im Adipose Tissue Engineering. Dort ermöglichen sie, eine Lücke zwischen dem stark vereinfachten 2-dimensionalen Zellkulturverfahren und den komplexen Bedingungen eines Organismus zu schließen.

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

Weißes Fettgewebe (WAT) stellt heute aus vielerlei Hinsicht ein interessantes Forschungsgebiet dar. Zum einen ist die Prävalenz der Adipositas weiterhin sehr hoch; mit ihr einher gehen Gesundheitsprobleme wie Bluthochdruck, Diabetes, Dyslipidämie und Atherosklerose, sowie deshalb das Bestreben, bessere Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Zum anderen hofft man im Bereich des Tissue Engineering, zukünftig mit *in vitro* hergestelltem weißem Fettgewebe Weichteildefekte decken zu können. Aus therapeutischer Sicht ist die weitere Erforschung von weißem Fettgewebe deshalb von großer Wichtigkeit. *In vivo* ist weißes Fettgewebe stark vaskularisiert. Die starken physiologischen Schwankungen von Fettgewebe erfordern deshalb ein besonders dynamisches Gefäßwachstum. Für ein genaueres Verständnis der Physiologie von WAT ist es unerlässlich das Zusammenspiel von Gefäß- und Fettzellen zu verstehen. 2-dimensionale Kultursysteme sind in ihrer Aussagekraft über die Bedingungen *in vivo* jedoch sehr limitiert. Deshalb kommt in der Erforschung von WAT zunehmend die 3-dimensionale Kultivierung zur Anwendung, welche bezüglich des Gewebekontextes einem lebenden Organismus näher kommt und damit eine größere Aussagekraft haben kann.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Voraussetzungen für die Untersuchung der einzelnen Zellfraktionen von Kokulturen aus mesenchymalen Stammzellen aus humanem Fettgewebe (ASC) und mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC) zu schaffen. Hierfür wurde erfolgreich ein Protokoll zur Trennung solcher Zellsuspensionen mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) etabliert (Kapitel 4.2.1). Während in vorangegangenen Arbeiten nur eine der beiden Zellfraktionen analysiert werden konnte [9], ermöglichte es dieses Protokoll nun beide Zellfraktionen einer Kokultur verunreinigungsfrei zu isolieren und zu analysieren.

Dies eröffnet neue Möglichkeiten in der Erforschung des Zusammenspiels dieser beiden Zelltypen. Um diese zu demonstrieren wurde in dieser Arbeit die Expression von vier Genen in ASC und MVEC aus gemeinsamer Kokultivierung in einem 3-dimensionalen Sphäroid-Modell analysiert (Kapitel 4.2.2). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Expression der Gene Angiopoietin-2, Interleukin-1 $\beta$ ,

Interleukin-6 und Leukemia Inhibitory Factor in MVEC bei 3-dimensionaler Kokultivierung mit ASC nach zwei Tagen Kultur stark anstieg, während sich in der Fraktion der ASC kaum Veränderungen zeigten. Dies wiederum spricht für eine angiogene Aktivität der MVEC. Ohne ein Protokoll zur Trennung solcher ASC-MVEC-Kokulturen mittels MACS, welche die weitere Analyse beider Zelltypen erlaubt, wäre diese Untersuchung so nicht möglich gewesen.

Ziel dieser Arbeit war auch, der Hypothese über eine Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der Steuerung der Adipogenese durch Endothelzellen in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden nachzugehen. Zuvor konnte beobachtet werden, dass in diesen die Triglyceridsynthese lokal reduziert war, während sie in ASC-Monokultur-Sphäroiden homogen verteilt und nicht inhibiert war [9]. Hierfür wurden Schnitte von adipogen induzierten ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden und ASC-Monokultur-Sphäroiden immunhistochemisch auf aktives  $\beta$ -Catenin gefärbt (Kapitel 4.3), wodurch der aktive Wnt-Signalweg innerhalb des Sphäroids dargestellt werden konnte. Tatsächlich konnte innerhalb der Kokultur-Sphäroide für die Hälfte der untersuchten Schnitte eine regionale Erhöhung von aktivem  $\beta$ -Catenin festgestellt werden, welche auf der Seite der ASC-Monokultur-Sphäroide nicht nachweisbar war. In Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit – auch im Kontext weiterer Forschungsergebnisse – erscheint eine Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der Steuerung der Adipogenese in ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroiden sehr wahrscheinlich.

In dieser Arbeit konnte ein Beitrag zum Verständnis des Zusammenspiels von ASC und MVEC in 3-dimensionaler Kokultivierung sowie dessen weiterer Untersuchung geleistet werden. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die Anwendbarkeit und Wichtigkeit von 3-dimensionalen Kulturmilieus in der Erforschung von weißem Fettgewebe, sowohl für die Adipositasforschung als auch für Adipose Tissue Engineering.

**Kapitel 7**

**Literatur- u.**  
**Abbildungsverzeichnis**

## 7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Ogden C L, Yanovski S Z, Carroll M D, and Flegal K M. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*. 2007; 132(6):2087–2102.
- [2] Bray G A. Complications of obesity. *Ann Intern Med*. 1985; 103(6 ( Pt 2)):1052–1062.
- [3] Fabbrini E, Sullivan S, and Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010; 51(2):679–689.
- [4] Bianchini F, Kaaks R, and Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol*. 2002; 3(9):565–574.
- [5] Busetto L, Enzi G, Inelmen E M, Costa G, Negrin V, Sergi G, and Vianello A. Obstructive sleep apnea syndrome in morbid obesity: effects of intragastric balloon. *Chest*. 2005; 128(2):618–623.
- [6] Aronne L J, Wadden T, Isoldi K K, and Woodworth K A. When prevention fails: obesity treatment strategies. *Am J Med*. 2009; 122(4 Suppl 1):S24–S32.
- [7] Maury E and Brichard S M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 314(1):1–16.
- [8] Choi J H, Gimble J M, Lee K, Marra K G, Rubin J P, Yoo J J, Vunjak-Novakovic G, and Kaplan D L. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010; 16(4):413–426.



- [9] Muhr C. Establishment and characterization of a human 3-d fat model - adipogenesis of hasc in a spheroid model; 3-d cocultures of adipocytes and endothelial cells. Dissertation, Universität Regensburg. 2013.
- [10] Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol.* 2008; 456:1–22.
- [11] Hoang T, Smith M D, and Jelokhani-Niaraki M. Expression, folding, and proton transport activity of human uncoupling protein-1 (ucp1) in lipid membranes: evidence for associated functional forms. *J Biol Chem.* 2013; 288(51):36244–36258.
- [12] Cypess A M, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine A B, Kuo F C, Palmer E L, Tseng Y H, Doria A, Kolodny G M, and Kahn C R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009; 360(15):1509–1517.
- [13] Bouchard C and Tremblay A. Genetic influences on the response of body fat and fat distribution to positive and negative energy balances in human identical twins. *J Nutr.* 1997; 127(5 Suppl):943S–947S.
- [14] Björntorp P. Abdominal fat distribution and disease: an overview of epidemiological data. *Ann Med.* 1992; 24(1):15–18.
- [15] Cinti S. The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech.* 2012; 5(5):588–594.
- [16] Trayhurn P and Beattie J H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60(3):329–339.
- [17] Guerre-Millo M. Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25(10):855–861.
- [18] Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, and Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res.* 2007; 39(5):314–321.

- [19] Klok M D, Jakobsdottir S, and Drent M L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev.* 2007; 8(1):21–34.
- [20] Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, and Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1784–1792.
- [21] Rosen E D and MacDougald O A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(12):885–896.
- [22] Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005; 19(4):483–499.
- [23] Lowe C E, O’Rahilly S, and Rochford J J. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci.* 2011; 124(Pt 16):2681–2686.
- [24] Bauer-Kreisel P, Goepferich A, and Blunk T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(7-8):798–813.
- [25] Farmer S R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006; 4(4):263–273.
- [26] Logan C Y and Nusse R. The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20:781–810.
- [27] Christodoulides C, Lagathu C, Sethi J K, and Vidal-Puig A. Adipogenesis and wnt signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(1):16–24.
- [28] Singh R, Artaza J N, Taylor W E, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid N F, and Bhasin S. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3t3-l1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and t-cell factor 4 may bypass canonical wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology.* 2006; 147(1):141–154.

- [29] Ross S E, Hemati N, Longo K A, Bennett C N, Lucas P C, Erickson R L, and MacDougald O A. Inhibition of adipogenesis by wnt signaling. *Science*. 2000; 289(5481):950–953.
- [30] Moldes M, Zuo Y, Morrison R F, Silva D, Park B H, Liu J, and Farmer S R. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J*. 2003; 376(Pt 3):607–613.
- [31] Bennett C N, Ross S E, Longo K A, Bajnok L, Hemati N, Johnson K W, Harrison S D, and MacDougald O A. Regulation of wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem*. 2002; 277(34):30998–31004.
- [32] Rajashekhar G, Traktuev D O, Roell W C, Johnstone B H, Merfeld-Clauss S, Van Natta B, Rosen E D, March K L, and Clauss M. Ifats collection: Adipose stromal cell differentiation is reduced by endothelial cell contact and paracrine communication: role of canonical wnt signaling. *Stem Cells*. 2008; 26(10):2674–2681.
- [33] Lijnen H R. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(2):286–293.
- [34] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9(6):653–660.
- [35] Christiaens V and Lijnen H R. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 318(1-2):2–9.
- [36] Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol*. 2000; 50(1-2):1–15.
- [37] Ucuzian A A and Greisler H P. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg*. 2007; 31(4):654–663.
- [38] Moeller B J, Cao Y, Vujaskovic Z, Li C Y, Haroon Z A, and Dewhirst M W. The relationship between hypoxia and angiogenesis. *Semin Radiat Oncol*. 2004; 14(3):215–221.

- [39] Fukumura D, Ushiyama A, Duda D G, Xu L, Tam J, Krishna V, Chatterjee K, Garkavtsev I, and Jain R K. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res.* 2003; 93(9):e88–e97. Blockade VEGF signaling can inhibit adipose tissue formation.
- [40] Pampaloni F, Reynaud E G, and Stelzer E H K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(10):839–845.
- [41] Yamada K M and Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3d. *Cell.* 2007; 130(4):601–610.
- [42] Bosman F T and Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003; 200(4):423–428.
- [43] Griffith L G and Swartz M A. Capturing complex 3d tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(3):211–224.
- [44] O’Connor K C, Song H, Rosenzweig N, and Jansen D A. Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose. *Biotechnol Lett.* 2003; 25(23):1967–1972.
- [45] Chan B P and Leong K W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 2008; 17 Suppl 4:467–479.
- [46] Weiser B. Adipose tissue engineering : precultivation strategies towards clinical applications and a novel 3-d model of adipogenesis for basic research. Dissertation, Universität Regensburg. 2008.
- [47] Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos E K, Kutschera S, Bartels S, Appak S, Besemfelder E, Terhardt D, Chavakis E, Wieland T, Klein C, Thomas M, Uemura A, Goerdts S, and Augustin H G. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through tie2 and integrin signaling. *J Clin Invest.* 2012; 122(6):1991–2005.

- [48] Rosell A, Arai K, Lok J, He T, Guo S, Navarro M, Montaner J, Katusic Z S, and Lo E H. Interleukin-1beta augments angiogenic responses of murine endothelial progenitor cells in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29(5):933–943.
- [49] Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, Chen Y, Lawton M T, Young W L, and Yang G Y. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28(1):90–98.
- [50] Pepper M S, Ferrara N, Orci L, and Montesano R. Leukemia inhibitory factor (lif) inhibits angiogenesis in vitro. *J Cell Sci.* 1995; 108 ( Pt 1):73–83.
- [51] Aguirre A, Planell J A, and Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 400(2):284–291.
- [52] Kirton J P, Crofts N J, George S J, Brennan K, and Canfield A E. Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circ Res.* 2007; 101(6):581–589.
- [53] Dvory-Sobol H, Sagiv E, Kazanov D, Ben-Ze’ev A, and Arber N. Targeting the active beta-catenin pathway to treat cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(11):2861–2871.
- [54] de Groot C J, Chao V A, Roberts J M, and Taylor R N. Human endothelial cell morphology and autacoid expression. *Am J Physiol.* 1995; 268(4 Pt 2):H1613–H1620.
- [55] Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin H G, Stark G B, and Kneser U. Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2004; 10(9-10):1536–1547.

- [56] Korff T and Augustin H G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 1998; 143(5):1341–1352.
- [57] Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway. *Dynabeads CD31 Endothelial Cell*, rev. no. 003 edition. 2007.
- [58] Fischer L J, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, Lombardi J, Shapiro I, and DiMuzio P J. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res.* 2009; 152(1):157–166.
- [59] Yuan H T, Khankin E V, Karumanchi S A, and Parikh S M. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(8):2011–2022.
- [60] Fagiani E and Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2013; 328(1):18–26.
- [61] Carmeliet P and Jain R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473(7347):298–307.
- [62] Augustin H G, Koh G Y, Thurston G, and Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10(3):165–177.
- [63] Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin H G, and Benjamin L E. Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. *Cancer Res.* 2013; 73(6):1649–1657.
- [64] Jones S A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for il-6. *J Immunol.* 2005; 175(6):3463–3468.
- [65] Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, and Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the

- hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 223(1):22–38.
- [66] Sironi M, Breviario F, Proserpio P, Biondi A, Vecchi A, Van Damme J, Dejana E, and Mantovani A. Il-1 stimulates il-6 production in endothelial cells. *J Immunol.* 1989; 142(2):549–553.
- [67] Cahill C M and Rogers J T. Interleukin (il) 1beta induction of il-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent akt/ikappab kinase alpha pathway targeting activator protein-1. *J Biol Chem.* 2008; 283(38):25900–25912.
- [68] Cohen T, Nahari D, Cerem L W, Neufeld G, and Levi B Z. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271(2):736–741.
- [69] Kubota Y, Hirashima M, Kishi K, Stewart C L, and Suda T. Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent vegf expression in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118(7):2393–2403.
- [70] Mohri T, Fujio Y, Maeda M, Ito T, Iwakura T, Oshima Y, Uozumi Y, Segawa M, Yamamoto H, Kishimoto T, and Azuma J. Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac stem cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(10):6442–6447.
- [71] Hogan J C and Stephens J M. Effects of leukemia inhibitory factor on 3t3-l1 adipocytes. *J Endocrinol.* 2005; 185(3):485–496.
- [72] Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, Mehlhorn A T, Schmal H, Stark G B, and Finkenzeller G. Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. *Cells Tissues Organs.* 2005; 181(2):80–88.
- [73] Rotter V, Nagaev I, and Smith U. Interleukin-6 (il-6) induces insulin resistance in 3t3-l1 adipocytes and is, like il-8 and tumor necrosis factor-alpha, overex-

- pressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003; 278(46):45777–45784.
- [74] Trujillo M E, Sullivan S, Harten I, Schneider S H, Greenberg A S, and Fried S K. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(11):5577–5582.
- [75] Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, Herington A, Cameron D, Whitehead J, and Prins J. Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes.* 2004; 53(12):3097–3106.
- [76] Lai N, Jayaraman A, and Lee K. Enhanced proliferation of human umbilical vein endothelial cells and differentiation of 3t3-l1 adipocytes in coculture. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(5):1053–1061.
- [77] Saleh F A, Whyte M, and Genever P G. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. *Eur Cell Mater.* 2011; 22:242–57; discussion 257.
- [78] Goodwin A M, Sullivan K M, and D’Amore P A. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of wnt signaling. *Dev Dyn.* 2006; 235(11):3110–3120.
- [79] Prestwich T C and Macdougald O A. Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19(6):612–617.
- [80] Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan A P, Blumenstock C, and Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature.* 1998; 391(6665):357–362.
- [81] Kang S, Bennett C N, Gerin I, Rapp L A, Hankenson K D, and Macdougald O A. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing ccaat/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2007; 282(19):14515–14524.



## 7.2 Abbildungsverzeichnis

1.1	Die molekulare Regulierung der Adipogenese (aus [25]) . . . . .	6
1.2	Der Wnt-Signalweg (aus [27]) . . . . .	7
1.3	Triglyceride und CD31+ im ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroid (oben); Verteilung von MVEC und ASC im ASC-MVEC-Kokultur-Sphäroid (unten) (beide aus [9]) . . . . .	11
3.1	Generierung von 3-dimensionalen Sphäroiden nach der Liquid- Overlay-Methode (aus [46]) . . . . .	23
4.1	2-dimensionale Kokultur nach 2 Tagen Kultivierung . . . . .	29
4.2	3-dimensionale Kulturen nach 1 und 2 Tagen Kultivierung . . . . .	31
4.3	Vergrößerungen ausgewählter Strukturen aus den Zellfraktionen . . . . .	33
4.4	MACS-Trennung: Zellgemische vor der Fraktionierung . . . . .	34
4.5	MACS-Trennung: ASC-Fraktion . . . . .	36
4.6	MACS-Trennung: MVEC-Fraktion . . . . .	37
4.7	Genexpressionsanalyse: ASC-Fraktion . . . . .	39
4.8	Genexpressionsanalyse: MVEC-Fraktion . . . . .	40
4.9	Genexpressionsanalyse: ASC und MVEC in Relation . . . . .	41
4.10	Immunhistochemische Färbung auf aktives $\beta$ -Catenin: Etablierung, Negativ- und Positivkontrolle . . . . .	43
4.11	Immunhistochemische Färbung auf aktives $\beta$ -Catenin: Mono- und Kokultur-Sphäroide . . . . .	44

# Kapitel 8

## Anhang

# Liste der verwendeten Abkürzungen

$\beta$ -Cat	$\beta$ -Catenin
2-D / 2D	2-dimensional
3-D / 3D	3-dimensional
Ang-2	Angiopoietin-2
ASC	mesenchymale Stammzellen aus humanem Fettgewebe <i>- adipose-derived stem cells</i>
BAEC	Bovine Aortale Endothelzellen
BAT	braunes Fettgewebe
BSA	Rinderalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Co	Kokultur
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTRL	Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DKK1	Dickkopf-Related Protein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBM	Endothelial Basal Medium
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazellulärmatrix

---

EGF	Epidermal Growth Factor
EGM	Endothelial Growth Medium
FACS	Durchflusszytometrie - <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FB	Fibroblasten
FBS	Fetales Kälberserum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
GA-1000	Gentamycin / Amphotericin-B
H <sub>2</sub> O	Wasser
HUVEC	Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen - <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IND	induziert
LDA	Low Density Array
LiCl	Lithiumchlorid
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mono	Monokultur
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MVEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen
p...	Passage ...
PBM	Preadipocyte Basal Medium
PBS	Phosphatpuffersalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGM	Preadipocyte Growth Medium
RNA	Ribonukleinsäure
ROO	Red-Oil-O

RP	Random Primers
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WAT	Weißes Fettgewebe

# Danksagung

Diesen Abschnitt möchte ich nutzen, um all jenen zu danken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit in vielfältigster Art und Weise zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Torsten Blunk für die Überlassung des Themas und die großartige Betreuung. Über den Verlauf der Arbeit hinweg hatte er stets ein offenes Ohr und stand mir mit konstruktiver Hilfe zu Seite. Seine gewissenhafte und dennoch motivierende Art hat sehr viel zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen und mein wissenschaftliches Arbeiten geprägt.

Dr. Christian Muhr möchte ich für die detaillierte praktische Einführung in das Themengebiet sowie für seine große Hilfsbereitschaft bei Nachfragen danken.

Prof. Dr. C. Otto danke ich für die Überlassung der Zellen zur Etablierung der Immunhistochemie.

Mein Dank gilt auch Dr. Petra Bauer-Kreisel, die mir vor allem zu Beginn der Arbeit mit fachlichen Ratschlägen zur Seite stand.

Sehr gerne möchte ich mich natürlich auch bei meinen KollegInnen Katharina Werner, Katharina Wittmann, Susanne Dietl, Andrea Lenertz, Thomas Böck, Miriam Wiesner, Christiane Höfner, Oliver Berberich, Martin Krähnke, Verena Nowroth, Wiebke Vinke, Natalie Ludwig, Felix Kiepe und Alexander Kossmann

bedanken. Die konstruktive Zusammenarbeit, sowie die freundliche und heitere Atmosphäre haben bewirkt, dass ich mich in unserer Arbeitsgruppe von Anfang an wohl gefühlt habe.

Bei unseren Technischen Mitarbeiterinnen Sabine Müller und Dr. Irina Chodnevskaja bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Mitarbeit und das Einbringen ihrer großen praktischen Erfahrung.

Großen Dank auch an Dipl.-Math. Sabine Karl vom Institut für Mathematik, welche mir mit allen meinen Fragen zum Thema Statistik geholfen hat.

Unseren Sekretärinnen Melanie Riechwald und Juliane Neumann gilt mein Dank für ihre organisatorische Mithilfe.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir jederzeit zur Seite stehen und mich unterstützen. Danke!

# Lebenslauf

## Prsönliche Daten

Markus Nestmeyer

Geb. 05.01.1987 in Nürtingen

## Ausbildung

04/2014–09/2014 Promotionsstudent

JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

04/2007–03/2014 Student der Medizin

2. Staatsexamen: 11. November 2013

1. Staatsexamen: 31. März 2009

JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

07/2006–04/2007 Student des Maschinenbaus

FACHHOCHSCHULE ULM IN KOOPERATION MIT VOITH AG

09/1993–06/2006 Gymnasiast mit Schwerpunkt Naturwissenschaften

Abitur: 21. Juni 2006

HÖLDERLIN-GYMNASIUM NÜRTINGEN