

**Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und
Wiederherstellungschirurgie (Chirurgische Klinik II)
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. R. Meffert

**Endotheliale Differenzierung von mesenchymalen
Stammzellen aus dem Fettgewebe zur Anwendung im
Tissue Engineering**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Andrea Leitschuh

aus Hamburg

Würzburg, November 2016

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

Koreferent: Prof. Dr. med. N. Kleinsasser

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2017

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Aufbau des Fettgewebes	2
1.2 Fettgewebersatz - Status quo	4
1.3 Tissue Engineering von Fettgewebe	5
1.3.1 Trägermaterialien	7
1.3.2 Zellen für das Fettgewebe-Tissue Engineering	8
1.4 ASC – Multipotente Stammzellen für das Tissue Engineering	10
1.5 Vaskularisierungsstrategien von Tissue-Engineering-Konstrukten	13
1.6 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Nährmedien	21
2.1.4 Medienzusätze, Puffer, Enzyme	21
2.1.5 Wachstumsfaktoren	22
2.1.6 Oberflächenmatrices	22
2.1.7 Induktoren für die Adipogenese	22
2.1.8 Materialien für die Immunhistochemie	22
2.1.9 Antikörper	23
2.1.10 Zellen	23
2.1.11 Kits	23
2.1.12 Materialien für den DNA-Assay	23
2.1.13 Materialien für die Quantitative Real-Time PCR	24
2.1.13.1 Materialien	24
2.1.13.2 Primer	24
2.1.14 Software	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkultur	25

3.2 Betrachtung der VEGF-Sekretion von endothelial stimulierten ASC unter Einfluss von Hypoxie	49
3.3 Betrachtung der Proliferation endothelial stimulierter ASC	51
3.4 Betrachtung der Proliferation und Nachweis der adipogenen Differenzierung unter Einfluss der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF in adipogenem Medium	54
3.5 Nachweis der adipogenen Differenzierung unter Einfluss von Hypoxie	57
4 Diskussion	63
4.1 Endotheliale Differenzierung	65
4.2 Adipogene Differenzierung	73
4.3 Schlussfolgerung	77
5 Zusammenfassung	78
6 Literaturverzeichnis	81
7 Anhang	90
Danksagung	

1 Einleitung

Die regenerative Medizin befasst sich mit der Wiederherstellung von morphologisch oder funktionell geschädigtem Gewebe oder Organen. Hierbei versucht man körpereigene Regenerations- und Reparaturprozesse anzuregen oder aber durch Techniken des Tissue Engineering (TE) einen funktionsfähigen und biokompatiblen Gewebeersatz zu schaffen. Die mit Hilfe der Techniken des TE *in vitro* hergestellten Konstrukte sollen Gewebe *in vivo* ersetzen können. Das Grundprinzip ist hierbei die Besiedlung von Trägermaterialien mit regenerationsfähigen Zellen, meist unter Zugabe wachstumsinduzierender Faktoren [1].

Das subkutane Fettgewebe als Körper-umhüllendes Gewebe ist häufig von Verletzungen mit nachfolgenden Substanzdefekten, Narbenbildung und Konturveränderungen betroffen. Die plastische und rekonstruktive Chirurgie sucht daher nach Möglichkeiten einen Gewebeersatz zu schaffen, um Patienten mit Verletzungen, kongenitalen Defekten oder nach Tumorresektionen und Verbrennungen suffizient behandeln zu können. Ziel des Fettgewebe-TE ist es, Fett zu generieren, das hinsichtlich der zellulären und extrazellulären Struktur nativem Fettgewebe gleicht. Anforderungen an dieses Gewebe sind eine gute Implantierbarkeit, eine mechanische und strukturelle Stabilität, Langlebigkeit und Formbeständigkeit. Herausforderungen sind dabei die Sicherstellung einer schnellen und ausreichenden Vaskularisierung des Gewebekonstrukts sowie die strukturelle, mechanische und funktionelle Integration dieses Gewebes an der Implantationsstelle [2]. Folglich ist es zur erfolgreichen Herstellung eines funktionsfähigen und biokompatiblen Fettgewebekonstrukts entscheidend Strategien zu entwickeln welche die zeitnahe Blutversorgung des Konstrukts sichern.

1.1 Funktion und Aufbau des Fettgewebes

Fettgewebe ist im gesamten menschlichen Körper verteilt und definiert dessen Kontur. Große Depots kommen intraabdominell vor, wie z. B. um das Omentum majus, im Mesenterium oder als Fettkapsel zum Schutz und zur Stabilisierung von Organen wie der Niere. Neben dem viszeralen Fett findet man außerdem große Mengen an Fett in subkutanen Depots, z.B. am Gesäß, an den Oberschenkeln oder am Bauch [3]. Zusätzlich zur mechanischen Schutz- und Polsterfunktion dient das Fettgewebe als Verschiebeschicht zwischen unterschiedlichen Gewebetypen und als Kälteschutz. Das Fettgewebe ist ein hoch spezialisiertes, reich perfundiertes und innerviertes Bindegewebe, welches bei Säugern in zwei Hauptformen vorkommt, als braunes und als weißes Fettgewebe. Im Säuglingsalter besteht das Fettgewebe des Menschen hauptsächlich aus braunem Fett. Im Laufe der Entwicklung nimmt die Masse an braunem Fett zugunsten des weißen Fettgewebes ab, so dass im Körper eines erwachsenen Menschen das braune Fett nur noch in kleinen Mengen, zerstreut in Depots aus weißem Fettgewebe, vorkommt [4]. Das Fettgewebe macht dann 10-29% des Körpergewichts normalgewichtiger Menschen aus [5]. Diese Veränderung im Auftreten der beiden Fettformen ist bedingt durch ihre unterschiedliche Funktion. Adipozyten des braunen Fettgewebes speichern weniger Lipide, sind aber reich an Mitochondrien. Ihre primäre Funktion ist daher die Wärmeproduktion [6]. Dies ist unter anderem durch die Expression des *uncoupling protein - 1* (UCP1) möglich. Durch eine veränderte Expression dieses Gens kann Energie als Wärme freigesetzt werden, ohne dass Adenosintriphosphat (ATP) generiert werden muss [4]. Der Fokus dieser Arbeit ist das weiße Fettgewebe, da es aktuell das Hauptinteressengebiet im Tissue Engineering von Fettgewebe darstellt.

Im weißen Fettgewebe können größere Mengen an Fetten gespeichert werden und es dient dem Körper durch seine Fähigkeit zur kontrollierten Speicherung und Freisetzung von Triglyceriden vornehmlich als Energiereservoir bzw. -regulator. Die hohe Plastizität des Gewebes ist sowohl durch die Fähigkeit zur Hypertrophie reifer Adipozyten als auch durch Hyperplasie und Differenzierung von im Stroma vorkommenden adipogenen Vorläuferzellen möglich [7]. Neben

seiner Funktion als Energiespeicher ist das Fettgewebe auch Produzent einer Reihe autokriner, parakriner und endokriner Faktoren, wie z.B. Adipokinen, Fettsäuren, Steroidhormonen und Prostaglandinen [7]. Die sezernierten Faktoren wirken auf eine Reihe von Systemen ein, unter anderen z.B. im Reproduktions-, im immunologischen und im Gefäßsystem [8].

Das Fettgewebe besteht zum Großteil aus reifen Adipozyten, die in einer kollagenhaltigen Extrazellulärmatrix (EZM) eingebettet sind. Das Zytoplasma reifer Adipozyten besteht zu 90% aus Lipiden [9], durch welche der Zellkern zur Seite gedrängt wird und die Zelle die typische Siegelringform annimmt. Die übrigen Zellen des Fettgewebes werden in der Stromal Vaskulären Fraktion zusammengefasst (SVF); sie enthält Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Blutzellen und adipogene Vorläuferzellen, sogenannte Präadipozyten, ebenso wie mesenchymale Stammzellen [2, 6]. Ein entscheidendes Charakteristikum des Fettgewebes ist seine gute Vaskularisierung. Jeder Adipozyt steht im Kontakt zu mindestens einer Kapillare. Dies ist wichtig für die Gewährleistung der Funktionen des Fettgewebes und ermöglicht zudem den ständigen Umbau des Gewebes [10-12]. Voraussetzung für das Wachstum von weißem Fettgewebe ist die kontinuierliche Veränderung des vaskulären Netzwerks. Es besteht daher eine enge Verbindung zwischen Adipogenese und Angiogenese. Die Expansion des Fettgewebes wird zum einen durch Neovaskularisation und zum anderen durch Dilatation und Remodelling von bereits vorhandenen Kapillaren unterstützt. Dazu existieren auto- und parakrine Beziehungen zwischen Endothelzellen und Präadipozyten. So fördern die im Fettgewebe vorhandenen Endothelzellen die adipogene Differenzierung von Präadipozyten und diese sezernieren wiederum angiogenesefördernde Faktoren [12]. Die rasche Sicherung einer suffizienten Blutversorgung bzw. die Neubildung dieser vaskulären Netzwerke stellen bis heute große Hindernisse im TE komplexer Gewebekonstrukte dar.

1.2 Fettgewebersatz – Status quo

Wie oben geschildert besteht ein großer Bedarf an Fettgewebersatzmaterial, um Substanzdefekte nach Tumorresektionen, Traumen und Verbrennungen suffizient behandeln zu können. Derzeitige klinische Ansätze für den Weichgewebersatz beinhalten u.a. den Einsatz autologer Fettgewebstransplantate. Diese scheinen hinsichtlich der Biokompatibilität, der Immunantwort und zur Verhinderung einer Gewebeabstoßung das ideale Implantat darzustellen [2]. So können beispielweise kleinere Defekte durch Injektion von mittels Liposuktion gewonnenem autologen Fettgewebe behandelt werden. Da reife Adipozyten allerdings ein zu 80-90% aus Lipiden bestehendes Zytoplasma besitzen, sind sie durch die bei der Liposuktion auftretenden mechanischen Kräfte leicht verletzbar, weshalb dabei bis zu 90% der Zellen zugrunde gehen. Die restlichen 10% neigen post injectionem zur Zystenbildung oder lokaler Nekrosenbildung [9]. Um große Defekte wie z.B. nach einer Mastektomie ersetzen zu können, benötigt man Fetttransplantate von größerem Ausmaß. Freie Lappentransplantate zeigen hier häufig keine zufriedenstellende Ergebnisse, da es durch mangelnde Perfusion und nachfolgenden Sauerstoff- und Nährstoffmangel teilweise zur Resorption des Transplantats und dadurch zu einem 40-60%igem Volumenverlust kommt [6]. Um diesem Mangel entgegen zu wirken wurden die sogenannten gestielten Lappen entwickelt. Sie bleiben entweder durch einen Gefäßstiel, welcher für eine ausreichende Perfusion des Lappens sorgt, mit ihrem Ursprungsgewebe in Verbindung oder ihr Gefäßstiel wird mit einem lokalen Gefäß mikrochirurgisch anastomosiert. Beispiel hierfür ist der sog. DIEP-Lappen (*deep inferior epigastric artery perforator flap*). Dieser Perforatorlappen wird am Unterbauch entnommen und ist eine Lappenplastik aus Bauchdeckenhaut, subkutanem Fettgewebe und dem Perforatorgefäß mit Ursprung aus der Arteria epigastrica inferior. Nach Hebung des Lappens wird die Brust rekonstruiert und das Perforatorgefäß in der Regel mit der Arteria thoracica interna mikrochirurgisch anastomosiert, so dass die sofortige Perfusion des Lappens gewährleistet ist [13]. Diese OP-Methode hat sich in der letzten Zeit zur „state of the art“ für die Rekonstruktion eines großen Fettgewebedefekts mit autologem Gewebe entwickelt [14]. Großer Vorteil dieser Methode ist die Reduktion des Hebedefekts, da im

Gegensatz zur früher häufig verwendeten TRAM-Lappentechnik (*transverse rectus abdominus myocutaneous flap*) kein Muskelgewebe entnommen wird [13]. Mit dem Einsatz gestielter Lappentechniken konnten zwar bessere Ergebnisse erzielt werden als mit freien Fettgewebstransplantaten, allerdings handelt es sich hierbei um eine aufwendige und kostenintensive Operation, verbunden mit den typischen Operationsrisiken wie Infektion, Wundheilungsstörung und Narbenbildung. Nachteilig ist zudem die Tatsache, dass am Entnahmeort ein neuer Defekt geschaffen wird [1, 2]. Neben autologem Material werden auch synthetische Implantate zur Brustrekonstruktion verwendet, diese bestehen häufig aus Silikon. Ihr Einsatz kann allerdings eine Immunreaktion mit Kapselbildung oder eine allergische Reaktion hervorrufen. Die Implantate können außerdem rupturieren und dislozieren [9]. Auf Grund der aufgezählten Nachteile aller aktuellen Therapiemöglichkeiten besteht nach wie vor eine große Nachfrage an geeigneten Gewebesubstituten, die den oben genannten Anforderungen standhalten können. Dieser Nachfrage versucht man auch durch Ansätze des TE nachzukommen.

1.3 Tissue Engineering von Fettgewebe

TE-Ansätze werden in azelluläre und zellbasierte Ansätze unterteilt. Azelluläre Ansätze basieren auf der Applikation eines Stimulus, wie z.B. der Wachstumsfaktorenzugabe *in vivo*, welcher die Migration von Präadipozyten und Endothelzellen zur Implantationsstelle bewirkt. Die Zellen beginnen daraufhin zu proliferieren, zu differenzieren und Fettgewebedepots zu bilden [6]. Man spricht daher auch von *de novo* Adipogenese. Diese kann für klinische Anwendungen von Vorteil sein, da Schwierigkeiten im Rahmen der Zellgewinnung entfallen und immunologische Kompatibilitätsprobleme ausbleiben. Zudem ist keine zeit- und kostenintensive *in vitro* Kultivierung notwendig [2]. Ein Beispiel für diesen azellulären Ansatz ist die Applikation von Matrigel zusammen mit *basic fibroblast growth factor* (bFGF). So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die Injektion von Matrigel in Kombination mit bFGF in das subkutane Fettgewebe von Nacktmäusen zu einer *de novo* Entwicklung von vaskularisiertem Fettgewebe führt [15-17]. Nachteilig ist hier, dass kein Einfluss auf die Entstehung sowie auf Form und Größe des

neugeschaffenen Gewebes genommen werden kann [2]. Zudem ist das Matrigel auf Grund seines Ursprungs aus Karzinomzellen von Mäusen nicht klinisch anwendbar.

Aktuelle zellbasierte Ansätze im TE von Fettgewebe beruhen auf dem Prinzip der Besiedlung von Trägerstrukturen unterschiedlichen Materials mit ASC (*adipose derived stem cells*) *in vitro* und darauffolgender Implantation *in vivo*. Die ASC dienen hier nicht nur als „Baumaterial“ für die Rekonstruktion des herzustellenden Gewebes, sondern fungieren durch Sekretion verschiedener Zytokine auch als Trigger für Zellmigration und –differenzierung, wodurch indirekt auch die Vaskularisierung und Bildung des neuen Gewebes gefördert wird [18-20]. Die Idealvorstellung einer Anwendung von mittels TE hergestelltem Fettgewebe skizziert Abbildung 1. Dem Patienten wird durch Liposuktion oder im Rahmen einer Abdominoplastik Fettgewebe entnommen. Daraus werden die ASC isoliert und anschließend unter Standardbedingungen vermehrt. Sind genügend Zellen vorhanden, werden diese auf ein Trägermaterial gesät und oftmals werden zusätzlich gewebeinduzierende Faktoren hinzugefügt. Das mit Zellen besiedelte Implantat wird dann dem Patienten implantiert, meist nach einer Kultivierungsphase *in vitro*.

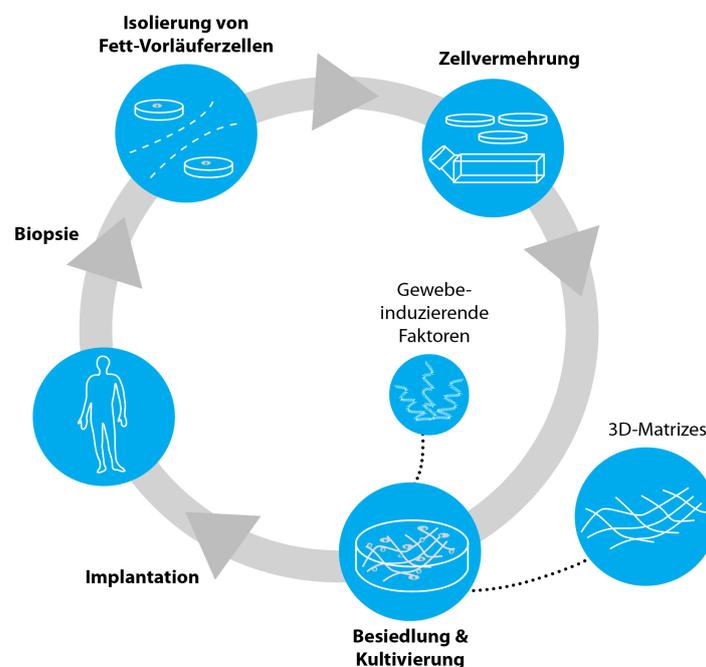


Abb. 1 – Schematische Darstellung der Herstellung eines TE-Konstrukts
Dem Patienten wird durch Liposuktion Gewebe entnommen, daraus werden die ASC isoliert. Diese werden *in vitro* vermehrt. Wenn genügend Zellen vorhanden sind, werden diese auf Trägermaterialien ausgesät. Das Konstrukt wird im Anschluss, oft unter Einfluss wachstumsinduzierender Faktoren, *in vitro* kultiviert, bevor es dem Patienten an die zu ersetzende Stelle implantiert wird.

Variationen dieses Prozesses sind durch Applikation verschiedener Wachstumsfaktorencocktails bzw. Wachstumsfaktorenfreisetzungssysteme, die Verwendung verschiedener Trägermaterialien oder die Modifikation der Oberflächen sowie durch die *in vitro* Präkultivierung der Implantate möglich.

1.3.1 Trägermaterialien

Trägermaterialien spielen für die mittels Techniken des TE hergestellten Implantate eine wichtige Rolle und können sowohl Gewebeförderung als auch -vaskularisierung dieser Konstrukte durch ihre verschiedenen Eigenschaften fördern. Anforderungen an die verwendeten Materialien sind folgende: sie sollten biokompatibel, resorbierbar und verformbar sein. Sie sollten mechanischen Belastungen standhalten und eine möglichst natürliche Festigkeit besitzen [6]. Ihre Resorptionszeit sollte im Bereich von Monaten liegen, um mit der Entwicklungskinetik des neu hergestellten Gewebes zu harmonisieren [2]. Bei den verwendeten Biomaterialien unterscheidet man zwischen synthetisch hergestellten und natürlichen Polymeren. Vorteile der erstgenannten sind, dass sie hinsichtlich ihrer mechanischen und chemischen Eigenschaften sowie der Abbaubarkeit definier- und modifizierbar sind. Die am häufigsten verwendeten synthetischen Materialien sind Polymere wie Polylactide/Polymilchsäure (PLA), Polyglycolide/Polyglycolsäure (PGA) und das Copolymer Polylactid-co-Glycolid (PLGA). PGA-Scaffolds werden vom Körper bereits innerhalb weniger Wochen resorbiert, wohingegen PLA und PLGA-Scaffolds eine längere Haltbarkeit aufweisen und erst nach Monaten bis zu einem Jahr vollständig resorbiert werden, was für die Langlebigkeit der Konstrukte von Vorteil ist [2]. Natürliche Materialien, z.T. als Teil der körpereigenen EZM, bieten Vorteile hinsichtlich der Biokompatibilität. So besitzen sie z.B. die gleichen biologischen und mechanischen Eigenschaften. Bisher untersuchte Materialien sind: Kollagen, Gelatine, Seide, Fibrin, Hyaluronsäure, dezellularisiertes menschliches Fettgewebe und Matrigel [21, 22]. Eine Alternative zu implantierbaren Scaffolds sind sog. injizierbare Systeme. Hierbei dient als Trägermaterial für die Zellen ein Hydrogel, welches über einen minimalinvasiven Eingriff in den Defekt eingebracht werden kann und an Ort und Stelle geliert. Auch hierfür stehen synthetische (z.B.

Polyethylenglycol) oder natürliche Materialien wie z.B. Kollagen, Hyaluronsäure, Alginat und Fibrin zur Verfügung [23]. So entstandene minimalinvasive Implantate stimulieren die Regeneration des Fettgewebes und können den Weichgewebedefekt schließen [6]. Alle genannten Materialien zeichnen sich jeweils durch bestimmte Vorzüge aus und die Bildung von Adipozyten konnte bei allen untersuchten Materialien nachgewiesen werden. Allerdings wurde noch kein Material gefunden, welches allen oben genannten Anforderungen entspricht und welches die volumen- und langzeitstabile Bildung von Fettgewebe unterstützt [2].

Neben der Verwendung unterschiedlicher Materialien können diese auch durch Modifikation ihrer Oberflächenstruktur in ihren Eigenschaften optimiert werden. So kann z.B. durch Anlagerung von Bindungsstellen an die Oberfläche der Trägermaterialien die Anheftung der ASC an das Trägermaterial verbessert und deren Wachstum und Proliferation verstärkt werden [6]. Zur Oberflächenmodifikation werden im Fettgewebe-TE Adhäsionsmoleküle wie das Arginin-Glycin-Aspartat-Säure (RGD)-Peptid oder Tyrosin-Isoleucin-Glycin-Serin-Arginin (YIGSR)-Peptid an die Trägermaterialien angelagert. Diese Peptide kommen besonders in Proteinen der Extrazellulärmatrix vor und vermitteln eine Integrin-basierte Zelladhäsion [24]. Außer der Oberfläche der Materialien kann auch deren Aufbau variiert werden, um die Porengröße und die Interkonnektivität der Poren für die Gewebeentwicklung zu optimieren. Hier konnte gezeigt werden, dass die korrekte Porengröße und -beschaffenheit das Bindungsverhalten der Zellen positiv beeinflusst [6].

1.3.2 Zellen für das Fettgewebe-Tissue Engineering

Ein entscheidender Faktor für das Fettgewebe-TE ist die Auswahl der verwendeten Zellen. Die am besten untersuchten adipogenen Zelllinien sind die Präadipozyten-Mauszelllinien 3T3-L1, 3T3-F442a und Ob17 [25]. Untersuchungen an diesen Zelllinien trugen dazu bei, die regulierenden molekularen Mechanismen der Adipogenese zu verstehen [26, 27]. Die Verwendung dieser definierten Zelllinien umgeht u.a. das Problem der Spenderdiversität. Die Zellen sind gleichartig und können *in vitro* länger passagiert werden [1]. Allerdings sind sie wegen ihres xenogenen Ursprungs

und ihrem aneuploiden Status nicht klinisch anwendbar [2]. Studien mit embryonalen Stammzellen, die auf Grund ihres nahezu uneingeschränkten Proliferationspotentials und ihrer Differenzierbarkeit die ideale Zellquelle für die Regenerative Medizin wären, wurden nur wenige durchgeführt, da ihre Anwendung gesetzlich streng reglementiert wird und ethische Bedenken bestehen [2, 6].

Adulte mesenchymale Stammzellen (MSC) dagegen sind multipotente Zellen, die sich selbst regenerieren können. Darüber hinaus können sie zusätzlich leicht isoliert, expandiert und kultiviert werden und stellen somit eine attraktive Quelle für verschiedenste zellbasierte klinische Anwendungen dar [28]. Bisher konnte eine Differenzierbarkeit u.a. in folgende Zelllinien nachgewiesen werden: Adipozyten, Myoblasten, Osteoblasten und Chondrozyten [29]. MSC können aus der SVF von Fettgewebe, dann *adipose-derived stem cells* (ASC) genannt, oder aus dem Knochenmark (*bone marrow-derived stem cells* - BMSC) isoliert werden. Die Knochenmarkspunktion stellt allerdings eine schmerzhafteste Prozedur für den Patienten dar und es können nur geringe Mengen multipotenter MSC gewonnen werden, weshalb eine aufwendige Expansion *ex vivo* notwendig wird, was wiederum eine verminderte Differenzierbarkeit mit sich bringt [30]. Die zweite und im Fettgewebe-TE häufiger verwendete Zellquelle ist das Fettgewebe selbst. Hieraus können die MSC nach Homogenisierung des Gewebes und enzymatischem Verdau durch Kollagenase sowie mehreren Zentrifugationsschritten aus dem Zellpellet, der SVF, in deutlich größerer Menge gewonnen werden als aus Knochenmarksaspirat [29, 31, 32]. Zum Vergleich: Ein Gramm durch Liposuktion gewonnenes Fettgewebe enthält $3,5 \times 10^5$ bis 1×10^6 ASC und ein Gramm Knochenmarksaspirat lediglich 5×10^2 bis 5×10^4 BMSC [33, 34]. Weitere Vorteile sind, dass das Fettgewebe bei den meisten Menschen in ausreichenden Mengen vorhanden ist, das Gewebe leicht zu gewinnen ist und die Zellen durch ihre Eigenschaft der Plastikadhärenz leicht isolier- und expandierbar sind [31].

1.4 ASC – Multipotente Stammzellen für das Tissue Engineering

Neben den oben genannten Vorzügen zeichnen sich die ASC besonders durch ihr großes Differenzierungspotential aus. Bisher konnte die Differenzierbarkeit zu Zelllinien mesodermalen Ursprungs d.h. zu Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myozyten [29, 32] und Endothelzellen [35, 36] sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter Applikation zelllinienspezifischer Induktoren nachgewiesen werden. Außerdem konnte ein sogenanntes Transdifferenzierungspotential der ASC festgestellt werden. D.h. Zellen mesodermalen Ursprungs lassen sich zumindest *in vitro* auch zu Zellen des Ektoderms wie Neuroblasten [32, 33, 37] oder zu Zellen der endodermalen Linie wie Hepatozyten und β -Pankreasinselnzellen [33, 37] differenzieren. Dieses Transdifferenzierungspotential wird allerdings kontrovers diskutiert.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Adipogenese und insbesondere auf der endothelialen Differenzierung der ASC. Deshalb werden diese beiden Punkte hier näher erläutert.

Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung der MSC zu reifen Adipozyten findet während der Embryonalentwicklung und des gesamten weiteren Lebens eines Organismus statt: Einerseits als Antwort auf den normalen Zellumsatz, andererseits in Zeiten in denen die Nahrungsaufnahme den täglichen Bedarf übersteigt [38]. Die adipogene Differenzierung wird in zwei Phasen unterteilt. Die erste Phase, die sogenannte Determination, beschreibt die Festlegung der Stammzelle auf eine Zelllinie, in diesem Fall die Umwandlung einer pluripotenten Zelle zu einem Präadipozyten. Die zweite Phase wird terminale Differenzierung genannt und umfasst neben den morphologischen Veränderungen der Zellen vom fibroblasten-ähnlichen Präadipozyten zum reifen, runden, mit Lipidvakuolen gefüllten Adipozyten, auch die funktionellen und molekularen Veränderungen der Zellen [4]. Für verschiedenste Faktoren wurde ein Einfluss auf die adipogene Differenzierung nachgewiesen. Insulin bzw. *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), Glukokortikoide und Thyroxin stimulieren die adipogene

Differenzierung [39, 40], wohingegen z.B. die im Serum vorkommenden Faktoren *tumor necrosis factor α* (TNF α) und *epidermal growth factor* (EGF) die Adipogenese inhibieren [41]. *In vitro* wird im Allgemeinen ein Hormoncocktail aus verschiedenen Induktoren zur Induktion der Adipogenese verwendet. Dieser enthält Insulin oder IGF-1, ein Glukokortikoid (z.B. Dexamethason), Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Indomethacin, in unterschiedlicher Zusammensetzung [2, 42]. Diese Faktoren führen zur Aktivierung der Expression Adipogenese-fördernder Gene. Insulin und IGF-1 aktivieren den IGF-Rezeptor, was zur Hochregulation der Transkriptionsfaktoren *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) und *CCAAT-enhancer-binding protein α* (CEBP α) führt [38, 43]. Indomethacin dagegen ist ein direkter PPAR γ -Agonist [44]. Dexamethason induziert die Expression von CEBP δ , wodurch wiederum PPAR γ aktiviert wird [45]. IBMX führt zu einer intrazellulären Konzentrationssteigerung von cyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und dadurch zur Aktivierung eines Proteinkinase-Pathway, wodurch schließlich CEBP β hochreguliert wird [38]. Daraus wird ersichtlich, dass PPAR γ und die CEBP-Familie eine zentrale Rolle in der Regulation der Adipogenese spielen. Der Transkriptionsfaktor PPAR γ wird auch als Masterregulator der Adipogenese bezeichnet, zum einen da seine alleinige Aktivierung zur Induktion der adipogenen Differenzierung führt, und zum anderen weil die meisten proadipogenen Faktoren über die Aktivierung der PPAR γ -Expression wirken und die antiadipogenen Faktoren seine Expression unterdrücken. Außerdem konnte bisher kein Faktor gefunden werden, der in Abwesenheit von PPAR γ die Adipogenese induzieren kann [4]. Weitere Schlüsselfaktoren in der Adipogenese sind die Transkriptionsfaktoren der CEBP-Familie. Während CEBP β und - δ Faktoren der frühen Adipogenese sind, wird CEBP α durch diese beiden Faktoren erst in einer späteren Phase der Differenzierung aktiviert. CEBP α und PPAR γ aktivieren sich zudem gegenseitig und sorgen für den Erhalt des differenzierten Phänotyps der Adipozyten. Weitere proadipogene Transkriptionsfaktoren sind u.a. die *krüppel-like-factors 5* und *15* (KLF) und das *sterol response element binding protein 1 c* (SREBP-1c) [4].

Endotheliale Differenzierung

Aktuelle Vaskularisierungsansätze von TE-Konstrukten basieren unter anderem auf der Verwendung von Endothelzellen oder ihrer Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cell* - EPC) zur Induktion der Ausbildung eines Gefäßnetzwerks in TE-Implantaten. Allerdings ist die Kultur von Endothelzellen mit einigen Nachteilen behaftet, z.B. der geringen Proliferationsrate, der schlechten Verfügbarkeit und der Heterogenität ihres Geno- und Phänotyps [46]. Diese Nachteile führten zum Einsatz der endothelialen Vorläuferzellen. Aber auch diese verlieren nach einer gewissen Expansionszeit ihr Differenzierungspotential und ihre Expansionskapazität ist nicht hoch genug, um eine ausreichende Zellzahl für therapeutische Anwendungen zu erzielen [47-49]. Somit besteht ein großer Bedarf an einfach zu kultivierenden und zu differenzierenden Zellen, die in großer Menge vorhanden sind. Genau diese Vorteile bieten die ASC, deren prinzipielle Fähigkeit zur Differenzierung zu Endothelzellen in der Literatur bereits beschrieben wurde.

Bei der Untersuchung der endothelialen Differenzierung von EPC oder von embryonalen Stammzellen (ESC) zu Endothelzellen wurden verschiedenste Faktoren gefunden, welche die endotheliale Differenzierung beeinflussen und das endotheliale Potential *in vitro* aufrechterhalten können [49]. Besonders die Einwirkung von angiogenen Wachstumsfaktoren, v.a. von VEGF, gilt als Hauptinduktor für die endotheliale Differenzierung. Auch der Kontakt zur EZM fördert die ESC Differenzierung [50]. Die EZM dient den EC als Leitstruktur für die Kapillarbildung sowie zur Stabilisierung und Reifung neu gebildeter Gefäße [51]. Hier konnte v.a. für Kollagen Typ IV ein positiver Einfluss auf die Differenzierung von ESC zu EC nachgewiesen werden, aber auch Gelatine, Fibronectin und Kollagen Typ I erwiesen sich als differenzierungs-fördernde *Coatings* [52]. Ein weiterer Faktor, der die endotheliale Differenzierung anstößt, ist die Applikation von physiologischen Scherkräften. Scherkräfte beeinflussen die endotheliale Morphologie, Proliferation und Differenzierung [53, 54]. Sie bewirken, dass sich Endothelzellen strecken und in Richtung des Blutflusses bzw. des Stroms ausrichten, zudem fördern sie die Zelladhärenz [55, 56] und induzieren die Produktion vasodilatativer Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) [57].

Die oben beschriebenen Induktoren wurden auf die Differenzierung von ASC zu Endothelzellen übertragen. In der Literatur wird die endotheliale Differenzierung von ASC meist durch die Gabe angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF beschrieben [35, 54, 58], allerdings sind die Ergebnisse hierbei zum Teil widersprüchlich [59, 60]. Bei anderen Experimenten wurden die ASC zur Induktion der endothelialen Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen kultiviert [61, 62]. Die Hypoxie spielt *in vivo* eine fundamentale Rolle in der Neovaskularisierung ischämischen Gewebes. Ihre positiven Effekte werden u.a. durch die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen zu Stellen der Vaskulogenese erklärt und durch Sekretionssteigerung proangiogener Faktoren durch umliegende Zellen [61, 63]. Ihr Einfluss auf die endotheliale Differenzierung von ASC ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die Kombination von Hypoxie und den beiden Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF wurde bislang noch nicht näher untersucht.

Kriterien zur Charakterisierung der endothelialen Differenzierung der ASC können u.a. die Expression endothelspezifischer Marker wie z.B. CD31, von Willebrand Faktor (vWF), CD 144 und *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) sowie funktionell der DilacLDL-Uptake und die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen in 3D-Matrices sein [50, 64].

1.5 Vaskularisierungsstrategien von Tissue-Engineering-Konstrukten

Die meisten Gewebe im Körper sind auf ein gut ausgebildetes Blutgefäßsystem angewiesen, um die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen und ihren Funktionen nachzukommen. Da per Diffusion nur Zellen in einem Abstand von 100-200 μm zu einem Blutgefäß erreicht werden können, ist die Versorgung nach der Implantation von TE-Konstrukten oft unzureichend. Damit Gewebe über eine Größe von 100-200 μm (Diffusionsschwelle) hinauswachsen kann, bedarf es der Neubildung von Blutgefäßen [65]. Nach der Implantation eines TE-Konstrukts wachsen die Blutgefäße des Wirts als Reaktion auf die im Konstrukt entstehende Hypoxie und die darauffolgende endogene Sekretion angiogener Faktoren in das Konstrukt ein [66, 67]. Dieses spontane Einwachsen der Zellen ist allerdings auf einige Zehntel Mikrometer pro Tag beschränkt, so dass es bis zur kompletten

Vaskularisierung eines einige Millimeter großen Implantats mehrere Wochen dauern kann [67]. Dieser Prozess dauert in der Regel zu lang, so dass während dieser Zeit Nährstoffmangel und Hypoxie auftreten und es zum Absterben von Zellen kommen kann, v.a. in den tieferen Gewebeschichten. Um ein Langzeitüberleben größerer Konstrukte zu sichern, muss das zu implantierende Gewebe also vaskularisiert werden, d.h. es muss ein kapilläres Netzwerk geschaffen werden, das dazu fähig ist die Zellen *in vivo* mit Nährstoffen zu versorgen [67]. Die Herstellung eines solchen Netzwerks in TE-Konstrukten stellt derzeit die größte Herausforderung im TE dar, weswegen verschiedenste Strategien zur Verbesserung der Vaskularisierung untersucht werden. So kann z.B. das Trägermaterial in seinen biochemischen Eigenschaften so verändert werden, dass es optimale Bedingungen für die Ausbildung eines Gefäßsystems bietet. Alternativ können angiogene Faktoren eingesetzt werden, um die Gefäßbildung anzuregen. Des Weiteren existieren verschiedene Strategien wie die Integration von Gefäßbündeln in die TE-Konstrukte oder die Kokultivierung von Zellen des herzustellenden Gewebes mit Endothelzellen. Diese vier genannten Ansätze sollen hier näher erläutert werden.

Scaffold Design

Die Architektur und das Design eines *scaffolds* haben enorme Auswirkungen auf die Vaskularisierungsrate eines TE-Konstrukts nach der Implantation. So spielt die Porengröße des Trägermaterials nicht nur für die Adipogenese eine wichtige Rolle (s.o.), sondern auch für die Angiogenese. Die Geschwindigkeit des Einwachsens der Wirtgefäße in *scaffolds* mit einer Porengröße größer 250 µm ist signifikant höher als bei *scaffolds* mit geringerer Porengröße [68]. Ebenso wichtig wie die Porengröße ist die Interkonnektivität der Poren, da Zellmigration und somit auch die Vaskularisierung inhibiert werden, wenn die Poren nicht untereinander verbunden sind [69]. Mit dem Ziel der Herstellung von vaskularisiertem Fettgewebe stellte die Arbeitsgruppe um Mao z.B. Hydrogelzylinder aus Poly(ethylenglycol)diacrylat (PEGDA) her, die bFGF absorbiert hatten und zusätzlich von Mikrokanälen durchzogen waren. Durch diese Modifikation des *scaffolds* konnte, nach einer Implantationszeit von zwölf Wochen, eine Vaskularisierung des Konstrukts und die Bildung von

Fettgewebsinseln im Konstrukt nachgewiesen werden, wohingegen diese in Konstrukten ohne Kanäle bzw. ohne bFGF ausblieben [70]. Dieses Experiment ist also ein Beispiel dafür, dass durch Modifikation der *scaffolds* die Angiogenese und folglich das Wachstum des herzustellenden Gewebes verbessert werden kann. Trotz der Verbesserungen, die durch die Modifikation der Trägermaterialbeschaffenheit erzielt werden können, muss bedacht werden, dass die Perfusion des Konstrukts vom Einsprossen der Wirtsgefäße von außen abhängig ist und die oben genannte Modifikation zwar zu einer Verkürzung dieses Prozesses im Vergleich zu nicht modifizierten Trägermaterialien führt, dennoch dauert es mehrere Tage bis das Zentrum des Konstrukts vollständig perfundiert wird [67].

Angiogene Faktoren

Das oben beispielhaft genannte Experiment zeigt gleichzeitig den Einfluss der Applikation angiogener Faktoren auf die Vaskularisierung. Allein die Verwendung bFGF-enthaltender PEGDA-Hydrogele führte zu einer Bildung von zufällig und isoliert liegenden Gefäßstrukturen. Diese Strukturen zeigten mit Erythrozyten gefüllte und mit Endothelzellen ausgekleidete Gefäße [70]. In der Literatur ist beschrieben, dass die Zugabe angiogener Faktoren zu TE-Konstrukten die Vaskularisierung unterstützt [67, 71, 72]. Angiogene Wachstumsfaktoren können genutzt werden, um verschiedene Differenzierungsstufen der Blutgefäßbildung zu stimulieren und um die Vaskularisierung der Implantate zu verbessern. Die Bildung neuer Gefäße kann durch VEGF und bFGF induziert werden, sie stimulieren die Mobilisation und Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen, um so das Einsetzen der Angiogenese zu beschleunigen [67]. Allerdings sind diese neu gebildeten Gefäße oft unorganisiert, undicht und können somit zu Blutungen führen [73]. Die Stabilisierung der neu gebildeten Gefäße geschieht normalerweise durch die Rekrutierung glatter Muskelzellen oder Perizyten mit nachfolgender EZM-Bildung [67]. Wachstumsfaktoren, die diesen Prozess unterstützen sind: *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β* (TGF β) und Angiopoetin 1 (Ang 1) [74, 75]. Da beides, also Bildung und Stabilisierung von Blutgefäßen, für die Bildung eines funktionierenden vaskulären Netzwerks

wichtig ist, empfiehlt sich die Verwendung einer Kombination aus mehreren Wachstumsfaktoren. Die Kombination von VEGF und PDGF zeigte z.B. die Bildung einer großen Zahl an reifen Gefäßen im implantierten *scaffold* [76, 77]. Auch die eingesetzte Dosis der Faktoren muss beachtet werden, weil z.B. die Applikation zu hoher VEGF-Dosen zu Gefäßundichtigkeit und Hypotension führen kann [78]. Ansätze zur Applikation der Wachstumsfaktoren enthalten die Zugabe rekombinanter Proteine zu den Biomaterialien oder die Verwendung von Zelltransplantaten, die genetisch verändert wurden und die spezifischen Proteine überexprimieren. Die Zugabe der Faktoren ist zunächst die einfachste Anwendung, allerdings ist es hier schwierig, die freigesetzte Menge fein genug zu steuern. Eine neuere Methode um eine kontrollierte Freisetzung zu ermöglichen, ist die chemische Kopplung der Wachstumsfaktoren an eine Gelmatrix. Die Endothelzellen der einwachsenden Gefäße sezernieren Matrixmetalloproteasen (MMPs), die fähig sind, diese Matrix abzubauen, so dass die Faktoren lokal, als Antwort auf den zellulären Bedarf, freigesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Neovaskularisierung, die durch diese zellbedarf-gesteuerte Freisetzung der angiogenen Faktoren erreicht wurde, einen höheren Grad an Organisation zeigt als bei unkontrollierten Freisetzungssystemen [79, 80]. Bei diesen Ansätzen ist zu bedenken, dass die Wirtsgefäße dennoch in das Konstrukt einwachsen müssen und dies trotz Wachstumsfaktorenapplikation einige Tage dauert. Außerdem können die applizierten Faktoren einen negativen Einfluss auf das zu vaskularisierende Gewebe haben [67].

Integration von Gefäßbündeln

Eine vollkommen andere Strategie zur Herstellung eines vaskularisierten TE-Konstrukts ist die Integration eines Gefäßbündels in das Konstrukt. Hierzu wird das *in vitro* hergestellte Implantat, meist geschützt in einer Kammer aus Silikon oder Polycarbonat, entweder in ein axial vaskularisiertes Gewebe wie z.B. einen Muskel implantiert, oder es wird eine Arterie in das Konstrukt implantiert, bzw. eine arteriovenöse-Gefäßschleife (*AV-Loop*) um das Implantat gelegt [67, 81]. Das implantierte Gefäß soll für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des zu dieser Zeit noch nicht vaskularisierten Implantats sorgen und es ermöglicht

später die Translokation des Implantats. Die Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerks ausgehend von dem ursprünglich implantierten Gefäß oder im Fall des Muskels vom umgebenden Gewebe, geschieht erst während einer Vaskularisierungsphase von einigen Wochen. Nach dieser Phase wird das nun gut vaskularisierte Konstrukt explantiert und an die Stelle des zu ersetzenden Gewebes implantiert. Durch die direkte mikrochirurgische Anastomosenbildung zwischen der versorgenden Arterie des Konstrukts und einem Gefäß der neuen Implantationsstelle wird eine unmittelbare Perfusion des gesamten Konstrukts gesichert [67]. Im Hinblick auf die Vaskularisierung und das Langzeitüberleben dieser TE-Konstrukte konnten gute Ergebnisse erzielt werden [2]. Nachteil dieser Strategie ist die lange „Prävaskularisierungsphase“, während der das Implantat, ebenso wie bei den oben genannten Ansätzen, auf das spontane Einwachsen der Gefäße ausgehend von den umliegenden Gefäßen angewiesen ist. Ein weiterer Nachteil ist die Notwendigkeit der Durchführung von mindestens drei Operationen – zunächst die Implantation an der initialen Vaskularisierungsstelle und nach der Prävaskularisierung die Explantation mit nachfolgender Implantation an der finalen Implantationsstelle [67, 72].

Kokultur mit Endothelzellen

Eine weitere Vaskularisierungsstrategie ist die Kokultivierung von Zellen des herzustellenden Gewebes mit Endothelzellen. Bei dieser Methode werden Konstrukte mit Endothelzellen besiedelt, um in diesen ein prävaskuläres Netzwerk bereits außerhalb des Körpers zu bilden, welches nach der Implantation die Vaskularisierung des Konstrukts beschleunigt [81]. Die dabei verwendeten Endothelzellen können verschiedenen Ursprungs sein, so werden menschliche Endothelzellen dermalen (*human dermal microvascular EC* – HDMEC) oder umbilikalen (*human umbilical vein EC* – HUVEC) Ursprungs ebenso eingesetzt wie bovine Endothelzellen (*bovine aortic EC* – BAE, *bovine capillary EC* – BCE) [72, 82]. Auch endotheliale Vorläuferzellen (EPC) wurden bereits erfolgreich für TE-Anwendungen eingesetzt [83, 84].

Da Endothelzellen fähig sind, *in vitro* prävaskuläre Strukturen auszubilden [67], können sie entweder als alleinige Zellkomponente auf bzw. in die Trägermaterialien eingebaut werden, um im Konstrukt ein mikrovaskuläres

Netzwerk auszubilden [81], oder sie können *in vitro* gemeinsam mit anderen Zelltypen kultiviert werden, was in der Bildung eines Gewebes bzw. eines Gewebevorläufers mit einem prävasculären Netzwerk resultiert [67, 81]. In verschiedenen Studien, in denen EC mit Zelltypen wie glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Adipozyten und Osteoblasten kokultiviert wurden, konnte ein großer Einfluss der Interaktion der eingesetzten Zellarten untereinander und dadurch eine Verbesserung der Konstruktperfusion durch Kokultivierung festgestellt werden [85-88]. Bei der Kokultivierung ist es allerdings wichtig Kulturbedingungen zu definieren, die sowohl die Organisation eines vaskulären Netzwerks, als auch die Entwicklung des herzustellenden Gewebes ermöglichen. Nach der Implantation der *in vitro* prävascularisierten Implantate kann das präformierte Netzwerk spontan mit den einwachsenden Gefäßen des Wirts anastomosieren. Bei Ansätzen der *in vitro* Präkultivierung müssen die Wirtsgefäße also nicht bis zum Zentrum, sondern nur bis in die äußeren Schichten des Konstrukts einwachsen, um auf das präformierte Netzwerk zu treffen [67]. Dadurch kann die Zeit bis zur vollständigen Vaskularisierung des Konstrukts verkürzt werden. Dennoch ist es kein unmittelbarer Prozess und kann bis zu acht Tagen dauern [89], mit der möglichen Folge einer Ischämie des hergestellten Gewebes.

Andere Vaskularisierungsansätze sind beispielsweise die Verwendung dezellularisierten Gewebes mit einem vorhandenen vaskulären Netzwerk und der Wiederbesiedlung dieser dezellularisierten Matrix mit Zellen des herzustellenden Gewebes und Endothelzellen [90]. Des Weiteren kommen Bioreaktorsysteme zum Einsatz oder Strategien wie das „*modular assembly*“. Dabei wird versucht, durch die Verknüpfung endothelialisierter Kleinstgewebeeinheiten ein großes mit Gefäßen durchzogenes Gewebekonstrukt zu bilden [71].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das vielfältige Differenzierungspotential der ASC macht diese Zellen zu einer häufig verwendeten Zellquelle für das TE. Besonders interessant im Hinblick auf eine Vaskularisierung der TE-Konstrukte ist die Möglichkeit der Differenzierung dieser Zellpopulation zu Endothelzellen. Die ASC könnten somit als Zellquelle für die Regeneration des zu ersetzenden Gewebes dienen, im Falle des Fettgewebes durch Differenzierung zu Adipozyten. Gleichzeitig könnte eine erfolgreiche Differenzierung der ASC zu Endothelzellen, in den durch Tissue Engineering generierten Gewebekonstrukten die Ausbildung eines funktionsfähigen Blutgefäßsystems beschleunigen und so die Integration und das Langzeitüberleben der transplantierten Fettgewebekonstrukte gewährleisten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die endotheliale Differenzierung der ASC unter verschiedenen Bedingungen im Hinblick auf eine Anwendung im TE von Fettgewebe zu untersuchen.

Diese Bedingungen waren zum einen die Applikation der angiogenen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF, zum anderen die Kultivierung der Zellen in Hypoxie. Der Einfluss der beiden Bedingungen (Wachstumsfaktoren und Hypoxie) auf die Differenzierung der ASC zu Endothelzellen wurde jeweils quantitativ untersucht und in weiteren Schritten wurden diese Bedingungen verknüpft und optimiert. Es folgten zudem Untersuchungen zur weitergehenden Charakterisierung der differenzierten ASC. Neben der endothelialen Differenzierung der ASC sollte außerdem überprüft werden, ob unter diesen Gegebenheiten eine adäquate Adipogenese stattfinden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoflow NU-5510 direct heat CO2-Inkubator	Nuaire, Plymouth, USA
CB 150 (E3) CO2-Inkubator mit Sauerstoffregelung	Binder, Tuttlingen
Cytospin® 4 Zytozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mastercycler® Gradient PCR-Gerät	Eppendorf, Hamburg
MRX Microplate Reader Photometer für Mikrotiterplatten	Dynatec Laboratories, Chantilly, USA
NanoDrop 2000c Spektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Olympus IX51 Inversmikroskop XC30 Kamera	Olympus, Hamburg
Olympus BX51TF Mikroskop, DP71 Kamera	Olympus, Hamburg
Rotamax 120 Zentrifuge	Heidolph, Schwabach
Rotina 420 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Sonoplus HD 2070 Ultraschallhomogenisator	Bandelin electronic, Berlin
Sigma Laborzentrifuge 1-14	Sigma, Osterode
TECAN GENios pro plate reader Mikroplattenlesegerät	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermomixer® comfort MTP	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cryo tube vials 1,8 ml Einfriergefäße	NUNC, Wiesbaden
PP-Schraubverschluss Röhrchen 15 ml	Greiner bio one, Frickenhausen
PP-Schraubverschluss Röhrchen 50 ml	Greiner bio one, Frickenhausen
SuperFrost® Plus Adhäsions-Objektträger	R.Langenbrinck, Emmendingen

PCR-Gefäße 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Tip one, low retention tips 10 µl Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Hamburg
Tip one®, graduated tip 1250, 300, 200 µl Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Hamburg
Safe Seal Gefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
UV-Küvette micro	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim
µ-Slide Angiogenesis, ibiTreat Angiogeneseslide	Ibidi, München
µ-Slide 8 well, ibiTreat Gefensteres Deckglas	Ibidi, München
Nunclon Surface 24, 48, 96 well Wellplatten	NUNC, Wiesbaden
Cellstar® 75/175 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	SPL life sciences Co., Korea

2.1.3 Nährmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium with factor 12 (DMEM/Ham's F-12) Proliferationsmedium	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium – 2 (EGM-2-MV) Endotheliales Differenzierungsmedium	Lonza, Walkersville, USA
Preadipocyte Growth Medium-2 (PGM-2) Adipogenes Differenzierungsmedium	Lonza, Walkersville, USA

2.1.4 Medienzusätze, Puffer, Enzyme

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, no Ca ²⁺ , no Mg ²⁺) Pufferlösung	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Fetal Bovine Serum(FBS) Fetales Kälberserum	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Kollagenase NB 4 von Clostridium Histolyticum	Serva Elektrophoresis, Heidelberg

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen Strep)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
---	------------------------------

Trypsin-EDTA (0,25%), phenol red	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
----------------------------------	------------------------------

2.1.5 Wachstumsfaktoren

Recombinant Human FGF basic 146 aa (rhFGF)	R&D Systems, Wiesbaden
---	------------------------

Recombinant human VEGF 165 (rhVEGF)	R&D Systems, Wiesbaden
--	------------------------

2.1.6 Oberflächenmatrices

Attachment factor (AF) Gelatinelösung	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
--	------------------------------

BD Matrigel™, basement membrane matrix growth factor reduced, phenol red free	Becton Dickinson, Heidelberg
---	------------------------------

2.1.7 Induktoren für die Adipogenese

Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
--------------	------------------------

Indomethacin	Sigma-Aldrich, München
--------------	------------------------

Insulin (bovin)	Sanofi-Aventis, Frankfurt
-----------------	---------------------------

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
--------------------------------------	-----------------------------------

2.1.8 Materialien für die Immunhistochemie

Bovine Serum Albumin (BSA), Rinderalbumin	Sigma-Aldrich, München
--	------------------------

ImmunoSelect® Antifading Mounting Medium DAPI Eindeckmedium (Fluoreszenz)	Dianova, Hamburg
---	------------------

DAPI Nucleic Acid Stain Farbstoff DAPI (MW = 457.5)	Invitrogen, Darmstadt
--	-----------------------

Methanol	Sigma-Aldrich, München
----------	------------------------

2.1.9 Antikörper

Dil AcLDL Fluoreszenzmarkiertes LDL	Invitrogen, Darmstadt
FLEX Negative control mouse cocktail IgG Negativkontrollantikörperlösung	Dako, Hamburg
Monoclonal Mouse Anti-Human CD 31 Clone JC70A Primärantikörper	Dako, Hamburg
Monoclonal Mouse Anti-Human vWF Clone F8/86 Primärantikörper	Dako, Hamburg
REAL Antibody diluent Antikörperverdünnung	Dako, Hamburg
Cy3-Donkey anti-mouse IgG Sekundärantikörper	Dianova, Hamburg

2.1.10 Zellen

hMVEC-dB1Ad, Lot 6F4144 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen	Lonza, Walkersville, USA
---	--------------------------

2.1.11 Kits

Serum triglycerid determination kit	Sigma-Aldrich, München
Quantakine® human VEGF Immunoassay	Qiagen, Hilden

2.1.12 Materialien für den DNA-Assay

Bisbenzimid (HOECHST 33258)	Polysciences, Warrington, USA
DNA sodium salt from calf thymus	Sigma-Aldrich, München
Na-EDTA	Merck, Darmstadt
Trizma-Base	Sigma-Aldrich, München
Trizma-HCl	Sigma-Aldrich, München

2.1.13 Materialien für die Quantitative Real-Time PCR

2.1.13.1 Materialien

Trizol® Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Ambion RNaseZAP	Invitrogen, Darmstadt
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega, Madison, USA
Mesa green qPCR mastermix plus	Eurogentec, Seraing, Belgien
MeteorTaq Polymerase	Eurogentec, Köln

2.1.13.2 Primer

QuantiTect® Primer Assays for SYBR Green-based real-time RT-PCR	Qiagen, Hilden
β-Actin	
Hs_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay	
C/EBP α	
Hs_CEBPA_1_SG QuantiTect Primer Assay	
FABP 4	
Hs_FABP4_1_SG QuantiTect Primer Assay	
GAPDH	
Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay	
GLUT 4	
Hs_SLC2A4_1_SG QuantiTect Primer Assay	
PPARγ	
Hs_PPARG_1_SG QuantiTect Primer Assay	

2.1.14 Software

Olympus cellSens™ Dimension	Olympus, Hamburg
Microscope Imaging software	Olympus, Hamburg
Microsoft Office®	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism® 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 hASC-Isolation aus humanem Fettgewebe

Die bei dieser Arbeit verwendeten Zellen stammen aus Abdominalfett von drei weiblichen Spenderinnen mit einem *Body-Mass-Index* (BMI) zwischen 26 und 28 kg/m², im Alter von 22, 31 und 41 Jahren. Die Zellen wurden im Rahmen von elektiv durchgeführten Fettabsaugungen oder Abdominoplastiken nach schriftlicher Zustimmung der Patientinnen in der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie (Chirurgische Klinik II) der Universität Würzburg gewonnen. Ein entsprechendes positives Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg lag vor (193/11). Zur Isolation der humanen Stammzellen aus Fettgewebe (*adipose derived stem cells*, ASC) wurde nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll gearbeitet.

Das bei der Fettabsaugung gewonnene Material wurde drei Stunden bei 37°C auf einem Plattformschüttler mit 100 rpm dem enzymatischen Verdau durch 0,1% Kollagenase in Kollagenase-Puffer (0.1 M HEPES, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂ und 5 mM Glucose, pH 7.4) zugeführt. Hierbei wurde 1 ml Kollagenaselösung pro 1 g Fett eingesetzt. Anschließend wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von Basalmedium (DMEM/Ham's F 12 ergänzt um 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung) neutralisiert und eine Zentrifugation bei 311 × g für 10 Minuten durchgeführt. Die obere, gelbliche Fettschicht wurde entfernt und abhängig vom Probenvolumen eine kleine Menge an PBS zugegeben. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde die obere Fettschicht erneut abgesaugt und die gesamte Zellsuspension durch ein 100 µm Nylonnetz filtriert, um Zelltrümmer und Restgewebekomponenten zu entfernen. Schließlich wurde ein dritter Zentrifugationsschritt bei 700 x g für 10 Minuten durchgeführt und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet, die Stromal Vaskuläre Fraktion, wurde in Basalmedium dissoziiert und die Zellen entweder direkt der Expansion unterzogen oder in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurde das Medium um 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) ergänzt und die Röhrchen zunächst über Nacht bei -80° C in Isopropanol gelagert, bevor sie in den Stickstofftank gebracht wurden.

2.2.1.2 Expansion und Splitten der Zellen

Zur Expansion wurden die Zellen in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² in T75 oder T175 Zellkulturflaschen in DMEM/Ham's F-12-Medium ausgesät. Den Zellen wurde ermöglicht über Nacht am Boden der Zellkulturflaschen zu adhären. Sie wurden dann mit PBS gewaschen, um Erythrozyten und weitere nicht haftende Zellen zu entfernen. Anschließend wurde frisches Basalmedium hinzugegeben. Die ASC wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für einen Teil der Versuche wurde zusätzlich der Sauerstoffgehalt auf 3% O₂ reduziert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht und die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% passagiert. Hierzu wurde das Medium komplett entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch fünfminütige Einwirkung von 0,25%-igem Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Nährmedium gestoppt. Um ein Zellpellet zu erhalten, wurden die Zellen bei 311 × g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Es folgte die Resuspension im entsprechenden Basal- oder Differenzierungsmedium. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die darin enthaltenen Zellen mit Hilfe des Mikroskops gezählt. So konnte dann die Gesamtzellzahl errechnet werden und die ASC entsprechend ihrer Menge wieder in Zellkulturflaschen oder in *wells* aufgeteilt werden. Für die Experimente wurden die Zellen vor Gebrauch drei- bis viermal passagiert.

2.2.1.3 Differenzierung der Zellen

Um den Einfluss der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF sowohl im Hinblick auf die endotheliale als auch auf die adipogene Differenzierung der ASC zu untersuchen, wurden die Nährmedien in ihrer Zusammensetzung verändert.

2.2.1.3.1 Endotheliale Differenzierung

Die Zellen für die endotheliale Differenzierung wurden nach der Expansionsphase mit einer Dichte von 10.000 Zellen/well in so genannten *chamber slides* ausgesät. Die *chamber slides* wurden zuvor mit jeweils 200 µl/well „Attachment Factor“, einer Gelatinelösung, versehen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Platten, wie oben beschrieben, besiedelt. Zur Beschreibung des zeitlichen Versuchsverlaufs wurde der Tag des Versuchsstarts als Tag 0 bezeichnet. Als Medium wurde das EGM™-2MV (*endothelial cell growth medium*) verwendet. Das zugehörige EGM™-2MV BulletKit™ besteht aus einem Grundmedium und einem SingleQuot™Kit; dieses beinhaltet einzelne Wachstumsfaktoren und Medienzusätze als Aliquote. Darin enthalten sind FBS, Hydrocortison, bFGF, VEGF, IGF-1, Ascorbinsäure, EGF und Gentamicin (GA-1000). Um den Einfluss von bFGF und VEGF auf die Differenzierung zu untersuchen, wurden diese beiden Wachstumsfaktoren jeweils in ihrer Konzentration variiert.

Das für die Aussaat der Zellen bei den Versuchen verwendete Medium bestand aus dem Grundmedium und den genannten Zusätzen, allerdings ohne bFGF und VEGF. Im Folgenden wird dieses Medium „EGM“ genannt. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Den Zellen wurde beim nächsten Mediumwechsel, also ab Tag 2 und bei jedem weiteren Mediumwechsel je nach Gruppe die verschiedenen Mengen der beiden Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF hinzugefügt. Die Darstellung der verschiedenen Medienzusammensetzungen zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1 – Mediengruppenamen und -zusammensetzungen der endothelialen Differenzierung

Mediengruppenname	EGM	EGM-Kombi-low	EGM-bFGF	EGM-VEGF	EGM-Kombi-high
bFGF-Konz. in ng/ml	0 ng bFGF	5 ng bFGF	10 ng bFGF	0 ng bFGF	10 ng bFGF
VEGF-Konz. in ng/ml	0 ng VEGF	2 ng VEGF	0 ng VEGF	50 ng VEGF	50 ng VEGF

Die Versuchslaufzeit variierte zwischen neun und sechzehn Tagen. Den zeitlichen Verlauf der Versuche skizziert Tabelle 2.

Tabelle 2 – Tabellarische Darstellung des zeitlichen Versuchsverlaufs der endothelialen Differenzierung

Expansionsphase	Differenzierungsphase					
Grundmedium P0-3/4	Grundmedium Aussaat Tag 0	Differenzierungsmedium Tag 2-16/23				
DMEM/Ham's F-12	EGM	EGM	EGM-Kombi- low	EGM-bFGF	EGM-VEGF	EGM-Kombi- high

2.2.1.3.2 Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden die ASC, suspendiert in PGM-2 (*preadipocyte growth medium*) ergänzt mit 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung, mit einer Dichte von 30.000 Zellen/*well* in 48-Wellplatten ausgesät. Zur Induktion der adipogenen Differenzierung der Zellen wurde einem Teil der Zellen zwei Tage nach der Aussaat Induktionsmedium bestehend aus Kulturmedium (PGM-2 wie oben ergänzt) mit 1,7 μ M Insulin, 1 μ M Dexamethason, 200 μ M Indomethacin und 500 μ M IBMX zugeführt. Da auch die Auswirkungen der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF auf die adipogene Differenzierung untersucht werden sollten, wurden dem adipogenen Medium ebenso ab Tag 2 verschiedene Konzentrationen der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF zugesetzt. Folglich gab es auch hier, durch die Variation der Konzentrationen der beiden Faktoren, unterschiedliche Mediengruppen. Siehe dazu Tabelle 3.

Tabelle 3 – Mediengruppennamen und -zusammensetzungen der adipogenen Differenzierung

Mediengruppenname	PGM-2	PGM-2-bFGF	PGM-2-VEGF	PGM-2-Kombi-high
bFGF-Konz. in ng/ml	0 ng bFGF	10 ng bFGF	0 ng bFGF	10 ng bFGF
VEGF-Konz. in ng/ml	0 ng VEGF	0 ng VEGF	50 ng VEGF	50 ng VEGF

Den zeitlichen Versuchsverlauf für die adipogene Differenzierung stellt Tabelle 4 dar.

Tabelle 4 – Tabellarische Darstellung des zeitlichen Versuchsverlaufs der adipogenen Differenzierung

Expansionsphase	Differenzierungsphase				
Grundmedium P0-P3/4	Grundmedium Aussaat Tag 0	Differenzierungsmedium Tag 2-9/16			
DMEM/Ham's F-12	PGM-2	PGM-2	PGM-2-bFGF	PGM-2-VEGF	PGM-2-Kombi-high

Die Zellen wurden unter den entsprechenden Differenzierungsbedingungen bis zum Ende der Versuche kultiviert. Die Versuchslaufzeit betrug 16 bis 23 Tage und das Medium wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht.

2.2.1.4.Variation der Sauerstoffkonzentration

Zusätzlich zur Variation der Nährmedienzusammensetzung wurden die Sauerstoffkonzentrationen, denen die ASC ausgesetzt waren, variiert. Zur Untersuchung der Auswirkungen der Reduktion der Sauerstoffkonzentration auf die Differenzierung und Proliferation der Zellen wurden die ASC in Gruppen unterteilt, welche verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt wurden. Hierzu wurden die Zellen nach dem Auftauen entweder bei einem Sauerstoffgehalt von 21% (Normoxiebedingungen) im normalen CO₂-Inkubator expandiert oder in einem Inkubator mit Sauerstoffregulation, bei einem Sauerstoffgehalt von 3% kultiviert (Hypoxiebedingungen). Insgesamt ergaben sich drei Gruppen durch die Variation der Sauerstoffkonzentration. Der erste Teil der ASC verblieb während der gesamten Versuchslaufzeit, d.h. in der Proliferations- und Differenzierungsphase, in der Normoxie, im Folgenden „Gruppe NN“ genannt. Der zweite Teil wurde einer „hypoxischen Präkonditionierung“ unterzogen, indem die Zellen in der Zeit zwischen der dritten und vierten Passage, etwa 5 Tage, unter Hypoxiebedingungen kultiviert wurden und in der Differenzierungsphase wieder 21% Sauerstoff zu Verfügung hatten – „Gruppe HN“. Der dritte Teil verblieb sowohl in der Expansions- als auch während der Differenzierungsphase in der Hypoxie – „Gruppe HH“. Zur Verdeutlichung der Einteilung der drei Gruppen siehe auch Tabelle 5.

Tabelle 5 – Tabellarische Darstellung der Variation der Sauerstoffkonzentration im zeitlichen Verlauf

Gruppe	Proliferation		Differenzierung
	Passage 1-3	Passage 4	
HH	H	H	H
HN	N	H	N
NN	N	N	N

Nachdem der Einfluss der Wachstumsfaktoren sowie der Hypoxie einzeln untersucht wurde, sollten außerdem die Auswirkungen der Kombination dieser beiden Bedingungen analysiert werden.

Dazu wurden den zwei Sauerstoffbedingungen (Hypoxie und Normoxie) jeweils die fünf verschiedenen Medienzusammensetzungen zugeordnet. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Kulturbedingungen im Verlauf der Proliferation und Differenzierung der Zellen. Diese Anzahl an Variationen gab es sowohl in der Versuchsreihe der endothelialen (Tbl. 6), als auch in der der adipogenen Differenzierung (hier mit PGM-2 statt EGM-2-MV, ausgenommen Gruppe Kombi-low).

Tabelle 6 – Tabellarische Übersicht der Kulturbedingungen der endothelialen Differenzierung

Gruppe	Proliferation		Differenzierung					
	Passage 1-3	Passage 4		Wachstumsfaktoren				
HH	H	H	H	EGM	EGM-Kombi-low	EGM-VEGF	EGM-bFGF	EGM-Kombi-high
NN	N	N	N	EGM	EGM-Kombi-low	EGM-VEGF	EGM-bFGF	EGM-Kombi-high

2.2.2 Auswertungsmethoden

2.2.2.1 CD31- und vWF-Immunfluoreszenzfärbung

Nach Ablauf der Kulturzeit wurden die endothelial differenzierten Zellen im *chamber slide* 20 Minuten mit Methanol fixiert, luftgetrocknet, rehydriert und mit 1% BSA in PBS geblockt. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen für 24 Stunden bei Raumtemperatur entweder mit dem Maus-Antihuman-CD31-Antikörper (Verdünnung 1:100) oder mit dem Maus-Antihuman-vWF-Antikörper (Verdünnung 1:50) inkubiert. Darauf folgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS. Der für die Zellvisualisierung verwendete Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper, Esel-Antimaus IgG (Verdünnung 1:400), inkubierte, ebenfalls bei Raumtemperatur, eine Stunde unter Lichtabschluss. Anschließend wurde die Waschprozedur wiederholt. Die Gegenfärbung wurde in den *chamber slides* mit „DAPI Nucleic Acid Stain“ und auf den Objektträgern mit „ImmunoSelect® Antifading Mounting Medium DAPI“ durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Färbungen dienten gekaufte Endothelzellen (*human microvascular endothelial cells* - hMVEC-dB1Ad, Lot 6F4144), als Negativkontrolle nicht-induzierte Zellen, welche in Proliferationsmedium kultiviert wurden. Zum Ausschluss unspezifischer Färbung wurde „FLEX Negative control mouse cocktail IgG“ verwendet. Die qualitative Analyse der

Zellen erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Olympus IX50) in Kombination mit einer angeschlossenen Kamera und der „CellSens Dimension Software“ von Olympus. Zur Quantifizierung der CD31-positiven Zellen wurden vier *chamber slide-wells* je Gruppe (n= 4) jeweils zweimal ausgezählt.

2.2.2.2 DilacLDL-Uptake

Nach Ende der Kulturzeit wurde das alte Medium vollständig abgesaugt, frisches Medium, welches 10 µg/ml des mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil markierten acetylierten *low density* Lipoprotein (Dil AcLDL) beinhaltete, auf die Zellen gegeben und anschließend für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser vier Stunden wurde der Zellrasen mindestens viermal mit je 250 µl frischem Medium gewaschen. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie, so dass die Zellen, welche die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil markierten Lipoproteine internalisiert hatten, eine rote Fluoreszenz zeigten. Zu beachten ist bei diesem Assay, dass zwischen dem Trypsinieren der Zellen und der Inkubation mit dem Farbstoff mindestens 36 Stunden liegen sollten, da die Bindung der *low density* Lipoproteine an den Scavenger-Rezeptor auf das Vorhandensein von Ca²⁺ und Mg²⁺ angewiesen ist und durch EDTA inhibiert wird.

2.2.2.3 Matrigel-Assay

Zur Analyse der *tube formation* der endothelial stimulierten ASC wurden Zellen auf Matrigel™ („Matrigel™ Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, Phenol Red free“) ausgesät. Hierzu wurde die *thin gel method* gewählt; dabei wird das *well* eines Angiogeneseslides lediglich mit einer dünnen Schicht Matrigel (50 µl/cm²) bedeckt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um das Gelieren zu induzieren. Anschließend wurden die im Medium gelösten Zellen auf das beschichtete *well* gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten hinsichtlich der Zellmorphologie und CD31-Expression mit Hilfe des Mikroskops und nach Färbung auch mittels Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.2.4 DNA-Assay

Am Ende eines Versuchs wurde das Medium abgesaugt, die *wells* mit je 250 µl PBS gewaschen und sämtliche Flüssigkeit entfernt. Danach wurde 250 µl Pufferlösung (P-Saline-Puffer - 2 mM EDTA, 2M NaCl, 50 mM Na₃PO₄, pH 7,4) auf den Zellrasen gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in ein beschriftetes Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zerstörung des Zellkerns durch den Ultraschallhomogenisator und die Proben wurden bis zur Auswertung bei -80 °C gelagert. Aufgetaut wurde die Suspension für 15 Minuten im Ultraschallbad, dann wurden jeweils 10 µl der Proben auf eine schwarze 96-Wellplatte pipettiert und mit 200 µl der Hoechst 33258-Farblösung (0.1 µg/ml in 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4) versehen. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers. Durch Einsatz einer DNA-Standardlösung konnte der DNA-Gehalt ermittelt werden. Alle Messungen wurden an je drei biologischen Replikaten und in Zweifachbestimmung durchgeführt.

2.2.2.5 Nachweis der adipogenen Differenzierung

2.2.2.5.1 Triglyceridassay zur Bestimmung des intrazellulären Triglyceridgehalts

Zur Vorbereitung der adipogen differenzierten Zellen wurden diese nach Entfernung des restlichen Mediums mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde je 250 µl/*well* 0,5%ige Thesitlösung auf die Zellen gegeben, um diese darin zu lösen und anschließend in Eppendorfgefäße zu überführen. Nach der Homogenisierung mittels Ultraschall wurden die Proben bei -80°C eingefroren oder direkt vermessen. Die Bestimmung des Triglyceridgehalts erfolgte durch quantitative, enzymatische Messung, mit Hilfe des "Serum Triglycerid Determination Kit", nach Herstellerangaben. Zur Kalibrierung wurde eine mitgelieferte Glycerolstandardlösung verwendet. Die Messung erfolgte mit dem „ELISA-Reader“ bei einer Wellenlänge von 540 nm. Der ermittelte

Triglyceridgehalt wurde anschließend als μg Triglyceridgehalt pro μg DNA angegeben.

2.2.2.5.2 Oil Red O-Färbung

Zur Anfärbung der intrazellulären Fetttröpfchen und somit zur besseren Visualisierung der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen nach Ende der Kulturzeit zunächst mit PBS gewaschen, eine halbe Stunde mit 10%igem Formalin fixiert, erneut gewaschen und schließlich mit der „Oil Red O“-Lösung (ORO, 3 mg/ml Lösung in 60% Isopropanol) eine Stunde lang inkubiert. Nach mehrfachem Waschen konnten die *wells* mit PBS aufgefüllt werden und Bilder der nun rot gefärbten Lipidtropfen mit Hilfe des Mikroskops und der angeschlossenen Kamera aufgenommen werden.

2.2.2.6 VEGF-ELISA

Die VEGF-Konzentrationen im Zellkulturmedium wurden mit Hilfe eines „Sandwich Quantikine® Human VEGF Immunoassay“ gemessen. Die Zellkulturüberstände wurden jeweils über einen Zeitraum von 48 Stunden (Tag 0-2/3-5/7-9) gesammelt und bis zur Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Durchführung des ELISA verlief nach Herstellerangaben.

2.2.2.7 Quantitative Real-Time PCR

Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie für die Isolation der RNA mit „Trizol Reagenz®“ versetzt, geerntet und nach Anweisungen des Herstellers weiterverarbeitet. Im Anschluss daran wurde die isolierte RNA für 10 Minuten bei 56°C inkubiert und mit Hilfe eines Spektrometers (NanoDrop2000) erfolgte anschließend die RNA-Konzentrationsbestimmung. Die Einzelstrang cDNA wurde dann unter Verwendung des „ImPromII™ Reverse Transkription Systems“ synthetisiert. Für die qt-RT-PCR wurde der „MESA GREEN qPCR Master Mix Plus“ mit „MeteorTaq Polymerase“ verwendet. Die Zyklusbedingungen am „MJ Research Opticon 2 PCR Cycler“ wurden wie folgt festgelegt: 95°C für 15 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für je 15

Sekunden, 55°C für 30 Sekunden und 70°C für 30 Sekunden. Die Amplifikation wurde mit spezifischen Primern für PPAR γ (QT00029841), C/EPB α (QT00203357), GLUT 4 (*glucose transporter type 4* - QT00097902) und FABP 4 (*fatty acid binding protein 4* - QT00055517) von Qiagen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode. Alle ct-Werte wurden gegen das *housekeeping*-Gen β -Actin (QT00095431) normalisiert und die Expressionslevel der zu testenden Proben in Relation zu Proben von in Normoxie kultivierten Zellen von Tag 2 (Beginn der Induktion) gesetzt.

2.2.3 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Daten wurden mittels Varianzanalysen (one-way bzw. two-way ANOVA) gefolgt von Bonferroni's post-test auf ihre statistische Signifikanz untersucht. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die endotheliale Differenzierung von ASC unter Gabe angiogener Wachstumsfaktoren sowie hypoxischer Behandlung der Zellen verglichen. Im Hinblick auf eine Anwendung im Tissue Engineering von Fettgewebe wurde gleichzeitig untersucht, ob unter diesen Bedingungen eine Differenzierung der ASC zu Adipozyten möglich ist.

3.1 Nachweis der endothelialen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe (ASC)

Die Expression des Oberflächenmarkers CD31 (PECAM-1) ist neben dem Nachweis von CD34, CD144 (VE-Cadherin), des von Willebrand Faktors (vWF), der eNOS - Expression und anderen Markern ein Merkmal der endothelialen Differenzierung [35, 54, 58]. Funktionelle Nachweismethoden stellen beispielsweise die *tube formation* auf Matrigel und die Aufnahme von acetyliertem *low density* Lipoprotein dar [54, 58]. Die CD31-Immunfluoreszenzfärbung stellt in dieser Arbeit eine wichtige Nachweismethode für die endotheliale Differenzierung der ASC dar.

Ausschluss der Selektion CD31-positiver Zellen

Zum Ausschluss der Selektion bzw. Proliferation von bereits im Zellpool enthaltenen CD31-positiven Zellen wurden bei jedem Splitten der Zellen Proben entnommen und *cytopins* mit jeweils 5000 Zellen pro Objektträger angefertigt. Diese wurden im Anschluss einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 unterzogen und dann mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops auf CD31-positive Zellen untersucht. Abb. 2 zeigt exemplarische Bilder der Färbungen dieser *cytopins*. Als Positivkontrolle für alle hier beschriebenen Färbungen wurden *human microvascular endothelial cells* (hMVEC) verwendet. In Abb. 2 a, sieht man, dass in der Positivkontrolle alle Zellen rot fluoreszieren. Der Zellkern ist durch die DAPI-Gegenfärbung blau gefärbt. In den Passagen 0, 1 und 2 der untersuchten Zellen (ASC in Expansionsmedium DMEM/Ham's F-12) fanden sich noch vereinzelte CD31-positive Zellen wie in Abb. 2 b, c, und d, erkennbar. In höheren Passagen konnten diese nicht mehr nachgewiesen werden. Wie

Abb. 2 e, zeigt, fanden sich hier keine rot fluoreszierenden Strukturen mehr. Für die Versuche wurden daher Zellen in der 3. und 4. Passage verwendet, so dass eine Selektion vorhandener Endothelzellen ausgeschlossen werden konnte.

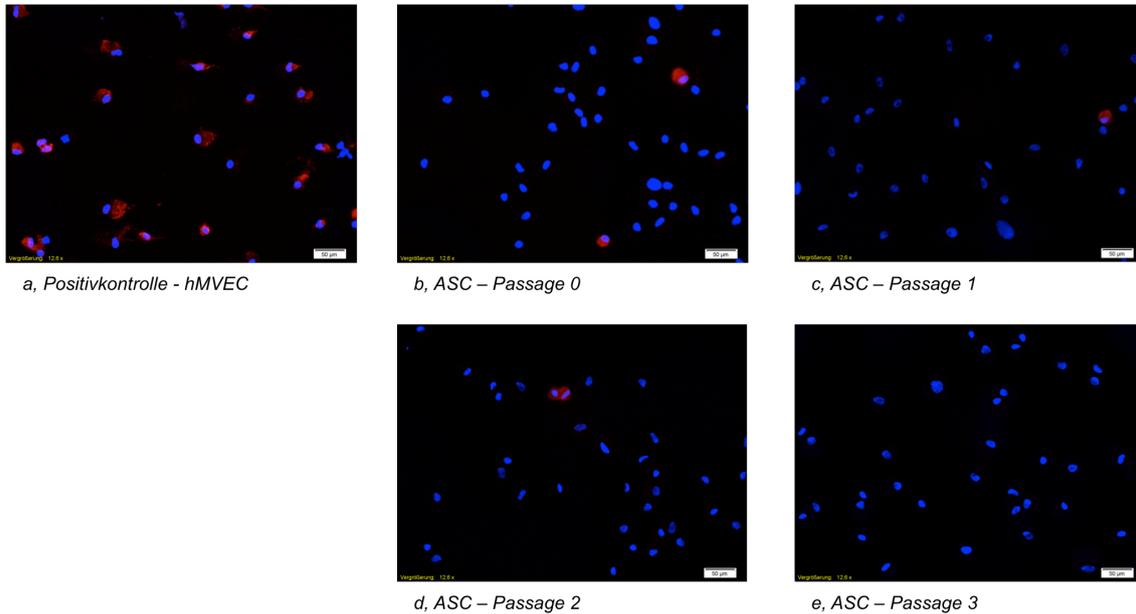
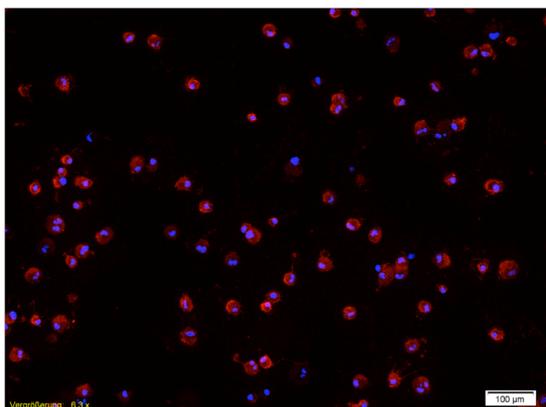


Abb. 2 a,-e, - Exemplarische Bilder der Cytospin-CD31-Immunfluoreszenzfärbung zum Ausschluss der Selektion CD31-positiver Zellen - Passagen 0-3 von in DMEM/Ham's F-12 kultivierten ASC gegenüber der Positivkontrolle (a, hMVEC); Größenbalken entspricht 50 μm .

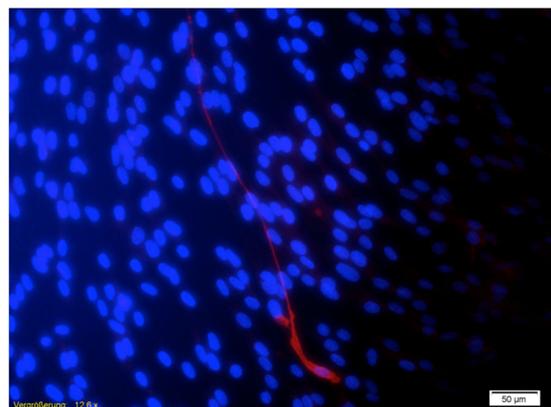
3.1.1 Nachweis der endothelialen Differenzierung von ASC unter Einfluss der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF

Die Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF besitzen eine starke proliferationsfördernde bzw. angiogene Wirkung. Um ihren Einfluss auf die endotheliale Differenzierung der Zellen zu untersuchen, wurden diese Wachstumsfaktoren in unterschiedlicher Konzentration und Kombination den verwendeten Medien zugesetzt (siehe Tab. 1, Seite 27). Die Festlegung der verwendeten Konzentrationen von bFGF und VEGF erfolgte nach Literaturrecherche. Hier zeigten sich die besten Ergebnisse im Hinblick auf eine endotheliale Differenzierung mit 10 ng bFGF und 50 ng VEGF pro ml Nährmedium [58, 91]. Nach Ablauf der Kulturzeit (in der Regel neun Tage) wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 unterzogen. In allen Untersuchungsgruppen konnten vereinzelt rot gefärbte, längliche Zellstrukturen nachgewiesen werden. In den *slides* der Zellen, welche mit der höheren bFGF-Konzentration bzw. der Kombination der beiden

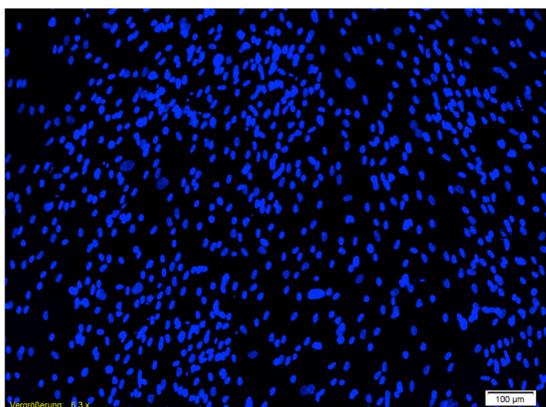
Wachstumsfaktoren (Gruppen: EGM-bFGF, EGM-Kombi-low, EGM-Kombi-high) versorgt wurden, konnte allerdings eine tendenziell höhere Anzahl CD31-positiver Zellen beobachtet werden als in den Gruppen mit alleiniger VEGF-Zugabe (EGM-VEGF-Medium) oder ohne bFGF und VEGF (EGM). Dies bestätigte sich auch bei mehrfacher Wiederholung der Versuche. In Abbildung 3 sieht man exemplarische Bilder von in Normoxie und unter Wachstumsfaktoreinfluss kultivierten Zellen. Die Bilder a, und b, stellen die Positiv- und Negativkontrolle für die Färbung gegen CD31 dar. Die Bilder c, und d, zeigen die Färbeergebnisse der beiden Gruppen mit der Kombination der Wachstumsfaktoren. Man sieht vereinzelt vorkommende, längliche, rot gefärbte Zellkörper mit einem, durch die DAPI-Gegenfärbung, blau gefärbten Zellkern. Umgeben werden sie von CD31-negativen Zellen, von denen man nur den Zellkern erkennen kann.



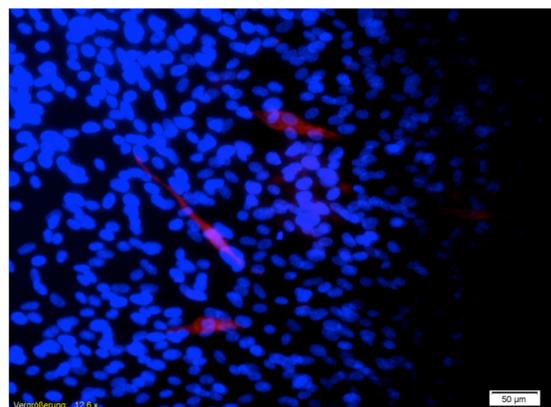
a, Positivkontrolle - hMVEC



c, ASC (EGM-Kombi-low)



b, Negativkontrolle – ASC (DMEM/Ham's F-12)



d, ASC (EGM-Kombi-high)

Abb. 3 - Endotheliale Differenzierung von ASC unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren; exemplarische Bilder der CD31-Immunfluoreszenzfärbung; Tag 9; a, Als Positivkontrolle wurden hMVEC verwendet; b, Als Negativkontrolle wurden in DMEM/Ham's F-12 kultivierte ASC verwendet; c, und d, zeigen exemplarische Bilder der in EGM-Kombi-low (c.) bzw. -high-Medium (d.) kultivierten ASC mit CD 31-positiven, rot gefärbten Zellen.

Zur Quantifizierung des Auftretens endothelial differenzierter Zellen in den einzelnen Versuchsgruppen wurden je vier *chamber slide-wells* pro Gruppe jeweils zweimal systematisch durchgemustert und die CD31-positiven Zellen quantitativ durch Zählen erfasst. Wie in Abbildung 4 dargestellt, konnte eine endotheliale Differenzierung in allen Gruppen nachgewiesen und das oben beschriebene Ergebnis quantitativ festgehalten werden.

Während die Zugabe von VEGF alleine (Gruppe NN-EGM-VEGF - 50 ng/ml) keine relevante Zunahme der Anzahl CD31-positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktoren (Gruppe NN-EGM) bewirkte, zeigte die alleinige Zugabe von bFGF (Gruppe NN-EGM-bFGF - 10 ng/ml) zum Medium bereits eine Steigerung der Menge CD31-positiver Zellen. Offensichtlich hat bFGF also eine stärkere Wirkung auf die endotheliale Differenzierung der ASC als VEGF. Die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren in niedriger sowie in hoher Konzentration führte allerdings zu einer nochmaligen Zunahme differenzierter Zellen, mit jeweils signifikantem Unterschied zur Kontrollgruppe. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass eine endotheliale Differenzierung von ASC allein durch Zugabe von bFGF und VEGF möglich ist, wenn auch nur in geringem Maße. Die besten Ergebnisse erzielte eine Kombination der beiden Faktoren.

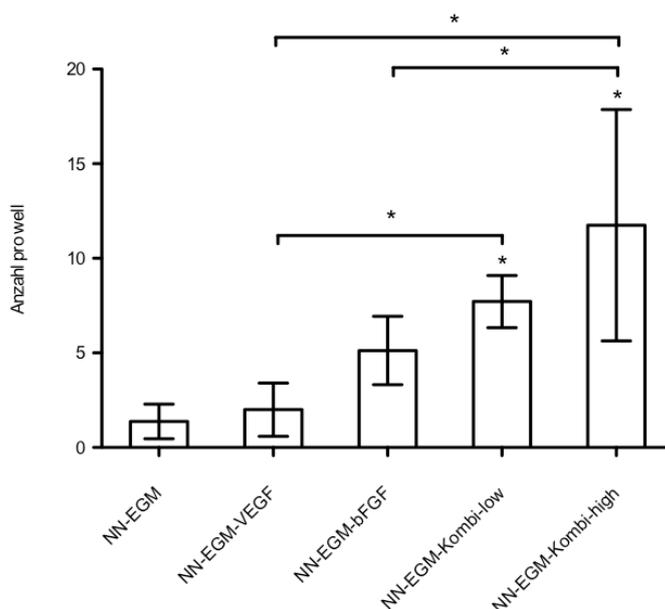


Abb. 4 - Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die endotheliale Differenzierung der ASC - Quantifizierung CD31-positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe NN-EGM bzw. zwischen den Gruppen wurden mit * markiert, Signifikanzniveau: $p < 0,05$. Detaillierte Darstellung der Gruppen siehe Tabelle 1, S. 27.

3.1.2 Einfluss der Hypoxie auf die Differenzierung endothelial stimulierter ASC

Es ist vielfach beschrieben, dass die Hypoxie in Zellen zu einer Steigerung der endogenen Sekretion angiogener Wachstumsfaktoren führt [20]. Deshalb wurde untersucht, ob eine zusätzliche Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂) die endotheliale Differenzierung der ASC verstärkt. Dazu wurden die ASC in Medium ohne und mit bFGF und VEGF (Gruppen EGM und EGM-Kombi-low) in Hypoxie (3% O₂ - HH) und Normoxie (21% O₂ - NN) kultiviert. Als dritte Sauerstoffbedingung wurden die ASC einer „hypoxischen Präkonditionierung“ (HN) unterzogen (s. auch Tabelle 5, S. 29).

In Abb. 5 ist erkennbar, dass schon die alleinige Wirkung der Hypoxie zu einer endothelialen Differenzierung führte (siehe Gruppe HH-EGM). Die Anzahl nachgewiesener CD31-positiver Zellen entsprach in etwa der Anzahl in der Gruppe mit kombiniert zugesetzten Wachstumsfaktoren in Normoxie (Gruppe NN-EGM-Kombi-low vgl. auch Abb. 4). Die Kombination von Hypoxie und VEGF-/bFGF-Zugabe zeigte allerdings noch einen weitaus stärkeren Einfluss auf die Differenzierung zu Endothelzellen als beide Bedingungen alleine. ASC, die in Hypoxie mit Zusatz der beiden Wachstumsfaktoren kultiviert wurden (HH-EGM-Kombi-low), zeigten einen deutlich größeren Anteil endothelial differenzierter Zellen als ASC, welche ohne Wachstumsfaktoren oder in Normoxie kultiviert wurden. Die hypoxische Präkonditionierung (HN) erbrachte dagegen keine Verbesserung und die Ergebnisse glichen fast denen der Normoxiegruppe (NN). Auf Grund dessen wurde diese Gruppe im weiteren Verlauf nicht mehr mitgeführt.

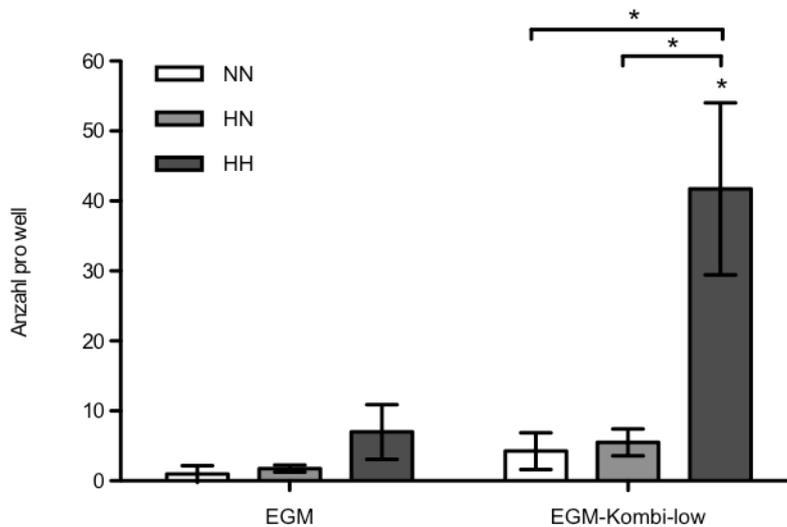


Abb. 5 - Einfluss der Hypoxie auf die endotheliale Differenzierung - Quantifizierung CD31-positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe NN-EGM bzw. zwischen den Gruppen wurden mit * markiert, Signifikanzniveau: $p < 0,05$. Detaillierte Darstellung der Gruppen siehe Tabelle 1, S. 27.

3.1.3 Endotheliale Differenzierung von ASC unter Einfluss der Kombination von Wachstumsfaktoren und Hypoxie

Es konnte gezeigt werden, dass für die endotheliale Differenzierung der ASC die Kultivierung in Hypoxie bereits in Verknüpfung mit der Zugabe der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF in niedriger Konzentration einen starken Einfluss besitzt (s. Abb. 5). Deshalb wurde auch unter hypoxischen Bedingungen die Konzentration der beiden Wachstumsfaktoren, analog zur Kultivierung unter normoxischen Bedingungen, variiert. Hierzu wurden die Zellen unter Zugabe der oben genannten Konzentrationen von bFGF und VEGF (s. Tabelle 1, S. 27) bei hypoxischen Bedingungen kultiviert. Alle hier beschriebenen Ergebnisse konnten bei mehrfacher Wiederholung der Versuche reproduziert werden. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 6 dargestellt.

Bemerkenswert war, dass der Einsatz der höheren Konzentrationen von bFGF und VEGF (siehe Gruppe HH-EGM-Kombi-high - 10 ng bFGF, 50 ng VEGF) in Hypoxie, im Vergleich zur Gruppe mit den geringeren Konzentrationen beider Faktoren (Gruppe HH-EGM-Kombi-low - 5 ng bFGF und 2 ng VEGF), zu einer nochmaligen signifikanten Steigerung der Anzahl von endothelial differenzierten

Zellen führte (s. Abb. 6), wohingegen die Konzentrationssteigerung unter normoxischen Bedingungen keinen so deutlichen Unterschied lieferte (s. Abb. 4). Abbildung 6 stellt zudem den Einfluss der einzelnen Wachstumsfaktoren auf die endotheliale Differenzierung dar. VEGF und bFGF zeigten beide positive Auswirkungen auf die Differenzierung, wobei die Zugabe von bFGF im Vergleich zur VEGF-Zugabe, wie bereits in Normoxie (s. Abb 4), auch in Hypoxie (s. Abb. 6), eine höhere Zahl an differenzierten Zellen erzielte, hier mit signifikantem Unterschied. Allerdings differenzierten selbst unter den hier herausgearbeiteten „besten“ Bedingungen insgesamt nur 0,5 - 1,1% der eingesetzten ASC endothelial.

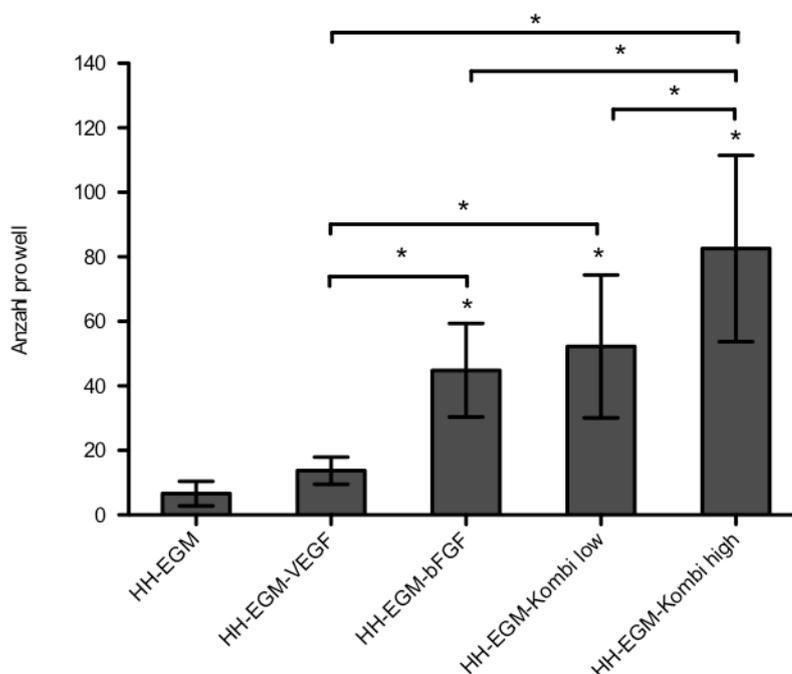


Abb. 6 - Einfluss der Kombination von Hypoxie und Wachstumsfaktoren auf die endotheliale Differenzierung - Quantifizierung CD31-positiver Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe HH-EGM sowie zwischen den Gruppen wurden mit * markiert, Signifikanzniveau: $p < 0,05$. Detaillierte Darstellung der Gruppen siehe Tabelle 1, S. 27.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass eine endotheliale Differenzierung von ASC nicht nur durch Zugabe angiogener Wachstumsfaktoren wie bFGF und VEGF induziert werden kann, sondern auch durch Kultivierung der Zellen allein unter hypoxischen Bedingungen. Die größte Rate CD31-positiver Zellen zeigte sich bei Verknüpfung dieser beiden Bedingungen, also wenn die Zellen unter hypoxischen Bedingungen und mit

den hohen Konzentrationen von bFGF und VEGF kultiviert wurden. Erwähnenswert ist der überadditive Effekt dieser Verknüpfung mit einem weitaus höheren Anteil endothelial differenzierter ASC verglichen mit den Einzelbedingungen bzw. der Normoxiegruppe. Des Weiteren kann festgehalten werden, dass bFGF, vor allem unter hypoxischen Bedingungen, einen weitaus größeren Einfluss auf die Differenzierung der ASC zu Endothelzellen zu besitzen scheint als VEGF.

3.1.4 Weitergehende Charakterisierung der endothelial differenzierten Zellen

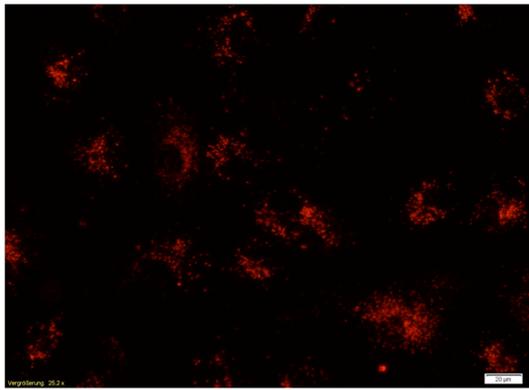
Nachdem eine endotheliale Differenzierung der ASC unter den beschriebenen Bedingungen mit Hilfe der CD31-Immunfluoreszenzfärbung mehrfach nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Experimente zur exemplarischen Charakterisierung der Zellen durchgeführt.

3.1.4.1 DilacLDL-Uptake

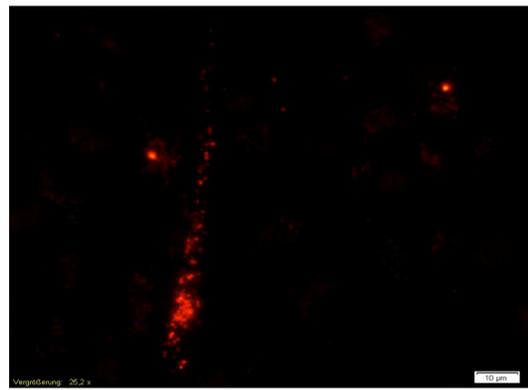
Ein weiteres Merkmal von Endothelzellen ist die rasche Aufnahme von acetyliertem *low density* Lipoprotein (acLDL). Um diese Eigenschaft darstellen zu können sind die acetylierten *low density* Lipoproteine mit dem Fluorophor Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine) markiert. Dil ist ein hoch lipophiles Molekül, das nichtkovalent in Lipoproteine inkorporiert werden kann und somit keine Auswirkungen auf deren Oberflächenladung besitzt. Die mit Dil markierten acetylierten Lipoproteine werden bei Makrophagen und Endothelzellen über Scavenger-Rezeptoren an der Zelloberfläche aufgenommen. So können diese Zellen die acetylierten Lipoproteine bis zu fünfzehnmal schneller aufnehmen, als dies anderen Zellen über den LDL-Rezeptor möglich ist. Diese Eigenschaft wird zur Selektion bzw. zum Nachweis von Endothelzellen genutzt. In der Zelle wird das acetylierte Lipoprotein durch lysosomale Enzyme verdaut und das Dil akkumuliert in den lysosomalen Membranen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann somit das internalisierte Dil nachgewiesen werden. Typischerweise sieht man bei den Zellen, welche das DilacLDL aufgenommen haben, eine punktchenartige, perinukleäre Verteilung

des rot fluoreszierenden Farbstoffs. Die schnelle Aufnahme von DilacLDL kann also als weitere Nachweismethode für die endotheliale Differenzierung der ASC herangezogen werden [92].

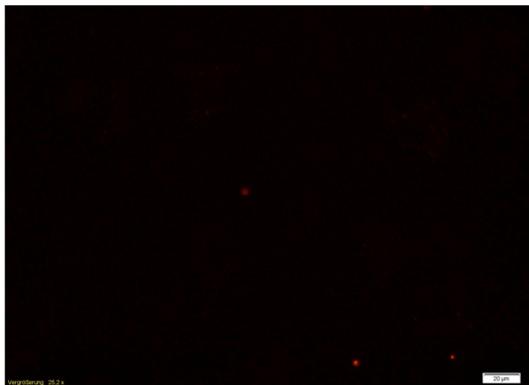
Die Zellen wurden bis zur Auswertung neun Tage kultiviert. Da hier der Nachweis erbracht werden sollte, dass die endothelial differenzierten Zellen DilacLDL aufnehmen, wurden für diesen Versuch nur die Gruppen mit der Kombination der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF in geringer (EGM-Kombi-low - 5 ng/ml bFGF; 2 ng/ml VEGF) und hoher (EGM-Kombi-high -10 ng/ml bFGF; 50 ng/ml VEGF) Konzentration untersucht, jeweils in Hypoxie und Normoxie. Es wurden also jene Gruppen ausgewählt, die in den vorherigen Versuchen die besten Ergebnisse hinsichtlich einer endothelialen Differenzierung zeigten. Abbildung 7 stellt die Ergebnisse dieser Untersuchung dar. Als Positivkontrolle dienten hMVEC; diese besitzen eine rundliche Zellform und zeigen um den Zellkern angeordnete rot fluoreszierende Pünktchen (Abb. 7 a,). Die Negativkontrolle stellten in Expansionsmedium kultivierte ASC dar. Hier fanden sich keine rot fluoreszierenden Zellen (Abb. 7 b,). Die Inkorporation des DilacLDL durch die ASC konnte in allen mit EGM-Medium kultivierten Gruppen nachgewiesen werden. Wie auch bei der CD31-Immunfluoreszenzfärbung ließen sich längliche Zellkörper nachweisen, welche durch die um den Zellkern verteilten, rot fluoreszierenden Pünktchen sichtbar wurden und sich deutlich vom dunklen Hintergrund abheben (Abb. 7 c, und d,). Bei den unter Hypoxie kultivierten Zellen konnte auch bei diesem Experiment eine höhere Rate an DilacLDL-aufnehmenden Zellen festgestellt werden als bei den Gruppen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Insgesamt war die Anzahl an differenzierten Zellen allerdings geringer als bei der CD31-Immunfluoreszenzfärbung. Außerdem kamen die Zellen einzeln zu liegen, so dass die hier gezeigten Bilder dies nicht repräsentieren.



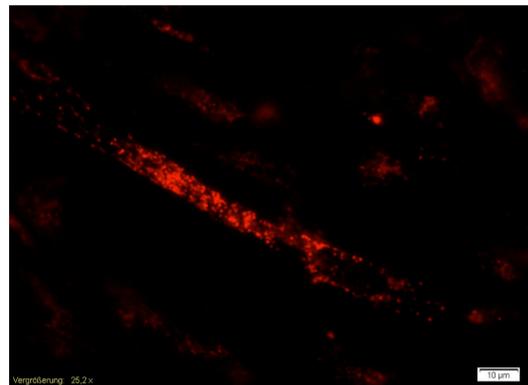
a, Positivkontrolle - hMVEC



c, ASC (HH-EGM-Kombi-low)



b, Negativkontrolle – ASC (DMEM/Ham's F-12)



d, ASC (HH-EGM-Kombi-high)

Abb. 7 a,-d, - DilacLDL-Uptake der endothelial differenzierten ASC - a, Als Positivkontrolle wurden hMVEC verwendet; b, Als Negativkontrolle wurden in DMEM/Ham's F-12 kultivierte ASC verwendet; c, und d, zeigen exemplarische Bilder der untersuchten ASC, hier kultiviert in EGM-Kombi-low- (c,) und -high-Medium (d,) jeweils unter hypoxischen Bedingungen, mit rot fluoreszierendem Zellkörper durch das internalisierte, fluoreszenzfarbstoffmarkierte LDL.

3.1.4.2 Matrigel-Assay

Matrigel™ („Matrigel™ Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, Phenol Red Free“) ist eine löslich gemachte Basalmembranpräparation, die aus dem *engelbreth-holm-swarm* (EHS)-Maussarkom extrahiert wird. Dies ist ein Tumor, welcher reich an Extrazellulärmatrixproteinen ist. Die Hauptbestandteile von Matrigel sind Laminin, Kollagen IV, Proteoglykane und Entactin. Des Weiteren sind noch geringe Mengen an Wachstumsfaktoren wie TGFβ, EGF, IGF, bFGF, *tissue plasminogen activator* (t-PA) und anderen Wachstumsfaktoren, die natürlicherweise im EHS-Tumor vorkommen, enthalten. Das Matrigel dient als typisches Substrat zur Anheftung und Differenzierung von Endothelzellen [93]. Typisch für diese ist, dass sie auf Matrigel sogenannte *tubes* bzw. gefäßähnliche Strukturen mit einem Lumen ausbilden. Dies gilt als funktioneller Nachweis der endothelialen Differenzierung [54, 94, 95].

Die ASC wurden für diese Versuche auf die mit Matrigel beschichteten Angiogeneseslides ausgesät und unter verschiedenen Bedingungen, hinsichtlich der Wachstumsfaktorenkonzentration, kultiviert. Als Positivkontrolle für die hier geschilderten Experimente wurden hMVEC, als Negativkontrolle in DMEM/Ham's F-12 kultivierte ASC verwendet. Zum einen wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen im zeitlichen Verlauf beobachtet und jeweils nach 4, 24 und 96 Stunden photographisch festgehalten. Zum anderen wurden die Zellen im *slide* am neunten Tag nach der Aussaat einer CD31-Immunfluoreszenzfärbung unterzogen.

Die Aufnahmen der Abb. 8 a,-d, zeigen im zeitlichen Verlauf die morphologischen Veränderungen der auf Matrigel ausgesäten Zellen. Zum Vergleich sind hier ASC den hMVEC gegenübergestellt. Beide Zellarten wurden in Normoxie in EGM-Medium mit oben genannter Variation der Wachstumsfaktorenzusammensetzung kultiviert (siehe Tabelle 1, Seite 27). Hier beispielhaft gezeigte Bilder der Gruppe NN-EGM-Kombi-low nach 4 und 24 Stunden. Im zeitlichen Verlauf fanden sich deutliche Unterschiede in der Morphologie beider Zellarten. Die hMVEC bildeten primäre Netzwerke aus (Abb. Nr. 8 c, und d,), während die ASC sternförmige Strukturen bildeten, die sich erst im Verlauf mit Hilfe ihrer Ausläufer miteinander verbanden. Abb. 8 e,-h, zeigt exemplarische Bilder der unter den verschiedenen Bedingungen kultivierten ACS nach 96 Stunden. Feststellbar ist, dass es keine Unterschiede in der Morphologie sowie der Länge und Dicke der Ausläufer der unterschiedlich kultivierten ASC gibt. Auch Zellen unter Kontrollbedingungen (ASC in DMEM/Ham's F-12), also Zellen, die keiner endothelialen Induktion unterlagen, bildeten diese Ausläufer bzw. sternförmige Strukturen. Daraus lässt sich schließen, dass die ASC auch ohne endotheliale Induktion fähig sind, auf Matrigel sternförmige Strukturen zu bilden. Diese unterscheiden sich jedoch morphologisch deutlich von den *tube*-förmigen Netzwerken der hMVEC.

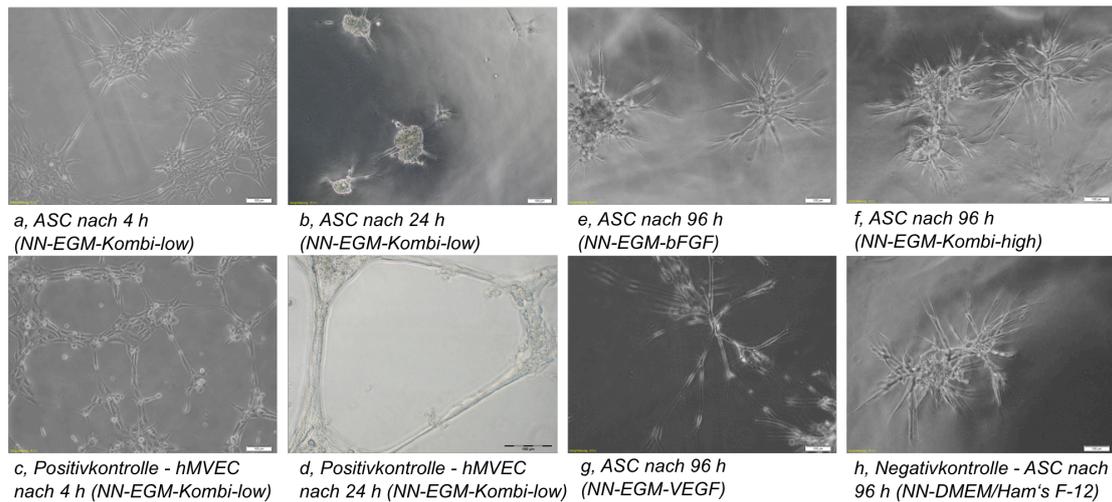
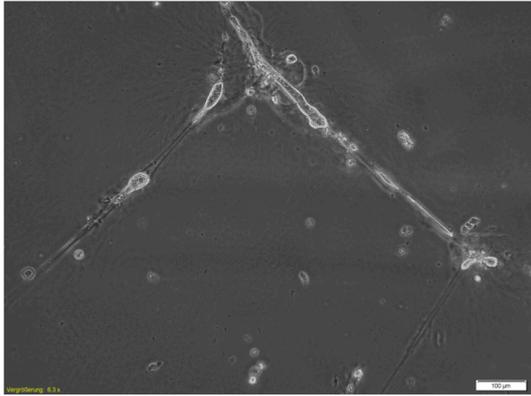
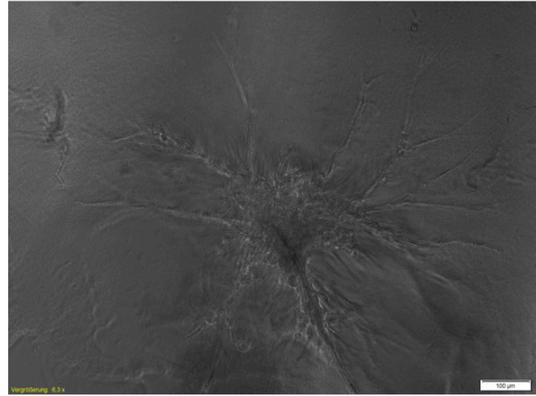


Abb. 8 a,-h, – Morphologische Veränderungen der ASC auf Matrigel im zeitlichen Verlauf; Abb. a., c., e., f., g, und h, zeigen exemplarische Bilder der morphologischen Veränderungen der unter normoxischen Bedingungen in EGM-Medium mit Wachstumsfaktoren kultivierten und auf Matrigel ausgesäten ASC im Vergleich zu MVEC als Positivkontrolle (hMVEC – Abb. b., d.); Größenbalken entspricht 100 μm .

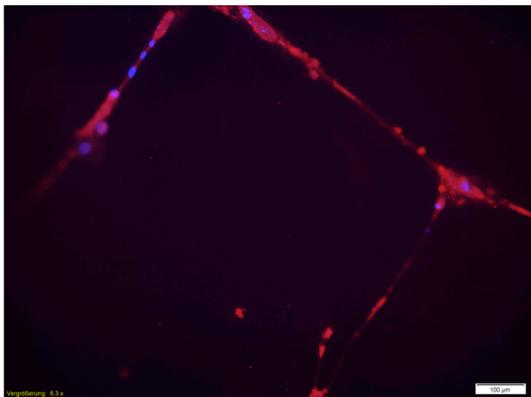
Um den endothelialen Charakter der Zellen und ihrer Ausläufer zu überprüfen, wurde eine CD31-Immunfluoreszenzfärbung der auf Matrigel kultivierten Zellen durchgeführt. Die Aufnahmen in Abb. 9 a,-b, zeigen die Nativ- sowie die Fluoreszenzmikroskopaufnahme der hMVEC. Zu sehen ist eine gefäßartige Struktur, welche sich mit CD31 komplett anfärben lässt und somit in rot zur Darstellung kommt. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Gegenfärbung blau dargestellt. Dagegen zeigen die Bilder in Abb. 9 c,-d, ASC der Gruppe NN-EGM-bFGF. Die Bilder dieser Gruppe stehen exemplarisch für Zellen der anderen Mediengruppen, deren Ergebnisse mit den im Folgenden beschriebenen übereinstimmen. Die Immunfluoreszenzfärbung gegen CD31 fiel in allen Gruppen stets negativ aus. Die ASC zeigten zudem morphologische Unterschiede im Vergleich zu den hMVEC. Offensichtlich wandern die Zellen vom Zentrum in die Peripherie. Dabei bilden sich vielfach Verzweigungen. Interessant zu sehen ist, dass die sternförmigen Strukturen keine Zellausläufer im eigentlichen Sinn sind, sondern Zellen, die offenbar entlang der EZM in die Peripherie wandern. Dies ist deutlich durch die, in den Strukturen zu sehenden, blau gefärbten Zellkernen zu erkennen (Abb. 9 d.).



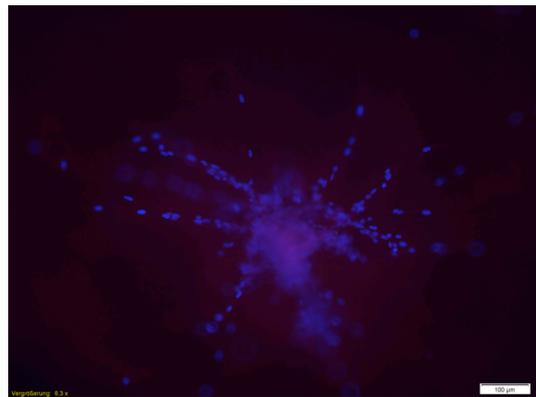
a, Positivkontrolle – hMVEC (NN-EGM-Kombi-low) - nativ



c, ASC (NN-EGM-bFGF) - nativ



b, Positivkontrolle - hMVEC (NN-EGM-Kombi-low)
- CD31-Färbung



d, ASC (NN-EGM-bFGF) - CD31-Färbung

Abb. 9 – Charakterisierung der Strukturen von auf Matrigel kultivierten ASC im Vergleich zu hMVEC ; Tag 9

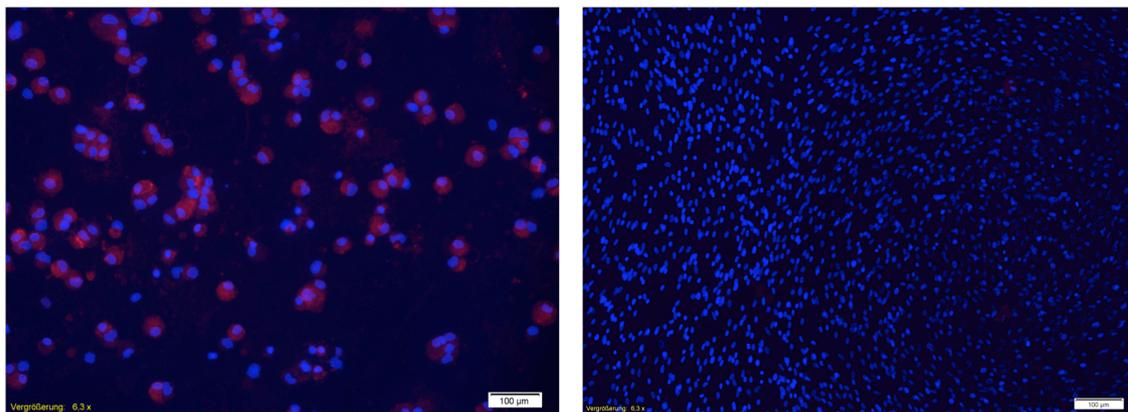
Die Aufnahmen a, (nativ) und b, (CD31-Immunfluoreszenzfärbung) zeigen die Bilder der Positivkontrolle (hMVEC); c, (nativ) und d, (CD31-Immunfluoreszenzfärbung) die Ergebnisse der Färbung von in EGM-bFGF-Medium kultivierten ASC, beispielhaft für alle untersuchten Gruppen.

3.1.4.3 Nachweis des von Willebrand Faktor

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein großes multimeres Glykoprotein, welches in Endothelzellen, Megakaryozyten und im subendothelialen Bindegewebe vorkommt [96]. Neben der Expression von CD31 oder dem VEGF-Rezeptor - *fetal liver kinase 1* (FLK-1), VE-Cadherin und anderen Endothelzellmarkern ist auch der vWF ein Marker, der zur Identifikation von Endothelzellen herangezogen werden kann.

Deshalb wurde als weitere Nachweismethode für die endotheliale Differenzierung der ASC eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den vWF durchgeführt. Wie auch bei den Versuchen für die CD31-Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in *chamber slides* ausgesät und darin kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde unter hypoxischen, der andere unter

normoxischen Bedingungen kultiviert. Die verwendeten Medien waren jeweils das EGM-, das EGM-Kombi-low- und das EGM-Kombi-high-Medium. Als Positivkontrolle dienten erneut hMVEC und als Negativkontrolle die in DMEM/Ham's F-12 kultivierten ASC. An Tag 9 wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Abb. a, (Positivkontrolle) zeigt hMVEC mit, um den blau gefärbten Zellkern verteilten, rot fluoreszierenden kleinen Granula. Die endothelial stimulierten ASC zeigten dagegen keine rote Fluoreszenz. Auch bei zweimaliger Wiederholung des Versuchs und der Färbung fanden sich in keiner der untersuchten Gruppen vWF-positive Zellen. Abb. 10 b, zeigt exemplarisch eine Fluoreszenzmikroskopaufnahme der Gruppe HH-EGM-Kombi-high. Somit müssen die unter diesen Versuchsbedingungen kultivierten ASC als vWF-negativ bezeichnet werden.



a, Positivkontrolle - hMVEC

b, ASC (HH-EGM-Kombi-high)

Abb. 10 – Nachweis des von Willebrand Faktors mittels Immunfluoreszenzfärbung; Tag 9

a, zeigt das Bild der Positivkontrolle - hMVEC mit deutlichem Nachweis des vWF; b, exemplarisches Bild der untersuchten ASC, ohne Nachweis vWF-positiver Zellen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass jeweils ein Teil der unter den oben beschriebenen Bedingungen kultivierten ASC den Oberflächenmarker CD31 exprimierten, mit Dil markierte acetylierte Lipoproteine internalisierten und auf Matrigel sternförmige Strukturen ausbildeten, wobei diese Strukturen auch von der Kontrollgruppe (in DMEM/Ham's F-12 kultivierte ASC) gebildet wurden und CD31-negativ waren. Der vWF konnte in den endothelial stimulierten ASC nicht nachgewiesen werden.

3.2 Betrachtung der VEGF-Sekretion von endothelial stimulierten ASC unter Einfluss von Hypoxie

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung von ASC in hypoxischer Umgebung oder die exogene Zugabe von Wachstumsfaktoren zu einer Steigerung der endothelialen Differenzierung führt. Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung einer endogenen VEGF-Expression der Zellen an der endothelialen Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen zu generieren, wurde die VEGF-Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines „Sandwich Quantikine® Human VEGF Immunoassay“ quantifiziert. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von 10^4 Zellen pro cm^2 in Wellplatten gesät und bei 3% Sauerstoff mit VEGF- und bFGF-freiem Medium (EGM) versorgt. Als Vergleichsgruppe wurden in Normoxie kultivierte ASC verwendet. Die Medien wurden jeweils über einen Zeitraum von 48 Stunden gesammelt, an Tag 2, 5 und 9 entnommen und bis zur Auswertung bei -20°C aufbewahrt. Die VEGF-Konzentrationen wurden auf den DNA-Gehalt der jeweiligen Probe zum Zeitpunkt der Ernte normalisiert und in $\text{pg VEGF}/\mu\text{g DNA}$ bzw. als VEGF-Menge pro *well* angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen. Das hier dargestellte Ergebnis konnte zweimal bestätigt werden.

Abb. 11 zeigt die Ergebnisse des VEGF-ELISA. Abb. 11 a, stellt die VEGF-Menge in Korrelation zum DNA-Gehalt dar ($\text{pg VEGF}/\mu\text{g DNA}$). An Tag 2 konnte bereits in beiden Gruppen eine endogene Sekretion von VEGF nachgewiesen werden. Ab Tag 5 ließ sich ein deutlicher Unterschied der VEGF-Konzentration im Kulturüberstand von in Hypoxie kultivierten ASC im Vergleich zu den in Normoxie kultivierten ASC feststellen. Diese signifikante Differenz ließ sich auch an Tag 9 nachweisen. Abb. 11 b, zeigt wiederum die durch die Zellen endogen produzierte Menge VEGF pro *well* (pro $500 \mu\text{g}$). Hier sah man im zeitlichen Verlauf einen kontinuierlichen Anstieg der VEGF-Konzentration in beiden Gruppen. Jedoch produzierten die in Hypoxie kultivierten Zellen signifikant mehr VEGF als die unter normoxischen Bedingungen kultivierten Zellen. Folglich bewirkt die Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen einen deutlich messbaren Anstieg der endogenen VEGF-Sekretion der ASC.

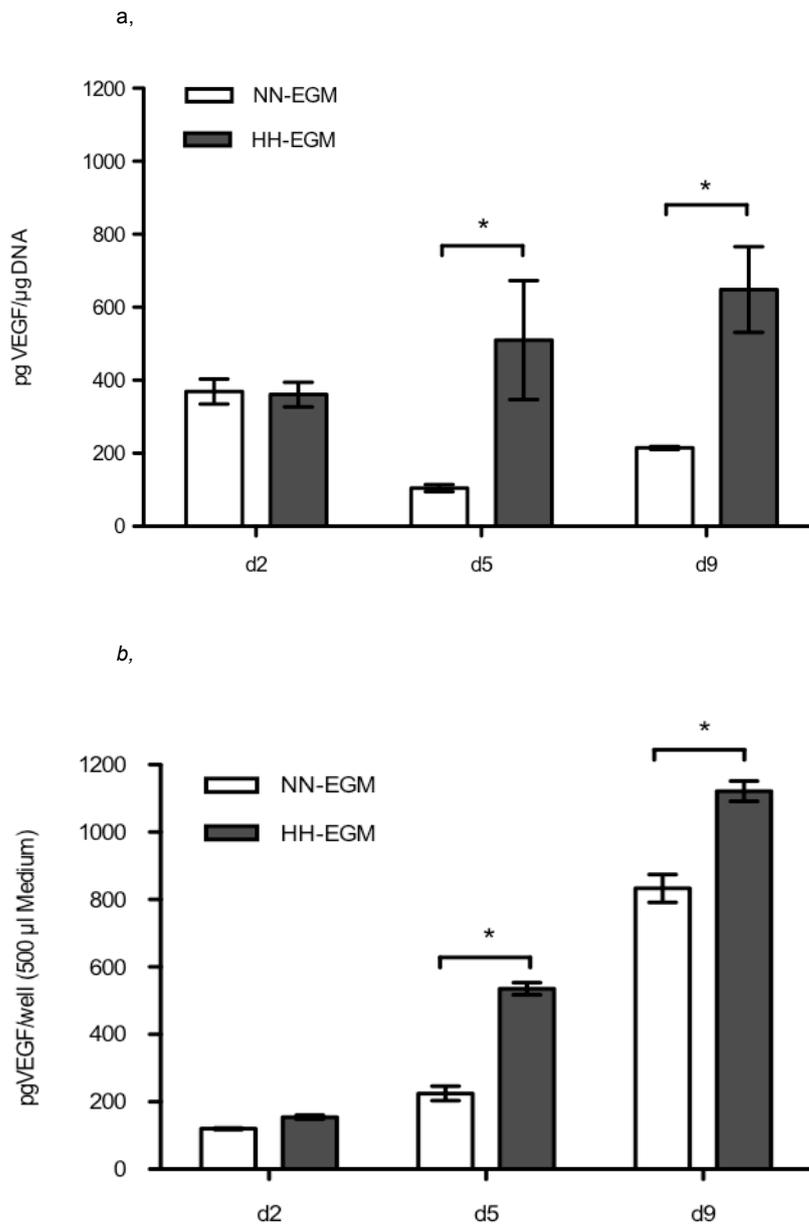


Abb. 11 a, und b, - Bestimmung der Konzentration von VEGF im Kulturüberstand endothelial stimulierter ASC mittels ELISA – Vergleich der endogenen VEGF-Sekretion von in Hypoxie im Vergleich zu in Normoxie kultivierten und mit EGM-Medium (VEGFfrei) versorgten ASC, Angabe in pg VEGF/µg DNA (a,) sowie in pg VEGF/well (500 µl Medium, b,), Sammelzeitraum 48 h, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit * markiert, Signifikanzniveau: $p < 0,05$.

3.3 Betrachtung der Proliferation endothelial stimulierter ASC

Neben der Untersuchung des Differenzierungspotentials wurde auch die Proliferation der endothelial stimulierten ASC unter hypoxischen Bedingungen sowie unter Einfluss der Wachstumsfaktoren mittels DNA-Assay untersucht. Dazu wurden die Zellen nach 2, 5 und 9 Tagen geerntet. Die Messungen wurden an drei biologischen Proben jeweils in Zweifachbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte dargestellt. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Ergebnisse der verschiedenen Experimente jeweils im zeitlichen Verlauf.

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Hypoxie auf das Wachstum der ASC wurden die Zellen in Normoxie (NN), Hypoxie (HH) oder „hypoxischer Präkonditionierung“ (HN) kultiviert und entweder mit bFGF- und VEGF-freiem Medium (EGM), oder mit einem Medium, welches die beiden Faktoren in niedriger Konzentration enthielt (EGM-Kombi-low-Medium – 5 ng bFGF und 2 ng VEGF/ml Medium), versorgt. Wie Abb. 12 a, und b, darstellen, zeigten alle Gruppen im zeitlichen Verlauf einen kontinuierlichen Zuwachs des DNA-Gehalts pro *well*. Auffällig ist der große Unterschied zwischen den in Normoxie und den in Hypoxie kultivierten Zellen. Die Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, zeigten deutliche Proliferationseinbußen gegenüber Zellen, denen 21% Sauerstoff zur Verfügung stand. Aber auch Zellen, welche nur ca. fünf Tage während der Expansionsphase einer Reduktion der Sauerstoffkonzentration ausgesetzt waren, zeigten Proliferationseinbußen (vgl. Gruppe HN). Diese reduzierte Proliferation entsprach interessanterweise annähernd der Proliferationsrate der ASC, welche in der gesamten Expansions- und Differenzierungsphase in Hypoxie kultivierten wurden.

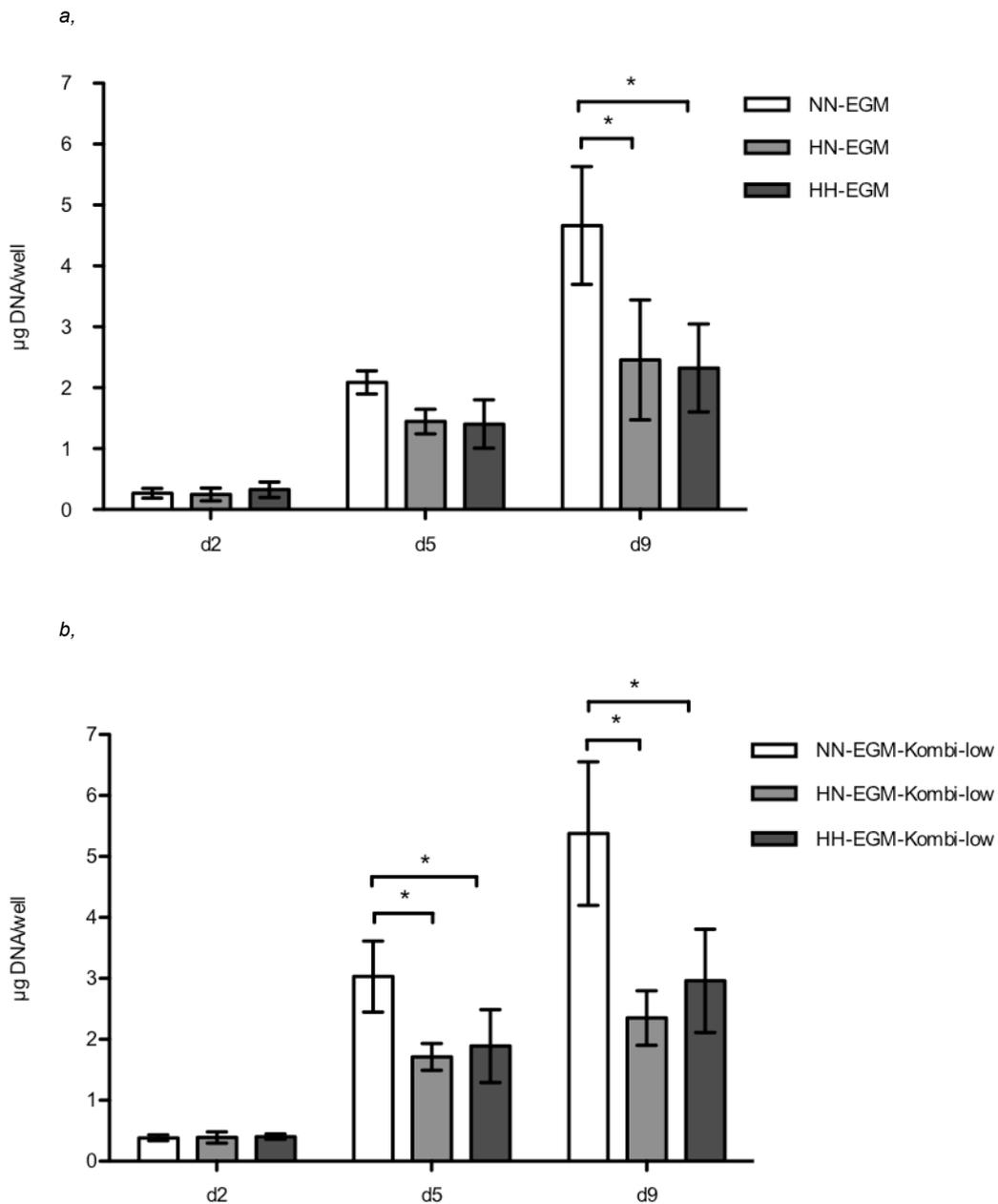
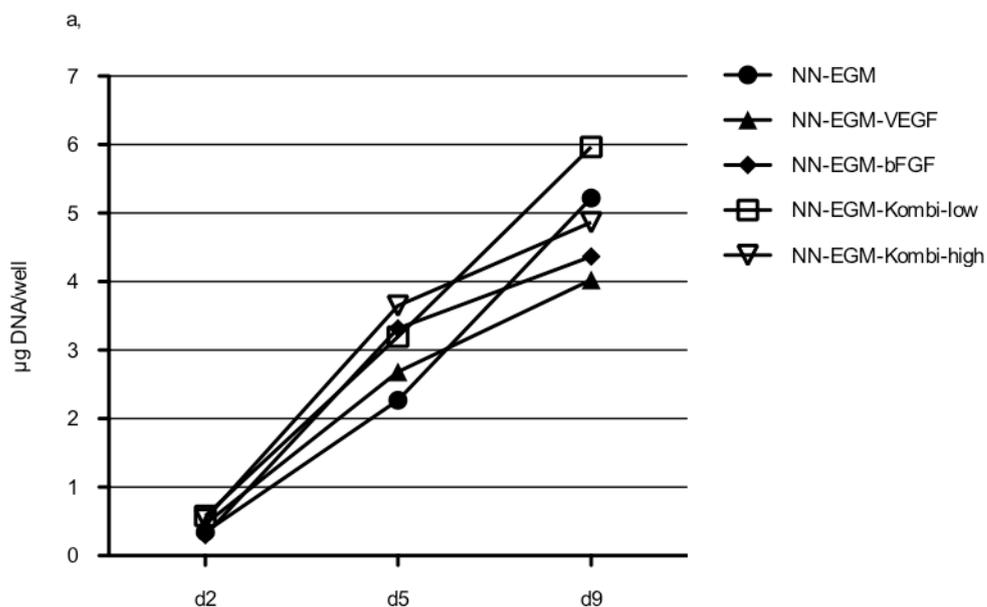


Abb. 12 a, und b, - Proliferation der ASC unter Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffbedingungen und Wachstumsfaktoren; DNA-Assay; Angabe in $\mu\text{g DNA/well}$, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit * markiert, Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Um eine Aussage über den Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation treffen zu können, wurden die ASC zum einen in Normoxie kultiviert und mit den unterschiedlichen Medienzusammensetzungen versorgt; die Ergebnisse dazu zeigt Abb. 13 a,. Die in Normoxie kultivierten ASC zeigten im zeitlichen Verlauf einen Anstieg des DNA-Gehalts auf das ca. Zehnfache ihres Ausgangswertes, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Mediengruppen gering waren. Es muss allerdings bemerkt werden, dass alle Gruppen unter dem Einfluss weiterer Wachstumsfaktoren wie EGF und IGF

standen, da diese im EGM-Grundmedium enthalten sind. Abb. 13 b, stellt den Einfluss der einzelnen Wachstumsfaktoren in Hypoxie dar. Hier zeigte sich ebenfalls ein Anstieg des DNA-Gehalts im zeitlichen Verlauf bei allerdings gegenüber der Normoxie insgesamt reduzierter Proliferationsrate – Anstieg des DNA-Gehalts nur ca. auf das Siebenfache im zeitlichen Verlauf.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die zugesetzten Wachstumsfaktoren in den jeweiligen Medien sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie, einen geringen Einfluss auf die Proliferationsrate besitzen (vgl. auch Abb. 12 a, und b,). Deutlich erkennbar ist die proliferationshemmende Wirkung der Hypoxie, denn alle in Hypoxie kultivierten Gruppen zeigten zu unterschiedlichen Zeitpunkten geringere DNA-Werte als ihre normoxischen Vergleichsgruppen. Die Hypoxie besitzt in den hier verwendeten Medien somit einen größeren Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen als die beiden untersuchten Wachstumsfaktoren.



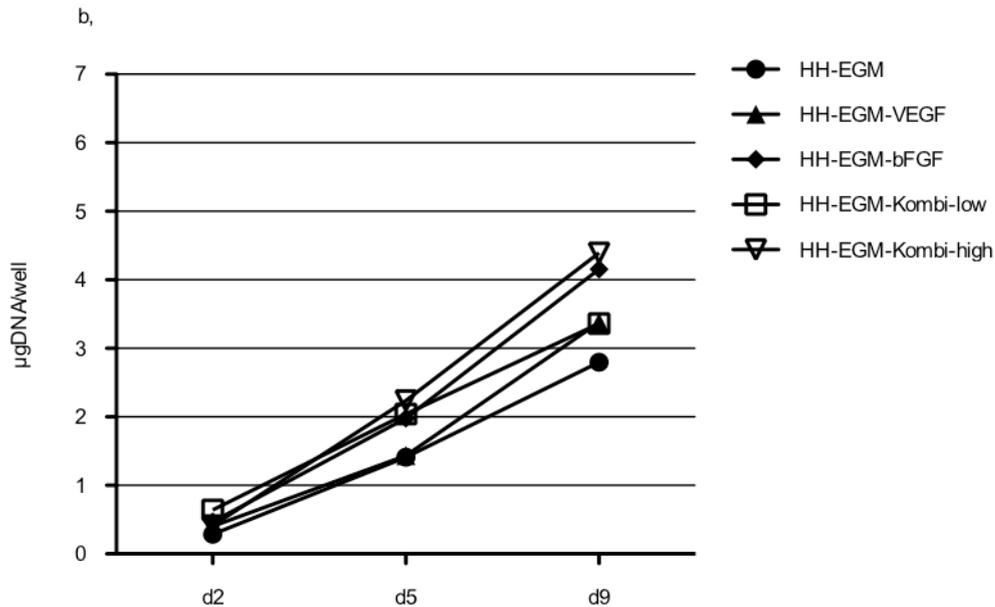


Abb. 13 a, und b, - Proliferation der ASC unter Einfluss von Wachstumsfaktoren in Normoxie (a.) bzw. der Kombination von Hypoxie und Wachstumsfaktoren (b.); DNA-Assay; Angabe in $\mu\text{g DNA/well}$. Detaillierte Darstellung der Gruppen siehe Tabelle 1, S. 27.

3.4 Betrachtung der Proliferation und Nachweis der adipogenen Differenzierung unter Einfluss der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF in adipogenem Medium

Um die Auswirkungen der Wachstumsfaktorengabe auf Proliferation und adipogene Differenzierung zu untersuchen, wurde das Medium mit den gleichen Mengen an VEGF (50 ng/ml) und bFGF (10 ng/ml) ergänzt wie im Versuchsteil der endothelialen Differenzierung. Als Differenzierungsmedium wurde hier ein adipozyten-spezifisches Medium (PGM-2-Medium) verwendet. Es wurden nur Gruppen mit hohen Konzentrationen an Wachstumsfaktoren gewählt, da in diesem Versuchsteil untersucht werden sollte, ob die Wachstumsfaktoren negative Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung der adipogen stimulierten ASC besitzen. Folgende Mediengruppen wurden untersucht: PGM-2-VEGF (50 ng VEGF/ml Medium), -bFGF (10 ng bFGF/ml Medium) und -Kombi-high (10 ng bFGF und 50 ng VEGF/ml Medium). Die Gruppe, die keine Wachstumsfaktoren enthielt (PGM-2), diente als Vergleichsgruppe. Für eine Übersicht über die verwendeten Medienzusammensetzungen siehe auch Tabelle 3 auf Seite 28.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse des DNA-Assays der adipogen induzierten ASC, im Vergleich zu den nicht-induzierten ASC, unter Einfluss der Wachstumsfaktoren. Die dargestellten Mittelwerte mit Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Proben jeweils in Zweifachbestimmung gewonnen. Alle induzierten Gruppen zeigten ähnliche Werte, von denen sich nur die nicht-induzierten Gruppen unterschieden. Die nicht-induzierten ASC der Gruppe PGM-2-VEGF wiesen einen ähnlichen DNA-Gehalt auf, wie Zellen der Vergleichsgruppe (PGM-2). Die nicht-induzierten, bFGF-enthaltenden Gruppen (PGM-2-bFGF und PGM-2-Kombi-high) zeigten hingegen eine deutliche Proliferationssteigerung, die hier im Vergleich zur Proliferation in EGM (Vgl. Abb. Nr. 13) stärker ausgeprägt war. Dies lässt sich auf die im EGM-Grundmedium enthaltenen zusätzlichen Wachstumsfaktoren zurückführen, die im PGM-Medium nicht enthalten sind.

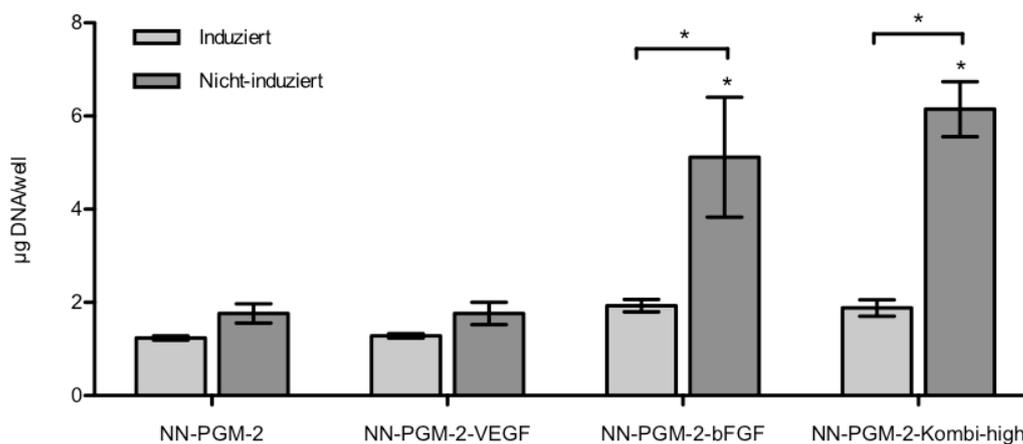


Abb. 14 – Proliferation von adipogen kultivierten ASC, induziert und nicht-induziert.; Quantifizierung des DNA-Gehalts an Tag 23; Angabe in µg DNA/well, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe NN-PGM-2-induziert wurden mit * markiert, Signifikanzniveau $p < 0,05$. Detaillierte Darstellung der Gruppen siehe Tabelle 3, S. 28.

Um zu untersuchen, ob die Zugabe der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF die adipogene Differenzierung beeinträchtigt, wurden dem adipogenem Induktionsmedium (PGM-2 mit Induktorencocktail) ebenfalls bFGF und VEGF hinzugefügt. Die Zellen wurden nach 23 Tagen geerntet und es wurde eine ORO-Färbung sowie ein Triglycerid-Assay durchgeführt, um die adipogene Differenzierung optisch und quantitativ darstellen zu können.

Die morphologische Untersuchung der Zellen erfolgte durch Darstellung der intrazellulären Fettakkumulation mittels ORO-Färbung. Diese Lösung färbt,

nach Fixierung der Zellen mit Formalin, intrazelluläre Triglyceride rot an und macht die Fetttropfchen somit sichtbar. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops mit angeschlossener Kamera an Tag 23 aufgenommen (siehe Abb. 15 a,-h,).

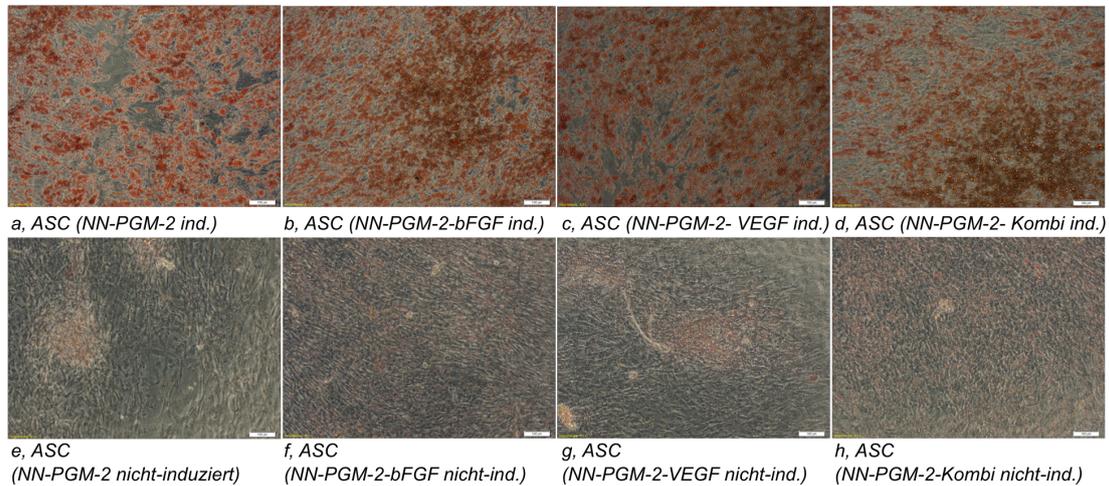


Abb. 15 a,- h, Intrazelluläre Fettakkumulation von adipogen kultivierten ASC unter Einfluss von Wachstumsfaktoren; Oil Red O-Färbung an Tag 23; a,-d, adipogen induzierte Zellen; e,-h, nicht-induzierte ASC; Größenbalken entspricht 100 µm.

Durch die ORO-Färbung konnte die adipogene Differenzierung bei allen induzierten Gruppen nachgewiesen werden, wohingegen diese in den nicht-induzierten Gruppen negativ ausfiel. Unterschiede im Differenzierungsausmaß zwischen den verschiedenen Wachstumsfaktorengruppen fanden sich nicht.

Abb. 16 stellt die Ergebnisse des Triglyceridassays dar. Mit Hilfe dieses Assays kann der intrazelluläre Triglyceridgehalt festgestellt werden. Die Werte werden in µg Triglycerid pro µg DNA angegeben und wurden jeweils aus drei biologischen Proben in Zweifachbestimmung ermittelt. Dargestellt sind deren Mittelwerte mit Standardabweichungen. Wiederum wurden Gruppen unter Einfluss der hohen Wachstumsfaktorenkonzentrationen untersucht. Als Vergleichsgruppen dienten in PGM-2 und ohne Wachstumsfaktoren kultivierte ASC, sowie die Zellen der nicht-induzierten Gruppen. Alle Zellen wurden in Normoxie kultiviert. Bei allen induzierten Gruppen konnten Triglyceride und somit eine adipogene Differenzierung nachgewiesen werden, mit jeweils signifikantem Unterschied gegenüber den nicht-induzierten Vergleichsgruppen. Gruppe PGM-2-VEGF wies tendenziell die größte Menge an Triglyceriden auf, während die Gruppe mit den hohen Konzentrationen beider

Wachstumsfaktoren (PGM-2-Kombi-high) den geringsten Wert zeigte; signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mediengruppen ließen sich jedoch nicht feststellen. Eine geringfügig induktions-unterstützende Wirkung von bFGF kann auf Grund des Nachweises geringer Mengen von Triglyceriden, in den nicht-induzierten Gruppen, die mit bFGF-haltigem Medium versorgt wurden, vermutet werden. Zusammenfassend besitzen die Wachstumsfaktoren keinen signifikanten Einfluss auf Proliferation und Ausmaß der Differenzierung der adipogen induzierten ASC.

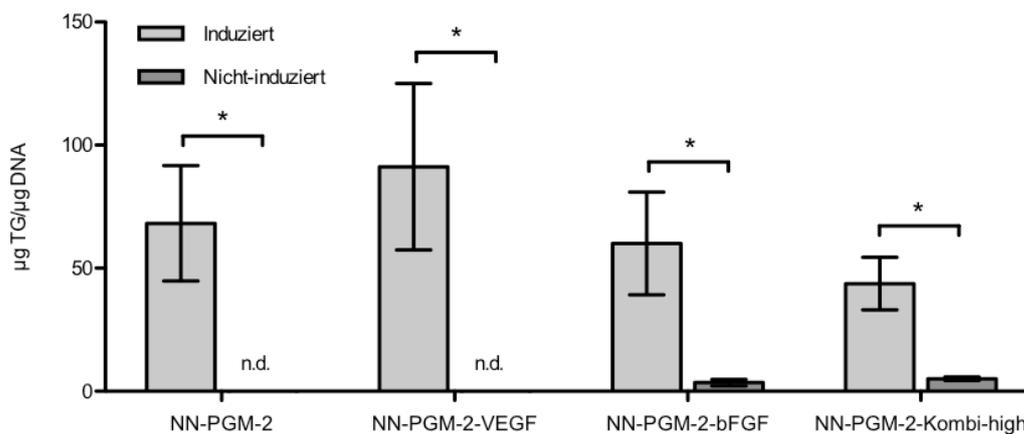


Abb. 16 - Einfluss der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF auf die adipogene Differenzierung der ASC; Triglycerid-Assay; Tag 23; Angabe in µg Triglycerid/µg DNA; n.d. = nicht detektierbar. Aufgeführt sind jeweils die induzierten gegen die nicht-induzierten Gruppen; statistisch signifikante Unterschiede zwischen diesen Gruppen wurden mit * markiert, Signifikanzniveau $p < 0,05$. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mediengruppen bzw. gegenüber der Kontrollgruppe NN-PGM-2. Detaillierte Darstellung der Gruppen siehe Tabelle 3, S. 28.

3.5 Nachweis der adipogenen Differenzierung unter Einfluss von Hypoxie

Es wurde außerdem untersucht, ob die ASC auch bei einer Sauerstoffkonzentration von 3%, also in Hypoxie, adipogen differenzierbar sind. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von 30.000 Zellen/cm² auf eine 48-Wellplatte ausgesät und in Hypoxie, bzw. die Vergleichsgruppe in Normoxie, kultiviert. Ein weiterer Teil der Zellen wurde der hypoxischen Präkonditionierung unterzogen, denn es sollte auch hier untersucht werden, ob schon die Reduktion der Sauerstoffkonzentration für kurze Zeit Auswirkungen auf die Differenzierbarkeit der Zellen hat. Als Nährmedium erhielten die Zellen adipogenes Differenzierungsmedium (PGM-2 mit Induktoren). Es wurde jeweils eine nicht-induzierte Kontrolle mitgeführt. Zum Nachweis der adipogenen

Differenzierung unter diesen Bedingungen wurden eine ORO-Färbung sowie eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt.

Um eventuell entstandene morphologische Unterschiede durch die veränderten Kulturbedingungen in Hypoxie festzustellen, wurden die Zellen nach einer Kulturzeit von 16 Tagen mit einer ORO-Lösung im *well* gefärbt und anschließend wurden Bilder der Zellen aufgenommen. Abb. 17 a-c zeigt exemplarische Bilder der drei untersuchten Gruppen. Morphologische Unterschiede von in Hypoxie kultivierten ASC im Vergleich zur Kontrollgruppe (Normoxie) waren nicht feststellbar. Ebenso fanden sich keine Unterschiede im Ausmaß der Differenzierung zwischen den beiden Sauerstoffbedingungen. Auch die Zellen der hypoxischen Präkonditionierung, die einer kurzfristigen Reduktion der Sauerstoffkonzentration ausgesetzt waren, zeigten ein normales Bild von im *well* kultivierten und induzierten ASC.

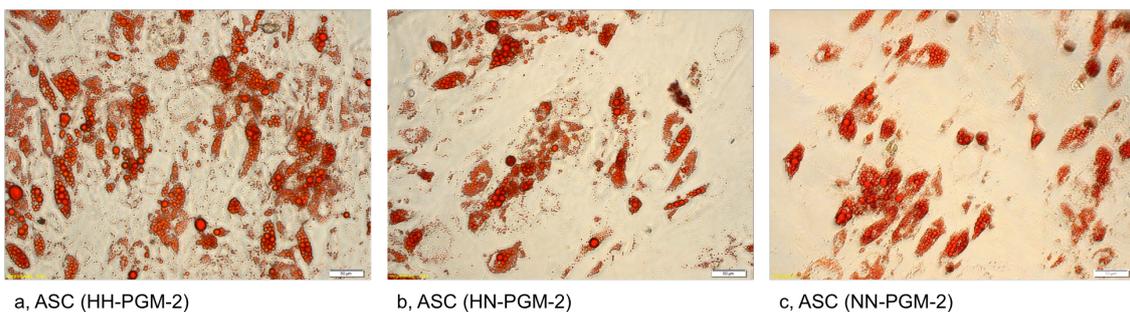


Abb. 17 - Einfluss der Hypoxie auf die Morphologie adipogen differenzierter ASC; Oil Red O-Färbung an Tag 16; Größenbalken entspricht 50 μm .

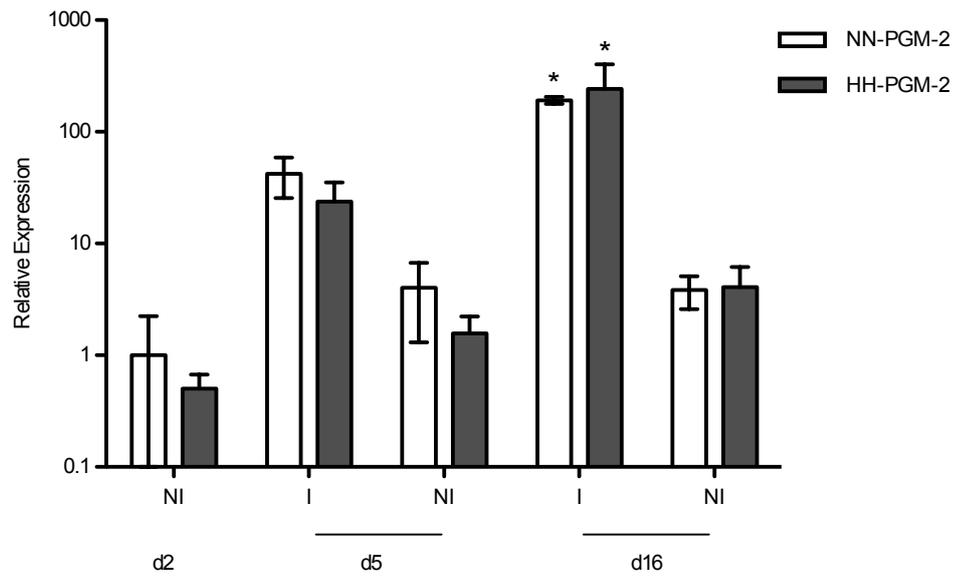
Für die PCR wurden von den unter oben beschriebenen Bedingungen kultivierten ASC (ohne Gruppe der hypoxischen Präkonditionierung) RNA-Proben gesammelt und die Genexpressionslevel Adipogenese-spezifischer Gene mit Hilfe spezifischer Primersets und einer quantitativen Real-Time PCR ermittelt. Die Proben wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten gesammelt. An Tag 2, also unmittelbar bevor die Zellen das Induktionsmedium erhielten, um einen Referenzwert zu erhalten, an Tag 5, einem frühen Zeitpunkt der Adipogenese sowie an Tag 16, um ein späteres Stadium der Adipogenese abbilden zu können. Es wurden jeweils drei biologische Proben pro Gruppe zur Datenerhebung verwendet. Alle Werte wurden gegen den Wert der Proben von

an Tag 2 geernteten und in Normoxie kultivierten, nicht-induzierten Zellen normalisiert.

Zum Nachweis der frühen Differenzierung wurden zwei der wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Adipogenese ausgewählt, CEBP α und PPAR γ . Als Marker reifer Adipozyten wurden die Genexpressionslevel von FABP 4 und GLUT 4 untersucht. Da die Genexpression von β -Actin durch die adipogene Induktion nicht gestört wird, wurde es als Referenz, als sogenanntes Housekeepinggen, verwendet. Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR stellen Abb. 18 und 19 dar.

Alle untersuchten Gene zeigten, sowohl in Normoxie (ausgenommen GLUT 4, d16) als auch in Hypoxie, einen deutlichen Anstieg der Expressionslevel durch die adipogene Induktion (siehe Abb. 18 und 19, induzierte Gruppen). Die Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ , die in der frühen Phase der adipogenen Differenzierung hochreguliert werden, zeigten beide einen deutlichen Anstieg ihrer Genexpression. Besonders deutlich ist der Anstieg der relativen Expression bei C/EBP α zu sehen. Die Expression an Tag 16 ist in allen induzierten Gruppen um mehr als das 150-fache, im Vergleich zur Kontrollgruppe, erhöht, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den in Normoxie und Hypoxie kultivierten Zellen erkennbar ist. Für PPAR γ konnte unter hypoxischen Bedingungen an Tag 16 ein fast doppelt so hoher und somit signifikanter Anstieg der relativen Expression nachgewiesen werden wie für in Normoxie kultivierte ASC – 18,9- zu 9,7-facher Anstieg.

a, C/EBP α



b, PPAR γ

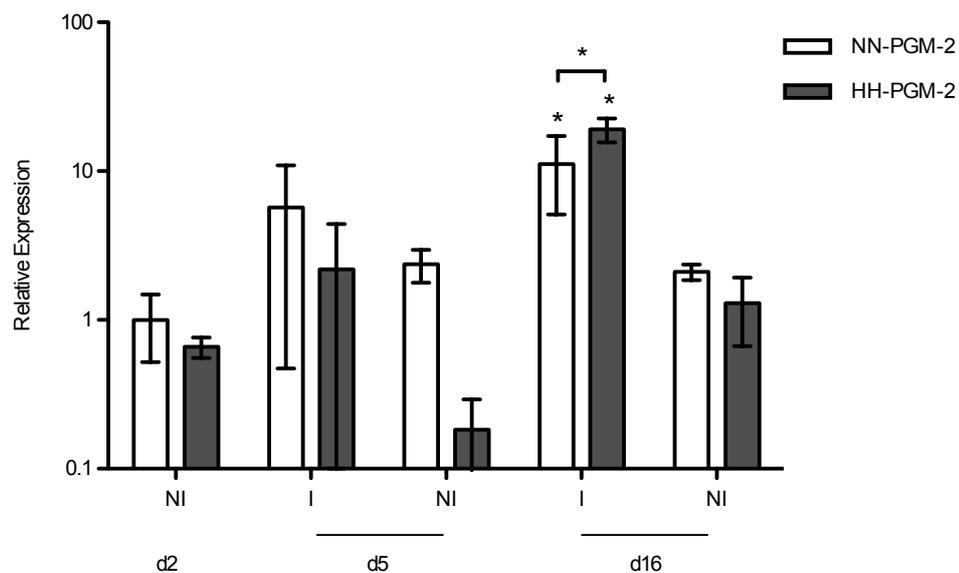
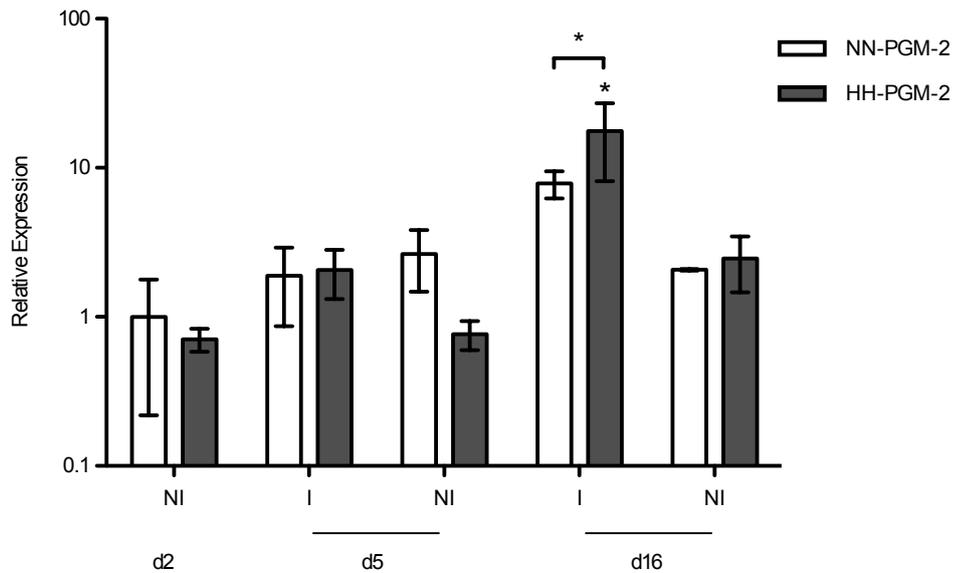


Abb. 18 a, und b, - Relative Genexpression der adipogenese-assoziierten Transkriptionsfaktoren C/EBP α (a.) und PPAR γ (b.) von adipogen induzierten ASC unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen. Alle Werte wurden zunächst auf die Expression des Housekeepinggens β -Actin und anschließend auf den Wert der Proben von an Tag 2 geernteten und in Normoxie kultivierten, nicht-induzierten Zellen (Gruppe NN-PGM-2-NI) normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber dieser Gruppe wurden mit * markiert, Signifikanzniveau: $p < 0,05$. I= induziert, NI= nicht-induziert.

Bei GLUT 4, als Marker reifer Adipozyten konnte sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie erst ab Tag 16 eine relevante Erhöhung der Expressionslevel des Gens festgestellt werden, mit erneut höheren Werten in der Hypoxie. Im

Kontrast dazu sah man bei FABP 4 jeweils bereits ab Tag 5 einen starken Anstieg der Expression. Die Expressionslevel beider Gruppen stiegen bis zu Tag 16 weiter an (bis zu 2000-fache Expressionssteigerung – Gruppe HH-PGM-2). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Adipogenese der ASC durch Kultivierung in Hypoxie nicht gestört wird.

a, GLUT 4



b, FABP 4

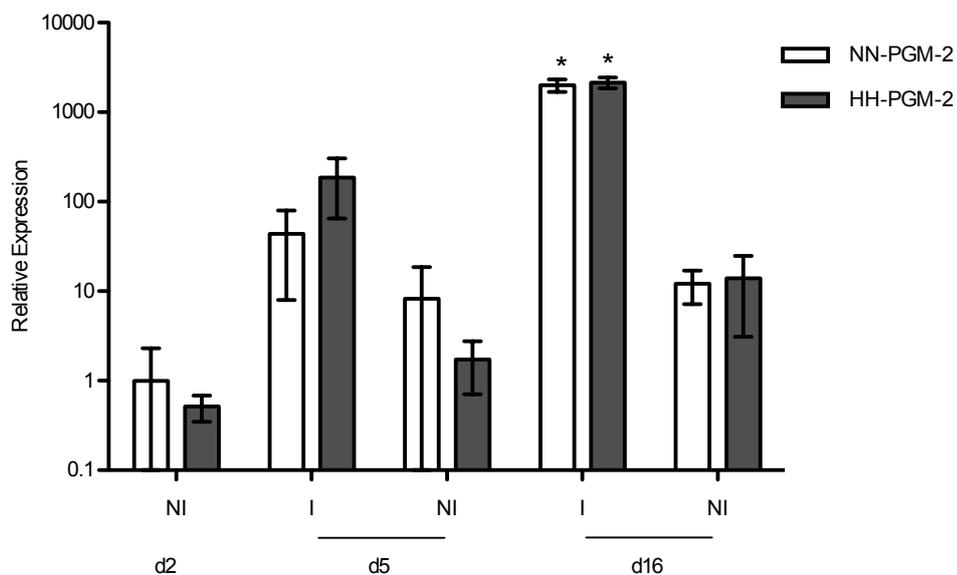


Abb. Nr. 19 a, und b, - Relative Genexpression der adipogenen Marker der Spätphase GLUT 4 (a.) und FABP 4 (b.) von adipogen induzierten ASC unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen. Alle Werte wurden zunächst auf die Expression des Housekeepinggens β -Actin und anschließend auf den Wert der Proben von an Tag 2 geernteten und in Normoxie kultivierten, nicht-induzierten Zellen (Gruppe NN-PGM-2-NI) normalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber dieser Gruppe wurden mit * markiert, Signifikanzniveau: $p < 0,05$. I= induziert, NI= nicht-induziert.

In Zusammenschau der Ergebnisse der ORO-Färbung und der quantitativen Real-Time PCR konnte weder auf zellulärer noch auf molekularer Ebene eine Störung der adipogenen Differenzierung durch Kultivierung der ASC in Hypoxie nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine adipogene Differenzierung auch in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF mittels Triglyceridassay und ORO-Färbung belegt werden. Hier trat ebenfalls keine gravierende Beeinträchtigung der Adipogenese durch die angiogenen Wachstumsfaktoren auf.

4 Diskussion

Einer der limitierenden Faktoren im TE von großen und komplexen Gewebekonstrukten ist die suffiziente und schnelle Vaskularisierung sowie die damit verbundene Sicherstellung der Nähr- und Sauerstoffversorgung der darin enthaltenen Zellen. Es existieren verschiedenste Ansätze zur Förderung der Vaskularisierung dieser Konstrukte, wie z.B. die Optimierung der Struktur verwendeter Trägermaterialien, der Einsatz angiogener Wachstumsfaktoren, die Integration von Gefäßbündeln in ein TE-Konstrukt, die Kokultivierung mit Endothelzellen oder die Verwendung dezellularisierten Gewebes wie z.B. Darmgewebe mit einem bereits vorhandenen mikrovaskulären Netz [67, 71, 72].

Besonders Fettgewebe, als reich vaskularisiertes Gewebe, in dem jeder Adipozyt von einer Kapillare umgeben ist [12], ist auf eine schnelle Ausbildung eines dichten vaskulären Netzes zur Wahrung seiner Funktionen *in vivo* angewiesen. Die enge Verzahnung von Adipogenese und Angiogenese zeigt sich in den auto- und parakrinen Verbindungen zwischen Kapillaren bzw. Endothelzellen und Präadipozyten. Aus verschiedenen Kokultursystemen weiß man, dass Endothelzellen Proliferation und Differenzierung von ASC stimulieren können [87, 97] und dass wiederum ASC eine Reihe Angiogenese-assoziiierter Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF, bFGF, HGF und das Chemokin *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) produzieren und sezernieren [12] und dadurch die Fähigkeit besitzen, Angiogenese zu fördern. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ASC, welche in ischämische Extremitäten von Mäusen transplantiert wurden, die Bildung neuer Gefäße und somit die Vaskularisierung des ischämischen Gewebes verbessern [20, 35, 61].

Neben dieser sekretorischen Eigenschaft besitzen ASC zudem ein hohes Differenzierungspotential. So können ASC unter dem Einfluss zelllinienspezifischer Induktoren *in vitro* zu adiogenen, chondrogenen, myogenen, neuronalen sowie osteogenen Zellen differenziert werden [29-31, 98]. Außerdem konnten einige Studien die prinzipielle Differenzierbarkeit zu Endothelzellen nachweisen [35, 36, 99], was wiederum einen möglichen neuen Ansatzpunkt zur Verbesserung der Gewebekonstruktion darstellt. Somit

besitzen ASC in zweierlei Hinsicht positive Voraussetzungen zur Anwendung im TE von vaskularisierten Gewebekonstrukten.

Es wurden bereits verschiedene Strategien zur Differenzierung von ASC zu Endothelzellen entwickelt. Diese leiten sich initial aus Untersuchungen der Differenzierung von endothelialen Stammzellen zu Endothelzellen, bzw. aus Versuchen des Erhalts endothelilaler Funktionen *in vitro*, ab [50]. Zur Induktion der endothelialen Differenzierung von ASC kommen u.a. angiogene Wachstumsfaktoren zum Einsatz. So konnten einige Arbeitsgruppen bereits die endotheliale Differenzierung von ASC unter Einwirkung von endothelzellspezifischem Differenzierungsmedium [36, 94] bzw. zusammen mit Wachstumsfaktoren, v.a. bFGF und VEGF, erwirken [35, 58, 98, 100]. Ein weiterer Stimulus der endothelialen Differenzierung, der zudem die Zelladhäsion, Migration und Proliferation sowie das Überleben von Endothelzellen fördern kann, ist die Verwendung von EZM [50, 51]. In den hier beschriebenen Arbeiten wurden meist zusätzlich zu endothelzellspezifischem Medium oder Wachstumsfaktoren EZM-Beschichtungen der Zellkulturplatten verwendet, hierunter v.a. Kollagen Typ IV, Fibronectin und Gelatine [54, 58, 101]. Ihr Einfluss auf die endotheliale Differenzierung von ASC im Einzelnen wurde jedoch bislang nicht näher untersucht. Durch Nachahmung physiologischer Scherkräfte mittels Kultivierung der Zellen auf einem Orbitalschüttler in Kombination mit endothelzellspezifischem Medium bzw. Wachstumsfaktoren konnte ebenfalls eine endotheliale Differenzierung bewirkt werden [54, 101]. Der Einsatz von Hypoxie, als proangiogenem Faktor, in Kombination mit VEGF resultierte ferner im Nachweis endothelial-differenzierter Zellen [61, 62]. Allerdings lieferten die bisherigen Versuche unterschiedlichste und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse im Hinblick auf die Expression endothelialer Marker und Funktionen, so dass weiterhin Forschungsbedarf zur Entwicklung einer aussichtsreichen und robusten Kultivierungsstrategie zur Differenzierung von ASC zu Endothelzellen besteht.

4.1 Endotheliale Differenzierung

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie der Einfluss der angiogenen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF, sowie von Hypoxie (3% Sauerstoff) bzw. die Kombination der drei Faktoren eine endotheliale Differenzierung der ASC beeinflusst. Dazu wurden die Zellen mit jeweils einem oder mit einer Kombination der beiden Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen (5 ng/ml bFGF und 2 ng/ml VEGF bzw. 10 ng/ml bFGF und 50 ng/ml VEGF) unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die Analyse der endothelialen Differenzierung erfolgte primär mittels CD31-Immunfluoreszenzfärbung. CD31 (PECAM-1) ist einer der Hauptmarker reifer Endothelzellen [98, 102] und wird deshalb häufig zum Nachweis der endothelialen Differenzierung herangezogen.

Um die Selektion und Anfärbung von in der Ausgangspopulation vorhandenen Endothelzellen auszuschließen, wurden bei jedem Passagieren der Zellen Proben entnommen und eine CD31-Immunfluoreszenzfärbung angefertigt. Konnten in den niedrigen Passagen (0, 1, 2) noch vereinzelt CD31-positive Zellen nachgewiesen werden, traten diese ab Passage 3 nicht mehr auf. Durch Verwendung von Zellen erst ab der dritten Passage konnte somit eine Selektion bzw. Anfärbung vorhandener Endothel- oder endothelähnlicher Zellen ausgeschlossen werden.

Zunächst wurde der Einfluss der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF unter normoxischen Bedingungen auf die endotheliale Differenzierung der ASC untersucht. VEGF als starker Stimulator der Proliferation und Migration von Endothelzellen [103] wird in der Mehrzahl der Studien zur Induktion der Differenzierung der ASC zu Endothelzellen verwendet. In der Literatur wird meist eine Konzentration von 50 ng VEGF/ml Medium eingesetzt [35, 62, 98, 100, 101]. So zeigten beispielsweise Zhang et al., dass die Zugabe von 50 ng/ml VEGF zu EGM-2-MV-Medium die Expression der Endothelzellmarker vWF und eNOS erhöhte sowie zur Steigerung der Proteinexpression von CD31 auf humanen ASC führte [101]. bFGF spielt *in vivo* eine wichtige Rolle in der Wundheilung und Angiogenese. In seiner Funktion als angiogeneseförderndes Zytokin steigert es die endotheliale Proliferation und Kapillarbildung [104]. Konno et al. untersuchten unterschiedliche bFGF-Konzentrationen (5, 10, und

20 ng/ml) hinsichtlich ihres Effekts auf die endotheliale Differenzierung von Maus-ASC, welche in EGM-2-MV kultiviert wurden, und kamen zu dem Ergebnis, dass 10 ng bFGF/ml Medium die effektivste Dosis zur Stimulation der endothelialen Differenzierung ist [58]. Marra et al. konnten zudem den angiogenesefördernden Effekt von bFGF *in vivo* nachweisen. Sie zeigten, dass die bFGF-Zugabe (1 ng/ml) zu erhöhtem Zellüberleben und gesteigerter Proliferation von Präadipozyten sowie zu erhöhter Vaskularisierung eines in Mäusen implantierten Konstrukts führte [105]. Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von bFGF (10 ng/ml) und VEGF (50 ng/ml) fand in Anlehnung an die oben beschriebenen *in vitro*-Studien statt.

Die ASC wurden für diese Versuche neun Tage in Normoxie in EGM-2-MV-Medium mit Zusatz des jeweiligen Wachstumsfaktors bzw. der Kombination aus beiden kultiviert. Mittels CD31-Immunfluoreszenzfärbung und anschließender Mikroskopie wurde der Anteil CD31-positiver Zellen quantifiziert. Im Vergleich zu Zellen, welche in EGM-Medium ohne zusätzliche Wachstumsfaktoren (Kontrollgruppe) kultiviert wurden, führte die alleinige bFGF-Zugabe zu einer Steigerung der Anzahl differenzierter Zellen. Der Zusatz von VEGF zeigte hingegen keine Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe (EGM). Konno et al. beschrieben die gleiche Beobachtung [58]. Somit kann angenommen werden, dass hinsichtlich der Differenzierung von ASC zu Endothelzellen bFGF eine größere Rolle spielt als VEGF.

Die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren führte in dieser Arbeit zudem tendenziell zu einem weiteren Anstieg der CD31-positiven Zellen (vgl. mit der bFGF-Gruppe), in der hohen Konzentration zeigte sich hier sogar ein signifikanter Unterschied. Auch Cao et al. setzten die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren (10 ng/ml bFGF und 50 ng/ml VEGF) zur Differenzierung humaner ASC ein. Sie konnten bei den endothelial differenzierten ASC die Expression endothelialer Marker wie CD 31, CD 34, CD 144 und eNos nachweisen [35]. Rophael et al. testeten die Auswirkungen der Kombination dreier Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF und PDGF) auf die Vaskularisierung und Bildung von Fettgewebe von in Mäusen implantierten Matrigelkammern. Auch sie beschreiben deutliche positive Effekte der Kombination von Wachstumsfaktoren *in vivo* im Vergleich zum alleinigen Einsatz eines Wachstumsfaktors [106]. Zusammenfassend konnte im Einklang mit der bisher

publizierten Literatur gezeigt werden, dass die endotheliale Differenzierung von ASC bereits durch den Einfluss einzelner Wachstumsfaktoren, wenn auch in sehr geringem Ausmaß, möglich ist. Ein kombinierter Einsatz von Wachstumsfaktoren scheint allerdings zielführender zu sein, denn die Kombination beider Wachstumsfaktoren bewirkt eine stärkere Induktion der endothelialen Differenzierung als der alleinige Einsatz der Faktoren. Dies scheint der physiologischen Situation *in vivo* näher zu kommen.

Einer der potentesten Stimuli für die Neoangiogenese sind hypoxische Bedingungen im Gewebe (Ischämie). Die Ischämie induziert u.a. die Formation neuer Blutgefäße, um eine adäquate Sauerstoffversorgung in betroffenem Gewebe wiederherzustellen [107]. Die Zellen reagieren auf Hypoxie über die HIF1- α Signaltransduktion. Die α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors ist unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert, was zu einem proteasomalen Abbau führt [108, 109]. In Hypoxie wird HIF-1 α durch eine reduzierte Hydroxylierung stabilisiert, wodurch es zur Induktion der Expression verschiedener proangiogener Gene kommt, darunter v.a. von VEGF [61]. Zudem kommt es in Hypoxie durch die gesteigerte Freisetzung von SDF-1, einem Chemokin, zu einer Rekrutierung verschiedenster Zellen mit dem SDF-1-Rezeptor (CXCR4), darunter zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen, Endothelzellen und auch ASC, zu Orten verminderter Perfusion und durch deren Funktionen wiederum zu einer Förderung der Neovaskularisierung [110]. Insgesamt besitzt die Hypoxie also ein starkes proangiogenes Potential, das man sich zur Förderung der Vaskularisierung von TE-Konstrukten zunutze machen könnte.

Für den physiologischen Sauerstoffgehalt im subcutanen Fettgewebe sind in der Literatur unterschiedliche Werte angegeben. Yamamoto et al. gehen davon aus, dass eine Sauerstoffkonzentration von ca. 3% der „physiologischen Normoxie“ entspricht, trotz der hohen Zahl von Gefäßen im Fettgewebe [111]. Grundlage dafür sind die Untersuchungen von Matsumoto et al. an mamillärem Fettgewebe von Mäusen [112]. Andere Autoren gehen von einem relativ normoxischen Sauerstoffgehalt (21 %) im subcutanen Fettgewebe aus [62] verglichen mit der Konzentration, denen BMSC im Knochenmark ausgesetzt sind, für die ein Sauerstoffgradient zwischen 1 und 7% bestehen soll [113]. Andere Autoren konnten eine Oxygenierung des Fettgewebes

normalgewichtiger Mäuse von ca. 6,5% nachweisen, was im Rahmen des allgemeinen Sauerstofflevels von vaskularisiertem Gewebe liegt (PaO_2 40-50 mmHg) [114]. Bei Untersuchungen an humanem abdominellem subcutanem Fettgewebe wurden Werte zwischen 3 und 11% (PaO_2 ca. 23-84 mmHg) gemessen [115, 116]. Die ASC in den hier beschriebenen Versuchen wurden in einem CO_2 -Inkubator mit Sauerstoffregulation bei 3% Sauerstoff, als hypoxische Bedingung, kultiviert. Es erfolgte somit eine Orientierung am unteren Limit der in den verschiedenen Studien gemessenen Sauerstoffkonzentrationen.

Um den Effekt der Hypoxie auf die Differenzierung von ASC zu Endothelzellen zu untersuchen, wurden die Zellen sowohl während der Proliferations- als auch in der Differenzierungsphase entweder bei 3% (Gruppe HH) oder bei 21% Sauerstoff (Gruppe NN) zunächst in EGM-Medium (also ohne bFGF und VEGF) bzw. in EGM-Medium mit niedriger Wachstumsfaktorenkonzentration (EGM-Kombi-low-Medium - 5 ng/ml bFGF und 2 ng/ml VEGF) kultiviert. Zudem existierte noch eine dritte Gruppe an Zellen, die nur für eine kurze Phase während der Proliferation einer Sauerstoffreduktion ausgesetzt waren und während der Differenzierungsphase in Normoxie kultiviert wurden (Gruppe HN). Hier sollte die sog. hypoxische Präkonditionierung untersucht werden, da beispielsweise Valorani et al. für die adipogene Differenzierung unter dieser Versuchsanordnung eine signifikant höhere Differenzierungskapazität der Zellen nachweisen konnten [117].

Der Effekt der Hypoxie zeigt sich durch Vergleich der Zellen, die in Hypoxie oder Normoxie ohne zusätzliche Wachstumsfaktorenzugabe kultiviert wurden (Gruppen HH-EGM und NN-EGM). Dabei führte die Kultivierung der Zellen bei 3% Sauerstoff zu einem ca. dreifachen Anstieg an CD31-positiven Zellen. Die Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen in Kombination mit den beiden Wachstumsfaktoren erzielte einen nahezu zehnfachen Anstieg CD31-positiver Zellen, verglichen mit der Kontrollgruppe in Normoxie (NN-EGM-Kombi low). In der Gruppe der hypoxischen Präkonditionierung zeigte sich zwar ein gering positiver Effekt durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren; dieser glich allerdings dem der vollständig in Normoxie kultivierten Zellen, so dass für die endotheliale Differenzierung kein positiver Effekt dieser hypoxischen Präkonditionierung nachweisbar war. Auf Grund dessen wurde diese Gruppe in

den nachfolgenden Versuchen nicht weiter untersucht (vgl. Abb. 5, Seite 40). Entgegen der in dieser Arbeit festgestellten positiven Wirkung von Hypoxie allein, stellten Thangarajah et al. keine Steigerung CD31-/FLK-1-positiver Zellen fest, erst durch Zugabe von VEGF (50 ng/ml) beschrieben sie, wie auch Hamou et al., den Anstieg CD31-/Flk-1-positiver Zellen [61, 62].

Die positiven Auswirkungen der Kombination von Hypoxie und Wachstumsfaktoren auf die endotheliale Differenzierung konnten durch einen weiteren Versuch, in dem der Einsatz der einzelnen Faktoren sowie die Kombination der Wachstumsfaktoren in niedriger und hoher Konzentration in Normoxie und Hypoxie verglichen wurden, verdeutlicht werden. Zum einen ließ sich erneut der positive Effekt der Hypoxie, aber auch der Einfluss der einzelnen Wachstumsfaktoren mit dem stärkeren Einfluss von bFGF als von VEGF (wie unter normoxischen Bedingungen) nachweisen. Zum anderen zeigte sich, dass durch Dosissteigerung der Wachstumsfaktoren in Hypoxie eine nochmalige Zunahme an CD31-positiven Zellen möglich ist (nahezu Verdoppelung CD31-positiver Zellen zwischen der niedrigen Wachstumsfaktorenkonzentration und der hohen - Gruppen HH-EGM-Kombi low und -high - in Hypoxie). Zudem zeigte sich ein überadditiver Effekt im Zusammenspiel der beiden Wachstumsfaktoren in Hypoxie verglichen zu den Einzelfaktoren in Hypoxie. Dieser Synergismus der drei hier untersuchten Bedingungen konnte erstmals gezeigt werden. In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit kann man schlussfolgern, dass die Kultivierung der ASC unter hypoxischen Bedingungen zusammen mit der Wachstumsfaktorenkombination hinsichtlich einer endothelialen Differenzierung *in vitro* die aussichtsreichste Kultivierungsstrategie darstellt.

Um zu evaluieren, ob die Kultivierung der ASC in Hypoxie zu einer Steigerung der Sekretion angiogener Faktoren führt, wurde die VEGF-Sekretion untersucht. Mittels eines ELISA konnte in dieser Arbeit eine drei- bis vierfache Zunahme der endogenen VEGF-Sekretion unter hypoxischen Kulturbedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. In anderen Arbeiten wurde dieser Hypoxieeffekt ebenfalls nachgewiesen [20, 61]. Thangarajah et al beschreiben einen zwei- bis dreifachen Anstieg der VEGF-Konzentration in Medium von unter 5 bzw. 1% Sauerstoff kultivierten Maus-

ASC, zudem konnten sie eine zunehmende VEGF-Sekretion mit sinkendem Sauerstoffgehalt nachweisen [61]. Somit könnte die gesteigerte endogene VEGF-Sekretion ein partieller Beitrag zum hier dargestellten positiven Hypoxieeffekt hinsichtlich der endothelialen Differenzierungskapazität der ASC sein. Um die durch Hypoxie angestoßenen Veränderungen der Sekretionsleistung von ASC besser zu verstehen, wäre es zudem interessant, die bFGF-Sekretion zu untersuchen, zumal bFGF hier einen stärkeren Effekt auf die endotheliale Differenzierung der ASC zeigte.

Zur Charakterisierung der endothelial differenzierten Zellen wurden in dieser Arbeit weitere Endothelzellmarker untersucht. Zum Nachweis des vWF wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Des Weiteren folgten Experimente zur Inkorporation von, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil markiertem, acetyliertem LDL und eine Untersuchung der Bildung gefäßähnlicher Strukturen auf 3D-Matrices im Rahmen eines Matrigelassay. Beides gilt als funktioneller Nachweis der endothelialen Differenzierung.

Für die vWF-Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen neun Tage in Hypoxie oder Normoxie kultiviert und mit Medium versorgt, welches die Wachstumsfaktoren in Kombination in niedriger oder hoher Konzentration enthielt. Als Positivkontrolle dienten erneut hMVEC. Hier konnten allerdings, auch bei mehrfacher Wiederholung des Versuchs, keine vWF-positiven Zellen nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der LDL-Inkorporation durch die differenzierten ASC erfolgte unter den o.g. Bedingungen. Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zellen konnten in allen untersuchten Gruppen nachgewiesen werden. Im Verhältnis glich das Ergebnis dem der CD31-Immunfluoreszenzfärbung, denn es zeigte sich ebenfalls ein weitaus größerer Anteil an mit Dil-markierten Zellen in der Hypoxie- als in der Normoxiegruppe. Ein weiterer funktioneller Nachweis der endothelialen Differenzierung ist die sog. *tube formation*, also die Ausbildung dreidimensionaler gefäßähnlicher Strukturen, auf Matrigel. Matrigel ist eine lösliche gemachte Basalmembranpräparation, die aus dem *engelbreth-holmswarm*-Maussarkom extrahiert wird. Es begünstigt die Anheftung und Differenzierung von Endothelzellen [93]. Um die *tube formation* nachzuweisen, wurden die Zellen für insgesamt neun Tage auf mit Matrigel gecoateten

Angiogeneseslides unter normoxischen Bedingungen kultiviert und zu definierten Zeitpunkten die Veränderung der Zellmorphologie beobachtet. Als Positivkontrolle wurden ebenfalls hMVEC verwendet; diese bildeten rasch ein über das ganze *slide* wachsendes kapilläres Netzwerk aus. Die endothelial induzierten ASC dagegen bildeten Zellausläufer, ausgehend von zuvor gebildeten Zellansammlungen, so dass sich sternförmige Strukturen entwickelten. Dieses Bild zeigten auch die Zellen der Negativkontrolle, also Zellen, welche keiner endothelialen Induktion ausgesetzt waren. Nach neun Tagen wurden die Zellen zudem einer CD31-Immunfluoreszenzfärbung unterzogen, hier konnten keine CD31-positiven Strukturen nachgewiesen werden, in der Positivkontrolle hingegen zeigte sich eine deutliche Anfärbung der Zellen. Erwähnenswert ist, dass es sich bei den sternförmigen Strukturen der ASC nicht um Zellausläufer handelt, sondern um Zellen welche entlang der EZM in die Peripherie wandern. Dies wird durch die DAPI-Gegenfärbung sichtbar. Folglich sind die, unter den hier angewandten Bedingungen kultivierten Zellen, nicht in der Lage den Endothelzellen entsprechende *tubes* auszubilden.

Den Matrigelassay muss man jedoch generell differenziert betrachten. In den meisten Studien erfolgt ein rein morphologischer Vergleich der Zellen, es wird also nur untersucht, ob die Zellen sich verzweigen und ein Netzwerk ausbilden. Das können neben Endothelzellen allerdings ebenfalls andere Zelltypen wie z.B. Epithelzellen [95] oder wie hier gezeigt naive ASC, auch wenn diese Netzwerke teilweise unterschiedlich aussehen. Beim Matrigel-Assay geht es allerdings nicht nur um den morphologischen Abgleich der Zellen im Vergleich zu EC, sondern darum, auf EZM dreidimensionale Strukturen mit einem Lumen auszubilden, d.h. es sollte eine Vakuolisierung stattfinden [93, 95]. Allein die Verwendung unterschiedlicher Begrifflichkeiten wie *tube formation* [54, 98] oder *cord formation* [94] bzw. die Ausbildung von *capillary-like structures* [101] oder *tube-like structures* [36] zeigt, dass hier keine einheitliche Definition besteht, was *tubes* überhaupt sind, bzw. ab wann sie als solche bezeichnet werden können. Thangarajah et al. definieren die *tubes* als Struktur deren Länge mindestens viermal dessen Querschnitt misst [61]. Kaum eine Studie weist

jedoch die Dreidimensionalität der Strukturen bzw. die Lumenbildung nach oder führt eine Immunfluoreszenz auf endotheliale Marker durch.

In der Literatur wurden verschiedenste Versuchsansätze für die Induktion der endothelialen Differenzierung von ASC beschrieben. Neben den unterschiedlichen Versuchsbedingungen variiert auch das Ausmaß der Expression endothelialer Marker. So wiesen einige Autoren bereits nach Behandlung der Zellen mit endothel-spezifischem Wachstumsmedium die Expression von vWF und CD31 nach [94, 118], wohingegen andere unter alleinigem Einfluss des Medium nur die Annahme einer endothelzellähnlichen Morphologie beschreiben, aber keine Markerexpression nachweisen konnten [49, 54]. Gleichermaßen berichten beispielweise Janeczek Portalska et al. dass der Einsatz von Scherkräften sowie von Endothelzellmedium nicht zur Ausbildung endothelialer Merkmale führte [49]. Dem gegenüber stehen die Untersuchungen von Fischer et al. sowie Zhang et al., die eine endotheliale Differenzierung mittels CD31 nachweisen konnten [54, 101]. Der vWF konnte in diesem Fall nur durch Zhang et al. nachgewiesen werden.

Auch das Ausmaß der Anzahl differenzierter Zellen verglichen mit der Ausgangspopulation variiert stark. Im Ergebnisteil wurden die absoluten Zahlen der differenzierten Zellen dargestellt. Dies waren unter den hier dargestellten besten Bedingungen (Hypoxie in Kombination mit beiden Wachstumsfaktoren) Werte zwischen 51 und 112. Setzt man diese in Relation zur Ausgangspopulation, zeigte sich, dass nur für etwa 0,5 - 1,1% der eingesetzten Zellen eine endotheliale Differenzierung nachgewiesen werden konnte. In der Literatur sind Werte im einstelligen Bereich zwischen 1,5 – 6,1% beschrieben [59, 61, 62], aber ebenso ein Anteil differenzierter Zellen im zweistelligen Prozentbereich (zwischen 14 und 78%) [98, 100, 101]. Konno et al. berichteten sogar von der Expression endothelialer Marker (flk-1, Angiopoetinrezeptor 2 (tie2), CD 34 und DilacLDL-Uptake) durch 80-90% der eingesetzten Zellen [58]. Die divergierenden Resultate der Markerexpression, Annahme endothelialer Eigenschaften durch ASC und zum Ausmaß der differenzierten Zellen lassen sich durch die vielfältigen Variationsmöglichkeiten hinsichtlich verwendeter Zellen, unterschiedlicher Medien und -zusätze sowie unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration und Kultivierungszeit erklären. Es wird also deutlich,

dass die Ergebnisse auf Grund der unterschiedlichen Versuchsansätze nur schwer im Gesamten vergleichbar sind. Abgesehen von den unterschiedlichen Ergebnissen konnten jedoch alle Gruppen die Annahme einer Reihe von Endothelzellcharakteristika für die ASC bestätigen.

In dieser Arbeit stellte die Kultivierung der ASC unter Einfluss einer Wachstumsfaktorkombination (bFGF/VEGF) in Hypoxie die aussichtsreichste Kultivierungsstrategie zur endothelialen Differenzierung von ASC dar. Es konnte zudem erstmals ein synergistischer Effekt dieser Kombination bzgl. des Ausmaßes differenzierter Zellen gezeigt werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass ein Teil der unter diesen Bedingungen kultivierten Zellen das Potential besitzt, CD31 zu exprimieren und mit Dil-markierte acetylierte Lipoproteine rasch zu internalisieren. Allerdings konnte keine vWF-Expression nachgewiesen werden und die *tube formation* auf Matrigel muss formal als negativ bezeichnet werden. Zur genaueren Einordnung könnten noch weitere endotheliale Marker wie z.B. KDR, VE-Cadherin und eNOS untersucht werden.

4.2 Adipogene Differenzierung

Da es sich in dieser Arbeit um eine Anwendung für das Fettgewebe-TE handelt, galt ein Teil der Experimente der Untersuchung der Auswirkungen der oben beschriebenen Kulturbedingungen auf die adipogene Differenzierung der ASC. Hier wurde zunächst der Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der ASC untersucht. Dazu wurden die Zellen in Adipozyten-spezifischem Medium (PGM-2), welches bFGF und VEGF jeweils alleine oder in Kombination enthielt, kultiviert. In den nicht-induzierten Gruppen zeigte sich unter bFGF-Einfluss eine deutliche Proliferationssteigerung. Dies ist konsistent mit der Funktion *in vivo*, hier stimuliert bFGF u.a. die Proliferation und Migration mesenchymaler Zellen [119]. In der VEGF-Gruppe zeigte sich hingegen kein Anstieg der Proliferationsrate. Bei den hormonell zur adipogenen Differenzierung induzierten Gruppen war keine signifikante Erhöhung der Zellzahl erkennbar. Hier hat sich durch Einfluss der adipogenen Induktoren das Zellprogramm von Proliferation zu Differenzierung verschoben, was wiederum in den Triglycerid-Assays sichtbar wird.

Um zu untersuchen, ob die adipogene Differenzierung der ASC durch die hier verwendeten Wachstumsfaktoren und -konzentrationen gestört wird, wurde zur Quantifizierung der Adipogenese der intrazelluläre Triglyceridgehalt ermittelt. Eine signifikante Beeinträchtigung der adipogenen Differenzierung war hier nicht feststellbar, alle drei Gruppen zeigten wie die Kontrollgruppe einen Anstieg der intrazellulären Fettakkumulation nach 23 Tagen Kultivierung in adipogenem Medium unter Zusatz der Wachstumsfaktoren. Zur Wirkung von VEGF auf die adipogene Differenzierung der ASC *in vitro* gibt es in der Literatur kaum Untersuchungen, allerdings existieren Beobachtungen aus *in vivo*-Studien, die nachweisen, dass VEGF *in vivo* die Adipogenese fördert [120]. Dies ist allerdings wahrscheinlich durch Förderung der Vaskularisierung mit nachfolgender Verbesserung der Adipogenese bedingt.

Sung et al. zeigten beispielsweise, dass VEGF-Knockoutmäuse (*adipose tissue-specific VEGF knockout mice*) eine geringere vaskuläre Dichte des Fettgewebes sowie einen geringeren Anteil an Fettgewebe hatten, wohingegen Mäuse mit Überexpression von VEGF einen Anstieg der Fettgewebevaskularisation und nachfolgend auch reifen Fettgewebes aufwiesen [121]. Auch Tang et al. fanden im Rahmen einer Studie für neue Präventions- und Therapiestrategien für Adipositas heraus, dass (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG – ein Bestandteil von grünem Tee) die VEGF Expression in murinen Präadipozyten als auch in reifen Adipozyten inhibiert und dass dadurch sowohl Angiogenese als auch Adipogenese supprimiert wurden [122]. In beiden Studien wird erneut der enge Zusammenhang zwischen Angiogenese und Adipogenese verdeutlicht. Auch für bFGF konnte bereits eine, die Angiogenese als auch Adipogenese, fördernde Wirkung nachgewiesen werden [105]. Bezüglich der bFGF-Wirkung auf die adipogene Differenzierung von Stammzellen aus dem Fettgewebe bzw. Knochenmark beschreiben Kakudo et al. sowie Neubauer et al. eine Förderung der adipogenen Differenzierung von ASC bzw. BMSC durch den Wachstumsfaktor v.a. dann, wenn er während der Proliferationsphase, also vor Zugabe des Hormoncocktails zur adipogenen Induktion, dem Medium hinzugefügt wird. Während Neubauer et al. auch bei Zusatz von bFGF nur in der Differenzierungsphase eine geringe Steigerung der Adipogenese sahen,

konnten Kakudo et al. in diesem Fall keinen positiven Effekt feststellen [123, 124]. In dieser Arbeit wurden die Wachstumsfaktoren erst mit Beginn der adipogenen Induktion eingesetzt und es zeigte sich keine Steigerung der Adipogenese unter dem Einfluss von bFGF.

Im Hinblick auf die endotheliale Differenzierung der ASC hatte die Reduktion der Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung positive Auswirkungen. Um herauszufinden, ob die adipogene Differenzierung durch Hypoxie beeinträchtigt wird, wurden auch die adipogen induzierten ASC einer Sauerstoffkonzentration von 3% ausgesetzt. Zur Visualisierung der intrazellulären Fettakkumulation wurden die adipogen induzierten und in PGM-2 kultivierten ASC nach 16 Tagen mit einer ORO-Lösung gefärbt. Die in Hypoxie kultivierten ASC zeigten keine morphologischen Unterschiede zur in Normoxie kultivierten Kontrollgruppe. Zu diesem Ergebnis kamen auch Yamamoto et al., allerdings führten sie Untersuchungen an murinen ASC durch [111]. In allen drei Gruppen der unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen (HH, HN, NN) ließ sich zudem rein optisch ein vergleichbarer Anteil an rot gefärbten und somit adipogen differenzierten Zellen nachweisen, dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen proliferiert wurden. Als weitere Nachweismethode für die adipogene Differenzierung wurde eine quantitative rt-PCR zur Untersuchung Adipogenese-relevanter Gene durchgeführt. Es wurden zum einen die Genexpressionslevel zweier Transkriptionsfaktoren der frühen Adipogenese – C/EBP α und PPAR γ – untersucht, als auch Genexpressionslevel von Markern der reifen Adipozyten – FABP4 und GLUT4. Es galten die gleichen Versuchsbedingungen wie oben aufgeführt. Vergleicht man die Ergebnisse der an Tag 16 untersuchten induzierten Zellen, so zeigte sich eine leichte Erhöhung der Expressionsrate der in Hypoxie kultivierten Zellen bei PPAR γ und GLUT4, jedoch umgekehrte Verhältnisse bzw. kaum Unterschiede bei C/EBP α und FABP4. Insgesamt zeigte sich somit auch auf molekularer Ebene, dass die adipogene Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen nicht beeinträchtigt wird.

Der Einfluss der Hypoxie auf die Differenzierbarkeit von ASC zu Adipozyten oder auch in andere Zelllinien wird allerdings kontrovers diskutiert, denn hier wurden bislang unterschiedliche Ergebnisse gewonnen. So beschreiben einige

Gruppen die Abnahme des Differenzierungspotentials sowohl auf struktureller (ebenfalls mittels ORO-Färbung) als auch auf molekularer Ebene mittels rt-PCR, wobei in allen Experimenten eine adipogene Differenzierung nachweisbar war [117, 125, 126]. Choi et al. führten die Experimente beispielsweise mit humanen ASC durch, welche bei 2% Sauerstoff in DMEM mit adipogenen Induktoren (IBMX, Indomethacin, Dexamethason und Insulin) kultiviert wurden [125]. Kang et al. setzten dagegen 3T3-L1 Präadipozyten ein und Valorani et al. murine BMSC [117, 127]. Ren et al. hingegen berichteten bei Versuchen mit murinen BMSC von einem fünf- bis sechsfachen Anstieg der intrazellulären Fetttröpfchenakkumulation nach acht Tagen Kultivierung in Hypoxie (hier 8% O₂) im Vergleich zu Normoxie [128]. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich zum einen aus dem unterschiedlichen Ursprung der eingesetzten Zellen (unterschiedliche Spezies und Lokalisation (ASC/BMSC), zum anderen durch die Verwendung unterschiedlicher Medien und -zusätze sowie durch die Anwendung variierender Sauerstoffkonzentrationen erklären.

4.3 Schlussfolgerung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ASC, sowohl unter Einfluss angiogener Wachstumsfaktoren als auch durch Kultivierung in hypoxischer Umgebung, endotheliale Eigenschaften annehmen. Im Vergleich zu VEGF konnte für bFGF ein stärkerer Effekt nachgewiesen werden. Unter normoxischen Bedingungen erzielte die Kombination der Wachstumsfaktoren die besten Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl differenzierter Zellen. Durch Verknüpfung der beiden Bedingungen (Wachstumsfaktorenzugabe und Hypoxie) ließ sich nochmals, und das abhängig von der Konzentration der eingesetzten Wachstumsfaktoren, die Anzahl CD31-positiver Zellen steigern. Offenbar existiert ein Synergismus zwischen Hypoxie und Wachstumsfaktoren, denn unter diesen Bedingungen zeigte sich ein überadditiver Effekt im Vergleich zum Einsatz der Einzelfaktoren. In zukünftigen weiterführenden Versuchen sollte zur Quantifizierung dieses Effekts beispielsweise mittels PCR bzw. FACS-Untersuchung das Ausmaß der Expression weiterer endothelialer Marker in den verschiedenen Gruppen näher untersucht werden.

Neben der endothelialen Differenzierung der ASC konnte gezeigt werden, dass die adipogene Differenzierung von ASC durch die Verwendung angiogener Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF) sowie durch Hypoxie nicht beeinträchtigt wird. Da in den die Adipogenese betreffenden Versuchen adipozytenspezifisches Medium verwendet wurde, sollten weiterführende Versuchsansätze auch mit Kombinationsmedium bzw. in endothelzellspezifischem Medium mit Induktionscocktail durchgeführt werden.

Auch wenn es insgesamt nur eine geringe Menge an Zellen der Ausgangspopulation war, die endothelial differenzierten, konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des Einflusses der Wachstumsfaktoren und Auswirkungen der Hypoxie auf die ASC sowie auf deren Differenzierbarkeit festgestellt werden. In wie weit sich diese Kultivierungsbedingungen positiv auf eine Anwendung im TE von Fettgewebe übertragen lassen, muss in weiterführenden Tierversuchen nach entsprechender Präkultivierung näher untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In der regenerativen Medizin gewinnt die Herstellung eines funktionsfähigen und biokompatiblen Gewebeersatzes durch Techniken des Tissue Engineerings zunehmende Bedeutung [129]. Eine Grundlage dieser Technologie bilden körpereigene Zellen, die sich *in vitro* kultivieren und in verschiedene Gewebetypen differenzieren lassen, sogenannte adulte mesenchymale Stammzellen. Diese können u.a. aus Fettgewebe leicht und in größerer Anzahl isoliert und kultiviert werden (*adipose-derived stem cells*, ASC) [31]. In Anwesenheit Zelllinien-spezifischer Induktoren lassen sich diese Zellen zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren und für die Herstellung entsprechender Gewebekonstrukte nutzen [2, 130]. Eine erfolgreiche Differenzierung dieser Stammzellen zu Endothelzellen könnte in den durch Tissue Engineering generierten Gewebekonstrukten die Ausbildung eines funktionsfähigen Blutgefäßsystems *in vivo* beschleunigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die endotheliale Differenzierung von ASC unter Zusatz angiogener Wachstumsfaktoren sowie hypoxischer Behandlung der Zellen zu untersuchen und im Hinblick auf eine Anwendung im Tissue Engineering zu optimieren. Dabei sollte gleichzeitig untersucht werden, ob unter diesen Bedingungen die Differenzierung der ASC in eine andere Zelllinie (Adipozyten) möglich ist.

Die Untersuchungen wurden mit Stammzellen durchgeführt, welche mittels Liposuktion aus subkutanem Fettgewebe gewonnen wurden. Diese Zellen wurden zunächst vergleichend in endothelzellspezifischem Medium mit angiogenen Faktoren (VEGF, bFGF) bzw. unter hypoxischen Bedingungen (3% Sauerstoff) kultiviert und die Differenzierung zu Endothelzellen anhand verschiedener endothelzellspezifischer Marker nachgewiesen. Zunächst wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung die Expression des endothelialen Oberflächenantigens CD31 untersucht. Eine Quantifizierung der CD31-positiven Zellpopulation erfolgte im Anschluss durch Auszählung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops. Die endotheliale Differenzierung der ASC konnte bereits nach Zugabe der einzelnen Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Der kombinierte Einsatz der beiden Faktoren führte zu einem Anstieg CD31-positiver Zellen. Des Weiteren ließ sich eine stärkere induktive Wirkung für

bFGF im Vergleich zu VEGF demonstrieren. Durch Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen konnte ebenfalls eine endotheliale Differenzierung erzielt werden. Diese entsprach im Umfang etwa dem Ausmaß an differenzierten Zellen unter Wachstumsfaktoreinfluss in Normoxie. Als aussichtsreichste Kultivierungsstrategie für die endotheliale Differenzierung der ASC stellte sich jedoch die Kultivierung der Zellen unter Einsatz der Wachstumsfaktorkombination (bFGF und VEGF) in Hypoxie dar. Hier konnte zum einen eine Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Faktoren demonstriert werden und zum anderen ein Synergismus zwischen Hypoxie und kombiniertem Wachstumsfaktoreinsatz festgestellt werden. Denn die Anzahl an CD31-positiven Zellen in der Gruppe mit den hochkonzentriert zugesetzten Wachstumsfaktoren entsprach nicht einfach der Addition der Zellzahl unter Einzelbedingungen, sondern lag deutlich höher.

Insgesamt ist das Ausmaß der endothelial differenzierten ASC im Vergleich zur Ausgangspopulation allerdings als gering zu beurteilen, denn nur 0,5 - 1,1% der eingesetzten ASC zeigten endotheliale Marker. Zur weiteren Charakterisierung der endothelial differenzierten ASC wurden die endothelzellspezifische Aufnahme von DilacLDL, ein mit dem Farbstoff Dil markiertes Lipoprotein, und die *tube formation* auf Matrigel untersucht. Hier konnte bei einigen Zellen die Inkorporation von DilacLDL nachgewiesen werden. Beim Matrigel-Assay zeigten sich allerdings deutliche morphologische Unterschiede im Vergleich zu naiven Endothelzellen. Eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den von Willebrand Faktor fiel negativ aus.

Um den positiven Einfluss der hypoxischen Kulturbedingungen weiter zu ermitteln, wurde der Effekt der Hypoxie auf die Sekretion angiogener Wachstumsfaktoren am Beispiel von VEGF mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) untersucht. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der endogenen VEGF-Sekretion unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Normoxie. Die Steigerung der endogenen Wachstumsfaktorsekretion hat möglicherweise einen Anteil am Mechanismus des Hypoxieeffektes. Hier sollten weitere Untersuchungen, allen voran zur bFGF-Sekretion angeschlossen werden.

Neben der endothelialen Differenzierung der ASC wurde überprüft, ob unter den oben genannten Bedingungen eine adäquate Adipogenese stattfindet. Das wurde durch quantitative Messung des Triglyceridgehalts sowie Untersuchung der Expression adipogener Marker wie CEBP α , PPAR γ , FABP und GLUT 4 erfasst. Hier konnte gezeigt werden, dass die Adipogenese der Stammzellen unter den beschriebenen Bedingungen unbeeinträchtigt bleibt und somit eine Anwendung im TE von Fettgewebe möglich macht.

Mit der endothelialen Differenzierung unter unterschiedlichen Bedingungen zeigen die Ergebnisse der Arbeit eine Facette des Potentials der ASC. Ob die endothelial differenzierten ASC tatsächlich zu einer Verbesserung der Vaskularisierung von TE-Konstrukten führen, sollte in einer weiterführenden *In-vivo*-Studie evaluiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Flynn, L. and Woodhouse, K.A., *Adipose tissue engineering with cells in engineered matrices*. Organogenesis, 2008. **4**(4): p. 228-35.
2. Bauer-Kreisel, P., Goepferich, A., and Blunk, T., *Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(7-8): p. 798-813.
3. Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R., *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
4. Rosen, E.D. and MacDougald, O.A., *Adipocyte differentiation from the inside out*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 885-96.
5. Kahn, C.R., *Medicine. Can we nip obesity in its vascular bud?* Science, 2008. **322**(5901): p. 542-3.
6. Gomillion, C.T. and Burg, K.J., *Stem cells and adipose tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(36): p. 6052-63.
7. Guerre-Millo, M., *Adipose tissue hormones*. J Endocrinol Invest, 2002. **25**(10): p. 855-61.
8. Schaffler, A., Muller-Ladner, U., Scholmerich, J., and Buchler, C., *Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases*. Endocr Rev, 2006. **27**(5): p. 449-67.
9. Patrick, C.W., Jr., *Tissue engineering strategies for adipose tissue repair*. Anat Rec, 2001. **263**(4): p. 361-6.
10. Cao, Y., *Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2362-8.
11. Lijnen, H.R., *Angiogenesis and obesity*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(2): p. 286-93.
12. Christiaens, V. and Lijnen, H.R., *Angiogenesis and development of adipose tissue*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **318**(1-2): p. 2-9.
13. Taeger, C.D., Horch, R.E., Dragu, A., Beier, J.P., and Kneser, U., *[Perforator flaps. A new era in reconstructive surgery]*. Chirurg, 2012. **83**(2): p. 163-71.
14. Cina, A., Barone-Adesi, L., Rinaldi, P., Cipriani, A., Salgarello, M., Masetti, R., and Bonomo, L., *Planning deep inferior epigastric perforator flaps for breast reconstruction: a comparison between multidetector computed tomography and magnetic resonance angiography*. Eur Radiol, 2013. **23**(8): p. 2333-43.
15. Kawaguchi, N., Toriyama, K., Nicodemou-Lena, E., Inou, K., Torii, S., and Kitagawa, Y., *De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1062-6.
16. Kimura, Y., Ozeki, M., Inamoto, T., and Tabata, Y., *Time course of de novo adipogenesis in matrigel by gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor*. Tissue Eng, 2002. **8**(4): p. 603-13.
17. Tabata, Y., Miyao, M., Inamoto, T., Ishii, T., Hirano, Y., Yamaoki, Y., and Ikada, Y., *De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor*. Tissue Eng, 2000. **6**(3): p. 279-89.
18. Verseijden, F., Jahr, H., Posthumus-van Sluijs, S.J., Ten Hagen, T.L., Hovius, S.E., Seynhaeve, A.L., van Neck, J.W., van Osch, G.J., and Hofer, S.O., *Angiogenic capacity of human adipose-derived stromal cells during adipogenic differentiation: an in vitro study*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(2): p. 445-52.

19. Kilroy, G.E., Foster, S.J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., Ludlow, J.W., Stricker, D.M., Potiny, S., Green, P., Halvorsen, Y.D., Cheatham, B., Storms, R.W., and Gimble, J.M., *Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors*. J Cell Physiol, 2007. **212**(3): p. 702-9.
20. Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L., *Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells*. Circulation, 2004. **109**(10): p. 1292-8.
21. Casadei, A., Epis, R., Ferroni, L., Tocco, I., Gardin, C., Bressan, E., Sivoletta, S., Vindigni, V., Pinton, P., Mucci, G., and Zavan, B., *Adipose tissue regeneration: a state of the art*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 462543.
22. Porzionato, A., Sfriso, M.M., Macchi, V., Rambaldo, A., Lago, G., Lancerotto, L., Vindigni, V., and De Caro, R., *Decellularized omentum as novel biologic scaffold for reconstructive surgery and regenerative medicine*. Eur J Histochem, 2013. **57**(1): p. e4.
23. Young, D.A. and Christman, K.L., *Injectable biomaterials for adipose tissue engineering*. Biomed Mater, 2012. **7**(2): p. 024104.
24. Grant, D.S., Kleinman, H.K., and Martin, G.R., *The role of basement membranes in vascular development*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **588**: p. 61-72.
25. Cornelius, P., MacDougald, O.A., and Lane, M.D., *Regulation of adipocyte development*. Annu Rev Nutr, 1994. **14**: p. 99-129.
26. Farmer, S.R., *Transcriptional control of adipocyte formation*. Cell Metab, 2006. **4**(4): p. 263-73.
27. Green, H. and Kehinde, O., *Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells*. Cell, 1976. **7**(1): p. 105-13.
28. Minguell, J.J., Erices, A., and Conget, P., *Mesenchymal stem cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(6): p. 507-20.
29. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
30. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
31. De Ugarte, D.A., Ashjian, P.H., Elbarbary, A., and Hedrick, M.H., *Future of fat as raw material for tissue regeneration*. Ann Plast Surg, 2003. **50**(2): p. 215-9.
32. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
33. Tsuji, W., Rubin, J.P., and Marra, K.G., *Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration*. World J Stem Cells, 2014. **6**(3): p. 312-21.
34. De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Drago, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser,

- J., and Hedrick, M.H., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow*. Cells Tissues Organs, 2003. **174**(3): p. 101-9.
35. Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., Meng, Y., Han, Q., and Zhao, R.C., *Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(2): p. 370-9.
 36. Planat-Benard, V., Silvestre, J.S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L., and Casteilla, L., *Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives*. Circulation, 2004. **109**(5): p. 656-63.
 37. Konno, M., Hamabe, A., Hasegawa, S., Ogawa, H., Fukusumi, T., Nishikawa, S., Ohta, K., Kano, Y., Ozaki, M., Noguchi, Y., Sakai, D., Kudoh, T., Kawamoto, K., Eguchi, H., Satoh, T., Tanemura, M., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., and Ishii, H., *Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine*. Dev Growth Differ, 2013. **55**(3): p. 309-18.
 38. Avram, M.M., Avram, A.S., and James, W.D., *Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell*. J Am Acad Dermatol, 2007. **56**(3): p. 472-92.
 39. Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., and Pfeiffer, E.F., *Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1663-70.
 40. Hauner, H., Schmid, P., and Pfeiffer, E.F., *Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(4): p. 832-5.
 41. Serrero, G. and Lepak, N., *Endocrine and paracrine negative regulators of adipose differentiation*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20 Suppl 3**: p. S58-64.
 42. Armani, A., Mammi, C., Marzolla, V., Calanchini, M., Antelmi, A., Rosano, G.M., Fabbri, A., and Caprio, M., *Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity*. J Cell Biochem, 2010. **110**(3): p. 564-72.
 43. Miki, H., Yamauchi, T., Suzuki, R., Komeda, K., Tsuchida, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Kamon, J., Kaburagi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K., and Kadowaki, T., *Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2521-32.
 44. Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M., and Kliewer, S.A., *Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3406-10.
 45. Shi, X.M., Blair, H.C., Yang, X., McDonald, J.M., and Cao, X., *Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPARgamma2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation*. J Cell Biochem, 2000. **76**(3): p. 518-27.
 46. Santos, M.I. and Reis, R.L., *Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges*. Macromol Biosci, 2010. **10**(1): p. 12-27.

47. Schatteman, G.C. and Awad, O., *In vivo and in vitro properties of CD34+ and CD14+ endothelial cell precursors*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **522**: p. 9-16.
48. Schatteman, G.C., Dunnwald, M., and Jiao, C., *Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(1): p. H1-18.
49. Janeczek Portalska, K., Leferink, A., Groen, N., Fernandes, H., Moroni, L., van Blitterswijk, C., and de Boer, J., *Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46842.
50. Kim, S. and von Recum, H., *Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008. **14**(1): p. 133-47.
51. Davis, G.E. and Senger, D.R., *Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization*. *Circ Res*, 2005. **97**(11): p. 1093-107.
52. Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H., *Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages*. *Development*, 1998. **125**(9): p. 1747-57.
53. Nerem, R.M. and Girard, P.R., *Hemodynamic influences on vascular endothelial biology*. *Toxicol Pathol*, 1990. **18**(4 Pt 1): p. 572-82.
54. 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): p. 157-66.
55. Baguneid, M., Murray, D., Salacinski, H.J., Fuller, B., Hamilton, G., Walker, M., and Seifalian, A.M., *Shear-stress preconditioning and tissue-engineering-based paradigms for generating arterial substitutes*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004. **39**(Pt 2): p. 151-7.
56. Ott, M.J. and Ballermann, B.J., *Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to in vitro shear stress*. *Surgery*, 1995. **117**(3): p. 334-9.
57. Davies, P.F., *Flow-mediated endothelial mechanotransduction*. *Physiol Rev*, 1995. **75**(3): p. 519-60.
58. Konno, M., Hamazaki, T.S., Fukuda, S., Tokuhara, M., Uchiyama, H., Okazawa, H., Okochi, H., and Asashima, M., *Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **400**(4): p. 461-5.
59. Boquest, A.C., Noer, A., Sorensen, A.L., Vekterud, K., and Collas, P., *CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage*. *Stem Cells*, 2007. **25**(4): p. 852-61.
60. Takahashi, M., Suzuki, E., Oba, S., Nishimatsu, H., Kimura, K., Nagano, T., Nagai, R., and Hirata, Y., *Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine fashion in rat femoral artery*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(2): p. H415-23.
61. Thangarajah, H., Vial, I.N., Chang, E., El-Ftesi, S., Januszyk, M., Chang, E.I., Paterno, J., Neofytou, E., Longaker, M.T., and Gurtner, G.C., *IFATS*

- collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia.* Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 266-74.
62. Hamou, C., Callaghan, M.J., Thangarajah, H., Chang, E., Chang, E.I., Grogan, R.H., Paterno, J., Vial, I.N., Jazayeri, L., and Gurtner, G.C., *Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization.* Plast Reconstr Surg, 2009. **123**(2 Suppl): p. 45s-55s.
 63. Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P., and Gurtner, G.C., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1.* Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
 64. Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R., *Endothelial cells derived from human embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4391-6.
 65. Carmeliet, P. and Jain, R.K., *Angiogenesis in cancer and other diseases.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
 66. Laschke, M.W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., Torio-Padron, N., Schramm, R., Rucker, M., Junker, D., Haufel, J.M., Carvalho, C., Heberer, M., Germann, G., Vollmar, B., and Menger, M.D., *Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes.* Tissue Eng, 2006. **12**(8): p. 2093-104.
 67. Rouwkema, J., Rivron, N.C., and van Blitterswijk, C.A., *Vascularization in tissue engineering.* Trends Biotechnol, 2008. **26**(8): p. 434-41.
 68. Druecke, D., Langer, S., Lamme, E., Pieper, J., Ugarkovic, M., Steinau, H.U., and Homann, H.H., *Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy.* J Biomed Mater Res A, 2004. **68**(1): p. 10-8.
 69. Yang, S., Leong, K.F., Du, Z., and Chua, C.K., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors.* Tissue Eng, 2001. **7**(6): p. 679-89.
 70. Stosich, M.S., Bastian, B., Marion, N.W., Clark, P.A., Reilly, G., and Mao, J.J., *Vascularized adipose tissue grafts from human mesenchymal stem cells with bioactive cues and microchannel conduits.* Tissue Eng, 2007. **13**(12): p. 2881-90.
 71. Lovett, M., Lee, K., Edwards, A., and Kaplan, D.L., *Vascularization strategies for tissue engineering.* Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(3): p. 353-70.
 72. Novosel, E.C., Kleinhans, C., and Kluger, P.J., *Vascularization is the key challenge in tissue engineering.* Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(4-5): p. 300-11.
 73. Jain, R.K., Au, P., Tam, J., Duda, D.G., and Fukumura, D., *Engineering vascularized tissue.* Nat Biotechnol, 2005. **23**(7): p. 821-3.
 74. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.* Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
 75. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-93.
 76. Richardson, T.P., Peters, M.C., Ennett, A.B., and Mooney, D.J., *Polymeric system for dual growth factor delivery.* Nat Biotechnol, 2001. **19**(11): p. 1029-34.
 77. Chen, R.R., Silva, E.A., Yuen, W.W., and Mooney, D.J., *Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation.* Pharm Res, 2007. **24**(2): p. 258-64.

78. Zisch, A.H., Lutolf, M.P., and Hubbell, J.A., *Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors*. Cardiovasc Pathol, 2003. **12**(6): p. 295-310.
79. Ehrbar, M., Djonov, V.G., Schnell, C., Tschanz, S.A., Martiny-Baron, G., Schenk, U., Wood, J., Burri, P.H., Hubbell, J.A., and Zisch, A.H., *Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1124-32.
80. Ehrbar, M., Metters, A., Zammaretti, P., Hubbell, J.A., and Zisch, A.H., *Endothelial cell proliferation and progenitor maturation by fibrin-bound VEGF variants with differential susceptibilities to local cellular activity*. J Control Release, 2005. **101**(1-3): p. 93-109.
81. Lokmic, Z. and Mitchell, G.M., *Engineering the microcirculation*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(1): p. 87-103.
82. Vailhe, B., Vittet, D., and Feige, J.J., *In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis*. Lab Invest, 2001. **81**(4): p. 439-52.
83. Miller-Kasprzak, E. and Jagodzinski, P.P., *Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(4): p. 247-59.
84. Chen, X., Aledia, A.S., Popson, S.A., Him, L., Hughes, C.C., and George, S.C., *Rapid anastomosis of endothelial progenitor cell-derived vessels with host vasculature is promoted by a high density of cotransplanted fibroblasts*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(2): p. 585-94.
85. Hurley, J.R., Balaji, S., and Narboneva, D.A., *Complex temporal regulation of capillary morphogenesis by fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(2): p. C444-53.
86. Unger, R.E., Ghanaati, S., Orth, C., Sartoris, A., Barbeck, M., Halstenberg, S., Motta, A., Migliaresi, C., and Kirkpatrick, C.J., *The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature*. Biomaterials, 2010. **31**(27): p. 6959-67.
87. Borges, J., Muller, M.C., Momeni, A., Stark, G.B., and Torio-Padron, N., *In vitro analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix*. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2007. **16**(3): p. 141-8.
88. Chung, S., Sudo, R., Mack, P.J., Wan, C.R., Vickerman, V., and Kamm, R.D., *Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform*. Lab Chip, 2009. **9**(2): p. 269-75.
89. Black, M.J., Chait, L., O'Brien, B.M., Sykes, P.J., and Sharzer, L.A., *How soon may the axial vessels of a surviving free flap be safely ligated: a study in pigs*. Br J Plast Surg, 1978. **31**(4): p. 295-9.
90. Schultheiss, D., Gabouev, A.I., Cebotari, S., Tudorache, I., Walles, T., Schlote, N., Wefer, J., Kaufmann, P.M., Haverich, A., Jonas, U., Stief, C.G., and Mertsching, H., *Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model*. J Urol, 2005. **173**(1): p. 276-80.
91. Lee, K.Y., Peters, M.C., and Mooney, D.J., *Comparison of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in SCID mice*. J Control Release, 2003. **87**(1-3): p. 49-56.

92. Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., and Zetter, B.R., *Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein*. J Cell Biol, 1984. **99**(6): p. 2034-40.
93. Kubota, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., and Lawley, T.J., *Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1589-98.
94. Policha, A., Zhang, P., Chang, L., Lamb, K., Tulenko, T., and DiMuzio, P., *Endothelial differentiation of diabetic adipose-derived stem cells*. J Surg Res, 2014.
95. Hirschi, K.K., Ingram, D.A., and Yoder, M.C., *Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(9): p. 1584-95.
96. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 1**: p. S5-9.
97. Hutley, L.J., Herington, A.C., Shurety, W., Cheung, C., Vesey, D.A., Cameron, D.P., and Prins, J.B., *Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(5): p. E1037-44.
98. Wosnitza, M., Hemmrich, K., Groger, A., Graber, S., and Pallua, N., *Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation*. Differentiation, 2007. **75**(1): p. 12-23.
99. Jumabay, M., Abdmaulen, R., Urs, S., Heydarkhan-Hagvall, S., Chazenbalk, G.D., Jordan, M.C., Roos, K.P., Yao, Y., and Bostrom, K.I., *Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(6): p. 790-800.
100. Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C.A., Busse, R., and Bouloumie, A., *Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells*. Circulation, 2004. **110**(3): p. 349-55.
101. Zhang, P., Moudgill, N., Hager, E., Tarola, N., Dimatteo, C., McIlhenny, S., Tulenko, T., and DiMuzio, P.J., *Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(6): p. 977-88.
102. Woodfin, A., Voisin, M.B., and Nourshargh, S., *PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(12): p. 2514-23.
103. Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., and Leung, D.W., *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins*. Endocr Rev, 1992. **13**(1): p. 18-32.
104. Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J.A., Fiddes, J.C., and Gospodarowicz, D., *Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth*. Nature, 1987. **325**(6101): p. 257-9.
105. Marra, K.G., Defail, A.J., Clavijo-Alvarez, J.A., Badylak, S.F., Taieb, A., Schipper, B., Bennett, J., and Rubin, J.P., *FGF-2 enhances vascularization for adipose tissue engineering*. Plast Reconstr Surg, 2008. **121**(4): p. 1153-64.
106. Rophael, J.A., Craft, R.O., Palmer, J.A., Hussey, A.J., Thomas, G.P., Morrison, W.A., Penington, A.J., and Mitchell, G.M., *Angiogenic growth*

- factor synergism in a murine tissue engineering model of angiogenesis and adipogenesis.* Am J Pathol, 2007. **171**(6): p. 2048-57.
107. Isner, J.M., *Tissue responses to ischemia: local and remote responses for preserving perfusion of ischemic muscle.* J Clin Invest, 2000. **106**(5): p. 615-9.
 108. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.* Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
 109. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L., *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.* Embo j, 2000. **19**(16): p. 4298-309.
 110. Lorier, G., Tourino, C., and Kalil, R.A., *Coronary angiogenesis as an endogenous response to myocardial ischemia in adults.* Arq Bras Cardiol, 2011. **97**(6): p. e140-8.
 111. Yamamoto, Y., Fujita, M., Tanaka, Y., Kojima, I., Kanatani, Y., Ishihara, M., and Tachibana, S., *Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells.* Biores Open Access, 2013. **2**(3): p. 199-205.
 112. Matsumoto, A., Matsumoto, S., Sowers, A.L., Koscielniak, J.W., Trigg, N.J., Kuppusamy, P., Mitchell, J.B., Subramanian, S., Krishna, M.C., and Matsumoto, K., *Absolute oxygen tension (pO₂) in murine fatty and muscle tissue as determined by EPR.* Magn Reson Med, 2005. **54**(6): p. 1530-5.
 113. Holzwarth, C., Vaegler, M., Gieseke, F., Pfister, S.M., Handgretinger, R., Kerst, G., and Muller, I., *Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells.* BMC Cell Biol, 2010. **11**: p. 11.
 114. Yin, J., Gao, Z., He, Q., Zhou, D., Guo, Z., and Ye, J., *Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(2): p. E333-42.
 115. Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R., *Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response.* Diabetes, 2009. **58**(3): p. 718-25.
 116. Goossens, G.H., Bizzarri, A., Venteclef, N., Essers, Y., Cleutjens, J.P., Konings, E., Jocken, J.W., Cajlakovic, M., Ribitsch, V., Clement, K., and Blaak, E.E., *Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation.* Circulation, 2011. **124**(1): p. 67-76.
 117. Valorani, M.G., Germani, A., Otto, W.R., Harper, L., Biddle, A., Khoo, C.P., Lin, W.R., Hawa, M.I., Tropel, P., Patrizi, M.P., Pozzilli, P., and Alison, M.R., *Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential.* Cell Tissue Res, 2010. **341**(1): p. 111-20.
 118. Chen, G., Shi, X., Sun, C., Li, M., Zhou, Q., Zhang, C., Huang, J., Qiu, Y., Wen, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Yang, S., Lu, L., Zhang, J., Yuan, Q., Lu, J., Xu, G., Xue, Y., Jin, Z., Jiang, C., Ying, M., and Liu, X., *VEGF-*

- mediated proliferation of human adipose tissue-derived stem cells*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e73673.
119. Chiou, M., Xu, Y., and Longaker, M.T., *Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(2): p. 644-52.
 120. Zhang, Q., Hubenak, J., Iyyanki, T., Alred, E., Turza, K.C., Davis, G., Chang, E.I., Branch-Brooks, C.D., Beahm, E.K., and Butler, C.E., *Engineering vascularized soft tissue flaps in an animal model using human adipose-derived stem cells and VEGF+PLGA/PEG microspheres on a collagen-chitosan scaffold with a flow-through vascular pedicle*. Biomaterials, 2015. **73**: p. 198-213.
 121. Sung, H.K., Doh, K.O., Son, J.E., Park, J.G., Bae, Y., Choi, S., Nelson, S.M., Cowling, R., Nagy, K., Michael, I.P., Koh, G.Y., Adamson, S.L., Pawson, T., and Nagy, A., *Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis*. Cell Metab, 2013. **17**(1): p. 61-72.
 122. Tang, W., Song, H., Cai, W., and Shen, X., *Real Time Monitoring of Inhibition of Adipogenesis and Angiogenesis by (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in 3T3-L1 Adipocytes and Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. Nutrients, 2015. **7**(10): p. 8871-86.
 123. Kakudo, N., Shimotsuma, A., and Kusumoto, K., *Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(2): p. 239-44.
 124. Neubauer, M., Fischbach, C., Bauer-Kreisel, P., Lieb, E., Hacker, M., Tessmar, J., Schulz, M.B., Goepferich, A., and Blunk, T., *Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells*. FEBS Lett, 2004. **577**(1-2): p. 277-83.
 125. Choi, J.R., Pinguan-Murphy, B., Wan Abas, W.A., Noor Azmi, M.A., Omar, S.Z., Chua, K.H., and Wan Safwani, W.K., *Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **448**(2): p. 218-24.
 126. Kim, K.H., Song, M.J., Chung, J., Park, H., and Kim, J.B., *Hypoxia inhibits adipocyte differentiation in a HDAC-independent manner*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(4): p. 1178-84.
 127. Kang, S., Kim, S.M., and Sung, J.H., *Cellular and molecular stimulation of adipose-derived stem cells under hypoxia*. Cell Biol Int, 2014. **38**(5): p. 553-62.
 128. Ren, H., Cao, Y., Zhao, Q., Li, J., Zhou, C., Liao, L., Jia, M., Zhao, Q., Cai, H., Han, Z.C., Yang, R., Chen, G., and Zhao, R.C., *Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(1): p. 12-21.
 129. Johnson, P.C., Mikos, A.G., Fisher, J.P., and Jansen, J.A., *Strategic directions in tissue engineering*. Tissue Eng, 2007. **13**(12): p. 2827-37.
 130. Gimble, J.M., Katz, A.J., and Bunnell, B.A., *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1249-60.

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung der Herstellung eines TE-Konstrukts	6
2	Exemplarische Bilder der Cytospin-CD31-Immunfluoreszenzfärbung zum Ausschluss der Selektion CD31-positiver Zellen	36
3	Endotheliale Differenzierung von ASC unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren	37
4	Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die endotheliale Differenzierung der ASC	38
5	Einfluss der Hypoxie auf die endotheliale Differenzierung	40
6	Einfluss der Kombination von Hypoxie und Wachstumsfaktoren auf die endotheliale Differenzierung	41
7	DilacLDL-Uptake der endothelial differenzierten ASC	44
8	Morphologische Veränderungen der ASC auf Matrigel im zeitlichen Verlauf	46
9	Charakterisierung der Strukturen von auf Matrigel kultivierten ASC im Vergleich zu hMVEC	47
10	Nachweis des von Willebrand Faktors mittels Immunfluoreszenzfärbung	48
11	Bestimmung der Konzentration von VEGF im Kulturüberstand endothelial stimulierter ASC mittels ELISA	50
12	Proliferation der ASC unter Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffbedingungen und Wachstumsfaktoren	52
13	Proliferation der ASC unter Einfluss von Wachstumsfaktoren	53
14	Proliferation von adipogen kultivierten ASC	55
15	Intrazelluläre Fettakkumulation von adipogen kultivierten ASC unter Einfluss von Wachstumsfaktoren	56
16	Einfluss der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF auf die adipogene Differenzierung der ASC	57
17	Einfluss der Hypoxie auf die Morphologie adipogen differenzierter ASC	58

18	Relative Genexpression der adipogenese-assoziierten Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PPAR γ von adipogen induzierten ASC unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen	60
19	Relative Genexpression der adipogenen Marker der Spätphase GLUT 4 und FABP 4 von adipogen induzierten ASC unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen	61

Tabellenverzeichnis

1	Mediengruppennamen und -zusammensetzungen der endothelialen Differenzierung	27
2	Tabellarische Darstellung des zeitlichen Versuchsverlaufs der endothelialen Differenzierung	28
3	Mediengruppennamen und -zusammensetzungen der adipogenen Differenzierung	28
4	Tabellarische Darstellung des zeitlichen Versuchsverlaufs der adipogenen Differenzierung	28
5	Tabellarische Darstellung der Variation der Sauerstoffkonzentration im zeitlichen Verlauf	29
6	Tabellarische Übersicht der Kulturbedingungen der endothelialen Differenzierung	30

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
Ac	acetyliert
Ang 1	Angiopoetin 1
ASC	adipose-derived stem cell
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Arteriovenös
BAE	bovine aortic endothelial cell
BCE	bovine capillary endothelial cell
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
BMSC	bone marrow-derived stem cells
BMI	body mass index
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy/complementary deoxyribonucleic acid
C/EBP α,β,γ	CAAT-enhancer binding protein α,β,γ
CO ₂	Kohlendioxid
CT	cycle threshold
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIEP	deep inferior epigastric artery perforator
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EC	Endothelzellen
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGM	endothelial growth medium
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay

EPC	endothelial progenitor cell
EZM	Extrazellulärmatrix
FABP4	fatty acid binding protein 4
FBS	fetal bovine serum
FLK-1	fetal liver kinase -1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GA-1000	Gentamicin
GLUT4	glucose transporter type 4
H	Hypoxie
HDMEC	human dermal microvascular endothelial cell
HIF-1 α	hypoxia inducible factor – 1 α
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
HMVEC	human microvascular endothelial cell
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IGF-1	insulin-like growth factor - 1
KDR	Kinase insert domain receptor
KLF-5/-15	Krüppel-like factor 5/15
LDL	low density lipoprotein
MEM α	Minimum Essential Medium alpha modification
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	mesenchymal stem cell
N	Normoxie
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
O ₂	Sauerstoff
ORO	Oil Red O
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PEG	poly(ethylene glycol)
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEGDA	poly(ethylene glycol)-diacrylate

PGA	polyglycolic acid
PGI ₂	Prostacyclin
PGF	placental growth factor
PGM-2	preadipocyte growth medium - 2
PenStrep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PLA	polylactic acid
PLGA	poly(lactic-co-glycolic) acid
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RGD-Peptid	Arginin-Glycin-Aspartat-Säure Peptid
rpm	rounds per minute
RQ	relative expression level
SDF-1	stromal derived factor - 1
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein 1c
SVF	Stromal-vaskuläre-Fraktion
TE	Tissue Engineering
TRAM	transverse rectus abdominus myocutaneous
t-PA	tissue plaminogen activator
TGF β	transforming growth factor beta
TNF α	tumor necrosis factor alpha
UCP-1	uncoupling protein -1
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrand Faktor
YISGSR-Peptid	Tyrosin–Isoleucin–Glycin–Serin–Arginin - Peptid
3D	dreidimensional

Veröffentlichung

Posterpräsentation

Lenertz A., Wittmann K., Blunk T., Bauer-Kreisel P., *Differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells towards the endothelial lineage by combination of hypoxic treatment and angiogenic growth factors*. 3rd International Conference "Strategies in Tissue Engineering", Würzburg, Germany (2012)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Torsten Blunk für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und des Arbeitsplatzes sowie die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe.

Herzlich möchte ich mich außerdem bei meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Petra Bauer-Kreisel bedanken, die mich tatkräftig bei der Planung und Umsetzung der Experimente sowie bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit unterstützte. Für die Einführung in das experimentelle und wissenschaftliche Arbeiten sowie die Hilfe bei der Durchführung der Versuche möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, allen voran Katharina Wittmann und Christian Muhr, aber auch Katharina Werner, Susanne Dietl, Thomas Böck, Martin Krähnke, Christiane Höfner, Miriam Wiesner, Oliver Berberich und Markus Nestmeyer bedanken. Auch bei Frau Sabine Müller und Frau Dr. Irina Chodnevsckaja möchte ich mich für die Hilfestellung bei der Durchführung einiger Untersuchungen bedanken. Ebenso bei Frau Melanie Riechwald und Frau Juliane Neumann für die Hilfe bei organisatorischen Fragen.

Des weiteren gilt mein Dank der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg für die Gewährung des Promotionsstipendium und der damit verbundenen finanziellen Unterstützung zur Durchführung dieser Dissertation.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie, im Besonderen bei meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und die Durchführung der Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben. Ebenso möchte ich mich bei meinem Mann für die seelische und moralische Unterstützung während sämtlicher Höhen und Tiefen der Arbeit bedanken.

