

Universität Stuttgart

HOHENSTEIN
INSTITUTE

**Entwicklung eines autologen Fettgewebeersatzes
mit angiogenen Eigenschaften auf Basis einer
adipogenen Alginatmatrix in Kombination mit
humanen mesenchymalen Stammzellen**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens-, und Biotechnik
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Marina Handel, geb. Müller

aus Heilbronn

Hauptberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier - Universität Stuttgart

Mitberichter: Prof. Dr. Dirk Höfer - Hohenstein Institute

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juli 2013

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart

2013

Handel, Marina

Entwicklung eines autologen Fettgewebeersatzes mit angiogenen Eigenschaften auf Basis einer adipogenen Alginatmatrix in Kombination mit humanen mesenchymalen Stammzellen

Universität Stuttgart - Institut für Zellbiologie und Immunologie
Hohenstein Institute - Hygiene, Umwelt & Medizin

*Jeden Tag ein bissl weiter,
jeden Tag ein bissl g'scheiter.*

Zusammenfassung

Die Rekonstruktion von subkutanem Fettgewebe stellt die Plastische Chirurgie noch immer vor eine große Herausforderung, denn für großflächige Gewebeschäden steht meist nicht ausreichend patienteneigenes Gewebe zur Verfügung. In der Regenerativen Medizin arbeitet man daher an künstlichem Fettgewebeersatz. Aufgrund der schlechten Vaskularisierung weisen diese Ansätze jedoch eine unzureichende Nährstoffversorgung auf, woraus eine Transplantatvolumenreduktion von bis zu 60 % resultiert. In dieser Arbeit wurde daher der Ansatz des "Adipose Tissue Engineering" (ATE) verfolgt, einer neuen Variante zur Rekonstruktion von subkutanem Fettgewebe. Geeignete Trägerstrukturen (z.B. textile Implantate) wurden mit patienteneigenen Vorläuferzellen besiedelt und zu Fettzellen differenziert, um autologes Fettgewebe *in situ - de novo* zu generieren. Dieser Fettgewebeersatz auf Basis humaner Stammzellen aus Fettgewebe (hASC) zeigte dabei ausgeprägte angiogene Eigenschaften. Das adipogene Differenzierungspotenzial sowie die Sekretion pro-angiogener Zytokine der hASC wurde ermittelt. Ein spezifischer VEGF-Knockdown bestätigte VEGF als potentes pro-angiogenes Zytokin, weshalb die VEGF-Sekretion stellvertretend für weitere pro-angiogene Zytokine humaner ASC ermittelt wurde. Standardisierte *in vitro* Angiogenese-Modelle belegten ein erhöhtes angiogenes Potenzial hASC besiedelter Implantate. Diese *in vitro* Ergebnisse wurden mit dem *in vivo* CAM Angiogenese Assay bestätigt. Die Kombination von Implantatmaterialien mit hASC zeigte auch hierbei stets ein verbessertes angiogenes Potenzial. Mit fortschreitender adipogener Differenzierung nahm die VEGF-Sekretion humaner ASC hingegen rapide ab. Um das pro-angiogene Potenzial der Vorläuferzellen *post transplantationem* nutzen zu können, ist daher zu empfehlen, native hASC zu verwenden. Hierzu wurden erste adipogene Alginatstrukturen entwickelt, welche über integrierte Differenzierungsfaktoren eine adipogene Differenzierung immobilisierter hASC induzierten. Die Ergebnisse dieses Ansatz des ATE zeigten auf, dass eine Differenzierung der Vorläuferzellen durch das Scaffoldmaterial *post transplantationem* induziert werden kann, was aus therapeutischer Sicht sowohl die erforderliche VEGF-Sekretion humaner ASC und somit das angiogene Potenzial zum Zeitpunkt der Implantation sicherstellen, als auch die Zeitspanne vor einer Geweberekonstruktion deutlich verkürzen würde.

Abstract

The reconstruction of subcutaneous adipose tissue still presents a large challenge in plastic surgery. For a sufficient reconstruction of large scale damages there is often a lack of autologous tissue. Therefore, current approaches in regenerative medicine are marking on artificial fat substitutes. Due to poor vascularization and an insufficient supply of nutrients, these approaches often result in graft volume reductions up to 60 %. Therefore, we followed the "Adipose Tissue Engineering" (ATE) - a new approach for the reconstruction of subcutaneous adipose tissue. Suitable scaffold materials (e.g. textile implants made of polypropylene) were seeded with autologous progenitor cells which were then differentiated into adipocytes in order to build adipose tissue *in situ - de novo*. This new approach for fat regeneration based on human adipose tissue-derived stem cells (hASC) showed distinct angiogenic properties. A specific VEGF knockdown in hASC confirmed VEGF as potent pro-angiogenic cytokine. Therefore, VEGF secretion was determined substitutional for further pro-angiogenic cytokines of hASC. Standardized *in vitro* angiogenesis models showed increased angiogenesis when hASC were seeded onto the implant materials. These *in vitro* results were correlated and finally confirmed by *in vivo* CAM angiogenesis assays. In these experiments, the combination of implant materials with undifferentiated hASC constantly showed an enhanced angiogenic potential. However, with progressing adipogenic differentiation of the hASC, the VEGF secretion decreased significantly. To benefit from the pro-angiogenic potential of the progenitor cells after transplantation, the use of native hASC is highly recommended. For this purpose, first adipogenic alginate scaffolds with incorporated differentiation factors were developed, which directly induce the adipogenic differentiation of immobilized hASC.

This ATE-approach showed the differentiation of the progenitor cells induced by the scaffold material. From a therapeutic point of view, this ATE-approach would ensure the required VEGF secretion of hASC and thus the angiogenic potential at the time of implantation as well as a significantly shorter period of time prior to a tissue reconstruction surgery.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angaben von Quellen kenntlich gemacht worden sind. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Studiengang als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

Publikationsliste

Englischsprachige Veröffentlichungen zur Dissertation (peer review)

**45S5-Bioglass[®] based 3D scaffolds seeded with human adipose tissue
derived stem cells (hASC)**

Handel M, Hammer TR, Nooeaid P, Boccaccini AR, Höfer D
Tissue Engineering Part A (accepted)

**Adipogenic differentiation of scaffold-bound ASC for soft tissue
engineering**

Handel M, Hammer TR, Höfer D
Biomed Mater.2012 Oct; 7(5): 054107(2012)

Englischsprachige Veröffentlichungen zur Dissertation (full text conference proceedings)

**Induction of blood vessel formation by biofunctionalized fibrous implants
in tissue engineering**

Müller M, Hammer TR, Höfer D
Proceedings of the FiberMed11 Conference

Fiber-based approaches for innovative wound care

Hohn G, Müller M, Höfer D
Proceedings of the FiberMed11 Conference

Sonstige englischsprachige Veröffentlichungen

(peer review)

Effects of cigarette smoke residues from textiles on fibroblasts, neurocytes and zebrafish embryos and nicotine permeation through human skin

Hammer TR, Fischer K, Müller M, Höfer D

International Journal of Hygiene and Environmental Health 214(5): 384-391

Deutschsprachige Veröffentlichungen

Biologisierte Textilimplantate für die personalisierte Regenerationsmedizin.

Müller M, Hammer TR, Höfer D

Deutsche Zeitschrift für Klinische Forschung 01/02 2011

Hoffnung auf Heilung

Forschern in Hohenstein ist ein Durchbruch in der Regenerationsmedizin gelungen. Textile Implantate regen die Bildung neuer Blutgefäße an, wenn sie mit Stammzellen bestückt sind.

Hammer TR, Müller M, Höfer D

17. Juli 2010, *Bietigheimer Zeitung*

Pressemitteilungen

Kostbares Fettgewebe - keiner will es, jeder braucht es

Forscher wandeln Stammzellen auf 3D-Implantaten in Fettzellen, um künftig Verletzungen von Weichteilgewebe schneller behandeln zu können

Müller M, Hammer TR, Höfer D

19.07.2011, 277-DE

Hohensteiner Forscher erzielen Fortschritt bei der Biotoleranz textiler Implantate

Stammzellen regen Gefäßneubildung an und sorgen so für optimiertes Einwachsen von Textilimplantaten

Müller M, Hammer TR, Höfer D

05.05.2010, 303-DE

Teilaspekte dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt

Vortrag & Poster: Synthesis of biopolymer fibres and promotion into artificial fat tissue using human stem cells

Handel M, Höfer D

51st DORNBIRN MAN MADE FIBERS CONGRESS - Communicating the Future of Man-Made Fibers 2012, Dornbirn

Poster: Engineering soft tissue substitutes with hASC-biofunctionalized scaffolds

Handel M, Hammer TR, Höfer D

Strategies in Tissue Engineering - 3th International Conference 2011, Würzburg

Vortrag: Innovative approaches for the improvement of tissue engineering scaffold vascularisation

Hammer TR, Müller M, Höfer D

EUROMAT 2011, Montpellier

Vortrag: In vivo vascularisation of fibre-based scaffolds biofunctionalised with adult mesenchymal stem cells (conference abstract)

Hammer TR, Müller M, Höfer D

5th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine 2010, Hanover

Vortrag & Poster: Fibre-bound stem cells on scaffolds induce vascularization in the modified in vivo HET-CAM angiogenesis model

Hammer TR, Müller M, Höfer D

Biostar - 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine 2010, Stuttgart

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	iv
Abbildungsverzeichnis	xiv
Tabellenverzeichnis	xvii
Abkürzungsverzeichnis	xviii
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung des Fettgewebes	2
1.1.1 Funktion des Fettgewebes	2
1.2 Derzeitige Strategien zum Gewebersatz	4
1.2.1 Allogene Transplantate	4
1.2.2 Alloplastische Transplantate	5
1.2.3 Xenogene Transplantate	5
1.2.4 Autologe Transplantate	6
1.2.5 Autologe Fettgewebstransplantation	6
1.2.6 Tissue Engineering in der Regenerativen Medizin	7
1.2.7 Alloplastische Implantate aus Biopolymeren zur Rekonstruktion von Fettgewebe	7
1.2.8 Aktuelle Techniken: "Adipose Tissue Engineering"	9
1.3 Angiogenese	10
1.3.1 Physiologische und pathologische Angiogenese	11

1.3.2	Bedeutung der Angiogenese für die Medizin	11
1.4	Kontrollmechanismen der Angiogenese	12
1.4.1	Stimulation und Inhibition der Angiogenese	12
1.4.2	Vascular Endothelial Growth Factor	13
1.4.3	VEGF als Schlüsselfaktor in der Regenerativen Medizin	15
1.5	Die Chorioallantoismembran	16
1.5.1	Entwicklung der Chorioallantoismembran	17
1.5.2	Bedeutung des CAM-Modells für die Wissenschaft	18
1.6	Ziele dieser Arbeit	20
2	Material & Methoden	22
2.1	Geräte	22
2.2	Verbrauchsmaterial	24
2.3	Chemikalien, Zellkulturmedien und -zusätze	25
2.4	Primersequenzen	29
2.5	siRNA	30
2.6	Testreagenzien und Kits	30
2.7	Verbrauchsmaterial Histologie	31
2.7.1	Histologische Farbstoffe	31
2.7.2	Fluoreszenzfarbstoffe	31
2.8	Antikörper	31
2.9	Zellbiologische Methoden	33
2.9.1	Isolierung und Kultivierung humaner ASC	33
2.9.2	Isolierung humaner ASC	33
2.9.3	Kultivierung humaner ASC	34
2.9.4	Charakterisierung humaner ASC	36
2.9.5	Adipogene Differenzierung humaner ASC	39
2.9.6	Isolierung und Kultivierung porciner Stammzellen aus Fettgewebe (porcine adipose tissue-derived stem cells (pASC))	40

2.9.7	Isolierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)	40
2.9.8	Kryokonservierung HUVEC	41
2.9.9	HUVEC Charakterisierung	41
2.9.10	HUVEC Tube Formation Assay	42
2.9.11	Isolierung und Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten (<u>h</u> uman <u>f</u> ibroblasts from <u>a</u> dult <u>s</u> kin <u>t</u> issue (HF AST))	43
2.9.12	Proliferations- und Vitalitätstests	44
2.9.13	Besiedelung textiler Implantate mit humanen Zellen	45
2.10	Alginate in der Zellkultur	47
2.10.1	Externe Polymerisation: CaCl ₂ Fällbad	47
2.10.2	Externe Polymerisation: Tiefemperaturpolymerisation	47
2.10.3	Interne Polymerisation: CaCO ₃	48
2.11	Integration biologisch aktiver Substanzen in eine Alginatematrix	48
2.11.1	Freisetzungskinetik mittels Szintillationsmessung von ¹⁴ C D-Glukose/Concanavalin A	48
2.11.2	Immobilisierung humaner ASC in einer Alginatematrix	49
2.11.3	Herstellung einer adipogenen Alginatematrix	49
2.12	Molekularbiologische Standardmethoden	50
2.12.1	Isolierung der mRNA aus Gesamtzelllysaten	50
2.12.2	cDNA Synthese mittels Random-PCR	51
2.12.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
2.12.4	Agarose-Gelelektrophorese	53
2.13	Protein Knockdown mittels siRNA Transfektion	54
2.13.1	siRNA Transfektion	54
2.13.2	Nachweis des Knockdowns mittels ELISA	54
2.14	Histologie	55
2.14.1	Einbetten histologischer Proben zur Anfertigung von Gefrierschnitten	55

2.14.2	Einbetten biologischer Gewebeproben in Epoxidharz . . .	55
2.14.3	Einbetten biologischer Gewebeproben in LR-White . . .	57
2.14.4	HE-Färbung	57
2.15	Immunhistochemie	58
2.15.1	Antikörpermarkierung histologischer Proben	58
2.16	CAM Angiogenese Assay	60
2.16.1	Kultivierung der befruchteten Hühnereier	60
2.16.2	Öffnen der Eischale und Applikation der Proben	60
2.16.3	Auswertung des CAM Angiogenese Assays	60
2.17	Statistik	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Etablierung des CAM Angiogenese Assays	62
3.1.1	<i>Ex ovo</i> Methode	62
3.1.2	<i>In ovo</i> Methode	63
3.1.3	Makroskopische Auswertungsmethoden	64
3.1.4	Histologische Auswertung	66
3.2	Isolierung und Charakterisierung primärer Zellen	68
3.2.1	Isolierung und Charakterisierung humaner ASC	68
3.2.2	Isolierung und Charakterisierung: porcine ASC (pASC)	70
3.2.3	Isolierung und Charakterisierung humaner Endothelzellen aus der großen Nabelschnurvene (HUVEC)	71
3.3	Besiedelung von Implantatmaterialien	73
3.3.1	Optimierung der Zelladhäsion auf textilen Implantaten	73
3.3.2	Besiedelung textiler Implantate mit hASC	74
3.3.3	Besiedelung von 45S5 Bioglass [®] -basierten Glaskeramiken mit humanen Zellen	75
3.4	Eigenschaften humaner ASC <i>in vitro</i>	76

3.4.1	Vergleich der VEGF Sekretion primärer (P1) und bereits kultivierter (P8) hASC	77
3.4.2	Vergleich des adipogenen Differenzierungspotentials primärer (P1) und bereits kultivierter (P8) hASC	77
3.5	Verwendung humaner ASC im Adipose Tissue Engineering	80
3.5.1	VEGF-Sekretion nativer hASC	80
3.5.2	HUVEC Tube Formation Assay mit hASC-konditioniertem Medium	84
3.6	VEGF Knockdown mittels VEGF:siRNA	85
3.6.1	VEGF Sekretion nach Knockdown (Monolayer-Kulturbedingungen)	85
3.6.2	VEGF Sekretion humaner ASC nach si:VEGF Knockdown	86
3.6.3	HUVEC Tube Formation Assay nach si:VEGF Knockdown (3D Kulturbedingungen auf textilen Implantaten)	87
3.6.4	si:VEGF-hASC auf textilen Implantate im CAM Angiogenese Assay	88
3.6.5	Fazit: VEGF-Sekretion und Angiogenese	88
3.7	Angiogenese hybrider Implantate	88
3.7.1	Proliferation humaner ASC auf Implantaten	89
3.7.2	VEGF Sekretion humaner ASC auf Implantaten	90
3.7.3	HUVEC Proliferationsassay und HUVEC Tube Formation Assay humaner ASC auf Implantaten	91
3.7.4	CAM Angiogenese Assay humaner ASC auf Implantaten	93
3.8	Untersuchungen zu Differenzierung und angiogenem Potenzial humaner ASC	94
3.8.1	Adipogene Differenzierung humaner ASC auf textilen Implantaten	94
3.8.2	VEGF Sekretion adipogen differenzierter hASC auf Implantaten	95

3.8.3	HUVEC Tube Formation Assay adipogen differenzierter hASC auf Implantaten	96
3.8.4	CAM Angiogenese Assay mit adipogen differenzierten hASC auf Implantaten	97
3.8.5	Fazit: Biologisierung textiler Implantate zur autologen Fettgewebesubstitution	98
3.9	Biopolymere im Adipose Tissue Engineering	99
3.9.1	Kollagen	99
3.9.2	Chitosan	99
3.9.3	Alginat	100
3.10	Herstellung von Alginatscaffolds	100
3.10.1	Externe Polymerisation: CaCl ₂ Fällbad	100
3.10.2	Externe Polymerisation und Gefriertrocknung	101
3.10.3	Externe Polymerisation: Tiefemperaturpolymerisation	102
3.11	Integration biologisch aktiver Substanzen in eine Alginatmatrix	102
3.11.1	Integration von Wachstumsfaktoren in eine Alginatmatrix	103
3.11.2	Verkapselung humaner ASC in eine Alginatmatrix	105
3.12	Entwicklung einer adipogenen Alginatmatrix	107
3.12.1	Adipogene Differenzierung humaner ASC nach Verkapselung in adipogener Alginatmatrix	107
3.12.2	VEGF Sekretion nach Verkapselung humaner ASC in eine adipogene Alginatmatrix	109
3.12.3	HUVEC Tube Formation Assay nach Verkapselung humaner ASC in eine adipogene Alginatmatrix	110
3.12.4	Adipogene biopolymere Implantate im CAM Angiogenese Assay	111
3.13	Fazit: Adipogene biopolymere Implantate	111

4.1	VEGF als repräsentativer Parameter bei der Untersuchung der Angiogenese	112
4.2	Einfluss humaner ASC auf die Induktion der Angiogenese diverser 3D-Gerüststrukturen	114
4.2.1	hASC-biofunktionalisierte Gerüststrukturen im CAM Angiogenese Assay	115
4.2.2	hASC-biofunktionalisierte Gerüststrukturen in <i>in vitro</i> Angiogenese Assays	117
4.2.3	Fazit: Einfluss humaner ASC auf die Induktion der Angiogenese von TECs	120
4.3	Humane ASC im "Adipose Tissue Engineering"	121
4.3.1	Sind hASC zur Anwendung "Adipose Tissue Engineering" geeignet?	122
4.3.2	Zelluläre Veränderungen durch <i>in vitro</i> Kultivierung humaner ASC	123
4.3.3	Genexpression während adipogener Differenzierung	124
4.3.4	Dreidimensionale adipogene Differenzierung humaner ASC auf textilen Implantaten	125
4.3.5	Immobilisierung und Matrix-induzierte adipogene Differenzierung humaner ASC	126
4.3.6	Fazit: TECs im "Adipose Tissue Engineering"	128
4.4	Ausblick	129
	Literaturverzeichnis	129
	Danksagung	142
	Curriculum vitae	143

Abbildungsverzeichnis

1.1	Überblick über die Sekretionsprodukte reifer Adipozyten	3
1.2	Schematische Darstellung der adipogenen Differenzierung . . .	4
1.3	Strukturformel der Alginsäure	8
1.4	VEGF-Rezeptoren	13
1.5	Alternatives Splicing des humanen VEGF-A-Gen	14
1.6	Anatomie des Hühnereis	16
1.7	Entwicklung der Chorioallantoismembran <i>ex ovo</i>	17
2.1	Charakterisierung humaner ASC (Invitrogen)	33
2.2	Silikonform zur Herstellung von Alginatnetzen	47
2.3	Methode zur Quantifizierung der Angiogenese	61
3.1	<i>Ex ovo</i> Kultivierungsmethode des CAM Angiogenese Assay . .	63
3.2	Schematische Darstellung zur Öffnung der Eischale	63
3.3	<i>In ovo</i> Kultivierungsmethode des CAM Angiogenese Assay . .	64
3.4	Evaluierung einer pro-angiogenen Reaktion der CAM	65
3.5	Semi-quantitative Auswertung des CAM Angiogenese Assays .	65
3.6	Modifikation der semi-quantitativen Auswertung	66
3.7	Anti-Desmin Antikörpermarkierung der CAM	67
3.8	Häutchenpräparat: anti-Desmin Antikörpermarkierung der CAM	67
3.9	Charakterisierung primärer hASC	69
3.10	Genexpression humaner ASC während adipogener Differenzierung	70
3.11	Charakterisierung primärer pASC	70
3.12	Charakterisierung HUVEC	72

3.13 Vergleich adhäsionsfördernder Protein-Beschichtungen	73
3.14 Optimierung der Besiedelung textiler Implantate mit hASC . . .	74
3.15 REM: 45S5 Bioglass [®]	75
3.16 45S5 Bioglass [®] besiedelt mit hASC	76
3.17 Vergleich der VEGF Sekretion hASC-P1 und hASC-P8	77
3.18 Vergleich der adipogenen Differenzierung hASC-P1 und hASC-P8	78
3.19 Quantifizierung der adipogenen Differenzierung	79
3.20 VEGF-Sekretion humaner ASC pro 24h	81
3.21 Durchschnittliche Zellzahl	82
3.22 VEGF-Sekretion pro 1000 Zellen und 24h	82
3.23 Einfluss des Zellkulturmediums auf die VEGF-Sekretion	83
3.24 HUVEC Tube Formation Assay mit hASC-konditionierten Medien	84
3.25 VEGF Sekretion nach si:VEGF Knockdown (Monolayer)	85
3.26 VEGF-Sekretion nach si:VEGF Knockdown (3D-Kultur)	86
3.27 HUVEC Tube Formation nach si:VEGF Knockdown	87
3.28 CAM Angiogenese Assay nach si:VEGF Knockdown	88
3.29 Proliferation humaner ASC auf Implantaten	89
3.30 VEGF Sekretion auf Implantaten	90
3.31 HUVEC Proliferation in Anwesenheit von 45S5 Bioglass [®]	91
3.32 Hybride Implantate im HUVEC Tube Formation Assay	92
3.33 Hybride Implantate im CAM Angiogenese Assay	93
3.34 Adipogene Differenzierung über 21 Tage auf textilen Netzen	94
3.35 Adipogene Differenzierung nach 21 Tagen auf textilem Nonwoven	95
3.36 VEGF Sekretion nach adipogener Differenzierung (3D-Kultur)	96
3.37 HUVEC Tube Formation während adipogener Differenzierung (3D-Kultur)	97
3.38 CAM Angiogenese Assay mit adipogen differenzierten hASC (3D-Kultur)	98
3.39 Herstellung von Alginatfasern und Kugeln	100
3.40 Herstellung von Alginatschwämmen und Alginatvliesen	101

3.41	Alginate netze	102
3.42	Integration von Wachstumsfaktoren in Biopolymerfasern . . .	103
3.43	¹⁴ C D-Glucose / Concanavalin A Gehalt nach 21 Tagen . . .	104
3.44	Verkapselung humaner ASC in eine adipogene Alginate matrix .	105
3.45	Verkapselung von hASC in eine Alginate faser	106
3.46	Vergleich der VEGF Sekretion immobilisierter hASC	106
3.47	Durch Alginate matrix induzierte adipogene Differenzierung . . .	107
3.48	Alginate matrix: Differenzierungstag 21	108
3.49	VEGF Sekretion nach Verkapselung humaner ASC	109
3.50	HUVEC Tube Formation: hASC in adipogener Alginate matrix .	110
4.1	Schematische Darstellung der hASC-induzierten Angiogenese .	115
4.2	Schema Fettgewebeersatz	121

Tabellenverzeichnis

1.1	Physiologische und pathologische Angiogenese	11
1.2	Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese	12
1.3	Entwicklungsstadien der aviären Embryonalentwicklung	17
2.1	Rezeptur: DMEM-hASC	35
2.2	Rezeptur: Gefriermedium	35
2.3	StemPro® Adipogenesis Differentiation Medium	36
2.4	StemPro® Chondrogenesis Differentiation Medium	37
2.5	Alcian-Blau Färbelösung	38
2.6	StemPro® Osteogenesis Differentiation Medium	38
2.7	Alizarin-Rot Färbelösung	39
2.8	Rezeptur: Adipogenes Differenzierungsmedium	39
2.9	Rezeptur: HUVEC Medium	41
2.10	Rezeptur: HUVEC Gefriermedium	42
2.11	Rezeptur: DMEM-Vollmedium	43
2.12	Rezeptur: Sterilisationsmedium	46
2.13	Standardprotokoll Random-PCR	51
2.14	Standardprogramm Mastercycler: Random-PCR	52
2.15	Standardprotokoll PCR	52
2.16	Standardprogramm Mastercycler	53

Abkürzungsverzeichnis

3'-	am Karboxyterminus einer Nukleinsäure
5'-	am Aminoternus einer Nukleinsäure
AB	Antibody; dt.: AK für Antikörper
Abb.	Abbildung
ADD1	Adipozyten Determinierungs- und Differenzierungsfaktor-1
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
ASC	Adipose tissue-derived stem cell
AK	Antikörper; engl.: AB für Antibody
ATE	Adipose Tissue Engineering
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
bp	Basenpaare
BD	Becton Dickinson
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
CAM	Chorioallantoismembran
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Cy3	Cyanin am 3'-Ende
Cy5	Cyanin am 5'-Ende
d	Tag(e)
DAPI	4,6 - Diamino - 2 - phenylindol
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, auch DNS
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECM	Extracellular Matrix, auch EZM
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDD	Embryonal Development Day
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced GFP
ESC	Embryonal Stem Cell
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix, auch ECM
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
Flt-1	FMS-like tyrosine kinase
fwd	forward, 5' → 3'
g	Gramm
GDL	Glucunolacton (D-(+)-Gluconic acid δ -lactone)
GFP	Green Fluorescent Proteine
GS	Growth Supplement
GulUA	α -L-Guluronsäure
h	Stunde
HEK	Humane epidermale Keratinozyten
HET-CAM	Hen's Egg Test an der Chorioallantoismembran

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HF	Humane Fibroblasten
HF AST	Humane Fibroblasten from Adult Skin Tissue
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
HLA	Human Leukozyte Antigen
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HUVEC	Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells
HRP	Horse-raddish peroxidase; Meerrettichperoxidase
ICM	Inner Cell Mass
IF	Interferon
IGF	Insuline-like Growth Factor
IFN	Interferon(e)
IL	Interleukin(e)
Kap.	Kapitel
KDR	Kinase insert domain receptor
L	Liter
LSM	Laser Scanning Microscopy
m	Meter
M	molar
max.	maximal
mAB	monoclonal Antibody
ManUA	β -D-Mannuronsäure
mg	Milligramm
min	Minute
mRFP	monomeric Red Fluorescent Protein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NTC	No Template Control
OD	optische Dichte

P	Passage
pAB	polyclonal Antibody
p.a.	pro Analyse (für die Analyse) = höchster Reinheitsgrad
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-ECGF	Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
PI	Propidium Iodid
PPAR	Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptoren
PGA	Polyglykolsäure
PIGF	Placental Growth Factor
PLA	Polymilchsäure (Poly-Lactid)
rev	reverse, 3' → 5'
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Reaktion mit anschließender PCR
SDS	Natriumdodezylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
sec	Sekunde(n)
SFit1	soluble FMS-like Tyrosine Kinase
siRNA	small interfering RNA
SREBP1	Sterol Regulatorisches Element Bindungsprotein 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEC	Tissue Engineered Construct

TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	
	Enzymeinheiten (Units)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	
	Volt
VAS	Vaskulotropin
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
VPF	vaskulärer Permeabilitätsfaktor
w/v	
	Gewicht pro Volumen
z.B.	
	zum Beispiel

Kapitel 1

Einleitung

Während in der Schönheitschirurgie die Fettabsaugung zum medizinischen Standard gehört, stellt in der plastischen und regenerativen Medizin die Rekonstruktion von Unterhautfettgewebe noch immer eine große Herausforderung dar. Viele Patienten leiden nach Verbrennungen, Traumata oder onkologischen Resektionen unter fehlendem oder defektem Weich- bzw. Unterhautfettgewebe oder weisen bereits kongenital eine behandlungsbedürftige Missbildung auf, welche einen adequate Fettgewebeersatz erfordert. Derzeit angewandte Verfahren zum Weichgewebsersatz umfassen verschiedene plastisch-chirurgische Standardtherapien, wie lokal-regionale und freie Lappenplastiken sowie die Transplantation von autologem Gewebe mit oder ohne Gefäßanschluss [1]. Diese Techniken sind stets verbunden mit Operations- und Infektionsrisiken, hohen Kosten für Operation, Krankenhausaufenthalt und Nachbehandlung sowie Morbiditäts- oder Thromboserisiken für Transplantat und Spenderstelle [2]. Alternative Ansätze sehen als Weichgewebsäquivalente die Verwendung alloplastischer und allogener Materialien wie z.B. Teflon oder Silikon vor. Modernere Verfahrenstechniken setzen z.B. injizierbares Kollagen, Hyaluronsäurepräparate oder dermale Allotransplantate ein. Bei der Auswahl individueller Weichgewebsäquivalente sind neben den Wünschen des Patienten die Defektlokalisierung, das benötigte Füllvolumen, die Modellierbarkeit des Materials und Äquivalent-spezifische Risiken zu berücksichtigen. Speziell die alloplastischen Materialien neigen jedoch zu Problemen (z.B. zur Migration). Zudem besteht das Risiko von Fremdkörperreaktionen, Kapselbildung und -kontrakturen, lokalen Infektionen sowie der Ausbildung allergischer Reaktionen [3].

Auch allogene Materialien können allergische Reaktionen provozieren, bergen das Risiko der Krankheitsübertragung und fordern in Folge einer Implantatresorption wiederholte Rekonstruktionsanwendungen.

Kurzum: Zum derzeitigen Zeitpunkt steht kein geeignetes Verfahren zur autologen Transplantation von Fettgewebe mit voraussagbarem Volumeneffekt und persistierendem Langzeitergebnis zur Verfügung.

1.1 Bedeutung des Fettgewebes

Fettgewebe stellt eine wesentliche Komponente des humanen Weichgewebes dar und ist in hohem Maße für die Formgebung des menschlichen Körpers verantwortlich. Das Fettgewebe wird als Sonderform des retikulären Bindegewebes eingestuft und liegt bei einer normalgewichtigen erwachsenen Person bei rund 25 % [4]. Im Fettgewebe finden sich neben univakuolären Fettzellen (reifen Adipozyten) eine Vielzahl anderer Zelltypen wie Makrophagen, Fibroblasten, Perizyten, Mastzellen, mikrovasculäre Endothelzellen und mesenchymale Vorläuferzellen. Reife Adipozyten erreichen einen Zelldurchmesser von bis zu 120 μm . Weitere Zellen der adipogenen Linie sind Adipoblasten, Präadipozyten und unreife Adipozyten. Für die Plastische und Regenerative Medizin ist vor allem das subkutane Fettgewebe von Bedeutung.

1.1.1 Funktion des Fettgewebes

Bei Fettgewebe handelt es sich um ein stark vaskularisiertes Gewebe mit hoher metabolischer und endokriner Aktivität (Abb. 1.1).

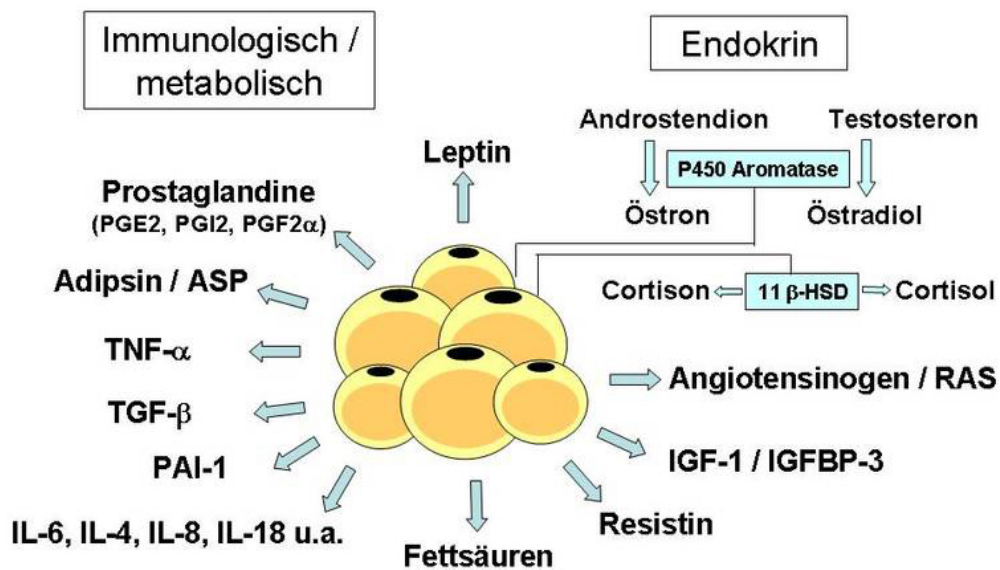


Abbildung 1.1: Überblick über die Sekretionsprodukte reifer Adipozyten [5]

Neben den fettspezifischen Botenstoffen (Adipozytokine wie z.B. Leptin, Adiponektin, Resistin und Visfatin) finden sich im Fettgewebe eine Reihe weiterer regulatorischer Faktoren wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1). Diese Sekretionsprodukte werden unter dem Begriff Adipokine zusammengefasst. Adipokine haben sowohl lokale als auch systemische Wirkungen und beeinflussen eine Reihe von Körperfunktionen wie das Immunsystem (TNF- α , IL-6), den Blutdruck (Angiotensinogen), die Blutgerinnung (PAI-1), den Kohlehydratstoffwechsel (Adiponektin, Leptin, Resistin, Visfatin) sowie die Angiogenese (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) [6].

Adipozyten-Differenzierung

Der komplexe Prozess der Zelldifferenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen hin zu reifen Adipozyten (Abb. 1.2) ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt. *In vitro* kommt es nach Induktion der Differenzierung zu einem Proliferationsstop kultivierter Präadipozyten oder mesenchymaler Vorläuferzellen. Anschließend durchlaufen die Zellen noch eine weitere DNA-Replikation und Zellteilung. Reife Adipozyten sind hingegen nicht mehr zur Zellteilung befähigt [5, 7].

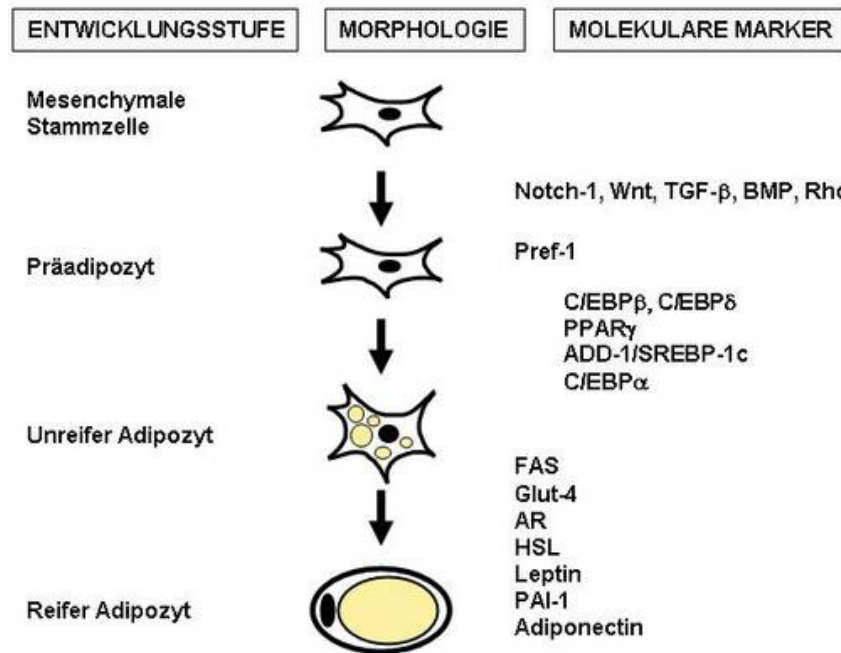


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der adipogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen [5]

Im Zuge der Differenzierung werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert (Abb. 1.2). Schlüsselrollen in der adipogenen Differenzierungskaskade nehmen beispielsweise die Proteine ADD1/SREBP1 (Adipozyten Determinierungs- und Differenzierungsfaktor 1 / Sterol Regulatorisches Element-Bindungsprotein 1), PPAR- γ (Peroxisom Proliferator-aktivierender Rezeptor- γ) und die C/EBP-Familie (CCAAT / Verstärker Bindungsprotein-Familie, C/EBP- α , β , δ) ein. Daneben wurde eine Vielzahl sezernierter Wachstumsfaktoren und Hormone sowie spezifische Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen beschrieben, die ebenfalls an der adipogenen Differenzierung beteiligt sind [5, 7, 8].

1.2 Derzeitige Strategien zum Gewebersatz

1.2.1 Allogene Transplantate

Allogene Transplantate, d.h. von Fremdspendern stammende Gewebe, werden bereits seit geraumer Zeit für die Behandlung von Gewebsdefekten eingesetzt. Herz-, Leber-, Lungen-, Knochen- und Nierentransplantationen gehören heute

zum medizinischen Standard. Von 1967 bis 2007 wurden weltweit über 80 000 Herzen transplantiert [9]. Nierentransplantationen werden seit 1954 erfolgreich durchgeführt [10]. Im Falle von Knochen und Spenderhaut werden zur Verbesserung der Transplantatakzeptanz allogene Gewebetransplantate verschiedenen Bearbeitungsschritten unterzogen, die das Herausspülen von Blut und Blutbestandteilen sowie die Extraktion von Fett beinhalten. Während bei Applikation von kaum zellhaltigen allogenen Transplantaten, wie z.B. Knochen, nur selten Abstoßungsreaktionen auftreten, muss bei stark zellhaltigem Gewebe, wie z.B. Haut, eher mit Problemen gerechnet werden [3].

1.2.2 Alloplastische Transplantate

Unter alloplastischen Transplantaten versteht man künstliche Materialien zur Anwendung im Körper, wie z.B. Knochenimplantate aus verschiedensten Kunststoffen, Zahnimplantate aus Titan oder keramischen Materialien, künstliche Gelenke aus Metall, Keramik oder Polyethylen oder textile Blutgefäße, sog. Stents.

1.2.3 Xenogene Transplantate

Xenogene Transplantate, d.h. von Tieren stammende Gewebetransplantate, wie z.B. Herzklappen vom Schwein oder Rind, werden in der Humanmedizin aufgrund ihrer einfachen Verfügbarkeit häufig eingesetzt, obwohl natürlich auch bei diesen Spendermaterialien eine Fibrosebildung oder Abstoßungsreaktionen nicht ausgeschlossen werden können. Um deren Antigenität zu verringern und die Transplantatstabilität zu erhöhen, werden Xenografts häufig mit Quervernetzern wie Glutaraldehyd oder Formaldehyd vorbehandelt [11]. Diese Reagenzien können jedoch gesundes Gewebe am Implantationsort schädigen und führen unter Umständen zu Kalziumablagerungen entlang des Xenograft, was letztlich ein Langzeitversagen des Transplantats durch Kalzifizierung bewirken kann [12].

1.2.4 Autologe Transplantate

Autologe Transplantate, d.h. patienteneigene Gewebetransplantate, werden in der Humanmedizin wegen der ausbleibenden Abstoßungsreaktionen bevorzugt verwendet. Autoplastiken sind dabei hauptsächlich in der Plastischen Chirurgie angesiedelt. Allerdings ist der Mangel an patienteneigenem gesundem Gewebe zur ausreichenden Abdeckung eines Gewebedefekts häufig das Kardinalproblem [3].

1.2.5 Autologe Fettgewebstransplantation

Der Gedanke autologes Fett zur Füllung von Weichgewebsdefekten zu verwenden ist nicht neu. Bereits vor über 100 Jahren wurden Fettgewebstransplantate im Rahmen der Plastischen und Wiederherstellenden (Rekonstruktiven) Chirurgie verwendet [13]. Die erste Autotransplantation menschlichen Fettgewebes wurde 1889 von van der Meulen durchgeführt. 1893 demonstrierte Neuber den Transfer kleiner Fetttransplantate vom Oberarm zur Rekonstruktion von Weichgewebe im Gesicht [13]. Trotz frühzeitiger, innovativer Versuche zur Weichgewebsrekonstruktion mittels Fettgewebe und einer Vielzahl klinischer und experimenteller Studien zu Transplantation und zum Langzeitüberleben autologen Fettgewebes sind die Ergebnisse freier Fettgewebstransplantationen ohne Gefäßanschluss enttäuschend. Klinisch wird vielfach eine progradiente Absorption des Transplantates mit einem Volumenverlust von 40-60 % bis hin zur kompletten Resorption des Transplantates beobachtet [14–17]. Die Überkorrektur des bestehenden Volumendefizits durch Transplantation größerer Fettgewebsmengen erwies sich aufgrund der fehlenden Vorhersagbarkeit des Volumenergebnisses und unerwünschter Formgebung ebenfalls als nicht zufrieden stellend. Für die Behandlung großflächiger Gewebeschäden steht meist nicht ausreichend patienteneigenes Gewebe zur Verfügung um den Defekt adäquat wiederherzustellen. Die Behandlung ausgedehnter Weichgewebsdefekte ist daher immer noch eine Herausforderung für die Plastische und Rekonstruktive Chirurgie [14, 18–21].

Ein neuer Ansatz zur autologen Rekonstruktion von Fettgewebe ist die Isolierung und Vermehrung patienteneigener Vorläuferzellen aus Fettgewebe und die Kombination dieser mit alloplastischen Materialien als Gerüststruktur

zur Herstellung sogenannter "Tissue Engineered Constructs (TECs)" und letztlich deren Einsatz in der Regenerationsmedizin.

1.2.6 Tissue Engineering in der Regenerativen Medizin

Um Weichgewebsdefekte vollständig wiederherstellen zu können genügt es nicht, zellfreie Scaffolds einzusetzen. Da meist ein großer Teil des Gewebes ersetzt werden muss, ist es unumgänglich, patienteneigene Zellen aus gesundem Gewebe zu entnehmen. Reife Fettzellen sind hierzu jedoch ungeeignet, denn, wie bereits erwähnt haben die durch Fettabsaugung (Liposuktion) gewonnenen, reifen Adipozyten die Fähigkeit zur Zellteilung verloren [5, 7]. Zugleich benötigen sie eine gute Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Da dies bei einer freien Fettgewebstransplantation nicht gewährleistet werden kann, sterben die reifen Adipozyten ab und das Implantat wird vom Körper des Patienten resorbiert. Dies hat oftmals eine Transplantatvolumenreduktion von mehr als 60 % und unerwünschte Bindegewebskapseln oder Ölzysten zur Folge [14–17]. Solche Weichgewebsrekonstruktion sind Teil des Arbeitsgebietes "Biomedical Engineering", welches Materialwissenschaften, Zellkultur und Medizin strategisch miteinander verknüpft [22] und resorbierbare sowie nicht resorbierbare Gerüststrukturen mit adäquaten Zelltypen kombiniert.

1.2.7 Alloplastische Implantate aus Biopolymeren zur Rekonstruktion von Fettgewebe

Alloplastische Implantate zur Rekonstruktion von Fettgewebe müssen besondere Eigenschaften aufweisen. Sie sollten biokompatibel und elastisch sein, um die natürlichen Gewebeeigenschaften zu erhalten und Bewegungen nicht nachteilig zu beeinflussen. Außerdem sollte das Material Adhäsion, Proliferation und Differenzierung spezifischer Zellen unterstützen. Aktuelle Forschungsarbeiten zeigen, dass sich textile Implantate aufgrund ihrer Flexibilität in Form und Größe hierfür besonders gut eignen [23, 24].

Im Tissue Engineering werden als Flächengebilde neben Membranen und Netzen besonders häufig dreidimensionale Vliesstoffe als Scaffolds verwendet. Sie bestehen aus synthetischen, bioresorbierbaren Polymeren wie PGA

(Polyglycolic Acid, Polyglykolsäure), PLA (Polylactic Acid, Poly-Milchsäure) oder PGA/PLA Co-Polymeren. Diese synthetischen Polymere können *post transplantationem* jedoch durch saure Zerfallsprodukte nachweislich Entzündungsreaktionen am Implantationsort verursachen [25].

Um dies zu vermeiden, fällt der Fokus in der Biomaterialforschung immer stärker auf alternative Biopolymere wie z.B. das natürlich vorkommende Polysaccharid Alginat [26, 27]. Alginat wird derzeit in der Regel aus Braunalgen isoliert, kann jedoch auch biotechnologisch über bakterielle Fermentation hergestellt werden. Alginat ist ein Polysaccharid, bestehend aus den beiden Uronsäuren α -L-Guluronsäure (GulUA) und β -D-Mannuronsäure (ManUA), welche 1,4-glycosidisch in wechselndem Verhältnis zu linearen Ketten verbunden sind (siehe Abb. 1.3). Es bildet homopolymere Bereiche, in denen Mannuronsäure oder Guluronsäure als Blöcke vorliegen. Diese Blöcke werden als GG- oder MM-Blöcke bezeichnet. Im Bereich der GG- und MM-Blöcke kommt es zu einer Art Faltstruktur, die bei der Gelierung eine wesentliche Rolle spielt. Sowohl in der Medizin als auch in der Lebensmittelindustrie wird meist Natriumalginat verwendet. In Anwesenheit zweiwertiger Kationen wie Ca^{2+} wird das vorhandene Na^+ durch die Ca-Ionen ausgetauscht und das Calciumalginat geliert.

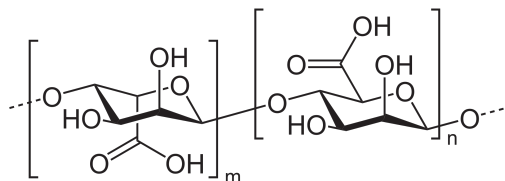


Abbildung 1.3: Strukturformel der Alginsäure [28]

Ein weiteres Biopolymer, das derzeit für das Tissue Engineering interessant erscheint, ist Chitosan. Chitosan wird durch Deacetylierung und teilweiser Depolymerisierung aus natürlich vorkommendem Chitin gewonnen. Es kann bis zu 98 % deacetyliert vorliegen und ist in verschiedenen Säuren löslich. Als Wundverbandsmaterial, als Wirkstoffträger beim Drug Delivery sowie im Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin werden diese Biopolymere aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften bereits eingesetzt [29]. Sie weisen sehr gute Biokompatibilität auf und werden *in vivo* durch Hydrolasen abgebaut [23]. Dabei entstehen nicht-toxische Oligomere, die vom Körper problemlos resorbiert werden können, ohne dass Entzündungsreaktionen

hervorgerufen werden. Abbauprodukte des Chitosan sollen Studien zufolge sogar entzündungshemmende Wirkungen aufweisen [30, 31].

Humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (hASC)

Patienteneigene (autologe) mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (hASC (human Adipose tissue-derived Stem Cells)) bieten sich im Rahmen der Regenerativen Medizin als autologer Zelltyp zur Rekonstruktion von Fettgewebe an. ASC sind pluripotente Stammzellen, die aus Fettgewebe (z.B. subkutan) durch minimalinvasive Eingriffe gewonnen und durch einfache Methoden im Labor innerhalb kurzer Zeit (ca. 1 Stunde) isoliert werden können [7, 32, 33]. Sie zeigen *in vitro* gute Proliferationsraten, benötigen nur wenig Sauerstoff und haben einen vergleichsweise geringen Nährstoffbedarf [16]. In Stresssituationen wie beispielsweise Sauerstoff- oder Nährstoffmangel steigern hASC die Produktion von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, bFGF), was nicht nur die Proliferation anderer Zellen in ihrer Umgebung anregt, sondern auch die Differenzierung von Vorläuferzellen sowie die Angiogenese am Implantationsort positiv beeinflussen kann [34, 35].

Durch die Pluripotenz der hASC ist es möglich, sie in Knorpel- und Knochen- als auch in Fettzellen zu differenzieren [36, 37]. Die Differenzierung lässt sich *in vitro* über die Zugabe von Wachstumsfaktoren ins Zellkulturmedium steuern. Die *in vitro* Differenzierung von hASC in beispielsweise Knochen- oder Knorpelzellen zur Behandlung verschiedener Defekte ist in der Medizin bereits etabliert [31, 37–41], während die Differenzierung in Fettzellen zur Wiederherstellung größerer Weichgewebsdefekte hingegen größtenteils unerforscht ist [42–44].

1.2.8 Aktuelle Techniken: "Adipose Tissue Engineering"

Der neue Ansatz, autologes Fettgewebe auf einem entsprechenden Scaffold *de novo* aus Vorläuferzellen zu generieren, nennt sich "Adipose Tissue Engineering" (ATE). Dieses Arbeitsgebiet beschäftigt sich explizit mit der Wiederherstellung von Fettgewebe. In Tierversuchen werden dreidimensionale Scaffolds verschiedenster Formen und Größen bereits genutzt, um defektes Weichgewebe zu ersetzen. Diese Scaffolds werden mit hASC oder Präadipozyten besiedelt und anschließend mindestens 15 Tage *in vitro* mit

adipogenem Differenzierungsmedium behandelt. Auf dem Implantat finden sich zum Zeitpunkt der Implantation *in vivo* daher hauptsächlich Präadipozyten und wenige reife Adipozyten [15, 18, 21, 42, 45, 46]. Diese Zellen weisen jedoch die bereits oben beschriebenen, negativen Eigenschaften autologer Fettzellen auf: Ohne eine schnelle Neovaskularisierung des Implantats werden auch diese Zellen nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt, sterben ab und werden vom Körper resorbiert. Ein weiterer Nachteil ist die lange Kultivierungsdauer. Bereits die Zellisolation und -expansion im Labor und die anschließende Besiedelung des Scaffolds beansprucht eine Zeitspanne von einigen Tagen. Die nachfolgende Differenzierung der Vorläuferzellen beansprucht weitere 15-21 Tage [7, 32, 46, 47]. Somit sieht sich das Adipose Tissue Engineering zwei Anforderungen gegenüber:

1. Eine schnellere Verfügbarkeit adipogener Implantate zur Fettgewebssubstitution (< 15 Tage)
2. Die Sicherstellung einer schnellen Neovaskularisierung des Zell-Scaffold-Konstrukts zur adäquaten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Implantat-gebundenen Zellen am Implantationsort (Angiogenese)

1.3 Angiogenese

Die Ausbildung und Aufrechterhaltung eines umfassenden Gefäßsystems ist eine wesentliche Voraussetzung für das Wachstum und die Versorgung der meisten Organe und Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen (Ausnahmen bilden hier z.B. Knorpelgewebe und die Linse des Auges). Zwei unterschiedliche Mechanismen sind für die Bildung von kapillären Blutgefäßen verantwortlich. Die Vaskulogenese bezeichnet die Ausbildung neuer Gefäße aus Stammzellen des Blutes und ist beschränkt auf die frühe Embryonalentwicklung. Die Angiogenese bezeichnet demgegenüber die Bildung neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen durch zelluläres Auswachsen (Aussprossung) und ist, im Gegensatz zur Vaskulogenese, auch postnatal und während des gesamten Lebens von großer Bedeutung (z.B. in der Uterusschleimhaut oder bei der Wundheilung). Eine solche physiologische Angiogenese scheint immer nach den Bedürfnissen der entsprechenden Gewebe genau geregelt zu sein [48].

1.3.1 Physiologische und pathologische Angiogenese

Die physiologische Angiogenese spielt in vielen Reproduktionsprozessen wie der plazentären, embryonalen, fötalen und postnatalen Entwicklung eine entscheidende Rolle (siehe Tabelle 1.1). Sie ist zugleich der grundlegende Mechanismus einer physiologischen Wundheilung. Zur pathologischen Angiogenese kommt es, wenn die komplexen Regulationsmechanismen der Angiogenese gestört sind. Tabelle 1.1 stellt die Vorgänge der physiologischen und pathologischen Angiogenese gegenüber [49].

Tabelle 1.1: Physiologische und pathologische Angiogenese [49]

Physiologische Angiogenese	Pathologische Angiogenese
Embryonalentwicklung	Tumorwachstum
Ovarien	Tumormetastasierung
Uterus	Okuläre Neovaskularisierung
Plazenta	Hämangiome
Brustdrüsen	Rheumatoide Arthritis
Wundheilung	Psoriasis
Regeneration	Arteriosklerose
Bildung von Kollateralen nach Ischämie	

1.3.2 Bedeutung der Angiogenese für die Medizin

Die Erforschung von Angiogenese mit VEGF als Schlüsselfaktor der Angiogenese, ist auf drei wesentliche klinische Anwendungen:

1. die Untersuchung der Angiogenese zu diagnostischen und prognostischen Zwecken [50],
2. die Hemmung pathologischer Angiogenese [50] sowie
3. die Beschleunigung der Angiogenese bei verschiedenen Wiederherstellungsmechanismen in der Regenerativen Medizin [51, 52].

Eine Vielzahl daran beteiligter Faktoren wurden bereits sowohl auf genetischer als auch auf zellulärer Ebene erforscht und charakterisiert.

1.4 Kontrollmechanismen der Angiogenese

Die Neubildung von Blutgefäßen unterliegt streng regulierten Mechanismen [49]. Einerseits wird sie über die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren gelenkt, andererseits erfolgt eine direkte Interaktion mit umliegendem Gewebe und der bestehenden extrazellulären Matrix (EZM).

1.4.1 Stimulation und Inhibition der Angiogenese

Die physiologische Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts ist ein kontinuierlicher Prozess, in dem pro- und anti-angiogene Moleküle genauestens reguliert werden. Tabelle 1.2 fasst beispielhaft bereits bekannte endogene Angiogenese-Stimulatoren und -Inhibitoren zusammen [53, 54].

Tabelle 1.2: Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese nach [53, 54]

Stimulatoren der Angiogenese	Inhibitoren der Angiogenese
VEGF (45 kDa)	Thrombospondin-1 (450 kDa)
bFGF (18 kDa)	Angiostatin (38 kDa)
PD-ECGF (46 kDa)	Plättchenfaktor-4 (28 kDa)
TGF- α (5.5 kDa)	Prolactin-Fragment (16 kDa)
TGF- β (25 kDa)	Troponin-I (21 kDa)
TNF- α (17 kDa)	Interferon- α (18.5 kDa)
Angiogenin (14.4 kDa)	Interferon- γ (50 kDa)

Die am besten charakterisierten pro-angiogenen Regulatoren sind der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), VEGF-Homologe (PDGF, PIGF) sowie der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF), welche direkt die Endothelzellproliferation anregen [50].

Inhibitoren von Matrix-abbauenden proteolytischen Enzymen (z.B. Matrix-Metalloproteinasen, Plasminogen-Aktivatoren) hemmen die Angiogenese, indem sie den vaskulären Zusammenhalt verhindern. Auch verschiedene Zytokine (z.B. Interferon- α , Interferon- γ) wirken anti-angiogen. Daneben sind weitere Wachstumsfaktoren und Zytokine an der Regulation der Angiogenese beteiligt.

1.4.2 Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor mit zentraler Bedeutung in Vaskulogenese und Angiogenese. VEGF - auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) oder Vaskulotropin (VAS) bekannt - übt verschiedenste Effekte auf vaskuläre Endothelzellen aus, was die Bildung und das Wachstum neuer Blutgefäße begünstigt. Neben einer Permeabilitätssteigerung der Gefäße regt VEGF Endothelzellen sowohl zur Migration als auch zur Proliferation an [50].

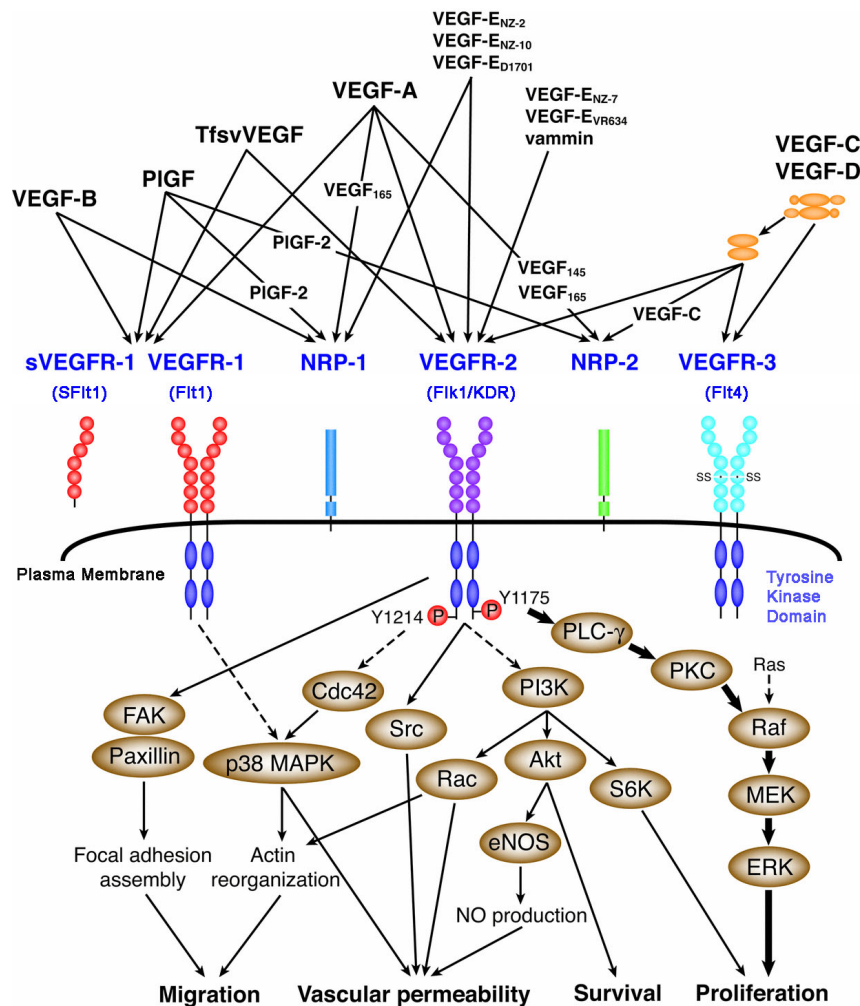


Abbildung 1.4: Interaktion zwischen VEGF und VEGF-Homologen und den assoziierten Tyrosinkinase-Rezeptoren (nach [50]). In dieser komplexen Kaskade ist VEGF-A von besonderer Bedeutung, da es zelluläre Prozesse wie Migration, Proliferation und Gefäßpermeabilität essenziell beeinflusst.

Molekulare Struktur von humanem VEGF-A

Der Vergleich vollständiger cDNA-Sequenzen des humanen, bovinen, porcinen und murinen VEGF zeigt, dass VEGF ein hoch konserviertes, Sulfid-gebundenes dimeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 34-46 kDa ist [50]. Sieben verschiedene Formen von VEGF (VEGF A-F und PlGF) wurden bislang in humanen Zellen beschrieben. VEGF-A ist in allen vaskulären Systemen zu finden. Seine zentrale Rolle bei der Angiogenese ist bereits gut untersucht. Durch alternatives Splicing desselben mRNA-Transkripts entstehen verschiedene Polypeptide mit einer Länge von 121, 145, 148, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren (siehe Abbildung 1.5) [55].

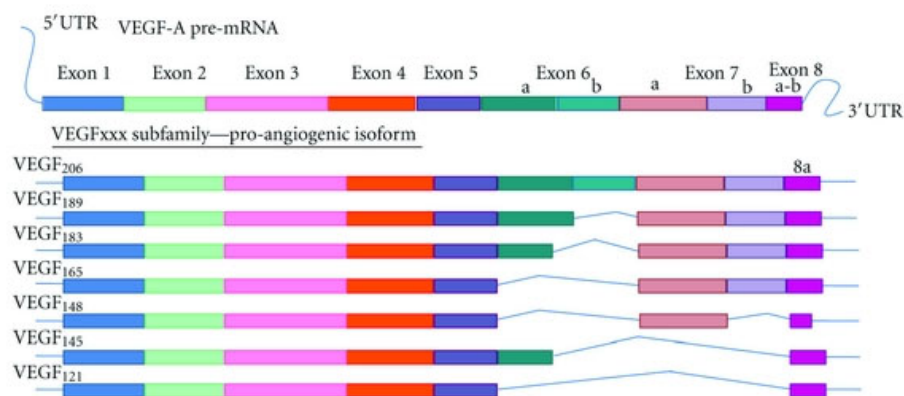


Abbildung 1.5: Alternatives Splicing des humanen VEGF-A Gen-Transkripts [55]

Die Isoform VEGF-A₁₆₅ ist dabei die dominierende Splice-Variante, welche in löslicher Form von verschiedensten Zellen sezerniert wird.

Regulation der VEGF-Expression

Viele Zelllinien reagieren *in vitro* auf hypoxische oder nährstoffarme Kulturbedingungen (z.B. Glukosemangel) mit erhöhter VEGF-Produktion [56]. *In vivo* wurden dementsprechend, beispielsweise in hypoxischen Zonen von Tumorgewebe oder in Geweben, die unter hypobarer Hypoxie, funktioneller Anämie oder lokalisierter Ischämie gestanden haben, eine analog erhöhte VEGF-Produktion festgestellt [57]. Auf transkriptioneller Ebene wird VEGF durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor-1) reguliert. Auf

post-transkriptioneller Ebene wird eine Hypoxie-induzierte Stabilisierung der VEGF-mRNA beobachtet. Diese Regulationsmechanismen können vorteilhaft in der Regenerativen Medizin genutzt werden, um lokale angiogene Stimuli zu setzen und so die Angiogenese und Regeneration von beschädigtem Gewebe gezielt anzuregen.

1.4.3 VEGF als Schlüsselfaktor in der Regenerativen Medizin

Um einen langfristigen Erfolg der Behandlung von Weichgewebdefekten mit Hilfe des Tissue Engineering zu erzielen, ist eine schnelle Neovaskularisierung des TECs nach Implantation nötig (siehe Kapitel 1.2.8 Anforderung 2). Hier werden (prä)klinisch bereits verschiedene Ansätze verfolgt:

1. lokale Applikation hochreinen Wachstumsfaktors VEGF [58].
2. Integration von VEGF in das Biomaterial, um eine Depotwirkung am Implantationsort zu erzielen [59–66].
3. Gentransfer zur Überexpression von VEGF in Scaffold-gebundenen Zellen [37]

Obwohl ein therapeutischer Gentransfer in Tierversuchen bereits erfolgreich eingesetzt wurde [51], ist die Gentherapie aufgrund fehlender Langzeitstudien noch immer stark umstritten. Daher scheint derzeit die kontrollierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren sicherer und klinisch geeigneter zu sein, als Verfahren auf Basis von Gentransfers [52].

Der Goldstandard zur Untersuchung der therapeutischen Angiogenese sind letztendlich stets *in vivo* Versuche am Tier. Aufgrund ethischer Aspekte und den hohen Kosten sind Tierexperimente als reines Screening zur Untersuchung potentiell (anti-)angiogener Substanzen, Zellen oder Zell-Scaffold Kombinationen jedoch untragbar. Auf der anderen Seite sind *in vitro* Zellkulturmodelle, wie beispielsweise der Tube Formation Assay mit Endothelzellen, nicht praxisnah (abstrakt) und können zudem nicht mit jedem Material durchgeführt werden. Ein vielversprechender Ansatz, um *in vivo* Screeningversuche mit nahezu allen Materialien durchzuführen, ist der CAM

Angiogenese Assay, der auf der Kapillar-reichen Chorioallantoismembran des befruchteten Hühnereis durchgeführt wird [53].

1.5 Das befruchtete Hühnerei und die Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos

Die Entwicklung des Kükens beginnt lange bevor das Ei gelegt wird. Zeitlich findet die Befruchtung eines Hühnereis statt, wenn das Eigelb in den Eileiter der Henne tritt und ist nur dann möglich, wenn sich noch kein Eiklar am Eigelb angelagert hat. Diese Anfangsphase der Entwicklung dauert 24 Stunden. Nach dem Legen ist die Wachstums- und Entwicklungsrate direkt temperaturabhängig. Bei 4 °C kann das Wachstum gestoppt werden, bei etwa 36 °C Bebrütungstemperatur entwickelt sich der Embryo dann weiter. In einem frischen Ei kann man die Keimscheibe als kleinen, weißen, flachen Fleck auf der oberen Außenseite des Eigelbs sehen. Verglichen mit Säugetieren ist ein Vogelembryo während seiner gesamten Embryonalentwicklung nahezu autark. Er ist nur von einer relativ konstanten, nahe dem physiologischen Bereich liegenden Temperatur und Luftfeuchtigkeit abhängig. Alle Nährstoffe und Informationen für seine Entwicklung befinden sich im Eidotter. Die Entwicklung des Haushuhnes (*Gallus gallus f. domestica*) findet dann innerhalb von 21 Tagen statt.

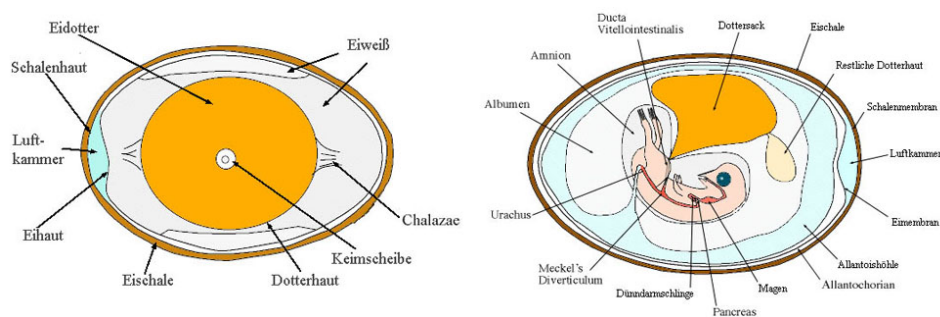


Abbildung 1.6: Anatomie des unbrüteten und des bebrüteten Hühnereis [67]

Nach Starck (1998) lässt sich die aviäre Embryonalentwicklung in vier Abschnitte unterteilen [68]:

Tabelle 1.3: Entwicklungsstadien der aviären Embryonalentwicklung

Entwicklungsstadium I	umfasst erste Furchungsteilung und Ausbildung der Körpergrundgestalt
Entwicklungsstadium II	umfasst Ausbildung der Organstruktur und erste Gewebedifferenzierung
Entwicklungsstadium III	umfasst fortschreitende Organdifferenzierung zu arttypischen Baumerkmalen
Entwicklungsstadium IV	beendet Wachstum und Ausreifung

1.5.1 Entwicklung der Chorioallantoismembran

Die aviäre Chorioallantoismembran stellt ein leicht zugängliches, hoch vaskularisiertes embryonales Organ dar, welches sich beim Hühnerei ab dem dritten Tag nach der Befruchtung durch Auswachsen und Verschmelzen der Allantois mit dem Chorion ausbildet. Die CAM besteht daher aus einem mesodermalen Stroma, welches von einem ektodermalen und einem endodermalen Epithel bedeckt wird [53].

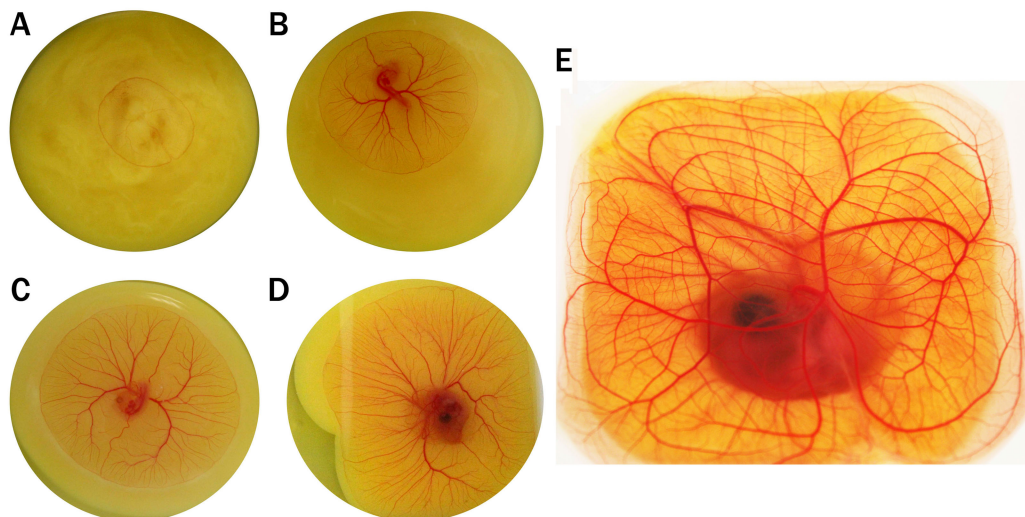


Abbildung 1.7: Entwicklung der Chorioallantoismembran *ex ovo*. A: Embryonaltag 2; B: Embryonaltag 3; C: Embryonaltag 4; D: Embryonaltag 5; E: Embryonaltag 9 (Quelle: Marina Handel - Hohenstein Institute)

Eine Besonderheit der Gefäßstruktur der CAM liegt darin, dass der Baum der großen Gefäßstämme in der mesodermalen Schicht nahezu in einer Ebene angeordnet ist. Dieses dichte Kapillarnetz breitet sich in einer nahezu

zweidimensionalen Schicht aus. Mit ihrem Gefäßreichtum ist die CAM während der Embryonalphase das wichtigste respiratorische Organ [69]. Charakteristisch für die CAM ist zudem das Fehlen von spezialisiertem Gewebe, wie z.B. Nervengewebe [70]. Die Ausbildung des Nervengewebes beginnt beim Hühnerembryo ab dem 10. Bebrütungstag, wodurch diese gut zugängliche, hoch vaskularisierte aviäre Membran für wissenschaftliche Untersuchungen erst interessant wurde [53, 54].

1.5.2 Bedeutung des CAM-Modells für die Wissenschaft

Der HET-CAM (Hen's Egg Test an der Chorioallantoismembran) ist eine von der ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) anerkannte Alternativmethode zur Irritationsprüfung am Kaninchenauge (Draize-Test) bzw. der Irritationsprüfung an der Mundschleimhaut. Die Prüfsubstanzen (in der Regel reine Chemikalien oder wässrige Extrakte) werden nach Öffnung der Eischale und dem Entfernen der Eihaut auf die freigelegte CAM appliziert. Die Bewertung erfolgt hier optisch innerhalb von fünf Minuten nach Applikation der Prüfsubstanz. Es werden dazu Hämorrhagie, Koagulation und Lyse als normative Endpunkte genutzt, um ein irritatives Potential der Prüfsubstanz zu bestimmen.

Seit vielen Jahren gilt die CAM jedoch zugleich auch als geeignetes Modell zur Untersuchung der Angiogenese. Hauptsächlich werden dabei Gewebe, Tumorzellen oder potenzielle (anti-)angiogene Pharmazeutika auf deren angiogenes Potenzial untersucht. In diesem Zusammenhang richtet sich das Hauptaugenmerk der Forschung auf die Mechanismen, die zum Einwachsen neuer Blutgefäße in das Tumorgewebe führen [53, 54].

Der CAM Angiogenese Assay zur Untersuchung der Angiogenese

Aufgrund des noch nicht entwickelten adaptiven Immunsystems und der fehlenden Innervation der CAM mit Nervenzellen, ist dieses Modell bis zum Bebrütungstag 11 als suborganismisches *in vivo* Testsystem eingestuft, was ein schnelles und kostengünstiges *in vivo* Angiogenese-Screening ermöglicht [53, 54]. Bereits 1914 wurde die CAM von Rous and Murphy zur Erforschung der Tumorangio-genese herangezogen. Bisher konnten so über 10 Tumor-Arten und über 20 isolierte Tumor-Zelllinien auf der CAM hinsichtlich

einer Tumorangiogenese untersucht werden. Seit den 1980er Jahren wurde mit Hilfe eines modifizierten CAM Angiogenese Assays auch die Prüfung pharmazeutisch aktiver Substanzen durchgeführt. So wurden bereits über 500 Substanzen auf ihre angiogene oder anti-angiogene Wirkung getestet [54]. Aufgrund der neueren Entwicklungen im Bereich des Tissue Engineering wird dieser *in vivo* Screeningtest auch zur Prüfung potenzieller Angiogenesefördernder Scaffolds und TECs immer interessanter. Diese, vergleichsweise großen und dreidimensionalen TECs können im Ganzen nur schwer in Zellkultursystemen geprüft werden. Im CAM Angiogenese Assay hingegen kann das angiogene Potenzial der meisten TECs mit Zellarten jeder Spezies geprüft werden. Weiterhin sind aufgrund des fehlenden adaptiven und des nur gering entwickelten angeborenen Immunsystems des Hühnerembryos unspezifische Immunreaktionen oder Abstoßungsreaktionen auch bei Verwendung allogener Zellen nicht zu erwarten. Durch mechanische Reize oder nicht biokompatible Gerüststrukturen können jedoch lokale Irritationen in Form von granulärem Gewebe mit erhöhter Monozytenzahl auftreten [53].

1.6 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels "Adipose Tissue Engineering" ein Gewebersatz für Fett entwickelt werden, und zwar durch Kombination textiler und biopolymerer Materialien mit geeigneten Vorläuferzellen. Im Hinblick auf eine künftige Anwendung als autologer Fettgewebersatz in der Regenerativen Medizin ergaben sich folgende Unterziele:

1. Etablierung des CAM Angiogenese Assays zur Prüfung von TECs
2. Evaluation und Charakterisierung geeigneter humaner Vorläuferzellen
3. Optimierung der Besiedelung verschiedener Gerüststrukturen mit humanen Vorläuferzellen
4. Untersuchungen zur adipogenen Differenzierung humaner Vorläuferzellen in 2D-Monolayerkulturen sowie unter 3D-Kulturbedingungen *in vitro*
5. Evaluation und Charakterisierung geeigneter Biopolymere sowie Etablierung einer biopolymeren Matrix als Gerüststruktur zur Anwendung im "Adipose Tissue Engineering"
6. Entwicklung einer adipogenen Biopolymermatrix zur Scaffold-induzierten adipogenen Differenzierung der verwendeten Vorläuferzellen
7. Untersuchung des angiogenen Potenzials der zuvor charakterisierten TECs *in vivo*

Zugleich sollte das künstliche Fettgewebe *in vivo*-de novo, d.h. durch die Implantat-induzierte adipogene Differenzierung von den Scaffold gebundenen, humanen Vorläuferzellen generiert werden. Während der Differenzierung können körpereigene Mechanismen zur Enddifferenzierung und zur Formgebung des Gewebersatzes beitragen.

Die Strategie einer Integration adipogener Differenzierungsfaktoren direkt in das Scaffoldmaterial hat zum Ziel:

- eine erheblich schnellere Verfügbarkeit autologer Implantate,
- eine schnelle Neovaskularisierung des Gewebes sowie
- eine gezielte Differenzierung der Implantat-gebundenen Zellen *in vivo*

zu erreichen.

Dieser Therapieansatz würde in einer klinischen Anwendung die Zeitspanne von der Entnahme autologer Zellen bis zum Zeitpunkt der Implantation um mindestens drei Wochen verkürzen, da eine langwierige Differenzierung der Zellen im Labor entfällt, welche stattdessen *in vivo* am Implantationsort stattfindet. Die Implantat-induzierte Differenzierung und aktive Regeneration von Gewebedefekten mit patienteneigenen Stammzellen durch ein bioresorbierbares, beliebig formbares Implantat wäre damit ein Novum der Regenerativen Medizin, welches eine Vielzahl neuer Behandlungsmöglichkeiten eröffnen würde.

Kapitel 2

Material & Methoden

2.1 Geräte

Accu-Jet Pro	Elektronische Pipettierhilfe, Produkt-Nr.: 26301 Brandt GmbH & Co. KG, Wertheim
Autoklav	Horizontaler Tischaufoklav, Produkt-Nr.: 3850EL-B Tuttnauer Europe B.V. , EH Breda - Niederlande
AX-70	Fluoreszenzmikroskop mit Kamera "F-View" und der Software "Analysis" Olympus, Hamburg
Brutschrank	Heraeus CO ₂ -Inkubator "Cytoperm 2" mit aktiver Luftfeuchte Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Elektrophoresekammer	Horizontale Gelelektrophoreseeinheit, V10-CB Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LSC Christ, Osterode
Homogenisator	Precellys 24, 000.1340 Peqlab Biotechnologie GmbH
Kryostat	CM 1510 - 1 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikrotom	Cut 4050 SLEE Technik GmbH, Mainz
Messerbrecher	Microtome Knifemaker 7801A

	LKB Bromma, Schweden
Multiwellplattenreader	"GENios" mit der Software "Magellan TM " Tecan Group Ltd., Männedorf - Schweiz
PCR-Cycler	Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg
Photometer	Nanodrop lite, 0256 Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Pipetten	2-20 μL ; 20-200 μL ; 100-1000 μL Eppendorf AG, Hamburg
Power Supply	EC 105 LVD E-C Apparatus Corporation
Real-time PCR-System	7500 Real Time PCR-System, 275002715 Applied Biosystems, Darmstadt
Scintillationsmessgerät	Scintillation Counter Hidex 300 SL Hidex Ltd., Turku - Finnland
Strecktisch	Strecktisch OTS 40 Medite Medizintechnik, Burgdorf
Thermomixer	Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	LMS Mini-Zentrifuge MCF-2360 LMS Laborbedarf
Ultramikrotom	Reichert Ultra Cut S Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Ultra-Turrax	T10 basic ULTRA-TURRAX® IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Ultraschallbad	RK 31 Sonorex Bandelin, Berlin
Vortexer	Vortex Lab Dancer IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Zentrifuge	Beckman Coulter Microfuge 22R Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge	5804R Zentrifuge Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterial

6-Well Zellkulturplatte	Multidishes, 6 Well Produkt-Nr.:140675 Thermo Fisher Scientific Inc. - Nunc GmbH & Co. KG Langenselbold
24-Well Zellkulturplatte	CELLSTAR [®] 24 Well Zellkultur Multiwell Platten Produkt-Nr.: 662160 Greiner Bio One, Frickenhausen
96-Well Zellkulturplatte	F96 MicroWell [™] Plates Produkt-Nr.:167800 Thermo Fisher Scientific Inc. - Nunc GmbH & Co. KG Langenselbold
0.1-10 μL Pipettenspitzen	epT.I.P.S Standard, 0.1-10 μ L Produkt-Nr.: 0030 000.811 Eppendorf AG, Hamburg
2-200 μL Pipettenspitzen	epT.I.P.S Standard, 2-200 μ L Produkt-Nr.: 0030 000.870 Eppendorf AG, Hamburg
50-1000 μL Pipettenspitzen	epT.I.P.S Standard, 50-1000 μ L Produkt-Nr.: 0030 000.919 Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser	Deckgläser gemäß ISO 8255-1 Produkt-Nr.: H874.1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Einmal-Küvetten	Plastibrand [®] , semi-micro PMMA Produkt-Nr.: 759115 12,5 x 12,5 x 45 mm Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Einmal-Reaktionsgefäß	transparent, 1,5 mL Produkt-Nr.: 780502 Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Herniennetze	Optilene Mesh; Premilene Mesh Aesculab, B. Braun Melsungen AG, Tuttlingen
Objektträger	Polylysinbeschichtet, Produkt-Nr.: ET10.1

Objektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Standard-Objektträger mit Mattrand Produkt-Nr.: H870.1
Skalpelle	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Chirurgische Einmalskalpelle CUTFIX 21 Produkt-Nr.: 5518075
Spritzenvorsatzfilter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Sterilfilter, 0.2 μm Porengröße, Sorte WCN Zellulosenitrat, Durchmesser 13 mm Produkt-Nr.: 9.950 981 Whatman GmbH, Dassel
Szintillations-Messflaschen	Typ Vial aus LDPE Produkt-Nr.: 0794.1
T25 Zellkulturflasche	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe TC-Flasche T25, Belüftungskappe rot Produkt-Nr.: 83.1810.002
T75 Zellkulturflasche	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht TC-Flasche T75, Belüftungskappe rot Produkt-Nr.: 83.1813.002 Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Zellkultur-Inserts	10 mm Zellkulturinserts 0.4 μm Polycarbonat-Membran Malge Nunc International, Rochester-USA

2.3 Chemikalien, Zellkulturmedien und -zusätze

Alginat	Alginate sodium salt from brown algae BioReagent, suitable for immobilization of MO's Produkt-Nr.: 71238 Sigma-Aldrich GmbH, München
Amphotericin B	Antimykotikum, Produkt-Nr.: A2610 Biochrom AG, Berlin
AquaLight	Reagenz zur Szintillationsmessung Hidex Ltd., Turku - Finnland

BSA	Albumin from bovine serum, lyophilized powder Produkt-Nr.: A2153 Sigma-Aldrich GmbH, München
Collagenase	Collagenase from Clostridium histolyticum 100 mg, lyophilized powder, >125 CDU/mg solid Produkt-Nr.: C2674 Sigma-Aldrich GmbH, München
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5 g/L Glc, 25 mM HEPES, w/o L-Glutamin Lonza Sales Ltd., Basel
DMSO	Dimethylsulfoxid, Produkt-Nr.: A994.2 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dexamethason	suitable for cell culture Produkt-Nr.: D4902 Sigma-Aldrich GmbH, München
DNA-Polymerase	DreamTaq TM DNA Polymerase, 5 u/ μ L Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
dNTP Mix	dNTP Mix, 10mM Produkt-Nr.: R0191 Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
DPX	Eindeckmedium, Produkt-Nr.: 06522 Sigma-Aldrich GmbH, München
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat 99 %, Produkt-Nr.: X986.1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eisessig	Essigsäure 100 %, Produkt-Nr.: 3738.1, 1 L Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂) Produkt-Nr.: 7332.1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	99,5 %, Ph.Eur., reinst Produkt-Nr.: 5054.1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FCS	Fetal Calf Serum Produkt-Nr.: S0115/0216K

Fibronectin	Biochrom AG - Seromed, Berlin 0.1 % Lösung aus bovinem Plasma Produkt-Nr.: F1141
Formaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, München Formaldehyd >37 % (CH ₂ O) Produkt-Nr.: 7398.1
C14 D-Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe C14 D-Glucose Produkt-Nr.: ARC122D, 0,1 mCi/mL American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis
Glutamin	L-Glutamin, Produkt-Nr.: G7513, 200mM Sigma-Aldrich GmbH, München
Gluconolacton	D-(+)-Gluconic acid δ -lactone Produkt-Nr.: G4750 Sigma-Aldrich GmbH, München
Gefrierschnitt Medium	Tissue Freezing Medium Produkt-Nr.: 14020108926 Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Gentamycin	Gentamycin-Sulfat, Produkt-Nr.: A 271-23 Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Glycerin/Glycerol/1,2,3-Propantriol (C ₃ H ₈ O ₃) ROTIPURAN 99,5 % p.a., wasserfrei, Produkt-Nr.: 3783.1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Histofix	Rotihistofix 4 %, Produkt-Nr.: P087.4 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HyClone	HyClone Bovine Calf Serum Thermo Fisher Scientific Inc., Langenselbold
Hydrocortison	1 mg/mL in Ethanol, Produkt-Nr.: K 3520 Biochrom AG, Berlin
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin Produkt-Nr.: I7018 Sigma-Aldrich GmbH, München
Indomethazin	Indomethazin, Produkt-Nr.: I7378 Sigma-Aldrich GmbH, München

Insulin	Insulin (human), Produkt-Nr.: K3620 Biochrom AG, Berlin
Isopropanol	2-Propanol min. 99.5 %, Produkt-Nr.: 9866.5 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kalziumkarbonat	CaCO ₃ , 100 g, Produkt-Nr.: C4830 Sigma-Aldrich GmbH, München
Kollagen	Kollagen from rat tail, Produkt-Nr.: C8897-25MG Sigma-Aldrich GmbH, München
Matrigel	BD Matrigel, Produkt-Nr.: 356230 Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced BD Bioscience, Heidelberg
MesenPro RSTM Basal Medium	Stammzellmedium, Produkt-Nr.: 12746-012 Invitrogen - Life Technologies GmbH, Darmstadt
MesenPro RSTM Growth Supplement	Wachstumsfaktoren, Produkt-Nr.: 12746-012 GIBCO Invitrogen Cell Culture, Darmstadt
Mirus TransIT TKO	siRNA Transfektionsreagenz, Produkt-Nr.: MIR 2154 Mirus Bio LCC, Madison USA
Nukleasefreies Wasser	Water, Nuclease-free, Produkt-Nr.: R0582 Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
PBS	Phosphate Buffered Saline, Produkt-Nr.: P4417 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin - Streptomycin Solution Hybri-MaxTM	Produkt-Nr.: P7539, 100 mL Sigma-Aldrich GmbH, München
Roti[®]-Mount	Xylol- und toluolfreies Eindeckmedium Produkt-Nr.: HP68.1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TriFast	peqGOLD TriFast, Produkt-nr.: 30-2010 Peqlab Biotechnologies GmbH,
TrypLETM Express	Trypsin-Ersatz für Stammzellen, Produkt-Nr.: 12604-013 Invitrogen - Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypsin	Trypsin aus bovinem Pankreas, Produkt-Nr.: 93610 Fluka Chemie AG, Buchs - Schweiz

2.4 Primersequenzen

β-Actin	<i>Homo sapiens</i> β -Actin 661 bp - Fragment fwd 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' Schmelztemperatur: 72,2 °C rev 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3' Schmelztemperatur: 70,9 °C Quelle: de Bari et al. (2001) [71]
PPARγ-2	<i>Homo sapiens</i> Peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 130 bp - Fragment fwd 5'-TGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCC-3' Schmelztemperatur: 64,6 °C rev 5'-CCAAAGTTGGTGGGCCAGAATG-3' Schmelztemperatur: 62,1 °C Quelle: Chen et al. (2006) [72]
VEGF	<i>Homo sapiens</i> VEGF-A 109 bp - Fragment fwd 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3' Schmelztemperatur: 59,4 °C rev 5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGA-3' Schmelztemperatur: 59,4 °C Quelle: Takei et al. (2004) [73]
HLA-C	<i>Homo sapiens</i> HLA-C (MHC Klasse I) 210 bp - Fragment fwd 5'-ATGGCGCCCCGAGCCCTCCTCC-3' Schmelztemperatur: 71,4 °C rev 5'-CGCCCCGCGGCTCCCCTCTCG-3' Schmelztemperatur: 71,7 °C

Quelle: eigenes Primerdesign mittels Primer-BLAST

2.5 siRNA

si:VEGF

Homo sapiens, hVEGF5.siRNA

5'-ACCUCACCAAGGCCAGCAC-3'

Quelle: MWG Operon predesigned siMAX siRNA

2.6 Testreagenzien und Kits

BCA

BCA-A Reagenz Produkt-Nr.: UP95424A, 1 L

BCA-B Reagenz Produkt-Nr.: UP40840, 25 mL

Interchim, Montlucon - Frankreich

Human VEGF ELISA Kit

Produkt-Nr.: KHG0111

Invitrogen Life Technologies

MTT

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

Produkt-Nr.: M5655

Sigma-Aldrich GmbH, München

StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit

A10070-1

GIBCO Invitrogen Cell Culture, Darmstadt

StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit

A10071-1

GIBCO Invitrogen Cell Culture, Darmstadt

StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit

A10072-1

GIBCO Invitrogen Cell Culture, Darmstadt

Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit

100 Reaktionen, Produkt-Nr.: K1632

Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

2.7 Verbrauchsmaterial Histologie

2.7.1 Histologische Farbstoffe

Hämalaun	Hämalaunlösung sauer nach Mayer Produkt-Nr.: T865.1, 500 mL Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eosin G	4',5'-Dibrom-2',7'-dinitrofluorescein-Dinatriumsalz Produkt-Nr.: X883.1, 500 mL Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.7.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Calcein-AM	BioReagent, suitable for fluorescence Produkt-Nr.: 17783 Sigma-Aldrich GmbH, München
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Produkt-Nr.: D1306 Molecular Probes, Oregon - USA
NileRed	BioReagent, suitable for fluorescence Produkt-Nr.: 19123 Sigma-Aldrich GmbH, München
Green Actin Stain	Phalloidin green actin stain Cytoskeleton, Inc., Denver
Phalloidin Rhodamin	PHDR1 Cytoskeleton, Inc., Denver
Propidium Iodid	Produkt-Nr.: P4864 Sigma-Aldrich GmbH, München

2.8 Antikörper

Desmin	Monoclonal Mouse Antibody to Human Desmin Mob060-05 Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
---------------	---

PECAM-1	Monoclonal Mouse Antibody to human PECAM1/CD31 ABIN205319 Antibodies-online.de, Atlanta
goat anti-mouse FITC	aus Laborbestand
goat anti-mouse TRITC	aus Laborbestand
goat anti-mouse Cy3	aus Laborbestand

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Isolierung und Kultivierung humaner Stammzellen aus Fettgewebe (human adipose tissue-derived stem cells (hASC))

Zu Beginn dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe von Invitrogen - Life Technologies GmbH in Darmstadt verwendet (STEMPRO® - Human Adipose-Derived Stem Cell Kit). Die angelegten Primärkulturen wurden über ein charakteristisches Expressionsmuster an Oberflächenproteinen im Durchflusszytometer identifiziert (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 positiv sowie CD14, CD31, CD45, Lin1 negativ) und anschließend kryokonserviert (Abb. 2.1).

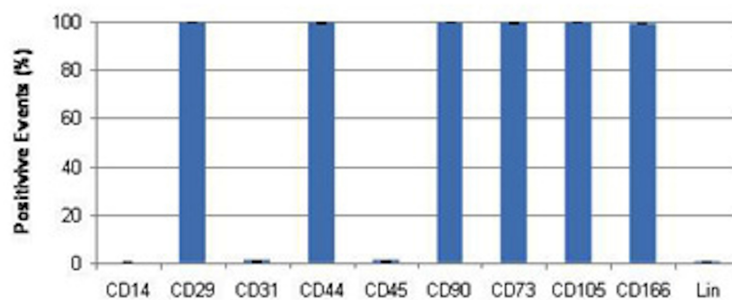


Abbildung 2.1: Charakterisierung ASC (Invitrogen ([74])): hASC sind definiert als CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 positive sowie CD14, CD31, CD45, Lin1 negative Zellpopulation, was hier zur Charakterisierung standardisiert geprüft wurde.

Für die angestrebte klinische Anwendung des Fettgewebeersatzes war jedoch die Etablierung einer schnellen und effizienten Isolationsmethode erforderlich. Hierzu wurden Operationsabfälle aus einer ortsnahen Schönheitsklinik bezogen und hASC wie folgt isoliert, charakterisiert und kultiviert.

2.9.2 Isolierung humaner ASC

Zur Isolation humaner ASC kann eine subkutane Fettgewebsbiopsie oder durch Liposuktion gewonnenes Gewebe genutzt werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolation humaner ASC aus subkutanen Fettgewebsbiopsien

etabliert und durchgeführt. Nach der Biopsie wurde das Gewebe bis zur Zellisolation in PBS gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern. Zur Isolation musste zunächst das subkutane Fettgewebe von der Haut gelöst werden. Um bakterielle Kontaminationen einzugrenzen wurde dieses Gewebe für ca. 5 Sekunden in 70 % 2-Propanol geschwenkt und anschließend dreimal mit sterilem PBS gespült. Für den enzymatischen Verdau wurde das Fettgewebe in kleine Stücke (ca. 1 mm³) geschnitten. Dabei wurde strikt darauf geachtet, dass nur das gelbe Fettgewebe zerkleinert und das weiße Bindegewebe verworfen wurde, um eine Kontamination der Kultur mit Fibroblasten zu minimieren. Die Gewebestücke wurden zu je 1 g in 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit jeweils 1 mL/g 0,075 % Kollagenase-Lösung versetzt. Nach 60 min bei 37 °C im Wasserbad wurden die Ansätze je dreimal im Vortex gemischt und anschließend über einen groben 100 µM CellTrix Nylonfilter von großen, nicht verdauten Gewebekomponenten getrennt. Anschließend wurde der Zellsuspension 2 mL FCS zugegeben um die Enzymaktivität der Kollagenase zu stoppen und bei 200 *g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in PBS + 0,1 % BSA resuspendiert und erneut bei 200 *g 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Zellsediment in supplementiertem MesenProRS, das entsprechend den Herstellerangaben mit MesenProRSTM-Growth Supplement und 1 % L-Glutamin sowie 1 % P/S komplettiert wurde, resuspendiert und die Zellsuspension in T75 Zellkulturflaschen ausgesät werden. Nach 24 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen, um nicht adhärente Zellen und sonstige Verunreinigungen zu entfernen, und frisches MesenProRS + 1 % P/S zugegeben, bevor das Isolationsergebnis mikroskopisch begutachtet wurde. Waren adhärente Zellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie vorhanden, so wurden die Zellkulturflaschen bis zu einer Zellkonfluenz von etwa 80 % weiter kultiviert.

2.9.3 Kultivierung humaner ASC

Kultiviert wurden hASC entweder in speziell supplementiertem MesenProRS oder mit folgendem, Serum-reduzierten Stammzellmedium (DMEM-hASC).

Tabelle 2.1: Rezeptur: DMEM-hASC

Stammzellmedium	DMEM-hASC	
	500 mL	DMEM Basismedium
	3 %	FCS - HyClone, steril
	1 %	L-Glutamin

Gefrierkultur humaner ASC

Zur Kryokonservierung eukaryotischer Zellen wurden hASC Gefrierschutzfaktoren zugesetzt, die das Platzen der Zellen beim Auftauen verhindern. Am häufigsten kommt hier DMSO zum Einsatz, das den Zellen Wasser entzieht und somit die Bildung von Eiskristallen im Zytoplasma verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgendes Gefriermedium zur Kryokonservierung humaner ASC verwendet.

Tabelle 2.2: Rezeptur: Gefriermedium

Gefrier-Medium		
	500 mL	DMEM
	20 %	FCS, steril
	10 %	DMSO
	2 %	L-Glutamin
	1 %	Penicillin/Streptomycin

Zum Einfrieren wurde eine Zellzahl von etwa 1×10^6 Zellen/mL eingestellt und jeweils 1 mL der Zellsuspension in einem Röhrchen zur Kryokonservierung zunächst für 15 min bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die hASC in einem Einfrierblock bei -80 °C tiefgefroren. Nach 24 Stunden wurden die gefrorenen Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie bis zum Auftauen gelagert wurden.

Zum Auftauen der Zellkultur wurde das Röhrchen kurz im Wasserbad bei 37°C geschwenkt und die hASC in 10 mL DMEM-hASC aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren wurden die hASC in frischem DMEM-hASC bzw. MesenProRS resuspendiert und in eine T75 Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen und Zelltrümmer vollständig zu entfernen.

2.9.4 Charakterisierung humaner ASC

Stammzellen aus Fettgewebe können durchflusszytometrisch mittels verschiedener Oberflächenantigene oder über einen Differenzierungsassay als mesenchymale Vorläuferzellen charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Charakterisierung über das mesenchymale Differenzierungspotenzial im Labor etabliert und wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt.

Adipogene Differenzierung und spezifische Färbung von Adipozyten

Zu Charakterisierung humaner ASC wurde das StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit benutzt. Das adipogene Differenzierungsmedium wurde laut Herstellerangaben wie folgt hergestellt (Tab. 2.3) und zu einer Zellkultur mit 80 % Konfluenz in einer 24 Well Platte hinzugefügt.

Tabelle 2.3: StemPro® Adipogenesis Differentiation Medium

StemPro Adipogenesis Differentiation Medium			
	90 mL	StemPro Differentiation Basal Medium	Adipogenesis
	10 mL	StemPro Supplement	Adipogenesis

Das Differenzierungsmedium wurde alle 3 bis 4 Tage erneuert. Nach der gewünschten Differenzierungsdauer wurde die Monolayerkultur mit OilRed-O oder NileRed angefärbt.

OilRed-O Färbung von Adipozyten

Für die Stocklösung wurden 300 mg OilRed-O Pulver abgewogen und in 100 mL 99 % Isopropanol gelöst. Diese Lösung ist ab Herstellungsdatum ein Jahr haltbar. Für die OilRed-O Färbelösung wurden 3 Teile OilRed-O Stocklösung mit 2 Teilen destilliertem, deionisiertem Wasser gemischt, 10 min bei RT inkubiert und über einen Faltenfilter von groben Schwebstoffen getrennt.

Zur OilRed-O Färbung von Adipozyten wurde das Medium von der Zellkultur abgenommen und verworfen und der Zellrasen dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die zu färbenden Zellen in 4 % Paraformaldehydlösung für 10 min fixiert. Vor der Färbung wurde das Formalin

entnommen und verworfen, die Wells vorsichtig mit destilliertem, deionisiertem Wasser gewaschen und die Adipozyten 5 min in 60 % Isopropanol inkubiert. Zur eigentlichen Färbung wurde nun das Isopropanol entnommen und 500 μ L OilRed-O Färbelösung den Zellen zugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min wurde die Färbelösung abgenommen und verworfen, die Zellen 4-6 s in 60 % Isopropanol gespült und anschließend mit destilliertem, deionisiertem Wasser gewaschen bis dieses klar blieb und direkt mit dem Lichtmikroskop analysiert.

NileRed Fluoreszenzfärbung von Adipozyten

Zur NileRed Fluoreszenzfärbung wurde eine Stocklösung mit 1 mg/mL NileRed in Aceton hergestellt, welche bei -28°C gelagert wurde. Zur Herstellung der Färbelösung wurde die Stocklösung 1:100 in PBS verdünnt. Zur Fluoreszenzfärbung der Adipozyten wurde das Medium von der Zellkultur abgenommen und verworfen, der Zellrasen dreimal 5 min mit PBS gewaschen, der Zellrasen mit NileRed Färbelösung bedeckt und 20 min abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und verworfen, der Zellrasen 2 mal je 5 min mit PBS gewaschen und direkt mit dem Lichtmikroskop analysiert.

Chondrogene Differenzierung und Alcian-Blau Färbung von Chondrozyten

Zur Charakterisierung humaner ASC wurde das StemPro[®] Chondrogenesis Differentiation Kit benutzt. Das chondrogene Differenzierungsmedium wurde laut Herstellerangaben wie folgt hergestellt (Tab. 2.4).

Tabelle 2.4: StemPro[®] Chondrogenesis Differentiation Medium

StemPro Chondrogenesis Differentiation Medium			
	90 mL	StemPro Differentiation Basal Medium	Chondrogenesis
	10 mL	StemPro Supplement	Chondrogenesis

Das Differenzierungsmedium wurde alle 3 bis 4 Tage erneuert. Nach der gewünschten Differenzierungsdauer wurde die Monolayerkultur zum Nachweis der Proteoglykan-Synthese von Chondrozyten mit dem Farbstoff Alcian-Blau behandelt. Hierzu wurden die Zellen 30 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert, dreimal je 5 min mit PBS gewaschen und mit Alcian-Blau Färbelösung (siehe Tab. 2.5) für 30 min angefärbt.

Tabelle 2.5: Alcian-Blau Färbelösung

Alcian-Blau Färbelösung		
	1 %	Alcian-Blau
	0.1 N	HCl

Anschließend wurde der Farbstoff verworfen und die Wells dreimal mit 0.1 N HCl gespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Zur Neutralisierung der Säure und Visualisierung der Blau-Färbung wurden die Wells mit destilliertem Wasser ausgewaschen und im Lichtmikroskop analysiert.

Osteogene Differenzierung und Alizarin-Rot Färbung von Osteozyten

Zu Charakterisierung humaner ASC wurde das StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit benutzt. Das osteogene Differenzierungsmedium wurde laut Herstellerangaben wie folgt hergestellt (siehe Tab. 2.6).

Tabelle 2.6: StemPro® Osteogenesis Differentiation Medium

StemPro Osteogenesis Differentiation Medium			
	90 mL	StemPro Differentiation Basal Medium	Osteogenesis
	10 mL	StemPro Supplement	Osteogenesis

Das Differenzierungsmedium wurde alle 3 bis 4 Tage erneuert. Nach der gewünschten Differenzierungsdauer wurde die Monolayerkultur zum Nachweis der Kalzium-Einlagerungen der Osteozyten mit dem Farbstoff Alizarin-Rot behandelt. Hierzu wurden die Zellen 30 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert, dreimal 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Alizarin-Rot Färbelösung (siehe Tab. 2.7) für 2-3 min angefärbt.

Tabelle 2.7: Alizarin-Rot Färbelösung

Alizarin-Rot Färbelösung		
Färbelösung	2 %	Alizarin-Rot
mit	4.2	pH

Anschließend wurde der Farbstoff verworfen und die Wells dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Das Färbeergebnis wurde direkt im Lichtmikroskop analysiert und dokumentiert.

2.9.5 Adipogene Differenzierung humaner ASC

Weitere Versuche, die eine adipogene Differenzierung humaner ASC beinhalteten, wurden mit folgendem Labor-eigenem adipogenem Differenzierungsmedium hergestellt (Tab. 2.8).

Tabelle 2.8: Rezeptur: Adipogenes Differenzierungsmedium

Adipogenes Differenzierungsmedium		
	500 mL	DMEM
	10 %	HyClone FCS, steril
	10 μ M	Dexamethason
	0.2 μ M	Indomethazin
	1 mM	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)
	100 μ g/ml	Insulin

2.9.6 Isolierung und Kultivierung porciner Stammzellen aus Fettgewebe (porcine adipose tissue-derived stem cells (pASC))

Die Isolierung, Charakterisierung, Differenzierung und Kultivierung porciner ASC wurde entsprechend der etablierten Methode zur Isolierung humaner ASC durchgeführt. Durchführung und Medien sind den entsprechenden Kapiteln 2.9.1 bis 2.9.4 zu entnehmen.

2.9.7 Isolierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Humane umbilicale Endothelzellen (Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells, HUVEC) können entweder als etablierte Zelllinie oder als Primärzellkultur kommerziell erworben werden. Günstiger ist jedoch die Isolierung primärer Zellen aus der großen Nabelschnurvene. Die entsprechende Isolationsmethode [75] wurde im Rahmen dieser Dissertation im Labor etabliert und wie folgt durchgeführt. In einem ersten Schritt mussten T25 Zellkulturflaschen mit Gelatine beschichtet werden. Hierzu wurde eine 1 % Gelatinelösung in destilliertem, deionisiertem Wasser hergestellt und autoklaviert. 5 mL dieser Gelatinelösung wurden in T25 Zellkulturflaschen gegeben, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die überflüssige Gelatinelösung abgenommen und verworfen. Die Flaschen wurden wieder verschlossen und konnten nun zur Kultivierung von HUVEC genutzt werden. Die Nabelschnur wurde direkt nach der Geburt des Kindes abgeklemmt und abgeschnitten. Die Klemmen verblieben hierbei an den Enden der Nabelschnur. Anschließend wurde die Nabelschnur bis zur Isolierung der HUVEC, in sterilem PBS eingelegt und kühl gelagert. Zur Isolierung der Endothelzellen aus der großen Nabelschnurvene wurde die noch immer abgeklemmte Nabelschnur zunächst einmal 30 s in 70 % 2-Propanol und dreimal für je 5 min in sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde an beiden Enden die Klemmen entfernt und die Nabelschnur auf einem sterilen Papiertuch trockengetupft. In einem nächsten Schritt wurde die große Nabelschnurvene mit steriler 0.86 % NaCl-Lösung gründlich gespült und an einem Ende wieder mit einer Klemme dicht verschlossen. Die Vene wurde nun mit 0.1

% Kollagenaselösung befüllt und bei 37 °C 20 min inkubiert. Anschließend wurde ein Ende der Nabelschnur wieder geöffnet, der Inhalt in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen aufgefangen und mit gleichem Volumen sterilem FCS versetzt. Über das geöffnete Ende der Nabelschnur wurde diese nun mit 0.86 % NaCl-Lösung nochmals befüllt, erneut verschlossen und die Nabelschnur massiert, um bereits angelöste Endothelzellen vollständig abzulösen. Wiederum wurde ein Ende der Nabelschnur geöffnet und der Inhalt in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen aufgefangen und mit FCS versetzt, um die Enzymaktivität der Kollagenase zu inhibieren.

Tabelle 2.9: Rezeptur: HUVEC Medium

HUVEC Medium		
	500 mL	M200
	3 %	FCS - HyClone, steril
	1 %	L-Glutamin

Die entnommene Zellsuspension wurden in Zentrifugenröhrchen bei 200*g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in Antibiotika-haltigem M200 HUVEC-Medium resuspendiert und auf die gelatinisierten T25 Zellkulturflaschen verteilt. Nach 24 Stunden wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um nicht adhärente (Blut-)Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Sobald die Kulturen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurden Subkulturen angelegt sowie die Charakterisierung der isolierten Zellen durchgeführt.

2.9.8 Kryokonservierung HUVEC

Die Kryokonservierung der HUVEC wurde analog zur bereits beschriebenen Methode (Kap. 2.9.3) für die Kryokonservierung von hASC durchgeführt, es wurde jedoch spezielles HUVEC Gefriermedium verwendet (siehe Tabelle 2.10).

2.9.9 HUVEC Charakterisierung

Zur Charakterisierung der primären HUVEC wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, dreimal mit PBS + 0.1 % BSA gewaschen und zwischen den

Tabelle 2.10: Rezeptur: HUVEC Gefriermedium

HUVEC Gefriermedium		
	500 mL	FCS
	10 %	DMSO
	1 %	Penicillin/Streptomycin

Waschschritten bei 200 *g je 5 min zentrifugiert. Der Primärantikörper "mouse anti-PECAM1" wurde 1:500 in PBS + 0.1 % BSA verdünnt. Nach dem dritten Waschschritt wurde das Zellsediment in dieser Primärantikörper-Lösung resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgten wiederum drei Wasch- und Zentrifugationsschritte bei 4 °C. Der Sekundärantikörper "sheep anti-mouse/FITC" oder "goat anti-mouse/Cy3" wurde 1:100 in PBS + 0.1 % BSA verdünnt. Nach dem dritten Waschschritt wurde das Zellsediment in dieser Sekundärantikörper-Lösung resuspendiert und weitere 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper-markierten Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.9.10 HUVEC Tube Formation Assay

Einer der am häufigsten angewandten Tests zu *in vitro* Untersuchung von Angiogenese ist der HUVEC Tube Formation Assay. In Gegenwart pro-angiogener Stoffe können Endothelzellen in diesem Modellsystem auf einer speziellen Matrix migrieren, proliferieren und dreidimensionale tubuläre Strukturen ausbilden. Dies gilt als Angiogenese.

Zunächst wurde BD MatrigelTM über Nacht im Kühlschrank auf Eis aufgetaut und 50 µL pro Well in die Kavitäten einer 96 Well Platte pipettiert und 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden HUVEC trypsiniert, bei 200 *g 5 min zentrifugiert und das Sediment in M200 Basismedium ohne Supplementierung resuspendiert. Nachdem sich das MatrigelTM in der 96 Well Platte verfestigt hatte, wurden 100 µL einer Zellsuspension mit einer Zellzahl von 5x10⁵Zellen pro mL in die zuvor mit MatrigelTM beschichteten Wells gegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde das M200 Basismedium vorsichtig aus den Wells abgenommen und verworfen und die entsprechenden Prüfmedien aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde HUVEC Medium (siehe Tab. 2.9), als Negativkontrolle M200 ohne Supplementierung

benutzt. Nach weiteren 24 h bei 37 °C wurde 2 µg/mL Calcein-AM zu den Endothelzellen gegeben, um lebende Zellen und Tubes im Fluoreszenzmikroskop zu analysieren. Die Auswertung erfolgte fotografisch, indem alle vorhandenen Tubes pro Well fotografiert und mit Hilfe der Bildanalysesoftware ImageJ (Freeware NIH) ausgezählt und vermessen wurden.

2.9.11 Isolierung und Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten (human fibroblasts from adult skin tissue (HF AST))

Humane, dermale Fibroblasten können durch zwei unterschiedliche Methoden isoliert werden. Zum einen ist es möglich die Dermis enzymatisch zu Verdauen, um die Fibroblasten zu vereinzeln und in Kulturgefäßen auszusäen. Zum anderen können Zellen im Kulturgefäß direkt aus Vollhaut oder Dermissegmenten auswachsen, was viel Geduld erfordert, aber meist zur gewünschten Zellkultur führt. Dazu wurde die Spenderhaut in 1 cm² große Stücke geschnitten und je dreimal 30 Sekunden mit Isopropanol und PBS gewaschen. Anschließend wurden die Hautsegmente nochmals geviertelt und in entsprechend vorbereitete Zellkulturschalen gelegt. Nach einer Trocknungszeit von 30 min unter der Sterilwerkbank wurden die Zellkulturschalen mit DMEM-Vollmedium befüllt, so dass die Hautsegmente gerade nicht bedeckt sind. Nach etwa 3 Tagen konnten im Mikroskop bereits erste auswachsende Zellen erkannt werden. Nach 5 Tagen wurden die Hautsegmente abgenommen und die ausgewachsenen Zellen weiter kultiviert.

Die Kultivierung von HF AST erfolgte dann in T75 Zellkulturflaschen mit folgendem Zellkulturmedium.

Tabelle 2.11: Rezeptur: DMEM-Vollmedium

DMEM Vollmedium		
	500 mL	DMEM
	10 %	FCS, steril
	2 %	L-Glutamin

Eine Subkultivierung erfolgte stets bei einer Konfluenz von etwa 80 %. Zur Kryokonservierung wurde wie bereits in Kapitel 2.9.3 beschrieben verfahren.

2.9.12 Proliferations- und Vitalitätstests

Proliferationsanalysen werden genutzt, um die Verdopplungszeit eukaryotischer Zellen zu quantifizieren und so eine Aussage über das Zellwachstum treffen zu können. So kann auch der Einfluss verschiedener Substanzen oder Medienzusätze auf die Zellkultur, deren Wachstum und Vitalität untersucht werden. Bei einer Vitalitätsanalyse wird nicht die Verdopplung der Zellen, sondern deren Lebensfähigkeit untersucht. Derzeit sind zahlreiche standardisierte Testsysteme kommerziell erhältlich, bei denen die Proliferationsraten über Radioaktivität, Chemilumineszenz oder Absorptionsphotometrie gemessen werden.

BCA-Test zur Proteinquantifizierung

Der Bicinchoninic Acid Assay (BCA-Assay) ist eine colorimetrische Methode zur Proteinquantifizierung. Dazu wurden zunächst die zu untersuchenden Zellen (in dieser Arbeit hASC, HUVEC, HF AST) in eine 96 Well Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Inkubation von mindestens 30 Minuten bei 37 °C im CO₂-Inkubator erfolgte die Zugabe der Prüfsubstanzen in die jeweiligen Wells. Anschließend wurden die Zellen 24-72 Stunden (je nach Fragestellung bzw. Prüfsubstanz) mit den Prüfsubstanzen kultiviert. Nach 3 Tagen erfolgte die Auswertung des BCA-Tests. Hierfür wurde die Zellkulturplatte dreimal mit PBS gewaschen. Je Well wurden 25 µL PBS zugegeben, bevor die Platte je dreimal bei -28 °C eingefroren und bei 37 °C und 650 rpm im Thermomixer aufgetaut wurde.

BCA-A und BCA-B Reagenz wurden im Verhältnis 1:50 gemischt. Nach dem dritten Auftauvorgang wurden je Well 200 µL BCA-Reagenz pipettiert. Das BCA-Reagenz wurde dann 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt, bevor die Platte mit dem Multiwellplattenleser GENios bei einer Wellenlänge von 540 nm ausgewertet werden konnte.

MTT Assay zur Vitalitätsanalyse

Der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) Assay ist ein Vitalitätstest, bei dem Zellen *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff "Tetrazoliumsalz" behandelt werden, um so den Anteil lebender

Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen. Dieser Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs entspricht damit der zellulären Glykolyserate und ist somit ein Nachweis für stoffwechselaktive, lebende Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit kam die MTT-Färbung bei Zytotoxizitätsanalysen nach DIN EN ISO 10993-5 entsprechend der normativen Anforderungen zum Einsatz.

Calcein-AM/Propidiumiodid-Färbung zur Vitalitätsanalyse

Gibt man Calcein-AM zu vitalen Zellen nehmen diese den veresterten Farbstoff über ihre Zellmembran schnell auf. Esterasen spalten den Ester intrazellulär enzymatisch ab und das grün fluoreszierende Calcein wird frei, so dass Zytoplasma stoffwechselaktiver, vitaler Zellen grün angefärbt wird. Der Fluoreszenzfarbstoff zeigt ein Anregungsmaximum bei 495 nm (Excitation) und ein Abstrahlungsmaximum (Emissionsmaximum) bei 515 nm. Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, welcher die perforierte Zellmembran von toten Zellen, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen kann. Propidiumiodid hat ein Absorptionsmaximum bei 488 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm. Eine Calcein-AM/Propidiumiodid-Doppelfärbung kann so zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Fluoreszenzmikroskopie genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Calcein-AM Färbung mit einer Endkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ unter anderem zur Vitalfärbung im HUVEC Tube Formation Assay (siehe Kap. 2.9.10) eingesetzt. In derselben Konzentration kam diese Färbemethode aber auch bei der Vitalitätsbestimmung der auf verschiedenen Biomaterialien angesiedelten Zellen bzw. der in den später entwickelten Alginatkonstrukten verkapselten Zellen zum Einsatz.

2.9.13 Besiedelung textiler Implantate mit humanen Zellen

Um textile Implantate oder Nahtmaterialien mit Zellen zu besiedeln, wurden diese zunächst in einen sterilen Zustand gebracht. Materialien, die einer

Dampfsterilisation bei 121 °C standhalten, wurden vor ihrem Gebrauch autoklaviert. Viele resorbierbare Materialien sind allerdings nicht hitzestabil und schmelzen daher bei erhöhten Temperaturen. Für den Einsatz in der Zellkultur war es somit nötig, die Materialien nach dem Anpassen der Größe für 48 Stunden in folgendem Sterilisationsmedium im CO₂-Inkubator zu inkubieren.

Tabelle 2.12: Rezeptur: Sterilisationsmedium

DMEM Sterilisationsmedium		
	500 mL	DMEM - Vollmedium
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	3 µg/mL	Amphotericin B

Nach entsprechender Vorbereitung und Sterilisation konnten die jeweiligen Materialien in der Zellkultur eingesetzt werden. Zur Besiedelung der textilen Implantate mit ASC wurde zwischen zwei Varianten gewählt:

1. *Besiedelung textiler Materialien ohne adhäsionsfördernde Proteine*

Die Zellen wurden wie gewohnt passagiert und eine hohe Zellzahl in einer geringer Menge Zellkulturmedium aufgenommen. Wenige Mikroliter dieser Suspension wurden anschließend auf das zu besiedelnde Textil pipettiert. Um die Anhaftung der Zellen auf der Oberfläche der Textilfasern zu erreichen, wurden diese 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnte das Zellkulturgefäß mit Medium befüllt werden.

2. *Besiedelung unter Zuhilfenahme adhäsionsfördernder Proteine*

Hier wurden die Zellen nach dem Passagieren in Gelgießlösung aufgenommen und diese mit gelöstem Kollagen gemischt. Anschließend wurde das Gemisch wie zuvor beschrieben auf die textilen Implantate pipettiert und 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.10 Alginat in der Zellkultur

Alginatlösungen können durch Einlagerung von Kalziumionen gelieren. Um diese Reaktion kontrolliert ablaufen zu lassen, werden in der Praxis verschiedene Ansätze verfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Methoden zur Polymerisierung der Alginatlösungen evaluiert.

2.10.1 Externe Polymerisation: CaCl_2 Fällbad

Bei dieser Methode wurde eine 3 %ige Alginatlösung in dem gewünschten wässrigen Medium (z.B. Wasser, Zellkulturmedium, NaCl) hergestellt. Anschließend wurde die Lösung in eine Spritze (5 mL oder 50 mL Einmalartikel) gefüllt und je nach gewünschtem Faserdurchmesser über den Luer-Ausgang der Spritze oder passende Kanülen mit entsprechender Stärke bei gleichbleibender Geschwindigkeit in ein 1 M CaCl_2 Fällbad gespritzt.

2.10.2 Externe Polymerisation: Tiefemperaturpolymerisation

Bei der Tiefemperaturpolymerisation wurde ebenfalls eine 3 %ige Alginatlösung in dem gewünschten, wässrigen Medium hergestellt. Anschließend wurde diese viskose Lösung sehr dünn in Formen (Beispiel siehe Abb. 2.2) gegossen und für mindestens eine Stunde bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren.

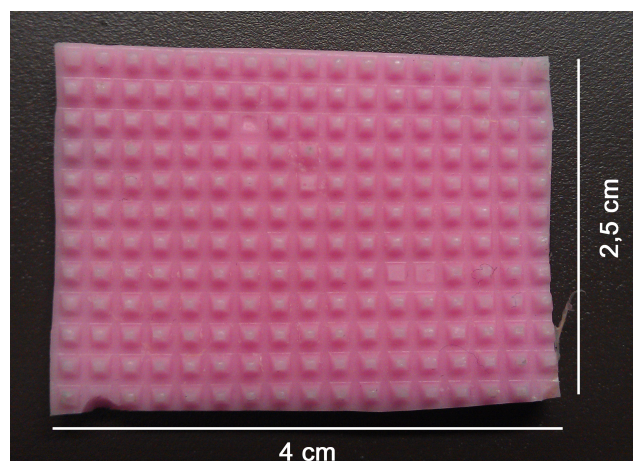


Abbildung 2.2: Silikonform zur Herstellung von Alginatnetzen

War das Alginat vollständig gefroren, wurde es direkt in das bereits oben beschriebene CaCl_2 Fällbad gelegt und ca. 10 min inkubiert. Anschließend konnte man die Form entfernen und das Netz je nach späterer Anwendung luft- oder gefriertrocknen.

2.10.3 Interne Polymerisation: CaCO_3

Zur internen Polymerisation wurde eine 3 %ige Alginatlösung in dem gewünschten, wässrigen Medium hergestellt. 15 g des so entstandenen Sols wurden auf dem Magnetrührer mit 1 mL 1 M Glucono-D-Lacton (GDL) verrührt. Anschließend wurden 2 mL der 0.5 M Kalziumkarbonat (CaCO_3)-Suspension zugegeben und 30 s untergerührt, der Magnetrührstab entfernt und die Masse weitere 10 min bei RT polymerisiert. Der dadurch entstandene Flüssigkeitsüberstand wurde verworfen und das entstandene, poröse Hydrogel 24 h lyophilisiert.

2.11 Integration biologisch aktiver Substanzen in eine Alginatmatrix

Die kontrollierte Freisetzung biologisch aktiver Substanzen aus Matrices, z.B. Fasern oder Scaffolds, ist ein wichtiger Aspekt der Regenerativen Medizin. So könnte beispielsweise VEGF zur Induktion eines initialen Angiogenesereizes in ein Biopolymer integriert werden. Um dies zu prüfen, wurde eine Freisetzungskinetik mittels Flüssig-Szintillationsmessung durchgeführt.

2.11.1 Freisetzungskinetik mittels Szintillationsmessung von ^{14}C D-Glukose/Concanavalin A

Zunächst wurden Komplexe aus radioaktiv markierter ^{14}C D-Glukose und Concanavalin A hergestellt. Diese Komplexe entsprechen in ihrer molekularen Größe dem etwa 40 kDA großen VEGF. Die Stocklösung mit diesen Komplexen wurde anschließend 1:1000 zu einer 3 % Alginatlösung in DMEM-Vollmedium gegeben. Aus dieser radioaktiv markierten Alginatlösung wurden über Tieftemperaturpolymerisation Netze hergestellt (siehe Kap. 2.10.2). Nach

dem Trocknen wurden die Netze in gleich große Stücke geschnitten und über einen Zeitraum von 21 Tagen in DMEM Basismedium bei 37 °C kultiviert. 24 h vor der Probenahme wurde das Medium gewechselt, so dass in der Freisetzungskinetik die Freisetzung von ^{14}C D-Glukose/Concanavalin A pro 24 h bestimmt werden konnte.

Szintillationsmessung

Zur Szintillationsmessung wurde 6 mL destilliertes Wasser in die Szintillations-Messflaschen vorgelegt. Anschließend wurde 1 mL des zu prüfenden Mediums in die Messflaschen überführt, 8 mL AquaLight Szintillationscocktail zugegeben und die Messung gestartet.

2.11.2 Immobilisierung humaner ASC in einer Alginatmatrix

Zur Immobilisierung humaner ASC in einer Alginatmatrix wurde eine 3 % Alginatlösung in DMEM-Vollmedium hergestellt. hASC wurden mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und in einer Zellzahl von 2×10^6 in DMEM-Vollmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann 1:2 mit der 3 % Alginatlösung gemischt und wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben in einer 1 M CaCl_2 gefällt. Nach 1-minütiger Inkubation in 1 M CaCl_2 wurden die zellhaltigen Alginatkonstrukte aus dem Fällbad genommen, mit PBS gespült, in eine Zellkulturplatte überführt und mit DMEM-Basismedium + 1 % P/S bedeckt.

2.11.3 Herstellung einer adipogenen Alginatmatrix

Zur Herstellung einer adipogenen Alginatmatrix wurde eine 3 % Alginatlösung in 2-fach konzentriertem adipogenen Differenzierungsmedium hergestellt. Die Immobilisierung der hASC erfolgte analog zu Kap. 2.11.2. Nach 14-21 Tagen konnte die adipogene Differenzierung der immobilisierten hASC, wie in Kap. 2.9.4 beschrieben, über OilRed-O Färbung oder NileRed Färbung nachgewiesen werden.

2.12 Molekularbiologische Standardmethoden

2.12.1 Isolierung der mRNA aus Gesamtzelllysaten

Zur Genexpressionsanalyse muss die mRNA aus Zell- oder Gewebelysaten zu isoliert werden. Diese mRNA-Isolate humaner ASC und HF AST wurden mittels reverser Transkription in einem Random-PCR Verfahren in cDNA-Templates umgeschrieben und anschließend mittels qualitativer PCR und Agarosegelelektrophorese oder quantitativer RealTime PCR analysiert.

Homogenisierung

Zur Homogenisierung einer Monolayer Zellkultur wurde 1 mL peqGOLD TriFast je 10 cm² Wachstumsfläche verwendet. Zur Homogenisierung von Gewebe wurde 1 mL TriFast je 100 mg Gewebe verwendet. Konnte die Probe nicht direkt weiter prozessiert werden, wurde das Zell- bzw. Gewebelysat bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

Phasentrennung

Zur Phasentrennung wurden dem Homogenat 0.2 mL Chloroform pro eingesetztem Milliliter TriFast zugegeben, im Vortex gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit. Nun befand sich die mRNA ausschließlich in der wässrigen Phase. Daher wurde die wässrige Phase vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur RNA-Extraktion auf Eis gelagert. Die verbleibende Inter- und Phenolphase kann für spätere DNA- und Proteinaufreinigung weiter bei -80 °C gelagert werden.

mRNA Präzipitation

Zur RNA Präzipitation wurde der wässrigen Phase 0.5 mL eiskaltes Isopropanol pro eingesetztem mL TriFast zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben wieder 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert.

Waschen der mRNA

Zum Waschen der RNA wurde der Isopropanol-Überstand nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde zweimal mit 0.2 mL eiskaltem 75 % Ethanol im Vortex gemischt und anschließend durch Zentrifugation (10 min, max. Geschwindigkeit und 4 °C) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Ethanolüberstand vorsichtig aber möglichst vollständig abgenommen und verworfen. Das RNA-Sediment wurde nun für max. 30 min an der Luft getrocknet.

Lösen der mRNA und Lagerung

Nachdem das Ethanol abgedampft und das Sediment getrocknet war, wurde die RNA in 50 µL sterilem, nuklease-freiem DEPC-Wasser gelöst, der RNA-Gehalt mit Hilfe eines Nanodrop Photometer bestimmt und die mRNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.12.2 cDNA Synthese mittels Random-PCR

Die zur Genexpressionsanalyse isolierte Template-mRNA wurde zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde folgendes Protokoll verwendet.

Tabelle 2.13: Standardprotokoll Random-PCR

20 µL Reaktionsansatz:	
1-100 ng	"template" mRNA
4 µL	5x Reaktionspuffer
2 µL	10 mM dNTPs
1 µL	Random Hexamer Primer
1 µL	20 U/µL RiboLock RNase Inhibitor
1 µL	200 U/µL RevertAid H Minus M-MuIV reverse Transkriptase
ad 20 µL	DEPC treated H ₂ O

Zur reversen Transkription der mRNA wurden sogenannte Random Hexamer Primer eingesetzt. Als Negativkontrolle (no template control - NTC) wurde bei jedem Lauf eine Reaktion mit H₂O oder 1x TE Puffer anstelle der

Template-mRNA eingesetzt.

Tabelle 2.14: Standardprogramm Mastercycler: Random-PCR

Standardprogramm	Random PCR		
	5 min	25 °C	Start
	60 min	42 °C	cDNA Synthese
	5 min	70 °C	Termination
	∞	4 °C	Kühlung der PCR-Produkte bis zur Weiterverarbeitung

2.12.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen wurde die "Polymerase Chain Reaction" (PCR) nach dem Protokoll von Saiki *et al.* [76] und Bej *et al.* [77] angewandt. Mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen (z.B. *Taq*-Polymerase) und synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primern) können hierbei bestimmte DNA-Fragmente amplifiziert werden, so dass sie im Agarosegel als spezifische Banden detektierbar sind. Durch Variation der Anlagerungstemperatur der Primer (Annealing-Temperatur) oder der Mg²⁺-Konzentration kann die Spezifität der Reaktion beeinflusst werden.

Tabelle 2.15: Standardprotokoll PCR

20 µL Reaktionsansatz:		
	1-100 ng	"template" DNA
	2 µL	10x PCR-Puffer
	0,4 µL	10 mM dNTPs
	0,5 µL	10 µM Primer 5'
	0,5 µL	10 µM Primer 3'
	0,1 µL	<i>Taq</i> DNA Polymerase
	ad 20 µL	nuclease free dH ₂ O

Als Negativkontrolle (no template control - NTC) wurde bei jedem Lauf eine Reaktion mit H₂O oder 1x TAE Puffer anstelle der "Template-DNA" eingesetzt. Als Positivkontrolle und interne Referenz der PCR wurde stets ein Housekeeping Gen (z.B. β -Actin) mit angesetzt.

Tabelle 2.16: Standardprogramm Mastercycler

Standardprogramm	PCR		
Start	2 min	94°C	Denaturierung der template DNA
33 Zyklen:	30 sec	94 °C	Denaturierung der template DNA
	30 sec	var. °C	Denaturierung der template DNA
	30 sec	68 °C	Elongation (Synthese des Zweitstranges)
Ende	7 min	68 °C	Elongation (Vervollständigung der Reaktion)
	∞	4 °C	Kühlung der PCR-Produkte bis zur Weiterverarbeitung

2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Gelelektrophorese wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Die jeweilige Konzentration der Agaroselösung richtet sich hierbei nach der zu detektierenden Fragmentgröße: Je weniger Basenpaare das PCR-Produkt aufweist, desto höherprozentig wurde das Agarosegel angesetzt. Für die hier verwendeten PCR Produkte des VEGF Primerpaars (100 bp) wurde beispielsweise ein 4,5 %iges Agarosegel bevorzugt.

Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurde dem Ansatz unter einem Chemikalienabzug 7,5 µL Ethidiumbromidlösung zugefügt, das Gel in die Agarosegelform gegossen, der Taschenkamm eingesetzt und das Gel erkalten lassen. Nach dem Aushärten/Erkalten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und die DNA-Marker sowie die Proben in die entsprechenden Taschen aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese bei ca. 80 V so lange durchgeführt, bis die sichtbaren Markerbanden zu 75 % durch das Gel gelaufen waren. Das Agarosegel wurde direkt im Anschluss in der Gel-Dokumentationskammer (GelDoc, Biorad) analysiert.

2.13 Protein Knockdown mittels siRNA Transfektion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protein-Knockdown mittels siRNA durchgeführt. Hierbei wurde VEGF-mRNA über spezifische VEGF-siRNA (im Folgenden "siVEGF") blockiert, so dass die Proteinbiosynthese von VEGF inhibiert war.

2.13.1 siRNA Transfektion

Zur siRNA Transfektion wurde zunächst die siRNA in einer Stockkonzentration von 100 pmol/ μ L in 1x siMAX Universal Buffer (vom Hersteller mitgeliefert) aufgenommen. Zur Herstellung einer 1 μ M Gebrauchslösung wurde diese Stocklösung 1:100 verdünnt.

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen passagiert und in einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen pro Well in einer 24 Well Platte bzw. auf den entsprechenden Herniennetzen ausgesät. 60 min vor der Transfektion wurde das Medium entnommen und frisches, nicht supplementiertes Medium in die Wells gegeben. Zur Herstellung der Transfektionskomplexe wurde (je Well) 50 μ L nicht supplementiertes Zellkulturmedium mit 2,5 μ L Mirus TransIT-TKO Transfektionsreagenz und 15 μ L der 1 μ M siRNA Gebrauchslösung gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 50 μ L dieser Transfektionskomplexe in jedes Well gegeben und 24 h auf den Zellen belassen. Zur Transfektionskontrolle wurden jeweils NTCs (No Template Controls; Ansätze mit Transfektionsreagenz ohne siRNA) sowie Negativkontrollen (ohne Transfektionsreagenz und ohne siRNA) mitgeführt. Nach 24h Inkubation der Transfektionskomplexe wurde erneut das Medium entnommen und frisches, supplementiertes Medium zugefügt. Dieses Medium wurde weitere (mind.) 24h auf den Zellen inkubiert, bevor ein VEGF-ELISA zum Nachweis des Knockdown erfolgte.

2.13.2 Nachweis des Knockdowns mittels ELISA

Zum Nachweis des VEGF Knockdown über siVEGF wurde der Zellkulturüberstand 24 h nach Transfektion auf die sezernierte VEGF-

Menge mit Hilfe eines VEGF-ELISA analysiert. Die Durchführung des VEGF-ELISA erfolgte nach Herstellerangaben.

2.14 Histologie

Zur histologischen Bewertung des CAM-Gewebes war es nötig, die jeweiligen Gewebeproben entsprechend zu fixieren, einzubetten, zu schneiden und anschließend zu färben.

Der erste Schritt war dabei die Fixierung des Gewebes, beispielsweise in 4 % Paraformaldehydlösung. Anschließend folgte die Einbettung in Paraffin, Kunstharz oder andere Einbettmedien. Nach dem Aushärten dieser Medien konnten die eingebetteten Gewebeproben wenige Mikrometer dünn geschnitten und entsprechend angefärbt werden.

2.14.1 Einbetten histologischer Proben zur Anfertigung von Gefrierschnitten

Um Gewebe mit einem Kryostat zu schneiden, musste es zunächst am Probenhalter fixiert werden. Dazu wurde eine ausreichend große Menge an Gefrierschnittmedium auf einen ungekühlten Probenhalter gegeben, bevor dieser in die entsprechende Haltevorrichtung des kalten Kryostats gestellt wurde. Anschließend wurde die Probe im noch flüssigen Gefrierschnittmedium ausgerichtet. Nachdem die Probe vollständig gefroren war, konnten Gewebeschnitte angefertigt, auf Standard-Glasobjektträger aufgezogen und ohne weitere Vorbehandlung direkt gefärbt werden.

2.14.2 Einbetten biologischer Gewebeproben in Epoxidharz

Für die Einbettung histologisch relevanter Gewebeproben in Epoxidharz mussten die Proben über Nacht in 4 % Paraformaldehydlösung fixiert werden. Um überschüssiges Paraformaldehyd zu entfernen, wurde das Gewebe anschließend drei Mal mit PBS gewaschen. Um das Gewebe haltbar zu machen war es nötig, die Probe, wie vom Hersteller beschrieben, in einer aufsteigenden Aceton-Reihe (30 %, 60 %, 90 %, 100 %) für je 5 min zu entwässern. Folgende Lösungen ergaben letztlich das eigentliche Kunstharz:

1. Mixture A

- 5 mL Epoxy Embedding Medium
- 8 mL DDSA

2. Mixture B

- 8 mL Epoxy Embedding Medium
- 7 mL NMA

3. Final Embedding Medium

- 16 Tropfen Beschleuniger zu 15 mL Mixture B geben
- Mixture A und Mixture B zu gleichen Teilen mischen

Im letzten Schritt wurden die Proben in Silikon-Einbettformen überführt und diese mit "Final Embedding Medium" befüllt. Das Kunstharz wurde zunächst 12 Stunden bei 45 °C entgast, bevor es weitere 24 Stunden bei 60 °C zur Polymerisation inkubiert wurde. Nach dieser Behandlung war das Harz ausgehärtet und konnte für die Weiterverarbeitung am Mikrotom vorbereitet werden.

Ätzen der Epoxidharzschnitte

Um Semi-Dünnschnitte von Epoxy-eingebetteten Proben optimal anzufärben, war es nötig, das Kunstharz möglichst vollständig zu entfernen. Dazu wurden 1 μm dicke Epoxidharzschnitte in einem Tropfen Wasser auf einen (Polysin-beschichteten) Objektträger überführt und bei 60 °C auf dem Strecktisch vollständig getrocknet. Für die anschließende Ätzung musste Natrium-Ethoxid mit Ethanol zu gleichen Teilen gemischt werden. Um das Kunstharz herauszulösen wurden die Objektträger mit den Semi-Dünnschnitten ca. 10 min darin inkubiert. Anschließend wurde viermal 5 Minuten in 96 % Ethanol inkubiert, bevor die Proben über eine absteigende Ethanolreihe (95 %, 70 %, 50 %, 30 %) wieder in die wässrige Phase überführt wurden. Um Reste des Ethanols zu entfernen wurden weitere 5 min in destilliertem Wasser und PBS inkubiert.

2.14.3 Einbetten biologischer Gewebeproben in LR-White

Für die Einbettung histologisch relevanter Gewebeproben in LR-White mussten die Proben über Nacht in 4 % Paraformaldehyd fixiert werden. Um überschüssiges Paraformaldehyd zu entfernen, wurde anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Um das Gewebe haltbar zu machen war es nötig, die Probe, wie vom Hersteller beschrieben, in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30 %, 60 %, 90 %, 100 %) zu entwässern. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation der Proben in einem 1:2 Ethanol:LR-White Gemisch bei 4 °C sowie einer 30 minütigen Inkubation in einem 1:3 Ethanol:LR-White Gemisch bei 4 °C. In einem dritten Schritt wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur in frischem LR-White inkubiert. Dabei wurde das Ethanol im Gewebe vollständig durch das Kunstharz ersetzt. Zur eigentlichen Einbettung wurde dem LR-White Harz Beschleuniger zugesetzt und die Proben in Gelatine kapseln oder Silikonformen ausgerichtet eingebettet. Die Polymerisation erfolgte dann für 24 h bei 4 °C sowie weiteren 4 h bei RT unter UV-Licht.

2.14.4 HE-Färbung

Hämalaun liegt bei Zusatz von Zitronensäure in saurer Lösung vor. Dadurch werden negativ geladene Karboxylgruppen im Zytoplasma abgesättigt, wodurch es zu einer selektiven Kernfärbung kommt. Eosin ist der wichtigste Zytoplasmafarbstoff und liegt in leicht saurer Lösung vor. Die meisten Proteine im Zytoplasma haben einen niedrigen isoelektrischen Punkt und sind daher negativ geladen. Die H⁺-Ionen der sauren Lösung geben dem Zytoplasma bei der Färbung eine positive Ladung, so dass sich das negativ geladene Eosin gut anlagern kann. Für die HE-Färbung wurden die Epoxy-Schnitte zunächst mit Natrium-Ethoxid behandelt (siehe Kapitel 2.14.2). Durch die absteigende Ethanolreihe bei der Ätzung des Kunstharzes konnte die Überführung in die wässrige Phase hier ausgelassen werden. Die rehydrierten Schnitte wurden zur Kernfärbung für 20 min in Hämalaun nach Mayer inkubiert und für 15 min in sauberem, fließendem Leitungswasser gebläut. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in wässrigem Eosin zur Zytoplasmafärbung für 30 Sekunden inkubiert und mit destilliertem Wasser kurz abgespült, bevor sie mittels aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 95 %, 95 %, 100 % je 1-5 min) wieder dehydriert wurden. Bei gutem Färbeergebnis wurden die Schnitte mit entsprechendem

Eindeckmedium und Deckgläschen eingedeckt, um sie für längere Zeit zu konservieren.

2.15 Immunhistochemie

Die Histochemie nutzt die Identifikation chemischer Gruppen und Komponenten in Gewebsschnitten durch spezifische Farbreaktionen, die unter dem Mikroskop beobachtet werden können. Dazu wird die Affinität verschiedener Farbstoffe gegenüber Zellbestandteilen genutzt.

Fluoreszenzfärbung mittels Phalloidin-Rhodamin und DAPI

Um eine erfolgreiche Besiedelung sowie die Besiedlungsdichte der Textilfasern und textilen Implantate zu überprüfen, wurden adhärente Zellen zunächst mit Phalloidin-Rhodamin angefärbt. Phalloidin ist eines der Toxine des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*). Es weist eine hohe Affinität zu F-Aktin auf. Gebunden an einen Fluoreszenzfarbstoff wie Rhodamin können mit Phalloidin daher spezifisch Teile des Zytoskeletts einer Zelle sichtbar gemacht werden. Dazu wurde der Phalloidin-Rhodamin-Komplex 1:100 in PBS verdünnt und die Zellen 20 min darin inkubiert. Zur Abschätzung der Zellzahl wurde anschließend mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt, indem besiedelte textile Implantate für etwa 1 min in einer 1:30 verdünnten DAPI-Lösung inkubiert wurden. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird. Die Verbindung lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

2.15.1 Antikörpermarkierung histologischer Proben

Bei der Antikörpermarkierung histologischer Proben muss zwischen der Antikörpermarkierung von Häutchenpräparaten (Whole-Mount) und Semi-Dünnschnitten unterschieden werden.

Antikörpermarkierung von Häutchenpräparaten

Fixierte Gewebe wurden in TBS + 1 % Triton-X 100 für 10 min inkubiert, um das Gewebe für die Antikörper zu permeabilisieren. Anschließend wurde dreimal 5 min mit TBS gewaschen und das Gewebe für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in dem entsprechend verdünnten Primärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig dreimal 5 min mit TBS gewaschen und die Restflüssigkeit mit einem saugfähigen Papiertuch vorsichtig abgenommen. Die folgende Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sollte für 2 Stunden in einer dunklen, feuchten Kammer erfolgen, um die Fluoreszenz vor dem Ausbleichen zu schützen.

Je nach Antikörper kann auch der Primärantikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sein, so dass die Inkubation mit einem Sekundärantikörper entfällt. Anschließend wurde nochmals vorsichtig dreimal 5 min mit TBS gewaschen, das Gewebe mit TBS bedeckt und das Ergebnis mikroskopiert und dokumentiert.

Antikörpermarkierung von Semi-Dünnschnitten

Die zuvor rehydrierten Gewebeschnitte (Kap. 2.14.2 sowie 2.14.3) wurden für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig dreimal 5 min mit TBS gewaschen und die Restflüssigkeit mit einem saugfähigen Papiertuch vorsichtig abgenommen. Die folgende Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sollte für 2 Stunden in einer dunklen, feuchten Kammer erfolgen, um die Fluoreszenz vor dem Ausbleichen zu schützen.

Je nach Antikörper kann auch der Primärantikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sein, so dass die Inkubation mit einem Sekundärantikörper entfällt. Anschließend wurde nochmals vorsichtig dreimal 5 min mit TBS gewaschen, die Flüssigkeit mit einem saugfähigen Papiertuch möglichst vollständig abgenommen, ein Tropfen Eindeckmedium (Roti-Mount oder DPX) auf das fluoreszenzmarkierte Präparat gegeben und möglichst ohne Lufteinschlüsse mit einem Deckglas eingedeckt. Anschließend wurden die Präparate mikroskopiert und das Ergebnis per Kamera dokumentiert.

2.16 CAM Angiogenese Assay

Zu *in vivo* Untersuchungen des angiogenen Potenzials diverser TECs wurde im Rahmen dieser Arbeit der CAM Angiogenese Assay etabliert und auf die Prüfung verschiedener Zell-Scaffold-Kombinationen optimiert.

2.16.1 Kultivierung der befruchteten Hühnereier

Befruchtete Hühnereier (White Leghorn Lohman LSL) wurden bei 37 °C und 60 % relativer Luftfeuchte (rH) in einem Standard-Brutautomat bebrütet. Die Wendeautomatik wurde alle 8 h zugeschaltet.

2.16.2 Öffnen der Eischale und Applikation der Proben

An Bebrütungstag 7 wurde die Eischale an der Luftblase geöffnet und die innere Eihaut vorsichtig entfernt (Abb. 3.2). Die Proben wurden zentral auf der CAM platziert, das Loch in der Eischale mit Parafilm verschlossen und das Hühnerei für weitere 72 h in aufrechter Position bei 37 °C und 60 % rH bebrütet.

2.16.3 Auswertung des CAM Angiogenese Assays

An Bebrütungstag 10 wurden die Hühnereier vom Parafilm befreit und die CAM stereomikroskopisch fotografiert. Anschließend wurde die Probe explantiert, mit Hilfe des Stereomikroskops nochmals analysiert und fotografiert und in 4 % Paraformaldehydlösung fixiert. Die Auswertung des CAM Angiogenese Assays erfolgt über die Auswertung der digitalen Bilder. Hierbei wurden stets die eingewachsene Blutgefäße sowie die Verzweigungspunkte der eingewachsenen Blutgefäße innerhalb des Implantats in einem Bereich von 0,5 cm² mit ImageJ (Freeware NIH) gezählt.

Zur weiteren Analyse konnten die Proben, wie bereits beschrieben, in Kunstharz eingebettet und histologisch analysiert werden.

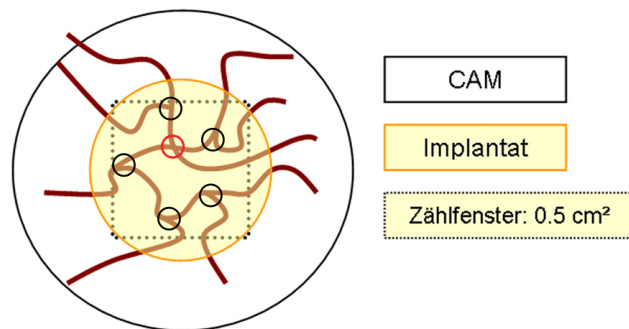


Abbildung 2.3: Methode zur Quantifizierung der Angiogenese im CAM Angiogenese Assay

2.17 Statistik

Zur statistischen Auswertung relevanter Ergebnisse wurden hauptsächlich t-Tests ($k < 3$) sowie einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) ($k > 2$) durchgeführt, um Signifikanzen ($p < 0,05$; $\alpha = 5\%$) zu ermitteln. Die statistische Auswertung sowie alle graphischen Darstellungen der Messwerte wurde mit Microsoft Excel 2007 durchgeführt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Etablierung des CAM Angiogenese Assays

Zum Screening (anti-)angiogener Effekte von Wirkstoffen, Geweben oder TECs *in vivo* eignen sich Tierversuche aufgrund des hohen finanziellen Aufwands und verschiedenster ethischer Aspekte nur bedingt. Alternativ werden daher Tumorgewebe und Wirkstoffe mit dem CAM Modell auf ihre angiogene Eigenschaft hin untersucht [53].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein modifizierter CAM Angiogenese Assay etabliert, so dass Scaffold-gebundene Zellen auf ihre angiogenen Eigenschaften *in vivo* untersucht werden konnten.

3.1.1 Ex ovo Methode

Bei der *ex ovo* Methode wurde an Embryonaltag 2 (Embryo Development Day, EDD) eine Sollbruchstelle in die Eischale geätzt und die Hühnereier entlang dieser Sollbruchstelle aufgebrochen. Der gesamte Inhalt wurde vorsichtig in sterile Kunststoffschalen überführt und bei 65 % rH und 36,5 °C weiter bebrütet (Abb. 3.1). Aufgrund der vergrößerten Oberfläche war es in diesem Ansatz möglich, bis zu vier Scaffold- oder Gewebeproben auf einer CAM zu platzieren.

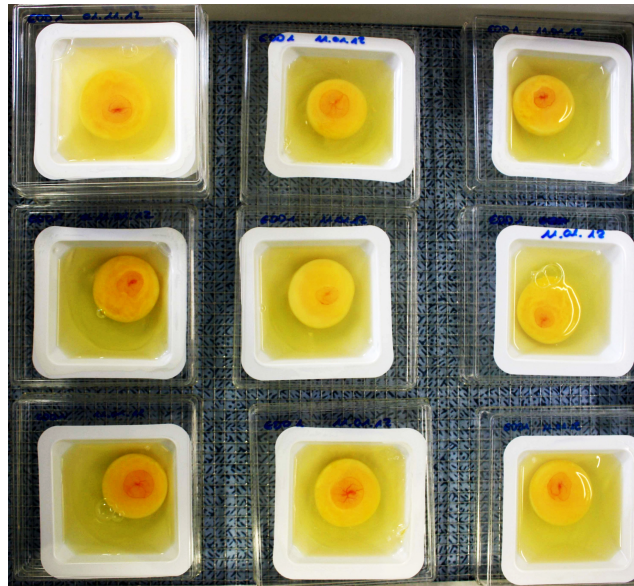


Abbildung 3.1: *Ex ovo* Kultivierungsmethode des CAM Angiogenese Assay

Die weitere Überlebensrate der Hühnerembryonen, die vier Tage nach dem Transfer in die Kunststoffgefäße (EDD 6) noch am Leben waren, betrug >90 %. Den *ex ovo* Transfer (EDD 2 - EDD 6) überstanden insgesamt jedoch nicht mehr als 30 % der Tiere. Aufgrund der hohen Mortalitätsrate wurde die *ex ovo* Methode im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

3.1.2 In ovo Methode

Bei der *in ovo* Methode wurde, wie in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt, die Eischale seitens der Luftblase geöffnet (Abb. 3.2 A), die innere Eihaut entfernt (Abb. 3.2 B) und die Probe zentral auf der CAM platziert (Abb. 3.2 C).

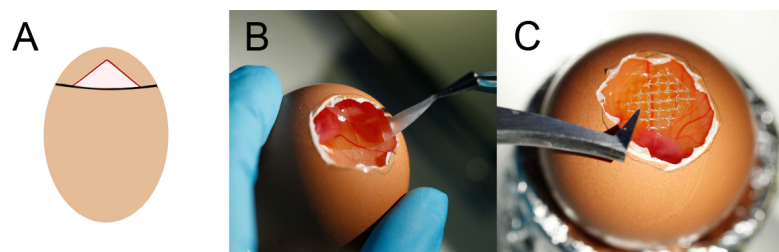


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung zur Öffnung der Eischale (entlang der roten Linie) zur *in ovo* Kultivierung der Hühnerembryonen im CAM Angiogenese Assay. (A) Schema zur Öffnung der Eischale. (B) Entfernen der inneren Eihaut. (C) Platzieren des Implantats auf der CAM.

Die Bebrütungsumgebung des Hühnerembryos wurde hierbei nur minimal verändert. Pro Hühnerei konnte jedoch nur eine Probe appliziert werden.



Abbildung 3.3: *In ovo* Kultivierungsmethode des CAM Angiogenese Assay

Die Überlebensrate der so behandelten Hühnereier betrug insgesamt >85 %. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit stets die *in ovo* Methode eingesetzt.

3.1.3 Makroskopische Auswertungsmethoden

Zur Quantifizierung der Angiogenese im CAM Angiogenese Assay wurden bereits verschiedenste Auswertemethoden etabliert und publiziert [78]. Eine vasoproliferative Reaktion der CAM wurde z.B. über Fotografien bestimmt, indem ein 1 mm breiter Ring um das Implantat herum gelegt und die Blutgefäße innerhalb dieses Ringes gezählt wurden (Abb. 3.4). Gefäße, die sich nicht verzweigen, wurden mit 0, Gefäße, die sich innerhalb des Ringes verzweigen mit 1, und Gefäße, die sich außerhalb des Ringes verzweigen wurden mit 2 gewertet. Je höher der Score am Ende der Auszählung, desto höher das pro-angiogene Potenzial der geprüften Substanz.

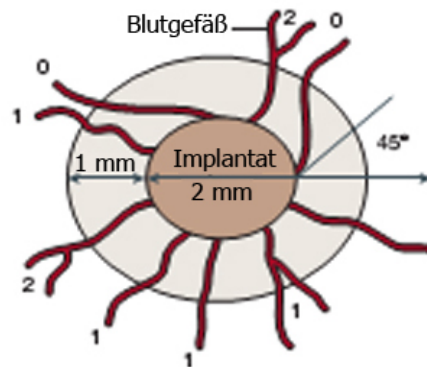


Abbildung 3.4: Evaluierung einer pro-angiogenen Reaktion der CAM mittels makroskopischer semi-quantitativer Score-Methode [78].

Eine weitere Methode ist die Bewertung der pro-angiogenen Reaktion der CAM über eine definierte Skala von 0-5. 0 deutet hierbei auf keinerlei Änderungen des Gefäßwachstums in der CAM hin, 1 deutet auf leichte Änderungen in der Wachstumsrichtung (zum Implantat) hin, 2-5 stehen für ein kontinuierlich gerichtetes, dichter werdendes Gefäßnetz um das Implantat (Abb. 3.5).

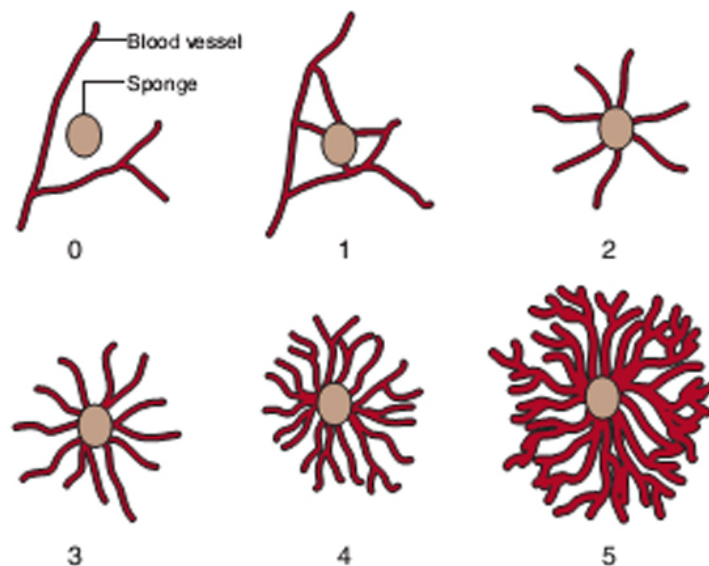


Abbildung 3.5: Semi-quantitative Auswertung einer pro-angiogenen Reaktion der CAM. Die sechs Abbildungen zeigen repräsentative Beispiele der entsprechenden Score-Werte zur semi-quantitativen Bewertung einer pro-angiogenen Reaktion des CAM Gewebes [78].

Diese Auswertemethoden bewerten jedoch lediglich das Gefäßnetz um ein Implantat herum. Das Einwachsen neuer Blutgefäße in ein Implantat hinein wird mit dieser Methode leider nicht erfasst. Aus diesem Grund wurde die Auswertung des CAM Angiogenese Assays im Rahmen dieser Arbeit so modifiziert, dass die in das Implantat hinein gewachsenen Blutgefäße als Anhaltspunkt für eine Implantat-Neovaskularisierung semi-quantitativ bewertet werden konnten (Abb. 3.6).

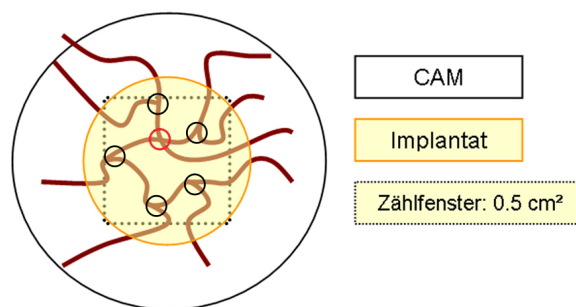


Abbildung 3.6: Modifikation der semi-quantitativen Auswertung der Neovaskularisierung eines Implantats. Im aktuellen Beispiel hätte der Score-Wert 5 Verzweigungspunkte ergeben. Der rote Kreis markiert die Überlappung zweier Blutgefäße, die nicht gezählt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gestanzte textile Implantate mit einem Durchmesser von 1,0 cm mit humanen Zellen besiedelt und auf die CAM aufgebracht. Zur semi-quantitativen Bestimmung einer pro-angiogenen Reaktion der CAM wurden die Verzweigungspunkte der Blutgefäße innerhalb eines 0,5 cm² großen Quadrats stereomikroskopisch ausgezählt.

3.1.4 Histologische Auswertung

Zur Bestätigung eines pro-angiogenen Effektes kann zusätzlich zu einer stereomikroskopischen Auswertung eine histologische Analyse angeschlossen werden. Hierzu wurden die Proben in Kunstharz (EPOXY-Harz oder LR-White) eingebettet und am Ultramikrotom semi-dünn geschnitten (1 μ M). Anschließend wurde das Gewebe mit Hämalaun und Eosin (HE) angefärbt, oder zur weiteren Analyse mit spezifischen Antikörpern immunmarkiert.

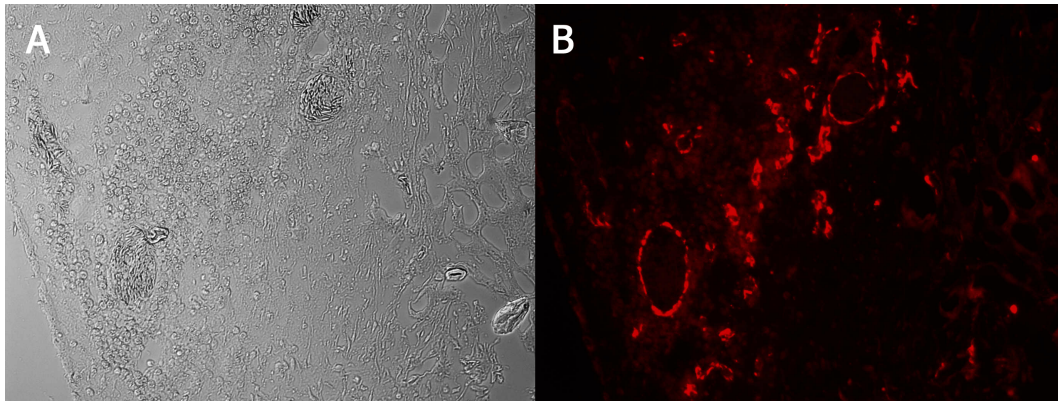


Abbildung 3.7: Semi-Dünnschnitt ($1\ \mu\text{M}$) einer LR-White eingebetteten CAM mit anschließender anti-Desmin Antikörpermarkierung. Die rote Fluoreszenz markiert Desmin-positive Perizyten neugebildeter Kapillaren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden textile Implantate (Herniennetze) als Trägerstruktur für humane Zellen verwendet. Diese Polypropylenetze erschwerten die Anfertigung histologischer Semi-Dünnschnitte, da die Fasern geschnittener Netze nicht an den verwendeten Glasobjektträgern hafteten. Spätestens bei der anschließenden Färbeprozedur wurden die Faserquerschnitte vom Objektträger gespült, wodurch der gesamte Gewebeschnitt stark geschädigt wurde. Daher wurde unter anderem auch auf Antikörpermarkierung von Häutchenpräparaten zurückgegriffen, um die Neubildung von Blutgefäßen über die Anwesenheit von Desmin-positiven Perizyten zu bestätigen (Abb. 3.8).

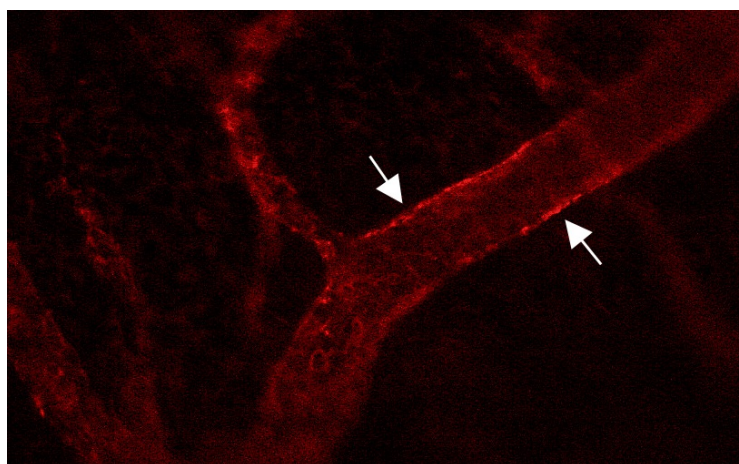


Abbildung 3.8: Das Beispiel einer anti-Desmin Antikörpermarkierung (Häutchenpräparat) der CAM zeigt eine Kapillare, umschlossen von Desmin-positiven Perizyten (rote Fluoreszenz, markiert durch weiße Pfeile).

3.2 Isolierung und Charakterisierung primärer Zellen

Primäre Zellen können durch verschiedene Verfahren wie z.B. den enzymatischen Abbau eines dissoziierten Gewebes mit anschließenden Reinigungsschritten isoliert werden. Primäre Zellkulturen sind in Kultur genommene primäre Zellen. Gegenüber permanenten, immortalisierten Zelllinien haben primäre Zellen den Vorteil, dass sie noch eher das *in vivo* Verhalten der Zellen widerspiegeln (siehe hierzu auch Kap. 3.5). Zur eindeutigen Identifizierung der isolierten, primären Zellen können verschiedene Techniken angewandt werden. hASC zum Beispiel, zeichnen sich durch ein charakteristisches Expressionsmuster an Oberflächenproteinen sowie über die Fähigkeit zur Differenzierung in die chondrogene, osteogene und adipogene Linie aus.

3.2.1 Isolierung und Charakterisierung humaner ASC

Die Isolierung humaner ASC wurde wie von Yang et al. [33] beschrieben etabliert (Kapitel 2.9.1) und konnte innerhalb einer Stunde durchgeführt werden. Eine erste mikroskopische Beurteilung nach 24-stündiger Kultivierung zeigte adhärenente Zellen mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie. Zur weiteren Charakterisierung der so isolierten, primären Zellen wurden chondrogene, osteogene und adipogene Differenzierungsassays, wie in Kapitel 2.9.4 beschrieben, durchgeführt (Abb. 3.9).

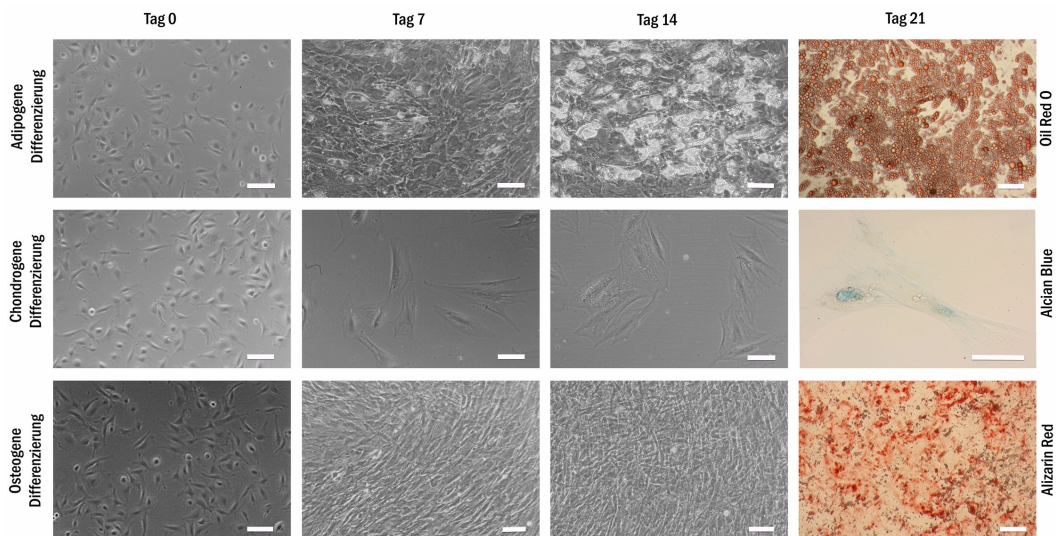


Abbildung 3.9: Induktion der chondrogenen, osteogenen und adipogenen Differenzierung über 21 Tage zur Charakterisierung primärer hASC im Differenzierungsassay belegt eine mesenchymale Multipotenz. Maßbalken entsprechen $20\mu\text{m}$.

Nach dreiwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Differenzierungsmedien konnte eine Differenzierung in Adipozyten durch eine OilRed-O Färbung der Speicherlipide nachgewiesen werden. Außerdem konnte mittels Alcian-Blau Färbung der Proteoglykane eine erfolgreiche Differenzierung in Chondrozyten und mittels Alizarin-Rot Färbung intrazellulärer Kalziumablagerungen eine erfolgreiche Differenzierung in Osteozyten (siehe auch Kap. 2.9.4) bestätigt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass es sich bei diesen primär isolierten Zellen um Vorläuferzellen der mesenchymalen Linie aus Fettgewebe (hASC) handelt.

Genexpressionsanalysen (β -Aktin und $\text{PPAR}_{\gamma 2}$) während der adipogenen Differenzierung humaner ASC

Zur Bestätigung der adipogenen Differenzierung per Färbung intrazellulärer Speicherlipide wurde zusätzlich eine Genexpressionsanalyse bezüglich des Fettzell-spezifischen Rezeptors $\text{PPAR}_{\gamma 2}$ mit β -Aktin als Housekeeping Gen durchgeführt (Abb. 3.10).

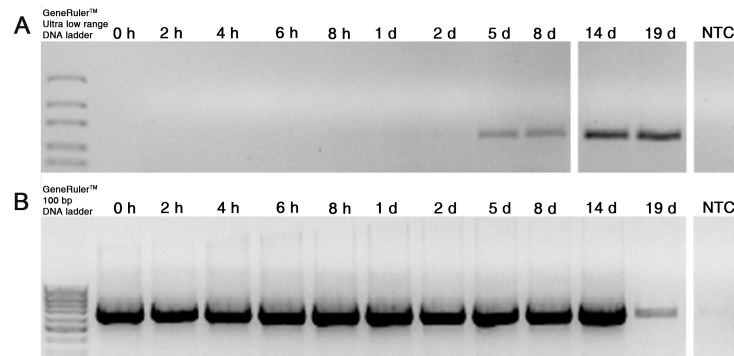


Abbildung 3.10: Genexpression humaner ASC (Passage 1) während adipogener Differenzierung. (A) PPAR γ_2 Expression konnte ab Differenzierungstag 5 nachgewiesen werden. (B) β -Aktin wurde als Housekeeping Gen (interne PCR-Kontrolle) genutzt.

Die Expression von PPAR γ_2 in hASC konnte ab Differenzierungstag 5 bis Differenzierungstag 19 beobachtet werden. Die entsprechenden β -Aktin Amplikons belegen eine valide PCR-Reaktion. An Differenzierungstag 19 konnte eine Abnahme der Bandenintensität von β -Aktin bei gleichbleibender Bandenintensität von PPAR γ_2 beobachtet werden.

3.2.2 Isolierung und Charakterisierung: porcine ASC (pASC)

Zur Vorbereitung eines Großtierversuchs am Schwein wurde die zuvor etablierte Methode zur Isolierung von Vorläuferzellen aus Fettgewebe angewandt. Die so gewonnenen primären Zellen wurden wiederum mittels Differenzierungsassay charakterisiert (Abb. 3.11).

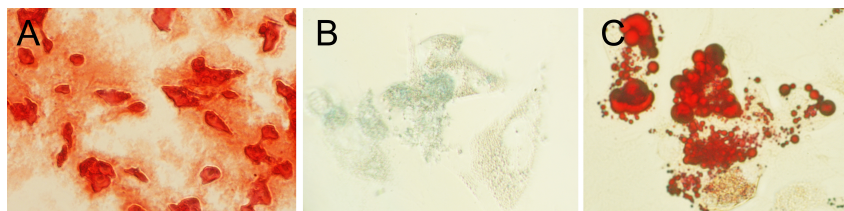


Abbildung 3.11: Induktion der chondrogenen, osteogenen und adipogenen Differenzierung. Abgebildet sind die spezifischen Färbeergebnisse nach 21 Tagen Differenzierung. (A) Alizarin-Rot Färbung der Kalziumablagerungen in Osteozyten (B) Alcian-Blau Färbung der Proteoglykane in Chondrozyten und (C) OilRed-O Färbung der Speicherlipide in Adipozyten.

Auch hier konnte nach dreiwöchiger Kultivierung in den entsprechenden Differenzierungsmedien eine Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten über spezifische Färbungen (siehe Kap. 2.9.4) mikroskopisch bestätigt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei diesen primär isolierten Zellen um Vorläuferzellen der mesenchymalen Linie aus Fettgewebe (porcine Adipose tissue-derived Stem Cells, pASC) handeln musste.

Die so isolierten primären porcinen ASC wurden einer medizinischen Doktorandin des Universitätsklinikum Bochum (Frau Christine Lämmle, Leiter: Dr. med. Tobias Hirsch, Arbeitsgruppe Gewebsregeneration und Inflammation, Klinik für Plastische Chirurgie und Schwerbrandverletzte, Handchirurgiezentrum, Operatives Referenzzentrum für Gliedmaßen-tumoren, Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil, Ruhr-Universität Bochum) überlassen und im Rahmen ihrer Dissertation zur Vorbereitung des Großtierversuchs am Schwein weiter charakterisiert.

3.2.3 Isolierung und Charakterisierung humaner Endothelzellen aus der großen Nabelschnurvene (HUVEC)

Für die Durchführung verschiedener *in vitro* Angiogenese Assays werden meist Endothelzellen aus der großen Nabelschnurvene (Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells, HUVEC) verwendet. Diese können kommerziell erstanden werden, sind in Form von primären Zellen jedoch sehr teuer. Günstiger kann man immortalisierte Endothelzellen erstehen. Wie bereits erwähnt zeigen etablierte und immortalisierte Zelllinien jedoch häufig ein anderes Verhaltensmuster als primäre Zellen. Um aussagekräftigere *in vitro* Ergebnisse zu generieren wurde hier auf die Anschaffung einer HUVEC-Zelllinie verzichtet. Stattdessen wurden primäre HUVEC aus der Nabelschnurvene isoliert und bis Passage 5 für Untersuchungen zur *in vitro* Angiogenese verwendet.

Nach der Isolierung wurde auch hier die Zellart eindeutig charakterisiert. Hierzu wurde der Oberflächenmarker CD31 (PECAM-1), ein Endothelzellmarker, mittels spezifischer Antikörper auf der Zelloberfläche der isolierten Nabelschnurzellen erfasst und die Anzahl CD31-positiver Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

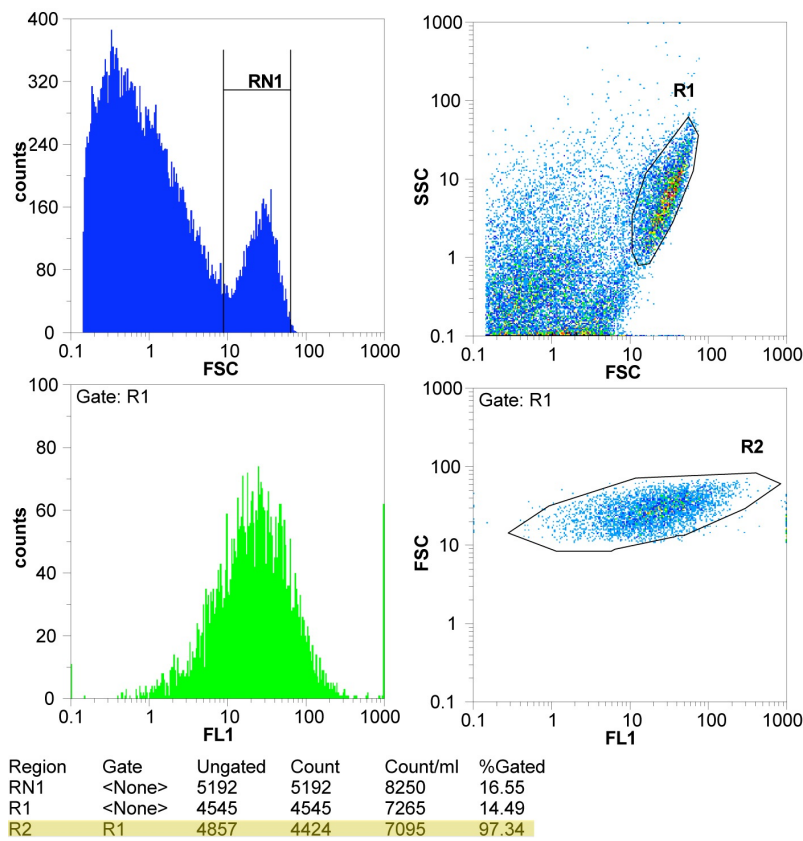


Abbildung 3.12: Die durchflusszytometrische Charakterisierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene über die Immunmarkierung des Oberflächenantigenen PECAM-1 (CD31) ergab >97 % positive Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Antikörper-markierten, primären HUVEC (Abb. 3.12) zeigt >97 % CD31-positive Endothelzellen, was die Effizienz der hier durchgeführten Isolationsmethode für Endothelzellen bestätigte. Somit konnten diese primären HUVEC im Folgenden in HUVEC Tube Formation Assays zum *in vitro* Screening des verwendet werden (siehe Kap. 3.5.2, Kap. 3.6.3, Kap. 3.8.3, Kap. 3.12.3).

3.3 Besiedelung von Implantatmaterialien mit humanen Zellen

Um textile Scaffolds mit Zellen zu besiedeln, können diese direkt auf dem Implantatmaterial ausgesät werden. Aufgrund der Oberflächenstruktur der verschiedenen Fasermaterialien erzielt man so jedoch keine standardisierte Besiedelung des TECs. Um die Besiedelungsmethode zu standardisieren und in einem ersten Schritt die Besiedelungsdichte auf den textilen Implantaten zu verbessern, wurden adhäsionsfördernde Proteine wie Kollagen oder Fibronectin eingesetzt.

3.3.1 Optimierung der Zelladhäsion auf textilen Implantaten

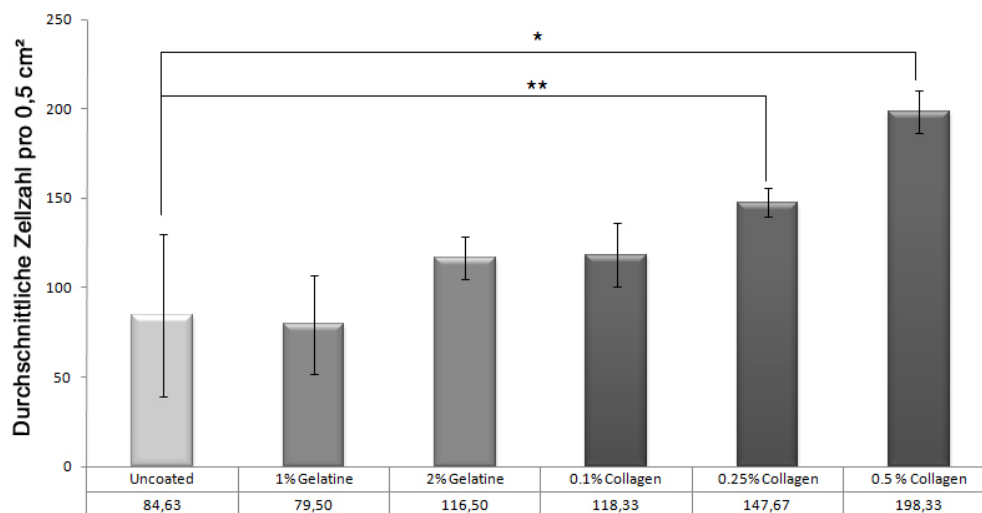


Abbildung 3.13: Vergleich adhäsionsfördernder Protein-Beschichtungen. Eine signifikante Verbesserung der Zelladhäsion konnte erreicht werden, indem die textilen Implantate zuvor mit einer 0,5 % Kollagenlösung beschichtet wurden (*, $F > F_{crit}$, $p = 0,0002$). Selbst eine Beschichtung mit nur 0,25 % Kollagen konnte eine signifikante Verbesserung der Zelladhäsion bewirken (**, $F > F_{crit}$, $p = 0,046$)

Abbildung 3.13 zeigt eine signifikant höhere Zellzahl pro 0,5 cm² der mit 0,25 % und 0,5 % Kollagen beschichteten, textilen Implantate im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten. Da die Zellzahl bei einer Beschichtung mit 0,5 % Kollagen wiederum signifikant höher lag als bei einer Beschichtung mit 0,25 % Kollagen, wurde die Besiedelung textiler Nahtmaterialien und Implantaten in den folgenden Versuchen stets mit 0,5 % Kollagen durchgeführt.

3.3.2 Besiedelung textiler Implantate mit hASC

Mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen konnte die Besiedelungsdichte der TECs nicht korrekt erfasst werden (Abb. 3.14 a + c). Für eine bessere Auswertung der Zelldichte auf den textilen Implantaten wurden die textilgebundenen Zellen in 4 % Paraformaldehydlösung fixiert und zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts sowie des Zellkerns mit Phalloidin-Rhodamin und DAPI fluoreszenzmarkiert.

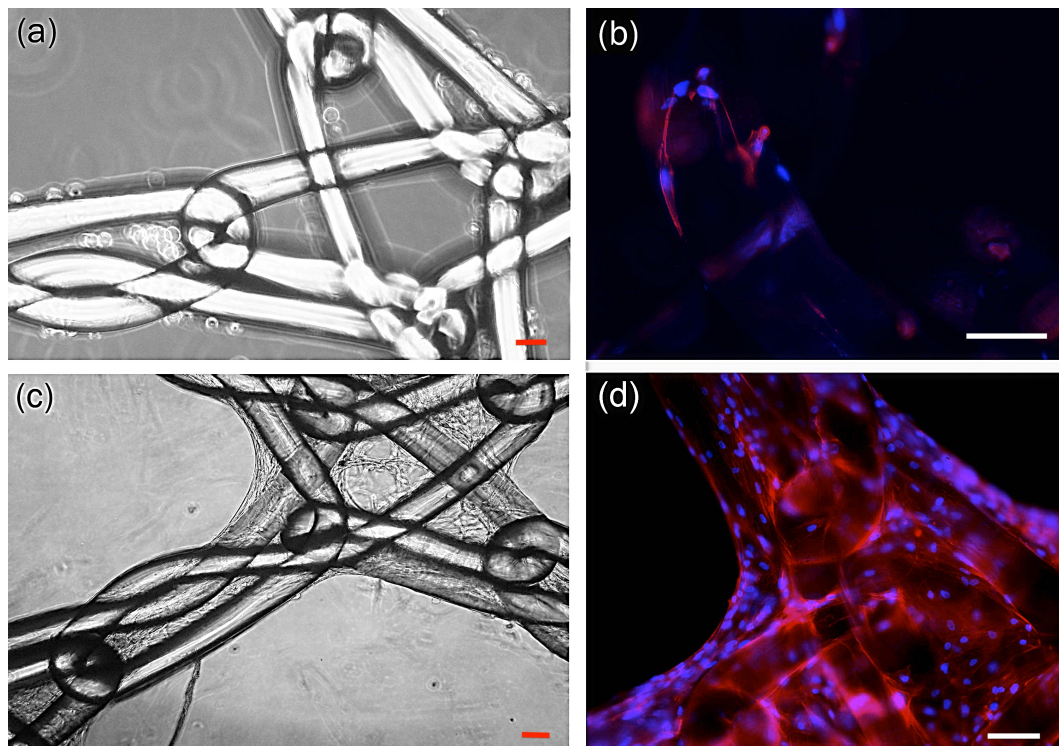


Abbildung 3.14: Optimierung der Besiedelung textiler Implantate mit hASC: (a) + (b) Lichtmikroskopische Aufnahmen besiedelter Herniennetze - Vergrößerung 100x (a) Besiedelung ohne Kollagen (c) Besiedelung mit Kollagen. (c) + (d) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines besiedelten Herniennetzes. Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit Phalloidin-Rhodamin und DAPI zur Visualisierung des Aktin Zytoskeletts und der Zellkerne durchgeführt. (b) Besiedelung ohne Kollagen (400x Vergrößerung) (d) Besiedelung mit Kollagen (Maßbalken entsprechen $100\mu\text{m}$).

3.3.3 Besiedelung von 45S5 Bioglass[®]-basierten Glaskeramiken mit humanen Zellen

Die Besiedelungstechnik mittels Kollagen sollte nun auch auf anderen Gerüstsubstanzen getestet werden, um eine universell gültige Aussage über die Verbesserung der Besiedelungsdichte verschiedener Implantatmaterialien mit der hier etablierten Beschichtung zu zeigen. In Kooperation mit der Universität Erlangen (Institut für Biomaterialien) wurde daher an der Besiedelung von 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds zum Knochenersatz gearbeitet. Diese Glaskeramik-Scaffolds werden mit Hilfe einer Schaumstoff-Replikatechnik hergestellt und zeigen eine Porosität von 90-95 %. Durch das Sintern der Glaskeramik verdichtet sich die Bioglass[®]-Struktur und kristallisiert (Abb. 3.15).

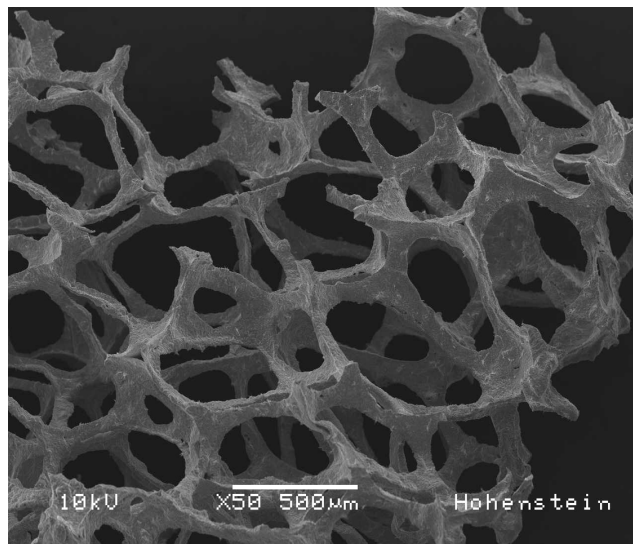


Abbildung 3.15: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme eines nativen 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds

45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds sind in der Zell- und Gewebekultur nur schwer zu verarbeiten. Neben der als Wachstumsoberfläche für Säugetierzellen nur bedingt geeigneten Struktur des Scaffolds, werden von 45S5 Bioglass[®] verschiedene Ionen freigesetzt, sobald dieses mit Flüssigkeit (z.B. Zellkulturmedium) in Berührung kommt. Diese Ionenfreisetzung führt zu einer stark basischen pH-Verschiebung des Mediums, was die Zellvitalität stark beeinträchtigen kann. Um dem vorzubeugen, wurden die Scaffolds mindestens drei mal eine Stunde in Phenolrot-haltigem, HEPES gepuffertem

Zellkulturmedium gewaschen. Eine Besiedelung der Glaskeramiken war erst möglich, nachdem das Medium einen neutralen pH-Wert halten konnte.

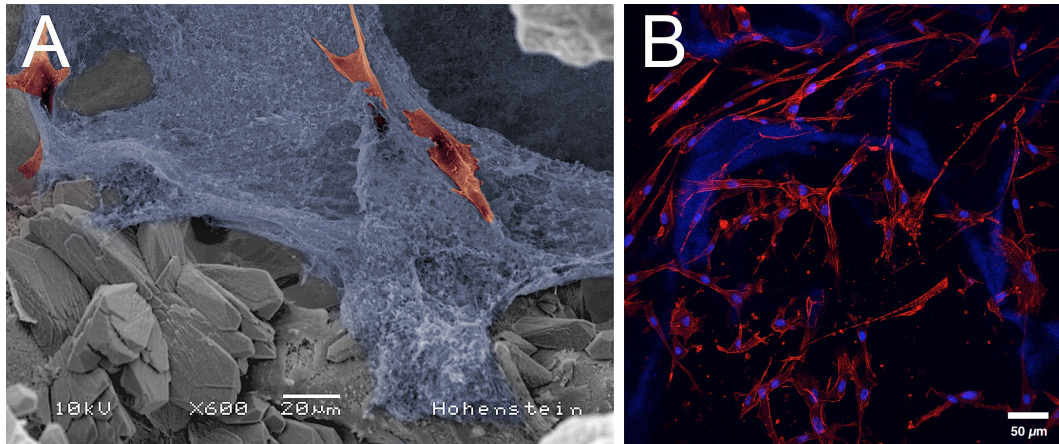


Abbildung 3.16: 45S5 Bioglass[®] besiedelt mit hASC: (A) Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme eines mit 0,5 % Kollagen und hASC besiedelten 45S5 Bioglass[®], koloriert. (B) Fluoreszenzmikroskopische (LSM) Übersichtsaufnahme Phalloidin-Rhodamin und DAPI-markierter hASC auf 45S5 Bioglass[®]

Aufgrund der porösen Struktur und der rauen Oberfläche dieses Biomaterials (Abb. 3.16 a) wurden die Zellen ebenfalls mit Hilfe einer Kollagenmatrix aufgetragen, was insgesamt die Zelladhäsion und Zellvitalität auf dem Scaffoldmaterial verbesserte (Abb. 3.16 a + b).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Zellbesiedelung durch die Beschichtung der Scaffoldmaterialien mit einer 0,5 % Kollagenlösung signifikant verbessert werden konnte.

3.4 Veränderungen der Proteinsekretion und des adipogenen Differenzierungspotenzials humaner ASC in Kultur

Zwei für diese Arbeit wichtige Aspekte waren die VEGF-Sekretion der verwendeten hASC, welche eine schnelle Angiogenese am Implantationsort bewirken sollte, und die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung. Um

diese Eigenschaften der hASC optimal auszunutzen, wurden im Folgenden primäre (P1) und bereits längere Zeit kultivierte (P8) hASC bezüglich der Proteinsekretion und des adipogenen Differenzierungspotenzials untersucht und miteinander verglichen.

3.4.1 Vergleich der VEGF Sekretion primärer (P1) und bereits kultivierter (P8) hASC

Zum direkten Vergleich der VEGF-Sekretion humaner ASC (P1) und humaner ASC (P8) über einen Zeitraum von 6 Tagen, wurde das Zellkulturmedium stets 24 h vor Probenahme erneuert, so dass die VEGF-Sekretion humaner ASC stets über einen Zeitraum von 24 h gemessen wurde (Abb. 3.17).

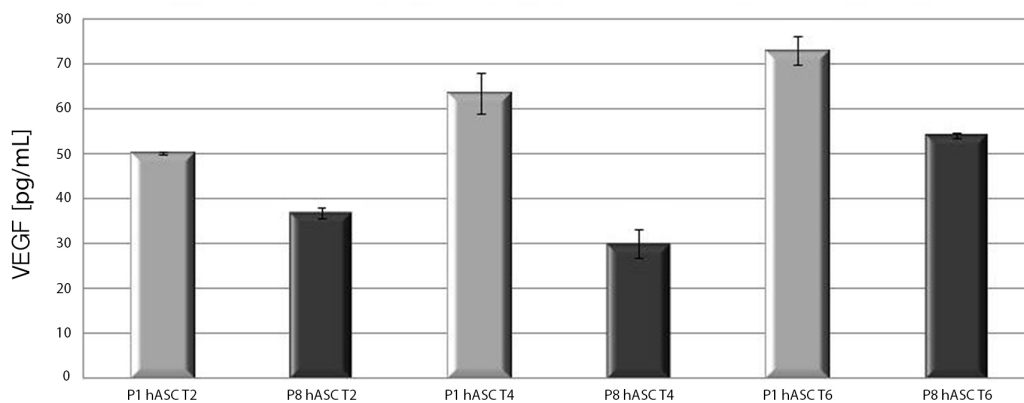


Abbildung 3.17: Vergleich der VEGF Sekretion hASC-P1 und hASC-P8 nach 2, 4 und 6 Tagen: hASC-P8 zeigten, im Vergleich mit hASC-P1 über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikant geringere VEGF-Sekretion pro 24 h.

Im huVEGF ELISA konnte eine über 6 Tage gleichbleibend geringere VEGF-Sekretion der hASC-P8 im direkten Vergleich mit hASC-P1 gezeigt werden.

3.4.2 Vergleich des adipogenen Differenzierungspotentials primärer (P1) und bereits kultivierter (P8) hASC

Bei längerer Kultivierung von Vorläuferzellen *in vitro* kommt es häufig zu einer spontanen Zelldifferenzierung. Um dies zu verhindern oder hinauszuzögern wurde im Rahmen dieser Arbeit auf speziell abgestimmtes Stammzellmedium

zurückgegriffen.

Dennoch findet dieser Prozess in Kultur häufig statt, was unter anderem dazu führen kann, dass eine gezielte Differenzierung in Adipozyten nicht mehr induziert werden kann. Das adipogene Differenzierungspotential von hASC-P1 und hASC-P8 wurde daher mittels Histochemie näher untersucht.

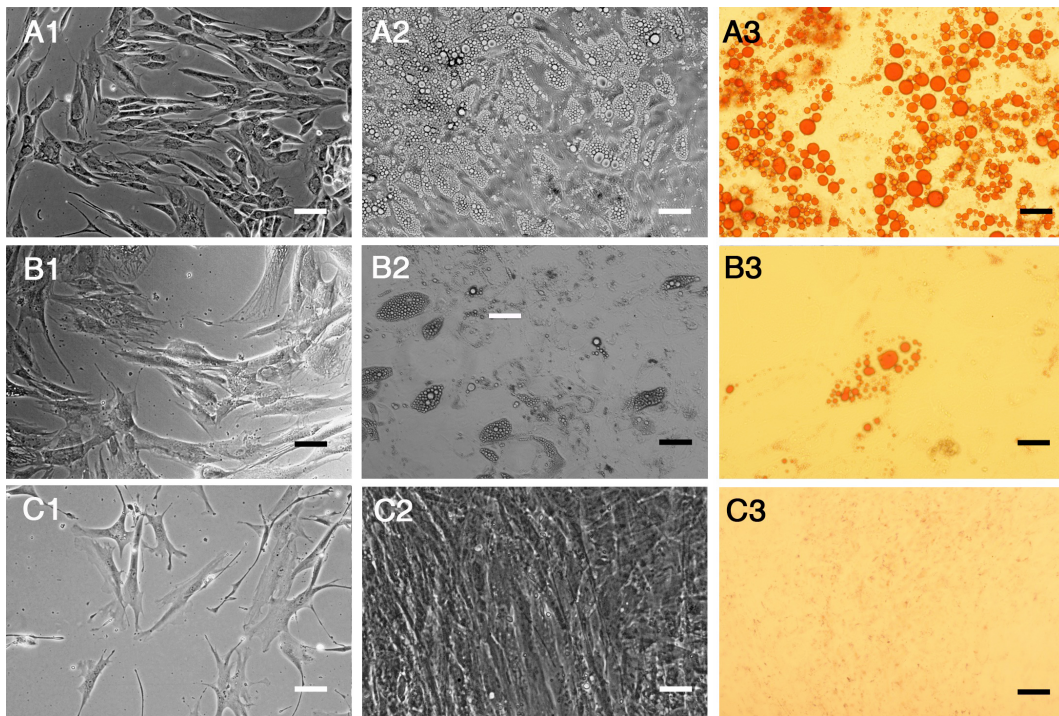


Abbildung 3.18: Vergleich der adipogenen Differenzierung hASC-P1 und hASC-P8. (A) hASC, Passage 1; (B) hASC, Passage 8, (C) HF AST (Kontrolle). Die linke Spalte (1) zeigt die Zellen an Tag 0 der adipogenen Differenzierung; die mittlere Spalte (2) zeigt hASC und HF AST an Tag 21 der adipogenen Differenzierung im Phasenkontrast; die rechte Spalte (3) zeigt hASC und HF AST nach OilRed-O Färbung im Hellfeld. Maßbalken entsprechen 20 μm .

Primäre hASC-P1 bis hASC-P4 zeigten eine schlanke, langgestreckte, fibroblastenartige Morphologie vor Induktion der Differenzierung (Abb. 3.18 (A1)), wohingegen hASC-P8 größere Zellkörper ausbildeten (Abb. 3.18 (B1)). Nach 21 Tagen in adipogenem Differenzierungsmedium zeigten die meisten hASC-P1 intra-zytoplasmatische Lipidvakuolen, während bei den hASC-P8 nur wenige Zellen Speicherlipide eingelagert hatten. Undifferenzierte hASC-P1 und hASC-P8 wurden ebenfalls mit OilRed-O angefärbt, zeigten jedoch keine zytoplasmatischen Speicherlipide. Zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung wurden die OilRed-O gefärbten Zellen mikroskopisch fotografiert und anschließend über eine binäre Bildanalyse

der prozentuelle Anteil der Lipidvakuolen im Well errechnet. Zur weiteren Quantifizierung wurden die Lipidvakuolen mittels ImageJ ausgemessen und ein durchschnittlicher Durchmesser errechnet (Abb. 3.19).

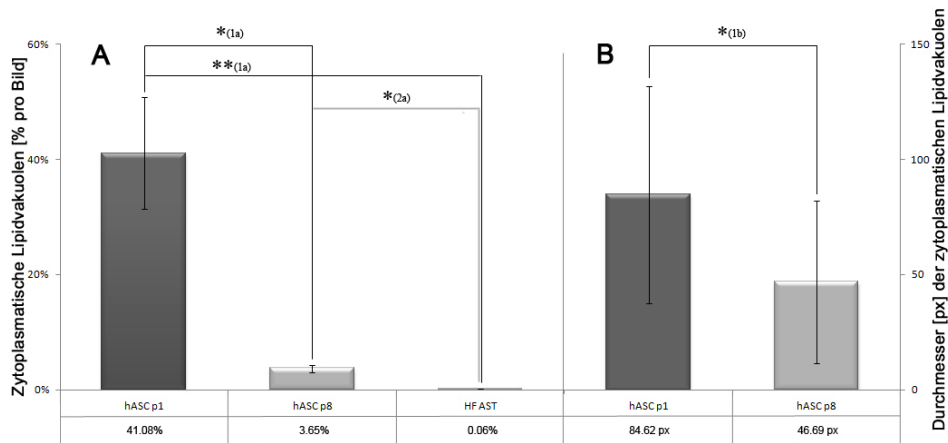


Abbildung 3.19: Quantifizierung der adipogenen Differenzierung (A) Binärbildanalyse zur prozentuellen Quantifizierung der adipogenen Differenzierung. (B) Durchschnittlicher Durchmesser der Lipidvakuolen von hASC-P1 und hASC-P8. HF AST *(2a) wurden hierbei vernachlässigt. Die statistische Analyse der adipogenen Differenzierung zeigte sowohl signifikant mehr *(1a), $F > F_{crit}$, $p = 0,032$) als auch größere *(1b), $F > F_{crit}$, $p = 0,038$) Lipidvakuolen in hASC-P1 verglichen mit hASC-P8.

Dieses Vorgehen zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung zeigte signifikant mehr sowie größere zytoplasmatische Lipidvakuolen nach 21 Tagen adipogener Differenzierung in frisch isolierten hASC im Vergleich zu bereits länger *in vitro* kultivierten hASC.

Unabhängig vom eigentlichen Zellalter, welches z.B. über die Telomeraseaktivität und zelluläre Seneszenz bestimmt werden kann, wurden aufgrund dieser Ergebnisse alle nachfolgenden Versuche ausschließlich mit $hASC \leq$ Passage 4 durchgeführt.

3.5 Verwendung humaner ASC im Adipose Tissue Engineering

Es gibt eine Reihe von Schlüsselfaktoren für die erfolgreiche Verwendung von adipogenen TECs in der Regenerativen Medizin:

- autologe Zellen mit optimalen Eigenschaften zur Verwendung im "Adipose Tissue Engineering" und der Regenerativen Medizin
- die Möglichkeit zur Isolierung einer ausreichend großen Zellzahl ohne mehrtägige *in vitro* Kultivierungsperioden
- gute Zell-Adhäsion auf dem Implantatmaterial
- gute Zell-Viabilität auf dem Implantatmaterial
- schnelle Implantat-Vaskularisierung
- ausreichendes adipogenes Differenzierungspotenzial der Implantat-gebundenen Zellen

Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurden im Rahmen dieser Arbeit humane mesenchymale Stammzellen verwendet. Diese Zellen können innerhalb einer Stunde [33] in vergleichsweise großer Anzahl aus kleinen Mengen Fettgewebe (z.B. über Liposuktion oder Fettgewebsbiopsien) isoliert werden, so dass, falls nötig, innerhalb von 1-2 Vermehrungszyklen *in vitro* die benötigte Zellzahl erreicht werden könnte. Wie bereits in Kapitel 3.3 gezeigt ist es möglich, hASC auf verschiedenen Implantatmaterialien anzusiedeln. Eine Differenzierung in Adipozyten konnte, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, *in vitro* in 2D Monolayer Zellkulturen bestätigt werden.

Im Folgenden wurde nun die Besiedelung sowie adipogene Differenzierung von hASC auf verschiedenen Trägerstrukturen untersucht und das Angiogenesefördernde Potenzial dieser mesenchymalen Vorläuferzellen mittels *in vitro* Angiogenese Screening Assays näher charakterisiert.

3.5.1 VEGF-Sekretion nativer hASC

Geeignete Zellen für adipogene TEC müssen nicht nur auf Trägerstrukturen angesiedelt und in Adipozyten differenziert werden können, sie sollten zusätzlich

in der Lage sein die Wundheilung und Angiogenese am Implantationsort zu unterstützen, um die rasche Nährstoffversorgung der Implantat-gebundenen Zellen zu gewährleisten. Da die Angiogenese mitunter eine Antwort verschiedener Bindegewebs- und Endothelzellen auf lokale Reize in Form löslicher Signalproteine wie beispielsweise VEGF ist, wurde in einem ersten Screening die VEGF-Sekretion humaner ASC ins Zellkulturmedium untersucht (Abb. 3.20).

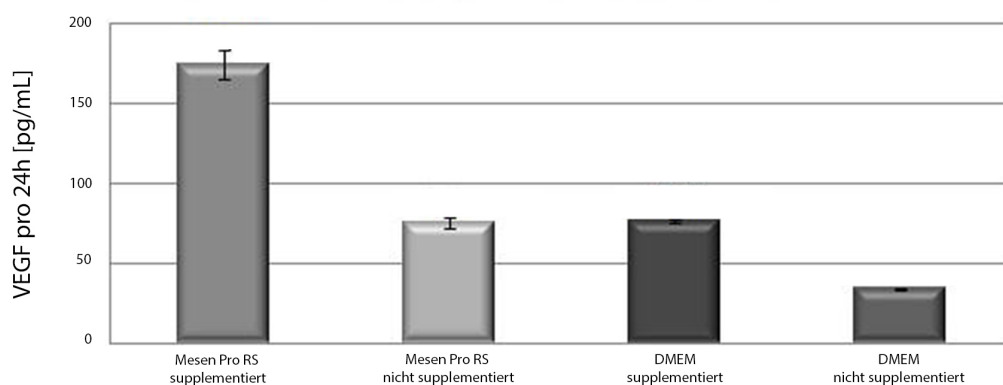


Abbildung 3.20: VEGF-Sekretion humaner ASC in diversen Zellkulturmedien pro 24 h. Die höchste Konzentration an VEGF konnte hier bei hASC gemessen werden, die in MesenProRS kultiviert wurden. hASC in DMEM ohne Supplement (DMEM-Basismedium) zeigten hier eine sehr geringe Konzentration VEGF im Medium.

Der höchste Gehalt an VEGF konnte in 24 Stunden konditioniertem, supplementiertem Stammzellmedium (MesenProRS) gefunden werden. MesenProRS Basismedium (nicht supplementiert) und supplementiertes DMEM zeigten ähnliche VEGF Mengen wohingegen nicht supplementiertes DMEM vergleichsweise geringe Menge an VEGF zeigte.

In der Originalliteratur wird jedoch die erhöhte VEGF Sekretion humaner ASC in Stresssituationen beschrieben [56]. So soll Hypoxie oder Nährstoffmangel die VEGF-Sekretion fördern. Diese Daten beziehen sich jedoch häufig auf eine bestimmte Zellzahl. Um vergleichbare Werte zu errechnen, wurde die Zellzahl pro Well zum Zeitpunkt der Probenahme bestimmt (Abb.3.21).

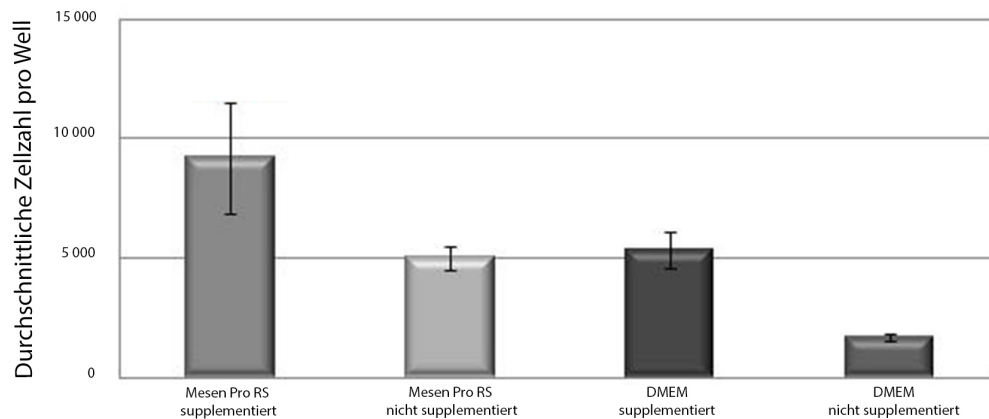


Abbildung 3.21: VEGF-Sekretion: Durchschnittliche Zellzahl zum Zeitpunkt der Probenahme. Wells mit supplementiertem MesenProRS enthielten nahezu doppelt so viele hASC wie Wells mit nicht supplementiertem MesenProRS und supplementiertem DMEM. Die geringste Zellzahl fand sich in nicht supplementiertem DMEM-Basismedium.

Diese Analyse ergab Zellzahlen in Relation zu den gemessenen Menge VEGF. So wurden in supplementiertem Stammzellmedium nahezu doppelt so viele Zellen gezählt wie in nicht supplementiertem MesenProRS oder DMEM-hASC. In supplementiertem MesenProRS fanden sich nahezu fünfmal so viele Zellen wie in DMEM Basismedium. Bezog man den VEGF-Gehalt des jeweiligen Mediums auf die Zellzahl, so zeigte sich bei Nährstoffmangel (in nicht supplementiertem Medium) stets eine deutlich stärkere VEGF-Sekretion der hASC (Abb. 3.22).

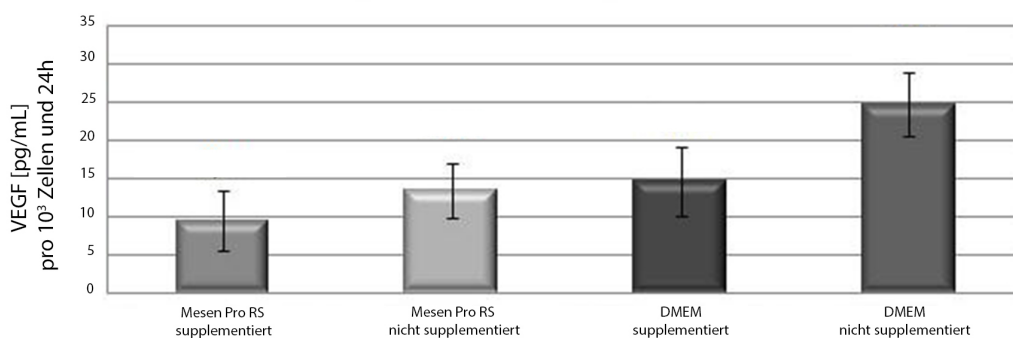


Abbildung 3.22: Berechnung der VEGF-Sekretion pro 1000 Zellen und 24 Stunden. Es zeigte sich eine höhere VEGF-Sekretion in DMEM-Basismedium im Vergleich zu FCS supplementierten Zellkulturmedien.

Diese Darstellung der Ergebnisse bestätigte die zuvor erwähnten Literaturangaben. Unter Nährstoffmangel (DMEM Minimalmedium) steigerten hASC die Produktion und Sekretion von Wachstumsfaktoren wie VEGF. In Abbildung 3.20 wurde dieser Sachverhalt nicht deutlich, da offenbar eine sehr viel höhere Zellzahl in supplementiertem Zellkulturmedium (Abb. 3.21) diesen Effekt kompensiert. Untersuchungen über einen längeren Zeitraum, verdeutlichten diesen Nährstoffmangel-Effekt (Abb.3.23).

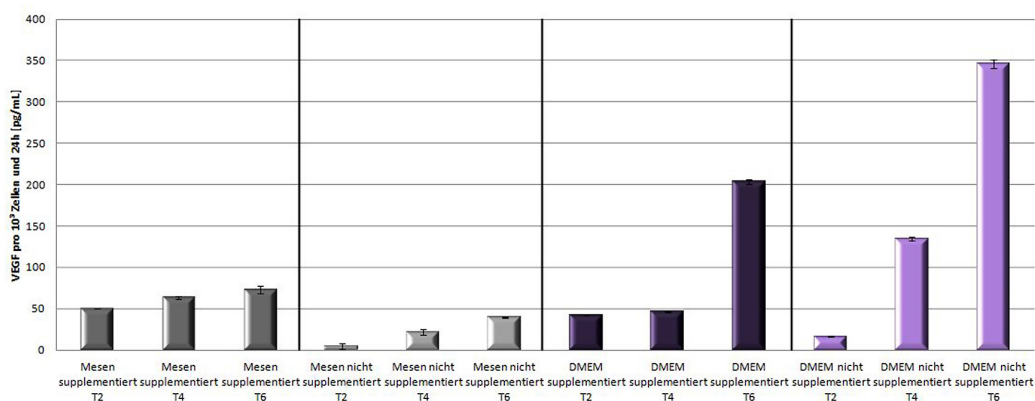


Abbildung 3.23: Einfluss des Zellkulturmediums auf die VEGF-Sekretion. Während in MesenProRS vergleichsweise wenig VEGF produziert und in das Zellkulturmedium sezerniert wurde, steigt die VEGF-Sekretion in DMEM und DMEM-Basismedium über sechs Tage stetig an.

MesenProRS Basismedium ist bereits herstellerseitig mit 2 % FCS supplementiert. Zur Herstellung des empfohlenen Stammzellmediums wurde dieses Basismedium laut Herstellerangaben mit MesenProRS Growth Supplement ergänzt, welches eine umfangreiche Nährstoffversorgung der Zellen garantieren und die spontane Differenzierung der hASC in die chondrogene, osteogene oder adipogene Linie verhindern sollte. In Abbildung 3.23 ist die Wirkung des Stammzellmediums auf die VEGF-Sekretion deutlich erkennen. Aufgrund der speziellen Zusammensetzung des Mediums bleibt die VEGF-Sekretion der Zellen selbst über 6 Tage konstant.

In supplementiertem DMEM steigt die VEGF Sekretion zwischen dem vierten und dem sechsten Versuchstag stark an, was darauf hindeutet, dass zu diesem Zeitpunkt die meisten Nährstoffe aber auch der Sauerstoff im Medium zu einem großen Teil aufgebraucht wurden. In DMEM Minimalmedium ist dieser Effekt noch deutlicher, da hier bereits zu Beginn des Experiments nur ein Minimum

an Nährstoffen zur Verfügung stand. Hier stieg der Gehalt an VEGF im Zellkulturüberstand bereits zwischen Tag 2 und Tag 4 stark an und verdoppelte sich bis Tag 6 nochmals. In MesenProRS war dieser Effekt nur schwach erkennbar, was vermutlich an der Supplementierung des Mediums mit diversen Wachstumsfaktoren und essenziellen Nährstoffen zu erklären ist.

3.5.2 HUVEC Tube Formation Assay mit hASC-konditioniertem Medium

Um das angiogene Potential der verwendeten hASC näher zu beurteilen wurden HUVEC Tube Formation Assays mit den bereits zuvor charakterisierten (siehe Kapitel 3.5.1) hASC-konditionierten Medien durchgeführt.

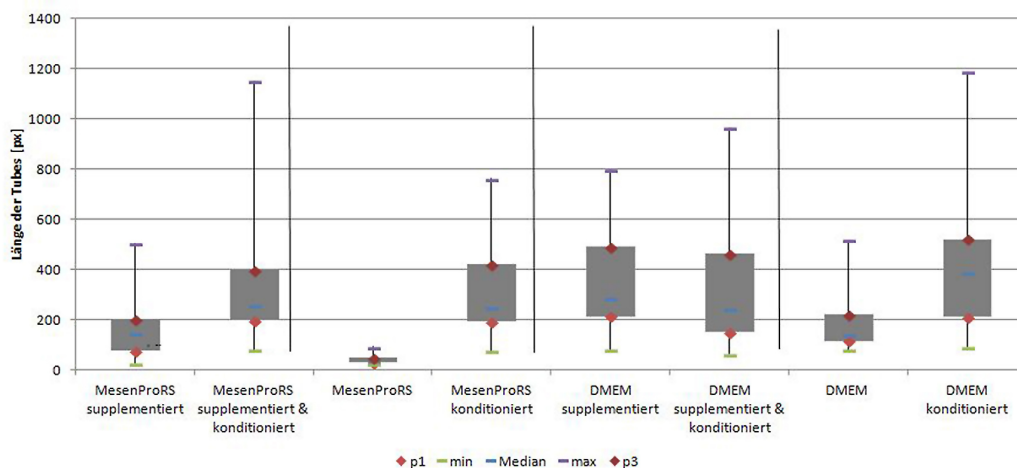


Abbildung 3.24: HUVEC Tube Formation Assay mit hASC-konditionierten Medien zeigt deutlich längere Tubes in konditionierten Medien im direkten Vergleich mit den entsprechenden, nicht konditionierten Medien (Ausnahme DMEM supplementiert). In supplementiertem DMEM ist dieser Effekt, wahrscheinlich aufgrund der hohen FCS-Konzentration im Medium, nicht zu beobachten.

Während die Längen der Endothelzell-Tubes in den Kontrollmedien stark schwankten, zeigte sich die durchschnittliche Länge der Tubes in allen konditionierten Medien gleich. Verglichen mit dem zuvor ermittelten VEGF-Gehalt in sechs Tagen hASC-konditionierten Zellkulturmedien (Abb. 3.23 Werte T6) konnte folgende Korrelation beobachtet werden:

In MesenProRS Basismedium wurde die geringste Menge VEGF ins Medium sezerniert, was zugleich auch kürzere und signifikant weniger Tubes

hervorbrachte. Im Gegensatz dazu fand sich in DMEM Minimalmedium die höchste Menge VEGF, was sich im HUVEC Tube Formation Assay in deutlich längeren und häufiger auftretenden Tubes widerspiegelte.

3.6 VEGF Knockdown mittels VEGF:siRNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde stets die VEGF-Sekretion humaner ASC untersucht, um die beobachteten Effekte im HUVEC Tube Formation und CAM Angiogenese Assay zu erklären. Um diese Annahme zu belegen, wurde im Folgenden ein spezifischer Knockdown von VEGF mittels siRNA Transfektion (si:VEGF) durchgeführt.

3.6.1 VEGF Sekretion nach Knockdown (Monolayer-Kulturbedingungen)

Zur Transfektion der VEGF-siRNA wurde ein Transfektions-Kit verwendet, bei dem über liposomale Transfektionskomplexe die siRNA in die Zelle eingeschleust wird. 24 h nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand mit den Transfektionskomplexen abgenommen, verworfen, frisches, supplementiertes Zellkulturmedium hinzugegeben und nach weiteren 24 h im VEGF-ELISA analysiert.

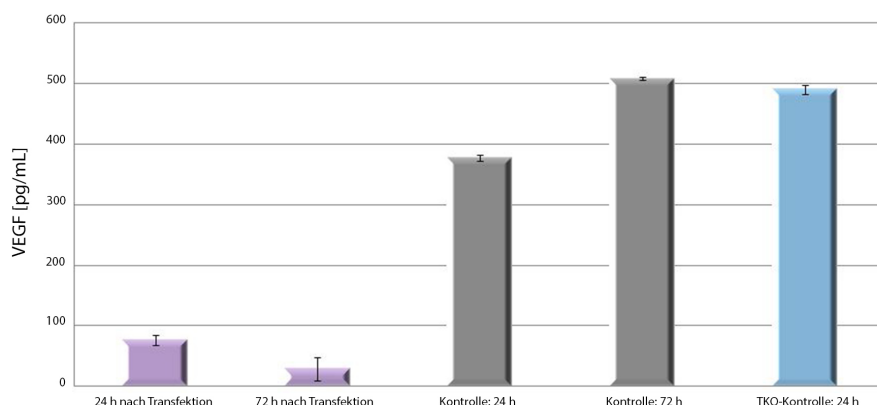


Abbildung 3.25: VEGF Sekretion nach si:VEGF-Knockdown unter Monolayer-Kulturbedingungen. Der Vergleich mit den mitgeführten Kontrollen (> 350 pg/mL) zeigt eine deutliche Reduktion der VEGF-Sekretion (< 70 %) humaner ASC nach si:VEGF Knockdown (< 100 pg/mL).

Im VEGF-ELISA konnte nach si:VEGF Knockdown unter Monolayer-Kulturbedingungen eine Reduktion des VEGF-Gehalts in Kulturmedium humaner ASC (< 100 pg/mL) über einen Zeitraum von 72 h gemessen werden. Sowohl die unbehandelten Kontroll-Kulturen als auch die TKO-Kontrollen (Zugabe des Transfektionsreagenz ohne siRNA) zeigten deutlich höhere Mengen an VEGF im Medium.

3.6.2 VEGF Sekretion humaner ASC nach si:VEGF Knockdown (3D Kulturbedingungen auf textilen Implantaten)

Zur Anwendung der si:VEGF Knockdown-Technik im CAM Angiogenese Assay wurde die Transfektion humaner ASC direkt auf textilen Implantaten durchgeführt und die Transfektionseffizienz bestimmt.

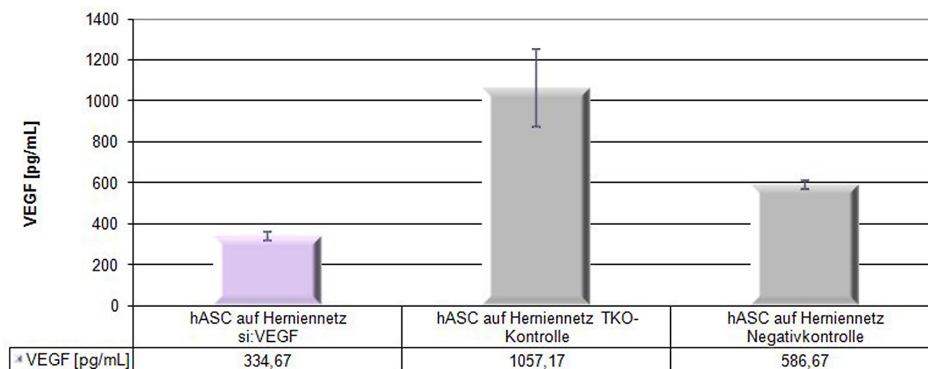


Abbildung 3.26: VEGF-Sekretion nach si:VEGF Knockdown humaner ASC auf Kollagen-beschichteten textilen Implantaten zeigt ebenfalls eine Reduktion der sezernierten VEGF-Menge um etwa 70 %.

Auch hier konnte eine deutlich geringere VEGF-Sekretion nach si:VEGF Knockdown im direkten Vergleich mit den unbehandelten Kontroll-Kulturen als auch den TKO-Kontrollen (Zugabe des Transfektionsreagenz ohne siRNA) auf den textilen Implantaten gemessen werden.

3.6.3 HUVEC Tube Formation Assay nach si:VEGF Knockdown (3D Kulturbedingungen auf textilen Implantaten)

In diesem Arbeitsschritt wurden die zuvor im VEGF-ELISA analysierten Zellkulturüberstände im HUVEC Tube Formation Assay eingesetzt (Abb. 3.27), um den Einfluss der verringerten VEGF-Expression nach si:VEGF Knockdown auf die Angiogenese *in vitro* zu untersuchen.

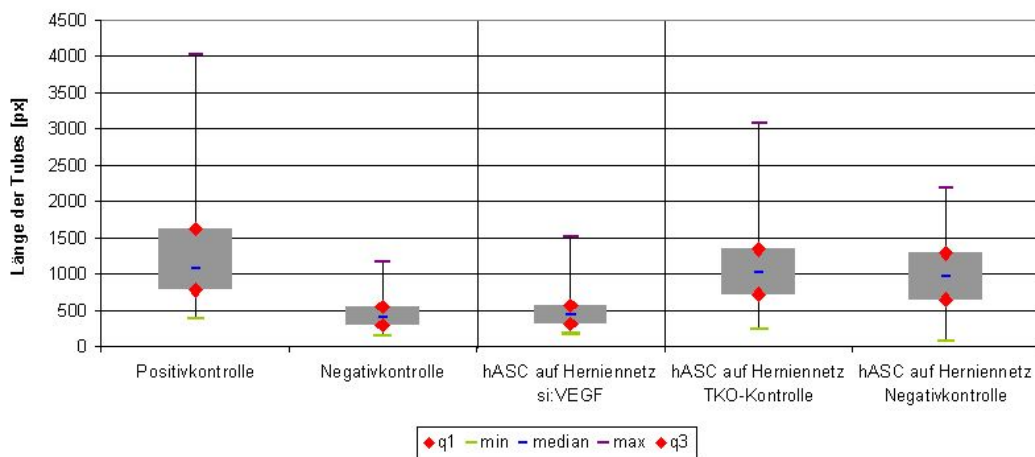


Abbildung 3.27: HUVEC Tube Formation nach si:VEGF Knockdown zeigt durchschnittlich kürzere Tubes in si:VEGF-hASC konditioniertem Medium und ist so eher dem Wertebereich der Negativkontrolle zuzuordnen. Die Tube-Längen in den Kontrollmedien sind dagegen eher mit den Tube-Längen der Positivkontrolle vergleichbar.

Der Zellkulturüberstand der si:VEGF Knockdown hASC zeigte im Tube Formation Assay deutlich weniger lange Tubes. Dies korreliert mit dem zuvor quantifizierten VEGF-Gehalt (siehe Abb. 3.27) . Die Längen der Tubes in den entsprechenden Kontrollen waren mit den Längen der Tubes in der Positivkontrolle (supplementiertes HUVEC-Medium) vergleichbar und ebenfalls mit dem zuvor gemessenen VEGF-Gehalt korrelierbar.

3.6.4 si:VEGF-hASC auf textilen Implantate im CAM Angiogenese Assay

Zur Untersuchung des angiogenen Potentials *in vivo*, wurden "si:VEGF-hASC"-besiedelte Implantate im CAM Angiogenese Assay eingesetzt.

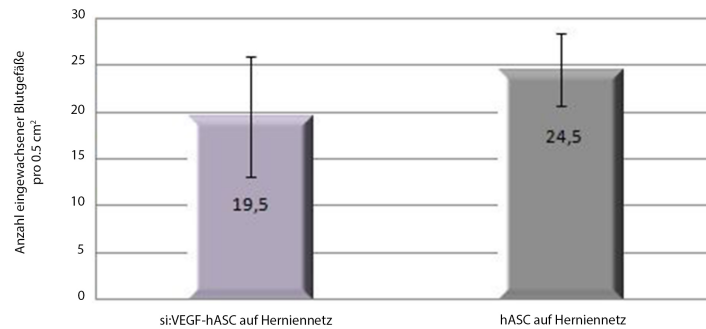


Abbildung 3.28: CAM Angiogenese Assay nach si:VEGF Knockdown zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen si:VEGF-hASC und der Negativkontrolle.

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen si:VEGF-hASC und den entsprechenden Kontrollen im CAM Angiogenese Assay. Verglichen mit den Ergebnissen des VEGF-ELISA und HUVEC Tube Formation Assay ist im CAM Angiogenese Assay lediglich eine Tendenz zu erkennen.

3.6.5 Fazit: VEGF-Sekretion und Angiogenese

Die Ergebnisse der Knockdown-Versuche bestätigen die Annahme, dass die VEGF-Sekretion humaner ASC offenbar die Angiogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im CAM Angiogenese Assay beeinflusst. Zur Untersuchung des angiogenen Potentials wurde daher im Folgenden stets eine Quantifizierung des VEGF-Gehalts im Zellkulturmedium nach 24-stündiger Kultivierung parallel zu den *in vitro* und *in vivo* Angiogenese Assays durchgeführt.

3.7 Untersuchungen zum angiogenen Potential hybrider Implantate

Zur Untersuchung der Angiogenese hybrider Implantate wurden Herniennetze sowie 45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben,

beschichtet und mit humanen ASC besiedelt. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen auf den Trägerstrukturen sowie deren angiogenes Potenzial *in vitro* und *in vivo* untersucht.

3.7.1 Proliferation humaner ASC auf Implantaten

Herniennetze und 45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds wurden mit hASC besiedelt (3.3.1). Aufgrund des durch 45S5 Bioglass[®] verursachten, basischen pH-Shifts des Zellkulturmediums, wurden diese Gerüststrukturen vor der Besiedelung mit humanen ASC so lange mit gepuffertem Zellkulturmedium gewaschen bis der pH-Wert im neutralen Bereich stabil blieb. Anschließend wurde die Proliferation der hASC auf dem Implantaten gemessen.

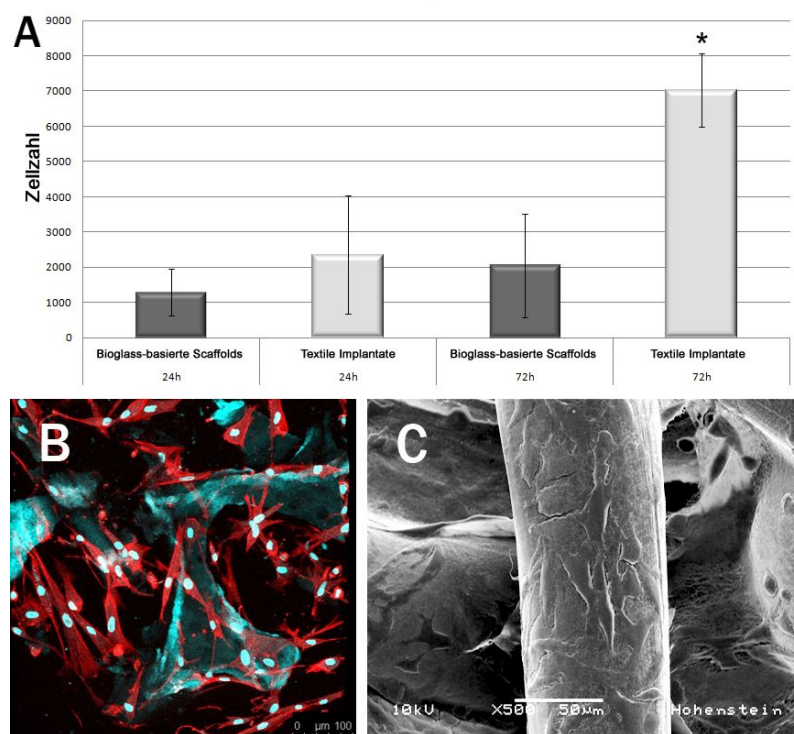


Abbildung 3.29: Proliferation humaner ASC auf Implantaten. (A) hASC zeigten keine weitere Vermehrung, nachdem die Zellen auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds angesiedelt wurden. hASC auf Herniennetzen zeigten dagegen eine signifikant höhere Proliferationsrate (*, $F < F_{crit}$, $p = 0,009$). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme humaner ASC auf 45S5 Bioglass[®]-basiertem Scaffold (C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme humaner ASC auf einem Herniennetz.

Wie in Abbildung 3.29 (B + C) dargestellt, zeigten die Stammzellen 24 h

nach der Besiedelung der Implantate insgesamt eine gleichmäßige Verteilung auf dem gesamten Scaffold. Die Proliferationsanalyse ergab eine konstante Zellzahl auf und in 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds, wohingegen hASC auf den biologisch inerten Herniennetzen ihre Zellzahl nahezu verdreifachten (Abb. 3.29 A).

3.7.2 VEGF Sekretion humaner ASC auf Implantaten

In Kapitel 3.5.1 konnte gezeigt werden, dass hASC in der Lage sind VEGF zu produzieren und zu sezernieren. Säugetierzellen reagieren jedoch auf unterschiedliche Kulturbedingungen mit zahlreichen Änderungen ihres zellulären Verhaltens (vgl. Kap. 3.5.1 & Abb. 3.23). Daher wurde im Folgenden die VEGF-Sekretion humaner ASC unter 3D-Kultivierungsbedingungen näher untersucht.

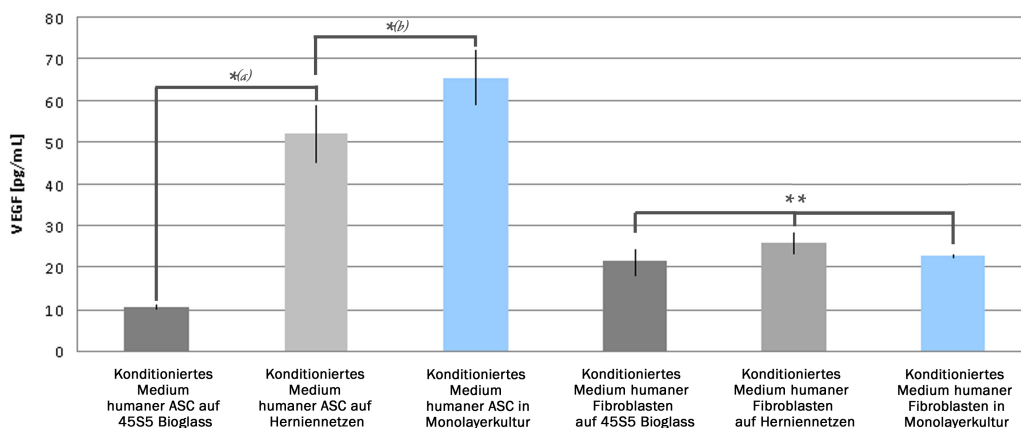


Abbildung 3.30: hASC auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds zeigten eine signifikant geringere Sekretion von VEGF ins Kulturmedium (*(a)) als hASC, die auf Herniennetzen wuchsen. Die VEGF-Sekretion humaner ASC auf Herniennetzen zeigte keine signifikanten Unterschiede zur VEGF-Sekretion humaner ASC in Monolayerkultur (*(b)). Humane Fibroblasten zeigten unabhängig von der Gerüststruktur eine gleichbleibend geringe VEGF-Sekretion ins Kulturmedium (**).

Zunächst wurden sowohl Herniennetze als auch 45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds mit der selben Zellzahl besiedelt. Anschließend konnte im VEGF-ELISA gezeigt werden, dass hASC auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds eine signifikant geringere Sekretion von VEGF ins Kulturmedium aufwiesen als hASC, die auf Herniennetzen angesiedelt wurden. Die VEGF-Sekretion

humaner ASC auf Herniennetzen zeigte keine signifikanten Unterschiede zur VEGF-Sekretion humaner ASC in Monolayerkultur. Humane Fibroblasten (Kontrolle) zeigten unabhängig von der Gerüststruktur eine gleichbleibend geringe VEGF-Sekretion ins Kulturmedium.

3.7.3 HUVEC Proliferationsassay und HUVEC Tube Formation Assay humaner ASC auf Implantaten

Um den Effekt des bioaktiven 45S5 Bioglass[®] auf die Endothelzellproliferation primärer HUVEC selektiv zu untersuchen, wurde DMEM-Basismedium mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 %, 0,1 %, 1 %) von gemahlenem 45S5 Bioglass[®] supplementiert. Zum direkten Vergleich wurde hASC-konditioniertes DMEM-Minimalmedium eingesetzt. Nach 24 h wurde anschließend die HUVEC Proliferation mittels MTT Vitalitätsassay ausgewertet.

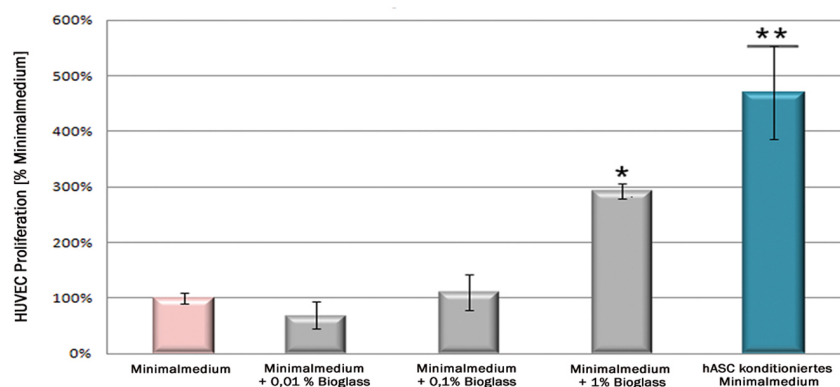


Abbildung 3.31: HUVEC Proliferation nach Applikation von 0,01 %, 0,1 % und 1 % gemahlenem 45S5 Bioglass[®] sowie in hASC-konditioniertem Minimalmedium. Die statistische Analyse ($\alpha = 0.05$) ergab eine signifikant höhere Proliferationsrate der HUVEC in Medium mit 1 % 45S5 Bioglass[®] (*, $F > F_{crit}$, $p = 0,0039$). Konditioniertes Medium humaner ASC bewirkte dagegen eine noch weiter erhöhte Proliferationsrate der HUVEC als Medium mit 1 % 45S5 Bioglass[®] (**, $F > F_{crit}$, $p = 0,008$)

Die Proliferationsrate der HUVEC war in DMEM-Basismedium mit 1 % 45S5 Bioglass[®] etwa dreimal höher als in DMEM-Basismedium ohne Zusatz von 45S5 Bioglass[®]. In hASC-konditioniertem DMEM-Basismedium konnte eine weitere, signifikante Steigerung der Proliferationsrate beobachtet werden.

Der Einsatz von 45S5 Bioglass[®]-haltigem DMEM-Basismedium im HUVEC Tube Formation Assay war jedoch nicht möglich, da das Scaffoldmaterial stark an der verwendeten Matrigel[™]-Beschichtung der Zellkulturplatte adhärierte und eine mikroskopische Auswertung des Assays daher nicht möglich war. Deshalb wurden zu weiteren *in vitro* Angiogeneseuntersuchungen die mittels des VEGF-ELISA analysierten, konditionierten Zellkulturmedien (Kap. 3.7.2) im HUVEC Tube Formation Assay eingesetzt.

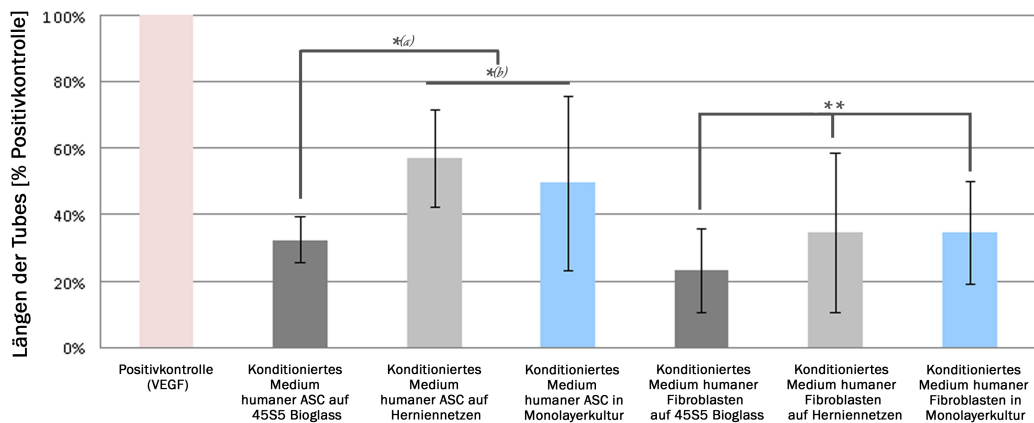


Abbildung 3.32: Im HUVEC Tube Formation Assay zeigte das konditionierte Medium der hASC auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds signifikant kürzere tubuläre Strukturen als hASC auf Herniennetzen (**(a)*). Die Länge der tubulären Strukturen von hASC auf Herniennetzen und hASC in Monolayerkultur zeigten keine signifikanten Unterschiede (**(b)*). In der Kontrollgruppe der konditionierten Medien HF-besiedelter Gerüststrukturen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Längen der tubulären Strukturen (**).

In dieser Versuchsreihe zeigten sich in Korrelation zu den zuvor gemessenen VEGF-Werten im Zellkulturmedium signifikant weniger und kürzere tubuläre Strukturen bei konditionierten Medien der hASC auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds im Vergleich zu hASC auf Herniennetzen. Die Längen der tubulären Strukturen konditionierter Medien von hASC auf Herniennetzen und hASC in Monolayerkultur wiesen jedoch keine statistischen Unterschiede auf. Auch in der Kontrollgruppe (konditionierte Medien humaner Fibroblasten) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Längen der Tubes.

3.7.4 CAM Angiogenese Assay humaner ASC auf Implantaten

Um eine angiogene Wirkung des Scaffoldmaterials im Ganzen untersuchen zu können wurde der *in vivo* CAM Angiogenese Assay sowohl mit hASC als auch mit HF AST besiedelten Implantaten durchgeführt (siehe Abb. 3.33). Zur Zellfreien Kontrolle (ohne Abbildung) wurden mit PBS befeuchtete Implantate eingesetzt. Sie zeigten jedoch in keinem Fall eine angiogene Reaktion der CAM.

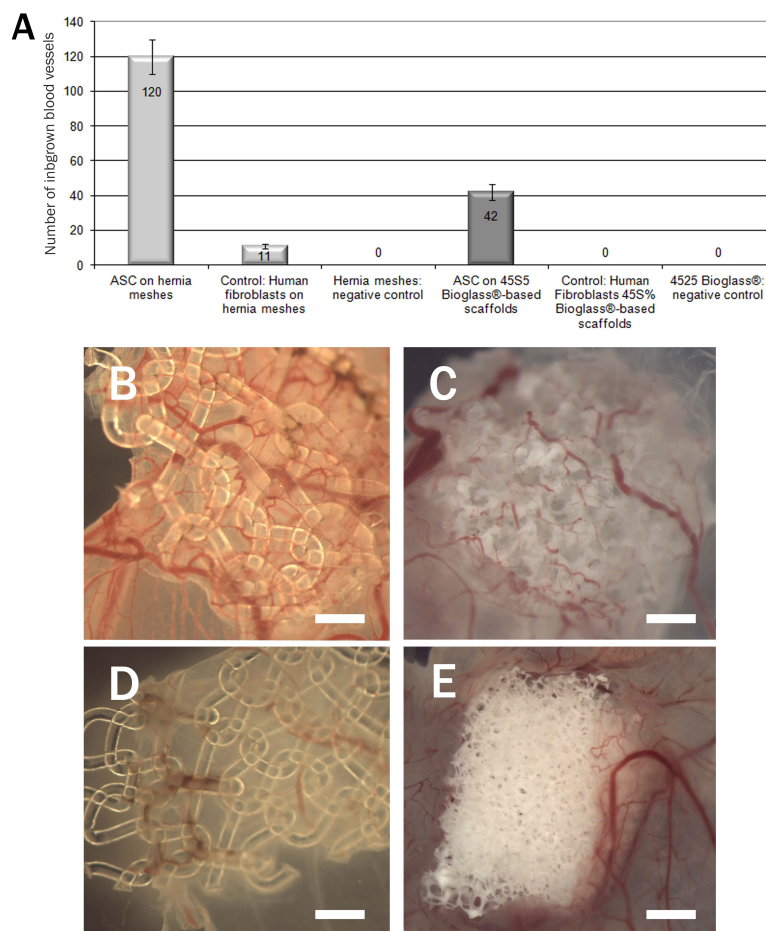


Abbildung 3.33: Hybride Implantate nach Untersuchung im CAM Angiogenese Assay. Herniennetze (B) und 45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds mit hASC (C) sowie Kontroll-Scaffolds mit HF AST (D + E) nach 72-stündiger Inkubation auf der CAM. Die Quantifizierung der Blutgefäße ergab eine signifikant höhere Anzahl an eingewachsenen Blutgefäßen, wenn hASC auf dem entsprechenden Scaffold angesiedelt waren ((*, $F > F_{crit}$, $p = 0,0042$) und (**, $F > F_{crit}$, $p = 2,28E-06$)). Maßstabsbalken entsprechen 1 mm.

Bei den, mit hASC besiedelten Implantatmaterialien reagierte das CAM-Gewebe deutlich: Die Implantate waren fest mit dem CAM-Gewebe verwachsen und zeigten eingewachsene Blutgefäße (Abb. 3.33 B + C). Im Falle HF AST besiedelter Implantate oder nativer Implantate ohne Zellbesiedelung konnte ein solches Einwachsen von Gewebe und Blutgefäßen hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 3.33 D + E). Bei Verwendung nativer, Zell- und Wachstumsfaktor-freier Kontrollmaterialien löste sich das CAM-Gewebe bei den folgenden Waschschrritten sogar wieder vom Implantat.

3.8 Untersuchungen zu Differenzierung und angiogenem Potenzial humaner ASC auf textilen Implantaten

3.8.1 Adipogene Differenzierung humaner ASC auf textilen Implantaten

Die adipogene Differenzierung von Scaffold-gebundenen hASC wurde mit textilen Implantaten (Abb. 3.34 & 3.35) durchgeführt, die mit Adhäsionsförderndem Kollagen beschichtet waren und anschließend mit Vorläuferzellen besiedelt wurden. Die Scaffolds wurden dann 21 Tage in adipogenem Induktionsmedium kultiviert.

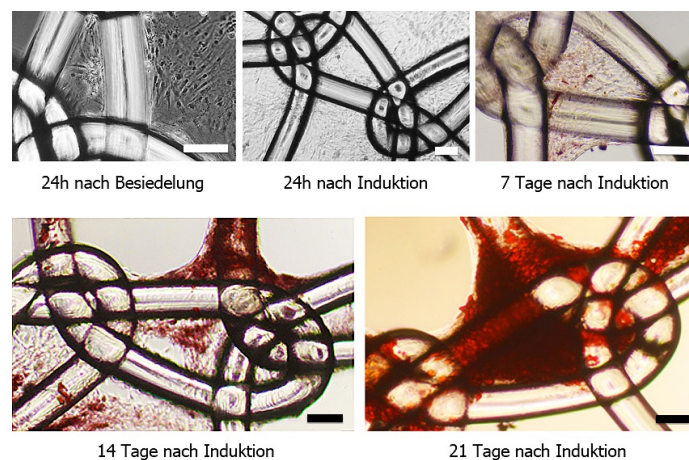


Abbildung 3.34: Die adipogene Differenzierung humaner ASC auf Herniennetzen über 21 Tage. Maßbalken entsprechen 100 μm .

Nach 21 Differenzierungstagen konnte auf den textilen Netzen eine Veränderung der Kollagenbeschichtung und eine Zellmigration in Richtung der Maschen beobachtet werden: Während die Kollagenbeschichtung und die anschließend auf dem Netz angesiedelten Zellen zunächst auch große Zwischenräume des Netzes überspannten (Abb. 3.34 a + b), waren die Zellen am 21. Differenzierungstag konzentrisch an den Maschen des Netzes gesammelt und nahezu vollständig zu Adipozyten differenziert (Abb. 3.34 e).

Im Falle hASC besiedelter Nonwovens konnte diese Entwicklung trotz identischer Probenbehandlung nicht beobachtet werden. Hier waren auch nach 21 Tagen Differenzierung sämtliche Adipozyten homogen im dreidimensionalen Vliesstoff verteilt (Abb. 3.35).

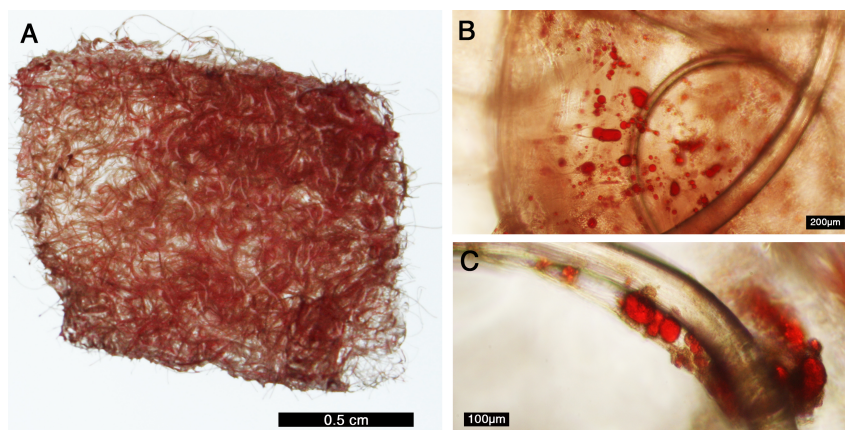


Abbildung 3.35: Adipogene Differenzierung nach 21 Tagen auf einem Vlies. (A) OilRed-O Färbung markiert differenzierte hASC selbst bei makroskopischer Betrachtung (B + C) Mikroskopische Detailaufnahme zeigt eine homogene Verteilung der Adipozyten im Vlies.

3.8.2 VEGF Sekretion adipogen differenzierter hASC auf Implantaten

Wir wollten nun herausfinden, zu welchem Zeitpunkt die Implantat-gebundenen hASC die höchste Menge an VEGF sezernieren. Dies hätte Auswirkungen für den Implantationszeitpunkt bei Fettimplantaten, welcher von einer optimalen Angiogenese begleitet werden sollte.

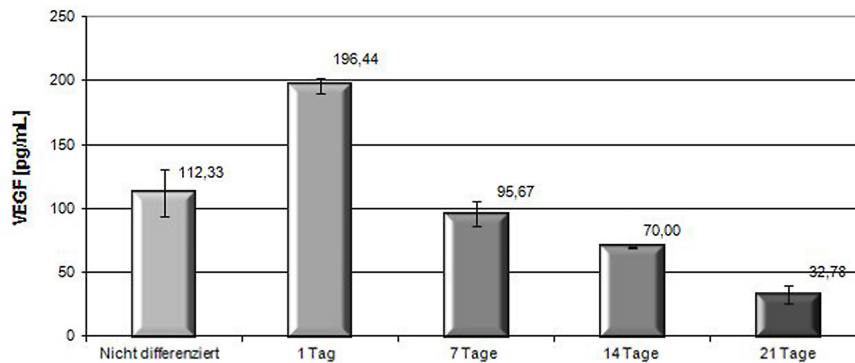


Abbildung 3.36: VEGF Sekretion nach adipogener Differenzierung Implantatgebundener hASC. Die VEGF-Sekretion nimmt mit zunehmender adipogener Differenzierung humaner ASC stetig ab.

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Induktion der adipogenen Differenzierung steigerten hASC ihre Sekretion von VEGF. Im weiteren Verlauf der adipogenen Differenzierung (7-21 Tage) nahm die Sekretion des Wachstumsfaktor jedoch signifikant ab, so dass am 21. Differenzierungstag schließlich nur noch 32 pg VEGF pro mL Zellkulturüberstand und 24 h sezerniert wurden, was ca. 30 % der Sekretion undifferenzierter Zellen entsprach.

3.8.3 HUVEC Tube Formation Assay adipogen differenzierter hASC auf Implantaten

In diesem Arbeitsschritt wurde der HUVEC Tube Formation Assay als *in vitro* Screening durchgeführt. Damit sollte das angiogene Potenzial von Implantaten untersucht werden, die eine fortschreitende adipogene Differenzierung aufwiesen. Hierzu wurden zuvor im VEGF ELISA geprüfte (3.8.2), konditionierte Zellkulturmedien eingesetzt.

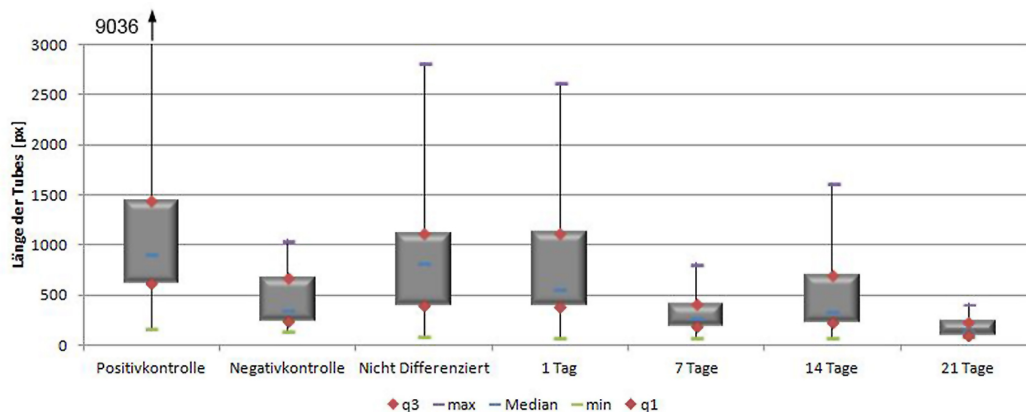


Abbildung 3.37: HUVEC Tube Formation während adipogener Differenzierung Scaffold-gebundener hASC. Man erkennt eine Abnahme der Tube-Längen bei fortschreitender adipogener Differenzierung.

Der Gehalt an VEGF im Medium korrelierte in diesen Experimenten mit der Abnahme der Tube-Längen bei fortschreitender adipogener Differenzierung. Während nicht differenzierte, native hASC und hASC in den ersten 24 h ihrer adipogenen Differenzierung noch Tube-Längen zeigten, die im Schnitt mit der Positivkontrolle vergleichbar waren, konnten bei fortschreitender Differenzierung nur vergleichsweise kurze Tubes gefunden werden, was ein vermindertes angiogenes Potenzial *in vitro* vermuten lässt.

3.8.4 CAM Angiogenese Assay mit adipogen differenzierten hASC auf Implantaten

Der CAM Angiogenese Assay erlaubt die *in vivo* Untersuchung der Angiogenese an einem funktionellen Gefäßsystem. Daher wurden adipogen differenzierte hASC auf textilen Implantaten in diesem Assay untersucht.

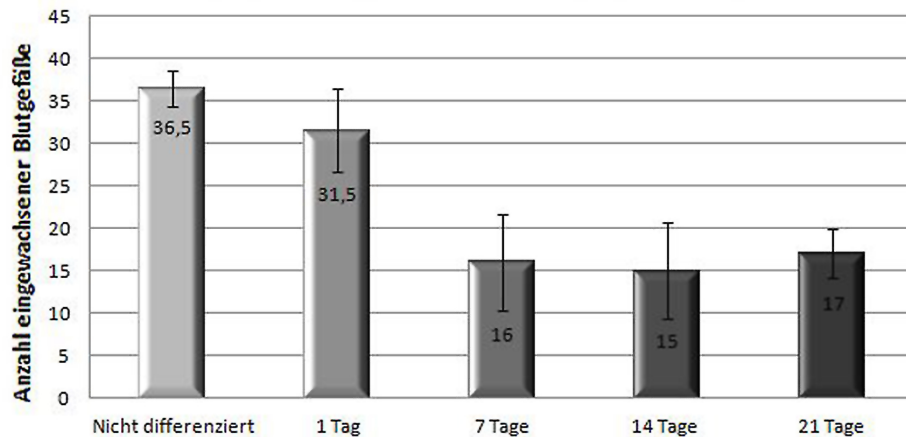


Abbildung 3.38: CAM Angiogenese Assay mit adipogen differenzierten hASC auf Implantaten. Die Anzahl eingewachsener Blutgefäße nahm mit fortschreitender adipogenen Differenzierung.

Die Ergebnisse des CAM Angiogenese Assay konnten auch in diesem Versuchsansatz mit den Ergebnissen des HUVEC Tube Formation Assay korreliert werden. Nicht differenzierte und 24h differenzierte hASC auf textilen Implantaten zeigten etwa die selbe Anzahl eingewachsener Blutgefäße während die Anzahl eingewachsener Blutgefäße mit fortschreitender adipogener Differenzierung weniger wurde.

3.8.5 Fazit: Biologisierung textiler Implantate zur autologen Fettgewebesubstitution

Eine Differenzierung humaner ASC auf Implantaten *in vitro* eignet sich nur bedingt zur autologen Fettgewebesubstitution. Dies liegt an der abnehmenden Sekretion von VEGF bei fortschreitender adipogener Differenzierung sowie an der einhergehenden verminderten Angiogenese im *in vitro* HUVEC Tube Formation Assay sowie im *in vivo* CAM Angiogenese Assay.

Aus diesem Grunde sollte ein Biopolymer gefunden werden, das schnell zu einer Trägerstruktur verarbeitet, mit Zellen ausgerüstet und implantiert werden kann, und zusätzlich die Fähigkeit zur Induktion einer adipogenen Differenzierung humaner ASC mit sich bringt.

3.9 Evaluierung verschiedener Biopolymere zur Anwendung im Adipose Tissue Engineering

Im Tissue Engineering werden derzeit verschiedenste (Bio-)Polymere als Träger- oder Gerüststrukturen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Biopolymere Kollagen, Chitosan und Alginat auf mögliche Anwendungen im "Adipose Tissue Engineering" miteinander verglichen.

3.9.1 Kollagen

Kollagen ist ein häufig eingesetztes Biopolymer. Es ist nicht immunogen und *in vivo* in der Regel gut verträglich. Als Trägerstruktur (Scaffoldmaterial) war Kollagen jedoch nicht das optimale Biopolymer: Durch Resorptionsprozesse war *in vitro* ein großer Volumenverlust des Kollagens zu beobachten, wenn Zellen auf oder in diesem Biopolymer angesiedelt wurden (vgl. Abb. 3.34).

Dieser Volumenverlust war nicht reproduzierbar vorhersagbar, so dass auch hier, ähnlich wie bei der Eigenfettsubstitution, bei einer Geweberekonstruktion mit Volumen- und Formdefiziten gerechnet werden müsste.

Zur Biofunktionalisierung synthetischer, formstabiler Polymere oder Glaskeramiken wurde Kollagen in dieser Arbeit daher nur als adhäsionsförderndes Biopolymer zur Besiedelung der Scaffolds mit hASC eingesetzt.

3.9.2 Chitosan

Chitosan ist ein Polyaminosaccharid, das durch Deacetylierung aus Chitin gewonnen wird. Der Grad der resultierenden Deacetylierung kann erheblich variieren, was sich am Deutlichsten in der Löslichkeit und Viskosität zeigt. Industriell hergestelltes, hochmolekulares Chitosan ist in verdünnten starken Säuren (außer Schwefelsäure) sowie in organischen Säuren löslich und wird anschließend, falls erforderlich, über Laugen-haltige Fällbäder polymerisiert. Die Eigenschaft der guten Löslichkeit in starken Säuren ist zwar einzigartig unter den Biopolymeren und daher charakterisierend für Chitosan, erschwert aber die Handhabung des Biopolymers im Tissue Engineering erheblich. Daher konnte es im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Scaffoldherstellung in Betracht gezogen

werden.

3.9.3 Alginat

Alginat aus Braunalgen konnte in beliebigen wässrigen Medien gelöst und über ein CaCl_2 Fällbad polymerisiert werden. Diesem Fällbad musste das Biopolymer nur kurz ausgesetzt werden, so dass im Alginat immobilisierten humanen Zellen keine Zellschäden aufwiesen. Aufgrund dieser vergleichsweise schonenden Verarbeitungsform, der Möglichkeit nahezu jede Form und Größe zu generieren und der guten Zellverträglichkeit, wurde Alginat als Matrix-Biopolymer zur autologen Fettgewebsrekonstruktion genutzt.

3.10 Herstellung verschiedener Scaffolds aus dem Biopolymer Alginat

Zur Rekonstruktion von subkutanem Fettgewebe sollten Alginatscaffolds, z.B. Fasern, Kugeln, Folien, gefriergetrocknete Schwämmchen, Vliese und Netze hergestellt werden. Anschließend wurde ihr möglicher Einsatz als Scaffoldmaterial im Rahmen eines autologen Fettgewebsersatzes bewertet.

3.10.1 Externe Polymerisation: CaCl_2 Fällbad

Abbildung 3.39 zeigt eine polymerisierte Alginatfaser und -kugel, welche mittels Ca^{2+} -Koagulationsbad gesponnen bzw. getropft und so polymerisiert wurde.

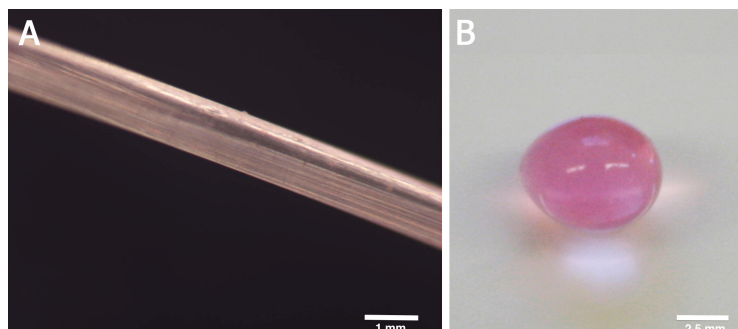


Abbildung 3.39: Herstellung von Alginatfasern und Kugeln mittels Ca^{2+} -Koagulationsbad

Mit dieser Technik war es möglich nahezu alle Formen mit geringer Dicke ($L \times B \times H < 0,5 \text{ cm}$) nachzubilden. Über $0,5 \text{ cm}^2$ führte eine Polymerisation des Biopolymers im Koagulationsbad alleine zu einer festen Hülle und einem flüssigen inneren Kern. Solche biopolymeren Konstrukte platzten bei steigendem Druck, was für eine Anwendung *in vivo* nicht geeignet wäre. Benötigt man Gerüststrukturen mit größerem Volumen, so muss auf andere Techniken zurückgegriffen.

3.10.2 Externe Polymerisation und Gefriertrocknung

Eine weitere Möglichkeit zur Verarbeitung des Biopolymers Alginat ist die Gefriertrocknung mit anschließendem Koagulationsbad, bei der das Alginat während der Gefriertrocknung aufschäumte. Dadurch erhält man eine poröse, Schwamm-artige Alginatmatrix (siehe Abb. 3.40 A).

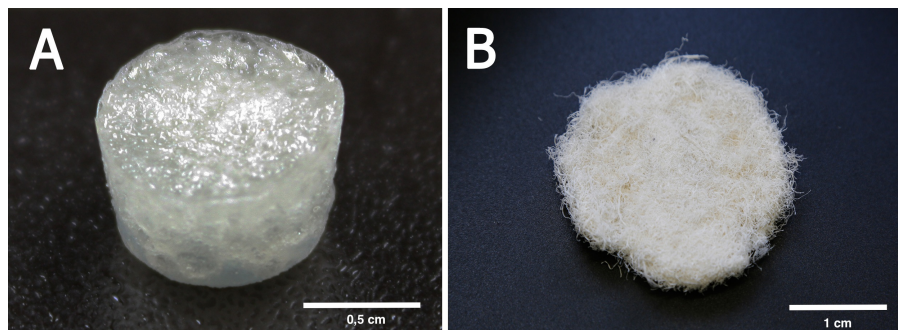


Abbildung 3.40: Herstellung von Alginatschwämmen und Alginatvliesen mittels Koagulationsbad und Gefriertrocknung

Eine zweite Variante der Scaffoldherstellung ist das Spinnen von Alginatfasern über das, in 2.10 beschriebene Nassspinnverfahren mittels Ca^{2+} -Koagulationsbad und das anschließende Vervliesen und Gefriertrocknen der Biopolymerfasern (siehe Abb. 3.40 B). Mit dieser Technik konnten beliebig viele Lagen der bereits polymerisierten Fasern übereinander geschichtet werden, so dass eine Herstellung von Biopolymervliesen mit beliebiger Dicke möglich war.

3.10.3 Externe Polymerisation: Tiefemperaturpolymerisation

Um eine gezielte Alginat-Form herzustellen, wurde auf die sog. Tiefemperaturpolymerisation zurückgegriffen. Hierbei wurde die Alginatlösung in eine entsprechende Silikonform gegossen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Nachdem die Biopolymerlösung vollständig gefroren war, wurde sie in eine eiskalte Ca^{2+} -Koagulationslösung getaucht und für 30 min polymerisiert. Sobald sich das Biopolymer von der Form löste, wurde das Netz herausgenommen und (gefrier-)getrocknet (siehe Abb. 3.41).

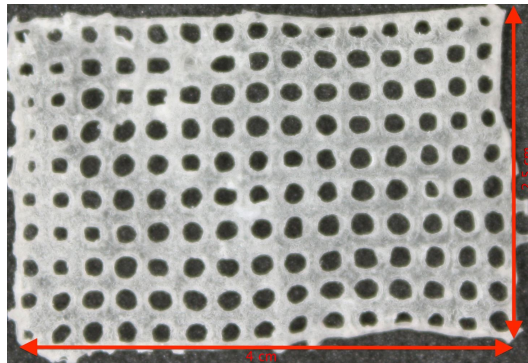


Abbildung 3.41: Alginatnetze hergestellt im Tiefemperaturpolymerisationsverfahren

3.11 Integration biologisch aktiver Substanzen in eine Alginatmatrix

Die Integration der entsprechenden Wachstumsfaktoren in das Scaffoldmaterial ist eine Möglichkeit, um Scaffolds trotz fortgeschrittener adipogenen Differenzierung zum Implantationszeitpunkt ausreichend Angiogenese-fördernde Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Umgekehrt könnte man sich vorstellen, native hASC bereits in einer adipogenen Matrix zu immobilisieren, so dass die VEGF-Sekretion zum Zeitpunkt der Implantation noch gegeben ist und die adipogene Differenzierung durch die Biopolymermatrix selbst erst nach Implantation induziert wird. Beide Ansätze sollen im Folgenden untersucht und verglichen werden.

3.11.1 Integration von Wachstumsfaktoren in eine Alginatmatrix

Die Untersuchungen zur VEGF-Sekretion differenzierender hASC zeigten, dass die produzierte und sezernierte Menge an VEGF während der adipogenen Differenzierung stark abnimmt (Kap. 3.8.2). Eine Möglichkeit die Abnahme der VEGF-Sekretion zu kompensieren, wäre die Integration des Wachstumsfaktors in die Alginatmatrix, um am Implantationsort einen Angiogenese-unterstützenden Effekt zu erzielen (Abb. 3.42).

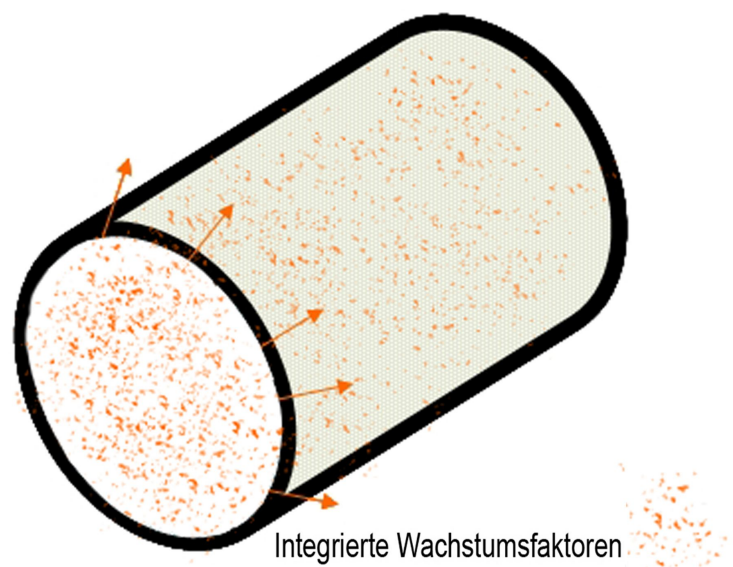


Abbildung 3.42: Schematische Darstellung der Integration von Wachstumsfaktoren in eine Biopolymerfaser

In einem solchen Therapieansatz wäre es erforderlich, eine konstante VEGF-Freisetzung über mehr als 21 Tage zu erreichen, da die verwendeten hASC zunächst *in vitro* in Adipozyten differenziert werden müssten. Zum Zeitpunkt der Implantation (nach 14-21 Tagen adipogener Differenzierung) müsste die VEGF-Freisetzung aus dem Scaffoldmaterial idealerweise noch so hoch sein, dass eine schnelle Neovaskularisierung des Implantats erfolgt.

Um die Freisetzung von Proteinen aus Alginatscaffolds zu untersuchen wurden Scaffolds hergestellt, in deren Grundmaterial radioaktiv markierte ^{14}C D-Glucose / Concanavalin A Komplexe integriert wurden. Diese Komplexe entsprechen in ihrem Molekulargewicht dem 40 kDa großen, dimeren VEGF.

Mittels Flüssigszintillationsmessung wurde dann die Freisetzungskinetik der ^{14}C D-Glucose / Concanavalin A Komplexe aus den biopolymeren Alginatscaffolds gemessen (Abb. 3.43).

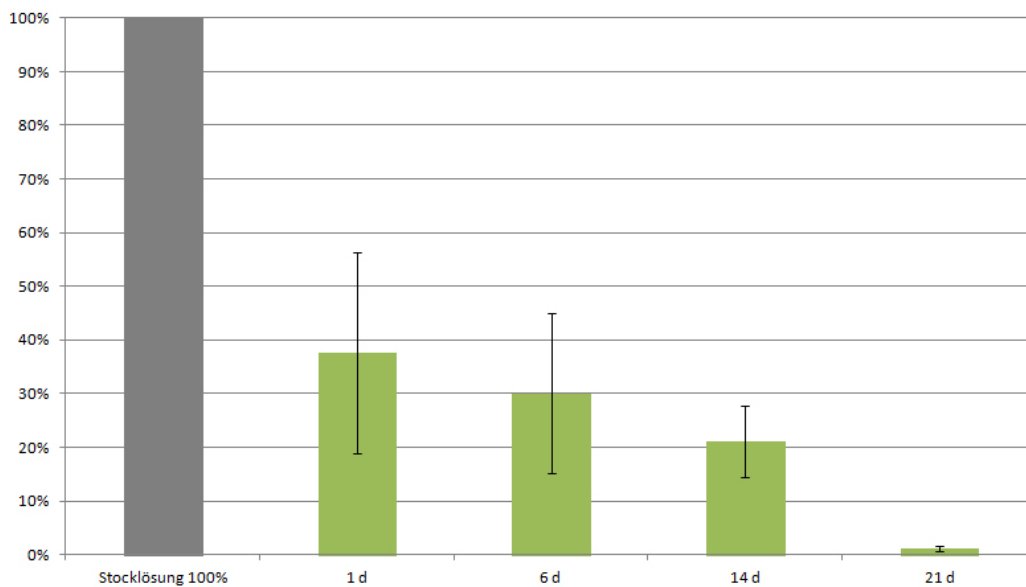


Abbildung 3.43: ^{14}C D-Glucose / Concanavalin A Gehalt in Alginatscaffolds. Nach 21 Tagen waren nur noch 1,23 % der ursprünglichen Menge im Scaffold detektierbar.

Die Szintillationsmessung ergab eine rapide Freisetzung der ^{14}C D-Glucose / Concanavalin A Komplexe aus den Alginatscaffolds. Bereits nach 24 h waren 63 % der 40 kDA großen Moleküle aus dem Alginatscaffold herausdiffundiert, so dass nur noch etwa 37 % der ursprünglichen Menge im Scaffold gefunden werden konnte. Nach 21 Tagen waren lediglich noch 1,2 % der ursprünglichen Menge ^{14}C D-Glucose / Concanavalin A im Scaffold auffindbar. Dies spricht für einen sog. "Burst-Effekt".

Eine mögliche Implantation der TECs zum autologen Fettgewebeersatz ist mit diesem Ansatz erst nach frühestens 14 Tagen *in vitro* Kultivierung möglich. Um mit dieser Methode nach 14 - 21 Tagen *in vitro* Kultivierung einen signifikanten, pro-angiogenen Effekt *in vivo* zu erreichen, müsste man jedoch eine enorme Menge an hoch-reinem VEGF in das Scaffoldmaterial integrieren, was sehr kostspielig wäre. Daher eignet sich dieser Ansatz im Rahmen der Ziele dieser Arbeit zur Unterstützung der Angiogenese am Implantationsort nicht.

3.11.2 Verkapselung humaner ASC in eine Alginatmatrix

Auch die primären, undifferenzierten hASC zeigten, wie in Kapitel 3.4 untersucht, die Fähigkeit, VEGF zu produzieren und in vergleichsweise hohen Mengen zu sezernieren. Während der Differenzierung in Adipozyten reduziert sich die Menge an sezerniertem VEGF jedoch signifikant (vgl. Kap. 3.8.2). Zudem ist eine schnelle Verfügbarkeit adipogener Implantate zur Fettgewebesubstitution seitens der Regenerativen Medizin erwünscht. Ein möglicher Ansatz, um diese Ziele zu erreichen liegt in der Verwendung primärer undifferenzierter hASC, immobilisiert in eine Alginatmatrix. Diese hASC könnten post-transplantationem zunächst die Angiogenese anregen und mittels integrierter adipo-induktiver Faktoren direkt am Implantationsort in Adipozyten differenzieren (Abb. 3.44).

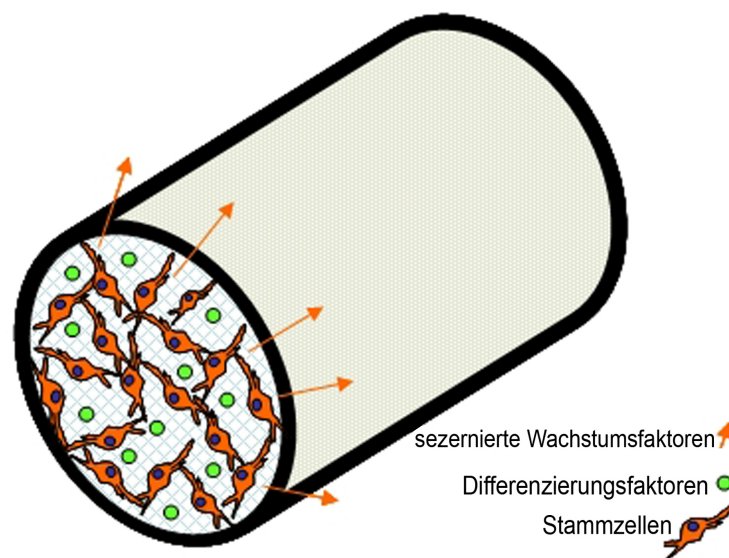


Abbildung 3.44: Schematische Darstellung der Verkapselung humaner ASC in eine adipogene Alginatmatrix

Um diesen Therapieansatz näher zu untersuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Biopolymerlösung zur Immobilisierung humaner ASC entwickelt. Eine Calcein-AM Färbung ergab, dass die immobilisierten hASC über 21 Tage in der Alginatmatrix vital waren (Abb. 3.45).

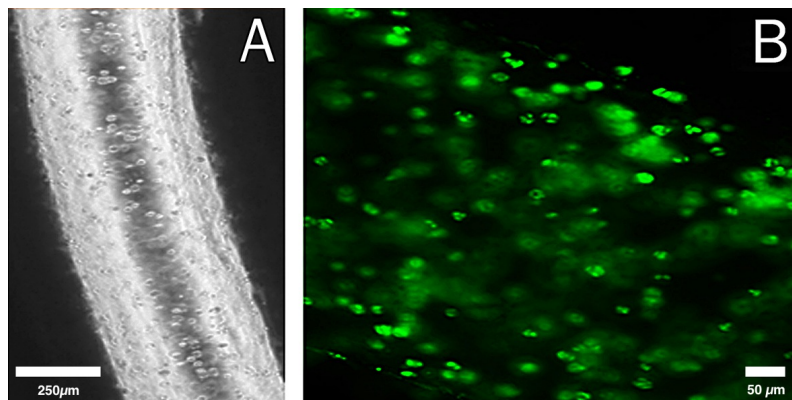


Abbildung 3.45: hASC, verkapselt in eine (A) Alginatefaser. (B) Die Calcein-AM Färbung zeigt lebende Zellen im Inneren der Alginatefaser nach einer Kultivierungsdauer von 21 Tagen in DMEM-Basismedium.

Die VEGF Sekretion Alginate-immobilisierter hASC entsprach in ihrer Höhe der Sekretion von VEGF von auf textilen Implantaten angesiedelten hASC (Abb. 3.46), so dass von einer ähnlich pro-angiogenen Wirkung in HUVEC Tube Formation und CAM Angiogenese Assay ausgegangen werden konnte.

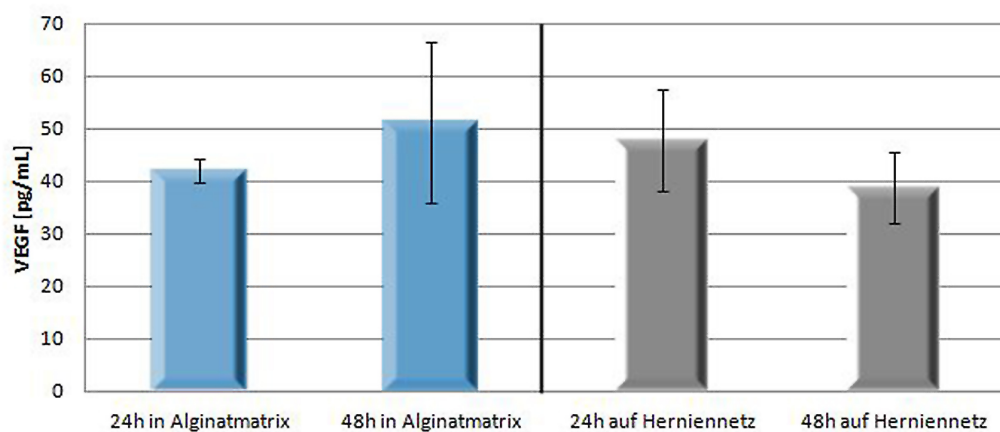


Abbildung 3.46: Vergleich der VEGF Sekretion immobilisierter humaner ASC in einer Alginatematrix und angesiedelt auf textilen Implantaten zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Da durch die Immobilisierung humaner ASC in einer Alginatematrix weder die Zellvitalität (Abb. 3.45) noch VEGF-Sekretion negativ beeinflusst wurde (Abb. 3.46), konnte dieser Ansatz zur Entwicklung eines adipogenen Biopolymers weiter verfolgt werden.

3.12 Entwicklung einer adipogenen Alginatmatrix

Alginat ist ein in sämtlichen wässrigen Medien lösliches Biopolymer. Aus diesem Grund wurde die Alginatlösung im Folgenden direkt in adipogenem Induktionsmedium hergestellt, so dass die Differenzierung der darin eingeschlossenen Zellen aufgrund der integrierten adipo-induktiven Faktoren eingeleitet werden sollte.

3.12.1 Adipogene Differenzierung humaner ASC nach Verkapselung in adipogener Alginatmatrix

Nach Verkapselung der hASC in eine adipogene Alginatmatrix wurden die TECs 21 Tage in DMEM-Basismedium kultiviert. Nach dreiwöchiger Kultivierung wurden die Zell-Scaffold Kombinationen makro- und mikroskopisch analysiert (Abb. 3.47).

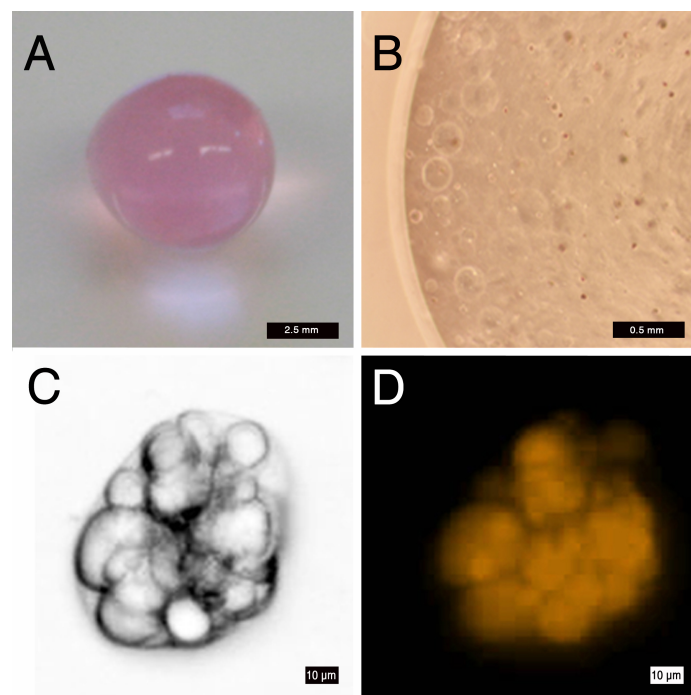


Abbildung 3.47: Durch Alginatmatrix induzierte adipogene Differenzierung humaner ASC. (A) Alginat-Kugel nach 19-tägiger Kultivierung in Minimalmedium. (B) Der makroskopische Querschnitt zeigt eine gleichmäßige Verteilung der verkapselten Zellen. (C+D) Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines dreidimensional wachsenden noch unreifen Adipozyten.

Zur vereinfachten Handhabung wurden in diesen Experimenten Alginatkugeln anstelle von Alginatfasern hergestellt. Nach 21-tägiger Kultivierung in DMEM-Basismedium wurden die Kugeln (Abb. 3.47 A) geschnitten und mikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Alginatmatrix (Abb. 3.47 B). Eine spezifische Lipidfärbung mit NileRed dokumentierte die adipogene Differenzierung der Alginat-immobilisierten hASC (Abb. 3.47 C + D). In der Alginatmatrix konnten gleichmäßig verteilte unreife Adipozyten mit vielen intra-zytoplasmatischen Lipidvakuolen gefunden werden. In einem Parallelansatz wurden hASC in einer doppelt konzentrierten adipogenen Alginatmatrix immobilisiert und ebenfalls 21 Tage in DMEM-Basismedium kultiviert.

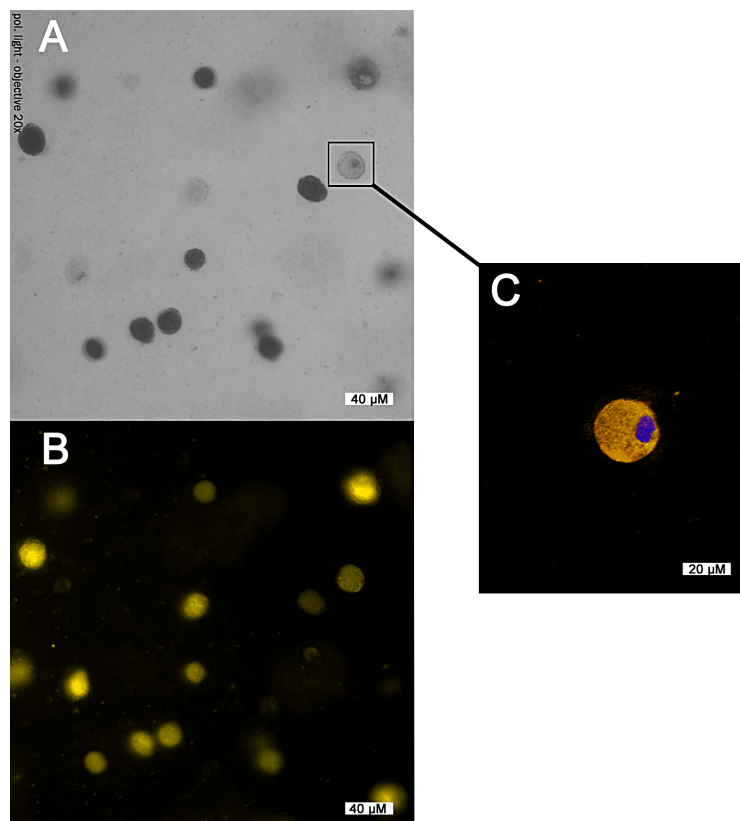


Abbildung 3.48: Durch Alginatmatrix induzierte adipogene Differenzierung humaner ASC an Differenzierungstag 21. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch die Alginatkugel. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der NileRed gefärbten Adipozyten. (C) Detailaufnahme eines NileRed und DAPI gefärbten, reifen Adipozyten. Blau zeigt den Zellkern, gelb zeigt eine große Lipidvakuole, was ein charakteristisches Merkmal reifer Adipozyten darstellt.

Nach 21 Tagen Differenzierung in der doppelt konzentrierten adipogenen Alginatmatrix wurde eine Calcein-AM sowie NileRed Färbung der Lipidvakuolen durchgeführt. Zur Kontrastierung wurden Zellkerne mit DAPI markiert. Die anschließende mikroskopische Analyse der adipogenen Alginatkonstrukte ergab eine Vielzahl reifer Adipozyten mit nur einer großen Lipidvakuole und einem an die Zellmembran angelagerten Zellkern (siehe Abb. 3.48 C).

3.12.2 VEGF Sekretion nach Verkapselung humaner ASC in eine adipogene Alginatmatrix

Nach Verkapselung von hASC in doppelt konzentrierte, adipogene Alginatmatrices wurden die Zell-Scaffold-Konstrukte in DMEM-Basismedium kultiviert. 24 h vor der Probenahme wurde auch hier ein Medienwechsel durchgeführt, so dass folgende Ergebnisse die VEGF-Sekretion pro 24 h zeigen (Abb. 3.49).

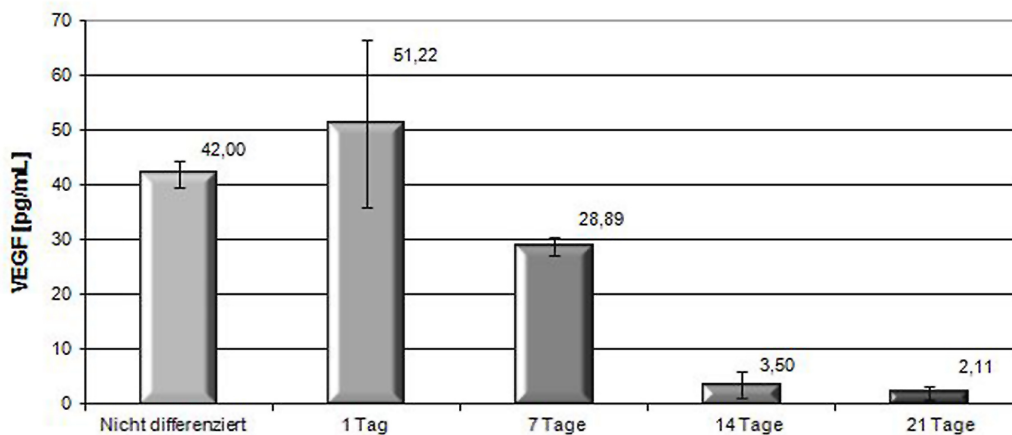


Abbildung 3.49: Die VEGF Sekretion nach Verkapselung humaner ASC in einer 3%igen, adipogenen Alginatmatrix. Es zeigt sich eine rapide Abnahme der VEGF-Sekretion ins Zellkulturmedium nach 7 Tagen. Nach 14 Tagen adipogener Differenzierung lag der VEGF-Gehalt im Medium nahe an der Nachweisgrenze des VEGF-ELISA.

Vergleichbar mit den Ergebnissen in Kapitel 3.8.2 zeigten humane ASC nach 24 h Kultivierung in einer adipogenen Alginatmatrix einen deutlichen Anstieg der VEGF Sekretion, welche über einen Zeitraum von 21 Tagen schließlich

rapide abnahm. Bereits nach 14 Tagen adipogener Differenzierung lag die VEGF Sekretion bei nur noch 3,5 pg VEGF pro mL und 24 h.

3.12.3 HUVEC Tube Formation Assay nach Verkapselung humaner ASC in eine adipogene Alginatmatrix

Um das angiogene Potenzial dieser adipogenen TECs während der fortschreitenden adipogenen Differenzierung der immobilisierten hASC *in vitro* zu untersuchen, wurde ein HUVEC Tube Formation Assay durchgeführt. Analog zu der Vorgehensweise in Kapitel 3.8 wurde parallel zum Tube Formation Assay der VEGF-Gehalt der konditionierten Medien bestimmt (Kap. 3.12.2).

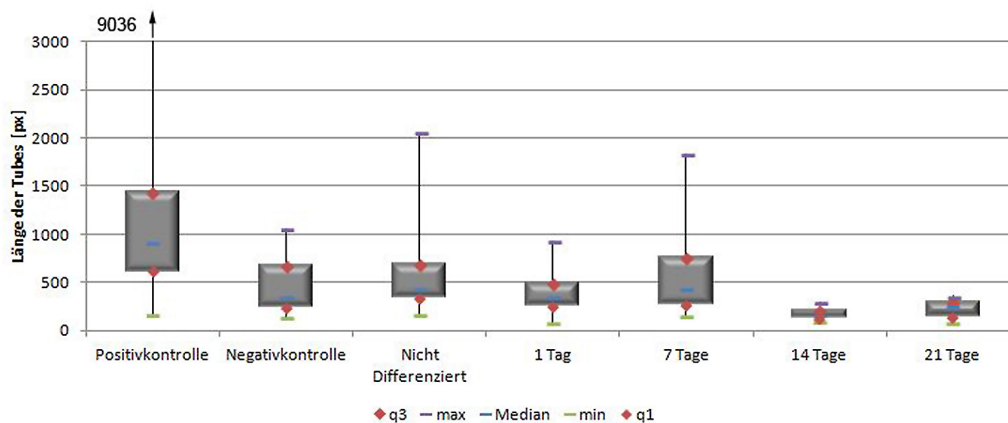


Abbildung 3.50: HUVEC Tube Formation während adipogener Differenzierung humaner ASC in adipogener Alginatmatrix zeigt eine Abnahme der Tube-Längen bereits zu Beginn der adipogenen Differenzierung in einer adipogenen Alginatmatrix immobilisierter humaner ASC.

Auch in diesem Ansatz korrelierten die Tube-Längen zum VEGF-Gehalt der geprüften konditionierten Medien. Es konnten im Medium der 7 Tage adipogen differenzierten hASC bereits nur noch vergleichsweise kurze Tubes beobachtet werden, was mit der schneller fortschreitenden adipogenen Differenzierung humaner ASC in der adipogenen Alginatmatrix und der damit einhergehenden Verringerung ihrer VEGF-Expression erklärt werden könnte.

3.12.4 Adipogene biopolymere Implantate im CAM Angiogenese Assay

Der CAM Angiogenese Assay mit adipogenen Alginatkonstrukten wurde analog zum CAM Angiogenese Assay mit adipogenen textilen Implantaten (Kap. 3.8.4) durchgeführt. Es wurden Alginatkonstrukte mit hASC in unterschiedlichen Differenzierungsstadien verwendet (native hASC, 24 h, 7 d, 14 d & 21 d). Eine Auswertung dieses Experimentes war jedoch nicht möglich: Die Alginatkonstrukte konnten nach 72 h auf der CAM nicht wiedergefunden werden. Offenbar finden Resorptions- oder Degradationsprozesse während der 72 h Inkubation auf der CAM statt.

3.13 Fazit: Adipogene biopolymere Implantate

Durch die Integration adipogener Differenzierungsfaktoren (Insulin, Indomethazin, IBMX, Dexamethason und Glucose) in eine Alginatlösung konnte eine adipogene Differenzierung humaner ASC über einen Zeitraum von 21 Tagen ohne die weitere Supplementierung des Kulturmediums erreicht werden. Die in Kapitel 3.8 beschriebene, verminderte VEGF-Sekretion humaner ASC während der adipogenen Differenzierung konnte auch hier beobachtet werden. Durch die Integration adipogener Differenzierungsfaktoren in das Scaffoldmaterial könnte die Zeitdauer bis zu einer möglichen Implantation des Fettgewebeersatzes um bis zu drei Wochen verringert werden, da die Differenzierung der Vorläuferzellen nicht wie bisher *in vitro* sondern bereits *in vivo* am Implantationsort *post transplantationem* erfolgen würde.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 VEGF als repräsentativer Parameter bei der Untersuchung der Angiogenese

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) spielt im adulten Organismus bei der Gefäßneubildung und Wundheilung eine zentrale Rolle als angiogenes Protein und wird daher als Schlüsselmolekül der Regulation der Angiogenese bezeichnet. Die Splicevariante VEGF-A aktiviert Endothelzellen durch Bindung einer Rezeptor-Tyrosinkinase (VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2)), welche daraufhin autophosphoryliert wird und so verschiedene Signaltransduktionsketten kontrolliert (siehe Abb. 1.4). Während VEGF beim Tumorwachstum hauptverantwortlich für die Vaskularisierung des malignen Gewebe ist und somit auch eine unerwünschte Rolle bei der Tumormetastasierung spielt, soll VEGF in der Regenerativen Medizin die gewünschte, schnelle Neovaskularisierung fördern, denn ausschließlich gut durchblutete Gewebetransplantate können vom Körper des Patienten akzeptiert werden und ihre Gewebefunktion optimal erfüllen.

Zur Neovaskularisierung allogener Implantate und TECs existieren bereits diverse Therapieansätze zur schnellen Implantat-Angiogenese [79]. Unter anderem werden hierbei Ansätze zur *in vitro* und *in vivo* Prävaskularisierung verfolgt, sowie der Einsatz von Angiogenese-fördernden Wachstumsfaktoren, Adhäsionspeptiden oder Co-Kultivierungs-Verfahren untersucht. Dabei kann grundsätzlich zwischen Zell-basierten Strategien und Scaffold-basierten

Strategien unterschieden werden [79]. Die Steigerung der Angiogenese, z.B. durch eine systemische Gabe von VEGF ist insgesamt jedoch fraglich, da große Proteinmengen erforderlich wären, um einen messbaren Effekt *in vivo* zu erzielen [58]. Auch die Integration von VEGF in das Scaffoldmaterial erfordert eine ausreichend hohe Dosis an hochreinem Wachstumsfaktor, um synthetische oder biopolymere Gerüstsubstanzen so auszurüsten, dass messbare angiogene Effekte am Implantationsort hervorgerufen werden [59–66].

Aufgrund dieser Vorüberlegungen und den Studien anderer Arbeitsgruppen sollten im Rahmen dieser Arbeit Zell-basierte Ansätze mit entsprechenden Scaffold-basierten Strategien kombiniert werden, um pro-angiogene Effekte zu erzielen. Dazu wurden adulte mesenchymale Vorläuferzellen aus Fettgewebe auf verschiedenen Gerüststrukturen (textile Herniennetze, Nonwovens, 45S5 Bioglass[®], biopolymere Matrizes etc.) angesiedelt und anschließend mit unterschiedlichen Angiogenese-Modellen *in vitro* und *in vivo* auf ihr angiogenes Potenzial untersucht. Parallel zu diesen Angiogenese Tests wurde die VEGF-Sekretion der Implantat-gebundenen hASC als weiterer Parameter herangezogen.

Um im Vorfeld zu zeigen, dass VEGF, neben weiteren Sekretionsprodukten humaner ASC, auch in unseren Versuchsansätzen das Schlüsselprotein der Angiogenese darstellt, wurde die VEGF mRNA über eine entsprechende anti-VEGF siRNA spezifisch inhibiert (siRNA-Knockdown). Dabei konnte *in vitro* bei ersten Transfektionen humaner ASC in 2D Monolayerkultur sowie unter 3D Kultivierungsbedingungen auf textilen Implantaten eine Reduktion der VEGF-Sekretion um mehr als 70 % erreicht werden. Diese Resultate müssen durch den Einsatz von Kontroll-siRNAs (z.B. scrambled siRNA) in weiteren Experimenten bestätigt werden, um unspezifische "off-target"-Effekte auszuschließen.

Das vorläufige Ergebnis des VEGF-Knockdown wurde jedoch durch korrelierende Ergebnisse in Angiogenese Tests unterstützt: Im HUVEC Tube Formation Assay konnte ein signifikant geringeres angiogenes Potenzial der hASC:siVEGF Knockdown-Zellen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass VEGF für die angiogenen Reaktionen in diesem Testsystem mitverantwortlich ist. Im CAM Angiogenese Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen hASC:siVEGF und den entsprechenden Kontrollen mit nativen hASC festgestellt werden. In diesen ersten Versuchen war jedoch eine Tendenz zur verringerten Gefäßeinsprossung

erkennbar.

Vor dem Hintergrund, dass der CAM Angiogenese Assay ein *in vivo* Angiogenesemodell darstellt, zeigen die Ergebnisse, dass Angiogenese *in vivo* ein Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren erfordert und nicht nur durch ein einziges Zytokin (wie VEGF) gesteuert wird.

Unsere Ergebnisse unterstützen dennoch die These, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ein Schlüsselprotein der Angiogenese darstellt, welches stets stellvertretend für pro-angiogene Zytokine *in vitro* und *in vivo* untersucht werden sollte.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Screening-Versuche durchgeführt, bei denen eine Quantifizierung des VEGF-Gehalts über einen entsprechenden VEGF-ELISA mit Ergebnissen des *in vitro* HUVEC Tube Formation Assay und des *in vivo* CAM Angiogenese Assay korreliert wurden, um Aussagen über mögliche angiogene Potenziale der entwickelten TECs treffen zu können.

In vivo Untersuchungen zur Angiogenese lassen sich über die Korrelation dieser drei Testsysteme (1. VEGF-Sekretion 2. HUVEC Tube Formation Assay 3. CAM Angiogenese Assay) jedoch nicht vollständig ersetzen. Letztlich müssen hier weitere Versuche in verschiedenen Tiermodellen folgen, um die in dieser Arbeit beobachteten Effekte näher untersuchen zu können.

4.2 Einfluss humaner ASC auf die Induktion der Angiogenese diverser 3D-Gerüststrukturen

Eine unzureichende und/oder verzögerte Neovaskularisierung ist noch immer eine Ursache für die schlechte Akzeptanz größerer Gewebeersatz-Konstrukte in der Regenerativen Medizin. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Gefäßneubildung verschiedener Scaffolds und Zell-Scaffold Kombinationen (Tissue Engineered Constructs, TECs) mit *in vitro* und *in vivo* Angiogenese-Modellen untersucht. Abbildung 4.1 stellt diesen Therapieansatz schematisch dar.

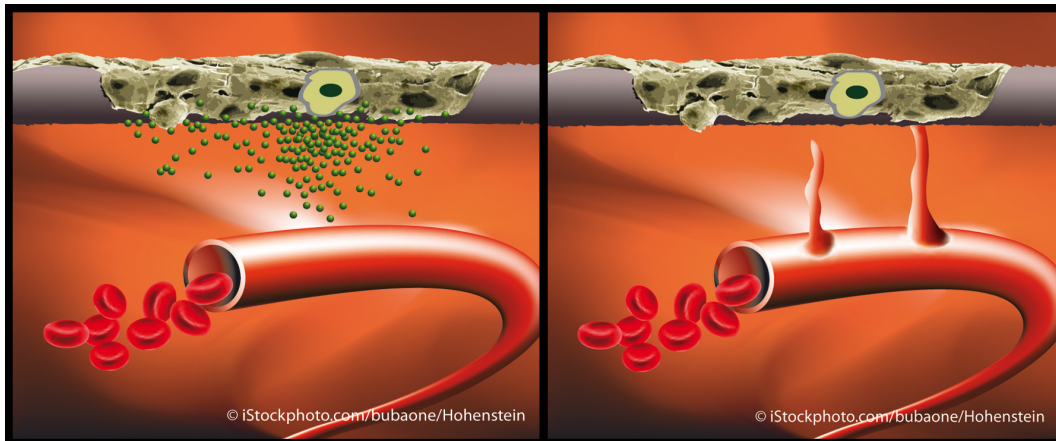


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der hASC-induzierten Angiogenese in TECs. Durch Ausschüttung von angiogenen Faktoren aus Faser-gebundenen Zellen wird die Gefäßneubildung induziert. (Quelle: iStock Photos - Hohenstein Institute)

4.2.1 hASC-biofunktionalisierte Gerüststrukturen im CAM Angiogenese Assay

In der Biomaterialforschung werden direkte und indirekte Versuchsdesigns unterschieden. In einer direkten Prüfung des Biomaterials wird das Scaffold selbst zu einer Zellkultur gegeben, in einem indirekten Ansatz werden wässrige Extrakte des Biomaterials hergestellt, die in Zellkultur geprüft werden [80]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein direkter Effekt des Scaffoldmaterials *in vitro* auf die verwendeten hASC und HUVEC sowie *in vivo* auf die Angiogenese im CAM Angiogenese Assay untersucht werden. Bei einer direkten Prüfung des Scaffoldmaterials *in vitro* besteht die Möglichkeit entweder fein gemahlene Partikel dem Zellkulturmedium zuzugeben und diese Suspension zu prüfen oder das dreidimensionale Biomaterial im Ganzen direkt in Zellkultur einzusetzen [80]. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die Zellen selbst auf dem Material anzusiedeln, um Effekte des Materials auf die verwendeten Zellen zu untersuchen. Dies wird später diskutiert.

Für Untersuchungen der Biokompatibilität [81] sowie eventuellen pro- und anti-angiogener Effekte *in vivo* [53] wird derzeit häufig auf das CAM Angiogenese Modell zurückgegriffen. Gorustovich *et al.* [82] und Vargas *et al.* [81] untersuchten beispielsweise die Biokompatibilität und Knochenmineralisierung von 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds mit Hilfe einer Variante des CAM Modells, dem *ex ovo* Chorioallantoismembran-Kultursystem. Sie konnten zeigen, dass 45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds keinerlei Entzündungsprozesse

im CAM-Gewebe auslösten. Interessanterweise beobachteten sie in diesem Versuchsansatz aber auch keinerlei angiogene Reaktionen der CAM.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Gegensatz zu Gorustovich *et al.* zunächst der *in ovo* CAM Angiogenese Assay etabliert und für die Prüfung von TECs in ersten Experimenten mit nativen, Zell-freien Scaffolds durchgeführt. In diesen Versuchen zeigten, analog zu den Ergebnissen von Gorustovich *et al.* [82] und Vargas *et al.* [81], weder die biologisch inerten Polypropylen-Herniennetze noch die Ionen-freisetzenden 45S5 Bioglass[®]-basierten Gerüststrukturen pro-angiogene Effekte.

Aufgrund der fehlenden Neovaskularisierung der Gerüststrukturen im CAM Angiogenese Assay wurde der Therapieansatz geändert. Nun wurden hASC auf den Scaffolds angesiedelt, denen ein pro-angiogener Effekt nachgesagt wird [56]. Diverse Studien konnten bereits belegen, dass diese Vorläuferzellen unter geeigneten Wachstumsbedingungen über die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF oder bFGF) sowohl die Wundheilung als auch die Angiogenese anregen können [19, 34, 56]. Wir wollten nun wissen, ob sie diese Eigenschaften auch auf Trägerstrukturen aufweisen. Daher wurde 45S5 Bioglass[®] mit hASC besiedelt und hinsichtlich verbesserter pro-angiogener Effekte untersucht.

Da 45S5 Bioglass[®] bei Kontakt mit wässrigem Medium verschiedene Ionen (z.B. Si, Ca, Na, P) freisetzt, die offenbar selbst eine starke, bioaktive Wirkung aufweisen [80] wurden hier stets auch biologisch inerte Herniennetze aus Polypropylen mitgeführt, um Reaktionen der CAM aufgrund freigesetzter Ionen erkennen bzw. ausschließen zu können. Zur optimierten "Biologisierung" der Gerüststrukturen mit hASC wurde eine Kollagen-haltige Beschichtung genutzt, um die Zelladhäsion der Vorläuferzellen auf den Scaffolds insgesamt zu verbessern. Leu und Leach [83] sowie Yao *et al.* [84] zeigten, dass Kollagen selbst keine pro-angiogene Wirkung aufweist. Sie prüften unter anderem Schwämme aus Kollagen Typ-1 und konnten weder eine gesteigerte HUVEC Proliferation oder HUVEC Tube Formation noch eine gesteigerte Expression von VEGF in Co-Kultivierungs-Experimenten *in vitro* feststellen. Auch *in vivo* im CAM Angiogenese Assay zeigte sich in diesen Studien kein Einwachsen neuer Blutgefäße in die Kollagenschwämmchen [83, 84]. Insofern war in unseren Versuchsansätzen kein angiogener Effekt der verwendeten Kollagenbeschichtung zu erwarten.

Wurden die Kollagen-beschichteten Gerüststrukturen (45S5 Bioglass[®] oder textile Implantate) mit hASC biofunktionalisiert und im *in vivo* CAM Angiogenese Assay untersucht, konnte in jedem Fall eine erhöhte Anzahl an Blutgefäßen beobachtet werden, die in das Scaffoldmaterial einwuchsen. Zellfreie Kontroll-Scaffolds zeigten keine pro-angiogenen Reaktionen der CAM. Im Falle hASC-besiedelter Scaffolds konnten stets signifikant mehr Blutgefäße im Vergleich zu HF AST-besiedelten Scaffolds oder Zell-freien Gerüststrukturen ermittelt werden.

In diesem Zusammenhang kam die Frage auf, ob die beobachteten Reaktionen durch die von hASC sezernierten Wachstumsfaktoren ausgelöst wurden oder gar das Ergebnis eines Entzündungsprozesses der Chorioallantoismembran sind [53, 85]. Eine Möglichkeit, um diesen Sachverhalt zu überprüfen wäre z.B. eine umfangreiche histologische Analyse der Proben nach Inkubation auf der CAM. Aufgrund der Größe der Gerüststrukturen bzw. Implantate und des relativ geringen Anteils an CAM-Gewebe war es im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich, adäquate Semi-Dünnschnitte für die Histologie herzustellen. Beim Anfertigen der Dünnschnitte am Mikrotom löste sich das Polymer stets aus dem Schnitt heraus und beschädigte dabei umliegendes, evtl. eingewachsenes CAM-Gewebe so stark, dass eine weitere Analyse nicht mehr möglich war. Um dennoch im CAM Angiogenese Assay beobachtete pro-angiogene Effekt von hASC besiedelten Scaffolds zu untersuchen, wurden daraufhin in den folgenden Untersuchungen standardisierte *in vitro* Angiogenese-Testsysteme durchgeführt.

4.2.2 hASC-biofunktionalisierte Gerüststrukturen in *in vitro* Angiogenese Assays

Die mit hASC biofunktionalisierten Gerüststrukturen wurden *in vitro* mittels HUVEC Proliferationsassays und HUVEC Tube Formation Assays untersucht [80, 86]. Grundsätzlich reagieren in beiden Testsystemen die verwendeten primären Endothelzellen ausschließlich auf lösliche Faktoren im Zellkulturmedium. Im HUVEC Tube Formation Assay äußert sich dies beispielsweise in der Ausbildung tubulärer Strukturen. Je höher die Menge an pro-angiogenen Faktoren im Medium desto längere tubuläre Strukturen werden von den Endothelzellen ausgebildet [86].

45S5 Bioglass[®] und hASC im HUVEC Proliferationstest

Die pro-angiogenen Eigenschaften von 45S5 Bioglass[®] sowie hASC-konditioniertem Medium wurden mittels HUVEC Proliferationstests erfasst. Dazu wurden 45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds fein gemahlen und in unterschiedlicher Konzentration in DMEM-Basismedium aufgenommen. Um hASC-konditioniertes Zellkulturmedium zu generieren, wurde DMEM-Basismedium für 72 h auf einem Monolayer der humanen ASC konditioniert und anschließend unverzüglich im HUVEC Proliferationsassay eingesetzt.

HUVEC in DMEM-Basismedium mit 1 % gemahlenem 45S5 Bioglass[®] zeigten eine signifikant höhere Zellproliferation als HUVEC in DMEM-Basismedium mit geringerer Bioglass-Konzentration oder DMEM-Basismedium ohne Zusatz von 45S5 Bioglass[®]. Offenbar stimulierte das 45S5 Bioglass[®]-Pulver das Endothelzellwachstum. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die einen stimulierenden Effekt von 45S5 Bioglass[®] auf die Endothelzellproliferation bereits publizieren konnten [80, 87, 88].

Day *et al.* [87] zeigten beispielsweise, dass konditioniertes Medium von CCD-18Co Zellen (Ratten-Kolonkarzinom-Fibroblasten), die auf einer 45S5 Bioglass[®]-beschichteten Zellkulturoberfläche wuchsen, einen signifikanten Anstieg der HUVEC Proliferation innerhalb von 24 h bewirkte. Die CCD-18Co Zellen selbst zeigten auf der 45S5-Bioglass[®] beschichteten Oberfläche jedoch eine signifikante Reduktion vitaler Zellen.

In hASC-konditioniertem DMEM-Basismedium konnte eine zusätzliche, signifikante Steigerung der Endothelzellproliferation gemessen werden. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu den ersten CAM Angiogenese Assays, in denen allein durch 45S5 Bioglass[®]-basierte Scaffolds keine Reaktion der CAM hervorgerufen wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine nur unzureichende Freisetzung pro-angiogener Ionen, wenn komplette 3D Scaffolds auf die CAM aufgebracht wurden. Die Pulverisierung des Scaffoldmaterials führte zu einer enormen Vergrößerung der Oberfläche, was offenbar schneller und stärker Ionen in das Zellkulturmedium freisetzt, wodurch letztlich der beobachtete proliferative Effekt hervorgerufen wurde. Die signifikant höhere Proliferationsrate primärer HUVEC in hASC-konditioniertem Medium korrelierte dagegen mit den Ergebnissen der CAM Angiogenese Assays in denen

hASC-besiedelte Scaffolds verwendet wurden und kann höchstwahrscheinlich auf verschiedene Sekretionsprodukte humaner ASC (z.B. VEGF, bFGF) zurückgeführt werden [34, 56]. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden im Folgenden HUVEC Tube Formation Assays mit konditionierten Medien hASC-besiedelter Scaffolds durchgeführt und der VEGF-Gehalt dieser konditionierten Medien im VEGF-ELISA quantifiziert.

Korrelation von VEGF und HUVEC Tube Formation

Ein von vielen Arbeitsgruppen angewandtes *in vitro* Testsystem zur Untersuchung der Angiogenese ist der HUVEC Tube Formation Assay [86]. In diesem Test wird über die Fähigkeit primärer Endothelzellen tubuläre, kapillar-ähnliche Strukturen auf einer speziellen extrazellulären Matrix (MatrigelTM Basement Membrane Matrix) auszubilden, ein angiogenes Potenzial abgeleitet. In unserem Versuchsansatz wurden hASC subkonfluent in Wells einer Kollagenbeschichteten 96 Well Zellkulturplatte ausgesät und über 24 h mit der Prüfsubstanz (hier: hASC-konditioniertes DMEM-Basismedium) kultiviert.

Für dieses Experiment konnte gemahlene 45S5 Bioglass[®] leider nicht wie im HUVEC Proliferationsassay direkt appliziert werden, da eine mikroskopische Auswertung des Tests aufgrund der Adhäsion des 45S5 Bioglass[®]-Pulvers an die MatrigelTM-Beschichtung unmöglich war. Außerdem wurden die Zellen aufgrund der scharfen Kanten der 45S5 Bioglass[®]-Partikel stark geschädigt. Daher wurde im Folgenden mit einer indirekten Technik gearbeitet [80]. Dabei wurde zunächst Zellkulturmedium (DMEM-Basismedium) durch die entsprechend zu prüfenden TECs konditioniert und anschließend im HUVEC Tube Formation Assay eingesetzt.

In diesen Versuchsreihen zeigten sich stets signifikant mehr tubuläre Strukturen in konditioniertem Medium humaner ASC auf Herniennetzen als in konditioniertem Medium humaner ASC auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds. Die Ergebnisse des konditionierten Mediums humaner ASC auf Herniennetzen und des konditionierten Mediums humaner ASC in Monolayerkultur ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die Resultate weisen darauf hin, dass die Unterschiede der angiogenen Effekte humaner ASC auf verschiedenen Scaffolds offenbar durch Unterschiede in der Sekretion von Wachstumsfaktoren bedingt sind. Daher wurde zusätzlich

zum HUVEC Tube Formation Assay der VEGF-Gehalt der konditionierten Zellkulturmedien über einen VEGF-ELISA quantifiziert. Darin zeigte sich, dass konditioniertes Medium humaner ASC auf Herniennetzen eine signifikant höhere Menge VEGF enthielt als das konditionierte Medium humaner ASC, die auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds siedelten. Der gemessene Gehalt an VEGF in den konditionierten Medien korrelierte somit sowohl mit den Ergebnissen des HUVEC Tube Formation Assays, als auch mit der geringeren Zellproliferation humaner ASC auf 45S5 Bioglass[®]-basierten Scaffolds, verglichen mit humanen ASC auf biologisch inerten textilen Implantaten (Herniennetzen). Wie bereits erwähnt, beobachteten Day *et al.* [87] ähnliche Inhibitionen der Zellproliferation, nachdem sie Fibroblasten direkt auf 45S5 Bioglass[®] beschichteten Zellkulturoberflächen ansiedelten.

4.2.3 Fazit:

Einfluss humaner ASC auf die Induktion der Angiogenese von TECs

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die angiogenen Effekte der TECs sowohl im *in vivo* CAM Angiogenese Assay als auch im *in vitro* HUVEC Tube Formation Assay höchst wahrscheinlich durch lösliche Sekretionsfaktoren humaner ASC bedingt sind. Vieles spricht dafür, dass es sich hierbei um VEGF handelt. Dies wird durch die Ergebnisse des VEGF ELISA sowie die spezifische Inhibition der VEGF Expression über VEGF:siRNA unterstützt.

Da biologisch inerte Herniennetze aus Polypropylen als Kontrollmaterial genutzt wurden, kann die Freisetzung verschiedener Ionen aus 45S5 Bioglass[®] als angiogener Stimulus im CAM Angiogenese Assay vernachlässigt werden. Obwohl eine weithin akzeptierte These besagt, dass die Freisetzung der Ionen aus bioaktiven Glaskeramiken sowohl Osteogenese als auch Angiogenese-Prozesse induzieren [80], sind hier offensichtlich noch weitere detaillierte Untersuchungen nötig, um den angiogenen Effekt der Ionenfreisetzung zu bestätigen. Ebenfalls interessant wären Untersuchungen zu angiogenen Potenzialen weiterer bioaktiver Glaskeramiken, welche mit spezifischen pro-angiogenen Substanzen dotiert sind (z.B. Integration von Kupferionen).

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass Kombinationen spezifischer Scaffoldmaterialien mit geeigneten autologen Zellen ein vielversprechender

Ansatz für das Tissue Engineering in der Regenerativen Medizin darstellen. Aufgrund der pro-angiogenen und pro-proliferativen Sekretionsprodukte humaner ASC könnte in Zukunft die Verwendung dieser Zellen im Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin zu einer schnelleren Neovaskularisierung diverser Gewebeersatzkonstrukte beitragen. Die gute Korrelation der *in vivo* CAM Angiogenese-Ergebnisse mit den *in vitro* Daten bestätigt erneut, dass der CAM Angiogenese Assay ein geeignetes Testsystem zur Untersuchung pro-angiogener Effekte dreidimensionaler Implantate und TECs darstellt.

4.3 Humane ASC im "Adipose Tissue Engineering"

Anders als etablierte und standardisiert verwendete Fettreduktionsmethoden (z.B. Liposuktionen) stellt die Rekonstruktion von defektem subkutanem Fettgewebe noch immer eine Hürde in der Regenerativen Medizin dar. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit ein TEC aus humanen mesenchymalen Stammzellen (hASC) und textilen (Biopolymer-)Implantaten entwickelt werden, welches die Angiogenese anregt und *in vivo* subkutanes Fettgewebe *de novo* ausbildet. Das folgende Schema (Abb. 4.2) soll dies verdeutlichen.

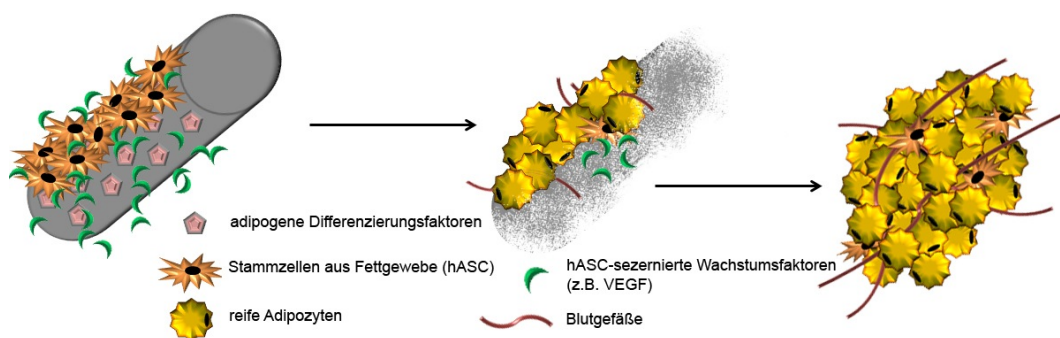


Abbildung 4.2: Schemazeichnung des angestrebten Fettgewebeersatzes. Durch die Immobilisierung humaner ASC soll eine VEGF-Sekretion am Implantationsort angeregt werden. Integrierte Differenzierungsfaktoren können währenddessen die adipogene Differenzierung humaner ASC induzieren. (Quelle: Marina Handel - Hohenstein Institute)

4.3.1 Sind hASC zur Anwendung "Adipose Tissue Engineering" geeignet?

Die Verwendung autologer Zellen im regenerativen Gewebeersatz ("Tissue Engineering"-basierte Ansätze) birgt aus medizinischer Sicht viele Chancen. Sie verspricht gute Biokompatibilität mit verringertem Risiko für Abstoßungsreaktionen [3] und bietet zugleich die Möglichkeit das Gewebewachstum durch den Einsatz spezieller Gerüststrukturen gezielt zu beeinflussen. Die Schlüsselfaktoren für eine erfolgreiche Anwendung von TECs in der Regenerativen Medizin umfassen [79]:

- die Verwendung eines optimalen (autologen) Zelltyps
- mit der Möglichkeit zur Isolierung großer Zellzahlen aus kleinen Mengen Gewebe
- mit nur kurzer oder bestenfalls keiner Kultivierung der primären Zellen *in vitro*
- Optimale Zelladhäsion und Zellvitalität auf bzw. in den entsprechenden Gerüststrukturen
- schnelle Neovaskularisierung der Implantate
- sowie (im Falle des "Adipose Tissue Engineering") die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung

hASC erfüllen sämtliche dieser Parameter. Sie können mit schnellen und unkomplizierten Methoden in großer Zahl aus einer kleinen Menge subkutanem Fettgewebe isoliert werden [33, 89]. Aufgrund der guten Proliferationsrate primärer humaner ASC und der Zellkultur wäre es theoretisch sogar möglich, hASC aus einer minimalinvasiven Gewebebiopsie zu isolieren und in Kultur zügig zu expandieren, um in kurzer Zeit eine ausreichende Zellzahl für den Fettgewebeersatz zu erzeugen. Ist die Entnahme größerer Mengen Fettgewebe möglich (z.B. aus subkutanem Bauchfett), so kann eine ausreichend große Zellzahl an hASC direkt nach Isolierung re-implantiert werden. Hierdurch könnte eine *in vitro* Kultivierung möglichst kurz gehalten, wenn nicht gar komplett vermieden werden, so dass spezifische Zellcharakteristika (z.B. Sekretion

pro-angiogener Wachstumsfaktoren oder adipogenes Differenzierungspotenzial) unbeeinflusst blieben [90].

4.3.2 Zelluläre Veränderungen durch *in vitro* Kultivierung humaner ASC

Entgegen dieser eher optimistischen Vorüberlegungen gibt es einige Entgegenhaltungen. So ist allgemein bekannt, dass Säugetierzellen in Zellkultur spezifische Charakteristika verändern oder sogar verlieren [90]. Um dies im Hinblick auf die *in vitro* Zelldifferenzierung von hASC zu berücksichtigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das adipogene Differenzierungspotenzial primärer hASC (Passage 1, P1) mit dem adipogenen Differenzierungspotenzial bereits kultivierter hASC (Passage 8, P8) verglichen. Dabei wurden hASC für 21 Tage in adipogenem Induktionsmedium kultiviert. Primäre hASC (P1) zeigten zu Beginn des Experiments eine Fibroblasten-ähnliche, langgestreckte Morphologie. P8-hASC zeigten im Vergleich zu P1-hASC eher stark vergrößerte Zellkörper und eine eher untypische und ungleichmäßige Morphologie. In Übereinstimmung mit der Studie von Izadpanah *et al.* [90] wurde in unseren Experimenten eine stark verlangsamte Proliferationsrate der P8-hASC beobachtet. Nach 21 Tagen Differenzierung in adipogenem Induktionsmedium zeigte die P1-hASC Kultur signifikant mehr adipogen differenzierte Zellen mit zytoplasmatischen Lipidvakuolen. Die parallel geprüfte P8-hASC Kultur wies dagegen nur sehr wenige Zellen mit zytoplasmatischen Speicherlipiden auf. Auch der Durchmesser dieser zytoplasmatischen Lipidvakuolen, ein Maß für den adipogenen Differenzierungsgrad [91], unterschied sich zwischen P1 und P8 hASC stark. So zeigten P1-hASC zusätzlich auch signifikant größere zytoplasmatische Lipidvakuolen als P8-hASC.

Diese Ergebnisse zeigen, dass hASC aufgrund längerer *in vitro* Kultivierung gewebespezifische Eigenschaften verlieren sowie spontan differenzieren. Bei längerer Kultivierung humaner ASC vor einer Transplantation wäre somit eine gezielt induzierte adipogene Differenzierung nicht mehr möglich. Um dennoch das adipogene Differenzierungspotenzial im Rahmen des "Adipose Tissue Engineering" optimal nutzen zu können, wurden in dieser Arbeit ausschließlich hASC < Passage 4 benutzt. Zur Anwendung *in vivo* d.h. als Fettgewebersatz sollte jedoch auf primäre Zellen mit möglichst kurzer oder, im besten Falle,

ohne weitere *in vitro* Kultivierung zurückgegriffen werden.

4.3.3 Genexpression während adipogener Differenzierung

Die adipogene Differenzierung ist ein genauestens regulierter zellulärer Prozess der im Körper durch verschiedene Zytokine (z.B. VEGF-A bis E oder PlGF) gesteuert wird [92]. *In vitro* kann dies durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF) [93] oder durch eine Supplementierung des Zellkulturmediums mit Dexamethason, Indomethazin, IBMX und Insulin erreicht werden [94, 95]. Die Kultivierung humaner ASC mit diesen Faktoren resultiert in der Induktion diverser Adipozyten-spezifischer Gene, im Speziellen dem Peroxysom-Proliferator aktivierten Rezeptor (PPAR). Neben weiteren Transkriptionsfaktoren inhibiert PPAR γ zugleich die Differenzierung der Vorläuferzellen in andere Zelltypen (z.B. Osteozyten oder Chondrozyten), fördert die adipogene Differenzierung und erhält im Weiteren den Differenzierungsstatus der Adipozyten. Daher gilt PPAR γ als Schlüsselfaktor der Adipogenese [91] und wird stets als Marker der adipogenen Differenzierung in Genexpressionsanalysen untersucht [8, 96–98].

Um den zeitlichen Verlauf der adipogenen Differenzierung unserer Zellkulturen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Expression von PPAR γ_2 , einer Splice-Variante von PPAR γ , während der 19-tägigen adipogenen Differenzierung *in vitro* an P1-hASC analysiert. PPAR γ_2 -mRNA konnte im Rahmen dieser *in vitro* Experimente ab dem 5. Differenzierungstag detektiert werden. Die Validität der qualitativen PCR zeigte sich in korrelierenden β -Aktin Amplifikaten.

Ferguson *et al.* [99] studierte den Einfluss von Referenzgenen auf die Normalisierung der Zielgene einer qualitativen PCR und beschrieb β -Aktin als ein Gen, welches während der adipogenen Differenzierung eine starke Varianz aufweist. Vor diesem Hintergrund scheint β -Aktin in diesem Experiment nicht die optimale interne Referenz darzustellen. Dennoch zeigt die schwächere Bandenintensität von β -Aktin am 19. Differenzierungstag (bei gleichbleibender Bandenintensität von PPAR γ_2) einen charakteristischen Prozess der adipogenen Differenzierung, da dies auf eine Abnahme der β -Aktin Expression hindeuten könnte.

Humane ASC, die eine Differenzierung in die adipogene Linie einschlagen, erfahren eine Vielzahl von Veränderungen. So kehrt sich z.B. die

Zellmorphologie aufgrund einer Reorganisation des Zytoskeletts von einer Fibroblasten-ähnlichen langgestreckten Zellform in eine kugelförmige Gestalt [91, 100]. Bereits 1982 konnten Spiegelmann und Farmer in Genexpressionsstudien zeigen, dass in adipogen differenzierenden Vorläuferzellen eine Abnahme der β -Aktin Expression um bis zu 90 % beobachtet wird [101]. Daher wurde β -Aktin in dieser Untersuchung nur indirekt als Referenzgen der qualitativen PCR herangezogen. Die Expression von β -Aktin stellt in diesem speziellen Fall vielmehr einen weiteren Indikator einer erfolgreichen adipogenen Differenzierung humaner ASC dar.

4.3.4 Dreidimensionale adipogene Differenzierung humaner ASC auf textilen Implantaten

Die 0,5 %ige Kollagen-haltige Beschichtung der Gerüststrukturen konnte in unseren Experimenten die Adhäsion humaner ASC auf verschiedenen Scaffoldmaterialien signifikant verbessern. In weiteren Versuchsansätzen wurden hASC nun in eine 0,5 % Kollagenlösung integriert und auf die faserbasierten Scaffolds aufgebracht, wodurch eine 3D Kultivierungsumgebung geschaffen wurde. Es ist bekannt, dass dreidimensionale Kultivierungsbedingungen eine adipogene Differenzierung humaner ASC begünstigen, da hierbei die physiologische (dreidimensionale) Morphologie der Adipozyten simuliert wird [102, 103].

Die Applikation der Stammzellen in einer Kollagenmatrix ergab eine gleichmäßigere Verteilung der hASC im Kollagen und somit auf/in den Gerüststrukturen. Bereits nach 10 Tagen Kultivierung in adipogenem Induktionsmedium zeigte sich eine klare Differenzierung der immobilisierten hASC, welche zu diesem Zeitpunkt bereits einige zytoplasmatische Lipidvakuolen aufwies. Nach 21 Tagen adipogener Differenzierung zeigten über 90 % der faser-gebundenen Zellen eine fortgeschrittene adipogene Differenzierung bis hin zu reifen univakuolären Adipozyten.

Eine Reihe von Studien beschäftigte sich mit der Induktion der adipogenen Differenzierung über die Zugabe diverser Faktoren (z.B. Dexamethason, Indomethazin, IBMX und Insulin oder bFGF) ins Zellkulturmedium [93]. So ist bereits bekannt, dass diese Differenzierungsfaktoren dazu führen, dass die gesamte Zellpopulation noch ein letztes Mal in die G1-Phase und die

folgende S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus eintritt, was zu einer letzten Zellteilung führt, bevor sie terminal in Adipozyten differenzieren [98]. Sowohl unreife (frühe) Adipozyten als auch reife Adipozyten verharren in der G0-Phase (Ruhephase) des Zellzyklus und teilen sich daher nicht mehr [91, 100, 104]. Ausserdem ist bekannt, dass Zellen in dreidimensionalen Matrizen per se eine geringere Proliferationsrate aufweisen als z.B. Zellen in Monolayer-Zellkultur [100, 104]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Befunde bestätigt werden: Die Zellzahlen auf den Implantaten blieben nach Induktion der adipogenen Differenzierung weitestgehend konstant.

Um künftig bei Weichgewebsrekonstruktionen größere Gewebedefekte mit Hilfe des "Adipose Tissue Engineering" behandeln zu können, ist es erforderlich dreidimensionale Zell-Scaffold Kombinationen zu entwickeln, die in ihrer Dicke etwa dem Unterhautfettgewebe entsprechen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zelladhäsion und Zelldifferenzierung auf bzw. in dickeren Faservliesen (sog. Nonwovens) ebenfalls untersucht. Nach der Besiedelung der Nonwovens mit hASC zeigten die Vorläuferzellen eine gleichmäßige Verteilung. Die Zellen wuchsen direkt an den Fasern, überspannten aber auch die Faser-Zwischenräume. Nach 21-tägiger Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium wiesen auch in diesem Versuchsansatz mehr als 90 % der Zellen zytoplasmatische Lipidvakuolen auf.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass hASC in Kombination mit textilen Scaffoldmaterialien selbst zur Behandlung größerer Fettgewebsdefekte genutzt werden könnten. Unsere Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass eine Zellzahl von etwa $2 \cdot 10^5$ hASC pro cm^2 Scaffold in jedem Fall sichergestellt werden sollte, um eine ausreichende Zelldichte auf bzw. in der Gerüststruktur zu erreichen.

4.3.5 Immobilisierung und Matrix-induzierte adipogene Differenzierung humaner ASC

Neben der Biologisierung von Scaffolds aus synthetischen Faserpolymeren wurden hASC auch in dem Biopolymer Alginat immobilisiert. Alginat ist ein natürliches Biopolymer mit sehr guter Biokompatibilität, das auch im Tissue Engineering zur Immobilisierung von Zellen genutzt werden [105]. Durch die schonenden Verarbeitungsmethoden können Zell-haltige Implantate

aus Alginat individuell und schnell geformt werden [106]. Therapeutische Vorteile bietet Alginat auch darin, dass das Polymer aufgrund seines non-vertebraten Ursprungs Risiken einer Abstoßungsreaktion verringert. Diese Vorzüge lassen vermuten, dass Alginatmatrices zur Immobilisierung autologer Zellen und Rekonstruktion dreidimensionaler Gewebestrukturen geeignet sind [106]. Jüngst konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation und Zellvitalität in Alginatkonstrukten über die Alginatkonzentration, Zelldichte und Polymerisationsdauer gesteuert werden kann [107]. Andere Studien zeigten, dass Alginat-verkapselte Zellen über die gesamte Kultivierungsdauer eine kugelförmige Morphologie aufwiesen, was unter anderem ein Faktor für ein verbessertes adipogenes Differenzierungspotenzial darstellen könnte [108]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Alginatmatrix zur Immobilisierung und Differenzierung humaner ASC entwickelt. Vor der Polymerisation wurde die Alginatlösung direkt mit adipogenen Differenzierungsfaktoren funktionalisiert. Nach Integration von hASC in die Alginatmatrix und anschließender Polymerisation im CaCl_2 -Fällbad konnte eine gleichmäßige Verteilung der Vorläuferzellen über das gesamte TEC beobachtet werden.

Ein weiteres Ziel bestand darin, bereits vor der Alginat-Polymerisation durch die Integration von Differenzierungsfaktoren in die Alginatlösung eine Supplementierung des Zellkulturmediums mit adipogenen Differenzierungsfaktoren zu umgehen. Daher wurden die mit Differenzierungsfaktoren dotierten Zell-Alginat-Konstrukte über 21 Tage in Minimalmedium kultiviert und anschließend die adipogene Differenzierung der immobilisierten hASC mittels NileRed-Färbung bewertet. Zell-Alginat-Konstrukte ohne Integration von Differenzierungsfaktoren zeigten erwartungsgemäß keine adipogene Differenzierung humaner ASC nach 21 Tagen. hASC, die in einer adipogenen Alginatmatrix (mit Differenzierungsfaktoren) immobilisiert und in Minimalmedium kultiviert wurden, zeigten dagegen eine fortschreitende adipogene Differenzierung der verkapselten Zellen. Dabei fanden sich hauptsächlich unreife Adipozyten mit unterschiedlich großen zytoplasmatischen Lipidvakuolen in der adipogenen Alginatmatrix. Wurde die Alginatlösung mit doppelt konzentrierten Differenzierungsfaktoren versetzt, so verstärkte sich dieser Effekt. Nach 21-tägiger Kultivierung waren die immobilisierten hASC in reife Adipozyten

mit einer großen Lipidvakuole differenziert.

4.3.6 Fazit:

TECs im "Adipose Tissue Engineering"

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Ansicht, dass eine Scaffold-basierte adipogene Differenzierung humaner ASC für das Adipose Tissue Engineering von Weichteilrekonstruktionen möglich wäre. Die hier gezeigte Vorgehensweise zur Herstellung autonomer TECs nutzt vorteilhaft die Isolierung humaner ASC aus patienteneigenem Fettgewebe und deren sofortige Immobilisierung in eine adipogene Alginatmatrix. Die adipogene Differenzierung würde somit direkt *post transplantationem* im Körper des Patienten induziert und könnte in ihrem Verlauf durch körpereigene Kontrollmechanismen weiter reguliert werden, was die Zeitspanne bis zu einer möglichen Operation deutlich verkürzen und die Bereitstellung der erforderlichen Gewebeersatzstrukturen somit vereinfachen würde.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurden patienteneigene Stammzellen aus Fettgewebe isoliert, um Gerüststrukturen so zu besiedeln, dass sie einen Patienten-spezifischen Weichgewebeersatz bilden. Dabei zeigte sich, dass Scaffold-gebundene hASC die Neovaskularisierung von Zell-Scaffold-Konstrukten positiv beeinflussen. Da die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF bei fortschreitender adipogener Differenzierung humaner ASC auf den Scaffolds abnimmt, zeigt die Verwendung nativer, undifferenzierter hASC sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im CAM Angiogenese Assay das größte Potenzial zur Gefäßneubildung. In einem weiteren Ansatz wurden die hASC in das Biopolymer Alginat eingebettet, in welchem Differenzierungsfaktoren enthalten waren. Der Vorteil dieser Scaffold-induzierten adipogenen Differenzierung liegt für Patient und Chirurg darin, dass hierzu native hASC ohne *in vitro* Kultivierungsprozesse implantiert werden könnten.

Die optimale Strategie zur Herstellung eines adäquaten Fettgewebeersatzes muss jedoch von Spezialisten der Plastischen und Regenerativen Medizin im Rahmen weiterer Klein- und Großtierstudien erarbeitet und verfeinert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Sameem M. et al. A systematic review of complication and recurrence rates of musculocutaneous, fasciocutaneous, and perforator-based flaps for treatment of pressure sores. *Plast Reconstr Surg*, 130(1):67e–77e, 2012.

- [2] Mat Saad A. Z. et al. Soft tissue reconstruction following hemipelvectomy: eight-year experience and literature review. *ScientificWorldJournal*, (702904):9, 2012.

- [3] Conway H. et al. Tom gibson, plastic surgeon (1915-93): Allograft rejection by the immune system and prediction of free tissue transplantation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 65(11):1447–50, 2012.

- [4] Smahel J. Adipose tissue in plastic surgery. *Ann Plast Surg*, 16(5):444–53, 1986.

- [5] Fischer-Posovszky P. and Wabitsch M. Entwicklung und Funktion des Fettgewebes. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 152(8):834–842, 2004.

- [6] Ludvik B. Viszerale Adipositas, Adipokine und Diabetes. 2008.

- [7] Bunnell B.A. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2):115–120, 2008.

- [8] Chawla A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)

- gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 135(2):798–800, 1994.
- [9] Deng M. C. et al. Effect of receiving a heart transplant: analysis of a national cohort entered on to a waiting list, stratified by heart failure severity. Comparative Outcome and Clinical Profiles in Transplantation (COCPIT) Study Group. *BMJ*, 321(7260):540–5, 2000.
- [10] Vollmar A. M. and Gerbes A. L. Historie und Status quo der Transplantationsmedizin: 50 Jahre Organtransplantation haben die Medizin nachhaltig verändert. *Pharmazie in unserer Zeit*, 34(4):262–267, 2005.
- [11] Sung H.W. et al. Degradation potential of biological tissues fixed with various fixatives: an in vitro study. *J Biomed Mater Res*, 35(2):147–55, 1997.
- [12] Sung H.W. et al. Effects of various chemical sterilization methods on the crosslinking and enzymatic degradation characteristics of an epoxy-fixed biological tissue. *J Biomed Mater Res*, 37(3):376–83, 1997.
- [13] Billings E. and May J. W. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plastic and reconstructive surgery*, 83(2):368–381.
- [14] Kaufman M.R. et al. Autologous fat transfer for facial recontouring: is there science behind the art? *Plast Reconstr Surg*, 119(7):2287–96, 2007.
- [15] Alhadlaq A. et al. Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction. *Tissue Eng*, 11(3-4):556–66, 2005.

- [16] von Heimburg D. et al. Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir Physiol Neurobiol*, 146(2-3):107–16, 2005.
- [17] Sterodimas A. et al. Tissue engineering in plastic surgery: an up-to-date review of the current literature. *Ann Plast Surg*, 62(1):97–103, 2009.
- [18] Choi J.H. et al. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B*, 16(4):413–26, 2010.
- [19] Sterodimas A. et al. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (adscs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63(11):1886–92, 2010.
- [20] Tabata Y. et al. De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng*, 6(3):279–89, 2000.
- [21] Patrick C.W. Jr. Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *Anat Rec*, 263(4):361–6, 2001.
- [22] Wu X. et al. Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 81(1):59–65, 2007.
- [23] Tuzlakoglu K. et al. Production and characterization of chitosan fibers and 3-d fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. *Macromol Biosci*, 4(8):811–9, 2004.
- [24] Tuzlakoglu K. and R.L. Reis. Biodegradable polymeric fiber structures in tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 15(1):17–27, 2009.
- [25] Taylor M. S. et al. Six bioabsorbable polymers: in vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *J Appl Biomater*, 5(2):151–7, 1994.

- [26] Hunt N. C. and Grover L. M. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnol Lett*, 32(6):733–42, 2010.
- [27] Ghidoni I. et al. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology*, 58(1):49–56, 2008.
- [28] Wikipedia. Alginsäure. 2012.
- [29] Khor E. and Lim L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13):2339–49, 2003.
- [30] Wang J. et al. Research of the degradation products of chitosan's angiogenic function. *Applied Surface Science*, 255(2):260–262, 2008.
- [31] Heinemann C. et al. In vitro osteoclastogenesis on textile chitosan scaffold. *Eur Cell Mater*, 19:96–106, 2010.
- [32] Locke M. et al. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*, 79(4):235–44, 2009.
- [33] Yang X. F. et al. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 18(1):59, 2011.
- [34] H.M. et al. Chung. Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opin Biol Ther*, 9(12):1499–508, 2009.
- [35] R. Ogawa. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*, 1(1):13–20, 2006.
- [36] Chen Y. et al. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(5):815–20, 2008.

- [37] Jabbarzadeh E. et al. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(32):11099–104, 2008.
- [38] Costa-Pinto A.R. et al. Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (bmc9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3d porous scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 14(6):1049–57, 2008.
- [39] Sundelacruz S. and Kaplan D.L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol*, 20(6):646–55, 2009.
- [40] Unger R.E. et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials*, 31(27):6959–67, 2010.
- [41] Xu Y. et al. Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr Opin Mol Ther*, 7(4):300–5, 2005.
- [42] Bauer-Kreisel P. et al. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(7-8):798–813, 2010.
- [43] Gimble J.M. et al. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther*, 1(2):19, 2010.
- [44] Gimble J.M. et al. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100(9):1249–60, 2007.
- [45] Kimura Y. et al. Adipose tissue engineering based on human

- preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 24(14):2513–21, 2003.
- [46] Rada T. et al. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part B*, 15(2):113–125, 2009.
- [47] Dubois S.G. et al. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol Biol*, 449:69–79, 2008.
- [48] Brown L. F. et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, 3(2):211–20, 1992.
- [49] Kajdaniuk D. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol*, 62(5):444–55, 2011.
- [50] Hiroyuki Takahashi and Masabumi Shibuya. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109:227–241, 2005.
- [51] Taniyama Y. et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther*, 8(3):181–9, 2001.
- [52] Simons M. et al. Therapeutic angiogenesis: potential role of basic fibroblast growth factor in patients with severe ischaemic heart disease. *BioDrugs*, 14(1):13–20, 2000.
- [53] Domenico Ribatti. Chorioallantoic membrane vasculature. In *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis*, pages 1–15. Springer Netherlands, 2010.

- [54] Domenico Ribatti. Chorioallantoic membrane vasculature. In *Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis, Antiangiogenesis, and the Vascularization of Grafted Tissues*, pages 17–39. Springer Netherlands, 2010.
- [55] Hilmi C. et al. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids*, (162692), 2012.
- [56] Lee E.Y. et al. Hypoxia-enhanced wound healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and upregulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*, 17(4):540–7, 2009.
- [57] Brown L. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*, 79:233–69, 1997.
- [58] Yancopoulos G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801):242–8, 2000.
- [59] Tabata Y. et al. Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*, 10(1):79–94, 1999.
- [60] Tabata Y. and Ikada Y. Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials*, 20(22):2169–75, 1999.
- [61] Tabata Y. et al. Vascularization into a porous sponge by sustained release of basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*, 10(9):957–68, 1999.
- [62] Tabata Y. et al. Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng*, 5(2):127–38, 1999.

- [63] Pandit A. et al. Investigation of acidic fibroblast growth factor delivered through a collagen scaffold for the treatment of full-thickness skin defects in a rabbit model. *Plast Reconstr Surg*, 101(3):766–75, 1998.
- [64] Pandit A. et al. In vivo wound healing response to a modified degradable fibrin scaffold. *J Biomater Appl*, 12(3):222–36, 1998.
- [65] Pandit A. et al. Stimulation of angiogenesis by fgf-1 delivered through a modified fibrin scaffold. *Growth Factors*, 15(2):113–23, 1998.
- [66] Kedem A. et al. Vascular endothelial growth factor-releasing scaffolds enhance vascularization and engraftment of hepatocytes transplanted on liver lobes. *Tissue Eng*, 11(5-6):715–22, 2005.
- [67] Avian Sciences Purdue University. Chicken classroom. 2012.
- [68] Starck J.M. Embryonic growth and development. In *Avian Growth and Development: Evolution within the Altricial-Precocial Spectrum*. Oxford University Press, USA, 1998.
- [69] Domenico Ribatti. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. *Pharmaceuticals*, (6):482–513, 2010.
- [70] Fontaine-Perus J. et al. Origin and development of vip and substance p containing neurons in the embryonic avian gut. *Histochemistry*, 71(3):313–23, 1981.
- [71] De Bari C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44(8):1928–42, 2001.
- [72] Chen Y. et al. Identification and regulation of novel ppar-gamma splice variants in human thp-1 macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 1759(1-2):32–43, 2006.

- [73] Takei Y. et al. A small interfering rna targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res*, 64(10):3365–70, 2004.
- [74] Darmstadt Invitrogen Life Technologies. Stempro®- human adipose-derived stem cell kit. 2012.
- [75] S. P. Crampton, J. Davis, and C. C. Hughes. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *J Vis Exp*, (3):183, 2007.
- [76] Saiki R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase. *Science*, 239(4839):487–91, 1988.
- [77] Bej A. K. et al. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (pcr) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 26(3-4):301–34, 1991.
- [78] Ribatti M. et al. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assays. *Nat Prot*, 1(1):85–91, 2006.
- [79] Novosel E. et al. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(4-5):300–11, 2011.
- [80] Hoppe A. et al. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11):2757–74, 2011.
- [81] Vargas G.E. et al. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45s5 bioglass-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos. *Acta Biomater*, 5(1):374–80, 2009.
- [82] Gorustovich A.A. et al. Novel bioassay to evaluate biocompatibility of bioactive glass scaffolds for tissue engineering. *Advances in Applied Ceramics*, 107(5):274–276, 2008.

- [83] Leu A. and Leach J.K. Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharm Res*, 25(5):1222–9, 2008.
- [84] Yao C. et al. The effect of cross-linking of collagen matrices on their angiogenic capability. *Biomaterials*, 29(1):66–74, 2008.
- [85] Oates M. et al. The angiogenic potential of three-dimensional open porous synthetic matrix materials. *Biomaterials*, 28(25):3679–86, 2007.
- [86] Arnaoutova I. et al. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 12(3):267–74, 2009.
- [87] Day R.M. et al. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng*, 11(5-6):5857–66, 2005.
- [88] Gorustovich A.A. et al. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Eng Part B Rev*, 16(2):300–11, 2010.
- [89] Danoviz M. E. et al. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. *Stem Cells Dev*, 20(4):661–70, 2008.
- [90] Izadpanah R. et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res*, 68(11):4229–38, 2008.
- [91] Zhang Y. et al. Mechanisms underlying the osteo- and adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Sci World J*, 793823, 2012.
- [92] Yamasaki S. et al. Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. *Rheumatology (Oxford)*, 43(4):448–52, 2004.

- [93] Neubauer M. et al. Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor in vitro. *Tissue Eng*, 11(11-12):840–51, 2005.
- [94] Pansky A. et al. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab*, 53(1-2):81–4, 2007.
- [95] Ninomiya Y. et al. Development of a rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(2):303–8, 2010.
- [96] Lazar M. et al. PPAR gamma, 10 years later. *Biochimie*, 87(1):9–13, 2005.
- [97] Tamori Y. et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 51:2045–55, 2005.
- [98] Farmer S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 4:263–73, 2006.
- [99] Ferguson B.S. et al. Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in adipocytes. *PLoS ONE*, 5(12):e15208, 2010.
- [100] Hausman D. B. et al. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*, 2(4):239–54, 2001.
- [101] Spiegelman B.M and Farmer S.R. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*, 29(1):53–60, 1982.
- [102] Wang W. et al. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 30(14):2705–15, 2009.

- [103] Daya S. et al. Culture and differentiation of preadipocytes in two-dimensional and three-dimensional in vitro systems. *Differentiation*, 75(5):360–70, 2007.
- [104] Smyth M. J. et al. Preadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. *J Cell Sci*, 106 (Pt 1):1–9, 1993.
- [105] Lee J. et al. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev*, 14(1):61–86, 2008.
- [106] Petrulyte S. Advanced textile materials and biopolymers in wound management. *Dan Med Bull*, 55(1):72–7, [2008].
- [107] Bohari S. P. et al. Effect of calcium alginate concentration on viability and proliferation of encapsulated fibroblasts. *Biomed Mater Eng*, 21(3):159–70, 2011.
- [108] Rowley J. A. et al. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1):45–53, 1999.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Dirk Höfer für die Überlassung der Aufgabenstellung, die stete Bereitschaft zur Diskussion, die ermöglichten Freiräume, die fachliche Betreuung und sein Interesse am Thema dieser Arbeit.

Herr Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung während der gesamten Promotion.

Mein besonderer Dank gilt dem gesamten Team des Fachbereichs Hygiene, Umwelt & Medizin an den Hohenstein Instituten in Bönningheim für all die guten Ideen, die Unterstützung und Motivation im Laboralltag.

Im besonderen gilt dieser Dank Dr. Anja Gerhardts, Nadja Berner und Dr. Timo Hammer, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten und durch viele Diskussionen, Anregungen und Ideen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem danke ich Julia Seeberg und ihrem jüngsten Sohn Tom für die großzügige Nabelschnur- und Zellspende, ohne die ich viele Experimente nicht hätte vollenden können.

Der größte Dank geht an meinen Ehemann Rainer Handel, meine Eltern, Schwiegereltern, Geschwister und Freunde, die mich während der gesamten Zeitdauer meiner Promotion unterstützt und motiviert sowie mit Interesse und vor allem viel Geduld begleitet haben.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Marina Handel, geb. Müller
geboren am	11.03.1986 in Heilbronn
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet
Ehemann	Rainer Handel, 24.01.1983
Eltern	Birgit Müller, geb. Frank, 01.11.1960 Ulrich Müller, 12.10.1956

Ausbildung

2010 - 2012	Externe Promotion (Dr. rer. nat.) Universität Stuttgart, Institut für Zellbiologie und Immunologie Hohenstein Institute, Fachbereich Hygiene, Umwelt & Medizin Schwerpunkte: Zellbiologie, Angiogenese, Biomaterialien
2008 - 2010	Studium Biomedical Engineering (M.Sc.) Hochschule Albstadt-Sigmaringen Schwerpunkte: Zellbiologie, Immunologie, molekulare Genetik

2005 - 2008 Studium Bioinformatik (B.Sc.)
Eberhardt Karls Universität Tübingen
Schwerpunkte: Informatik, Immunologie, pharmazeutische Biologie

Beruflicher Werdegang

01/2013 - heute

Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Hohenstein Institute, Fachbereich Hygiene, Umwelt & Medizin
Schwerpunkte: Projektleitung, Drittmittelaquise,
Vorlauftforschung, Etablierung neuer Dienstleistungen im Bereich
Zell- & Molekularbiologie

10/2010 - 12/2012

Wissenschaftliche Mitarbeiterin & Promotion
Hohenstein Institute, Fachbereich Hygiene, Umwelt & Medizin
"Entwicklung eines autologen Fettgewebeersatzes mit angiogenen
Eigenschaften auf Basis einer adipogenen Alginatematrix in
Kombination mit humanen mesenchymalen Stammzellen"

02/2010 - 09/2010

Masterthesis
Hohenstein Institute, Fachbereich Hygiene, Umwelt & Medizin
"Untersuchungen zum Wachstumsverhalten mesenchymaler
Stammzellen auf bioresorbierbaren Textilimplantaten im
3D-Hautmodell und deren Einfluss auf die Wundheilung"

09/2009 - 02/2010

Forschungs- / Praxissemester
Hohenstein Institute, Fachbereich Hygiene, Umwelt & Medizin
Bearbeitung des AiF-Forschungsprojekts 16067 N
"Entwicklung von Schnellnachweisen für Pressen- und
Prozesswasserkeime aus gewerblichen Wäschereien im Rahmen
betrieblicher Eigenkontrollen"