

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Parakrine Kommunikation von primären Fibroblasten und endothelialen Progenitorzellen im
Kontext der Prävaskularisierung komplexer Gewebeäquivalente

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Clara Yolanda Elisabetta Bader geb. Haslbauer
aus Stuttgart

Mainz 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Tissue Engineering	3
2.2 Vaskularisierung.....	5
2.2.1 Aufbau eines Gefäßes	5
2.2.2 Vaskulogenese	6
2.2.3 Angiogenese	7
2.3 Prävaskularisierung von <i>in vitro</i> generiertem Gewebe	9
2.3.1 Endothelzellen für die Prävaskularisierung von Gewebeäquivalenten	9
2.4 Endotheliale Progenitorzellen.....	11
2.5 Einfluss der untersuchten Zytokine auf die Vaskularisierung	12
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Chemikalien	17
3.1.2 Kits	17
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	17
3.1.4 Gebrauchsmaterialien.....	17
3.1.5 Geräte	18
3.2 Methoden	18
3.2.1 Isolation der Fibroblasten	18
3.2.2 Isolation der endothelialen Vorläuferzellen.....	18
3.2.3 Kultur der Zellen	19
3.2.4 Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter ELISA	20
4 Ergebnisse	23
4.1 Einfluss der Kokultivierung auf die Zytokin-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten.....	23
4.1.1 Ang-2	23
4.1.2 VEGF, IL-8, eNOS und bFGF.....	25

4.2	Einfluss der Kollagenmembran auf die Zytokin-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur	31
4.2.1	VEGF	31
4.2.2	IL-8	33
4.2.3	eNOS	35
4.2.4	bFGF	37
4.2.5	Ang-2	39
4.3	Vergleich des Sekretionsverhalten von HDMEC und ECFC	41
4.3.1	VEGF	41
4.3.2	IL-8	44
4.3.3	eNOS	47
4.3.4	bFGF	50
4.3.5	Ang-2	53
4.4	Zytokin-Sekretion im Rahmen der Prävaskularisierung eines Schleimhautäquivalentes unter Verwendung von HDMEC oder ECFC	56
5	Diskussion	58
5.1	Humorale Interaktion von Fibroblasten und ECFC	58
5.2	Einsatz von ECFC in der Prävaskularisierung von komplexen Gewebeäquivalenten	61
5.3	Abschließende Bewertung	69
6	Zusammenfassung	70
7	Literaturverzeichnis	72
8	Anhang – Werte der Abbildungen	80
9	Danksagung	89
10	Lebenslauf	90

Abkürzungsverzeichnis

Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CFU-EC	<i>colony-forming-unit endothelial cell</i>
CAC	<i>circulating angiogenic cells</i>
CXCR	Interleukin-8 Rezeptor
DBPS	<i>dulbeccos phosphate buffered Saline</i>
ECFC	<i>endothelial colony forming cell</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzym linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	<i>endothelial progenitor cell</i>
HDMEC	<i>human dermal microvascular endothelial cell</i>
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
HUVEC	<i>human umbilical-vein endothelial cell</i>
IL-8	Interleukin 8
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	Rezeptor des VEGF

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip des <i>Tissue Engineerings</i> mittels <i>cell seeding</i>	4
Abbildung 2: Dreischichtiger Aufbau eines Gefäßes	6
Abbildung 3: Vaskulogenese	7
Abbildung 4: Sprossende Angiogenese	8
Abbildung 5 Intussuzepives Wachstum	8
Abbildung 6: Einfluss der untersuchten Zytokine auf die postnatale Vaskulogenese	15
Abbildung 7: Einfluss der untersuchten Zytokine auf die Angiogenese	16
Abbildung 8: Insert-System	20
Abbildung 9: Durchführung ELISA	22
Abbildung 10: Ang-2-Sekretion durch Fibroblasten in Mono- und Kokultur	24
Abbildung 11: Ang-2-Sekretion durch ECFC in Mono- und Kokultur	24
Abbildung 12: Zytokin-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten jeweils in Monokultur im Well.....	26
Abbildung 13: Zytokin Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt	28
Abbildung 14: Zytokin Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur im Insert-System mit Kontakt	30
Abbildung 15: VEGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt	31
Abbildung 16: VEGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt	32
Abbildung 17: IL-8-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt	33
Abbildung 18: IL-8-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt	34
Abbildung 19: eNOS-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt	35
Abbildung 20: eNOS-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt	36
Abbildung 21: bFGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt	37
Abbildung 22: bFGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt	38
Abbildung 23: Ang-2-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt	39
Abbildung 24: Ang-2-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt	40
Abbildung 25: VEGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran	41

Abbildung 26: Vergleich der VEGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen .	43
Abbildung 27: IL-8-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran	44
Abbildung 28 Vergleich der IL-8-Sekretion durch HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen	46
Abbildung 29: eNOS-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran	47
Abbildung 30: Vergleich der eNOS-Sekretion von HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen	49
Abbildung 31: bFGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran	50
Abbildung 32: Vergleich der bFGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen .	52
Abbildung 33. Ang-2-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran	53
Abbildung 34: Vergleich der Ang-2-Sekretion von HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen....	55
Abbildung 35: Zytokin-Sekretion durch Endothelzellen und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zytokin-Sekretion der unterschiedlichen Endothelzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	62
---	----

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Das Gebiet des *Tissue Engineering* beschäftigt sich mit der *in vitro*-Generierung von Geweben. Mittels einer Biopsie werden einem Patienten lebende Zellen entnommen. Diese werden kultiviert, um aus ihnen ein Gewebe herzustellen. Dieses aus seinen eigenen Zellen hergestellte Gewebe kann dem Patienten reimplantiert werden, um beispielsweise eine Verletzung abzudecken (Berthiaume et al., 2011). Da hierfür lediglich Zellen benötigt werden und keine größeren Gewebe, kann dem Patienten ein chirurgischer Eingriff zur Gewebegewinnung erspart werden. Ein chirurgischer Eingriff geht mit Risiken wie Schmerzen, Wundheilungsstörungen und Sensibilitätsverlust einher. Daher ist es für den Patienten von Vorteil, wenn er diesem entgehen kann. Durch diesen Vorteil gilt aus *Tissue Engineering* gewonnenes Gewebe als vielversprechende Alternative für autologe Transplantate.

Ein *in vitro* generiertes Gewebe, das einen klinischen Nutzen haben soll, muss eine gewisse Größe aufweisen. Wenn es gelingt, ein ausreichend großes Gewebe herzustellen, muss dieses mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Die Versorgung hiermit erfolgt über die Durchblutung (Ko et al., 2007). Unterbleibt diese, stirbt das Gewebe ab und es kommt zu Nekrosen. Die Lösung und gleichzeitig Herausforderung stellt die Prävaskularisierung des Gewebes *in vitro* dar: Wenn schon in der Herstellung des Gewebes Gefäße entstehen, kann dem Patienten ein Material implantiert werden, das bereits ein funktionierendes Gefäßnetz enthält. Dieses muss sich nur noch mit dem bestehenden Gefäßsystem des Patienten verbinden (Kim et al., 2016). Damit wird die Zeit, in der das Gewebe ohne Nährstoffversorgung ist, verkürzt und die Chance zu überleben erhöht.

In Vorarbeiten der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Brenner ist es bereits gelungen, ein prävaskularisiertes komplexes Schleimhautäquivalent zu generieren. Auch die Anbindung an das Gefäßsystem *in vivo* war erfolgreich (Schulze, 2016, Bauer, 2017, Heller et al., 2016). Dies erfolgte in unterschiedlichen Kulturen von oralen Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen auf einer Kollagenmembran. Die Endothelzellen sind in den Kokulturen notwendig, damit Gefäße entstehen können. In diesen Versuchen wurden humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) verwendet, die aus Vorhaut gewonnen wurden. Da diese Zellen für die Verwendung in der Gynäkologie nicht geeignet sind, erfolgten bereits Versuche mit endothelialen Progenitorzellen (EPC). Diese haben gegenüber den HDMEC den

Vorteil, dass sie aus peripherem Blut gewonnen werden können. Dadurch ist für Patienten nur eine venöse Blutentnahme notwendig und sie können Anwendung in der Gynäkologie finden.

Während der Entstehung von Gefäßen kommunizieren die einzelnen Zellen über die Sekretion von sogenannten Zytokinen miteinander. Diese Zytokine beeinflussen sowohl das Wachstum der Zelle selbst als auch das der benachbarten Zellen (autokrin und parakrin) (Neufeld and Kessler, 2006). Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung der Zellkulturüberstände von verschiedenen Kulturen aus endothelialen Vorläuferzellen und Fibroblasten auf ihre sezernierten Zytokine. Hieraus erhofft man sich neue Erkenntnisse zur zellulären Kommunikation dieser Zellen im Rahmen der Vaskularisierung

Da die endothelialen Vorläuferzellen eine vielversprechende Alternative zu den HDMEC darstellen, wird das Sekretionsverhalten dieser beiden Zellarten miteinander verglichen. Möchte man die HDMEC auf Dauer durch endotheliale Vorläuferzellen ersetzen, muss man das sekretorische Verhalten der Zellen verstehen. Ein besseres Verständnis der zellulären Kommunikation und der Eigenschaften von endothelialen Vorläuferzellen ermöglicht die Optimierung der Prävasikularisierung von in *Tissue Engineering* generierten Geweben.

2 Literaturdiskussion

2.1 Tissue Engineering

Tissue Engineering bezeichnet ein Verfahren, das zur *in vitro*-Herstellung eines physiologischen Gewebes aus lebenden Zellen dient. Damit möchte man Gewebedefekte, die durch Krankheiten, Verletzungen oder Operationen entstehen können, im Heilungsprozess unterstützen und rekonstruieren. Bisher musste man solche Gewebedefekte mit Transplantaten, die entweder von einem Spender oder vom Patienten selbst (autolog) stammten, versorgen. Die Transplantatgewinnung erfolgt mittels eines chirurgischen Eingriffs, der Risiken birgt und es besteht die Gefahr einer Narbenbildung. Bei der Verwendung von Fremdmaterial ist man zusätzlich auf einen Spender angewiesen und es besteht die Gefahr einer Abstoßungsreaktion durch den Empfänger (Langer and Vacanti, 1993).

Dieser Problematik möchte man durch das *Tissue Engineering* entgehen. Dafür werden dem Patienten mittels einer Biopsie Zellen entnommen. Diese Zellen werden nach der Entnahme vermehrt und durch verschiedene technische Verfahren entstehen daraus funktionsfähige Gewebe. Dieses Gewebe wird dem Patienten zur Defektdeckung transplantiert (Abb. 1). Damit kann man dem Patienten einen Eingriff zur Gewebegewinnung ersparen und einer Abstoßungsreaktion entgehen, da körpereigene Zellen eingesetzt werden (Berthiaume et al., 2011).

Um aus den kultivierten Zellen ein vollständiges Gewebe zu erhalten, gibt es verschiedene technische Ansätze: Eine Möglichkeit ist die Generierung von Spheroïden. Hierbei werden unterschiedliche Zellarten in einer bestimmten 3D-Kultur in Kontakt gebracht und bilden dadurch runde Zellansammlungen aus. Durch die Form haben die Zellen engen Kontakt miteinander und imitieren die *in vivo*-Bedingungen (Buno et al., 2016). Bei der *cell sheet* Technik werden einfache Lagen von Zellen kultiviert. Nach einer gewissen Zeit werden mehrere dieser Lagen übereinandergelegt, wodurch man ein mehrschichtiges Gebilde erhält (Cerqueira et al., 2014). Die für diese Arbeit relevante Technik ist die des *cell seedings* (Abb. 1). Hierbei werden Zellen nach der Isolation und Proliferation auf ein Gerüst aus Kollagen, das sogenannte *Scaffold*, ausgesät. Das *Scaffold* imitiert die extrazelluläre Matrix (EZM). Durch chemische und mechanische Stimulation entsteht aus den Zellen auf dem Kollagengerüst ein funktionsfähiges Gewebe. Dieses kann den Patienten, von dem die Zellen isoliert wurden,

implantiert werden (Abb. 1). Der Vorteil an dieser Technik ist die bereits bestehende 3D-Struktur des *Scaffolds* (Laschke and Menger, 2016).

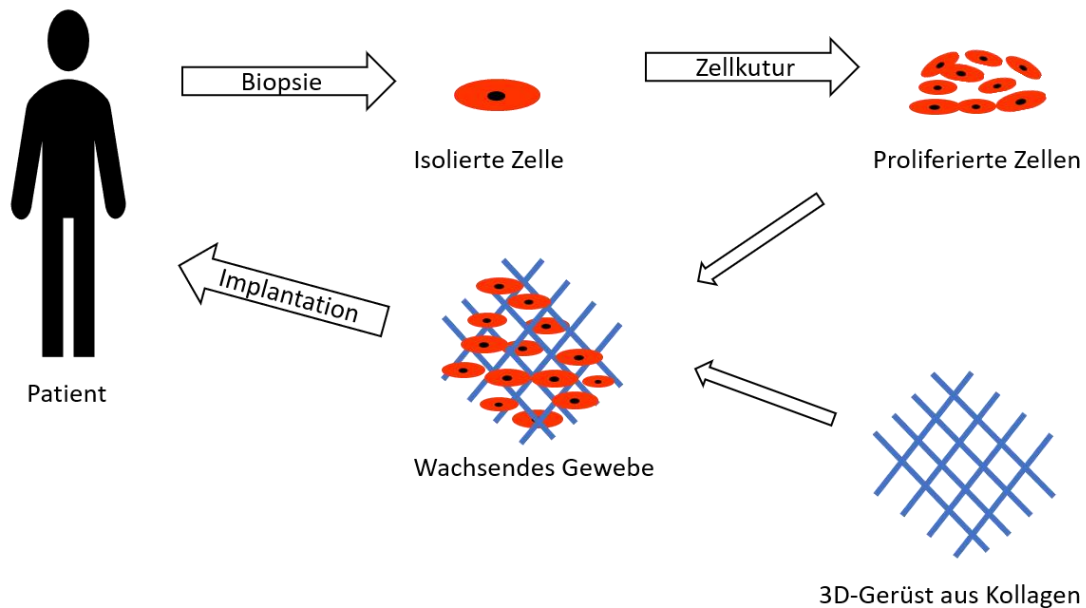


Abbildung 1: Prinzip des *Tissue Engineerings* mittels *cell seeding*

Einem Patienten, der einen Gewebedefekt aufweist, wird eine Biopsie entnommen, aus der Zellen isoliert werden. Diese Zellen werden kultiviert und vermehrt. Nach der Proliferation werden sie auf ein Gerüst aus Kollagen gegeben. Durch mechanische und chemische Stimulation entsteht ein funktionsfähiges Gewebe, das dem Patienten zur Defektdeckung reimplantiert wird. Modifiziert nach Asadian et al. (Asadian, 2020).

Der Begriff *Tissue Engineering* ist seit 1987 etabliert, auch wenn bereits vorher Versuche auf diesem Gebiet erfolgten. So arbeitete man seit den 1970er Jahren daran, Hautersatz herzustellen, der bei Verletzungen oder Verbrennungen die Wunde abdecken sollte. Mittlerweile gibt es eine große Anzahl verschiedener Hautersätze, die klinisch verwendet werden (Kaul and Ventikos, 2015). Auch Schleimhaut, insbesondere orale Schleimhaut, stellt einen Fokus der Forschungen im *Tissue Engineering* dar. Sie spielt unter anderem in der Gynäkologie und der Urologie eine wichtige Rolle für die Abdeckung von Gewebedefekten (Caldamone et al., 1998, Chan et al., 2017). Um den Patienten die Entnahme großer Teile Schleimhaut aus dem Mund zu ersparen und damit verbundene Risiken zu minimieren, gibt es bereits erfolgreiche Verfahren, mittels *Tissue Engineering* hergestellte Schleimhaut zu verwenden (Barbagli et al., 2018).

Auch die Versuche unserer Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit der Generierung von Schleimhautäquivalenten, wobei der Schwerpunkt auf der Prävascularisierung dieser Gewebe liegt (Heller et al., 2016). Gelingt es, im Rahmen des *Tissue Engineering* ein Gewebe zu generieren, werden während der *in vitro*-Kultur die Zellen permanent mit Sauerstoff und

Nährstoffen versorgt. Durch den Mediumwechsel werden Zellabfälle regelmäßig entfernt und neue Nährstoffe geliefert. Diese Funktionen müssen auch nach der Implantation des Gewebes in den Empfänger gewährleistet werden, um einen Untergang des Gewebes zu verhindern. Da die Versorgung über Diffusion nur über eine Strecke von 150-200 µm sichergestellt werden kann (Folkman and Hochberg, 1973), muss eine rasche Anbindung an das Gefäßsystem und damit an die Blutversorgung des Empfängers erfolgen (Laschke and Menger, 2016). Bei all den Erfolgen, die bisher im *Tissue Engineering* verzeichnet werden konnten, stellt diese Anbindung an das Gefäßsystem den limitierenden Faktor dar (Kim et al., 2016).

2.2 Vaskularisierung

2.2.1 Aufbau eines Gefäßes

Die Gefäße des menschlichen Körpers werden in Arterien, Venen und Kapillaren unterschieden (Welsch, 2014, Schünke et al., 2018). Sie alle transportieren das Blut im Körper, wobei die Arterien das Blut vom Herzen weg transportieren, die Venen das Blut zum Herzen zurückführen und die dazwischen geschalteten Kapillaren in den Organen den Stoffaustausch gewährleisten. Mit dem Blut werden Sauerstoff und Nährstoffe zu den Organen transportiert und Stoffe, die durch Stoffwechsel anfallen, aus den Organen abtransportiert (Welsch, 2014).

Arterien und Venen bestehen alle aus drei Schichten (Abb. 2):

- Tunica interna
- Tunica media
- Tunica externa

Die innerste Schicht – die Tunica interna – besteht aus einer Endothelzellschicht, einer bindegewebigen Subendothelialschicht und der Membrana elastica interna. Die Endothelzellschicht kleidet das Gefäß von innen aus.

Die Tunica media besteht aus einer ringförmigen Schicht aus glatten Muskelfasern und der Membrana elastica externa.

Die Tunica externa, die auch Adventitia genannt wird, besteht aus lockerem Bindegewebe. Dieses bettet das Gefäß in das umgebende Gewebe ein. Sie enthält sowohl elastische Fasern als auch Vasa vasorum, die die großen Gefäße mit Sauerstoff versorgen.

Der Unterschied zwischen Arterien und Venen liegt in der Dicke der jeweiligen Schichten (Welsch, 2014, Schünke et al., 2018).

Die Kapillaren besitzen keine Muskelschicht, sondern sind nur aus einer Endothelschicht und einer Basalmembran aufgebaut. Dieser Wandaufbau ermöglicht die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, da diese die dünne Wand überwinden können (Schünke et al., 2018).

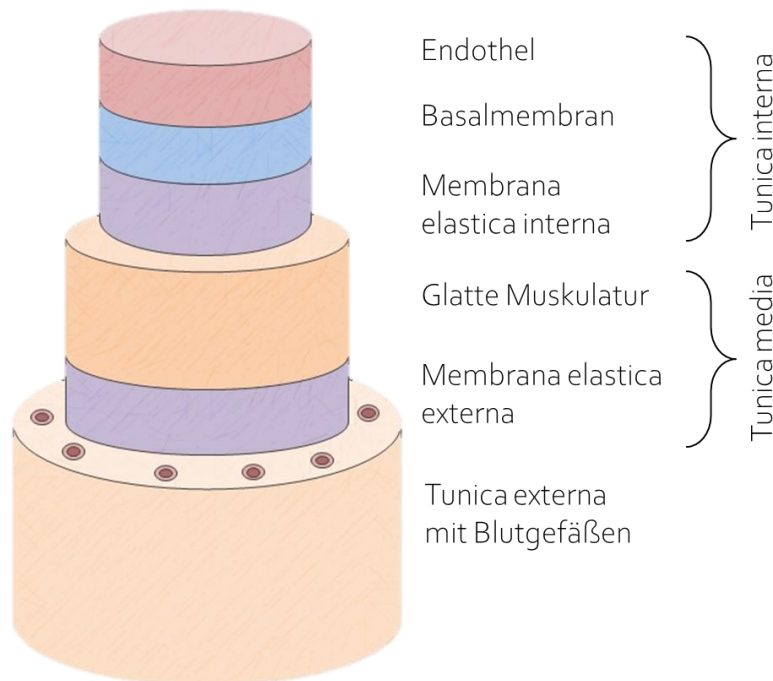


Abbildung 2: Dreischichtiger Aufbau eines Gefäßes

Das Lumen eines Gefäßes wird durch eine Endothelzellschicht ausgekleidet. Zusammen mit subendothelilalem Bindegewebe und der Membrana elastica interna bildet sie die Tunica interna. An sie schließt sich die Tunica media aus glatter Muskulatur und der Membrana elastica externa an. Die Tunica externa aus lockerem Bindegewebe bettet das Gefäß in das umliegende Gewebe ein (Schünke et al., 2018).

2.2.2 Vaskulogenese

Vaskulogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus Angioblasten in der Embryonalentwicklung. Als Angioblast wird die Vorläuferzelle von Endothelzellen bezeichnet (Welsch, 2014). Da die entstehenden Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden müssen, ist die Ausbildung des Gefäßsystems ein Entwicklungsschritt, der sehr früh in der Embryonalentwicklung abläuft: Nach der Gastrulation (der Entstehung der dreiblättrigen Keimscheibe) differenzieren sich aus mesodermalen Zellen die Angioblasten aus, die sich als sogenannte Blutinseln ansammeln. Die inneren Zellen der Blutinseln entwickeln sich zu Blutzellen, während sich die äußeren zu Endothelzellen weiterentwickeln und das eigentliche Gefäß bilden (Ribatti et al., 2015) (Abb. 3). Aufgrund dieser engen Entwicklung geht man von einem gemeinsamen Vorläufer – dem Hämangioblasten - sowohl für die Entstehung der Blutzellen als auch der Endothelzellen aus (Risau and Flamme, 1995).

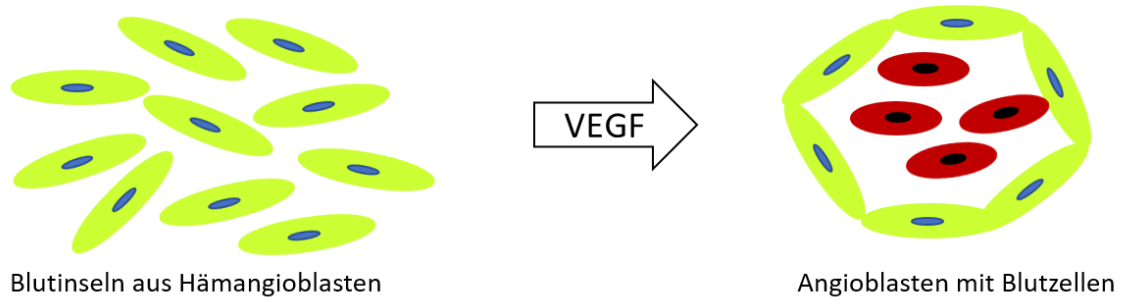


Abbildung 3: Vaskulogenese

Schematische Darstellung der Vaskulogenese (modifiziert nach Ribatti et al., 2015). Zuerst formen sich Blutinseln aus Hämangioblasten, dem gemeinsamen Vorläufer von Endothel- und Blutzellen. Unter dem Einfluss von VEGF bilden die Angioblasten eine äußere Schicht, die dem späteren Gefäß entsprechen. Von dem primitiven Gefäß aus Angioblasten umgeben, liegen die Blutzellen in der Mitte.

Die beschriebenen Mechanismen beziehen sich nur auf die Embryonalentwicklung. Es gibt jedoch auch eine postnatale Vaskulogenese. Dies spielt unter anderem eine Rolle bei der Vaskularisierung von Tumoren (Ribatti et al., 2001). Hierbei spielen statt der Hämangioblasten die endotheliale Vorläuferzellen (EPC) eine entscheidende Rolle (Asahara et al., 1997). Unter hypoxischen Bedingungen werden Zytokine freigesetzt, die eine Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark an den Ort der Hypoxie bewirken. Dort wandern sie in das Gewebe ein und bilden ebenfalls durch die Zytokinwirkung neue Gefäße aus (Balaji 2013).

2.2.3 Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Weiterentwicklung eines primitiven Kapillarnetzes zu einem ausgereiften Gefäßsystem (Schmidt et al., 2010). Man unterscheidet hierbei den sprossenden und den nicht-sprossenden Mechanismus (Intussuszeption):

Bei der sprossenden Angiogenese werden Endothelzellen unter anderem von vaskulärem endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF) und fibroblastischem Wachstumsfaktor (bFGF) stimuliert, bestimmte Proteasen zu sezernieren (Cross and Claesson-Welsh, 2001). Proteasen sind Enzyme, die Proteine spalten (Barrett and McDonald, 1986). Die hier beschriebenen Proteasen spalten die Basalmembran und lockern sie dadurch auf. Durch die Auflockerung der Basalmembran können Endothelzellen in die EZM invadieren. Dort proliferieren sie und differenzieren durch Reorganisation zu neuen Gefäßen (Abb. 4). Im Anschluss wird eine neue Basalmembran gebildet und Zytokine wie Angiopoietin-1 (Ang-1) werden ausgeschüttet. Dadurch angelockte Perizyten stabilisieren das ausgesprossete Gefäß (Risau, 1997, Cross and Claesson-Welsh, 2001).

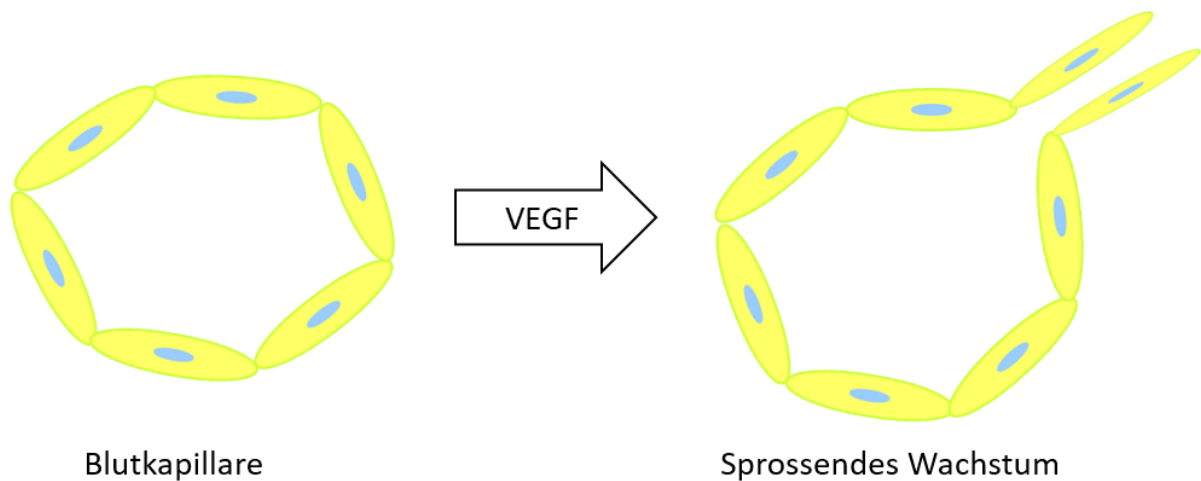


Abbildung 4: Sprössende Angiogenese

Dargestellt ist die sprössende Angiogenese (modifiziert nach Ribatti et al., 2015). Unter dem Einfluss von VEGF sezernieren Endothelzellen bestimmte Proteasen. Diese lösen die Basalmembran auf. Dadurch ist eine Invasion der Endothelzellen in die Umgebung möglich. Durch Reorganisation bilden sie neue Gefäße, die durch eine Basalmembran und durch Zytokine angelockte Perizyten stabilisiert werden.

Die nicht sprössende Angiogenese wird als intussuzzeptives Wachstum bezeichnet. Dabei trennen sich bestehende Gefäße durch Einwachsen von Gewebebrücken auf (Abb. 5). Diese Gewebebrücken aus Bindegewebszellen teilen das Gefäß in zwei Lumina und trennen es am Schluss in zwei Gefäße auf (Ribatti et al., 2015). Sprössende und nicht sprössende Angiogenese kann parallel vorliegen und hängt teilweise von dem Organ ab, in dem die Angiogenese stattfindet (Risau, 1997).

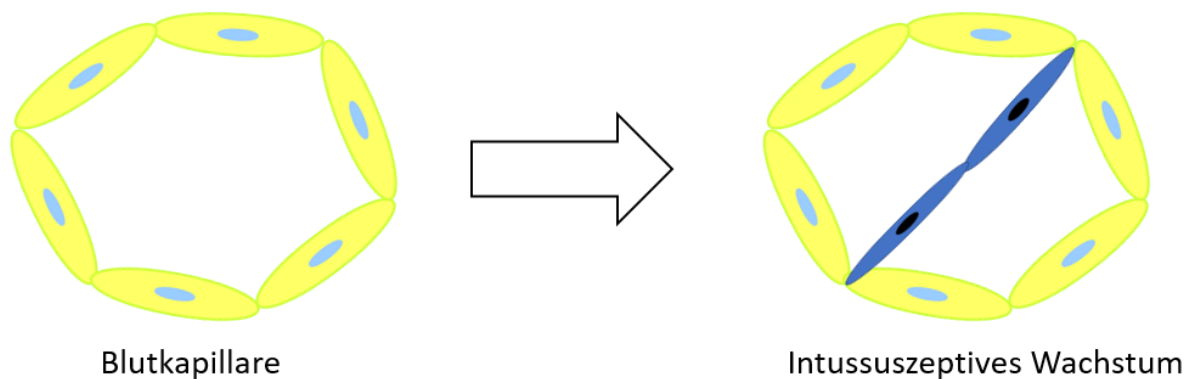


Abbildung 5 Intussuzzeptives Wachstum

Dargestellt ist das nicht sprössende Wachstum von Kapillaren (modifiziert nach Ribatti et al., 2015). In bestehenden Kapillaren bilden sich Gewebebrücken aus Bindegewebszellen, die das Lumen des Gefäßes teilen. Dadurch entsteht ein neues Lumen. Das Gefäß trennt sich in zwei neue Gefäße auf.

Auch die Angiogenese spielt eine wesentliche Rolle bei der Embryonalentwicklung. Jedoch kann auch sie postnatal vorkommen, was physiologischerweise im weiblichen Menstruationszyklus und bei der Wundheilung der Fall ist (Ribatti et al., 2001, Schmidt et al.,

2010). Vaskulogenese und Angiogenese kann man *in vivo* nicht strikt voneinander trennen, da sie teilweise parallel ablaufen (Ribatti et al., 2015).

2.3 Prävascularisierung von *in vitro* generiertem Gewebe

Eine Möglichkeit, die Anbindung des im *Tissue Engineering* gewonnenen Gewebes an das Gefäßnetz nach Implantation zu verbessern, besteht darin, Modifikationen am Scaffold vorzunehmen. Dies ist beispielsweise durch Veränderung der Porengröße (Choi et al., 2013) oder die Beimpfung mit proangiogenen Wachstumsfaktoren (Kirkpatrick et al., 2011) möglich.

Unser Ziel ist es jedoch, nicht nur die Gefäßanbindung nach Implantation zu verbessern, sondern bereits *in vitro* ein funktionierendes Gefäßnetz auszubilden. Dadurch muss das Gefäßnetz des Implantates nur noch an das Empfänger-Gefäßnetz anastomosieren. Hierfür ist bereits *in vitro* bei der Herstellung des Gewebes die Verwendung von Zellen notwendig, die in der Lage sind, Gefäße zu bilden.

2.3.1 Endothelzellen für die Prävascularisierung von Gewebeäquivalenten

In der Prävascularisierung von Geweben, die durch *Tissue Engineering* hergestellt wurden, spielen Endothelzellen eine essentielle Rolle (Bauguera and Ribatti, 2013, Baldwin et al., 2014, Rouwkema and Khademhosseini, 2016). Es wurden Versuche zur Prävascularisierung im Rahmen des *Tissue Engineering* mit unterschiedlichen Endothelzellen durchgeführt, die sich hinsichtlich ihres Wachstums, ihrer Differenzierung und der Migrationsfähigkeit unterscheiden (Bauguera and Ribatti, 2013).

Bereits 1998 gelang es, ein prävascularisiertes Hautäquivalent herzustellen, indem Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten kokultiviert wurden (Black et al., 1998). Verwendet wurden Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene, die sogenannten *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC). HUVEC können zwar einfach gewonnen werden, die durch sie gebildeten Gefäße sind allerdings instabil und nicht immunkompatibel (Bauguera and Ribatti, 2013). Unser Ziel ist es, ein Gewebe aus autologen Zellen zu generieren. Dies ist mit HUVEC nicht möglich, da hierfür die Nabelschnur des Patienten vorliegen müsste. HDMEC aus der Haut sind ein weiterer Ansatzpunkt. Für die Wundabdeckung von Hautdefekten wurden mittels *Cell Sheet*-Technologie Keratinozyten, Fibroblasten und HDMEC aus menschlicher Haut verwendet, um das Hautäquivalent zu prävascularisieren (Cerqueira et al., 2014). Auch für die Prävascularisierung von Knochengewebe wurden HDMEC aus der Haut

verwendet (Wenz et al., 2018). Die bisherigen Erfolge in der Arbeitsgruppe um Frau Professor Brenner, ein prävascularisiertes Schleimhautäquivalent herzustellen, das sich *in vivo* an das bestehende Gefäßnetz anschloss, erfolgten ebenfalls unter Verwendung von HDMEC (Heller et al., 2016).

Die HDMEC hierfür stammen aus Vorhaut, weshalb sie in der Gynäkologie keine Anwendung finden können. Für die Gewinnung der HDMEC aus Vorhaut oder auch von anderen Hautstellen ist ein invasiver Eingriff notwendig, wodurch eine Wunde entsteht. Des Weiteren gehören die HDMEC zu den ausgereiften Endothelzellen. Dadurch entdifferenzieren sie nach wenigen Passagen. Aus diesen Gründen sind sie nicht optimal geeignet, um längerfristig für die Prävascularisierung von Gewebeäquivalenten verwendet zu werden (Baiguera and Ribatti, 2013).

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten in der Verwendung von reifen Endothelzellen gewinnen die EPC an Bedeutung. Sie haben den Vorteil, dass sie minimalinvasiv aus peripherem Blut gewonnen werden, sich in alle möglichen Arten von Kapillaren entwickeln können und ein hohes proliferatives Potential aufweisen (Peters, 2018). Im Jahr 2004 gab es erste Versuche mit EPCs, die aus Nabelschnurblut (Wu et al., 2004) oder aus peripherem Blut gewonnen wurden, *in vitro* Gefäße herzustellen. Im Jahr 2008 gelang es, aus Kulturen von EPCs aus Nabelschnurblut und peripherem Blut in Kokultur mit mesenchymalen Stammzellen der Maus Gefäße auszubilden. Während aus den EPC der Nabelschnur schnell stabile Gefäße gebildet wurden, blieben die aus dem peripheren Blut instabil (Au et al., 2008). In weiteren Versuchen wurden anstelle der murinen Stammzellen, Stammzellen aus dem menschlichen Knochenmark verwendet. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass sowohl die EPC aus Nabelschnurblut als auch die aus peripherem Blut in der Lage sind, stabile Gefäße auszubilden (Melero-Martin et al., 2008).

Aufgrund des vielversprechenden Potentials von EPC wurde anknüpfend an die erfolgreiche Prävascularisierung eines Schleimhautäquivalentes in unserer Arbeitsgruppe um Frau Professor Brenner in weiterführenden Versuchen die HDMEC durch EPC ersetzt (Schulze, 2016). Hierbei wurden durch Kokulturen von EPC und Fibroblasten auf einer kollagenhaltigen Matrix gefäßähnliche Strukturen nachgewiesen.

2.4 Endotheliale Progenitorzellen

EPC sind Vorläuferzellen, die an der Vaskulogenese (Kap. 2.2.2) beteiligt sind. Sie wurden erstmals im Jahr 1997 von Asahara et al beschrieben. Bis zu diesem Zeitpunkt bestand die Meinung, dass postnatale Ausbildung von Blutgefäßen nur über die Angiogenese, also aus bereits vorhandenen Gefäßen, möglich ist (Asahara et al., 1997). Jedoch ebnete diese Entdeckung den Weg zum heutigen Wissen, dass Vorläuferzellen in der Lage sind, Gefäße zu bilden (Basile and Yoder, 2014). Als EPC werden eine heterogene Gruppe von Zellen bezeichnet, die zur Fraktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes gehören. Jedoch sind nur ein Teil von ihnen tatsächliche Vorläuferzellen:

Die *colony-forming unit-endothelial cells* (CFU-ECs), die *circulating angiogenic cells* (CACs) und *endothelial colony forming cells* (ECFC) werden alle zu den EPC gezählt. Sie können aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) kultiviert werden. Sie unterscheiden sich in der Art der Kultivierung und werden aufgrund der Reifezeiten in *early outgrowth* und *late outgrowth* unterteilt. Die CFU-ECs und die CACs zählen zu den *early outgrowth* EPCs. Sie sezernieren Zytokine wie VEGF und IL-8. Durch diese Wachstumsfaktoren entfalten diese Zellen ihr proangiogenes Potential (Hur et al., 2004, Prater et al., 2007). Die ECFC, die den *late outgrowth* EPCs entsprechen, werden als die eigentlichen endothelialen Vorläuferzellen angesehen (Liu et al., 2012, Basile and Yoder, 2014). *In vivo* bilden sie *de novo* Gefäße mit einem Lumen aus. *In vitro* formen sie kapillarähnliche Strukturen aus und haben ein hohes proliferatives Potential.

ECFC können aus Nabelschnurblut oder peripherem Blut gewonnen werden. Da im peripheren Blut nur eine ECFC unter einer Million mononukleärer Zellen vorkommt, ist die Isolation sehr aufwändig (Yoder et al., 2007). Man kann ECFC über durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern identifizieren oder schon bei der Kultur der Zellen wie oben genannt selektionieren (Tura et al., 2013). ECFC bilden Oberflächenmarker wie reife Endothelzellen, aber keine hämatopoietischen Marker aus (Yoder et al., 2007, Tura et al., 2013). Daher postulieren Tura et al, dass die ECFC entgegen der bisherigen Meinung keine Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Balaji et al., 2013), sondern Endothelzellen mit der Fähigkeit zur Proliferation sind. Green et al. haben aus der Endothelzellschicht der Vena saphena magna ECFC isoliert (Green et al., 2017). Damit stützen sie diese These und widerlegen die bisherige Meinung, dass die Endothelschicht nur aus ausdifferenzierten Zellen besteht.

Unabhängig davon, welche Endothelzellart verwendet wird, spielen bei der Gefäßneubildung verschiedene Zytokine eine wichtige Rolle. Diese entfalten auf unterschiedliche Art ihre proangiogene Wirkung bei der Angiogenese und der Vaskulogenese.

2.5 Einfluss der untersuchten Zytokine auf die Vaskularisierung

Ein Wachstumsfaktor, der sowohl für die Vaskulo- als auch die Angiogenese essentiell ist, ist das VEGF (Moens et al., 2014, Ribatti et al., 2015, Simons et al., 2016). Es gibt die fünf Untergruppen VEGF-A bis E (Schmidt et al., 2010). Der wichtigste Stimulus, der zur Expression von VEGF führt, ist Hypoxie. Unter Hypoxie kann ein bestimmtes Protein, der so genannte Hypoxie induzierbare Faktor (HIF), nicht abgebaut werden, da die hierfür benötigte Reaktion sauerstoffabhängig ist. Liegt HIF vor, wird die Expression von VEGF verstärkt. Dies erklärt, weshalb unter Hypoxie die Vaskularisierung gesteigert ist (Schmidt et al., 2010, Zimna and Kurpisz, 2015).

VEGF entfaltet seine Wirkung über verschiedene Rezeptoren. Dazu gehören die VEGFR1-3 sowie weitere Co-Rezeptoren. VEGFR1-3 haben die Funktion einer Rezeptortyrosinkinase, wobei VEGFR2 die stärkste Signaltransduktion bewirkt und damit den größten Einfluss auf die Vaskularisierung hat (Cross and Claesson-Welsh, 2001, Shibuya, 2013). Nach Bindung an den Rezeptor werden verschiedene Signalwege wie der PLC γ -ERK1/2-Signalweg aktiviert. Hierüber wird die Transkription beeinflusst (Simons et al., 2016) und VEGF kann seine Wirkungen auf die Gefäßentwicklung entfalten, die im Rahmen der Embryogenese unabdingbar ist. Mäuse, deren Gen für den VEGFR inaktiviert wurde, sterben in der Embryonalentwicklung, da sie keine Gefäße ausbilden können (Shalaby et al., 1995). VEGF wird hierbei sowohl für die Angiogenese als auch die Vaskulogenese benötigt (Asahara et al., 1999). Einfluss auf die frühe Angiogenese nimmt VEGF über die permeabilitätssteigernde Wirkung auf Kapillaren und Mikrogefäße (Dvorak, 2002, Moens et al., 2014, Ribatti et al., 2015) (Abb. 7). Des Weiteren werden die Migration und die Proliferation von Endothelzellen durch VEGF gesteigert sowie Zelladhäsion, Vasodilatation und Apoptoserate beeinflusst (Simons et al., 2016). Auf die Vaskulogenese nimmt VEGF Einfluss, indem es chemotaktisch auf EPC wirkt (Asahara et al., 1999) (Abb. 6). Damit mobilisiert es *in vivo* die EPC in das ischämische Gebiet und bewirkt dort die Ausbildung neuer Gefäße, wodurch die Versorgung mit Sauerstoff erfolgen kann (Moens et al., 2014). Nach abgeschlossener Gefäßbildung fällt die Menge an sezerniertem VEGF ab. Es wird dann

nur noch eine basale Menge VEGF ausgeschüttet, um die Homöostase zu gewährleisten (Moens et al., 2014).

Eine ähnliche Wirkung auf die Angiogenese entfaltet das Chemokin Interleukin-8 (IL-8), das von Makrophagen, Leukozyten und Endothelzellen sezerniert wird. Ursprünglich als Entzündungsmediator bekannt, wurde 1992 erstmals seine proangiogene Wirkung beschrieben (Koch et al., 1992, Xie, 2001). Diese Wirkung entfaltet IL-8 über zwei Rezeptoren, die CXCR1 und CXCR2. Sie sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und aktivieren über Konformationsänderung ihre Signaltransduktion. Diese steigert die Migrationsfähigkeit und die Proliferation von Endothelzellen, während die Apoptoserate reduziert wird (Li et al., 2003, Waugh and Wilson, 2008, Keeley et al., 2011).

Unter der Wirkung von IL-8 sezernieren Endothelzellen verstärkt Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Diese degradieren die Basalmembran und nehmen damit einen wichtigen Einfluss auf die frühe Angiogenese (Abb. 7). Ebenfalls fördert es die Proliferation von Endothelzellen. Diese Wirkungen von IL-8 auf Endothelzellen entfalten sich nicht nur als parakrine Effekte, sondern auch als autokrine, indem die Endothelzellen selbst das IL-8 ausschütten, welches dann an den CXCR auf der Endothelzelloberfläche bindet (Li et al., 2005). Einfluss auf die frühe Angiogenese nimmt IL-8 nicht nur über die Sekretion von MMP, sondern auch über eine VEGF-unabhängige Phosphorylierung des VEGFR2. Dies erfolgt über eine Transaktivierung nach der Bindung von IL-8 an seine beiden Rezeptoren (Petreaca et al., 2007). Durch diese Wirkung auf den VEGFR2 wird zusätzlich zu den oben beschriebenen Wirkungen auf die Endothelzellen die Permeabilität der Gefäße gesteigert.

Hinsichtlich der Wirkung von IL-8 auf endotheliale Progenitorzellen - und damit auf die Vaskulogenese - herrscht Uneinigkeit. Während ECFC aus Nabelschnurblut beschrieben wurden, die CXCR1 und CXCR2 exprimieren (Kimura et al., 2011), konnte die Arbeitsgruppe um Smadja diese Ergebnisse weder für ECFC aus Nabelschnurblut noch aus peripherem Blut nachweisen (Blandinieres et al., 2019). Aus der Tumorforschung ist bekannt, dass IL-8 im Tumormilieu erhöht ist und durch Stressfaktoren wie Hypoxie, Azidose und Stickstoffmonoxid (NO) verstärkt sezerniert wird (Xie, 2001). Durch seine proangiogene Wirkung fördert es den Tumorprogress und die Metastasierung (Li et al., 2005).

NO ist ein gasförmiges Signalmolekül, das nicht nur über die gesteigerte IL-8-Sekretion Einfluss auf die Vaskularisierung nimmt. Es wird von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus L-Arginin synthetisiert. Es gibt in verschiedenen Zellen NOS. Für die Vaskularisierung relevant ist die

endotheliale NOS (eNOS), die in Endothelzellen exprimiert wird (Alderton et al., 2001). Für die Aktivierung von eNOS in der Zelle gibt es verschiedene Mechanismen. Einer ist ein Calcium-Einstrom in die Zelle, der über den *second-messenger* Calmodulin eNOS aktiviert. Calcium-unabhängig kann es über den PI3K-Akt-Signalweg mittels Phosphorylierung von eNOS zu dessen Aktivierung kommen. Dieser Signalweg wird unter anderem durch VEGF aktiviert. (Fulton et al., 1999, Duda et al., 2004, Zhao et al., 2015, Dimmeler et al., 1999).

Durch eNOS werden die Permeabilität (Gratton et al., 2003), die Proliferation (Luo et al., 2014) und die Migration von Endothelzellen gesteigert (Yang et al., 2018). Über diese Effekte nimmt eNOS Einfluss auf die frühe Angiogenese (Abb. 7). Da es unter anderem durch VEGF aktiviert wird, entfalten diese beiden Faktoren eine synergistische Wirkung auf die Gefäßpermeabilität und damit auf die Aussprossung neuer Gefäße. Seine Wirkung auf die Vaskulogenese entfaltet eNOS über die Sekretion von MMP, wodurch EPC aus dem Knochenmarkt mobilisiert werden (Aicher et al., 2003). Ebenfalls steigert eNOS die Migration und die Proliferation von EPC (Lu et al., 2015) (Abb. 6).

Ein weiterer Wachstumsfaktor, der seine Wirkung unter anderem über VEGF entfaltet, ist bFGF. Der für die Vaskularisierung wichtige Rezeptor ist der FGFR-1 (Cross and Claesson-Welsh, 2001). Über die Sekretion von Plasminogenaktivator wird die Migrationsfähigkeit von Endothelzellen gesteigert. Die Basalmembran wird gelockert und die Endothelzellen können sich nach Invasion zu neuen gefäßähnlichen Strukturen formen (Montesano et al., 1986) (Abb. 7). Diese Wirkung entfalten die Endothelzellen teilweise in autokriner Weise (Sato and Rifkin, 1988). Des Weiteren bewirkt bFGF eine verstärkte VEGF-Expression und verstärkt damit seine Wirkung auf die frühe Angiogenese (Tzeng et al., 2015) (Abb. 7). Wie VEGF und eNOS mobilisiert bFGF EPC und steigert dadurch die Vaskulogenese (Fons et al., 2015), wobei es diesen Einfluss auch über die gesteigerte Expression von VEGF nimmt (Tzeng et al., 2015) (Abb. 6).

bFGF spielt auch in der späteren Angiogenese eine wichtige Rolle. Unter der VEGF-Wirkung der frühen Angiogenese bilden sich instabile und permeable Gefäße. Diese werden in Anwesenheit von bFGF in einem späteren Stadium der Angiogenese stabilisiert, was vermutlich durch den chemotaktischen Einfluss auf Perizyten geschieht (Abb. 7) (Spanholtz et al., 2011).

Ebenfalls über die Stabilisierung von neu entstandenen Gefäßen beeinflusst der Ang-Tie2-Signalweg die späte Angiogenese (Abb. 7). Diese Stabilisierung erfolgt über die verstärkte Interaktion zwischen Endothelzellen und EZM sowie anderen Endothelzellen (Eklund and Saharinen, 2013). Tie-2 ist ein Rezeptor, der auf Endothelzellen und einigen hämatopoietischen Zellen exprimiert wird (Thurston and Daly, 2012). Für die Aktivierung dieses Signalweges dient Angiopoietin-1 (Ang-1) (Suri et al., 1996). In der frühen Angiogenese, die durch eine gesteigerte Permeabilität gekennzeichnet ist, wird der Tie2-Rezeptor durch das Angiopoietin-2 (Ang-2) blockiert und dadurch die Gefäßbildung durch VEGF ermöglicht (Maisonpierre et al., 1997). Allerdings ist diese Auffassung mittlerweile umstritten, da in Tumorgewebe Ang-2 agonistisch auf Tie-2 wirkt (Daly et al., 2012). Die genaue Wirkung von Ang-2 im Rahmen der Vaskularisierung ist noch nicht ganz aufgeklärt.

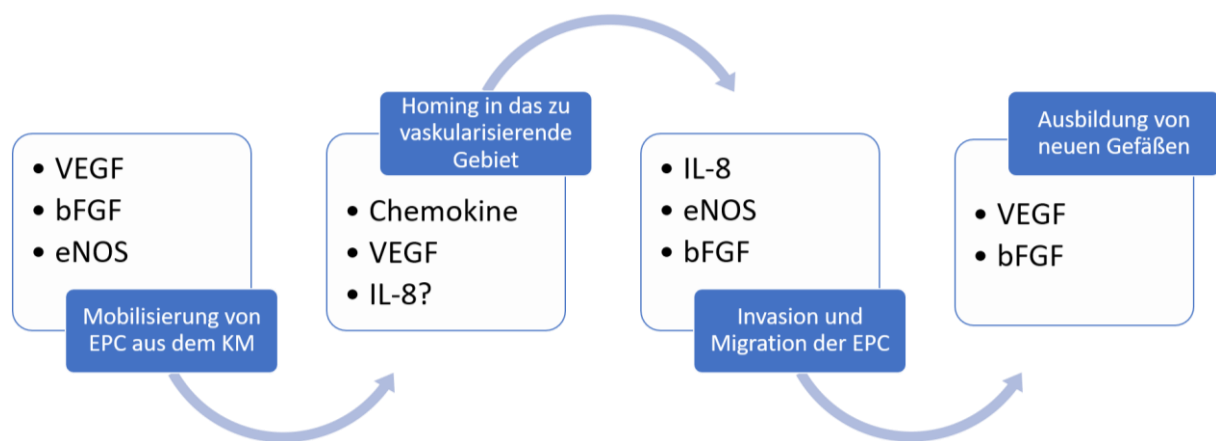


Abbildung 6: Einfluss der untersuchten Zytokine auf die postnatale Vaskulogenese

Dargestellt ist der Einfluss der verschiedenen Zytokine auf die einzelnen Schritte der postnatalen Vaskulogenese. Für die Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark werden VEGF, bFGF und eNOS benötigt. Unter dem Einfluss von Chemokinen, VEGF und möglicherweise IL-8 wandern die EPC in das zu vaskularisierende Gebiet ein. Dort steigern IL-8, eNOS und bFGF die Permeabilität der Gefäße, wodurch die EPC in das umgebende Gewebe invadieren und migrieren können. Durch bFGF und VEGF formen sich die EPC letztendlich zu neuen Gefäßen.

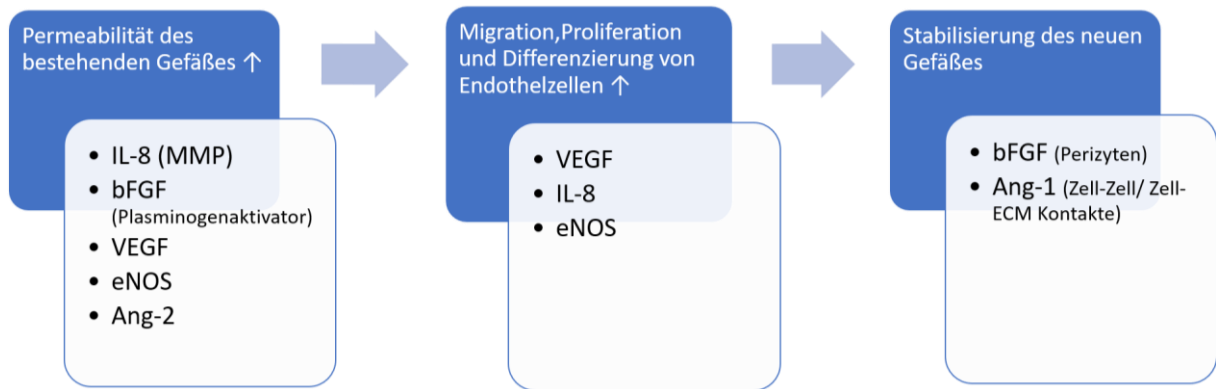


Abbildung 7: Einfluss der untersuchten Zytokine auf die Angiogenese

Zu Beginn der frühen Angiogenese steigert VEGF die Permeabilität. Die Zytokine bFGF, eNOS und IL-8 sorgen für die Ausschüttung von Plasminogenaktivator und Matrix-Metalloproteinasen, wodurch die Basalmembran gelockert und die Permeabilität ebenfalls gesteigert wird. Unter dem Einfluss von VEGF, IL-8 und eNOS wird die Migration, Proliferation und die Differenzierung der Endothelzellen gesteigert, die für die Ausbildung eines neuen Gefäßes notwendig sind. Im Anschluss werden in der späten Angiogenese durch bFGF Perizyten angelockt, die das bisherige instabile Gefäß stabilisieren. Unter der Wirkung von Ang-1 werden neue Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte gebildet, die das neu entstandene Gefäß ebenfalls stabilisieren.

Die dargestellten Zusammenhänge verdeutlichen, dass im Rahmen der Vaskularisierung ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zytokine und Zellen abläuft. Bei genauer Betrachtung der Mechanismen, die der Vaskulogenese und der Angiogenese zugrunde liegen (Abb. 6 und Abb. 7), wird deutlich, dass sich diese teilweise überschneiden und daher nicht immer klar voneinander abgrenzen lassen. Es herrscht noch Bedarf an weiterer Forschung, um die Zusammenhänge im Detail zu erfassen und die Erkenntnisse über die Zytokin-Sekretion während der Vaskularisierung im Rahmen des *Tissue Engineerings* anwenden zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Aqua dest.	Braun, Melsungen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma, Steinheim
Tris Buffer 20 mM, pH 7.0	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Kits

KitsDuoSet® ELISA Ancillary Reagent Kit2	#DY008, R&D Systems
DuoSet® ELISA Human Angiopoietin-2	#DY623, R&D Systems
DuoSet® ELISA Human IL-8/CXCL8	#DY208, R&D Systems
DuoSet® ELISA Human eNOS	#DY950-05, R&D Systems
DuoSet® ELISA Human FGF basic/FGF2	#DY233, R&D Systems
DuoSet® ELISA Human VEGF	#DY293B-05, R&D Systems

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe Nitril Sempercare	Semperit, Wien, Österreich
Pipettenspitzen FilterTips, Tip One® (0,5-10 µl, 22-200 µl, 100-1000 µl)	StarLab Hamburg
Polypropylen (PP)-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße <i>Safe Lock</i>	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.4 Gebrauchsmaterialien

Mehrkanalpipetten Eppendorf Research Plus (10-100 µl, 30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf <i>Research</i> (0,5-10 µl, 1-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand, Wertheim
-----------------------------	-----------------

3.1.5 Geräte

Computer	Lenovo, Hongkong
Gefrierschrank Temperatur -20 °C	Bosch, Gerlingen
GloMax®-Multi detection system	Promega, Madison, USA
Kühlschrank Temperatur 4 °C	Bosch, Gerlingen
Vortex VF2	IKA-Werke, Staufen

3.2 Methoden

Die Isolation sowie Kultur der Zellen, deren Überstände in dieser Arbeit untersucht wurden, erfolgten in Vorarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Brenner durch Heide-Katharina Bauer im Rahmen ihrer Dissertation (Bauer, 2017). Da die Kultur der Zellen eine unabdingbare Grundlage für die vorliegende Arbeit ist, wird ihr Vorgehen hier beschrieben.

3.2.1 Isolation der Fibroblasten

Zur Isolation der Fibroblasten wurde Mundschleimhaut aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie verwendet. Zuerst wurde die Probe gründlich desinfiziert, indem erst mit Ethanol 70 %, anschließend mit BODE Sterillium und dann erneut mit Ethanol 70 % für jeweils 15-20 Sekunden geschwenkt wurde. Das Bindegewebe wurde danach mechanisch vom Epithel getrennt und in 1-2 mm² große Stücke geschnitten. Die Stücke wurden mit der Schnittfläche nach unten in 6-Well-Platten gelegt und in FAD-Medium kultiviert. Sobald Zellen vom Gewebe auswuchsen, wurde auf Fibroblasten-Medium umgestellt. Als 90 % des Wells bedeckt waren, wurden die Zellen nach Behandlung mit 0,25 % Trypsin/EDTA in Zellkulturflaschen überführt.

3.2.2 Isolation der endothelialen Vorläuferzellen

Zur Isolation der endothelialen Vorläuferzellen aus peripherem Blut wurde nach dem in der Arbeitsgruppe Brenner etablierten Protokoll vorgegangen (Schulze, 2016):

Als erstes wurden 6-Well-Platten mit einer Kollagen-I-Lösung beschichtet. Freiwilligen Probanden wurde über eine Venenpunktion peripheres Blut in Lithium-Heparin oder EDTA-

Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde 1:1 mit Dulbecco's *Phosphat buffered saline* (DPBS), einer isotonischen Pufferlösung, verdünnt. In ein 50 ml-Reaktionsgefäß wurden 15 ml Ficoll-Histopaque-1077 gegeben. Dies ist eine Lösung, die geeignet ist, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) über Dichtegradienten von den anderen Zellen des Blutes zu trennen. Auf die Ficoll-Histopaque-Lösung wurden vorsichtig 25 ml der Blut-DBPS-Mischung gegeben ohne dass sich die Flüssigkeiten vermischen. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt. Die PBMC lagern sich nach der Zentrifugation zwischen Blutserum und Ficoll Lösung an. Diese Schicht wurde vorsichtig entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dort erfolgte eine 1:1 Verdünnung mit DPBS und eine erneute Zentrifugation.

Die gewaschenen PBMCs wurden in die 6-Well-Platten gegeben, aus denen vorher die Kollagen Lösung entfernt wurde. Es erfolgt die Kultur mit ECFC-Medium. Nach zwei bis sechs Wochen bildeten sich erste Zellkolonien, die in Gelatine-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät werden konnten. Alle isolierten Zellen wurden mit immunhistochemischen Färbungen an Cytospin-Präparaten eindeutig identifiziert.

3.2.3 Kultur der Zellen

Nach erfolgreicher Isolation der Zellen wurden diese bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator inkubiert.

Es wurden unterschiedliche Ko- und Monokulturen durchgeführt, um die Überstände zu entnehmen und zu vermessen:

- Monokultur von Fibroblasten im Well
- Monokultur von ECFC auf der Geistlich Bio-Gide®-Membran
- Monokultur von ECFC im Well
- Kokultur von Fibroblasten und ECFC auf der Geistlich Bio-Gide®-Membran
- Kokultur von Fibroblasten und ECFC im Insert-System mit Kontakt
- Kokultur von Fibroblasten und ECFC im Insert-System ohne Kontakt

Die Bio-Gide®-Membran ist eine Kollagenmembran und hat eine Bilayer-Struktur mit einer zelloklusiven und einer porösen Seite. Vor der Besiedelung mit Zellen musste die Membran in Stücke mit Durchmessern von 6 mm gestanzt und die Seite markiert werden, um im Versuch die zelloklusive von der porösen Seite unterscheiden zu können. Sowohl die Fibroblasten als

auch die ECFC wurden auf die poröse Seite ausgesät. Für die Kulturen haben sich Zellzahlen von $5,6 \cdot 10^4$ /Membran für die Fibroblasten und $1,12 \cdot 10^5$ für die ECFC bewährt.

Das Insert-System ist ein System, das es ermöglicht, verschiedene Zellarten in einem Well zu kultivieren und unterschiedliche Medien zu verwenden (Abb. 8). Die Überstände können getrennt voneinander entnommen werden. Dieses System ermöglicht Kokulturen, in denen sich die unterschiedlichen Zellen berühren oder Kokulturen, bei denen kein Kontakt zwischen den Zellen besteht. Die Porengröße der Inserts betrug $0,4 \mu\text{m}$.

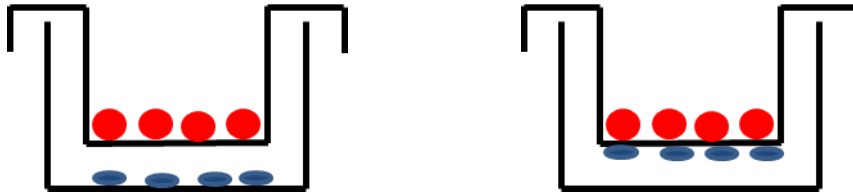


Abbildung 8: Insert-System

Kokultur im Insert-System ohne Kontakt (links): Im Insert wurden die ECFC kultiviert (rot) und im darunterliegenden Well die Fibroblasten (blau). Die Zellen stehen dabei nicht in direktem Kontakt. Kokultur im Insert-System mit Kontakt (rechts): Hierbei wurden die Fibroblasten auf der Unterseite des Inserts aufgebracht, wodurch die ECFC in direktem Kontakt mit den Fibroblasten stehen. Bei beiden Methoden ist es möglich, die jeweiligen Zellkultur-Überstände separat voneinander zu entnehmen und auf Zytokine und Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Die Porengröße der Inserts betrug $0,4 \mu\text{m}$.

24 Stunden vor Überstandentnahme wurden die Kulturen auf FCS-freies Medium umgestellt. Dann wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Überstände entnommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Diese Kokulturen wurden nicht nur mit ECFC, sondern auch mit HDMEC angelegt. Die Überstände der Kulturen mit HDMEC konnten bereits im Rahmen der Dissertation von Heide-Katharina Bauer untersucht werden. Die Überstände der Kulturen mit ECFC jedoch wurden erst in dieser Arbeit untersucht und nachfolgend mit den bereits vorliegenden Werten der HDMEC verglichen.

Für diese Arbeit waren die vorliegenden Überstände zu folgenden Zeitpunkten relevant und wurden verwendet: Nach Tag 1, 3, 7, 15 und 21. Vor Versuchsbeginn wurden alle Proben 1:10 verdünnt, um die Konzentrationen in einen messbaren Bereich zu bringen.

3.2.4 Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter ELISA

ELISA steht für *Enzym linked Immunosorbent Assay*. Dieses Nachweisverfahren stellt eine Enzymreaktion photometrisch dar. Zur Durchführung wurden Kits der Firma R&D Systems verwendet. Am ersten Tag wurden die Platten mit dem *Capture*-Antikörper beschichtet. Hierfür wurden $100 \mu\text{l}$ des auf Arbeitskonzentration verdünnten Antikörpers in jedes Well gegeben. Die Platten wurden mit einer Folie fest verschlossen und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst die Antikörperlösung abgesaugt und jedes Well erneut drei Mal gewaschen. Danach wurden 100 µl Block Buffer pro Well hinzugegeben. Dieser blockierte in seiner einstündigen Inkubationszeit die freien Bindungsstellen. Bevor die Platten zum Auftragen der Proben bereit waren, musste der Block Buffer abgesaugt werden und erneut dreimal gewaschen werden. Pro Probe wurden in je zwei Wells 100 µl der Kulturüberstände in unterschiedlichen Verdünnungen pipettiert. Laut Protokoll hätten die Proben zwei Stunden inkubieren müssen. Aufgrund der Vorarbeiten und der notwendigen Vergleichbarkeit fand eine Abweichung vom Protokoll statt: Die Proben wurden über Nacht auf der Platte belassen. In dieser Zeit konnten die untersuchten Proteine, die in der Probe enthalten waren, an ihren Antikörper auf dem Boden des Wells binden.

Am dritten Tag wurden die Proben abgesaugt und die Platte erneut dreimal gewaschen. Beim Waschen war es wichtig, darauf zu achten, dass der Waschpuffer durch Abklopfen wieder vollständig entfernt wird. Anschließend wurden 100 µl *Detection*-Antikörper pro Well aufgetragen. Dieser Antikörper ist an das Protein Biotin gekoppelt und bindet das zu messende Zytokin, das am *Capture*-Antikörper gebunden vorliegt. Es folgte eine zweistündige Inkubationszeit der verschlossenen Platte. Danach folgten erneut Absaugen und dreimaliges Waschen. Nun konnte auf die Probe 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung pro Well aufgetragen werden. Streptavidin ist ein Protein, das an das Biotin des *Detection Antikörper* bindet. HRP (*horseradish peroxidase*) ist die Bezeichnung für das Enzym Meerrettichperoxidase. Dieses Enzym ermöglicht den entscheidenden Farbumsatz für den Versuchsablauf eines ELISAs. Die 20-minütige Inkubation musste lichtgeschützt erfolgen.

Nachdem die Streptavidin-HRP Lösung abgesaugt und die Platte gewaschen worden war, konnten 100 µl Substrat-Solution aufgetragen werden. Diese enthält den Farbstoff, der durch HRP enzymatisch umgesetzt wird, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stop-Solution beendet (Abb. 9). Die Platten wurden im Promega Reader bei 450 nm photometrisch gemessen. Die gemessenen Extinktionswerte konnten in Excel mittels linearer Regression in Konzentrationen umgerechnet werden. Es fanden nur Versuchsansätze Berücksichtigung, deren Bestimmtheitsmaß größer als 0,9 war. Es wurden die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet sowie mittels T-Test Signifikanzen berechnet.

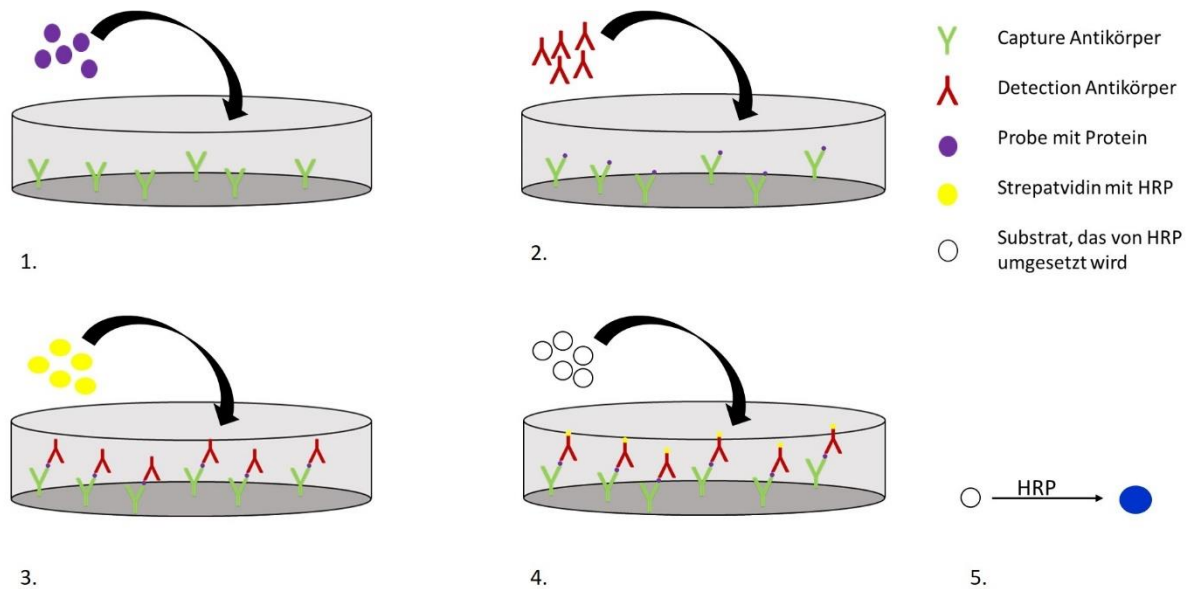


Abbildung 9: Durchführung ELISA

In die 96-Well-Platte, die mit dem *Capture*-Antikörper (grün) beschichtet wurde, werden pro Well 100 µl Probe mit dem zu bestimmenden Zytokin gegeben (1.). Der Antikörper bindet das nachzuweisende Antigen (lila) spezifisch. Nach der Inkubationszeit wird das ungebundene überschüssige Antigen abgewaschen und der *Detection*-Antikörper (rot) aufgetragen (2.). Dieser bindet an ein anderes Epitop des Zytokins als der Erstantikörper. Auf die nun entstandene Sandwich Struktur wird Streptavidin gegeben, an das HRP, eine Peroxidase, kovalent gebunden ist (3.). Das Streptavidin bindet an Biotin, das im *Detection*-Antikörper enthalten ist. Nun kann eine Substratlösung aufgetragen werden, die durch die Peroxidase enzymatisch umgesetzt wird (4.), wodurch ein blauer Farbstoff entsteht (5.). Durch Zugabe einer Säure wird die Reaktion beendet und die Farbe schlägt von blau in gelb um. Dieser Farbstoff kann nun photometrisch quantifiziert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Kokultivierung auf die Zytokin-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten

Sowohl in den Kulturüberständen der ECFC als auch in denen der Fibroblasten war Ang-2 das am stärksten sezernierte Zytokin. Da durch die Sekretion von Ang-2 in den Kulturüberständen so hohe Konzentrationen erreicht wurden, dass eine vergleichbare Darstellung mit den restlichen Zytokinen nicht möglich war, wird hier zuerst die Ang-2-Sekretion betrachtet und danach die restlichen Zytokine gemeinsam.

4.1.1 Ang-2

Außer an Tag 1 gaben die Fibroblasten in Kokultur mehr Ang-2 ab als die Fibroblasten in Monokultur (Abb. 10). Die Fibroblasten in Kokultur im Insert mit Kontakt sezernierten an Tag 1 ihre maximale Menge Ang-2 und erreichten damit eine Konzentration von 3.558 pg/ml. Danach fiel die abgegebene Menge Ang-2 ab und sie erreichte Konzentrationen zwischen 1.568 pg/ml und 2.036 pg/ml. In der Kokultur mit ECFC im Insert-System ohne Kontakt wurde im Kulturüberstand der Fibroblasten an Tag 7 mit 4.340 pg/ml am meisten Ang-2 gemessen. Auch an Tag 15 erreichten sie mit 3.274 pg/ml noch hohe Konzentrationen von Ang-2, bevor sie sich dann an Tag 21 mit 1.709 pg/ml an die Fibroblasten ohne Kontakt annäherten (Abb. 10).

Zu Beginn des Besiedlungszeitraumes war die Ang-2-Ausschüttung durch die ECFC in Monokultur höher als die der ECFC in Kokultur. Ab dem siebten Tag glich sich die Sekretion der Kokultur mit Kontakt und die der Monokultur an (Abb. 11). An Tag 15 stieg die Ang-2-Konzentration des Kulturüberstandes der ECFC in Kokultur mit Kontakt auf 10.390 pg/ml an und überwog damit die Sekretion der Monokultur um das Doppelte. Obwohl sie an Tag 21 zurückging, war die Ang-2-Konzentration mit 9.263 pg/ml immer noch deutlich höher als die der anderen Kulturen. Während die Ang-2-Sekretion der ECFC in Monokultur nach Tag 1 relativ konstant blieb, stieg die Sekretion durch die ECFC in Kokulturen über die Zeit an (Abb 11). Insgesamt war die Ang-2-Sekretion durch die ECFC deutlich höher als durch die Fibroblasten. Während in den Überständen der ECFC Ang-2-Konzentrationen bis über 10.000 pg/ml gemessen wurden, erreichten die Fibroblasten maximale Konzentrationen von knapp 4.500 pg/ml. Lediglich in der Kokultur im Insert-System ohne Kontakt sezernierten die Fibroblasten teilweise mehr Ang-2 als die ECFC.

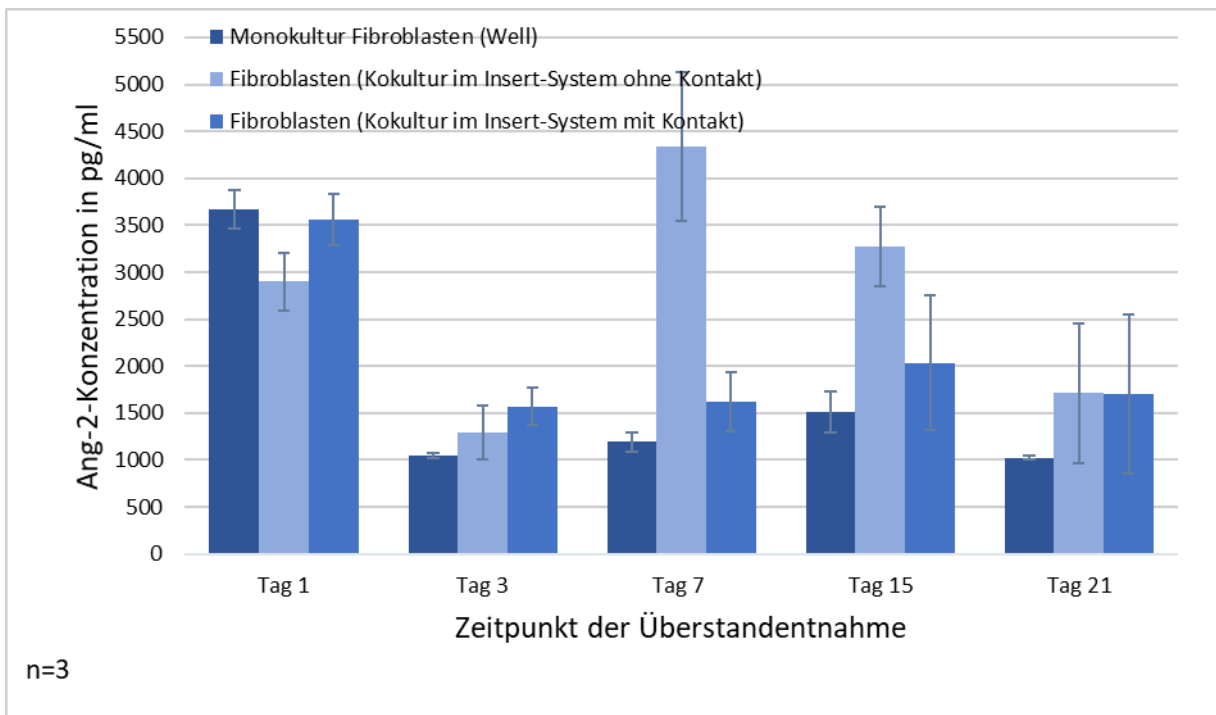


Abbildung 10: Ang-2-Sekretion durch Fibroblasten in Mono- und Kokultur

Dargestellt ist die Ang-2-Konzentration in den Kulturüberständen von Fibroblasten in Monokultur im Well sowie von Fibroblasten, die mittels Insert-System mit Endothelzellen kokultiviert wurden. Die Kokultivierung erfolgte sowohl ohne interzellulären Kontakt als auch mit interzellulärem Kontakt. Es erfolgte die getrennte Überstandentnahme im Insert (Endothelzellen) und unter dem Insert (Fibroblasten). Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an

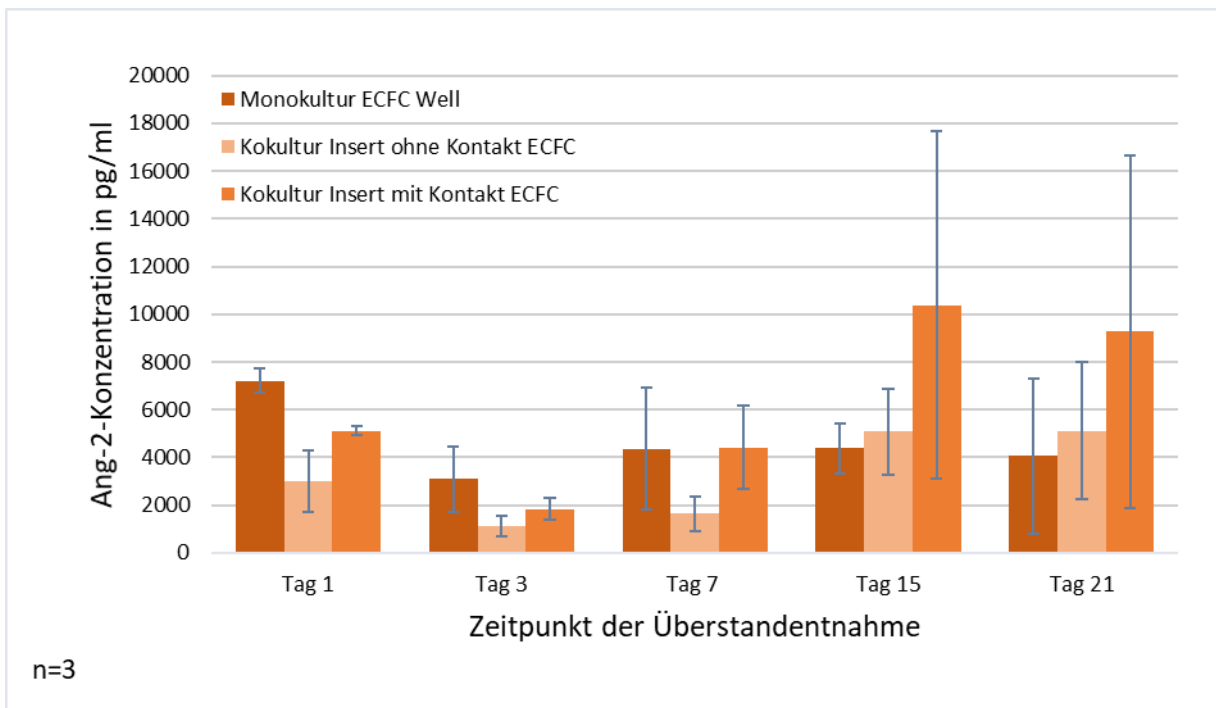


Abbildung 11: Ang-2-Sekretion durch ECFC in Mono- und Kokultur

Dargestellt ist die Ang-2-Konzentration in den Kulturüberständen von ECFC in Monokultur im Well sowie von ECFC, die mittels Insert-System mit Fibroblasten kokultiviert wurden. Die Kokultivierung erfolgte sowohl ohne interzellulären Kontakt als auch mit interzellulärem Kontakt. Es erfolgte die getrennte Überstandentnahme im Insert (Endothelzellen) und unter dem Insert (Fibroblasten). Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

4.1.2 VEGF, IL-8, eNOS und bFGF

Das Zytokin, welches durch die ECFC in Monokultur am zweitstärksten sezerniert wurde, ist IL-8 (Abb. 12a). Auch wenn seine Sekretion durch die ECFC über die Zeit abnahm, war sie insgesamt immer deutlich höher als die IL-8-Sekretion der Fibroblasten in Monokultur (Abb. 12b). Diese sezernierten zu Beginn des Besiedelungszeitraumes noch stark IL-8. Dabei wurde in den Überständen der Fibroblasten in Monokultur eine Konzentration von knapp 850 pg/ml gemessen, während diese in den Überständen der ECFC bei knapp 2600 pg/ml lag (Abb. 12).

Nach Ang-2 war VEGF das Zytokin, das am zweitstärksten von den Fibroblasten in Monokultur sezerniert wurde (Abb. 10 und Abb. 12b). Auch wenn die VEGF-Sekretion durch die Fibroblasten in Monokultur zu allen Zeitpunkten der Kultur höher war als die der ECFC in Monokultur, nahm die VEGF-Sekretion über die Zeit zu. Während in den Überständen der Fibroblasten an Tag 15 die maximale VEGF-Konzentration von 664 pg/ml gemessen wurde (Abb. 12b), sezernierten die ECFC ein basales Level an VEGF und erreichten eine maximale VEGF-Konzentration von 147 pg/ml an Tag 2 (Abb. 12a).

Sowohl bei den ECFC als auch bei den Fibroblasten war in Monokultur an Tag 1 insgesamt eine stärkere sekretorische Aktivität zu beobachten als an den restlichen Tagen. Sie erreichten beide für die Zytokine IL-8, eNOS, bFGF und Ang-2 am ersten Besiedelungstag die höchsten Konzentrationen. Auch wenn die Sekretion von bFGF nach Tag 1 durch beide Zellen abnahm, war die bFGF-Sekretion der ECFC über den Verlauf stärker als die der Fibroblasten. Die eNOS-Sekretion pendelte sich bei den ECFC und den Fibroblasten über die Zeit auf einem ähnlich niedrigen basalen Level ein.

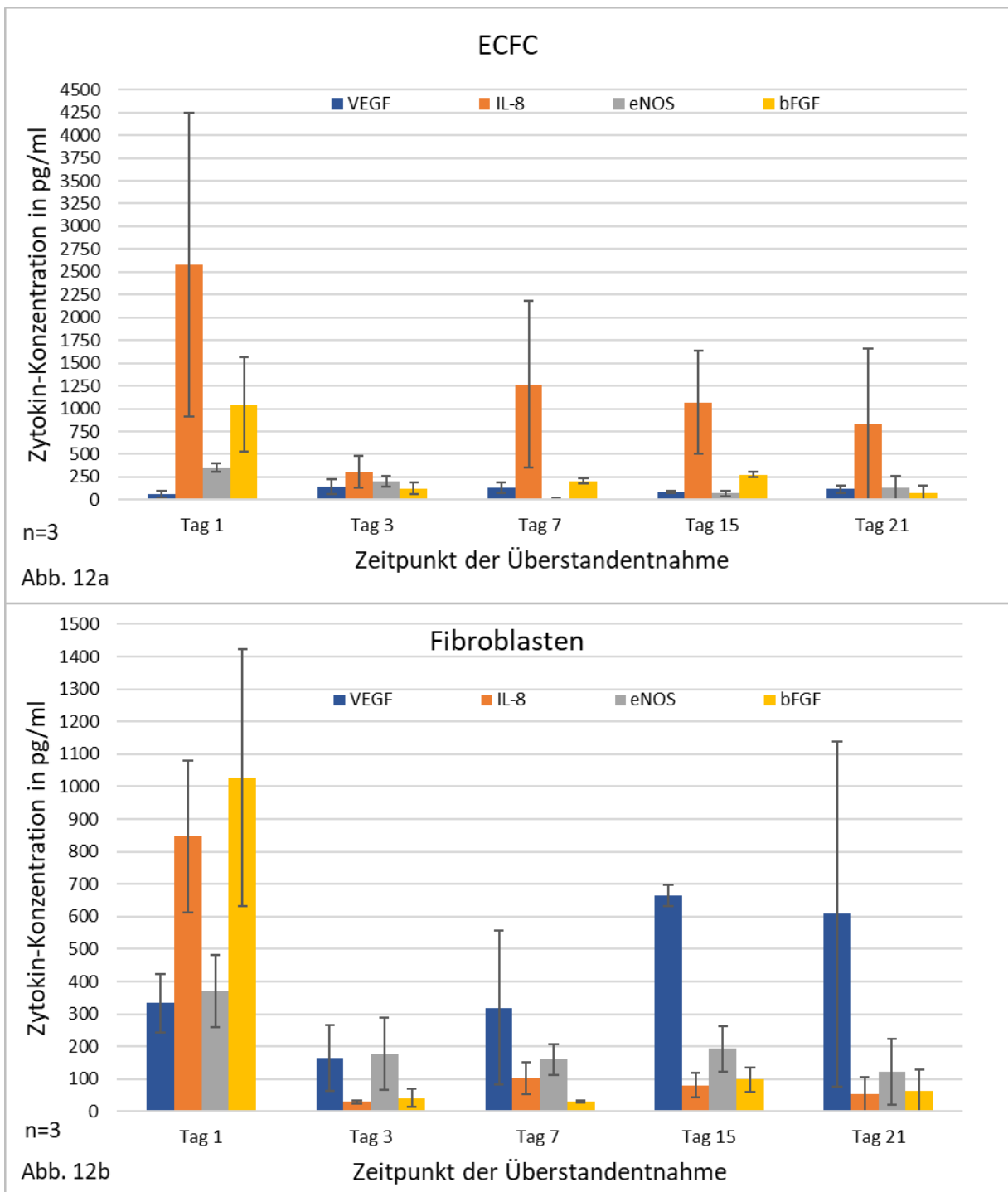


Abbildung 12: Zytokin-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten jeweils in Monokultur im Well

Dargestellt ist die Konzentration von VEGF, IL-8, eNOS und bFGF aus Kulturüberständen von ECFC (Abb. 12a) und Fibroblasten (Abb. 12b), die in Monokultur im Well kultiviert wurden. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Trotz eines Abfalls der IL-8-Konzentration in den Kulturüberständen der ECFC an Tag 3 wurde IL-8 am zweitstärksten durch die ECFC in Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt sezerniert (Abb. 13a). VEGF, eNOS und bFGF wurden von den ECFC in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt (Abb. 13a) ähnlich wie in Monokultur (Abb. 12a) in einem konstanten basalen Level sezerniert. Eine gesteigerte endotheliale Sekretion konnte in Kokultur ohne Kontakt im Vergleich zur Monokultur nicht beobachtet werden.

Die gemessene Zytokin-Konzentration war in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt in den Überständen der Fibroblasten insgesamt höher als die der ECFC (Abb. 13). Wie in Monokultur von Fibroblasten (Abb. 12b) war auch in der Kokultur ohne Kontakt VEGF nach Ang-2 das Zytokin mit den höchsten Konzentrationen (Abb. 13b). Zu den späteren Zeitpunkten der Besiedelung war die VEGF-Sekretion durch die Fibroblasten in Kokultur ohne Kontakt deutlich höher als die VEGF-Sekretion der Fibroblasten in Monokultur. In den Überständen auf der Seite der Fibroblasten wurden an den Tagen 7, 15 und 21 besonders viel VEGF und IL-8 sezerniert. Insgesamt fiel auf, dass die Fibroblasten in der Kokultur ohne Kontakt mehr IL-8, bFGF und Ang-2 sezernierten als in Monokultur. Die eNOS-Sekretion durch die Fibroblasten in Monokultur ohne Kontakt war über die Besiedelungszeit schwankend (Abb. 13b). An Tag 7 war die eNOS-Konzentration in den Überständen der Fibroblasten mit 630 pg/ml jedoch deutlich höher als die der ECFC.

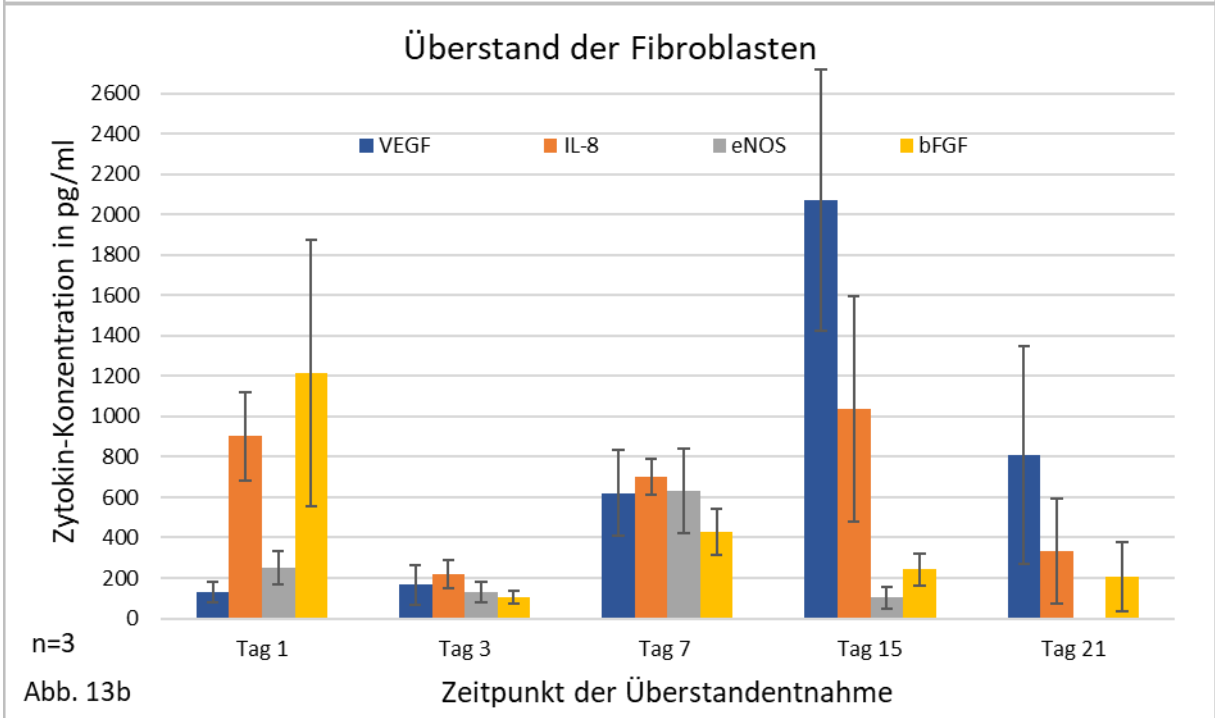
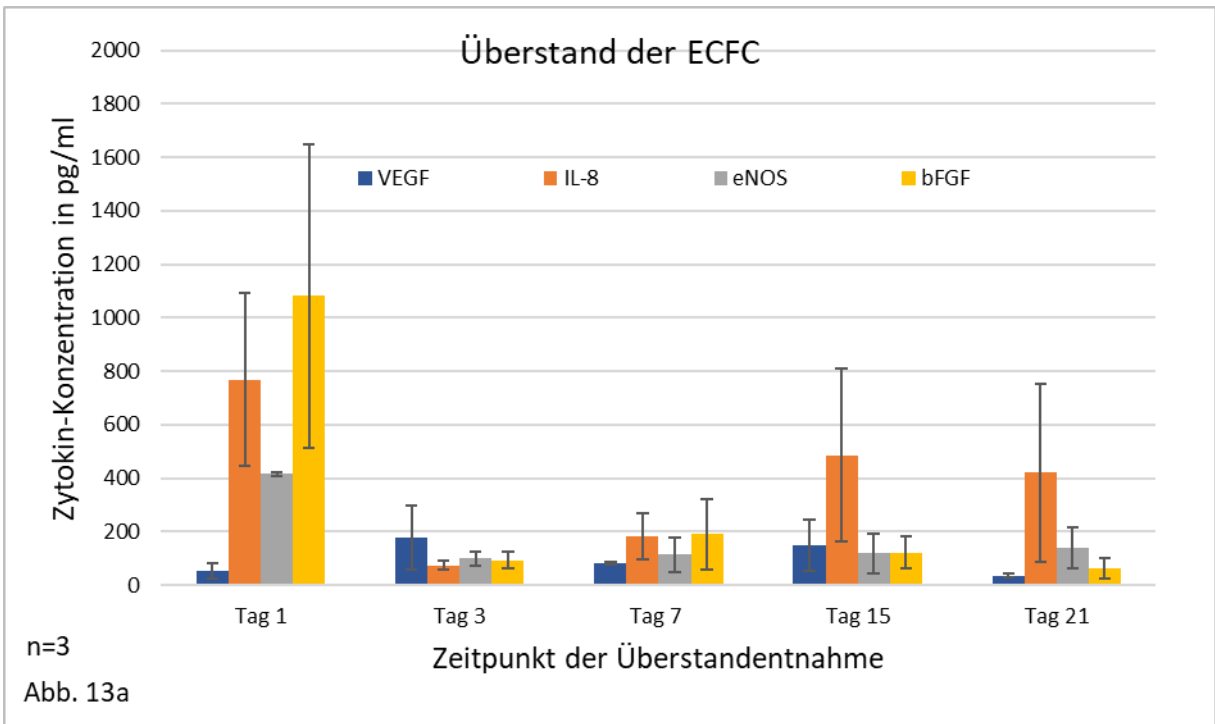


Abbildung 13: Zytokin Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt
 Dargestellt sind Konzentrationen von VEGF, IL-8, eNOS und bFGF in den Kulturüberständen aus Kokulturen von ECFC und Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt. Die Überstände der ECFC konnten im Insert (Abb. 13a) und die der Fibroblasten unter dem Insert (Abb. 13b) getrennt entnommen werden. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

In der Kokultur im Insert-System mit Kontakt war IL-8 -wie in den anderen Kulturüberständen von ECFC- das Zytokin, welches nach Ang-2 am zweitstärksten durch ECFC sezerniert wurde. Zu Beginn des Besiedelungszeitraumes war die IL-8-Sekretion durch die Fibroblasten noch stärker, mit der Zeit überwog dann die Sekretion durch die ECFC. Dennoch war die IL-8-Sekretion durch ECFC in Monokultur höher als durch ECFC in Kokultur mit Kontakt. Die bFGF-Konzentration war außer an Tag 21 in den Kulturüberständen der ECFC (Abb. 14a) höher als in denen der Fibroblasten (Abb. 14b) und. Für bFGF konnte eine gesteigerte endotheliale Sekretion in Kokultur mit Kontakt im Vergleich zur Monokultur verzeichnet werden. eNOS wurde sowohl von den ECFC als auch von den Fibroblasten konstant auf einem basalen Level sezerniert. Hier gab zwischen dem Sekretionsverhalten beider Zellen wenig Unterschiede ; ebenso konnte keine deutliche Abweichung zwischen der eNOS-Sekretion von den Zellen in Monokultur zu den Zellen in Kokultur mit Kontakt verzeichnet werden.

Die VEGF-Sekretion durch die ECFC in Kokultur im Insert-System mit Kontakt war an allen Tagen so niedrig, dass in den Überständen nie eine höhere Konzentration als 150 pg/ml erreicht wurde. Die VEGF-Sekretion durch die Fibroblasten im Insert-System mit Kontakt nahm über die Zeit zu und erreichte ihren Höchstwert mit einer gemessenen Konzentration von 1.339 pg/ml an Tag 21. Sowohl IL-8 als auch bFGF wurden an Tag 1 von den Fibroblasten stärker ausgeschüttet, um an den Tagen 3,7 und 15 weniger sezerniert zu werden (Abb. 14b). Beide Zytokine wurden an Tag 21 wieder in höheren Konzentrationen gemessen. Gegenüber der Monokultur steigerten die Fibroblasten in Kokultur mit Kontakt die Sekretion von VEGF, IL-8, bFGF und Ang-2.

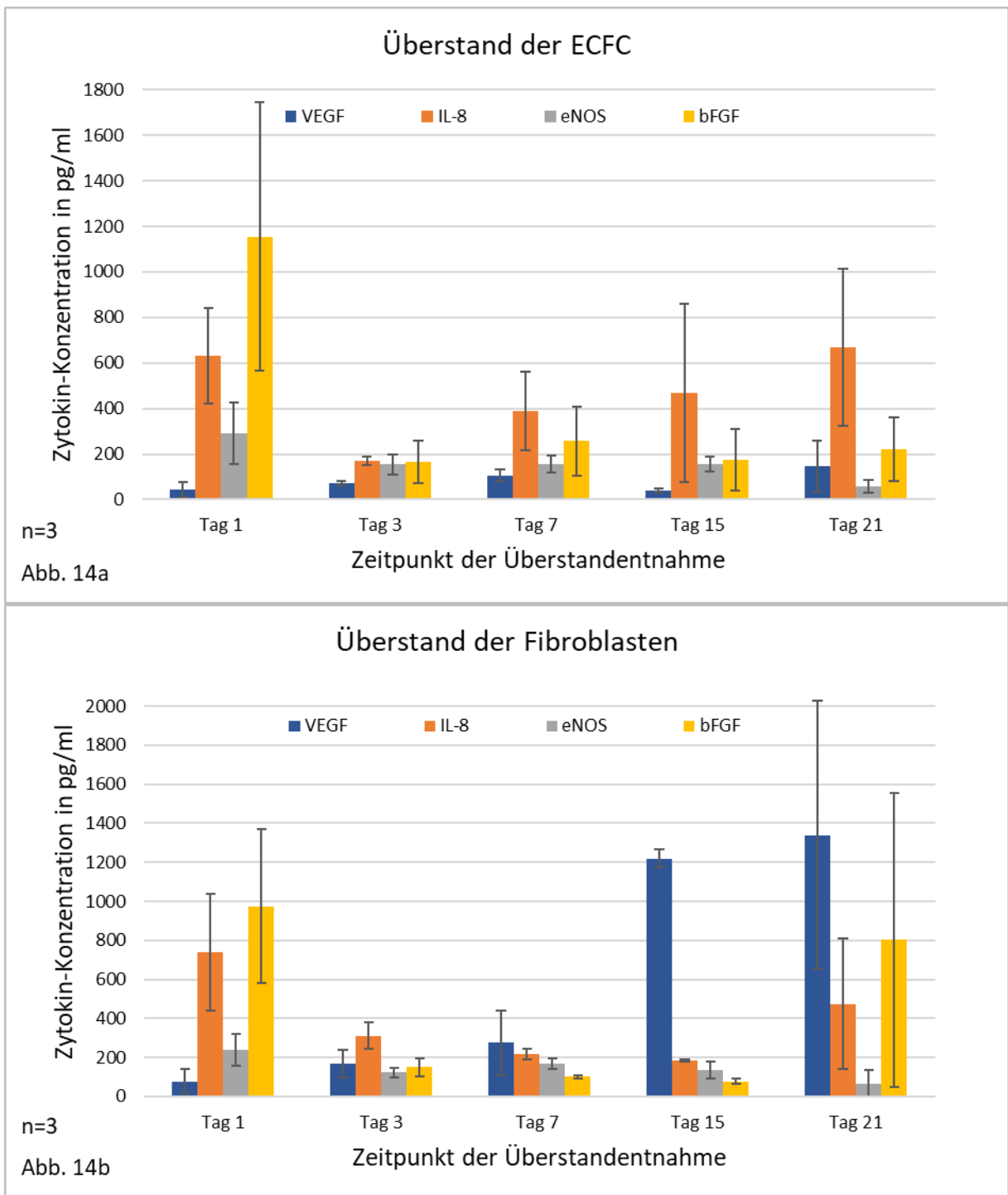


Abbildung 14: Zytokin Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur im Insert-System mit Kontakt

Dargestellt sind Konzentrationen von VEGF, IL-8, eNOS und bFGF in den Kulturüberständen aus Kokulturen von ECFC und Fibroblasten im Insert-System mit Kontakt. Die Überstände der ECFC konnten im Insert (Abb. 14a) und die der Fibroblasten unter dem Insert (Abb. 14b) getrennt entnommen werden. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

4.2 Einfluss der Kollagenmembran auf die Zytokin-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur

4.2.1 VEGF

An Tag 1 überwog die VEGF-Sekretion in der Kokultur auf der Kollagenmembran gegenüber der Kokultur im Insert mit Kontakt (Abb. 15). Im Kulturüberstand der Kokultur auf der Membran wurde an diesem Tag eine Konzentration von 473 pg/ml erreicht. In den Kulturüberständen in den Inserts bei Kokultur mit Kontakt lag die Konzentration auf der Seite der Fibroblasten bei 78 pg/ml und auf der Seite der ECFC bei 44 pg/ml. An Tag 3 war kein wesentlicher Unterschied zwischen den Kulturen zu erkennen. Ab Tag 7 sezernierten die Fibroblasten im Insert mit Kontakt am meisten VEGF. Der Höchstwert von 1.340 pg/ml wurde an Tag 21 erreicht. Die ECFC im Insert produzierten an allen Tagen am wenigsten VEGF (Abb. 15).

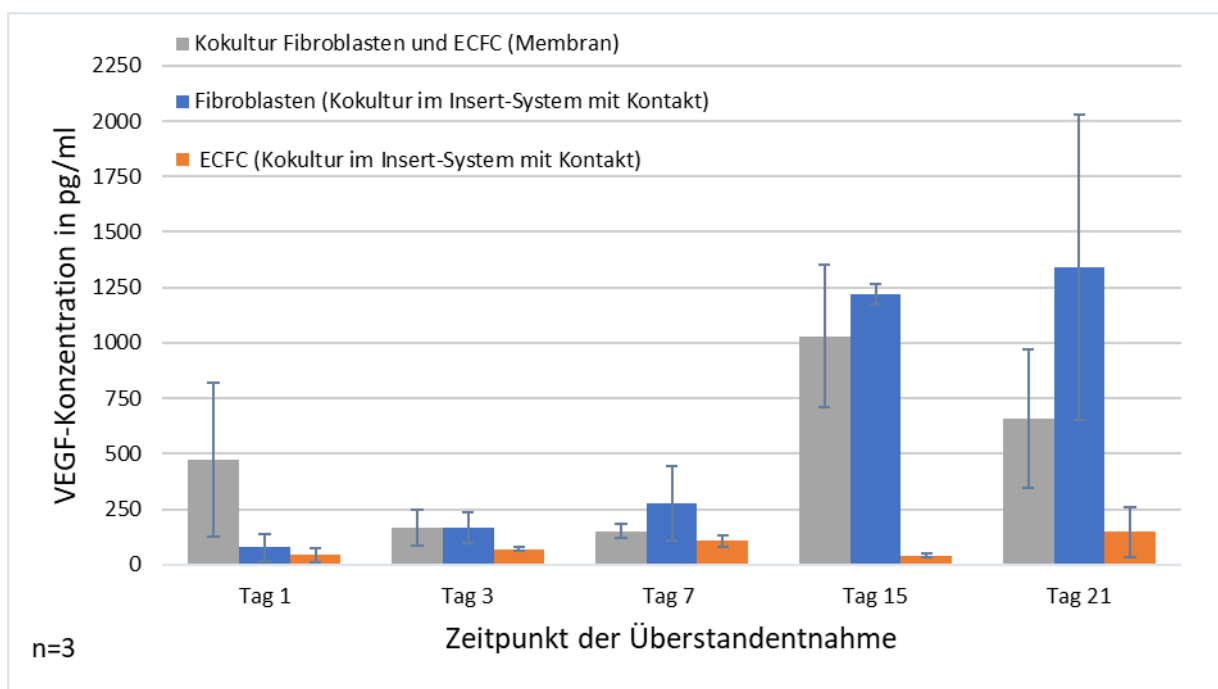


Abbildung 15: VEGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt

Dargestellt ist die VEGF-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System mit interzellulärem Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Beim Vergleich der VEGF-Sekretion der Kokultur auf der Kollagenmembran mit der Kokultur im Insert ohne Kontakt (Abb. 16) ergab sich das gleiche Bild wie beim Vergleich mit der Kokultur mit Kontakt: An Tag 1 überwog die Sekretion von VEGF durch die Kokultur auf der Membran. An Tag 3 ergab sich kein wesentlicher Unterschied und ab Tag 7 sezernierten die Fibroblasten in Kokultur im Insert am meisten VEGF. Hierbei wurde ein Maximum von 2.071 pg/ml an Tag 15 erreicht. Das Sekretionsmuster der Kokultur auf der Kollagenmembran ähnelt trotz niedrigerer Werte dem Sekretionsmuster der Fibroblasten. Insgesamt war die Sekretion durch die Kokultur auf der Kollagenmembran ab der Mitte der Besiedelungsdauer niedriger als durch die Kokulturen im Insert-System (Abb. 15 und Abb. 16).

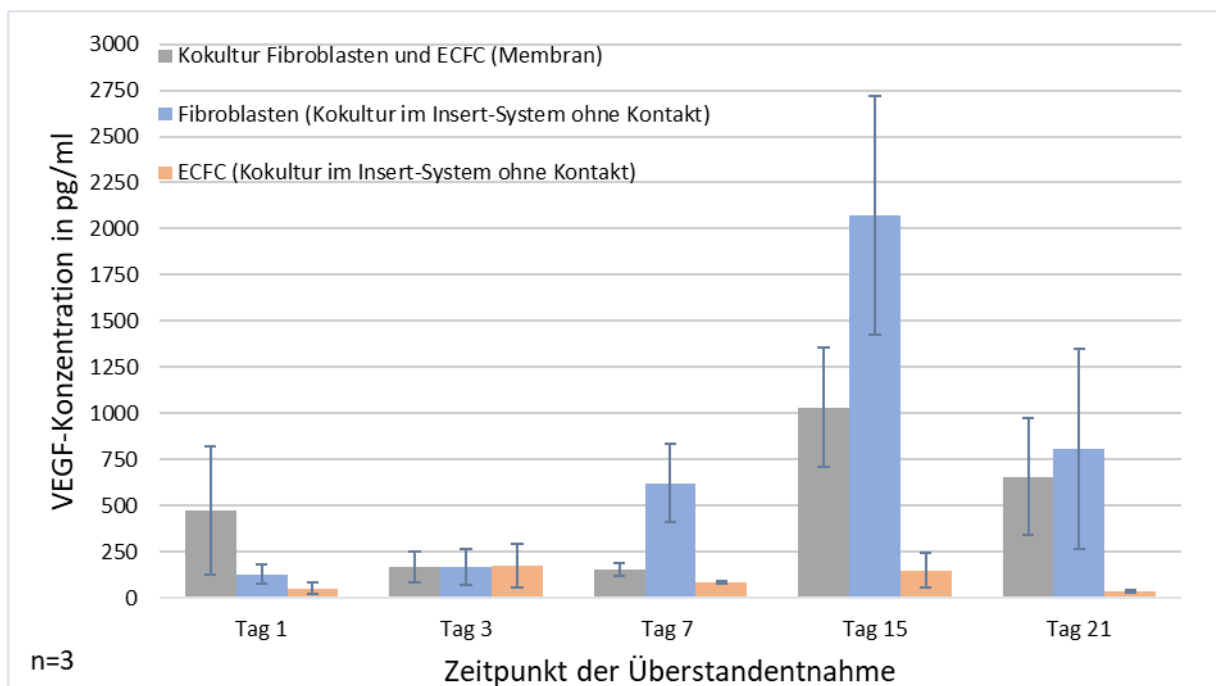


Abbildung 16: VEGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt

Dargestellt ist die VEGF-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System ohne interzellulären Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

4.2.2 IL-8

Im Zellkulturüberstand der Zellen in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran wurde an Tag 1 der Besiedelung eine Konzentration von 4.446 pg/ml IL-8 gemessen. Danach fiel die Sekretion von IL-8 ab und die Konzentrationen blieben für die restliche Kulturzeit unter 1.000 pg/ml. Die niedrigste Sekretion mit einer Konzentration im Zellkulturüberstand von 277 pg/ml erreichten sie an Tag 7; danach konnten sie ihre Sekretion jedoch nochmals steigern (Abb. 17 und Abb. 18).

Im Vergleich mit der Sekretion der Kokultur von ECFC und Fibroblasten im Insert mit Kontakt überwog die IL-8-Sekretion der Zellen in Kokultur auf der Kollagenmembran vor allem zu Beginn des Besiedelungszeitraumes (Abb. 17). Ab dem 7. Tag jedoch steigerten die ECFC in Kokultur im Insert-System ihre Sekretion und überwogen am Ende des Besiedelungszeitraumes die Sekretion der Zellen auf der Kollagenmembran. An Tag 7 wurde im Insert-System mit Kontakt auf der Seite der ECFC eine Konzentration von 389 pg/ml IL-8 gemessen; damit schütteten die ECFC mehr aus als die Zellen in Kokultur auf der Kollagenmembran. Mit einer Konzentration von 669 pg/ml sezernierten an Tag 21 die ECFC im Insert mit Kontakt ebenfalls mehr als die Zellen in Kokultur auf der Membran (Abb. 17).

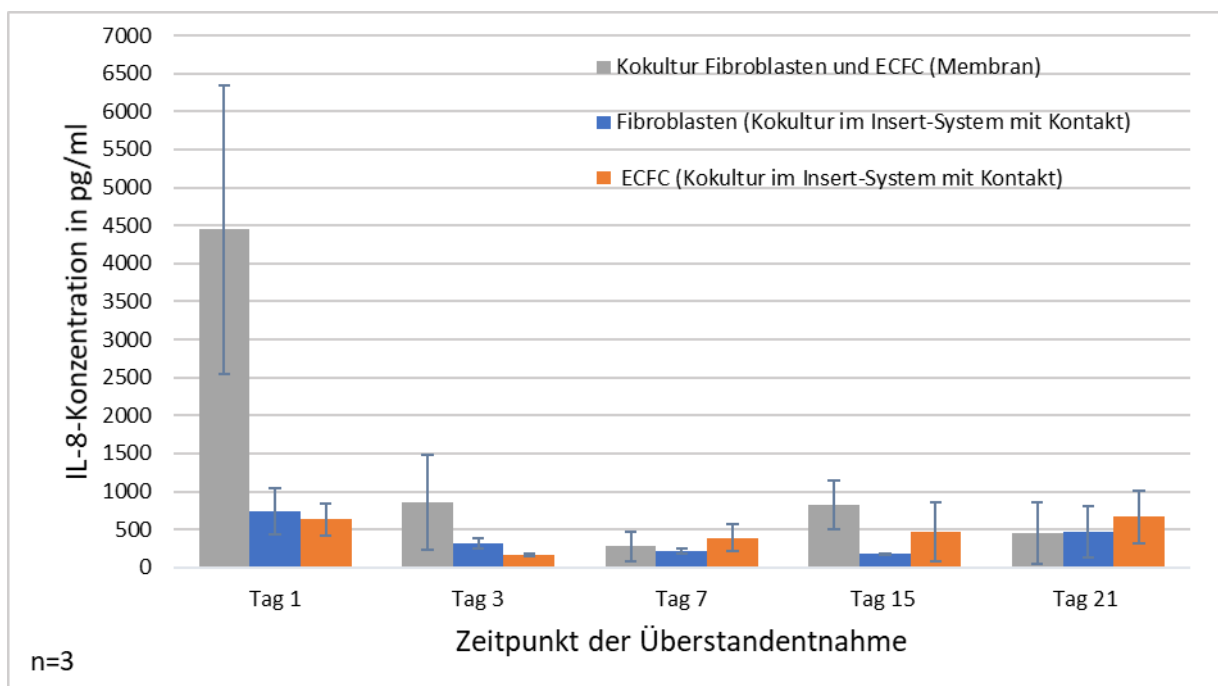


Abbildung 17: IL-8-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt

Dargestellt ist die IL-8-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System mit interzellulärem Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände

wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Im Vergleich der Kokultur auf der Membran mit der Kokultur im Insert-System ohne interzellulären Kontakt fiel auf, dass die IL-8-Sekretion der Zellen auf der Kollagenmembran zu Beginn der Besiedelung stärker war als die der Zellen im Insert-System (Abb. 18). Mit Fortschreiten der Besiedelungsdauer lies dies jedoch nach und die Sekretion der Kokulturen ohne Kontakt war insbesondere auf der Insert-Seite der Fibroblasten stärker als durch die Zellen in der Kokultur auf der Membran (Abb. 18). Interessanterweise war in Kokultur ohne Kontakt die IL-8-Konzentration auf der Insert-Seite der Fibroblasten höher (Abb. 18) und in Kokultur mit Kontakt auf der Seite der ECFC (Abb. 17).

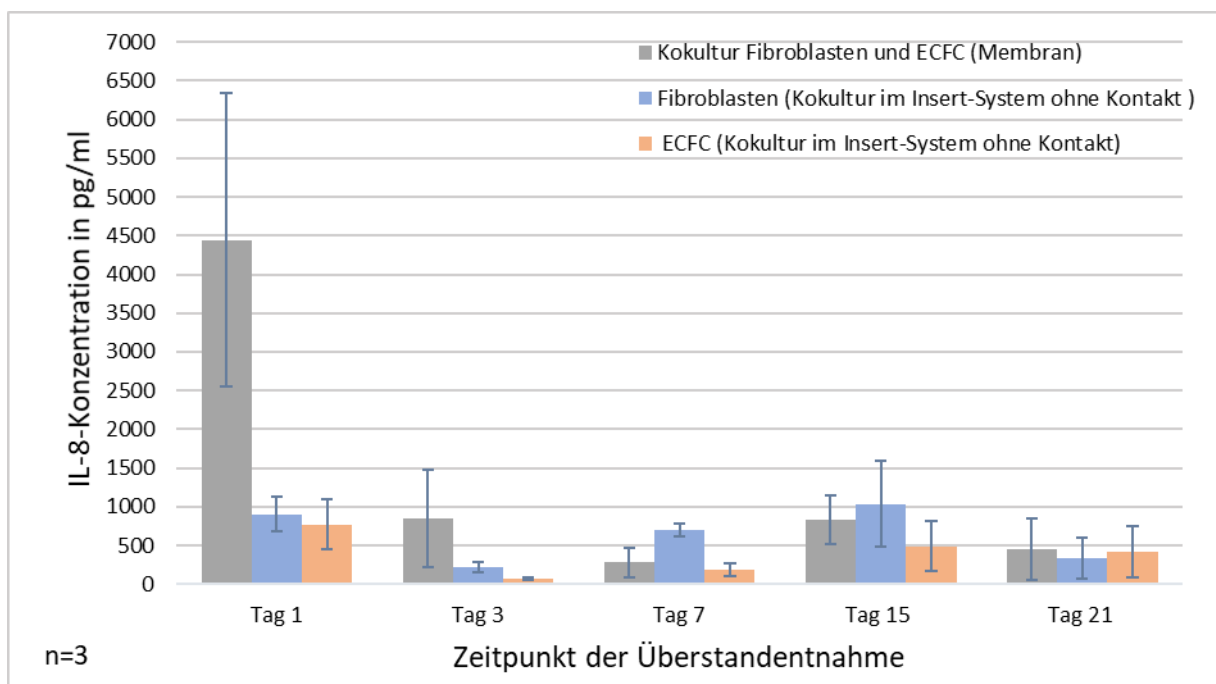


Abbildung 18: IL-8-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt

Dargestellt ist die IL-8-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System ohne interzellulären Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

4.2.3 eNOS

Die eNOS-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Kollagenmembran betrug an Tag 1 241 pg/ml, stieg an Tag 3 auf 256 pg/ml an, fiel an Tag 7 und 15 auf 171 pg/ml und 151 pg/ml ab, um an Tag 21 auf 253 pg/ml anzusteigen (Abb. 19). Im Vergleich der Sekretion von Kulturen auf der Kollagenmembran mit den Kokulturen im Insert-System mit interzellulärem Kontakt war bis auf Tag 1 die Sekretion der Zellen auf der Kollagenmembran etwas stärker als die der Zellen im Insert-System. Insgesamt war der Unterschied jedoch nicht stark und die eNOS-Sekretion pendelte sich in beiden Kulturen auf einem basalen Niveau ein (Abb. 19).

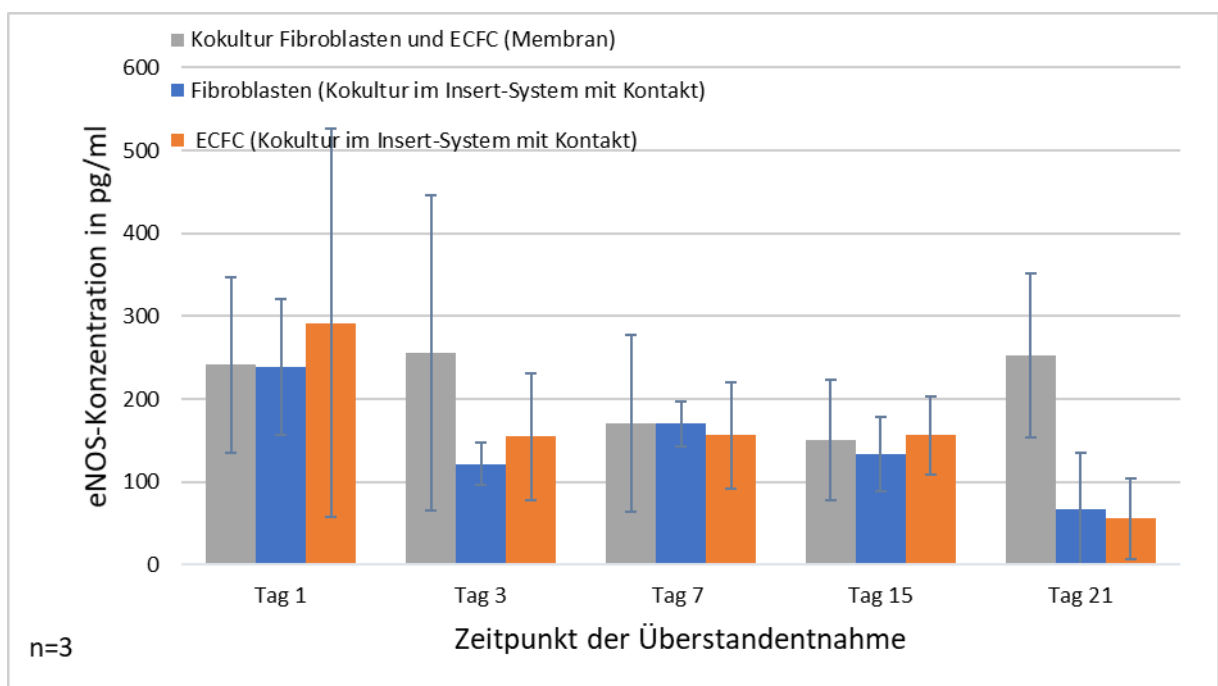


Abbildung 19: eNOS-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt

Dargestellt ist die eNOS-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System mit interzellulärem Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Auch im Vergleich mit den Kulturen ohne interzellulären Kontakt war ein leichtes Überwiegen der Sekretion der Zellen auf der Bio-Gide®-Membran zu verzeichnen. Jedoch wurde diese an Tag 1 von den ECFC und an Tag 7 von den Fibroblasten überwogen. Es war auch hier kein deutlicher Unterschied im Sekretionsverhalten der Zellen zu erkennen (Abb. 20).

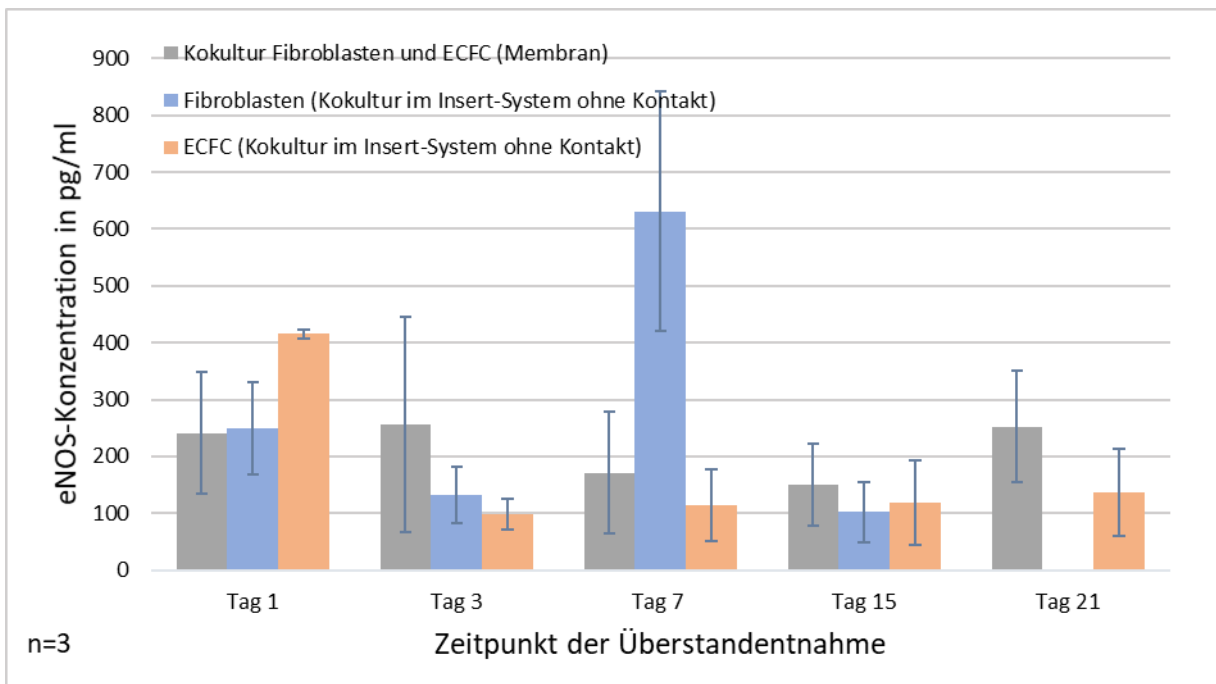


Abbildung 20: eNOS-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt

Dargestellt ist die eNOS-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System ohne interzellulären Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

4.2.4 bFGF

Wie alle anderen Kulturen sezernierten Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Kollagenmembran an Tag 1 am meisten bFGF: 1.602 pg/ml war die von allen Kulturen die höchste erreichte bFGF-Konzentration. Die Sekretion auf der Membran nahm über die Zeit ab (Abb. 21). An Tag 3 fiel die Konzentration im Kulturüberstand der Kokultur auf der Membran auf 461 pg/ml ab. An Tag 7 fiel sie weiter auf 155 pg/ml, um an Tag 15 auf 380 pg/ml zu steigen und an Tag 21 auf 95 pg/ml abzufallen. Damit war die Sekretion durch die Zellen in Kokultur auf der Membran der Ausschüttung im Insert-System mit Kontakt an den Tagen 1, 3 und 15 überlegen. Am Tag 7 sezernierten die ECFC mehr als die Kokultur auf der Membran und an Tag 21 war erneut die bFGF-Sekretion der Fibroblasten sehr stark (Abb. 21).

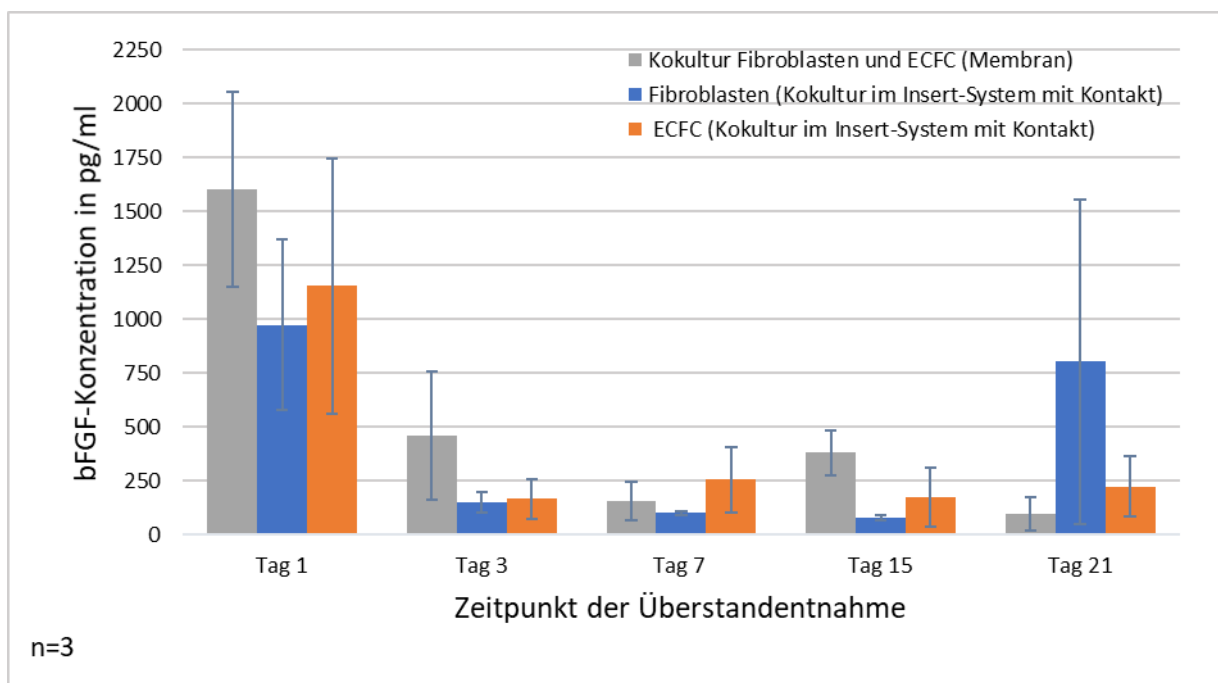


Abbildung 21: bFGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt

Dargestellt ist die IL-8-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System mit interzellulärem Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Im Vergleich der Sekretion durch die Zellen auf der Kollagenmembran mit der Sekretion der Zellen in Kokultur im Insert ohne Kontakt (Abb. 22) verhielt es sich genauso wie im Vergleich mit Kontakt (Abb. 21): An Tag 1, 3 und 15 war die Sekretion durch die Fibroblasten und ECFC auf der Kollagenmembran höher als im Insert-System. An den Tagen 7 und 21 war die Sekretion der Fibroblasten stärker.

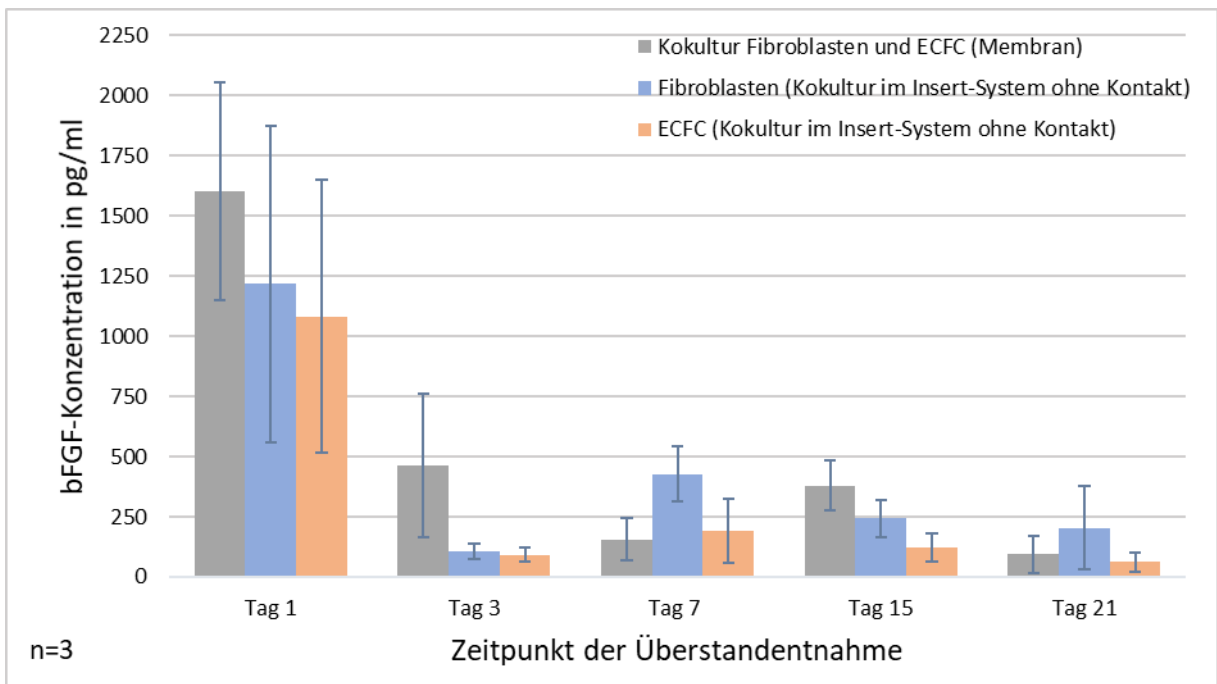


Abbildung 22: bFGF-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt

Dargestellt ist die bFGF-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System ohne interzellulären Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

4.2.5 Ang-2

Die Ang-2-Konzentration durch die Ausschüttung der ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran betrug an Tag 1 5.371 pg/ml. Sie fiel über die Zeit erst ab, stieg nochmals leicht an, um dann erneut bis auf 3.077 pg/ml abzufallen. Der maximale Wert von Tag 1 wurde nicht mehr überschritten. An diesem Tag war die Ausschüttung der Zellen auf der Kollagenmembran noch höher als die der Zellen im Insert-System mit Kontakt. An allen anderen Tagen wurde sie von der Sekretion der ECFC im Insert mit Kontakt übertroffen (Abb. 23).

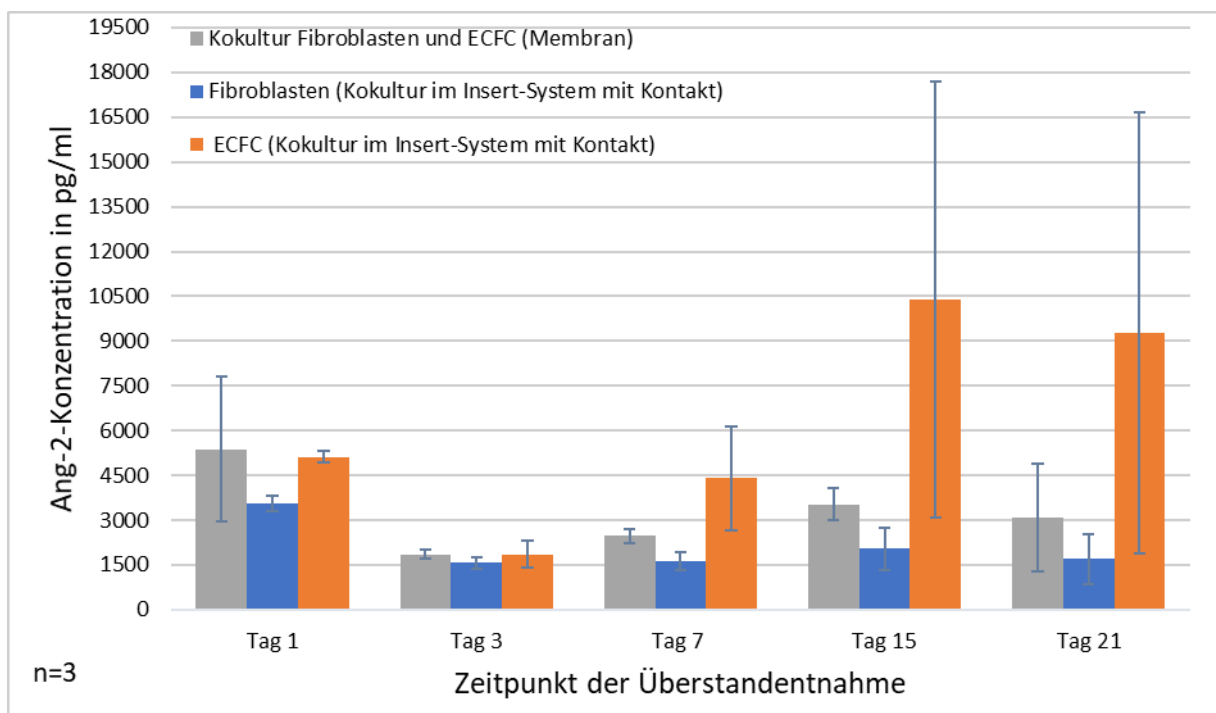


Abbildung 23: Ang-2-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System mit Kontakt

Dargestellt ist die Ang-2-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System mit interzellulärem Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Auch im Vergleich der Ang-2-Sekretion durch die Kokultur auf der Kollagenmembran mit der Kokultur im Insert-System ohne Kontakt konnte nur zu Beginn der Kultur ein Überwiegen der Sekretion auf der Kollagenmembran verzeichnet werden, danach überwog die Sekretion der Fibroblasten oder der ECFC im Insert-System (Abb. 24).

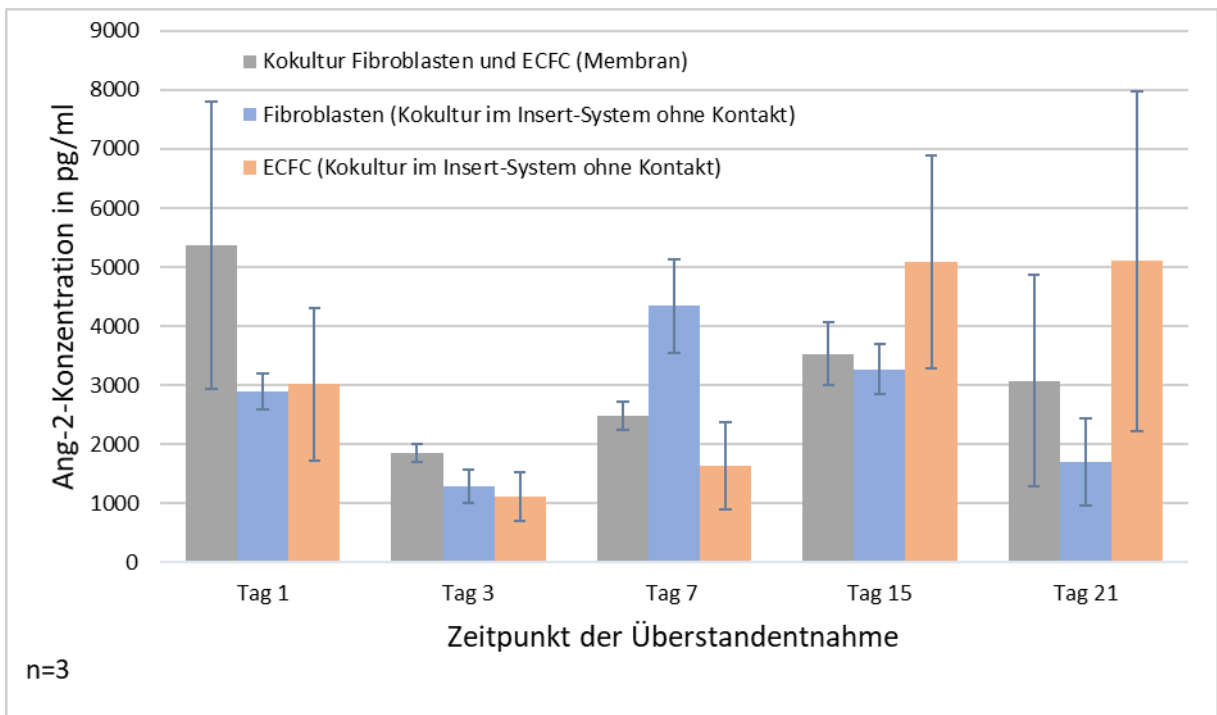


Abbildung 24: Ang-2-Sekretion durch ECFC und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran und in Kokultur im Insert-System ohne Kontakt

Dargestellt ist die Ang-2-Konzentration in Kulturüberständen von Fibroblasten und ECFC in Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran sowie in Kokultur im Insert-System ohne interzellulären Kontakt. Die Kulturüberstände wurden im Insert (ECFC) sowie unter dem Insert (Fibroblasten) entnommen und somit die Sekretion der ECFC und der Fibroblasten getrennt beurteilt. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Werte aus drei Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

4.3 Vergleich des Sekretionsverhalten von HDMEC und ECFC

Hinsichtlich eines Ersatzes der HDMEC durch ECFC bei der Prävaskularisierung von *in vitro* generiertem Schleimhautäquivalentes wurde das Sekretionsverhalten der beiden Zellarten miteinander verglichen.

4.3.1 VEGF

Zuerst wurde das Sekretionsverhalten der verschiedenen Endothelzellen, die jeweils auf der Bio-Gide®-Membran mit Fibroblasten kokultiviert wurden, verglichen (Abb. 25). Dabei fiel auf, dass die VEGF-Sekretion durch die HDMEC über den gesamten Besiedelungszeitraum höher war als die der ECFC. Auffallend war, dass die VEGF-Sekretion beider Zellarten von Tag 1 bis Tag 7 abnahm. Ab Tag 15 stieg sie bei beiden wieder an. Die VEGF-Sekretion der Kokultur mit ECFC fiel danach wieder ab und die der Kokultur mit HDMEC stieg noch weiter an. Das Sekretionsmuster der beiden Zellarten war sich in dieser Kultur sehr ähnlich. Die maximale gemessene VEGF-Konzentration in den Kulturüberständen lag bei den Kokulturen mit HDMEC an Tag 1 bei 1.511 pg/ml und in der Kokultur mit ECFC an Tag 15 bei 1.031 pg/ml (Abb. 25).

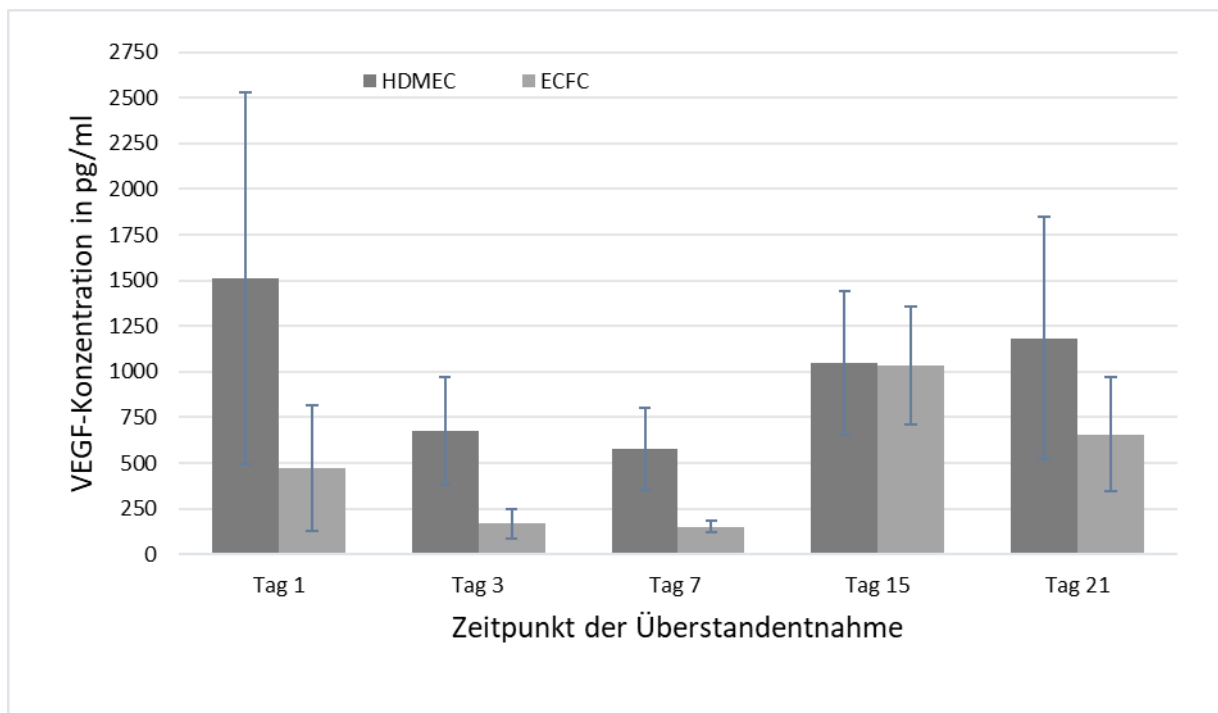


Abbildung 25: VEGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran

Dargestellt ist die VEGF-Konzentration in Kulturüberständen von HDMEC und ECFC in Kokultur mit Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

In Monokultur sezernierten die HDMEC sowohl auf der Membran (Abb. 26a) als auch im Well (Abb. 26b) an Tag 1 deutlich mehr VEGF als die ECFC. Im Kulturüberstand der Monokultur auf der Membran lag die Konzentration des von den HDMEC sezernierten VEGF an Tag 1 bei 1.253 pg/ml, während die Konzentration in der Kultur mit den ECFC nur 60 pg/ml betrug. An den restlichen Tagen sezernierten erst die ECFC mehr VEGF und an den Tagen 15 und 21 die HDMEC. Die HDMEC erreichten nach Tag 1 keine höheren Konzentrationen als 118 pg/ml mehr. Die ECFC erreichten an Tag 3 ihren Maximalwert von 138 pg/ml. Auch im Well (Abb. 26b) wurde die maximale VEGF-Ausschüttung an Tag 1 von den HDMEC erreicht. Die VEGF-Konzentration betrug im Kulturüberstand der HDMEC 1.106 pg/ml, während sie im Kulturüberstand der ECFC nur 62 pg/ml betrug. An den restlichen Tagen des Besiedelungszeitraumes war die Ausschüttung der ECFC höher als die der HDMEC. Die Werte der VEGF-Konzentration der HDMEC bewegten sich von Tag 3 bis Tag 21 zwischen 61 pg/ml und 79 pg/ml. Die ECFC erreichten mit 148 pg/ml an Tag 3 ihre höchste Konzentration im Well (Abb. 26b).

Die VEGF-Sekretion der HDMEC in Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt (Abb. 26c) war an Tag 1 mit einer Konzentration von 1.294 pg/ml am stärksten. Sie fiel danach stark ab auf 18 pg/ml. Sie stieg danach nochmals an und erreichte an Tag 21 453 pg/ml. An den Tagen 3, 7 und 15 sezernierten die ECFC mehr VEGF als die HDMEC. Die maximal erreichte Konzentration von VEGF in den Kulturüberständen erreichten sie an Tag 3 mit 177 pg/ml

Interessanter war die VEGF-Produktion der Fibroblasten jeweils in Kokultur mit den HDMEC und den ECFC (Abb. 26d). Im Kulturüberstand der Fibroblasten, die mit HDMEC im Insert kokultiviert wurden, wurde genau wie bei den HDMEC an Tag 1 die maximale Konzentration von 1.290 pg/ml erreicht. Sie fiel an Tag 3 ab und stieg danach erneut an. Die Fibroblasten, die mit ECFC kultiviert wurden, erreichten bis Tag 15 ihre maximal sezernierte Konzentration von 2.071 pg/ml und fielen an Tag 21 ebenfalls wieder ab.

In allen Kulturen sezernierten die HDMEC an Tag 1 viel VEGF, fielen danach ab, um teilweise wieder anzusteigen. Bis auf das unterschieden sich die HDMEC und die ECFC in Monokultur wenig. In Kokultur von Fibroblasten und Endothelzellen auf der Kollagenmembran überwog die Ausschüttung von VEGF durch HDMEC.

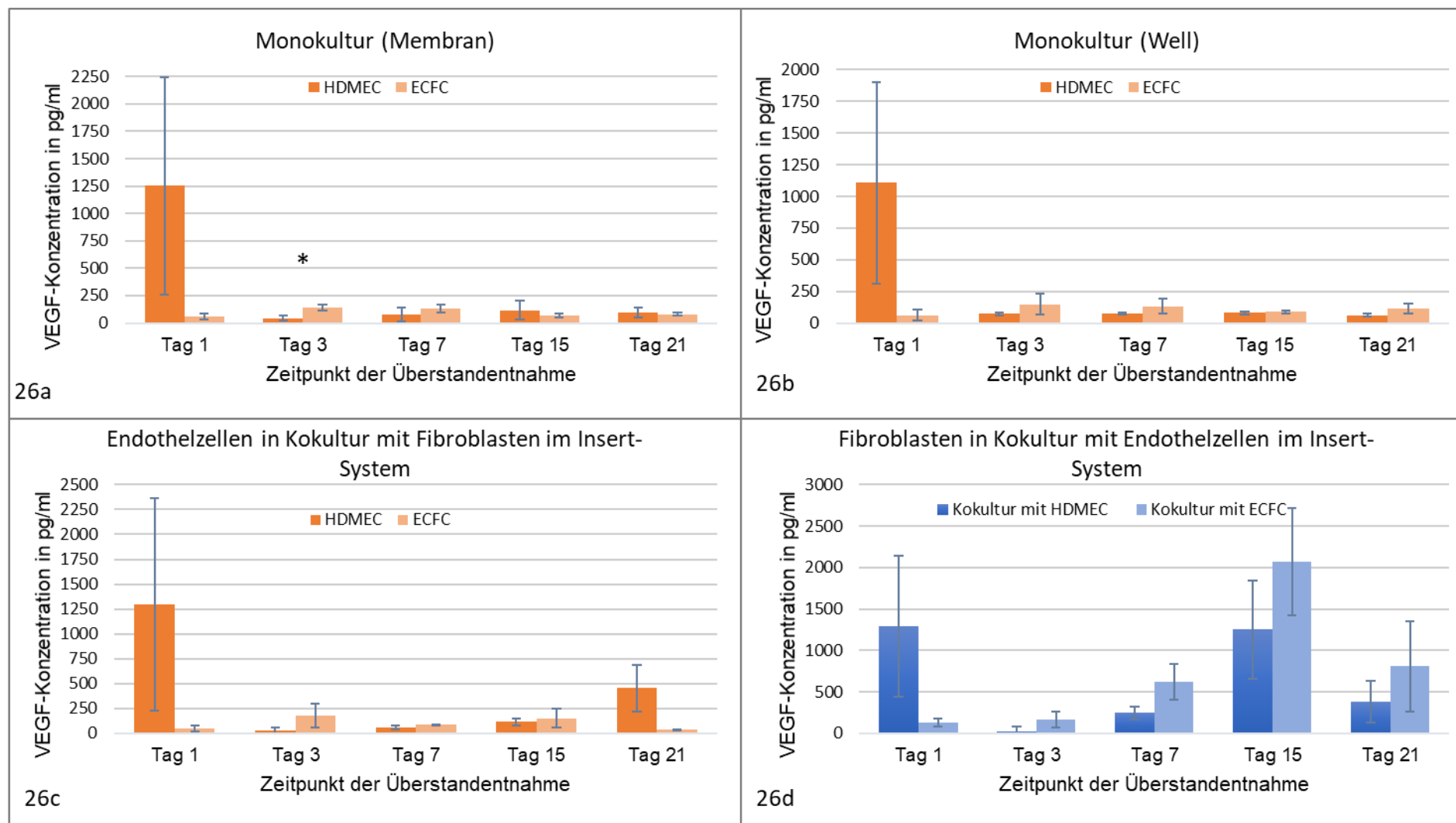


Abbildung 26: Vergleich der VEGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen

Dargestellt sind die VEGF-Konzentrationen der Kulturüberstände von ECFC und HDMEC in verschiedenen Kulturen. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Abb. 26a: Monokultur auf der Membran Abb. 26b: Monokultur im Well Abb. 26c und Abb. 26d: Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt. Die Überstände wurden getrennt entnommen, wobei im Insert die Überstände der Endothelzellen (Abb. 26c) und unter dem Insert (Abb. 26d) die Überstände der Fibroblasten waren.

4.3.2 IL-8

In Kokultur auf der Kollagenmembran (Abb. 27) war die IL-8-Sekretion der ECFC an Tag 1 mit einer erreichten Konzentration von 4.446 pg/ml noch stärker als die der HDMEC mit einer Konzentration von 3.035 pg/ml. An Tag 3 fielen die Konzentrationen beider Zellarten auf 853 pg/ml und 757 pg/ml ab, wobei die Sekretion der ECFC noch stärker war als die der HDMEC. Ab Tag 7 jedoch sezernierten die Kokulturen mit den HDMEC mehr IL-8 als die Kokulturen mit den ECFC.

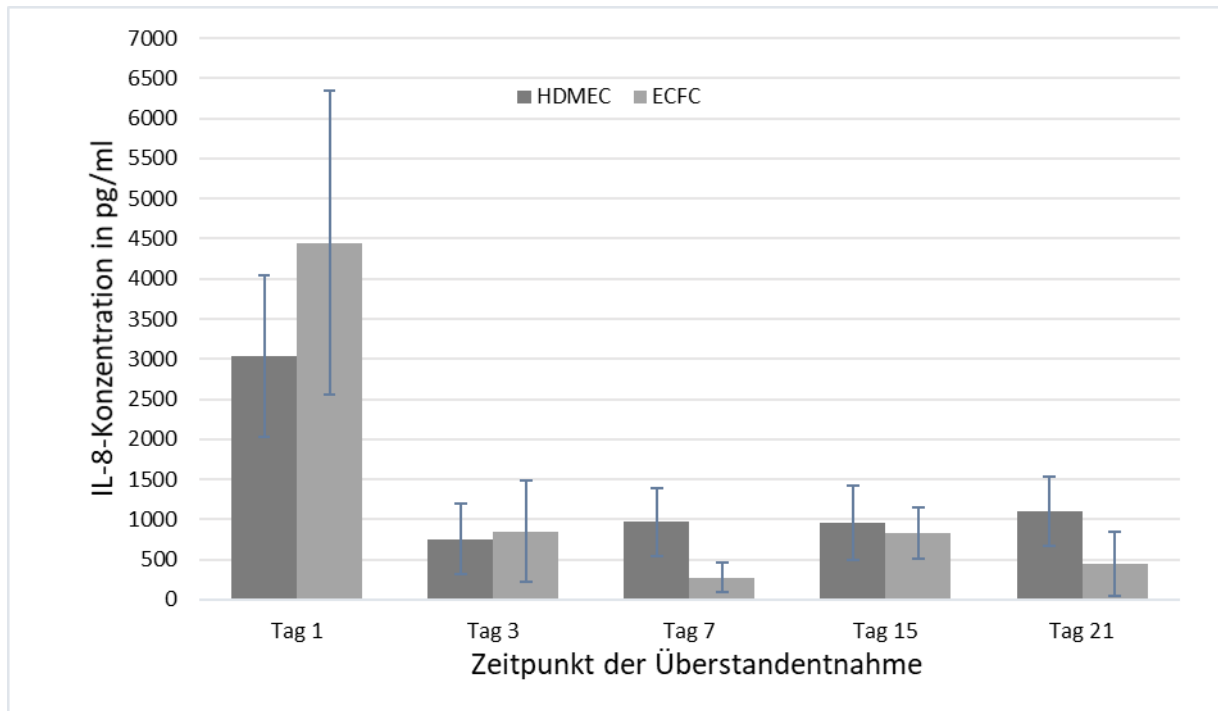


Abbildung 27: IL-8-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran

Dargestellt ist die IL-8-Konzentration in Kulturüberständen von HDMEC und ECFC in Kokultur mit Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

In Monokultur sezernierten die ECFC sowohl auf der Membran (Abb. 28a) als auch im Well (Abb. 28b) mehr IL-8 als die HDMEC. Vor allem an Tag 1 führte die IL-8-Sekretion durch die ECFC zu hohen Konzentrationen: Auf der Membran 3.963 pg/ml und im Well 2.579 pg/ml. Die HDMEC erreichten ihre Maximalsekretion bereits an Tag 1 mit Konzentrationen von 1.257 pg/ml und 906 pg/ml. Das Sekretionsverhalten der beiden verschiedenen Endothelzellen über den gesamten Besiedlungszeitraum ähnelte sich hinsichtlich IL-8 stark, auch wenn die ECFC höhere Konzentrationen erreichten

In den Kokulturen im Insert-System war die IL-8-Konzentration im Kulturüberstand auf der Seite der Endothelzellen an allen Tagen durch die HDMEC höher als durch die ECFC (Abb. 28c). Jedoch wurden von beiden Endothelzellen an allen Tagen niedrigere Konzentrationen erreicht als in der Kokultur auf der Membran. Sowohl die HDMEC als auch die ECFC sezernierten im Insert von Tag 1 auf Tag 3 weniger IL-8, stiegen danach nochmals bis Tag 15 an, um danach wieder weniger zu sezernieren. Die HDMEC erreichten dabei eine Höchstkonzentration von 1.048 pg/ml und die ECFC 769 pg/ml. Auf der Seite der Fibroblasten war die IL-8-Sekretion der Fibroblasten, die mit den HDMEC kokultiviert wurden, an den Tagen 1, 3 und 21 höher als die Sekretion der Fibroblasten, die mit ECFC kokultiviert wurden (Abb. 28d). Während in Monokultur die ECFC eindeutig mehr IL-8 ausschütteten als die HDMEC, war in Kokultur die Sekretion der HDMEC höher.

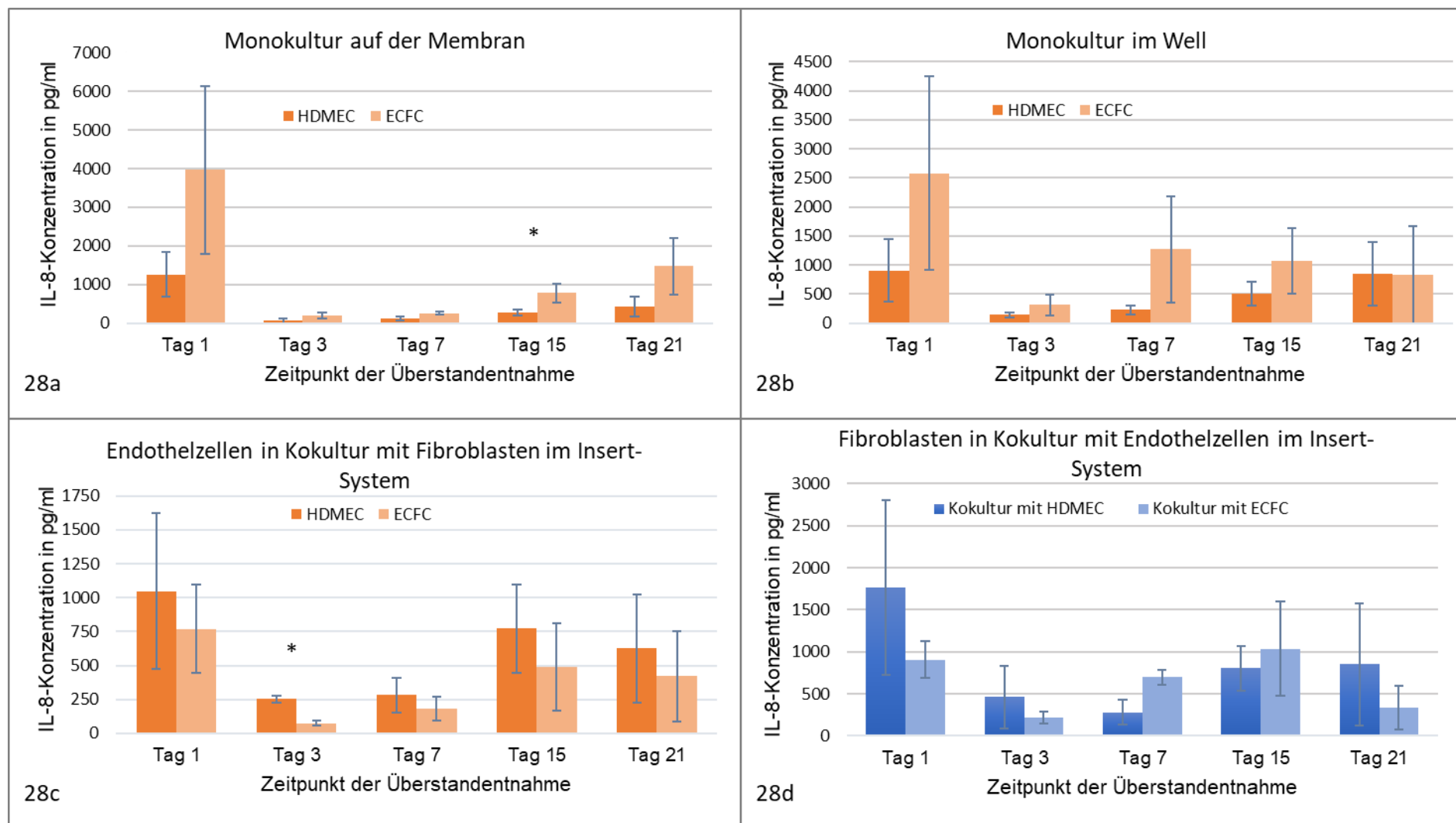


Abbildung 28 Vergleich der IL-8-Sekretion durch HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen

Dargestellt sind die IL-8-Konzentrationen der Kulturüberstände von ECFC und HDMEC in verschiedenen Kulturen. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Abb. 28a: Monokultur auf der Membran Abb. 28b: Monokultur im Well Abb. 28c und Abb. 28d: Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt. Die Überstände wurden getrennt entnommen, wobei im Insert die Überstände der Endothelzellen (Abb. 28c) und unter dem Insert die Überstände der Fibroblasten (Abb. 28d) waren.

4.3.3 eNOS

In der Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran war die eNOS-Sekretion der Kokultur mit ECFC stärker als die der Kokultur mit HDMEC (Abb. 29). Hier konnte man ein schwaches Absinken des von ECFC abgegebenen eNOS zur Mitte des Besiedelungszeitraumes erkennen. Die HDMEC dagegen sezernierten zur Mitte hin tendenziell stärker.

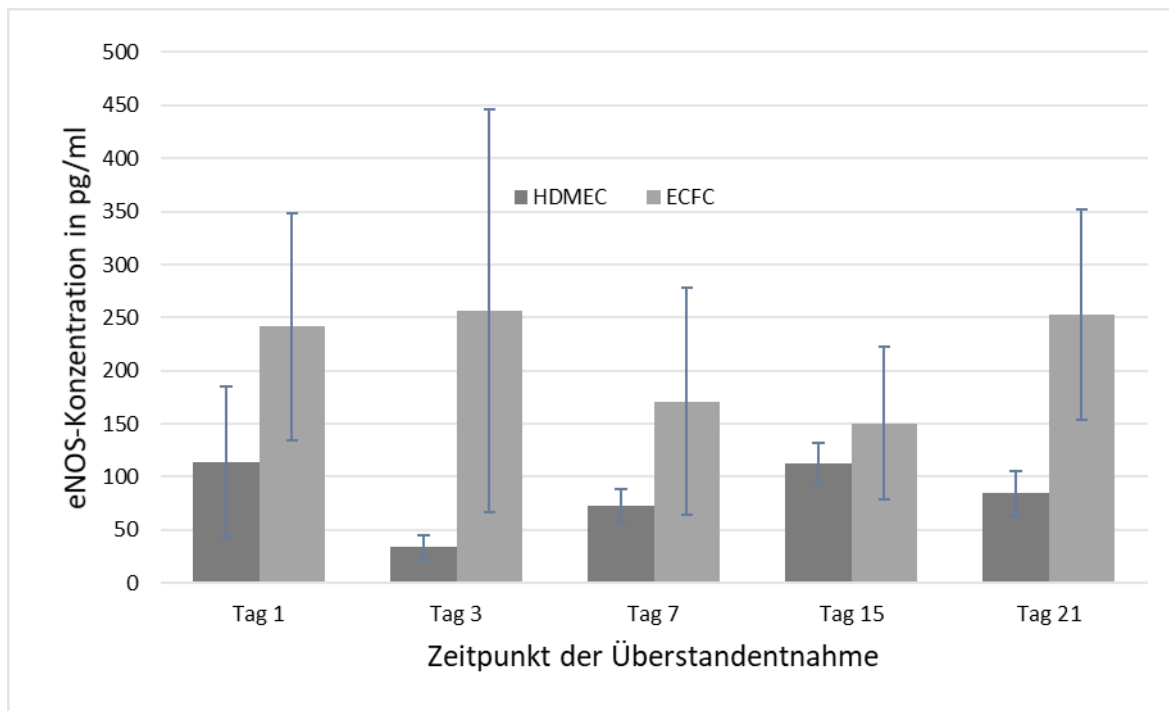


Abbildung 29: eNOS-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran

Dargestellt ist die eNOS-Konzentration in Kulturüberständen von HDMEC und ECFC in Kokultur mit Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Die eNOS-Sekretion in Monokultur auf der Membran (Abb. 30a) war durch die ECFC an allen Tagen des Besiedelungszeitraumes höher als die der HDMEC. Die Konzentrationen, die von den HDMEC erreicht wurden, bewegten sich alle zwischen 88 pg/ml und 113 pg/ml. Das durch die ECFC ausgeschüttete eNOS erreichte zu Beginn eine Konzentration von 320 pg/ml und fiel über die Zeit bis auf 167 pg/ml ab.

In der Monokultur im Well (Abb. 30b) war der Unterschied nicht so klar abzugrenzen wie auf der Membran: An den Tagen 1, 3, 7 und 21 bewegten sich die Konzentrationen von eNOS, das durch HDMEC ausgeschüttet wurde, zwischen 59 pg/ml und 78 pg/ml. An Tag 15 war ein Anstieg auf 256 pg/ml zu verzeichnen. Die Konzentration des von ECFC ausgeschütteten eNOS betrug an Tag 1 355 pg/ml und fiel bis Tag 7 auf 15 pg/ml ab, um danach wieder anzusteigen.

Während also die ECFC in Monokultur im Well zur Mitte des Besiedelungszeitraumes weniger eNOS sezernierten, gaben die HDMEC zu diesem Zeitpunkt mehr eNOS ab. Dabei war die Sekretion der HDMEC an den Tagen 7 und 15 stärker als die der ECFC (Abb. 30b).

In der Kokultur mit den Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt (Abb. 30c) war vor allem an Tag 1 die Konzentration des Inserts auf Seiten der ECFC höher als die auf der Seite des HDMEC: 415 pg/ml zu 70 pg/ml. An Tag 3 war der Unterschied nicht mehr so stark und ab Tag 7 war nur noch wenig Unterschied zwischen den beiden Endothelzellarten zu erkennen. Die Fibroblasten, die im Insert-System mit den ECFC kultiviert wurden, sezernierten zu Beginn der Besiedelung mehr eNOS als die, die mit den HDMEC kultiviert wurden (Abb. 45d). Vor allem an Tag 15 war der Unterschied deutlich: Die Konzentration von eNOS betrug 631 pg/ml im Kulturüberstand der Fibroblasten, die mit den ECFC kokultiviert wurden, während die Fibroblasten, die mit den HDMEC kokultiviert wurden, nur 61 pg/ml erreichten. An Tag 15 glich sich die Sekretion der Fibroblasten in Kokultur mit den ECFC den Fibroblasten in Kokultur mit den HDMEC an: es lagen eNOS-Konzentrationen von 102 pg/ml und 106 pg/ml vor. Während die Konzentration in den Kulturüberständen mit HDMEC an Tag 21 nur geringfügig auf 89 pg/ml absank, wurde in der Kokultur mit ECFC an Tag 21 gar kein eNOS mehr sezerniert. Auffallend war der starke Anstieg des sezernierten eNOS der Fibroblasten in Kokultur ohne Kontakt mit den ECFC an Tag 7 (Abb. 30d). Die ECFC schütteten immer dann mehr eNOS aus als die HDMEC, wenn sie auf der Kollagenmembran kultiviert wurden. Dies trifft sowohl auf Monokulturen als auch auf Kokulturen mit Fibroblasten zu.

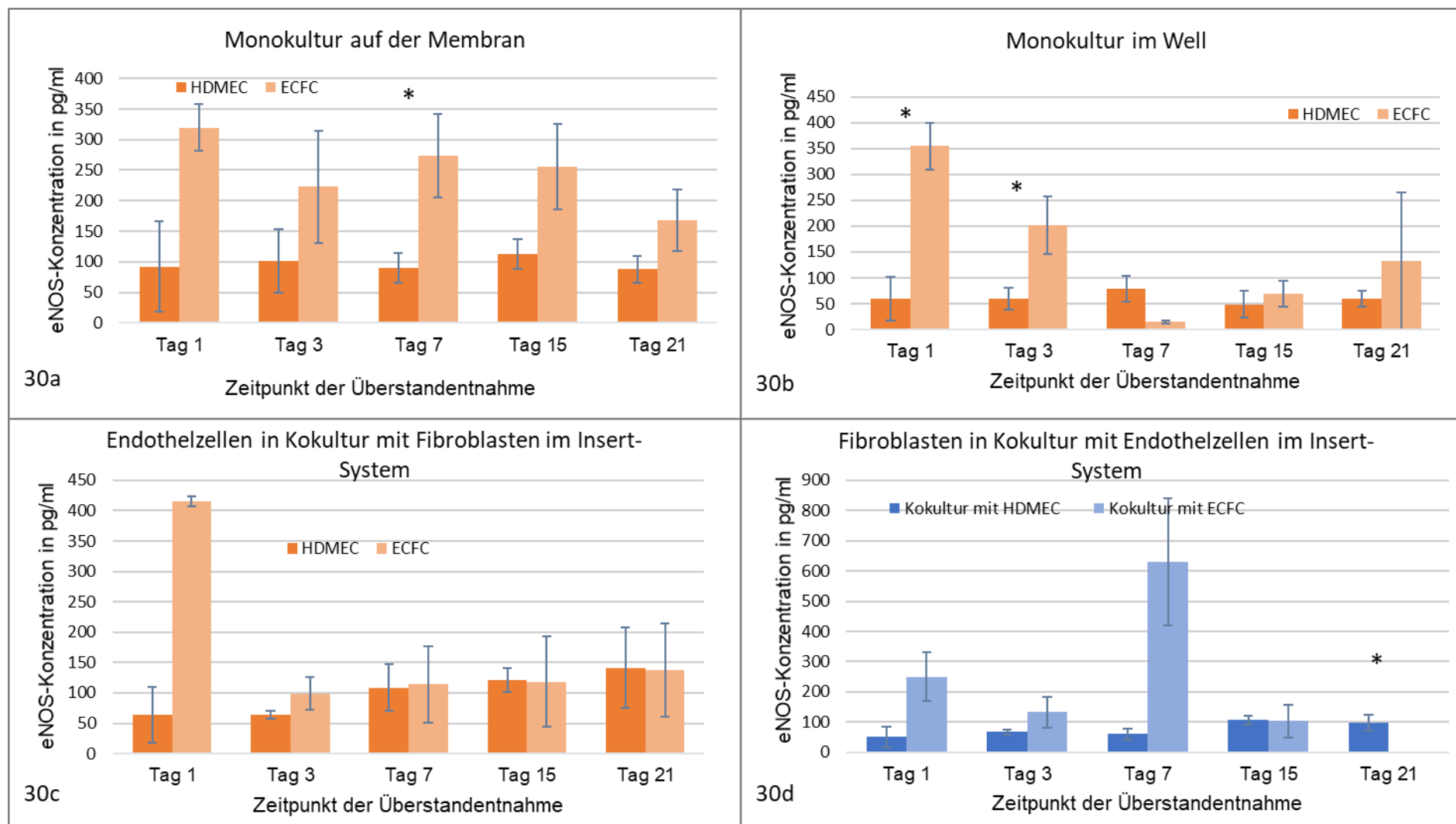


Abbildung 30: Vergleich der eNOS-Sekretion von HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen

Dargestellt sind die eNOS-Konzentrationen der Kulturüberstände von ECFC und HDMEC in verschiedenen Kulturen. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Abb. 30a: Monokultur auf der Membran Abb. 30b: Monokultur im Well Abb. 30c und Abb. 30d: Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt. Die Überstände wurden getrennt entnommen, wobei im Insert die Überstände der Endothelzellen (Abb. 30c) und unter dem Insert die Überstände der Fibroblasten (Abb. 30d) waren.

4.3.4 bFGF

In Kokultur mit Fibroblasten auf der Membran (Abb. 31) schütteten Kokulturen mit ECFC mehr bFGF aus als die Kokulturen mit HDMEC. Der Unterschied war an Tag 1 besonders deutlich. In den Überständen der Kokulturen mit den ECFC wurden Konzentrationen von 1.602 pg/ml gemessen, in denen der HDMEC nur 496 pg/ml. Auch an den Tagen 3 und 15 unterschieden sich die Sekretionen deutlich voneinander, während sie sich an den Tagen 7 und 21 aneinander annäherten.

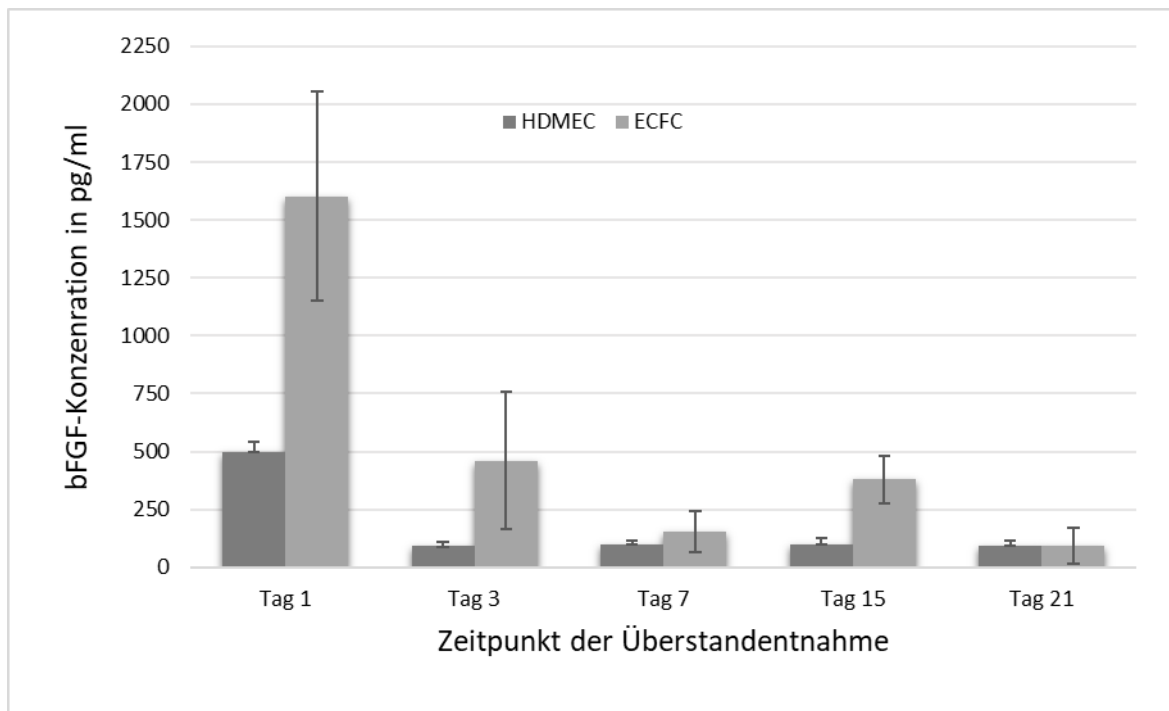


Abbildung 31: bFGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran

Dargestellt ist die bFGF-Konzentration in Kulturüberständen von HDMEC und ECFC in Kokultur mit Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

In Monokultur auf der Membran (Abb. 32a) und im Well (Abb. 32b) war die bFGF-Sekretion von ECFC zu allen Zeitpunkten höher als die der HDMEC. Sowohl auf der Membran als auch im Well nahm die Sekretion beider Endothelzellen über die Zeit ab. Auf der Membran war der Unterschied an den Tagen 1 und 15 besonders stark. In den Kulturüberständen der ECFC lag an Tag 1 eine bFGF-Konzentration von 1.291 pg/ml vor, während es bei den HDMEC nur 389 pg/ml waren. An Tag 15 erreichten die ECFC Konzentrationen von 407 pg/ml und die HDMEC 80 pg/ml. Auch in der Monokultur im Well (Abb. 32b) war die Sekretion an Tag 1 am stärksten. In den Kulturüberständen der ECFC lag die Konzentration bei 1.042 pg/ml und die

der HDMEC bei 334 pg/ml. Insgesamt war die Sekretion beider Zellarten im Well meistens niedriger als auf der Membran.

In den Kokulturen im Insert-System ohne Kontakt änderte sich das Bild sowohl hinsichtlich der Sekretion der Endothelzellen (Abb. 32c) als auch der Fibroblasten (Abb. 32d). An Tag 1 war die Sekretion der Kokulturen mit den ECFC höher als die mit den HDMEC. Während die ECFC ihren Maximalwert von 1.081 pg/ml erreichten, sezernierten die HDMEC nur 397 pg/ml. Bei den Fibroblasten waren es 1.217 pg/ml zu 291 pg/ml. Ab Tag 3 gaben dann die HDMEC und ihre zugehörigen Fibroblasten mehr bFGF ab als die ECFC. Ab diesem Tag war die Sekretion der Fibroblasten der Sekretion der Endothelzellen überlegen. Das Sekretionsmuster der Endothelzellen verhielt sich zu den mit ihnen kokultivierten Fibroblasten gleich: Die ECFC sezernierten an Tag 1 stark, fielen an Tag 3 ab, stiegen an Tag 7 nochmals leicht an und fielen dann bis Tag 21 erneut ab. Das gleiche Muster wiesen die Fibroblasten, die mit den ECFC in Kokultur waren, auf. In den Kokulturen mit den HDMEC wurde die maximale Konzentration Tag 3 erreicht, fiel dann ab, stieg nochmals leicht an und fiel bis Tag 21 wieder ab (Abb. 32c). Dieses Sekretionsmuster war auch bei den Fibroblasten zu beobachten (Abb. 32d).

Sowohl in den Monokulturen als auch in der Kokultur auf der Membran überwog die bFGF-Sekretion durch ECFC. Im Insert-System war dieses Verhalten nur an Tag 1 zu erkennen, an den anderen Tagen sezernierten die HDMEC mehr bFGF.

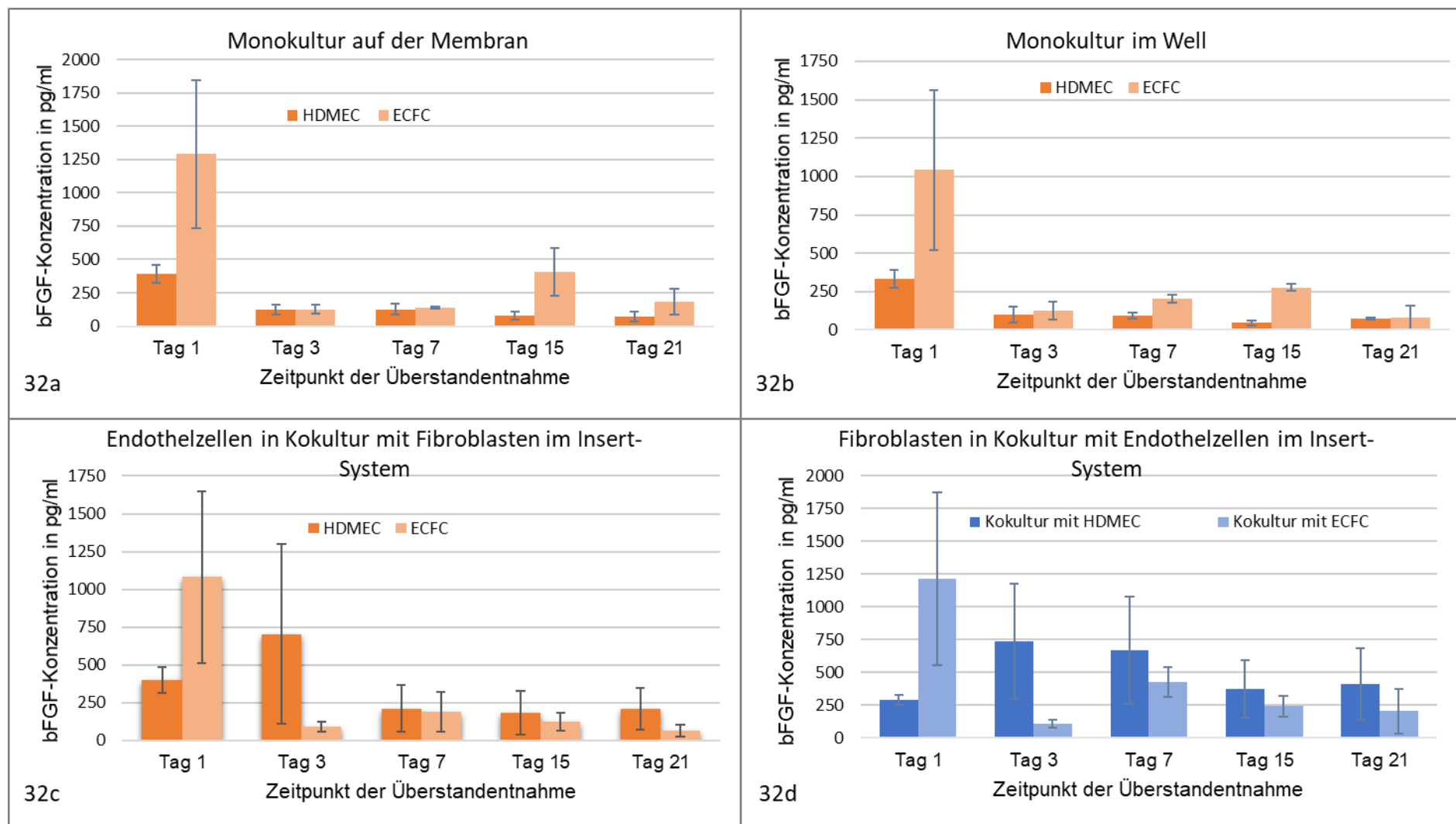


Abbildung 32: Vergleich der bFGF-Sekretion durch HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen

Dargestellt sind bFGF-Konzentrationen der Kulturüberstände von ECFC und HDMEC in verschiedenen Kulturen. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Abb. 32a: Monokultur auf der Membran Abb. 32b: Monokultur im Well Abb. 32c und 32d: Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt. Die Überstände wurden getrennt entnommen, wobei im Insert die Überstände der Endothelzellen (Abb. 32c) und unter dem Insert die Überstände der Fibroblasten (Abb. 32d) waren.

4.3.5 Ang-2

Im Vergleich der Ang-2-Sekretion durch Kokulturen von Endothelzellen mit Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran fiel auf, dass sowohl in den Kulturen mit den HDMEC als auch in den Kulturen mit den ECFC die Ang-2 Sekretion an Tag 1 am stärksten war (Abb. 33). An Tag 1 war der stärkste Unterschied in der Sekretion zwischen den HDMEC und den ECFC zu verzeichnen. In den Kulturüberständen der Kokulturen mit HDMEC wurden Konzentrationen von 22.809 pg/ml erreicht, während die Kulturüberstände der Kokulturen mit den ECFC nur 5.371 pg/ml erreichten. Danach fiel das produzierte Ang-2 beider Endothelzellarten ab und blieb meistens unter einer Konzentration von 5.000 pg/ml, wobei die HDMEC an den meisten Tagen mehr sezernierten als die ECFC (Abb. 33).

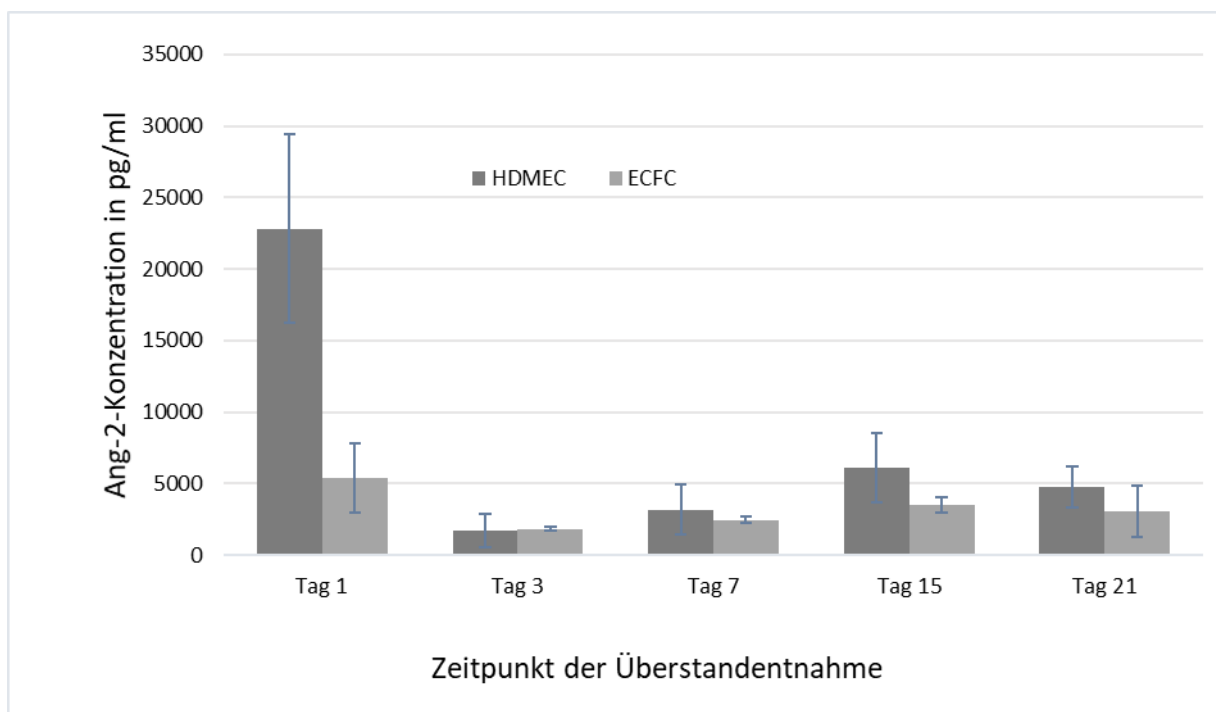


Abbildung 33: Ang-2-Sekretion durch HDMEC und ECFC jeweils in Kokultur mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran

Dargestellt ist die Ang-2-Konzentration in Kulturüberständen von HDMEC und ECFC in Kokultur mit Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

In Monokultur auf der Membran war die Ang-2-Ausschüttung durch HDMEC an allen Tagen höher als die durch die ECFC (Abb. 34a). Sowohl die HDMEC als auch die ECFC sezernierten unter diesen Kulturbedingungen an Tag 1 die größte Menge Ang-2, um danach abzufallen und über die Besiedelungszeit wieder anzusteigen. Die maximal gemessene Ang-2-Konzentration in den Überständen der HDMEC in Monokultur auf der Membran lag bei 23.735 pg/ml,

während in den Überständen der ECFC die Konzentration von 6.296 pg/ml nicht überschritten wurde.

In Monokultur im Well (Abb. 34b) gaben die ECFC an Tag 1 mit einer Konzentration von 7.202 pg/ml mehr Ang-2 ab als die HDMEC, in deren Kulturüberstand nur eine Konzentration von 2.678 pg/ml gemessen wurde. Im restlichen Besiedelungszeitraum war wie in Monokultur auf der Membran die Sekretion der HDMEC höher als die der ECFC (Abb. 34b). In den Kulturüberständen der HDMEC in Monokultur auf der Membran lagen die Ang-2-Konzentrationen immer über 7.315 pg/ml (Abb. 34a) und die Ang-2-Konzentrationen in der Monokultur im Well lagen immer unter 6000 pg/ml (Abb. 34b). Während die HDMEC auf der Membran höhere Werte erreichen als im Well, verhielt es sich bei den ECFC genau andersrum. Dennoch war die Ang-2-Sekretion der HDMEC noch höher als die der ECFC.

In Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt war an Tag 1 ein leichtes Überwiegen der Sekretion durch ECFC zu erkennen (Abb. 34c). An den restlichen Tagen der Besiedelungszeit sezernierten die HDMEC in Kokultur im Insert-System mehr Ang-2 als die ECFC. Die Ang-2-Sekretion der HDMEC in Kokultur mit den Fibroblasten stieg bis Tag 15 kontinuierlich an und fiel lediglich an Tag 21 leicht ab. Die maximal gemessene Konzentration von Ang-2 in den Kulturüberständen auf Seiten der HDMEC war an Tag 15 bei 10.987 pg/ml. Die ECFC dagegen fielen nach Tag 1 ab, um dann anzusteigen. Sie erreichten eine maximale Ang-2-Konzentration von 5.104 pg/ml an Tag 21.

Das Sekretionsverhalten von Ang-2 durch Fibroblasten, die mit HDMEC beziehungsweise ECFC im Insert-System kokultiviert wurden, war ähnlich (Abb. 34d): Es fiel jeweils an Tag 3 erst ab, um dann anzusteigen und nach Tag 15 wieder abzufallen. Zu Beginn des Besiedelungszeitraumes überwog dabei die Ausschüttung der Fibroblasten in Kokultur mit den ECFC. An Tag 15 erreichte führte die Ang-2-Sekretion durch die Fibroblasten in Kokultur mit den HDMEC zu einer Konzentration von 12.329 pg/ml. Alle anderen Konzentrationen blieben unter 5.000 pg/ml (Abb. 34d).

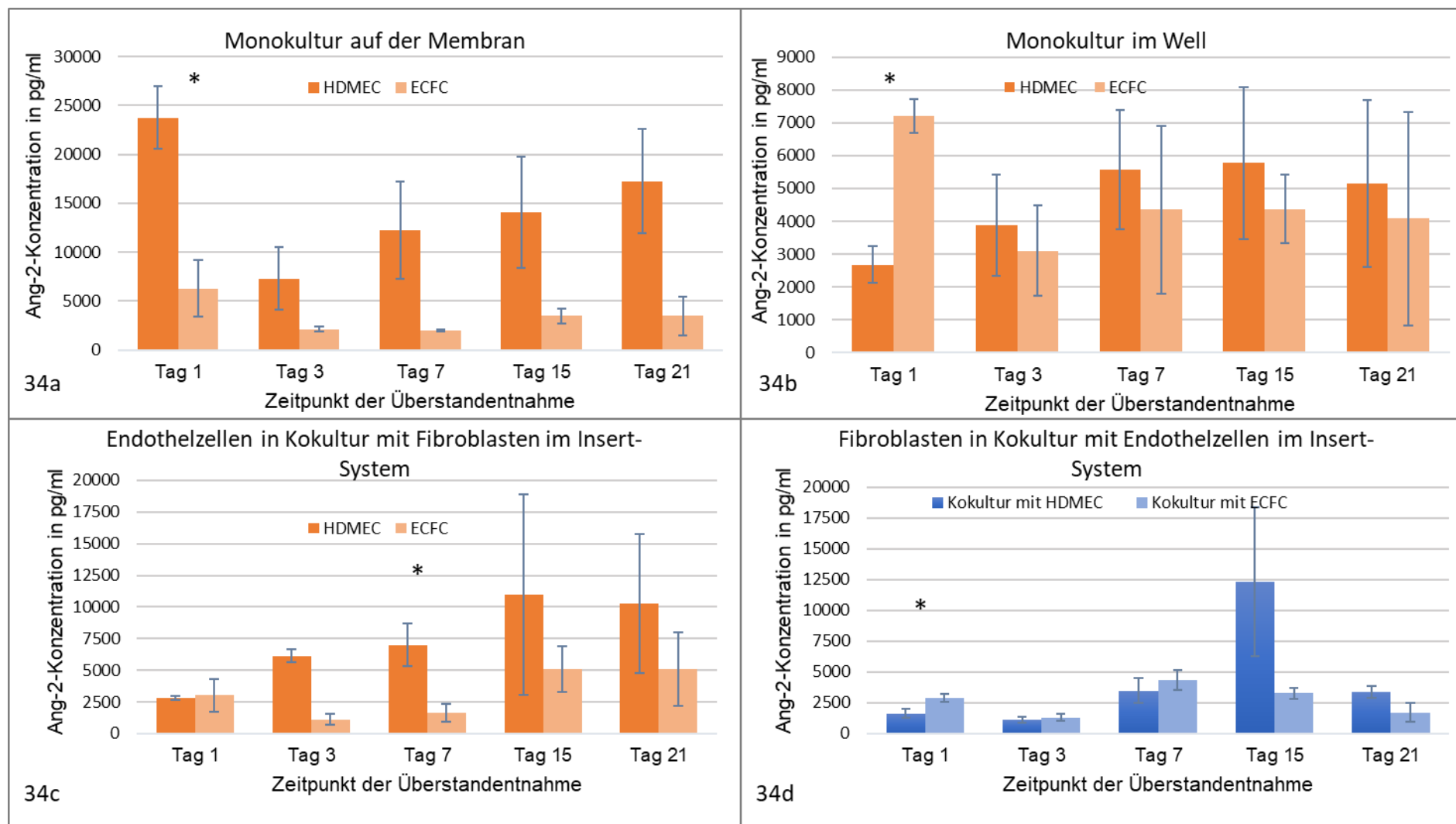


Abbildung 34: Vergleich der Ang-2-Sekretion von HDMEC und ECFC in verschiedenen Kulturen

Dargestellt sind die Ang-2-Konzentrationen der Kulturüberstände von ECFC und HDMEC in verschiedenen Kulturen. Die Überstandentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21. Die Überstände wurden mittels ELISA quantifiziert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Abb. 34a: Monokultur auf der Membran Abb. 34b: Monokultur im Well Abb. 34c und 34d: Kokultur mit Fibroblasten im Insert-System ohne Kontakt. Die Überstände wurden getrennt entnommen, wobei im Insert die Überstände der Endothelzellen (Abb. 34c) und unter dem Insert die Überstände der Fibroblasten (Abb. 34d) waren.

4.4 Zytokin-Sekretion im Rahmen der Prävaskularisierung eines Schleimhautäquivalentes unter Verwendung von HDMEC oder ECFC

Beim Vergleich der Sekretion aller fünf untersuchten Zytokine durch Kokulturen von Endothelzellen und Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran fiel auf, dass sowohl in Kultur mit den HDMEC als auch in Kokultur mit den ECFC an Tag 1 insgesamt eine hohe sekretorische Aktivität vorlag (Abb. 35). Beide Kokulturen sezernierten an keinem weiteren Tag so viel Ang-2, Il-8 und bFGF. Auch hinsichtlich der eNOS-Sekretion war das Verhalten der beiden Kokulturen vergleichbar. Beide gaben an allen Tagen nur ein basales Level von eNOS ohne massive Schwankungen ab. Hinsichtlich der VEGF-Sekretion unterschieden sie sich insofern, als dass die Kokultur mit den ECFC an Tag 1 keine so starke Ausschüttung bewirkte und diese ihre maximale Sekretion an Tag 15 erreichten (Abb. 35a), während die Kokultur mit den HDMEC an Tag 1 die höchste VEGF-Sekretion verzeichnete (Abb. 35b). Jedoch war auch bei den HDMEC ein erneuter Anstieg der VEGF-Sekretion zur Mitte der Besiedelungszeit zu erkennen, wenn auch weniger stark als bei den ECFC.

Auch wenn die Sekretion in den beiden Kokulturen sehr ähnlich war, fiel ein homogeneres Sekretionsmuster durch die ECFC auf. In den Überständen der Kokultur mit den ECFC gab es an Tag 1 und Tag 15 einen Peak aller Zytokin-Konzentrationen. Davon ausgenommen ist an Tag 15 ein leichter Abfall der eNOS-Sekretion wohingegen die anderen Zytokine deutlich anstiegen (Abb. 35a). Dieses Verhalten zeigten die HDMEC tendenziell ebenfalls in Bezug auf die Sekretion von Ang-2 und VEGF (Abb. 35b). Hinsichtlich der drei anderen Zytokine blieb dieser deutliche Anstieg an Tag 15 jedoch aus. Insgesamt war hier nach Tag 1 eine relativ konstante Sekretion aller Zytokine zu verzeichnen.

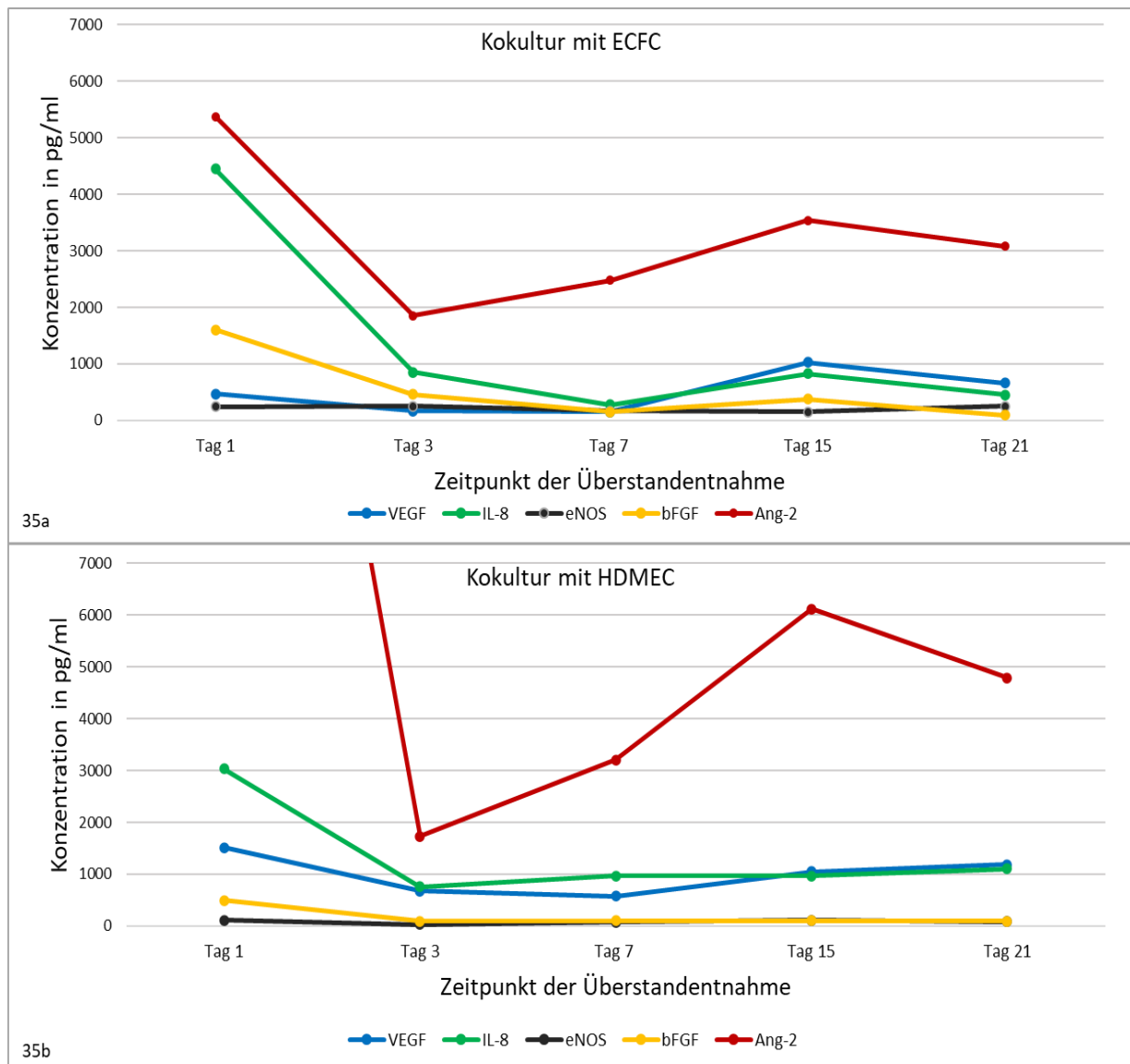


Abbildung 35: Zytokin-Sekretion durch Endothelzellen und Fibroblasten in Kokultur auf der Kollagenmembran
 Dargestellt ist die Konzentration der Zytokine VEGF, IL-8, eNOS, bFGF und Ang-2 in Kulturüberständen von Kokulturen aus Endothelzellen mit Fibroblasten auf der Kollagenmembran über die Besiedelungszeit von 21 Tagen. Die Überstände stammen von Kokulturen aus Fibroblasten mit ECFC (Abb. 35a) und HDMEC (Abb. 35b). Die Überstände wurden an den Tagen 1, 3, 7, 15 und 21 entnommen und ihre Quantifizierung erfolgte mittels ELISA. Auf die Darstellung der Fehlerindikatoren wurde für die bessere Übersichtlichkeit verzichtet.

5 Diskussion

5.1 Humorale Interaktion von Fibroblasten und ECFC

Um genauere Informationen über die Kommunikation von Fibroblasten und ECFC zu erhalten, wurde die Zytokin-Sekretion durch Fibroblasten und ECFC in Monokultur mit der Zytokin-Sekretion von Fibroblasten und ECFC in Kokultur verglichen. Die Monokultur erfolgte im Well und die Kokultur im Insert-System. Im Insert-System konnte die Kultur sowohl ohne interzellulären Kontakt als auch mit Kontakt zwischen den Fibroblasten und den ECFC erfolgen. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, die Zellkulturüberstände der Fibroblasten und der ECFC getrennt zu entnehmen und auf die enthaltenen Zytokine zu untersuchen.

Wie zu erwarten war, wurde ein Großteil des VEGF durch die Fibroblasten sezerniert. Aus Untersuchungen zu Wundheilung und der Tumorforschung ist bekannt, dass Fibroblasten nicht nur EZM produzieren, sondern auch eine wichtige Quelle für VEGF darstellen. Sie selbst besitzen bis auf wenige Ausnahmen keine Rezeptoren für VEGF (Kalluri and Zeisberg, 2006, Moens et al., 2014). Die Fibroblasten sind über das sezernierte VEGF und dessen Wirkung an dem VEGFR2 an der Tubulogenese beteiligt (Kellouche et al., 2007). Wurden die Fibroblasten mit den ECFC kokultiviert, stieg die sezernierte Menge an VEGF. Besonders deutlich war dieser Effekt in der Kokultur im Insert-System ohne interzellulären Kontakt zwischen den Fibroblasten und den ECFC zu verzeichnen. Da die Rezeptoren für VEGF hauptsächlich auf Endothelzellen und ihren Vorläuferzellen zu finden sind (Rakocevic et al., 2017), kann das sezernierte VEGF dort Wirkung zeigen.

Zudem können in Kokultur Interaktionen mit den durch die ECFC sezernierten Zytokinen stattfinden. Die VEGF-Expression in Endothelzellen wird durch bFGF gesteigert (Seghezzi et al., 1998). Auch in Chondrosarkom-Zellen steigert bFGF über unterschiedliche Signalwege die Expression von VEGF (Tzeng et al., 2015). Die bFGF-Sekretion durch Fibroblasten war in Monokultur außer an Tag 1 der Besiedelung niedrig. In Kokultur mit den ECFC dagegen sezernierten sie mehr bFGF. Es wäre denkbar, dass durch die größere Menge an vorliegendem bFGF die VEGF-Sekretion durch Fibroblasten gesteigert wurde. Dieser Effekt der gesteigerten VEGF-Sekretion konnte bei den ECFC dagegen nicht beobachtet werden. Die VEGF-Konzentration in den Überständen der ECFC lag in allen Kulturen zu allen Zeitpunkten unter 200 pg/ml. Dass EPC selbst VEGF sezernieren und nicht nur VEGFR ausbilden, weiß man bereits

aus anderen Arbeiten (Rehman et al., 2003, Abe et al., 2013). Auch die Sekretion von bFGF durch Fibroblasten und Endothelzellen ist seit langem bekannt (Sato and Rifkin, 1988). Mit den vorliegenden Messungen ist belegt, dass auch die Vorläuferzellen von Endothelzellen bFGF sezernieren.

Wurden ursprünglich aktivierte Monozyten und Makrophagen als Quelle von IL-8 genannt, zählt man inzwischen auch Fibroblasten, Endothelzellen und ECFC dazu (Baggiolini et al., 1989, Li et al., 2005, Chen et al., 2008, Blandinieres et al., 2019). Auch in den vorliegenden Messungen war eine IL-8-Sekretion durch die ECFC zu verzeichnen. Es herrscht Uneinigkeit, ob Endothelzellen und ihre Vorläuferzellen IL-8-Rezeptoren exprimieren. Es wurden zwar bereits IL-8-Rezeptoren auf frühen und späten EPC beschrieben (Hur et al., 2004, Smadja et al., 2009, Kimura et al., 2011), in Untersuchungen zu Lungenfibrose jedoch konnte nur nachgewiesen werden, dass ECFC zwar IL-8 abgeben, aber keine Rezeptoren dafür ausbilden (Blandinieres et al., 2019).

Es ist auffallend, dass die ECFC in Monokultur deutlich mehr IL-8 sezernierten als in Kokultur mit den Fibroblasten. Besonders stark war der Unterschied zur sezernierten IL-8-Menge der ECFC die ohne Kontakt mit den Fibroblasten kokultiviert wurden. Über eine VEGF-unabhängige Phosphorylierung mittels Transaktivierung kann IL-8 den VEGFR aktivieren (Petreaca et al., 2007). ECFC sezernierten sowohl in Monokultur als auch in Kokultur wenig VEGF, weshalb dieser Transaktivierung des VEGFR durch IL-8 in Monokultur möglicherweise ein höherer Stellenwert zukommt. Da in Kokultur mit den Fibroblasten das durch sie sezernierte VEGF zur Verfügung stand, war weniger IL-8 notwendig, da der VEGFR durch VEGF selbst aktiviert wird. Eine andere Erklärung für die geringere IL-8-Sekretion durch die ECFC in Kokultur wäre, dass die parakrine Aktivierung der IL-8-Rezeptoren auf den ECFC durch das von den Fibroblasten sezernierte IL-8 ausreicht und nachfolgend IL-8 weniger in autokriner Weise von den Endothelzellen sezerniert wird. Da bisher allerdings nicht hinreichend geklärt ist, ob ECFC IL-8-Rezeptoren ausbilden oder nicht, wären darüber weitere Untersuchungen notwendig, um diese These zu stützen.

Zu Beginn der Besiedelung war die eNOS-Sekretion durch Fibroblasten und ECFC in fast allen Kulturen höher als zu späteren Zeitpunkten. Danach bewegte sie sich in allen Kulturen um einen Wert mit wenigen Schwankungen, was zur konstitutiven Expression passt (Alderton et al., 2001). Im Vergleich der Monokultur mit den Kokulturen im Insert-System war die eNOS-

Sekretion zu den meisten Zeitpunkten in Kokultur etwas höher als in Monokultur. Es gibt eine enge Interaktion von eNOS und VEGF. eNOS moduliert die Wirkung von VEGF auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen (Shizukuda et al., 1999). Mäuse, deren eNOS-Expression blockiert wurde, zeigten trotz Behandlung mit VEGF eine reduzierte Angiogenese, was ein Hinweis dafür ist, dass eNOS ein wichtiger Mediator der Angiogenese durch VEGF ist (Fukumura et al., 2001). Nicht nur die VEGF-Wirkung wird durch eNOS moduliert, sondern auch die eNOS-Wirkung wird durch VEGF beeinflusst. Durch die Calcium-unabhängige Phosphorylierung von eNOS steigert VEGF über den PI3K/Akt-Signalweg die Ausschüttung von NO. In Untersuchungen an HUVEC konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss von VEGF nicht nur die NO-Sekretion über die Aktivierung von eNOS gesteigert wurde, sondern dass auch die Expression von eNOS selbst erhöht war (Papapetropoulos et al., 1997). Da in Kokultur von Fibroblasten und ECFC mehr VEGF sezerniert wurde, konnte dieses möglicherweise seine stimulierenden Effekte auf eNOS entfalten, wodurch die leicht erhöhten eNOS-Konzentrationen in den Überständen der Kokultur erklärt werden könnten.

NO dient nicht nur als Signalmolekül für Effekte wie die Vasodilatation oder als Neurotransmitter (Moncada and Higgs, 2006), sondern es nimmt auch Einfluss auf die IL-8-Sekretion. Diese wurde in Endothelzellen unter dem Einfluss von NO reduziert (De Caterina et al., 1995, Fowler et al., 1999). Es war auffallend, dass die IL-8-Konzentrationen, die in den Überständen der ECFC gemessen wurden, in Kokultur deutlich unter denen in Monokultur lagen. In Kokultur lag das von den Fibroblasten sezernierte VEGF vor. Eine Erklärung für die erniedrigte IL-8-Konzentration könnte sein, dass durch das erhöhte VEGF-Angebot mehr eNOS calciumunabhängig phosphoryliert und dadurch mehr NO gebildet wurde, was wiederum hemmend auf die IL-8-Sekretion wirkt. Um diese These zu stützen wäre in weiteren Versuchen die Untersuchung der NO-Konzentrationen notwendig.

Auch wenn die genauen Mechanismen von Ang-2 im Rahmen der Vaskularisierung noch nicht vollständig aufgeklärt sind, geht man aufgrund von Ergebnissen aus der Tumorforschung davon aus, dass Ang-2 mit VEGF synergistische Wirkungen entfaltet (Daly et al., 2012). Die Konzentration von Ang-2 beträgt im Serum eines gesunden Menschen im Median 1.240 pg/ml. Im Rahmen von entzündlichen Prozessen und der Gefäßreorganisation ist sie erhöht (Helfrich et al., 2009). Als Quelle von Ang-2 sind in erster Linie Endothelzellen bekannt. Aus der Tumorforschung ist allerdings bekannt, dass nicht nur Endothelzellen, sondern auch

Tumorzellen Ang-2 sezernieren (Thurston and Daly, 2012). Eine Sekretion von Ang-2 durch Fibroblasten wie in den vorliegenden Messungen wurde jedoch noch nicht beschrieben. In Monokultur und in Kokultur mit Kontakt war die Ang-2-Konzentration im Kulturüberstand der Fibroblasten nur geringfügig über dem oben genannten physiologischen Wert. Die Ang-2-Sekretion durch die ECFC dagegen lag deutlich darüber.

In früheren Untersuchungen wurde beschrieben, dass VEGF und bFGF die Ang-2-Expression von Endothelzellen verstärkt (Mandriota and Pepper, 1998, Zhang et al., 2003). Dieses Phänomen konnte in unseren Versuchen nicht so deutlich beobachtet werden. Die Ang-2-Sekretion durch ECFC war zwar in der Kokultur mit Kontakt zu späteren Besiedelungszeitpunkten höher als in Monokultur, in der Kokultur ohne Kontakt, in der eine besonders hohe VEGF-Sekretion durch die Fibroblasten vorlag, war die Ang-2-Sekretion jedoch nur etwas höher als in Monokultur.

Insgesamt war auffallend, dass die Sekretion der Zytokine IL-8, bFGF und Ang-2 sowohl in Monokultur als auch in Kokultur von Fibroblasten und ECFC am dritten Besiedelungstag deutlich abfällt. Eine ausreichende Erklärung für diesen Abfall konnte bislang nicht gefunden werden.

5.2 Einsatz von ECFC in der Prävaskularisierung von komplexen Gewebeäquivalenten

Auch wenn die bisherigen Versuche zur Prävaskularisierung eines Gewebeäquivalentes erfolgreich waren (Heller et al., 2016), ist aufgrund der klinischen Anwendung in der Gynäkologie ein Ersatz der HDMEC durch andere Endothelzellen unabdingbar. Da die ECFC aus einer venösen Blutentnahme gewonnen werden können (Joo et al., 2015), was einen geringen Aufwand und ein vergleichsweise niedriges Risiko für die Patientin darstellt, sind sie die vielversprechendste Alternative. Dass eine Prävaskularisierung mittels ECFC möglich ist, wurde bereits festgestellt (Schulze, 2016). Daher wurde das Sekretionsverhalten der ECFC mit dem der bisher verwendeten HDMEC im Rahmen der Vaskularisierung verglichen. Dabei zeigte sich, dass das Sekretionsverhalten der ECFC unter unterschiedlichen Kulturbedingungen dem der HDMEC sehr ähnlich war. Nur in wenigen Ansätzen war das Verhalten von HDMEC und ECFC gegensätzlich (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zytokin-Sekretion der unterschiedlichen Endothelzellen unter verschiedenen Kulturbedingungen

↑: zu mindestens drei Zeitpunkten höhere Sekretion; ↑↑: zu mindestens drei Zeitpunkten doppelte Sekretion; ↑↑↑: zu mindestens drei Zeitpunkten fünffache Sekretion; =: kein Unterschied; ↓: zu mindestens drei Zeitpunkten niedrigere Sekretion. Die farbige Hinterlegung weist auf Unterschiede im Sekretionsverhalten hin, die im Text genauer erläutert werden.

		Monokultur Membran vs. Monokultur Well	Kokultur Membran vs. Monokultur Membran	Kokultur Insert vs. Monokultur Well	Kokultur Insert vs. Kokultur Membran
VEGF	ECFC	=	↑↑↑	=	↑↑ (d 1 ↓)
	HDMEC	↑	↑↑↑	=	= (d 1 ↑)
IL-8	ECFC	↓	↑	↓	↓ ab d 15 ↑
	HDMEC	↓	↑↑	↑	↓ ab d 15 ↑
eNOS	ECFC	↑	=	↑	↑
	HDMEC	↑	=	↑	↑↑
bFGF	ECFC	↑	↑	↓	↑↑
	HDMEC	↑	↑	↑↑	↑↑↑
Ang-2	ECFC	↓	=	↓	↑↑
	HDMEC	↑↑	↓	↑	↑↑

Fibroblasten, die in Kokultur mit den ECFC kultiviert wurden, sezernierten vor allem zu späteren Zeitpunkten der Besiedelung deutlich mehr VEGF als Fibroblasten in Monokultur. Dieser steigernde Effekt wurde in der Kokultur der Fibroblasten mit den HDMEC nicht beobachtet. ECFC scheinen die VEGF-Sekretion von Fibroblasten stärker zu steigern, als das die HDMEC bewirken. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf der oben genannten Steigerung der VEGF-Sekretion (Seghezzi et al., 1998) und -Expression (Tzeng et al., 2015) durch bFGF. Auch wenn dieser Einfluss des bFGF nur bei Endothelzellen beschrieben wurde, ist es denkbar, dass dieser auch bei Fibroblasten zu tragen kommt. Die ECFC sezernierten mehr bFGF als die HDMEC. Dadurch lag in den Kokulturen mit ECFC mehr bFGF vor, was die höhere VEGF-Sekretion der Fibroblasten in Kokultur mit den ECFC erklären könnte.

Die räumliche Nähe von Fibroblasten wirkte sich auf die Zytokin-Sekretion von ECFC und HDMEC unterschiedlich aus. Die VEGF-Sekretion wurde bei beiden Endothelzellen nicht von

der Anwesenheit von Fibroblasten beeinflusst. Allgemein bekannt ist die Sekretion von VEGF im Rahmen der Vaskularisierung unter Hypoxie (Liu et al., 1995). Unabhängig von diesen bekannten proangiogenen Effekten von VEGF zeigen Untersuchungen von Lee et al, dass Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen VEGF in einem basalen Level sezernieren und damit in autokriner Weise zur Aufrechterhaltung der Homöostase und der Zellfunktionalität beitragen (Lee et al., 2007). In den vorliegenden Untersuchungen sezernierten die ECFC zu allen Zeitpunkten in allen Kulturen nur eine basale Menge an VEGF, sodass die Konzentration in den Überständen immer unter 200 pg/ml lag. Auch die HDMEC sezernierten außer an Tag 1 nur eine geringe Menge an VEGF. Hieraus lässt sich schließen, dass nicht nur reife Endothelzellen, sondern auch die Vorläuferzellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase VEGF sezernieren und dass die proangiogene Wirkung von VEGF vor allem über das in deutlich höheren Konzentrationen von den Fibroblasten sezernierte VEGF entfaltet wird.

Die ECFC sezernierten in Anwesenheit der Fibroblasten weniger IL-8, bFGF und Ang-2 als in Monokultur, wohingegen die Sekretion dieser Zytokine durch die HDMEC zunahm (Tabelle 1 grün hinterlegt). Während wie oben beschrieben die Fibroblasten stärker von der Anwesenheit von ECFC als von HDMEC beeinflusst waren, beeinflusste die Anwesenheit der Fibroblasten die sekretorische Aktivität der ECFC weniger als die der HDMEC.

HDMEC und ECFC unterschieden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Anwesenheit von Fibroblasten, sondern auch hinsichtlich ihrer Ang-2-Sekretion (Tabelle 1 blau hinterlegt). Insgesamt war die Ang-2-Sekretion durch die HDMEC höher als durch die ECFC. Man spricht der Ang/Tie2-Signalkaskade vor allem in der Angiogenese eine Wirkung zu (Eklund and Saharinen, 2013). Da die HDMEC als reife Endothelzellen eher eine Rolle in den Prozessen der Angiogenese und nicht der Vaskulogenese spielen, ist der Unterschied der Ang-2-Sekretion möglicherweise darin begründet.

Im Vergleich der Kokulturen von Fibroblasten und ECFC im Insert-System mit den Kokulturen auf der Kollagenmembran fiel auf, dass zu Beginn des Besiedlungszeitraumes die Zytokine VEGF, IL-8, bFGF und Ang-2 von den Zellen auf der Kollagenmembran stärker sezerniert wurden als im Insert-System. Alle diese Faktoren erhöhen die Permeabilität von Gefäßen und die Migrationsfähigkeit von Endothelzellen (Montesano et al., 1986, Maisonpierre et al., 1997, Li et al., 2003, Simons et al., 2016), was für die frühe Angiogenese unabdingbar ist (Risau,

1997). In der Kokultur auf der Membran wurden die Endothelzellen und die Fibroblasten direkt auf die Kollagenmembran ausgesät. Diese besteht aus Kollagen I und III (Camelo et al., 1998) und imitiert eine EZM. Durch den Kontakt zu den Kollagenen oder durch die 3D-Struktur könnten die Zellen auf der Membran schon ab dem ersten Besiedelungstag zur höheren Ausschüttung von diesen proangiogenen Zytokinen angeregt werden, um damit ihre Migrationsfähigkeit zu erhöhen und in die Membran zu invadieren. In den Kokulturen im Insert-System liegen anfangs nur die Zellen vor, während die Bestandteile der EZM wie Kollagen III, Fibronektin und Laminin, erst nach wenigen Tagen von den Fibroblasten gebildet werden (Kaessmeyer et al., 2017).

Die eNOS-Sekretion durch die Zellen in Kokultur auf der Membran war über die Besiedelungszeit gleichmäßiger auf einem basalen Level als die Sekretion der Zellen im Insert-System. Da eNOS konstitutiv exprimiert wird (Alderton et al., 2001) und als Marker für intakte Endothelzellen gilt (Kumar et al., 2017), könnte man diese gleichmäßigere Sekretion als Zeichen dafür sehen, dass die Zellen weniger Stress ausgesetzt sind als im Insert-System.

In den Überständen der Kokultur auf der Membran fiel ebenfalls auf, dass die VEGF-Konzentration dort niedriger war als in den Überständen der Fibroblasten in Kokultur im Insert-System. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Bestandteile der Membran VEGF binden. Es ist bereits bekannt, dass die EZM bestimmte Wachstumsfaktoren wie VEGF binden kann (Park et al., 1993). Es wäre denkbar, dass dieses teilweise auch durch Bestandteile der Bio-Gide®-Membran gebunden wird und dadurch die niedrigere VEGF-Konzentration in den Überständen der Kokultur auf der Membran zustande kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Überstände von Monokulturen und unterschiedlichen Kokulturen auf die Zytokine VEGF, IL-8, eNOS, bFGF und Ang-2 mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den Werten von gleichwertigen Kulturen mit HDMEC anstatt von ECFC verglichen. Die Kultur, die für die Generierung eines Schleimhautäquivalentes am relevantesten ist, ist die Kokultur auf der Bio-Gide®-Membran. In den bisherigen erfolgreichen Arbeiten zur Prävaskularisierung eines Schleimhautäquivalentes wurden Fibroblasten und Endothelzellen auf dieser Kollagenmembran kokultiviert. Daher ist besonders interessant, wie sich die Zytokin-Sekretion von HDMEC und ECFC in dieser Kultur über die Besiedelungszeit von 21 Tagen verhält und unterscheidet.

An Gemeinsamkeiten fiel auf, dass sowohl in der Kokultur mit den HDMEC als auch mit den ECFC an Tag 1 die Zytokin-Sekretion besonders hoch war. Zu Beginn der Besiedelung müssen sich die Endothelzellen noch zu Gefäßen formen. Das heißt, insbesondere die chemotaktischen Reize der Zytokine (Gratton et al., 2003, Moens et al., 2014, Fons et al., 2015) auf die Endothelzellen sind zu diesem Zeitpunkt der Vaskularisierung wichtig. Während die HDMEC reife Endothelzellen sind, haben die ECFC als Vorläuferzellen ein hohes proliferatives Potential und können in Endothelzellen ausdifferenzieren (Yoder, 2012). Für diese Differenzierung benötigen die Vorläuferzellen bFGF (Burger et al., 2002), welches in den Überständen der Kokulturen mit den ECFC in höheren Konzentrationen vorlag als in den Überständen der Kulturen mit den HDMEC. Es ist bisher weitgehend ungeklärt, wodurch die Expression von bFGF begünstigt wird. In einigen Zellreihen nimmt IL-6 einen förderlichen Einfluss auf die bFGF-Sekretion (Bisping et al., 2003). Möglicherweise steigert auch IL-8, welches zu Beginn der Besiedelungszeit in besonders hohen Konzentrationen in der Kokultur von ECFC und Fibroblasten vorliegt, die bFGF-Sekretion durch Fibroblasten. Dies müsste jedoch noch genauer untersucht werden. Es wäre auch möglich, dass Zytokine, die hier nicht untersucht wurden, eine Steigerung der fibroblastären bFGF-Sekretion bewirken.

Die frühe Angiogenese ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Permeabilität der Gefäße (Risau, 1997). Diese Permeabilität ermöglicht es den Endothelzellen, in das umliegende Gewebe zu migrieren und sich durch Reorganisation zu neuen Gefäßstrukturen umzuformen. VEGF bindet an unterschiedliche Rezeptoren, die jeweils andere Signalwege aktivieren. Durch den SRC-Signalweg nimmt VEGF Einfluss auf das Zytoskelett und damit auf die Stabilität zwischen den Zellen. Durch die Aktivierung dieses Signalweges wird die Permeabilität des Gefäßes gesteigert. Durch den PLC/ERK1/2-Signalweg verstärkt das VEGF die Migrationsfähigkeit und die Proliferation von Endothelzellen. Ebenfalls bewirkt dieser Signalweg einen Calciumeinstrom (Simons et al., 2016), der wiederum Einfluss auf die Aktivität von eNOS hat. In der Prävaskularisierung der Gewebeäquivalente war die VEGF-Sekretion an Tag 1 der Besiedelung zwar höher als an den späteren Zeitpunkten, die maximale Sekretion wurde jedoch erst an Tag 15 festgestellt. Da zu Beginn der Besiedelung die Faktoren Ang-2, bFGF und IL-8 jedoch ebenfalls stark sezerniert wurden, war möglicherweise nicht so viel VEGF notwendig, um eine Permeabilitätssteigerung zu erzielen.

Auch IL-8 steigert die Gefäßpermeabilität. Zellen, die mit IL-8 behandelt wurden, sezernieren MMP, die wiederum die EZM degradieren. Unter IL-8 sinkt die Apoptoserate von Endothelzellen (Li et al., 2003). Ebenfalls bewirkt IL-8 über Transaktivierung von VEGFR2 auch die Aktivierung der Signalkaskaden, die dem VEGFR2 nachgeschaltet sind (Petreaca et al., 2007). Damit wird die Wirkung von VEGF gesteigert und den Endothelzellen die Migration ermöglicht. Ang-2 verhindert durch die antagonistische Wirkung am Tie-2 Rezeptor die Stabilisierung von Gefäßen und steigert damit ebenfalls die Gefäßpermeabilität (Scholz et al., 2015). bFGF wirkt nicht nur mitogen auf Endothelzellen und Fibroblasten (Seghezzi et al., 1998) sondern bewirkt eine Ausschüttung von Plasminogenaktivator (Montesano et al., 1986) durch die Endothelzellen, welcher die Degradation der Basalmembran bewirkt. Damit verstärkt bFGF zusätzlich die proangiogene Wirkung von VEGF, IL-8 und Ang-2 an Tag 1 der Besiedelungszeit durch die Migration und Invasion von Endothelzellen.

Sowohl in der Kokultur mit den HDMEC als auch in der mit den ECFC fiel die Sekretion aller Zytokine nach Tag 1 ab. In der Kultur mit den HDMEC pendelte sich die Sekretion von VEGF, IL-8, eNOS und bFGF nach diesem Abfall auf einem relativ konstanten Level ein, was dafür spricht, dass zu Beginn der Mobilisierung und der Differenzierung eine große Menge Zytokine notwendig ist. Wenn diese Mechanismen erst angestoßen werden, scheinen danach keine so starken Stimuli mehr notwendig zu sein.

In der Kultur der ECFC dagegen stieg die Sekretion von VEGF, IL-8, bFGF und Ang-2 erneut an, um an Tag 15 einen zweiten Gipfel zu erreichen. In den Vorarbeiten wurden in den Kokulturen von Fibroblasten und ECFC bereits nach sieben Tagen gefäßähnliche Strukturen mit einem Lumen nachgewiesen. Nach 14 Tagen waren diese zu einem kapillarähnlichen Netz mit Verzweigungen weitergewachsen. Nach drei Wochen jedoch war das Bild von durchlässigen beinahe zerrissenen Strukturen geprägt (Schulze, 2016). Möglicherweise korreliert der Anstieg der gemessenen Zytokine mit dieser Abnahme der Qualität der Gefäße. Während die Menge an VEGF, IL-8, bFGF und Ang-2 an Tag 15 anstieg, fiel die Menge an eNOS an Tag 15 ab. Das Zytokin eNOS steht als Marker für die Funktionalität von Endothelzellen (Kumar et al., 2017). Der Abfall von eNOs würde ebenfalls mit der Zerstörung der Gefäßstrukturen korrelieren. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob die längere Kultur die Zellen in Stress bringt, wären weitere Untersuchungen hinsichtlich der Vitalität notwendig.

Eine ergänzende Erklärung für den Anstieg der Zytokin-Sekretion an Tag 15 wäre die, dass sich die gefäßähnlichen Strukturen im Rahmen der Angiogenese weiter verzweigen. In Versuchen mit Fragmenten von Mikrogefäßen, die auf einer Kollagen-I-Matrix kultiviert wurden, nahm die proteolytische Aktivität von den Endothelzellen über die Besiedelungszeit zu. An Tag 10 wurde ein Anstieg der MMPs und eine Lockerung der EZM nachgewiesen (Edgar et al., 2014). Auch in Versuchen mit ECFC auf einem Hydrogel aus Hyaluronsäuren zeigte sich, dass mit zunehmender Verzweigung der Gefäße die EZM abgebaut wurde, um das weitere Ausprossens der Gefäße zu ermöglichen (Hanjaya-Putra et al., 2011). Da die untersuchten Zytokine einen Einfluss auf die Angiogenese haben, die von einer gesteigerten Permeabilität gekennzeichnet ist, wäre diese weitere Verzweigung der Gefäße ebenfalls eine denkbare Erklärung für die gesteigerte Zytokin-Sekretion durch die Kultur mit den ECFC.

In einer Untersuchung der subzellulären Interaktionen von Fibroblasten und Endothelzellen während der Ausbildung eines Gefäßnetzes über einen Zeitraum von 20 Tagen stellten Käsmeyer et al. fest, dass an Tag 14 der Besiedelung die meisten Verzweigungen des tubulären Systems vorlagen, die danach weniger wurden. Ebenfalls stellten sie fest, dass am 14. Besiedelungstag die größte Menge an EZM vorlag, was sie auf eine gesteigerte Sekretion durch die Fibroblasten zurückführten (Kaessmeyer et al., 2017). Diese Ergebnisse lassen sich gut mit unserer vorliegenden Messung der gesteigerten Zytokin-Sekretion an Tag 15 vereinbaren, die damit im Zeichen der gesteigerten Angiogenese stehen könnte.

Die eNOS-Sekretion war in beiden Versuchsansätzen über die komplette Besiedelungszeit auf einem ziemlich konstanten Level. Da eNOS als konstitutiv exprimiertes Enzym unabhängig von äußeren Faktoren gebildet wird (Alderton et al., 2001, Aicher et al., 2004, Duda et al., 2004) und die Sekretion durch die ECFC höher war als durch die HDMEC, könnte man daraus schließen, dass die ECFC ein stärkeres angiogenes Potential haben. Das durch eNOS sezernierte NO aktiviert MMP, die wiederum die Mobilisierung von EPC steigern (Fukumura et al., 2001, Duda et al., 2004, Aicher et al., 2003).

In der für die Generierung von Schleimhautäquivalenten relevanten Kultur war die VEGF-Sekretion in den Kulturen mit den ECFC niedriger als in den Kulturen mit den HDMEC. Sowohl ECFC als auch reife Endothelzellen exprimieren VEGFR2. Jedoch stellte man fest, dass nach VEGF-A-Stimulation die Phosphorylierung von VEGFR2 auf ECFC stärker war als auf reifen Endothelzellen (Joo et al., 2015), wodurch ihr stärkeres angiogenes Potential begründet sein

soll. Dies erklärt, weshalb in der Kokultur mit den ECFC weniger VEGF sezerniert wird. Bereits geringe Mengen an VEGF sind in der Lage, den VEGF-Rezeptor zu aktivieren, so dass eine geringe VEGF-Sekretion durch die Fibroblasten zur Stimulation der ECFC ausreicht.

Die Ang-2-Sekretion war in der Kokultur mit den HDMEC deutlich höher als die Sekretion der Kultur mit den ECFC. Insgesamt war dies zu fast allen Zeitpunkten bei fast allen Kulturen zu verzeichnen. Über die Funktionsweise von Ang-2 bestehen widersprüchliche Meinungen. Die Signalkaskade, die auf die Aktivierung von Tie2 folgt, bewirkt eine Stabilisierung von bisher permeablen und instabilen Gefäßen. Dies erfolgt durch verstärkte interzelluläre Kontakte. Daher wurde dem Ang-Tie-System lange keine Rolle in der frühen Vaskulogenese, sondern erst in der sich später anschließenden Stabilisierungsphase zugesprochen (Eklund and Saharinen, 2013). Ang-2 wirkt auf Tie2 jedoch antagonistisch und verhindert dadurch die stabilisierende Wirkung von Tie2 (Maisonpierre et al., 1997). Damit steigert es die Permeabilität der aussprossenden Gefäße zu Beginn der Angiogenese. In verschiedenen Erkrankungen, die von einer gesteigerten Gefäßpermeabilität gekennzeichnet sind, wie beispielsweise Sepsis, wurden erhöhte Ang-2-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen (Eklund and Saharinen, 2013). Es gibt allerdings die Vermutung, dass Ang-2 nicht nur antagonistisch, sondern auch agonistisch auf den Tie2-Rezeptor wirkt (Li et al., 2009, Daly et al., 2012). Da Ang-2 sowohl von ECFC als auch von HDMEC zu zwei Zeitpunkten verstärkt sezerniert wird, könnte es durchaus sein, dass zu Beginn die permeabilitätssteigernde Wirkung und im späteren Verlauf der Kultur die gefäßstabilisierende Wirkung entfaltet wird. Des Weiteren steigert Ang-2 die Proliferation von Endothelzellen (Thurston and Daly, 2012), was die Gefäßbildung zusätzlich positiv beeinflussen kann.

Es ist nicht möglich, nur anhand der Zytokin-Sekretion festzulegen, welcher Schritt der Vaskularisierung *in vitro* gerade abläuft. Da die einzelnen Schritte der Vaskulogenese und der Angiogenese parallel erfolgen, ist eine solche Aussage jedoch auch nicht notwendig. Man kann allerdings durchaus nachvollziehbare Sekretionsmuster im Rahmen der Prävaskularisierung eines Schleimhautäquivalentes erkennen. Trotz der genannten Unterschiede zwischen den Kulturen mit HDMEC beziehungsweise mit ECFC überwiegen die Gemeinsamkeiten im Sekretionsmuster. Das Sekretionsverhalten der ECFC über die Besiedelungszeit ist mit den Abläufen der Vaskularisierung vereinbar, was die Schlussfolgerung zulässt, dass hinsichtlich

der Zytokin-Sekretion durchaus ein Ersatz der HDMEC durch die ECFC für die Prävaskularisierung möglich ist.

5.3 Abschließende Bewertung

Im Kontext der Prävaskularisierung von Schleimhautäquivalenten stellen die Endothelzellen den wichtigsten Faktor dar. Da Endothelzellen allein keine stabilen Gefäße ausbilden (Sun et al., 2016, Kim et al., 2016) und ein komplexes Gewebe generiert werden soll, sind Kokulturen die Methode der Wahl. Im Falle der Herstellung von Mundschleimhaut sind Fibroblasten als einer ihrer Hauptbestandteile die optimalen Zellen für die Kokultur (Welsch, 2014), zumal die Fibroblasten mittels ihrer Sekretion von Zytokinen und EZM eine wichtige Rolle in der Vaskularisierung spielen (Kalluri and Zeisberg, 2006, Kaessmeyer et al., 2017).

Der Ersatz der bisher verwendeten HDMEC durch ECFC bietet mehrere Vorteile. Zum einen ist die klinische Verwendbarkeit ein wichtiger Punkt für die Vorläuferzellen. Des Weiteren haben sie ein höheres angiogenes Potential als reife Endothelzellen (Joo et al., 2015) und besitzen die Fähigkeit, sich in jedes Endothel zu differenzieren (Peters, 2018). Hinsichtlich ihrer Zytokin-Sekretion bestehen zwar zu manchen Zeitpunkten Unterschiede zu den HDMEC, jedoch scheint dies die Prävaskularisierung nicht negativ zu beeinflussen. In unterschiedlichen Arbeiten erwies sich der Einsatz von ECFC zur Prävaskularisierung als erfolgversprechend (Sasagawa et al., 2016, Chen et al., 2010, Heller et al., 2016).

Es ist zu bemerken, dass es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine kleine Stichprobe handelt, wodurch teilweise große Standardabweichungen zustande kommen. Auch untersucht die vorliegende Arbeit lediglich das Sekretionsverhalten der verschiedenen Zellen. Zur praktischen Anwendung dieser Ergebnisse wären weitere Untersuchungen, die die Wirkung der proangiogenen Zytokine auf die ECFC und die Fibroblasten hinsichtlich der Proliferation, Migration, Vitalität und Ausbildung neuer Gefäße untersuchen, interessant.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Prävaskularisierung von Schleimhautäquivalenten durch die Verwendung von ECFC anstelle von HDMEC weiter verbessert werden kann. Da die ECFC ein gutes angiogenes Potential haben und sich hinsichtlich der Zytokin-Sekretion nur gering von den HDMEC unterscheiden, kann man sich den Vorteil der unkomplizierten Gewinnung zu Nutze machen. Damit wird auf lange Sicht die klinische Anwendbarkeit für den Patienten sowohl unkomplizierter als auch risikoärmer und somit verbessert.

6 Zusammenfassung

Mit Hilfe von Geweben, die mittels *Tissue Engineering* hergestellt werden, können zukünftig autologe Transplantationen, die mit einem chirurgischen Eingriff und damit verbundenen Risiken einhergehen, vermieden werden. Um die Anbindung an das Gefäßsystem des Patienten zu verbessern, ist es gelungen, *in vitro* eine Schleimhaut aus einer Trikultur aus Epithelzellen, Fibroblasten und den reifen Endothelzellen HDMEC herzustellen, die mit Gefäßen durchzogen ist. Auch die Anbindung *in vivo* war bereits erfolgreich (Heller et al., 2016). Da die HDMEC aus Vorhaut gewonnen wurden und somit eine begrenzte klinische Verwendbarkeit bestand, wurden sie durch endotheliale Vorläuferzellen ersetzt. Diese sogenannten ECFC können nach einer venösen Blutentnahme aus dem peripheren Blut gewonnen werden und die Prävascularisierung eines Schleimhautäquivalentes mit diesen Zellen war *in vitro* bereits erfolgreich (Schulze, 2016).

Um genauere Informationen über das sekretorische Verhalten von ECFC und Fibroblasten im Rahmen der Vaskularisierung zu erhalten, wurden in dieser Arbeit verschiedene Zellkulturüberstände mittels ELISA auf die enthaltenen Zytokin-Konzentrationen analysiert. Untersucht wurden die proangiogenen Zytokine VEGF, IL-8, eNOS, bFGF und Ang-2. Im weiteren Verlauf wurden die gemessenen Werte mit bereits vorliegenden Ergebnissen aus Kulturüberständen von HDMEC verglichen und in den Kontext der Vaskularisierung gestellt.

Gegenstand der Untersuchungen waren die Kulturüberstände verschiedener Mono- und Kokulturen von Fibroblasten und ECFC, die über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert wurden. Es konnte eine Steigerung der Sekretion von VEGF, IL-8, bFGF und Ang-2 durch die Fibroblasten nachgewiesen werden, wenn sie mit den ECFC kokultiviert wurden. Die Kokultur von Fibroblasten und ECFC mit direktem interzellulärem Kontakt führte zu einer gesteigerten Sekretion von bFGF und Ang-2 durch die Endothelzellen. Die Sekretionssteigerung durch die Zellen in Kokultur wurde auf die humorale Interaktion zwischen den Zellen zurückgeführt.

Da die Generierung des Gewebeäquivalentes unter Verwendung einer 3D-Kollagenmembran erfolgt, wurde auch der Einfluss dieser Membran auf die sekretorische Aktivität der Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass zu Beginn der Besiedelung die Sekretion von VEGF, IL-8, bFGF und Ang-2 auf der Kollagenmembran gegenüber der Kokultur ohne Membran gesteigert war. Dieser Hinweis auf eine gesteigerte Angiogenese könnte auf Interaktionen mit den

Bestandteilen der Membran zurückzuführen sein. Die eNOS-Sekretion durch die Zellen auf der Membran war über die Zeit gleichmäßiger als die Sekretion der Zellen, die nicht auf der Membran kultiviert wurden. Es wurde analysiert, ob die Zytokin-Sekretion der Kultur von ECFC und Fibroblasten auf der Membran mit den zeitlichen Abfolgen der Vaskularisierung korreliert. Hierbei fiel auf, dass nicht nur am ersten Besiedelungstag, der von der frühen Angiogenese geprägt ist, die Sekretion der Zytokine hoch war, sondern es an Tag 15 einen zweiten Peak von ausgeschütteten proangiogenen Zytokinen gab. Hieraus ergab sich die Vermutung, dass zu diesem Zeitpunkt die Angiogenese durch weitere Verzweigung der Gefäße gesteigert ist.

Im Vergleich der Zytokin-Sekretion durch die Vorläuferzellen zu der Sekretion der reifen Endothelzellen fiel auf, dass die eNOS-Sekretion durch die ECFC höher war, wohingegen die HDMEC mehr Ang-2 sezernierten. Insgesamt jedoch war die Zytokin-Sekretion der beiden Endothelzellarten sehr ähnlich, was uns zu dem Schluss kommen lässt, dass hinsichtlich der Sekretion von proangiogenen Zytokinen ein Ersatz der HDMEC durch die ECFC für die Prävaskularisierung möglich ist und damit die klinische Anwendbarkeit von *in vitro* generierten Schleimhautäquivalenten näher rückt.

7 Literaturverzeichnis

- ABE, Y., OZAKI, Y., KASUYA, J., YAMAMOTO, K., ANDO, J., SUDO, R., IKEDA, M. & TANISHITA, K. 2013. Endothelial progenitor cells promote directional three-dimensional endothelial network formation by secreting vascular endothelial growth factor. *PLoS One*, 8, e82085.
- AICHER, A., HEESCHEN, C. & DIMMELER, S. 2004. The role of NOS3 in stem cell mobilization. *Trends in Molecular Medicine*, 10, 421-5.
- AICHER, A., HEESCHEN, C., MILDNER-RIHM, C., URBICH, C., IHLING, C., TECHNANU-IHLING, K., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, 9, 1370-6.
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E. & KNOWLES, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*, 357, 593-615.
- ASADIAN, M. C., K.V.; NOROUZI, M.; GRANDE, S.; COOLS, P.; MORENT, R.; DE GEYTER, N. 2020. Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds. *Nanomaterials*, 10, 119.
- ASAHARA, T., MUROHARA, T., SULLIVAN, A., SILVER, M., VAN DER ZEE, R., LI, T., WITZENBICHLER, B., SCHATTEMAN, G. & ISNER, J.M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275, 964-7.
- ASAHARA, T., TAKAHASHI, T., MASUDA, H., KALKA, C., CHEN, D., IWAGURO, H., INAI, Y., SILVER, M. & ISNER, J. M. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *The EMBO Journal*, 18, 3964-72.
- AU, P., DAHERON, L. M., DUDA, D. G., COHEN, K. S., TYRRELL, J. A., LANNING, R. M., FUKUMURA, D., SCADDEN, D. T. & JAIN, R. K. 2008. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood*, 111, 1302-5.
- BAGGIOLINI, M., WALZ, A. & KUNKEL, S. L. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 84, 1045-1049.
- BAIGUERA, S. & RIBATTI, D. 2013. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis*, 16, 1-14.
- BALAJI, S., KING, A., CROMBLEHOLME, T. M. & KESWANI, S. G. 2013. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Advances in Wound Care* 2, 283-295.
- BALDWIN, J., ANTILLE, M., BONDA, U., DE-JUAN-PARDO, E. M., KHOSROTEHRANI, K., IVANOVSKI, S., PETCU, E. B. & HUTMACHER, D. W. 2014. In vitro pre-vascularisation of tissue-engineered constructs A co-culture perspective. *Vascular Cell*, 6, 13.
- BARBAGLI, G., AKBAROV, I., HEIDENREICH, A., ZUGOR, V., OLIANAS, R., ARAGONA, M., ROMANO, G., BALSMEYER, U., FAHLENKAMP, D., REBMANN, U., STANDHAFT, D. & LAZZERI, M. 2018. Anterior Urethroplasty Using a New Tissue Engineered Oral Mucosa Graft: Surgical Techniques and Outcomes. *The Journal of Urology*, 200, 448-456.
- BARRETT, A. J. & MCDONALD, J. K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *The Biochemical journal*, 237, 935-935.
- BASILE, D. P. & YODER, M. C. 2014. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, 229, 10-6.
- BAUER, H. K. 2017. *Etablierung und Charakterisierung eines prävascularisierten in vitro Schleimhaut-Äquivalents*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- BERTHIAUME, F., MAGUIRE, T. J. & YARMUSH, M. L. 2011. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 403-30.
- BISPING, G., LEO, R., WENNING, D., DANKBAR, B., PADRÓ, T., KROPFF, M., SCHEFFOLD, C., KRÖGER, M., MESTERS, R. M., BERDEL, W. E. & KIENAST, J. 2003. Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood*, 101, 2775-83.
- BLACK, A., BERTHOD, F., L'HEUREUX, N., GERMAIN, L. & AUGER, F. 1998. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *The FASEB Journal*, 12, 1331-1340.
- BLANDINIERES, A., GENDRON, N., BACHA, N., BIECHE, I., CHOCRON, R., NUNES, H., NEVO, N., ROSSI, E., CRESTANI, B., LECOURT, S., CHEVRET, S., LOKAJCZYK, A., MIGNON, V., KISAOGLU, A., JUVIN, K., BERTIL, S., VALEYRE, D., CRAS, A., GAUSSEM, P., ISRAEL-BIET, D. & SMADJA, D. M. 2019. Interleukin-8 release by endothelial colony-forming cells isolated from idiopathic pulmonary fibrosis patients might contribute to their pathogenicity. *Angiogenesis*, 22, 325-339.
- BUNO, K. P., CHEN, X., WEIBEL, J. A., THIEDE, S. N., GARIMELLA, S. V., YODER, M. C. & VOYTIK-HARBIN, S. L. 2016. In Vitro Multitissue Interface Model Supports Rapid Vasculogenesis and Mechanistic Study of Vascularization across Tissue Compartments. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 21848-60.
- BURGER, P. E., COETZEE, S., MCKEEHAN, W. L., KAN, M., COOK, P., FAN, Y., SUDA, T., HEBBEL, R. P., NOVITZKY, N., MULLER, W. A. & WILSON, E. L. 2002. Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood*, 100, 3527-35.
- CALDAMONE, A. A., EDSTROM, L. E., KOYLE, M. A., RABINOWITZ, R. & HULBERT, W. C. 1998. Buccal mucosal grafts for urethral reconstruction. *Urology*, 51, 15-9.
- CAMELO, M., NEVINS, M. L., SCHENK, R. K., SIMION, M., RASPERINI, G., LYNCH, S. E. & NEVINS, M. 1998. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gide. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 18, 321-31.
- CERQUEIRA, M. T., PIRRACO, R. P., MARTINS, A. R., SANTOS, T. C., REIS, R. L. & MARQUES, A. P. 2014. Cell sheet technology-driven re-epithelialization and neovascularization of skin wounds. *Acta Biomaterialia*, 10, 3145-55.
- CHAN, J. L., LEVIN, P. J., FORD, B. P., STANTON, D. C. & PFEIFER, S. M. 2017. Vaginoplasty with an Autologous Buccal Mucosa Fenestrated Graft in Two Patients with Vaginal Agenesis: A Multidisciplinary Approach and Literature Review. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 24, 670-676.
- CHEN, L., TREDGET, E. E., WU, P. Y. & WU, Y. 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, 3, e1886.
- CHEN, X., ALEDIA, A. S., POPSON, S. A., HIM, L., HUGHES, C. C. & GEORGE, S. C. 2010. Rapid anastomosis of endothelial progenitor cell-derived vessels with host vasculature is promoted by a high density of cotransplanted fibroblasts. *Tissue Engineering. Part A*, 16, 585-94.
- CHOI, S. W., ZHANG, Y., MACEWAN, M. R. & XIA, Y. 2013. Neovascularization in biodegradable inverse opal scaffolds with uniform and precisely controlled pore sizes. *Advanced Healthcare Materials*, 2, 145-54.
- CROSS, M. J. & CLAEISSON-WELSH, L. 2001. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 201-7.

- DALY, C., EICHTEN, A., CASTANARO, C., PASNIKOWSKI, E., ADLER, A., LALANI, A. S., PAPADOPOULOS, N., KYLE, A. H., MINCHINTON, A. I., YANCOPOULOS, G. D. & THURSTON, G. 2012. Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer Research*, 73, 108-18.
- DE CATERINA, R., LIBBY, P., PENG, H. B., THANNICKAL, V. J., RAJAVASHISTH, T. B., GIMBRONE, M. A., JR., SHIN, W. S. & LIAO, J. K. 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *The Journal of Clinical Investigation*, 96, 60-68.
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R. & ZEIHNER, A. M. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399, 601-5.
- DUDA, D. G., FUKUMURA, D. & JAIN, R. K. 2004. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends in Molecular Medicine*, 10, 143-5.
- DVORAK, H. F. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 4368-80.
- EDGAR, L. T., HOYING, J. B., UTZINGER, U., UNDERWOOD, C. J., KRISHNAN, L., BAGGETT, B. K., MAAS, S. A., GUILKEY, J. E. & WEISS, J. A. 2014. Mechanical interaction of angiogenic microvessels with the extracellular matrix. *Journal of Biomechanical Engineering*, 136, 021001-021001.
- EKLUND, L. & SAHARINEN, P. 2013. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental Cell Research*, 319, 1271-80.
- FOLKMAN, J. & HOCHBERG, M. 1973. Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal of Experimental Medicine*, 138, 745-53.
- FONS, P., GUEGUEN-DORBES, G., HERAULT, J. P., GERONIMI, F., TUYARET, J., FREDERIQUE, D., SCHAEFFER, P., VOLLE-CHALLIER, C., HERBERT, J. M. & BONO, F. 2015. Tumor vasculature is regulated by FGF/FGFR signaling-mediated angiogenesis and bone marrow-derived cell recruitment: this mechanism is inhibited by SSR128129E, the first allosteric antagonist of FGFRs. *Journal of Cellular Physiology*, 230, 43-51.
- FOWLER, A. A., 3RD, FISHER, B. J., SWEENEY, L. B., WALLACE, T. J., NATARAJAN, R., GHOSH, S. S. & GHOSH, S. 1999. Nitric oxide regulates interleukin-8 gene expression in activated endothelium by inhibiting NF-kappaB binding to DNA: effects on endothelial function. *Biochem Cell Biol*, 77, 201-8.
- FUKUMURA, D., GOHONGI, T., KADAMBI, A., IZUMI, Y., ANG, J., YUN, C. O., BUERK, D. G., HUANG, P. L. & JAIN, R. K. 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98, 2604-9.
- FULTON, D., GRATTON, J. P., MCCABE, T., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T. F., PAPAPETROPOULOS, A. & SESSA, W. C. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399, 597-601.
- GRATTON, J. P., LIN, M. I., YU, J., WEISS, E. D., JIANG, Z. L., FAIRCHILD, T. A., IWAKIRI, Y., GROSZMANN, R., CLAFFEY, K. P., CHENG, Y. C. & SESSA, W. C. 2003. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavitin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell*, 4, 31-9.
- GREEN, L., OFSTEIN, R. H., RAPP, B., SAADATZADEH, M. R., BHAVSAR, J. R., FAJARDO, A., DALSING, M. C., INGRAM, D. A. & MURPHY, M. P. 2017. Adult venous endothelium is a

- niche for highly proliferative and vasculogenic endothelial colony-forming cells. *Journal of Vascular Surgery*, 66, 1854-1863.
- HANJAYA-PUTRA, D., BOSE, V., SHEN, Y., YEE, J., KHETAN, S., FOX-TALBOT, K., STEENBERGEN, C., BURDICK, J. & GERECHT, S. 2011. Controlled activation of morphogenesis to generate a functional human microvasculature in a synthetic matrix. *Blood*, 118, 804-815.
- HELFRICH, I., EDLER, L., SUCKER, A., THOMAS, M., CHRISTIAN, S., SCHADENDORF, D. & AUGUSTIN, H. G. 2009. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 15, 1384-92.
- HELLER, M., FRERICK-OCHS, E. V., BAUER, H. K., SCHIEGNITZ, E., FLESCHE, D., BRIEGER, J., STEIN, R., AL-NAWAS, B., BROCHHAUSEN, C., THÜROFF, J. W., UNGER, R. E. & BRENNER, W. 2016. Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials*, 77, 207-15.
- HUR, J., YOON, C. H., KIM, H. S., CHOI, J. H., KANG, H. J., HWANG, K. K., OH, B. H., LEE, M. M. & PARK, Y. B. 2004. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 288-93.
- JOO, H. J., SONG, S., SEO, H. R., SHIN, J. H., CHOI, S. C., PARK, J. H., YU, C. W., HONG, S. J. & LIM, D. S. 2015. Human endothelial colony forming cells from adult peripheral blood have enhanced sprouting angiogenic potential through up-regulating VEGFR2 signaling. *International Journal of Cardiology*, 197, 33-43.
- KAESSMEYER, S., SEHL, J., KHIAO IN, M., MERLE, R., RICHARDSON, K. & PLENDL, J. 2017. Subcellular Interactions during Vascular Morphogenesis in 3D Cocultures between Endothelial Cells and Fibroblasts. *Int J Mol Sci*, 18.
- KALLURI, R. & ZEISBERG, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 392-401.
- KAUL, H. & VENTIKOS, Y. 2015. On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering. Part B* 21, 203-17.
- KEELEY, E. C., MEHRAD, B. & STRIETER, R. M. 2011. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Experimental Cell Research*, 317, 685-90.
- KELLOUCHE, S., MOURAH, S., BONNEFOY, A., SCHOEVAERT, D., PODGORNIAK, M. P., CALVO, F., HOYLAERTS, M. F., LEGRAND, C. & DOSQUET, C. 2007. Platelets, thrombospondin-1 and human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation. *Experimental Cell Research*, 313, 486-99.
- KIM, J. J., HOU, L. & HUANG, N. F. 2016. Vascularization of three-dimensional engineered tissues for regenerative medicine applications. *Acta Biomaterialia*, 41, 17-26.
- KIMURA, T., KOHNO, H., MATSUOKA, Y., MURAKAMI, M., NAKATSUKA, R., HASE, M., YASUDA, K., UEMURA, Y., SASAKI, Y., FUKUHARA, S. & SONODA, Y. 2011. CXCL8 enhances the angiogenic activity of umbilical cord blood-derived outgrowth endothelial cells in vitro. *Cell Biology International*, 35, 201-8.
- KIRKPATRICK, C. J., FUCHS, S. & UNGER, R. E. 2011. Co-culture systems for vascularization--learning from nature. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 291-9.
- KO, H. C., MILTHORPE, B. K. & MCFARLAND, C. D. 2007. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *European Cells & Materials*, 14, 1-18; discussion 18-9.
- KOCH, A. E., POLVERINI, P. J., KUNKEL, S. L., HARLOW, L. A., DIPIETRO, L. A., ELNER, V. M., ELNER, S. G. & STRIETER, R. M. 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258, 1798-801.

- KUMAR, V. V., HELLER, M., GOTZ, H., SCHIEGNITZ, E., AL-NAWAS, B. & KAMMERER, P. W. 2017. Comparison of growth & function of endothelial progenitor cells cultured on deproteinized bovine bone modified with covalently bound fibronectin and bound vascular endothelial growth factor. *Clinical Oral Implants Research*, 28, 543-550.
- LANGER, R. & VACANTI, J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, 260, 920-6.
- LASCHKE, M. W. & MENGER, M. D. 2016. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnology Advances*, 34, 112-121.
- LEE, S., CHEN, T. T., BARBER, C. L., JORDAN, M. C., MURDOCK, J., DESAI, S., FERRARA, N., NAGY, A., ROOS, K. P. & IRUELA-ARISPE, M. L. 2007. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell*, 130, 691-703.
- LI, A., VARNEY, M. L., VALASEK, J., GODFREY, M., DAVE, B. J. & SINGH, R. K. 2005. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis*, 8, 63-71.
- LI, A. H., DUBEY, S., VARNEY, M. L., DAVE, B. J. & SINGH, R. K. 2003. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of Immunology*, 170, 3369-3376.
- LI, Z., HUANG, H., BOLAND, P., DOMINGUEZ, M. G., BURFEIND, P., LAI, K. M., LIN, H. C., GALE, N. W., DALY, C., AUERBACH, W., VALENZUELA, D., YANCOPOULOS, G. D. & THURSTON, G. 2009. Embryonic stem cell tumor model reveals role of vascular endothelial receptor tyrosine phosphatase in regulating Tie2 pathway in tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 22399-404.
- LIU, Y., COX, S. R., MORITA, T. & KOUREMBANAS, S. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77, 638-43.
- LIU, Z. Q., LI, D. W., ZANG, Z. X., CHANG, M. & HU, L. S. 2012. A Systematic Review of Endothelial Colony-Forming Cells. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11, 4506-4513.
- LU, A., WANG, L. & QIAN, L. 2015. The role of eNOS in the migration and proliferation of bone-marrow derived endothelial progenitor cells and in vitro angiogenesis. *Cell Biology International*, 39, 484-90.
- LUO, Y., ZHAO, Y., LI, X., ZHAO, J. & ZHANG, W. 2014. ZNF580 mediates eNOS expression and endothelial cell migration/proliferation via the TGF-beta1/ALK5/Smad2 pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 393, 199-207.
- MAISONPIERRE, P. C., SURI, C., JONES, P. F., BARTUNKOVA, S., WIEGAND, S. J., RADZIEJEWSKI, C., COMPTON, D., MCCLAIN, J., ALDRICH, T. H., PAPADOPOULOS, N., DALY, T. J., DAVIS, S., SATO, T. N. & YANCOPOULOS, G. D. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277, 55-60.
- MANDRIOTA, S. J. & PEPPER, M. S. 1998. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res*, 83, 852-9.
- MELERO-MARTIN, J. M., DE OBALDIA, M. E., KANG, S. Y., KHAN, Z. A., YUAN, L., OETTGEN, P. & BISCHOFF, J. 2008. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circulation Research*, 103, 194-202.
- MOENS, S., GOVEIA, J., STAPOR, P. C., CANTELMO, A. R. & CARMELIET, P. 2014. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25, 473-82.
- MONCADA, S. & HIGGS, E. A. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S193-201.

- MONTESANO, R., VASSALLI, J. D., BAIRD, A., GUILLEMIN, R. & ORCI, L. 1986. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83, 7297-301.
- NEUFELD, G. & KESSLER, O. 2006. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Reviews*, 25, 373-85.
- PAPAPETROPOULOS, A., GARCÍA-CARDEÑA, G., MADRI, J. A. & SESSA, W. C. 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 100, 3131-9.
- PARK, J. E., KELLER, G. A. & FERRARA, N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4, 1317-26.
- PETERS, E. B. 2018. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Engineering Part B* 24, 1-24.
- PETREACA, M. L., YAO, M., LIU, Y., DEFEA, K. & MARTINS-GREEN, M. 2007. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 5014-23.
- PRATER, D. N., CASE, J., INGRAM, D. A. & YODER, M. C. 2007. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*, 21, 1141-9.
- RAKOCEVIC, J., ORLIC, D., MITROVIC-AJTIC, O., TOMASEVIC, M., DOBRIC, M., ZLATIC, N., MILASINOVIC, D., STANKOVIC, G., OSTOJIĆ, M. & LABUDOVIC-BOROVIC, M. 2017. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Experimental and Molecular Pathology*, 102, 303-313.
- REHMAN, J., LI, J., ORSCHELL, C. M. & MARCH, K. L. 2003. Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation*, 107, 1164-1169.
- RIBATTI, D., NICO, B. & CRIVELLATO, E. 2015. The development of the vascular system: a historical overview. *Methods in Molecular Biology*, 1214, 1-14.
- RIBATTI, D., VACCA, A., NICO, B., RONCALI, L. & DAMMACCO, F. 2001. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of Development*, 100, 157-63.
- RISAU, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671.
- RISAU, W. & FLAMME, I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 73-91.
- ROUWKEMA, J. & KHADEMHOSEINI, A. 2016. Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. *Trends in Biotechnology*, 34, 733-745.
- SASAGAWA, T., SHIMIZU, T., YAMATO, M. & OKANO, T. 2016. Endothelial colony-forming cells for preparing prevascular three-dimensional cell-dense tissues using cell-sheet engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10, 739-747.
- SATO, Y. & RIFKIN, D. B. 1988. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol*, 107, 1199-205.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. 2010. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, Heidelberg, Springer-Lehrbuch.
- SCHOLZ, A., PLATE, K. H. & REISS, Y. 2015. Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1347, 45-51.
- SCHULZE, A. 2016. *Einsatz und Charakterisierung von endothelialen Progenitorzellen für die Prävascularisierung einer in vitro Schleimhaut*. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- SCHÜNKE, M., SCHULTE, E. & SCHUMACHER, U. 2018. *Prometheus: Lernatlas der Anatomie Innere Organe*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- SEGHEZZI, G., PATEL, S., REN, C. J., GUALANDRIS, A., PINTUCCI, G., ROBBINS, E. S., SHAPIRO, R. L., GALLOWAY, A. C., RIFKIN, D. B. & MIGNATTI, P. 1998. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 141, 1659-73.
- SHALABY, F., ROSSANT, J., YAMAGUCHI, T. P., GERTSENSTEIN, M., WU, X. F., BREITMAN, M. L. & SCHUH, A. C. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376, 62-6.
- SHIBUYA, M. 2013. VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, a009092-a009092.
- SHIZUKUDA, Y., TANG, S., YOKOTA, R. & WARE, J. A. 1999. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C δ activity. *Circ Res*, 85, 247-56.
- SIMONS, M., GORDON, E. & CLAESON-WELSH, L. 2016. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17, 611-25.
- SMADJA, D. M., BIECHE, I., SUSEN, S., MAUGE, L., LAURENDEAU, I., D'AUDIGIER, C., GRELAC, F., EMMERICH, J., AIACH, M. & GAUSSEM, P. 2009. Interleukin 8 is differently expressed and modulated by PAR-1 activation in early and late endothelial progenitor cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, 2534-46.
- SPANHOLTZ, T. A., THEODOROU, P., HOLZBACH, T., WUTZLER, S., GIUNTA, R. E. & MACHENS, H. G. 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF165) plus basic fibroblast growth factor (bFGF) producing cells induce a mature and stable vascular network--a future therapy for ischemically challenged tissue. *The Journal of Surgical Research*, 171, 329-38.
- SUN, X., ALTALHI, W. & NUNES, S. 2016. Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 96, 183-194.
- SURI, C., JONES, P. F., PATAN, S., BARTUNKOVA, S., MAISONPIERRE, P. C., DAVIS, S., SATO, T. N. & YANCOPOULOS, G. D. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87, 1171-80.
- THURSTON, G. & DALY, C. 2012. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-tie signaling pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a006550.
- TURA, O., SKINNER, E. M., BARCLAY, G. R., SAMUEL, K., GALLAGHER, R. C., BRITTAN, M., HADDOKE, P. W., NEWBY, D. E., TURNER, M. L. & MILLS, N. L. 2013. Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem Cells*, 31, 338-48.
- TZENG, H. E., CHEN, P. C., LIN, K. W., LIN, C. Y., TSAI, C. H., HAN, S. M., TENG, C. L., HWANG, W. L., WANG, S. W. & TANG, C. H. 2015. Basic fibroblast growth factor induces VEGF expression in chondrosarcoma cells and subsequently promotes endothelial progenitor cell-primed angiogenesis. *Clinical Science*, 129, 147-58.
- WAUGH, D. J. & WILSON, C. 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14, 6735-41.
- WELSCH, U. 2014. *Lehrbuch Histologie : mit 49 Tabellen*, München, Elsevier, Urban & Fischer.
- WENZ, A., TJOENG, I., SCHNEIDER, I., KLUGER, P. J. & BORCHERS, K. 2018. Improved vasculogenesis and bone matrix formation through coculture of endothelial cells and

- stem cells in tissue-specific methacryloyl gelatin-based hydrogels. *Biotechnology and Bioengineering*, 115, 2643-2653.
- WU, X., RABKIN-AIKAWA, E., GULESERIAN, K. J., PERRY, T. E., MASUDA, Y., SUTHERLAND, F. W., SCHOEN, F. J., MAYER, J. E., JR. & BISCHOFF, J. 2004. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287, H480-7.
- XIE, K. 2001. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12, 375-391.
- YANG, J., XU, J., DANNIEL, M., WANG, X., WANG, W., ZENG, L. & SHEN, L. 2018. The interaction between XBP1 and eNOS contributes to endothelial cell migration. *Experimental Cell Research*, 363, 262-270.
- YODER, M. C. 2012. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a006692.
- YODER, M. C., MEAD, L. E., PRATER, D., KRIER, T. R., MROUEH, K. N., LI, F., KRASICH, R., TEMM, C. J., PRCHAL, J. T. & INGRAM, D. A. 2007. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 109, 1801-9.
- ZHANG, L., YANG, N., PARK, J. W., KATSAROS, D., FRACCHIOLI, S., CAO, G., O'BRIEN-JENKINS, A., RANDALL, T. C., RUBIN, S. C. & COUKOS, G. 2003. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res*, 63, 3403-12.
- ZHAO, Y., VANHOUTTE, P. M. & LEUNG, S. W. S. 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129, 83-94.
- ZIMNA, A. & KURPISZ, M. 2015. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed Research International*, 2015, 549412.

8 Anhang – Werte der Abbildungen

Werte der Abbildungen 10, 11, 23 und 24:

	Ang-2 in pg/ml	Monokultur Fibroblasten Well	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert mit Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert mit Kontakt ECFC	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	3.669,556	6.296,443	7.202,396	5.371,342	3.557,947	5.125,221	2.899,137	3.015,655
	3 Tage	1.044,488	2.109,998	3.102,950	1.850,106	1.568,254	1.843,154	1.296,240	1.110,858
	7 Tage	1.191,915	1.991,592	4.349,770	2.476,830	1.623,038	4.402,920	4.340,011	1.637,804
	15 Tage	1.510,226	3.477,608	4.374,413	3.535,528	2.036,422	10.389,652	3.274,191	5.088,696
	21 Tage	1.019,972	3.490,706	4.074,410	3.077,160	1.698,506	9.263,091	1.709,423	5.104,302
SD	1 Tag	364,446	5.057,458	869,548	4.207,295	475,590	354,316	528,488	2.240,404
	3 Tage	37,573	414,838	1.939,816	272,568	346,397	777,778	496,129	721,028
	7 Tage	147,486	246,543	3.606,888	410,329	542,555	3.026,941	1.374,577	1.285,032
	15 Tage	307,346	1.291,760	1.464,295	920,415	1.018,614	10.331,526	740,659	3.117,904
	21 Tage	29,240	3.408,753	4.594,203	3.111,695	1.461,640	12.783,874	1.282,194	4.987,151
SEM	1 Tag	210,413	2.919,925	502,034	2.429,083	274,582	204,565	305,123	1.293,498
	3 Tage	26,568	239,507	1.371,657	157,367	199,993	449,050	286,440	416,286
	7 Tage	104,288	142,341	2.550,455	236,904	313,244	1.747,605	793,612	741,914
	15 Tage	217,326	745,798	1.035,413	531,402	720,269	7.305,492	427,619	1.800,123
	21 Tage	20,675	1.968,045	3.248,592	1.796,538	843,878	7.380,773	740,275	2.879,333

Werte der Abbildungen 12 bis 16:

	VEGF in pg/ml	Monokultur Fibroblasten Well	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert mit Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert mit Kontakt ECFC	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	333,194	60,005	62,130	473,136	77,500	44,413	129,668	52,289
	3 Tage	164,537	138,164	147,706	167,080	167,329	70,954	166,875	177,417
	7 Tage	319,501	128,580	131,560	151,513	274,685	106,443	621,627	83,918
	15 Tage	664,610	67,558	86,469	1.030,769	1.219,629	40,768	2.071,096	149,256
	21 Tage	608,191	79,670	115,246	657,592	1.339,771	147,041	807,936	35,835
SD	1 Tag	155,586	51,614	69,766	599,561	108,506	53,967	85,138	51,258
	3 Tage	143,501	44,938	115,825	144,299	120,376	15,216	172,511	205,325
	7 Tage	336,368	63,540	82,040	58,981	288,906	46,121	369,098	8,455
	15 Tage	47,952	29,041	21,281	558,782	64,964	13,214	1.122,795	163,466
	21 Tage	751,896	20,846	54,573	542,997	1.188,656	196,513	935,722	9,744
SEM	1 Tag	89,828	29,799	40,280	346,157	62,646	31,158	49,154	29,594
	3 Tage	101,470	25,945	81,901	83,311	69,499	8,785	99,599	118,544
	7 Tage	237,848	36,685	58,011	34,053	166,800	26,628	213,099	4,881
	15 Tage	33,907	16,767	15,048	322,613	45,936	9,344	648,246	94,377
	21 Tage	531,671	12,035	38,589	313,500	686,271	113,457	540,239	5,626

Werte der Abbildungen 12, 13, 14, 17 und 18:

	IL-8 in pg/ml	Monokultur Fibroblasten Well	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert mit Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert mit Kontakt ECFC	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	846,577	3.963,116	2.578,595	4.445,809	736,666	631,664	903,501	769,237
	3 Tage	30,022	190,854	309,975	853,160	310,330	169,532	219,300	73,400
	7 Tage	103,171	253,725	1.267,361	277,187	216,076	389,063	700,602	183,107
	15 Tage	81,037	774,499	1.069,273	828,784	184,178	469,631	1.036,315	486,579
	21 Tage	53,538	1.468,093	831,986	453,285	475,043	669,020	332,106	419,953
SD	1 Tag	403,970	3.763,957	2.884,413	3.283,526	518,110	362,797	379,802	561,747
	3 Tage	6,238	116,936	251,625	1.089,129	117,720	32,441	118,155	30,246
	7 Tage	68,902	75,504	1.291,492	326,624	48,051	300,066	153,655	148,112
	15 Tage	54,839	406,675	798,903	553,586	5,971	553,852	968,637	557,589
	21 Tage	75,715	1.271,932	1.176,605	693,677	582,811	597,276	449,735	580,291
SEM	1 Tag	233,232	2.173,122	1.665,317	1.895,745	299,131	209,461	219,279	324,325
	3 Tage	4,411	67,513	177,925	628,809	67,965	18,730	68,217	17,462
	7 Tage	48,721	43,592	913,223	188,576	27,742	173,243	88,713	85,512
	15 Tage	38,777	234,794	564,910	319,613	4,222	391,632	559,243	321,924
	21 Tage	53,538	734,350	831,986	400,494	336,486	344,837	259,655	335,031

Werte der Abbildungen 12, 13, 14, 19 und 20:

	eNOS in pg/ml	Monokultur Fibroblasten Well	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert mit Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert mit Kontakt ECFC	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	368,920	319,795	354,695	241,379	238,186	292,009	249,800	415,122
	3 Tage	178,611	222,864	201,166	256,169	122,074	154,796	132,028	99,013
	7 Tage	159,822	273,175	14,600	171,055	170,599	156,335	630,569	113,867
	15 Tage	192,543	256,044	69,116	150,578	134,348	156,319	102,394	118,370
	21 Tage	121,204	167,197	133,016	252,651	67,507	55,828	0,000	137,262
SD	1 Tag	192,366	67,090	77,933	184,336	142,164	234,798	140,308	15,134
	3 Tage	157,961	158,900	78,963	329,205	43,047	76,466	86,703	47,031
	7 Tage	67,960	117,579	3,462	185,587	47,089	64,408	364,543	110,162
	15 Tage	100,417	121,377	36,285	124,949	63,408	47,385	91,338	129,197
	21 Tage	142,514	87,503	188,113	171,267	116,926	48,558	0,000	132,969
SEM	1 Tag	111,063	38,735	44,995	106,426	82,079	135,560	81,007	8,737
	3 Tage	111,696	91,741	55,836	190,066	24,853	44,148	50,058	27,153
	7 Tage	48,055	67,884	2,448	107,149	27,187	37,186	210,469	63,602
	15 Tage	71,006	70,077	25,657	72,139	44,836	33,506	52,734	74,592
	21 Tage	100,773	50,520	133,016	98,881	67,507	28,035	0,000	76,770

Werte der Abbildungen 12, 13, 14, 21 und 22:

	bFGF in pg/ml	Monokultur Fibroblasten Well	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert mit Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert mit Kontakt ECFC	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	1.027,426	1.290,963	1.042,067	1.602,047	974,680	1.153,996	1.216,617	1.081,221
	3 Tage	41,507	126,557	125,712	461,297	149,891	166,469	107,398	92,286
	7 Tage	30,347	138,930	204,415	155,342	101,739	256,282	427,492	191,074
	15 Tage	98,200	406,560	277,070	379,531	77,123	173,673	241,964	121,599
	21 Tage	63,513	184,209	79,307	94,912	802,741	221,832	204,295	62,435
SD	1 Tag	685,359	958,074	898,140	785,264	684,795	1.022,369	1.141,869	982,747
	3 Tage	40,591	60,374	84,415	515,005	78,252	159,919	54,167	54,647
	7 Tage	4,417	13,969	38,685	152,477	15,233	263,936	200,704	227,644
	15 Tage	54,159	307,110	35,214	178,990	18,173	190,461	137,276	103,144
	21 Tage	89,820	164,812	112,157	133,935	1.304,879	242,485	298,529	69,178
SEM	1 Tag	395,692	553,144	518,541	453,372	395,367	590,265	659,258	567,389
	3 Tage	28,702	34,857	59,690	297,338	45,179	92,329	31,273	31,550
	7 Tage	3,123	8,065	27,355	88,033	8,795	152,384	115,876	131,430
	15 Tage	38,296	177,310	24,900	103,340	12,850	134,676	79,257	59,550
	21 Tage	63,513	95,154	79,307	77,327	753,372	139,999	172,356	39,940

Werte der Abbildungen 25 und 26:

HDMEC						
	VEGF in pg/ml	Monokultur HDMEC Membran	Monokultur HDMEC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt HDMEC
Mittelwert	1 Tag	1.252,842	1.105,977	1.511,339	1.290,488	1.293,823
	3 Tage	44,914	72,361	675,684	18,113	24,320
	7 Tage	77,489	74,746	577,766	246,744	60,095
	15 Tage	117,502	78,756	1.048,384	1.252,262	114,260
	21 Tage	95,215	61,392	1.182,698	377,353	453,171
SEM	1 Tag	993,812	793,515	1.017,976	847,803	1.068,652
	3 Tage	19,621	11,170	293,342	67,669	30,395
	7 Tage	61,845	9,103	222,210	75,740	20,699
	15 Tage	83,516	12,397	390,911	592,935	37,560
	21 Tage	41,245	14,186	664,755	252,142	236,038
ECFC						
	VEGF in pg/ml	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	60,005	62,130	473,136	129,668	52,289
	3 Tage	138,164	147,706	167,080	166,875	177,417
	7 Tage	128,580	131,560	151,513	621,627	83,918
	15 Tage	67,558	86,469	1.030,769	2.071,096	149,256
	21 Tage	79,670	115,246	657,592	807,936	35,835
SEM	1 Tag	29,799	40,280	346,157	49,154	29,594
	3 Tage	25,945	81,901	83,311	99,599	118,544
	7 Tage	36,685	58,011	34,053	213,099	4,881
	15 Tage	16,767	15,048	322,613	648,246	94,377
	21 Tage	12,035	38,589	313,500	540,239	5,626

Werte der Abbildungen 27 und 28:

HDMEC						
	IL-8 in pg/ml	Monokultur HDMEC Membran	Monokultur HDMEC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt HDMEC
Mittelwert	1 Tag	1.257,480	905,666	3.034,747	1.760,006	1.048,060
	3 Tage	62,423	142,846	756,623	462,305	253,005
	7 Tage	115,270	225,275	966,482	280,722	280,977
	15 Tage	270,823	509,911	962,512	802,626	771,888
	21 Tage	420,431	842,350	1.103,019	853,116	625,923
SEM	1 Tag	577,704	541,103	1.004,376	1.038,868	576,356
	3 Tage	64,710	44,622	436,163	371,282	25,342
	7 Tage	61,351	82,396	424,362	148,565	125,637
	15 Tage	83,589	207,841	464,334	268,358	325,048
	21 Tage	254,220	544,034	433,174	727,489	397,753
ECFC						
	IL-8 in pg/ml	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	3.963,116	2.578,595	4.445,809	903,501	769,237
	3 Tage	190,854	309,975	853,160	219,300	73,400
	7 Tage	253,725	1.267,361	277,187	700,602	183,107
	15 Tage	774,499	1.069,273	828,784	1.036,315	486,579
	21 Tage	1.468,093	831,986	453,285	332,106	419,953
SEM	1 Tag	2.173,122	1.665,317	1.895,745	219,279	324,325
	3 Tage	67,513	177,925	628,809	68,217	17,462
	7 Tage	43,592	913,223	188,576	88,713	85,512
	15 Tage	234,794	564,910	319,613	559,243	321,924
	21 Tage	734,350	831,986	400,494	259,655	335,031

Werte der Abbildungen 29 und 30:

HDMEC						
	eNOS in pg/ml	Monokultur HDMEC Membran	Monokultur HDMEC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt HDMEC
Mittelwert	1 Tag	91,773	59,438	113,764	50,083	64,275
	3 Tage	101,257	58,857	33,582	67,031	63,532
	7 Tage	89,769	78,576	72,280	60,540	108,732
	15 Tage	112,579	48,676	112,341	105,686	120,931
	21 Tage	87,642	59,506	84,261	98,336	141,121
SEM	1 Tag	73,691	41,971	71,676	34,947	45,320
	3 Tage	52,226	21,186	11,658	8,750	6,392
	7 Tage	24,560	25,364	15,588	18,607	37,858
	15 Tage	23,978	26,470	19,870	15,801	20,113
	21 Tage	21,511	15,325	21,357	26,289	65,830
ECFC						
	eNOS in pg/ml	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	319,795	354,695	241,379	249,800	415,122
	3 Tage	222,864	201,166	256,169	132,028	99,013
	7 Tage	273,175	14,600	171,055	630,569	113,867
	15 Tage	256,044	69,116	150,578	102,394	118,370
	21 Tage	167,197	133,016	252,651	0,000	137,262
SEM	1 Tag	38,735	44,995	106,426	81,007	8,737
	3 Tage	91,741	55,836	190,066	50,058	27,153
	7 Tage	67,884	2,448	107,149	210,469	63,602
	15 Tage	70,077	25,657	72,139	52,734	74,592
	21 Tage	50,520	133,016	98,881	0,000	76,770

Werte der Abbildungen 31 und 32:

HDMEC						
	bFGF in pg/ml	Monokultur HDMEC Membran	Monokultur HDMEC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt HDMEC
Mittelwert	1 Tag	389,088	334,496	495,884	290,982	397,357
	3 Tage	120,646	98,239	91,262	735,306	703,931
	7 Tage	125,690	92,654	100,275	670,814	210,754
	15 Tage	79,843	47,290	98,803	375,743	183,974
	21 Tage	68,572	76,950	91,787	410,438	206,954
SEM	1 Tag	68,110	59,136	44,065	38,774	85,592
	3 Tage	38,106	50,960	19,628	439,597	595,282
	7 Tage	43,154	17,299	15,095	409,427	156,024
	15 Tage	28,224	16,793	29,283	220,141	142,704
	21 Tage	37,446	6,634	23,973	271,881	138,468
ECFC						
	bFGF in pg/ml	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	1.290,963	1.042,067	1.602,047	1.216,617	1.081,221
	3 Tage	126,557	125,712	461,297	107,398	92,286
	7 Tage	138,930	204,415	155,342	427,492	191,074
	15 Tage	406,560	277,070	379,531	241,964	121,599
	21 Tage	184,209	79,307	94,912	204,295	62,435
SEM	1 Tag	553,144	518,541	453,372	659,258	567,389
	3 Tage	34,857	59,690	297,338	31,273	31,550
	7 Tage	8,065	27,355	88,033	115,876	131,430
	15 Tage	177,310	24,900	103,340	79,257	59,550
	21 Tage	95,154	79,307	77,327	172,356	39,940

Werte der Abbildungen 33 und 34:

HDMEC						
	Ang-2 in pg/ml	Monokultur HDMEC Membran	Monokultur HDMEC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt HDMEC
Mittelwert	1 Tag	23.734,477	2.678,021	22.809,491	1.611,912	2.816,297
	3 Tage	7.315,478	3.889,288	1.731,749	1.105,558	6.145,514
	7 Tage	12.214,285	5.564,497	3.200,886	3.477,401	6.983,136
	15 Tage	14.050,390	5.779,341	6.118,173	12.329,410	10.987,060
	21 Tage	17.252,475	5.146,410	4.783,547	3.374,708	10.245,135
SEM	1 Tag	3.211,413	550,078	6.595,621	369,178	129,325
	3 Tage	3.168,511	1.543,641	1.140,393	244,380	513,602
	7 Tage	4.966,751	1.810,061	1.723,991	1.001,970	1.675,004
	15 Tage	5.700,004	2.313,684	2.415,206	6.025,739	7.923,001
	21 Tage	5.352,055	2.545,769	1.438,775	475,599	5.487,128
ECFC						
	Ang-2 in pg/ml	Monokultur ECFC Membran	Monokultur ECFC Well	Kokultur Membran	Kokultur Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur Insert ohne Kontakt ECFC
Mittelwert	1 Tag	6.296,443	7.202,396	5.371,342	2.899,137	3.015,655
	3 Tage	2.109,998	3.102,950	1.850,106	1.296,240	1.110,858
	7 Tage	1.991,592	4.349,770	2.476,830	4.340,011	1.637,804
	15 Tage	3.477,608	4.374,413	3.535,528	3.274,191	5.088,696
	21 Tage	3.490,706	4.074,410	3.077,160	1.709,423	5.104,302
SEM	1 Tag	2.919,925	502,034	2.429,083	305,123	1.293,498
	3 Tage	239,507	1.371,657	157,367	286,440	416,286
	7 Tage	142,341	2.550,455	236,904	793,612	741,914
	15 Tage	745,798	1.035,413	531,402	427,619	1.800,123
	21 Tage	1.968,045	3.248,592	1.796,538	740,275	2.879,333

Werte der Abbildung 35:

Zytokin-Sekretion von HDMEC in Kokultur auf der Membran					
pg/ml	1 Tag	3 Tage	7 Tage	15 Tage	21 Tage
VEGF	1.511,339	675,684	577,766	1.048,384	1.182,698
IL-8	3.034,747	756,623	966,482	962,512	1.103,019
eNOS	113,764	33,582	72,280	112,341	84,261
bFGF	495,884	91,262	100,275	98,803	91,787
Ang-2	22.809,491	1.731,749	3.200,886	6.118,173	4.783,547
Zytokin-Sekretion von ECFC in Kokultur auf der Membran					
pg/ml	1 Tag	3 Tage	7 Tage	15 Tage	21 Tage
VEGF	473,136	167,080	151,513	1.030,769	657,592
IL-8	4.445,809	853,160	277,187	828,784	453,285
eNOS	241,379	256,169	171,055	150,578	252,651
bFGF	1.602,047	461,297	155,342	379,531	94,912
Ang-2	5.371,342	1.850,106	2.476,830	3.535,528	3.077,160

9 Danksagung

In der elektronischen Version entfernt.

10 Lebenslauf

In der elektronischen Version entfernt.

