

Etablierung und Charakterisierung eines  
prävascularisierten  
*in vitro* Schleimhaut-Äquivalents

---

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Heide-Katharina Helene Bauer**

geboren am 21. Januar 1988 in Stuttgart-Bad Cannstatt

Dezember 2017

Tag der Prüfung: 22. Februar 2018

*Für Pepe*



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Summary .....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 <i>Tissue Engineering</i> von Weichgewebe in der Regenerativen Medizin.....	5
1.1.1 Mundschleimhaut als optimaler Weichgewebe-Ersatz .....	6
1.1.2 Alternativen zu autologen Donorgeweben.....	10
1.1.3 Generierung, Einsatz und Problematik von „ <i>full-thickness oral mucosa</i> “- Äquivalenten .....	12
1.2 Grundlagen der Vaskularisierung.....	14
1.2.1 Aufbau von Blutgefäßen.....	14
1.2.2 Vaskulogenese.....	16
1.2.3 Angiogenese.....	17
1.3 Konzepte der Vaskularisierung.....	21
1.4 Zielsetzung .....	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Chemikalien.....	27
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	28
2.1.3 Kits.....	30
2.1.4 Medien.....	30
2.1.5 Antikörper.....	31
2.1.6 Microbeads.....	33
2.1.7 Biomaterialien .....	33
2.1.8 Verbrauchsmaterialien .....	33
2.1.9 Gebrauchsmaterialien .....	34
2.1.10 Geräte .....	35
2.1.11 Computerprogramme.....	36
2.1.12 Zellen und Gewebeproben.....	36
2.1.13 Tiere .....	36

2.2	Methoden .....	37
2.2.1	Steriles Arbeiten .....	37
2.2.2	Etablierung der Isolation primärer Zellen.....	37
2.2.3	Kultivieren von Schleimhaut-Äquivalenten in Ko- und Trikultur .....	45
2.2.4	Analyse der Schleimhaut-Äquivalente .....	47
2.2.5	Optimierung der Schleimhaut-Äquivalente.....	51
2.2.6	Analyse der zellulären Kommunikation .....	53
2.2.7	Analyse zellulärer Parameter .....	56
2.2.8	Analyse der Angiogenese <i>in vitro</i> .....	59
2.2.9	Analyse der Anastomose der Schleimhaut-Äquivalente <i>in vivo</i> .....	60
2.2.10	Statistische Auswertung .....	61
3	Ergebnisse.....	63
3.1	Etablierung und Optimierung der Isolation primärer Zellen .....	63
3.1.1	Etablierung und Optimierung der Isolation von Epithelzellen aus oraler Mucosa .....	63
3.1.2	Etablierung und Optimierung der Isolation von Fibroblasten aus oraler Mucosa .....	68
3.1.3	Etablierung und Optimierung der Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen .....	70
3.2	Etablierung und Optimierung eines <i>in vitro</i> Schleimhaut-Äquivalents.....	74
3.2.1	Optimierung der Besiedlungsparameter .....	74
3.2.2	Beurteilung der Eignung von endothelialen Zellen aus Blut und alternativen Geweben. .....	89
3.3	Parakrine Kommunikation im Schleimhaut-Äquivalent .....	90
3.3.1	Identifikation von sezernierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Schleimhaut- Äquivalent.....	90
3.3.2	Quantifizierung der VEGF-Sekretion .....	92
3.3.3	Quantifizierung der Interleukin-8-Sekretion .....	101
3.3.4	Quantifizierung der bFGF-Sekretion .....	107
3.3.5	Quantifizierung der eNOS-Sekretion .....	115
3.3.6	Quantifizierung der Angiopoetin-2-Sekretion.....	123
3.4	Einfluss der ermittelten Faktoren auf zelluläre Parameter im Kontext der .....	
	Angiogenese.....	132
3.4.1	Einfluss auf die Vitalität.....	132
3.4.2	Einfluss auf die Proliferation.....	135
3.4.3	Einfluss auf die chemotaktische Migration .....	137

3.4.4	Einfluss auf angiogene Parameter <i>in vitro</i> .....	140
3.4.5	Einfluss auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen im Schleimhaut-Äquivalent.....	143
3.5	<i>In vivo</i> -Anastomosierung der Schleimhaut-Äquivalente .....	146
3.5.1	Mausmodell.....	146
3.5.2	CAM-Assay.....	150
4	Diskussion.....	153
4.1	Isolationsbedingungen primärer Epithelzellen .....	153
4.2	Vergleich verschiedener Donorgewebe zur Gewinnung von mikrovaskulären Endothelzellen .....	154
4.3	Molekulare Interaktion der Zellen im Schleimhaut-Äquivalent.....	156
4.4	Optimierung der Besiedlungsmethode der HDMEC.....	170
4.5	Optimierung der Prävaskularisierung durch Einsatz von Zytokinen.....	171
4.5.1	Förderung angiogener Prozesse durch VEGF .....	171
4.5.2	Förderung angiogener Prozesse durch IL-8.....	174
4.5.3	Förderung angiogener Prozesse durch bFGF.....	176
4.5.4	Einsatz von VEGF und IL-8 zur Optimierung der Prävaskularisierung.....	178
4.6	Anastomose der Schleimhaut-Äquivalente <i>in vivo</i> .....	180
4.7	Ausblick .....	183
5	Literaturverzeichnis.....	186
6	Anhang.....	206
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	206
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	208
6.3	Tabellenverzeichnis.....	212
6.4	Werte der Abbildungen .....	212
6.5	Publikationen und Kongressbeiträge .....	225
	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
	Danksagung .....	229
	Eidesstattliche Erklärung.....	231



## Zusammenfassung

*Tissue Engineering* beschreibt die *in vitro*-Generierung künstlicher Gewebe mit autologen Zellen des jeweiligen Patienten. In der Regenerativen Medizin gewinnt dieses Gebiet eine immer größere Bedeutung im Kontext der operativen Geweberekonstruktion zur Therapie erworbener und angeborener Fehlbildungen sowie zur Wundabdeckung und Unterstützung der Wundheilung. Der Einsatz von größeren, mittels *Tissue Engineering* generierten Gewebe-Äquivalenten ist derzeit noch limitiert durch eine nicht ausreichend schnelle Vaskularisierung nach Transplantation. Diese führt, aufgrund der mangelnden Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, zu Nekrosen und Abstoßung des Transplantats. Eine Prävaskularisierung von Gewebe-Konstrukten bereits *in vitro* durch den Einsatz mikrovaskulärer Endothelzellen stellt eine vielversprechende Alternative dar, um dieser Problematik entgegenzuwirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines prävaskulierten Schleimhaut-Äquivalents in Trikultur unter Verwendung von mikrovaskulären Endothelzellen sowie oralen Epithelzellen und Fibroblasten. In einem ersten Schritt wurde die Isolation und Kultivierung der primären Zellen etabliert, die im Weiteren für die Generierung der Gewebe-Äquivalente eingesetzt wurden. In diesem Kontext wurden verschiedene Besiedlungsparameter analysiert und optimiert, um eine zuverlässige Prävaskularisierung und Epithelialisierung zu garantieren. Eine vorangehende Besiedlung mit Fibroblasten war in Ko- wie auch Trikultur für die Bildung einer Prävaskularisierung und eines Epitheliums förderlich, vermutlich aufgrund der von den Fibroblasten sezernierten Wachstumsfaktoren. Hinsichtlich dieser beiden Charakteristika eignete sich zudem eine Besiedlung mit Epithelzellen sieben Tage vor den mikrovaskulären Endothelzellen am besten.

Zur Analyse der interzellulären Kommunikation innerhalb solcher Gewebe-Äquivalente wurden im *Multi Cytokine ELISA* pro-angiogene Wachstumsfaktoren selektioniert und ihre Sekretion im Schleimhaut-Konstrukt zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert. In der Kulturschale förderte die Kokultivierung gegenüber der Monokultur die endotheliale Sekretion von VEGF, bFGF, eNOS und Ang-2 sowie die fibroblastäre Sekretion von bFGF und Ang-2. Eine räumlich getrennte Kokultivierung bewirkte bei den Endothelzellen eine ver-

stärkte Sekretion von VEGF, bFGF und eNOS, bei den Fibroblasten eine gesteigerte Ausschüttung von VEGF, bFGF, eNOS und Ang-2 im Vergleich zu den Kokulturen mit direktem zellulärem Kontakt. In allen Ansätzen konnte ein komplexes Zusammenspiel der analysierten Faktoren im Kontext der Prävasikularisierung beobachtet werden.

Zusätzlich hatte die dreidimensionale Kollagenmembran einen stark fördernden Einfluss auf die Sekretion aller analysierten Zytokine. Dieser überstieg für VEGF die Stimulation durch die Kokultivierung. Die Sekretion von bFGF und eNOS wurde durch die Membran und die Kokultivierung annähernd gleich stark stimuliert. Diese Erkenntnisse geben Aufschluss über die interzellulären Wechselwirkungen innerhalb des Schleimhaut-Äquivalents und die Beteiligung der einzelnen Zytokine an dessen Prävasikularisierung.

Im Folgenden konnte eine Stimulation von zellulären Parametern, die im Kontext der Angiogenese essentiell sind, durch VEGF, IL-8 und bFGF nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit diesen Zytokinen führte zu einer durchgehenden Steigerung der endothelialen Vitalität, Proliferation, chemotaktische Migration sowie verschiedener angiogener Eigenschaften im *Tube Formation Assay*. Im kokultivierten Schleimhaut-Äquivalent führte eine Stimulation mit VEGF und IL-8 zu einer schnelleren und dichteren Ausbildung der Prävasikularisierung.

Abschließend wurde eine erfolgreiche Anastomose von *in vitro* prävasikularisierten Schleimhaut-Äquivalenten in Ko- und Trikultur an das Blutgefäßsystem der Maus bzw. der CAM von Hühnerembryonen nachgewiesen. Bereits fünf Tage nach Transplantation konnten murine bzw. aviäre Erythrozyten in den gefäßähnlichen Strukturen der Schleimhaut-Konstrukte detektiert werden. Zehn Tage nach Transplantation zeigte sich eine dichte Vaskularisierung, gebildet aus humanen Endothelzellen, mit durchgehender Invasion muriner Blutzellen.

Es konnte somit erfolgreich ein prävasikularisiertes und epithelialisiertes Schleimhaut-Äquivalent *in vitro* generiert werden, das nach Transplantation *in vivo* eine zeitnahe Anbindung an das Blutgefäßsystem erfuhr. Des Weiteren wurde die interzelluläre Kommunikation in solchen Konstrukten analysiert, um grundlagenwissenschaftliches sowie anwendungsbezogenes Verständnis der Vaskularisierungsmechanismen zu erlangen. Für die Zytokine VEGF und IL-8 konnte ein positiver Einfluss auf die Prävasikularisierung in Schleimhaut-Äquivalenten demonstriert werden. Die vorliegende Arbeit trägt damit dazu bei, prävasikularisierte Schleimhaut-Äquivalente der klinischen Routine näher zu bringen.

## Summary

In the field of Regenerative Medicine, Tissue Engineering of artificial constructs utilizing autologous cells of the respective patient becomes more and more important. This is relevant especially for reconstruction surgeries to treat inherited and acquired malformations or to cover and support wounded tissue. The use of larger tissue equivalents generated with the use of Tissue Engineering methods is to date limited by a delayed and/or insufficient vascularization after transplantation in the patient. Thereby, the constructs lack nutrient and oxygen supply, which often leads to necrosis and graft rejection. A promising approach to counteract these problems is the generation of an *in vitro* pre-vascularization inside the construct by the use of microvascular endothelial cells.

The main objective of this thesis was the *in vitro* establishment and characterization of a functionally pre-vascularized mucosa equivalent in triculture using microvascular endothelial cells, oral epithelial cells and fibroblasts. Initially, the isolation and cultivation of the involved cell types had to be established. Afterwards, several cultivation parameters were tested to ensure ideal conditions for all cell types and an optimal generation of the tissue equivalent. A preceding cultivation of the constructs with fibroblasts showed best results regarding the development of capillary-like structures (CLS) and an epithelium, followed by a seeding of epithelial cells seven days prior to endothelial cultivation. The growth factors secreted by the fibroblasts in the period before other cells were co- or tri-cultured presumably established a suitable milieu to promote the desired characteristics.

The next aim was to analyze the intercellular communication in such tissue equivalents with regard to optimize the prevascularization. The secreted pro-angiogenic cytokines VEGF, IL-8, bFGF, eNOS and Ang-2 were selected and quantified in the supernatant of different mono- and cocultures of endothelial cells and fibroblasts. Co-cultivations fostered the endothelial secretion of VEGF, bFGF, eNOS and Ang-2 as well as the secretion of bFGF and Ang-2 by fibroblasts. Furthermore, cultivation without direct intercellular contact led to an increased secretion of VEGF, bFGF and eNOS by endothelial cells and a higher secreted amount of VEGF, bFGF, eNOS and Ang-2 by fibroblasts compared with co-cultures with direct cellular contact. In all approaches, a complex interaction of the analyzed molecules was observed.

The threedimensional collagen membrane additionally stimulated the cytokine secretion. This effect exceeded the stimulation of the co-cultivation for VEGF and showed great impact on the secretion of IL-8. The secretion of bFGF and eNOS were stimulated similarly by the collagen membrane and the co-cultivation. These findings help understanding the cellular interactions in the context of tissue equivalents and the involvement of each individual cytokine in their prevascularization.

Hereafter, the effect of VEGF, IL-8 and bFGF on cellular parameters that are crucial in the context of angiogenesis was analyzed. The treatment of microvascular endothelial cells with these cytokines promoted cell vitality, proliferation and chemotactic migration as well as angiogenic parameters in tube formation assays. When the cocultured mucosa equivalent was cultivated in media containing VEGF and/or IL-8, a faster and denser prevascularisation was achieved.

Finally, we demonstrated a successful anastomosis of the *in vitro* prevascularized mucosa equivalents in co- and triculture to the vascular system of mice and the chorioallantoic membrane (CAM) of fertilized hen's eggs. Only five days after implantation, murine and avian blood cells could be detected inside the construct's CLS. Ten days after implantation, we observed a dense vascularization of CLS built by human endothelial cells with continuous invasion of murine erythrocytes.

In conclusion, an *in vitro* mucosa equivalent with prevascularization and epithelium was generated successfully. The construct showed a fast anastomosis to the host's vasculature after transplantation. Furthermore, the intercellular communication in such constructs was analyzed to contribute to basic and application-oriented knowledge. The cytokines VEGF and IL-8 showed a positive effect on the establishment of a prevascularization inside the equivalents. Thereby, the present thesis contributes to establish prevascularized mucosa equivalents for the use in clinical applications.

# 1 Einleitung

## 1.1 *Tissue Engineering* von Weichgewebe in der Regenerativen Medizin

Als *Tissue Engineering* wird die gezielte *in vitro* Konstruktion artifizierlicher physiologischer Gewebe bezeichnet, die im Labor mittels autologer Zellen personalisiert hergestellt werden. Das Gebiet des *Tissue Engineerings* entwickelte sich seit Mitte der 1980er Jahre rasant, höchst innovativ und erfolgversprechend [1, 2]. Grundlegender Ansatz ist, aus einer kleinen Gewebebiopsie patienteneigene Zellen zu kultivieren, um diese auf einer geeigneten Gerüstsubstanz, dem *Scaffold*, unter optimierten Bedingungen und geeigneter Stimulation *in vitro* zu einer Gewebe- bzw. Organ-ähnlichen Struktur ausdifferenzieren zu lassen [2]. Diese sollen anschließend zum Ersatz im Patienten dienen. Heutzutage stellt das *Tissue Engineering* Ansprüche grundlagenwissenschaftlicher, interdisziplinärer und translationaler Natur an Zell- sowie Stammzellbiologie, Materialwissenschaft und klinische Forschung [1]. Das Gebiet des *Tissue Engineerings* ist dabei nicht nur hinsichtlich der Vision, vollständig funktionsfähige Organe zu konstruieren, spannend und zukunftssträchtig. Gerade im Kontext der Regenerativen Medizin gewinnen autologe Gewebe-Äquivalente eine immer größere Bedeutung, da nach chirurgischen Eingriffen wie Tumorexzision oder der Rekonstruktionen von Fehlbildungen häufig großflächige Wunden geschlossen werden müssen. Angeborene oder erworbene Dysgenesien treten in allen klinischen Bereichen auf. In der Gynäkologie könnten kongenitale, vaginal wie auch zervikal auftretende Hypospadien, Atresien oder Aplasien, aber auch Tumorentfernungen, Behandlungen von Traumata oder Operationen zur Geschlechtsumwandlung von einer operativen Rekonstruktion profitieren [3–5]. In der Urologie treten urethrale Defekte als Folge von genetischen Krankheiten oder erworbenen Verletzungen auf. Beispiele sind hier Hypospadien und Epispadien sowie Strikturen als Folge von Traumata oder Tumorexzisionen [6–9]. In der Mund-Kiefer-Gesichts- sowie Hals-Nasen-Ohren-Medizin zählen Lippen-Kiefer-Gaumensegel-Spalten zu den häufigsten angeborenen Störungen [10]. Neben weiteren genetischen Dysgenesien führen auch erworbene Verletzungen, Infektionskrankheiten und klinisch notwendige Operationen wie Tumorsektionen zum Verlust von Weichgewebe, welches chirurgisch rekonstruiert werden muss [11–16]. In den angeführten Fällen ist Schleimhaut, insbesondere

Mundschleimhaut, ein beliebtes und optimal geeignetes Donorgewebe zur operativen Rekonstruktion.

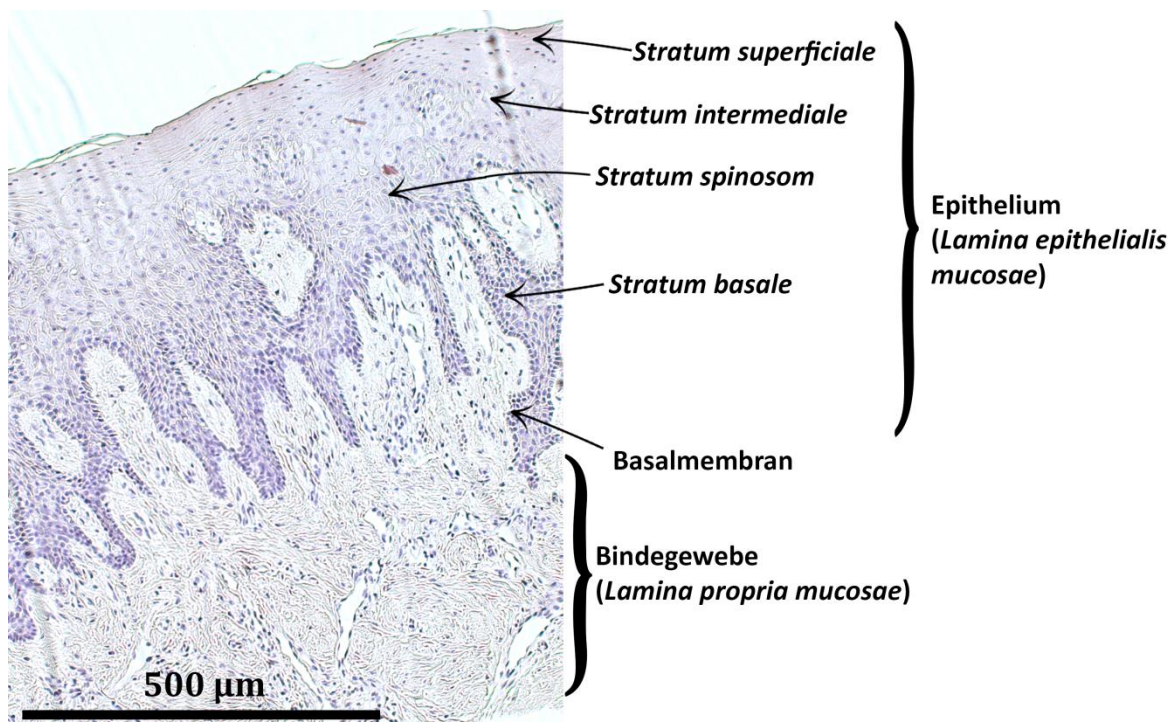
### 1.1.1 Mundschleimhaut als optimaler Weichgewebe-Ersatz

Mundschleimhaut ähnelt in ihrem Aufbau sehr stark anderen internen Schleimhäuten, ist dabei leicht zugänglich und weist eine hohe Resistenz gegenüber Infektionen auf [17, 18]. Dies macht sie zu einem optimalen Weichgewebe-Ersatz für operative Rekonstruktionen im Kontext der Regenerativen Medizin. Autologe Gewebe sind bei solchen Operationen stets von Vorteil, da immunologische Abstoßungsreaktionen vermieden werden können [19]. Im Weiteren soll auf die Anatomie nativer Mundschleimhaut sowie ihre Vor- und Nachteile beim Einsatz als Weichgewebe-Ersatz eingegangen werden.

#### 1.1.1.1 Anatomie nativer Mundschleimhaut

Native Mundschleimhaut gliedert sich in ein mehrschichtiges Plattenepithel (*Lamina epithelialis mucosae*), das durch eine Basalmembran vom darunterliegenden, gut durchbluteten Bindegewebe (*Lamina propria mucosae*) separiert wird (Abbildung 1). Insgesamt weist sie eine durchschnittliche Dicke von 500 µm auf [20]. Auskleidende Mundschleimhaut, wie sie an der Innenseite der Wangen sowie dem weichen Gaumen zu finden ist, besteht aus nicht-keratinisiertem Epithel. In anderen Regionen des Mundes findet sich keratinisierte, mastikatorische Mundschleimhaut, wie am harten Gaumen oder der Gingiva, oder aber spezialisierte Mundschleimhaut wie auf der Zunge [19, 21]. An der Auskleidung des Mundes überwiegt die nicht-keratinisierte Mundschleimhaut mit einem Anteil von ca. 60 % [21]. Um Vorgänge wie Kauen, Schlucken und Sprechen zu ermöglichen, besitzt sie ein lockeres, elastisches Bindegewebe, die *Lamina propria mucosae*, welches in vielen Fällen einer zusätzlichen flexiblen Submucosa aufsitzt [21, 22]. Die *Lamina propria* setzt sich zusammen aus einem Netzwerk an Kollagenfaser des Typs I und III sowie verschiedenen elastischen Fasern, in dem vermehrt Fibroblasten, aber auch in geringerem Ausmaß Lymphozyten, Makrophagen sowie Plasma- und Mastzellen zu finden sind. Zusätzlich sind Gefäß-, Lymph- und neuronale Strukturen sowie Speicheldrüsen in das Bindegewebe eingelagert [19, 23, 24]. Die anschließende, separierende Basalmembran setzt sich aus Kollagen IV,

Laminin und Fibronectin zusammen. Sie wird durch Epithelzellen synthetisiert und ist Wachstumsgrundlage des Epitheliums [24].



**Abbildung 1 - Aufbau nativer humaner Mundschleimhaut.** Native Mundschleimhaut weist eine dreischichtige Organisation auf. Das Epithelium (*Lamina epithelialis mucosae*) dient als Barriere zum Milieu des Mundes. Es ist verantwortlich für die Synthese der Basalmembran, die das Epithelium vom darunterliegenden Bindegewebe (*Lamina propria mucosae*) separiert. Dieses wiederum dient als Stützgewebe und versorgt das Epithel durch seine Vaskularisierung mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Das Epithel der Mundschleimhaut setzt sich aus mehreren Zellschichten zusammen. Die basale Epithelschicht (*Stratum basale*) besteht aus epithelialen Vorläuferzellen, welche sich im Laufe des Generationszyklus der Mucosa differenzieren und bei der Migration in Richtung der Oberfläche ihre Form und Eigenschaften verändern [23, 24]. Zusätzlich synthetisieren die Epithelzellen dieser Schicht die Basalmembran, die sich aus Kollagen IV, Laminin und Fibronectin zusammensetzt und auf der das gesamte Epithelium aufsitzt. Auf das *Stratum basale* folgt die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), in der die Differenzierung der Zellen beginnt [19, 24, 25]. Die Zellen werden größer, flacher und beginnen vermehrt Zytokeratine zu synthetisieren, welche während der weiteren Reifung Ansatzpunkte für Desmosomen bilden. Im Falle des keratinisierten Epithels folgen nun die Körnerschicht (*Stratum granulosum*), in welcher die Keratinisierung der Epithelzellen beginnt, sowie die Hornschicht (*Stratum corneum*), in der diese abgeschlossen ist [24, 25]. Im Verlauf dieser Diffe-

renzung verlieren die Keratinozyten nach und nach ihre Zellorganellen vollständig, flachen maximal ab und akkumulieren verstärkt Lipide, Zytokeratine und weitere Proteine, wie u.a. Involucrin, die später für die Barrierefunktion des *Stratum corneum* essentiell sind [19, 24]. Das *Stratum corneum* setzt sich aus toten, terminal differenzierten und keratinisierten Epithelzellen zusammen, welche eine starke Vernetzung zellulärer Proteine aufweisen, die eine Art Schutzmantel zum Milieu des Mundes bildet. Durch eine Vielzahl an interzellulären Verbindungspunkten, hauptsächlich Desmosomen und *Tight junctions*, erhält die Schicht Stabilität und Flexibilität gegenüber mechanischen Belastungen. Lipide bilden zusätzliche eine hydrophobe Barriere zum Mundraum [23–25]. Im nicht-keratinisierten Epithel ersetzen das *Stratum intermedium* sowie das *Stratum superficiale* die Körner- bzw. Hornschicht [19, 24, 25]. Auch hier akkumulieren die Epithelzellen im Verlauf ihrer Differenzierung verstärkt Lipide, Proteine sowie Zytokeratine und verändern ihre Morphologie, jedoch in einer nicht so prominenten Weise. Im Gegensatz zum keratinisierten Epithel bleiben ihre Zellorganellen inklusive Zellkern aber weitestgehend vorhanden [19, 24].

#### 1.1.1.2 Eignung als autologer Weichgewebe-Ersatz

Nicht-keratinisierte Mundschleimhaut stellt das Donorgewebe der Wahl für viele medizinische Rekonstruktionen dar. Aufgrund ihrer Flexibilität und Elastizität hält sie einigen mechanischen Strapazen stand - ein Vorteil auch gegenüber dem keratinisierten Epithel der Haut. Letztere wäre als Donorgewebe zwar in deutlich größeren Mengen verfügbar und leicht zugänglich, ist aufgrund ihrer festeren Struktur sowie ihrer Behaarung jedoch deutlich schlechter geeignet [17, 23]. Nach Transplantation zeigt Haut oftmals eine ungewollte Kontraktion oder Schwellung, was bei Mundschleimhaut nicht zu beobachten ist [26]. Hinzukommt, dass Mundschleimhaut aufgrund ihres natürlichen Milieus besser für den Ersatz innerer, meist feuchter Epithelien geeignet ist [23]. Der Vorteil gegenüber anderen, endogenen Donorgeweben - wie Blasen- oder Darmmucosa - ist hier die freie Zugänglichkeit ohne großen operativen Eingriff [8, 27]. Eine weitere wichtige Eigenschaft von Mundschleimhaut als Donorgewebe ist ihre hohe Resistenz gegenüber Infektionen. Native Mundschleimhaut ist kontinuierlich einem stark mikrobiellen Milieu sowie einer Vielzahl von Antigenen ausgesetzt, zeigt dabei jedoch nur selten Entzündungs- oder allergische Reaktionen [28, 29]. Diese „orale Toleranz“ ist zum einen auf die angesprochene

Proteinschutzschicht der Zellen sowie den Lipidmantel als Barriere zurückzuführen [17, 18, 28]. Zum anderen synthetisieren die Zellen spezifische antimikrobielle Peptide wie Defensine und die Mundschleimhaut als Ganzes verfügt über eine Art spezialisiertes Immunsystem, das *Mucosa associated lymphoid tissue* (MALT) [19, 28]. Gerade bei Einsatz als Donorgewebe für die operative Rekonstruktion ist diese hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen von großem Vorteil, da Infektionen an Operationsstellen ein generelles Risiko darstellen und sehr häufig zu Komplikationen führen. Ein weiterer nennenswerter Vorteil der Mundschleimhaut ist ihre gut durchblutete, aber dabei relativ dünne *Lamina propria*. Diese ermöglicht eine schnelle Anbindung des Transplantats an das vorhandene Blutgefäßsystem, sodass frühzeitig eine Versorgung des Gewebes stattfindet, wodurch eine Nekrose und damit verbundene Abstoßung des Transplantats verhindert werden kann [17, 20, 23]. Zudem zeigte orales Epithelium im Tiermodell, bei Transplantation von Mundschleimhaut in Blasendefekte, eine Konversion in Urothel und damit eine spezifische Anpassung der Epithelzellen an das sie umgebende Mikromilieu [30].

#### 1.1.1.3 Problematik beim Einsatz autologer Mundschleimhaut

Ein deutlicher Nachteil autologer Mundschleimhaut als Donorgewebe ist die limitierte Verfügbarkeit. In vielen Fällen ist eine Abdeckung von Wunden oder eine Rekonstruktion größentechnisch nicht möglich oder mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden [17, 18, 26, 31]. Im Bereich der Donorstelle treten häufig Morbiditäten auf, die nicht selten zusätzliche operative Korrekturen im Mundbereich notwendig machen [17, 19]. Zu den häufigsten Komplikationen zählen Narbenbildung und Kontraktionen, die zu Sensibilitätsstörungen bis hin zu einer eingeschränkten Lippenbeweglichkeit führen können [17, 19, 32]. Allgemein treten Schmerzen verschiedener Stärke auf, Taubheit sowie Anspannung des Mundraums, zum Teil mit Einschränkung der Beweglichkeit [17, 27, 33]. Auch neuronale Schäden können durch die hohe Zahl an Nerven in der Nähe der Entnahmestellen auftreten [27]. Generell stellt die Entnahme von Mundschleimhaut in Größenordnungen, die für die meisten Wundabdeckungen und Rekonstruktionen nötig sind, eine zusätzliche Belastung und einen operativen Mehraufwand dar. Dies und die Begrenztheit des verfügbaren Gewebes limitiert die Entnahme enorm [19, 27, 34]. Im Falle von Korrekturen kongenitaler Defekte betrifft dies sehr kleine Kinder, bei denen eine nochmals begrenzte Menge an transplantierbarer Mundschleimhaut zur Verfügung steht und denen die zusätz-

liche Belastung schwer erklärt werden kann [35]. Aufgrund der beschriebenen Problematiken begann eine intensive Suche nach Alternativen zu autologen Donorgeweben.

### 1.1.2 Alternativen zu autologen Donorgeweben

Erste Schritte bei der Suche nach Alternativen zu autologen Donorgeweben für Wundabdeckungen, Rekonstruktionen und operative Korrekturen stellten der Einsatz von azellulären Materialien sowie epithelialen „*Sheets*“ dar. Letztere wurden bereits in den frühen 80er Jahren eingesetzt, um die Wundheilung nach Verbrennung oder aber intraoral zu fördern. Häufig handelte es sich hierbei um Allotransplantate, Haut- oder Mundschleimhautgewebe Verstorbener, das in Kultur genommen wurde [36–38]. Andere Ansätze nutzten Biopsien von Haut und Mundschleimhaut von Patienten, um primäre Zellen zu isolieren und diese zur Kultivierung epithelialer *Sheets* zu verwenden [39–41]. Die erzielten Ergebnisse beider Ansätze nach Transplantation zeigten sich sehr variabel: Zum einen erwiesen sich solche epithelialen Zellsheets als sehr fragil und instabil, was ihre Handhabung erschwerte [22, 42]. Zum anderen trat das Problem der Narbenbildung und Wundkontraktion auf, die durch das Epithelsheet weder vermieden noch vermindert werden konnte [22, 40]. Vermutet wird, dass die Kontraktion durch die mangelnde Stabilität aufgrund des Fehlens von Basalmembran und Bindegewebe verursacht wurde [40]. Einige Studien berichteten, dass einfache Zellsheets bei großflächigen und tiefreichenden Wunden oftmals nicht zu einer wirklichen Verbesserung der Wundheilung führten [37]. Jedoch zeigten sich auch eindeutige Vorteile und positive Ergebnisse bei Einsatz epithelialer *Sheets*: so beschrieben Alvarez-Díaz *et al.* eine Beschleunigung der Wundheilung sowie eine Heilung schwerwiegender Wunden, die ohne diese Methode eventuell keine Genesung erfahren hätten [43]. Zudem brachte der Einsatz autologer Zellsheets bei der Therapie schwerer Verbrennungen einen Vorteil gegenüber der Standardtherapie und führte zu einer deutlich reduzierten Sterblichkeit von 48 % auf 14 % [39].

Azelluläre Materialien wurden zunächst hauptsächlich durch Dezellularisierung humanen oder tierischen Gewebes gewonnen. Diese wurden zur Rekonstruktion verschiedener defekter Gewebe verwendet, erzielten jedoch ebenfalls unterschiedliche *Outcomes*. Dezellularisierte Blasenmatrix, hauptsächlich basierend auf Kollagenen, zeigte sich als ebenso geeignet wie autologe Mundschleimhaut zur Korrektur einfacher urethraler Strikturen im

Mensch wie auch im Tiermodell [44, 45]. Mit steigender Komplexität der Strikturen erzielte der Einsatz autologer Mucosa jedoch bessere Erfolgsraten [44]. Im Tierversuch zeigte sich am Kaninchenmodell bei urethraler Rekonstruktion mit dem Biomaterial SIS (*porcine small intestinal submucosa*), welches auf einer dezellularisierten Kollagenmatrix des Dünndarms von Schweinen beruht, eine verzögerte Epithelialisierung und eine histologisch abnorme Gewebebildung [46]. Im direkten Vergleich mit spontaner urethraler Regeneration schnitt die mit SIS rekonstruierte Gruppe deutlich schlechter ab [47]. Weitere Studien bestätigten, dass dezellularisierte Biomaterialien sich durchaus als *onlay graft*, also zur einfachen Wundabdeckung, eignen, nicht jedoch zur komplexeren Rekonstruktion [48–53]. Vorteilhaft an der Verwendung dezellularisierter Gewebe ist, insbesondere durch neuere, schonendere Dezellularisierungsverfahren, dass die mechanischen Eigenschaften der Gewebe weitestgehend aufrechterhalten werden, da ihre mikroanatomische Struktur und Komposition erhalten bleibt [54]. Zudem sind sie noch in der Lage, Wachstumsfaktoren freizusetzen, die sich wiederum positiv auf die Geweberegeneration auswirken [48]. Als weiterer Vorteil dezellularisierter biologischer Materialien wird ihre gute immunologische Verträglichkeit gesehen, welche auf einen Verlust des *major histocompatibility complex* (MHC) zurückgeführt wird [55–58]. Zum Teil bestehen jedoch Zweifel an der vollständigen Freiheit der dezellularisierten Materialien von Zellfragmenten [35]. Bei Analyse verschiedener solcher Matrices konnte DNA nachgewiesen werden [35, 59, 60]. Die Herstellung großer Quantitäten zellfreier Biomaterialien in geeigneter Qualität scheint dabei ein Problem darzustellen [61].

Neben dezellularisierten Biomaterialien besteht auch die Möglichkeit, synthetische Materialien einzusetzen. Insbesondere mit zunehmender Relevanz und Erforschung von Technologien des 3D-Drucks und der additiven Fertigung entstehen neue vielversprechende Möglichkeiten zur Synthese azellulärer Materialien [62, 63]. Sie bringen den Vorteil, dass sie gänzlich definiert und modifiziert werden können hinsichtlich ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie ihrer Biokompatibilität und Degradation [61]. Methoden des 3D-Drucks zur Rekonstruktion sind im klinischen Alltag bereits angekommen und besonders in der MKG, Orthopädie und Gefäßchirurgie wichtig [62]. Auf dem Gebiet der Weichgewebsrekonstruktion sind jedoch Biomaterialien-basierte Systeme derzeit relevanter.

Schon vor dem Jahr 2000 traten erste Ansätze auf, azelluläre Materialien mit Zellen zu besiedeln [64–66]. Diese zeigten im Tierversuch bessere regenerative Eigenschaften als epitheliale *Sheets* [66]. Zudem zeigte sich ein deutlicher Vorteil von besiedelten gegenüber unbesiedelten Biomaterialien. Dezellularisierte Kollagenmatrix, generiert aus Submucosa der Blase, führte bei alleiniger Verwendung zur urethralen Rekonstruktion zu einer schlechten Geweberegeneration, Neigung zu Strikturen und Zerfall des Transplantats. Wurden die Materialien hingegen mit Zellen besiedelt, führte dies zu normaler Gewebebildung [52, 67–71]. Im Laufe der Jahre entwickelte sich das Gebiet des *Tissue Engineerings* immer weiter. Eine Vielzahl an präklinischen Studien zeigt vielversprechende Ergebnisse bezüglich Anwendungsgebieten in verschiedenen klinischen Bereichen. So konnten in Tiermodellen bereits erfolgreich *in vitro* konstruierte Gewebe zur Rekonstruktion von Vagina [72–74], Uterus [75], Urethra [76, 77] und oraler Mucosa zur Urethrarekonstruktion [78] sowie zur intraoralen Wundabdeckung [79] eingesetzt werden. Auch im Menschen zeigten sich Konstrukte aus Biomaterialien, die in Kokultur oder nur mit einem Zelltyp besiedelt wurden, als vielversprechend für die Rekonstruktion verschiedener Gewebedefekte [80]. Verschiedene Studien beschrieben erfolgreich die Rekonstruktion von humaner Blase [80], Urethra [8], Vagina [81], Cornea [82], Bronchien [83] oder der Trachea [84] sowie oraler Mucosa [69, 85–88]. Gerade die Generierung und der Einsatz von sogenannten „*full-thickness oral mucosa*“-Äquivalenten findet vielfältiges Forschungsinteresse und wird im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.1.3 Generierung, Einsatz und Problematik von „*full-thickness oral mucosa*“-Äquivalenten

Autologe Mundschleimhaut stellt, wie oben beschrieben, ein beliebtes Donorgewebe zur operativen Rekonstruktion sowie Wundabdeckung dar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass mannigfaltige Ansätze grundlagenwissenschaftlicher und klinischer Forschung existieren, mit dem Ziel, ein funktionelles Mundschleimhaut-Äquivalent mittels *Tissue Engineering* zu generieren. Epitheliale Monokulturen, kultiviert auf verschiedenartigsten *Scaffolds*, finden dabei auch heute noch klinische Anwendung [82, 85, 89]. Für die Abdeckung oberflächlicher Wunden oder, wie von Dobrowolski *et al.* beschrieben, zur Regeneration der Cornea, mögen solche „*partial-thickness oral mucosa*“-Äquivalente ausreichend sein [82, 85, 89]. Für größere, tiefere und komplexere Wunden sowie Rekonstruktionen zeigten sich

„full thickness oral mucosa“-Äquivalente vielversprechender [67]. Ziel dabei ist die Generierung eines Konstrukts, das der nativen Mundschleimhaut möglichst nahekommt. Um dies zu erreichen, werden orale Epithelzellen zusammen mit Fibroblasten, meist gewonnen aus einer kleinen Mundschleimhaut-Biopsie, auf einem geeigneten Biomaterial kultiviert. Die Kokultivierung fördert die Differenzierung der Epithelzellen sowie die Bildung eines mehrschichtigen Epitheliums und unterstützt die Ausbildung einer Art Bindegewebe im Konstrukt, welches wiederum die Stabilität erhöht [19, 90–92]. Kinikoglu *et al.* konnten anhand verschiedener, mittels *Tissue Engineering* generierter Konstrukte *in vitro* zeigen, dass die Herkunft der Fibroblasten (oral, dermal oder corneal) signifikante Auswirkungen auf die Struktur und die Dicke des Epitheliums hatten, nicht aber auf dessen Differenzierung [93]. Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben die Generierung von „full-thickness oral mucosa“-Konstrukten *in vitro*, basierend auf oralen Epithelzellen und Fibroblasten. Die dabei verwendeten Gerüstmatrices reichen von azellulärer humaner Dermis, meist von Kadavern [92, 94], über von den jeweiligen Arbeitsgruppen eigens hergestellten Plasma- [87], Fibrin- [95] oder Kollagen-basierten *Scaffolds* [31, 93, 96] bis hin zu kommerziell verfügbaren, Kollagen-basierten Materialien [32, 97]. Trotz der erfolgreichen *in vitro* Konstruktion solcher Mucosa-Äquivalente existieren bislang nur wenige Studien, die den Einsatz in Tier oder Mensch beschreiben. Xie *et al.* generierten ein „full-thickness oral mucosa“-Konstrukt auf elektrogesponnenen Seidenprotein-Matrices und demonstrierten die erfolgreiche Verwendung zur Rekonstruktion der Urethra im Hund [78]. Bhargava und Kollegen verwendeten ein artifizielles Mundschleimhaut-Konstrukt, basierend auf oralen Epithelzellen und Fibroblasten auf dezellularisierter humaner Dermis, zur Rekonstruktion der Urethra [98]. Von den fünf Patienten zeigten zwei innerhalb des 3-Jahres-Follow-ups Komplikationen in Form von Kontraktion des Gewebes und Fibrose. Bei den übrigen drei zeigte sich die Rekonstruktion komplikationslos [98]. Zur intraoralen Wundabdeckung verwendeten Llamas *et al.* ein Konstrukt, welches sich aus oralen Epithelzellen und Fibroblasten in einem Plasma-Fibrin-*Scaffold* zusammensetzte [87]. Das erste Konstrukt schrumpfte innerhalb des ersten Jahres stark und musste durch ein zweites ersetzt werden, welches ein erfolgreiches 2-Jahres-Follow-up zeigte [87]. Eine andere Arbeitsgruppe setzte eben dieses Konstrukt von Llamas *et al.* erfolgreich zur intraoralen Abdeckung von mittels *Fibula-Flap* rekonstruierten Kieferknochen ein [86].

Die geringe Zahl an präklinischen Studien und Anwendungen in Mensch und Tier verdeutlicht die immer noch bestehenden Limitationen von *in vitro* generierten Gewebe-Äquivalenten. Trotz erster vielversprechender Ergebnisse bestehen Schwierigkeiten, die den routinemäßigen Einsatz verhindern. Die Hauptproblematik bei Transplantation größerer „*full-thickness oral mucosa*“-Konstrukte ist die unzureichende Vaskularisierung dieser, welche im Patienten zu einem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen im Transplantat führt [99, 100]. Per Diffusion ist die Versorgung nur über 100-200 µm möglich [101–103]. Sobald ein Transplantat diese Größe überschreitet, ist es auf Anbindung durch das patienteneigene Blutgefäßsystem angewiesen [100]. Eine verzögerte Angiogenese des Gewebe-Äquivalents führt zu einem schlechten Anwachsen, häufig vergesellschaftet mit Nekrose und anschließender Abstoßung des Transplantats [19, 99, 104, 105]. In der Literatur existieren diverse Strategien, um dieser Problematik zu begegnen. Diese sollen nach einem Exkurs in die Grundlagen der Vaskularisierung genauer beleuchtet werden.

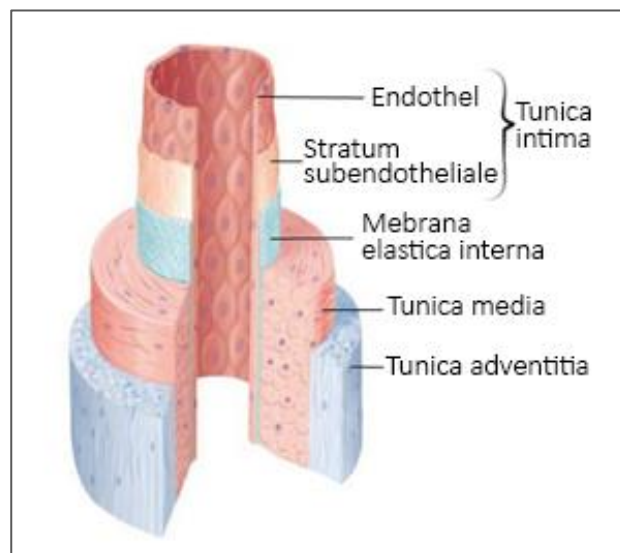
## 1.2 Grundlagen der Vaskularisierung

Die Bildung von Blutgefäßen im menschlichen Körper beruht auf zwei zentralen Prozessen, der Vaskulogenese und der Angiogenese [106]. Beide sind essentiell für die Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Organismus relevant im Rahmen von Wundheilung, Wachstums, Adaption an Hypoxie, Schwangerschaft und des weiblichen Menstruationszyklus [107–109]. Während die Vaskulogenese hauptsächlicher Mediator der Gefäßbildung im Embryo ist, spielt die Angiogenese eine wichtigere Rolle im adulten Organismus [110].

### 1.2.1 Aufbau von Blutgefäßen

Humane Blutgefäße gliedern sich in Arterien, welche Blut vom Herzen weg in die Peripherie transportieren, Venen, die Blut aus der Peripherie zum Herzen zurückführen und Kapillaren. Letztere bilden in Organen und Geweben ein feingliedriges Kapillarnetzwerk, das über Arteriolen Blut erhält und dieses über Venolen zurück in Richtung Herz dirigiert [111]. Arterien und Venen zeichnen sich durch einen dreischichtigen Aufbau in *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* aus (Abbildung 2) (lat. *Tunica* = Gewebsschicht, *intimus* = der Innerste, *media* = zentral, *advenire* = hinzukommen). Erstere bezeichnet die innerste Schicht der Gefäße, die sich luminal aus dem Endothel, einer einzelligen, spezialisierten

Epithelzellschicht, und der sich ihr anschließenden, zarten Bindegewebsschicht (*Stratum subendotheliale*; lat. *stratum* = Decke) zusammensetzt. Das Endothel separiert das Blut vom umgebenden Organparenchym und dient als interaktive Barriere, die Diffusions- sowie Transportvorgänge zwischen beiden ermöglicht. Zudem ist es essentiell für die Regulation von Vasodilatation und -konstriktion sowie die Kontrolle von Koagulationsmechanismen des Blutes. Daneben ermöglicht das Endothel die Adhäsion verschiedener Zellen, was insbesondere für das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt. Auf das *Stratum subendotheliale* folgt die *Membrana elastica interna*, eine Membran elastischer Fasern, die je nach Art des Gefäßes schwach (Venen) oder stark (Arterien) ausgeprägt vorliegt. An sie schließt sich die *Tunica media* an, bestehend aus glatten Muskelzellen und Kollagenfasern, die mitverantwortlich für die Gefäßkontraktion und darüber die Regulation der Durchblutung ist. Die *Tunica media* ist durch die *Membrana elastica externa* von der *Tunica adventitia* getrennt. Letztere bezeichnet die äußerste Schicht der Gefäße, die als eine lockere Schicht Bindegewebe neben elastischen sowie Kollagenfasern auch Nerven, Fibroblasten und zum Teil weitere Gefäße enthält. Kapillaren besitzen dagegen nur einen dreigliedrigen Aufbau aus Endothel, Basalmembran und außen aufliegenden, stabilisierenden Perizyten sowie glatten Muskelzellen [111–114].

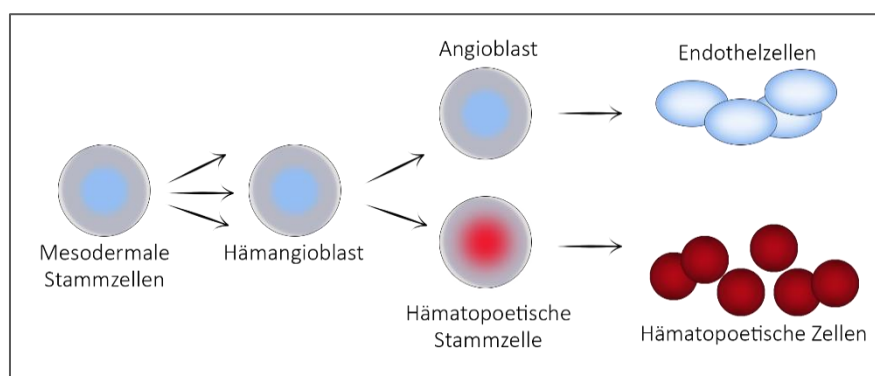


**Abbildung 2 - Schematische Anatomie von Blutgefäßen.**

Blutgefäße sind luminal vom Endothel ausgekleidet, einer einschichtigen, spezialisierten Epithelzellschicht. Zusammen mit dem auf sie folgenden *Stratum subendotheliale*, einer zarten Bindegewebsschicht, bildet das Endothel die innerste Schicht der Blutgefäße, die *Tunica intima*. Sie wird durch die *Membrana elastica interna* von der *Tunica media* separiert, welche aus glatten Muskelzellen und Kollagenfasern besteht. Die *Tunica adventitia* ist eine lockere Schicht Bindegewebe, die das Gefäß ins umgebende Organparenchym einbettet. *Verändert nach [1], aus [2].*

## 1.2.2 Vaskulogenese

Vaskulogenese bezeichnet die *de novo* Formation von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells, EPC*), die zu Endothelzellen differenzieren und ein primitives Gefäßsystem ausbilden [106, 109]. Essentiell für die Vaskulogenese während der embryonalen Entwicklung sind die Differenzierung mesodermaler Stammzellen zu Hämangioblasten und ihre Organisation zu ersten vaskulären Strukturen, die Bildung von Lumen in diesen sowie die weitere Differenzierung zu einem kontinuierlichen, differenzierten vaskulären System [106, 115, 116]. Die aus dem Mesoderm differenzierten Hämangioblasten aggregieren im Verlauf der Embryogenese zu sogenannten Blutinseln, die sich zentral zu hämatopoetischen Zellen und peripher zu Angioblasten, den embryonalen EPC, differenzieren (Abbildung 3) [106, 115, 116]. Wachstumsfaktoren veranlassen die Angioblasten zur Proliferation, Migration und Fusion miteinander, was zur Bildung erster tubulärer Strukturen führt. Die Differenzierung der Angioblasten zu reifen Endothelzellen führt zur weiteren Spezialisierung dieser primitiven Strukturen. Die Endothelzellen sind verantwortlich für die folgende Bildung eines Lumens sowie einer Basalmembran, wodurch ein erstes, einfaches Gefäßsystem entsteht [106, 117].



**Abbildung 3 - Differenzierungsschritte während der embryonalen Vaskulogenese.**

Während der Embryonalentwicklung differenzieren mesodermale Stammzellen zu Hämangioblasten. Diese wiederum differenzieren in sogenannten Blutinseln zu Angioblasten (embryonale ECFCs), die Vorläufer der Endothelzellen darstellen, sowie zu hämatopoetischen Stammzellen, welche in der Lage sind, alle blutbildenden Zellen zu generieren.

Verändert nach [1], aus [2].

Hauptverantwortlich für diese Reifung ist der Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ein dimeres Glykoprotein und konzentrationsabhängig wirkendes, endothelzellspezifisches Mitogen. In der humanen VEGF-Familie existieren die sechs Isoformen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und PlGF (*placental growth factor*), wobei

VEGF-A am stärksten zur Vaskulo- sowie Angiogenese beiträgt [118]. VEGF spielt dabei nicht nur bei der Initiation der Vaskulo- und Angiogenese eine essentielle Rolle, sondern auch - zusammen mit weiteren vaskulären Wachstumsfaktoren wie Angiopoetin 1 (Ang-1) und FGF (*fibroblast growth factor*) - bei der weiteren Strukturierung, Reifung und Stabilisierung sowie dem Überleben der Blutgefäße [119–122]. Diese Aufgaben sind dabei nicht nur während der Embryogenese von Bedeutung, sondern auch im adulten Organismus im Rahmen der Angiogenese [106, 117].

### 1.2.3 Angiogenese

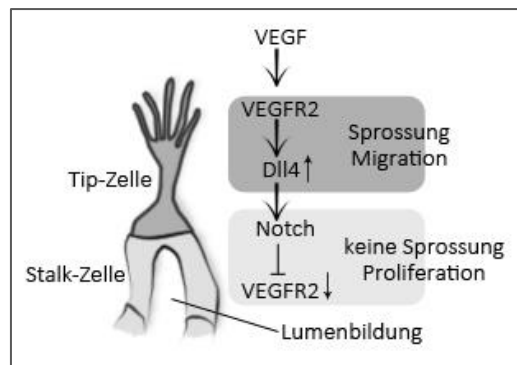
Angiogenese bezeichnet das Entstehen von Blutgefäßen aus dem bereits existenten vaskulären System. Sie erfolgt hauptsächlich durch Aussprossen von Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen oder aber intussuszeptiv, nicht-sprossend, durch Annäherung zweier gegenüberliegender Kapillarwände und Teilung des Gefäßes [108, 116]. Eine streng kontrollierte Balance aus pro- und anti-angiogenen Wachstumsfaktoren regelt den Auf-, Um- sowie Abbau von Gefäßen im adulten Organismus [108, 123]. Beteiligt an dieser Kontrolle sind diverse Wachstums-, Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden, wie VEGF, FGF (*fibroblast growth factor*), TGF (*transforming growth factor*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*), IL-8 (Interleukin-8), Angiopoetine, HIF (*hypoxia-inducible factor 1*) sowie der Notch-, Tie- und Wnt-Signalweg [124–126]. Die Rolle von VEGF ist dabei am besten beschrieben [108]. Hauptakteure der Angiogenese sind die Endothelzellen, wobei auch murale Zellen, wie Perizyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, essentiell beteiligt sind [126, 127].

Im normoxischen, gesunden Gewebe werden die existenten Gefäße durch autokrine Mechanismen stabilisiert, an denen niedrige Konzentrationen an VEGF-A, FGF, Ang-1 sowie der Tie- und der Notch-Signalweg beteiligt sind [122, 126, 128–131]. Die Endothelzellen der Blutgefäße werden von Perizyten umgeben, welche die genannten Wachstumsfaktoren sezernieren, die Proliferation der Endothelzellen inhibieren und ihr Überleben sowie die Stabilität des Gefäßes unterstützen. Perizyten und Endothelzellen synthetisieren eine gemeinsame Basalmembran, auf der sie aufsitzen [126]. Pro-angiogene Stimuli, wie VEGF, FGF oder Ang-2, initiieren die Angiogenese. Hauptmediator ist VEGF, dessen Expression über Hypoxie, andere Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine sowie Stickstoffmonoxid (NO) reguliert wird [108, 132, 133]. NO wird von endothelialen Stickstoffmonoxid-Syn-

thasen (eNOS, *endothelial Nitric Oxide Synthases*) aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff synthetisiert und wirkt, neben seiner vasodilatatorischen Funktion, über verschiedene Signalwege fördernd auf die Expression von VEGF [132]. Ein Hauptregulator der Hypoxiebedingten Angiogenese ist der Transkriptionsfaktor HIF-1, der permanent in allen Zellen synthetisiert wird. Während er unter Normoxie sauerstoffabhängig und Ubiquitinvermittelt direkt wieder über das Proteasom degradiert wird, stabilisiert Hypoxie ihn aufgrund des Sauerstoffmangels [134, 135]. Infolgedessen akkumuliert HIF, gelangt in den Zellkern und stimuliert die Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF und TGF [134]. Hypoxische Gewebe setzen diese pro-angiogenen Moleküle in ihr umgebendes Milieu frei [127, 133]. Bei Erreichen von Kapillaren veranlassen sie die Perizyten und Endothelzellen, sich voneinander zu lösen, interzelluläre Kontakte abzubauen und die Basalmembran mithilfe von Matrix-Metalloproteasen (MMP) zu degradieren. Die Permeabilität der Gefäße wird dadurch erhöht und die Degradation der umgebenden EZM eingeleitet [126, 130]. In Folge der Degradation werden weitere pro- sowie anti-angiogene Faktoren, die in der EZM immobilisiert sind, freigesetzt. Diese koordinieren im Zusammenspiel das Sprossen der Gefäße [136, 137]. Die Auflockerung des Gewebes sowie die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen ermöglicht den Endothelzellen, zu proliferieren und in Richtung der pro-angiogenen Stimuli zu migrieren [127]. Hauptsächlich verantwortlich hierfür ist die VEGF-Isoform VEGF-A, die konzentrationsabhängig die Formation jedes neuen Gefäßes (Tubulogenese oder *Tube Formation*) reguliert.

Endothelzellen nehmen VEGF über ihre VEGF-Rezeptoren wahr. Die Familie der VEGF-Rezeptortyrosinkinase (RTK) besteht aus den drei Rezeptoren VEGFR1 (auch Flt-1, *Fms-like tyrosine kinase-1*) VEGFR2 (auch KDR, *kinase insert domain receptor*) und VEGFR3. Während das VEGF-A/VEGFR2-Signaling Hauptvermittler der angiogenen Signalkaskaden ist, trägt VEGF-C/VEGFR1 zur angiogenen Feinjustierung bei [128, 138]. VEGFR3 spielt in der Lymphangiogenese eine Rolle [138]. Die Tubulogenese wird in der neueren Literatur als eine Art „*move while deciding*“ Mechanismus beschrieben. Dabei stellt der sogenannte *Tip*-Zell-Phänotyp die basale Aktivität der Endothelzellen dar [130]. Jedes sich neu bildende Gefäß wird von einer *Tip*-Zelle angeführt, welche die erste Antwort auf pro-angiogene Reize vermittelt [130, 139]. Die Filopodien der Endothelzellen exponieren eine große Menge an VEGFR2 und ermöglichen dadurch die konzentrationsabhängige Ausrichtung

und Migration in Richtung des pro-angiogenen Reizes [127, 140]. Sie sezernieren als Antwort auf diesen verstärkt proteolytische Enzyme wie MMP, welche die weitere Permeabilität der Gefäße begünstigen und für den Umbau der EZM verantwortlich sind. Blutplasma-proteine gelangen in das umgebende Milieu und bilden eine Art provisorische EZM, die als Wachstumsgrundlage für die neu entstehenden Gefäße dient [141]. Während dieser primären Mechanismen erfolgt eine weitere Anpassung benachbarter Endothelzellen zu sogenannten *Stalk*-Zellen, die aktiv selektioniert werden müssen [130, 142, 143]. Diese Selektionierung erfolgt mittels lateraler Inhibition zwischen den Zellen über einen VEGF-Dll4 (*Delta-like-ligand 4*)/Notch *Feedback-Loop* (Abbildung 4): Die Aktivierung von VEGFR2 bewirkt eine Hochregulation der Dll4-Expression [143, 144]. Dll4 bindet an den Notch1-Rezeptor, welcher auf allen Endothelzellen lokalisiert ist [145]. Sezerniert die *Tip*-Zelle, angeregt durch die erhöhte VEGF-Konzentration, den Liganden Dll4, aktiviert dieser die Notch1-Rezeptoren auf den benachbarten Endothelzellen. Daraufhin wird die intrazelluläre Notch1-Domäne abgespalten und transloziert in den Zellkern, wo sie nachgeschaltet eine Reduktion der VEGFR2-Synthese bewirkt [127]. Es wird angenommen, dass diese VEGFR2-Suppression, die niedrigere VEGF-Konzentration in der Umgebung sowie die erhöhte Notch1-Aktivität die *Stalk*-Zellen selektionieren [143]. In diesen führt die starke Aktivität von Notch1 neben der reduzierten Produktion von VEGFR2 zudem zu einer reduzierten Ausbildung von Filopodien, was beides zu einer Verminderung der Migration führt. *Stalk*-Zellen sind dabei zwar nicht so immobil wie immer angenommen wurde, dennoch überwiegt in ihnen das proliferative gegenüber dem migratorischen Potential [127, 130, 146]. Über die Proliferation und Migration der Zellen wird das sich bildende Gefäß verlängert. Die *Stalk*-Zellen tragen dabei zu dessen Stabilisierung bei, indem sie vermehrt Zell-Zell-Kontakte mit ihren benachbarten Zellen ausbilden und Komponenten der Basalmembran synthetisieren [118, 130, 146]. Zudem besitzen *Stalk*-Zellen die Fähigkeit zur Ausbildung eines Lumens, welches sich zwischen ihnen formt und das Innere des neuen Gefäßes definiert. Bei Aufeinandertreffen zweier *Tip*-Zellen fusionieren diese und infolgedessen auch die Lumina [118, 130].



**Abbildung 4 - Vereinfachte Darstellung des Dll4-Notch/VEGF-VEGFR-Feedback-Loop zur Determination des *Tip*- bzw. *Stalk*-Zell-Phänotyps.** VEGF wird über seinen Rezeptor VEGFR von den Endothelzellen wahrgenommen und führt intrazellulär zu einer Erhöhung der Delta-like-4 (Dll4)-Expression. Endothelzellen, die einer großen Menge an VEGF ausgesetzt sind und verstärkt VEGFR sowie Dll4 exprimieren, nehmen den Phänotyp einer *Tip*-Zelle an. Dll4 wird von der *Tip*-Zelle exprimiert und aktiviert auf benachbarten Endothelzellen den Notch1-Rezeptor, dessen intrazelluläre Domäne abgespalten wird und im Zellkern die VEGFR2-Expression supprimiert. Die so supprimierten Zellen wechseln zum *Stalk*-Zell-Phänotyp, bei dem das proliferative Potential überwiegt und der zur Ausbildung eines Lumens befähigt. *Verändert nach [1], aus [2].*

Durch die entstandene Versorgung des hypoxischen Gewebes wird der pro-angiogene Reiz reduziert. Die weitere Stabilisierung und Reifung der neuen Gefäße umfasst die Rekrutierung von muralen Zellen, die Auflagerung einer perivaskulären EZM unterhalb der gebildeten Basalmembran, die verstärkte Ausbildung interzellulärer Kontakte sowie das Eintreten der Endothelzellen in eine Art Ruhezustand [130, 147]. Perizyten werden direkt in die Gefäßwand integriert und bilden enge Zell-Zell-Kontakte mit den Endothelzellen aus, welche das Gefäß stabilisieren. Sie tragen zudem essentiell zur Bildung der Basalmembran bei [148, 149]. Zusätzlich stabilisieren sie das Gefäß durch Sekretion von niedrigen Konzentrationen an VEGF-A, der das Überleben der Endothelzellen garantiert, sowie Ang-1, der fördernd auf die zelluläre Adhäsion durch Festigung von interzellulären Kontakten wirkt [130].

Der genaue Ablauf der beschriebenen Prozesse ist dabei weit komplexer, als es in diesem Rahmen möglich ist darzustellen. Die Feinjustierung wird zusätzlich von weiteren Signalwegen reguliert und kontrolliert, wie unter anderem durch Angiopoetin/Tie2, Wnt, TGF $\beta$ /Alk1, FGF, und Integrin-Signaling [130, 139]. Zudem zeigte sich das Gleichgewicht verschiedener VEGFR, insbesondere VEGFR1 und VEGFR2, als relevant. Während *Tip*-Zellen eine erhöhte VEGFR2-Expression aufweisen, zeigen sie niedrige VEGFR1-Level; in *Stalk*-Zellen ist dies umgekehrt der Fall [130, 146]. Weitere Arbeitsgruppen konnten zusätzlich einen Einfluss von asymmetrischer mitotischer Teilung der *Tip*-Zelle auf die Tubulogenese demonstrieren [150, 151].

### 1.3 Konzepte der Vaskularisierung

Der Einsatz von mittels *Tissue Engineering* generierter Gewebe-Äquivalente scheitert sehr häufig, wie bereits beschrieben, an einer nicht ausreichend schnellen Vaskularisierung durch Einwachsen patienteneigener Gefäße nach Transplantation. Da die Diffusionsgrenze für Nährstoffe und Sauerstoff bei 100-200  $\mu\text{m}$  liegt, führt eine unzureichende vaskuläre Anbindung zu einer mangelnden Versorgung und bedingt dadurch zu Nekrose und Abstoßung des Transplantats [101–103, 152, 153]. Die fehlende Vaskularisierung ist derzeit eines der größten Hindernisse bei der Etablierung und dem klinischen Einsatz komplexer künstlicher Gewebe.

In der Literatur existieren diverse Strategien, um dieser Problematik zu begegnen. Ein Ansatz ist, das Einwachsen von patienteneigenen Gefäßen in das Transplantat über pro-angiogene Wachstumsfaktoren und Zytokine zu fördern, wie VEGF, bFGF oder Ang-1, die in den Biomaterialien immobilisiert werden [154–158]. Durch die meist kovalente Modifikation wird eine langsame Abgabe der Faktoren ermöglicht, anders als bei einer Injektion von Wachstumsfaktoren direkt in die Transplantationsstelle [156]. Obwohl diese Ansätze eine fördernde Wirkung auf die Angiogenese zeigten, ist auch hier die Geschwindigkeit, mit der das Gewebe-Äquivalent vaskularisiert wird, limitiert. Utzinger *et al.* konnten zeigen, dass die durchschnittliche Verlängerung sich bildender mikrovaskulärer Strukturen 5  $\mu\text{m}/\text{Stunde}$  beträgt [159]. Auch die Stimulation durch pro-angiogene Faktoren in den Biomaterialien führt damit nicht zu einer ausreichenden Beschleunigung der Vaskularisierung. Naito *et al.* beschrieben zudem das Problem der eingeschränkten Regeneration von Endothelzellen, die nach ca. 70 Zellzyklen nicht mehr teilungsfähig sind. Dadurch beschränkt sich das Einwachsen patienteneigener Gefäße in das Konstrukt auf 1-2 cm [160].

Eine vielversprechende Alternative stellt die Generierung einer Prävasikularisierung direkt *in vitro* dar, also die Etablierung einer funktionellen Mikrogefäßstruktur im Gewebe-Äquivalent bereits im Labor, vermittelt durch Endothelzellen [26, 161]. In diesem Kontext verfolgen verschiedene Arbeitsgruppen vielfältige Ansätze. Einer davon umfasst den Einsatz von *Scaffolds*, die vorgefertigte, hohle Kanäle aufweisen, welche mit Endothelzellen besiedelt werden. Ziel ist, ein definiertes Netzwerk vorzugeben, um eine möglichst physiologische Kapillarstruktur zu generieren. Synthetische sowie Biomaterialien werden dabei mittels Elektrosponning, 3D-Druck, Laserstrahlbohren, speziellen Gusstechniken oder Silikon-

formen nach den Wünschen der Wissenschaftler geformt [162–166]. Obwohl diese Methoden eine hochorganisierte Vaskularisierung ermöglichen, zeigten sich die dafür einsetzbaren Materialien meist als zu starr und unzulänglich für eine weitere Umstrukturierung des Gefäßnetzwerks oder Invasion von Endothelzellen [166]. Aus diesem Grund finden auch flexiblere Materialien wie Hydrogele Einsatz, die von Gelatine oder Glasfasern, welche anschließend entfernt werden, mit Kanälen durchzogen werden können [165, 167, 168]. Limitierend ist hierbei wiederum das Material: derzeit steht keine optimale Substanz zur Verfügung, die ausreichend flexibel ist, aber gleichzeitig Stabilität und strukturelle Integrität garantiert. Zudem reichen die Techniken bislang noch nicht aus, um erfolgreich eine EZM zu imitieren und so Gerüst und Wachstumsgrundlage für ein komplexeres Gewebekonstrukt zu garantieren [169].

Eine weitaus elegantere Lösung ist die Generierung einer *Scaffold*-unabhängigen Prävascularisierung. Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten die autonome Bildung eines Netzwerks gefäßähnlicher Strukturen bei Einsatz von Endothelzellen in Kokultur, beispielsweise mit mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten oder Fibroblasten, auf verschiedenen Biomaterialien [170–174]. Einsatz finden hierbei hauptsächlich HDMEC (*human dermal microvascular endothelial cells*), HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) oder in der neueren Literatur auch endotheliale Progenitorzellen (ECFC) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) [125]. Zudem können primäre mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen aus Lunge, Aorta, Gehirn oder Fettgewebe isoliert werden, weisen je nach Herkunft und Typ jedoch leicht unterschiedliche Charakteristika auf [125, 171, 175]. Chen *et al.* erzielten *in vitro* die Bildung eines Mikrokapillarsystems in Kalziumphosphatzement-Gerüsten durch Ko-Kultivierung von HUVEC und humanen Osteoblasten. Nach 14 Tagen zeigten sich dabei Ansätze einer Prävascularisierung, welche bis zum Tag 42 ausdifferenziert vorlag [172]. Einige andere Konstrukte erzielten sogar eine erfolgreiche Inoskulation *in vivo*. Melero-Martin *et al.* demonstrierten eine Anastomose von *in vitro* prävascularisierten, Matrigel-basierten Konstrukten mit ECFCs und mesenchymalen Stammzellen in Mäusen [176]. Eine andere Arbeitsgruppe generierte eine Prävascularisierung von Fibrin-basierten *Scaffolds* mittels Kokultivierung von HUVEC und Fibroblasten und transplantierte diese Konstrukte in Mäuse. Sie konnten dabei eine erfolgreiche Anastomose an das murine Blutgefäßsystem nachweisen, die deutlich schneller als in

nicht-prävaskularisierten Konstrukten auftrat [177]. Tremblay *et al.* generierten ein prävas-kularisiertes Haut-Äquivalent, unter Verwendung von Keratinozyten, Fibroblasten und HUVEC, das in der Maus einen deutlichen Vorteil bei der vaskulären Anbindung gegenüber eines nicht-prävaskularisierten Äquivalents zeigte. Sie demonstrierten, dass die Neovas-kularisation eines Gewebe-Äquivalents, abhängig von der Dicke, ca. 14 Tage dauert, wohin-gegen die Prävas-kularisierung innerhalb von vier Tagen an das murine Blutgefäßsystem an-gebunden wurde [161]. Durch die Kokultivierung von HDMEC und humanen Osteoblasten auf Seidenfibroin-basierten Matrices erzielten Unger *et al.* erfolgreich eine Prävas-kularisierung, die im Mausmodell nach Implantation an das murine Gefäßsystem angeschlossen wurde [178]. Zusätzlich zeigte die Prävas-kularisierung eine stimulierende Wirkung auf das Einwachsen muriner Gefäße. Im Vergleich dazu führte das gleiche Konstrukt, das nur mit Endothelzellen und nicht zusätzlich mit Osteoblasten besiedelt wurde, weder zu einer Prävas-kularisierung, noch zu einer Stimulation der Vaskularisierung durch murine Gefäße [178].

Die molekularen Mechanismen, die einer Prävas-kularisierung zugrunde liegen, sind kom-plex und bislang noch nicht ausreichend erforscht. Die Kokultivierung von Endothelzellen mit Bindegewebszellen stimuliert zum einen die Organisation der Endothelzellen in gefäß-ähnliche Strukturen, zum anderen bewirkt sie eine weitere Ausreifung und die Stabilisie-rung dieser sowie eine Vergrößerung des Lumens [125, 152, 171, 179, 180]. Veranlasst werden diese Prozesse durch die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, die wiede-rum durch die Kokultivierung und den interzellulären Kontakt stimuliert wird [125, 171]. Endothelzellen zeigen sich trotz ihres ubiquitären Vorkommens im gesamten humanen Or-ganismus sehr heterogen. Ihre Eigenschaften sowie ihre zellulären Prozesse wie beispiels-weise Vitalität, Wachstum, Differenzierung und Migration werden kontrolliert durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren, zu denen das jeweilige umgebende extrazelluläre Milieu, interzelluläre Kontakte und mechanische Belastungen zählen [171, 181–184]. Theo-retisch lässt sich über die Modulation dieser Gegebenheiten *in vitro* die Prävas-kularisierung fördern, je nachdem, welches physiologische Gewebe imitiert werden soll. Die richtige Balance zwischen Endothelzellen, kokultivierten weiteren Zelltypen sowie des optimalen Biomaterials zu finden, ist dabei essentiell für die Generierung definierter, prävas-kularisierter Gewebe-Äquivalente [125, 171, 181, 185, 186].

In der Literatur finden sich verschiedene Ansätze zur Prävaskularisierung von Knochen- und Hartgewebe-Äquivalenten, sowie eine Reihe von generellen Ansätzen ohne den Anspruch, ein bestimmtes Gewebe zu rekonstruieren [172, 173, 178, 187, 188]. Dagegen konnte kein Beispiel eines *in vitro* generierten und prävaskularisierten Schleimhaut-Äquivalents gefunden werden.

In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe um Frau Prof. Brenner Mundschleimhaut-Äquivalente aus oralen Epithelzellen und Fibroblasten generieren, die ein gut differenziertes, mehrschichtiges Epithelium sowie eine durchgehende Verteilung von Fibroblasten durch das Konstrukt aufwies (Diplomarbeit Flesch, 2010; Diplomarbeit Pfeifer, 2009). Eingesetzt wurden dafür kommerziell erhältliche und für den Einsatz am Patienten zugelassene Kollagenmatrices (Geistlich Bio-Gide®), die sich durch einen *Bilayer*-Aufbau auszeichnen: Während die eine Seite porös ist und die Invasion von Zellen gestattet, ist die andere Seite zelloklusiv, was den darauf ausgesiedelten Epithelzellen eine Wachstumsgrundlage bietet. Letztere zeigte sich notwendig für die Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen [189]. Bei zusätzlicher Kultivierung von HDMEC auf der porösen Seite konnte in Ko- wie auch in Trikultur eine Prävaskularisierung der Konstrukte erzielt werden [26]. Jedoch zeigte sich in Trikultur eine gegenseitige, negative Beeinflussung der Zellen, die zu einer verminderten Differenzierung der Epithelzellen und eingeschränkter Bildung eines Epitheliums führte. Aufgrund der räumlichen Trennung durch die *Bilayer*-Struktur ist diese Beeinflussung auf interzelluläre Kommunikation über lösliche Faktoren zurückzuführen. Zudem zeigte sich nur eine unzureichende Invasion der Endothelzellen in das Gewebe-Äquivalent, die lediglich zu einer oberflächlichen Lokalisation gefäßähnlicher Strukturen führte.

Die Prävaskularisierung von Gewebe-Äquivalenten stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um den bestehenden Problematiken des *Tissue Engineerings* zu begegnen. Die Etablierung einer vollständig funktionellen und kontinuierlichen Gefäßstruktur im Gewebe-Äquivalent bereits im Labor ist dabei Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz im klinischen Alltag.

## 1.4 Zielsetzung

Autologe, mittels *Tissue Engineering* generierte Gewebe-Äquivalente gewinnen derzeit in der Regenerativen Medizin eine immer größere Bedeutung. Neben der Vision, eines Tages vollständige Organe zu konstruieren, finden sich bereits heute ganz alltägliche Anwendungsgebiete. Zahlreiche chirurgische Eingriffe, wie Tumorentfernungen, führen zur Entstehung großflächiger Wunden, die versorgt werden müssen. Intelligente Transplantate, konstruiert mit patienteneigenen Zellen auf geeigneten Biomaterialien, bieten hier enorme Vorteile und eröffnen neue Möglichkeiten zur Abdeckung und Unterstützung von Wunden. Aber auch angeborene oder erworbene Defekte und Fehlbildungen, die eine operative Korrektur erfordern, würden durch eine Rekonstruktion mit speziell für den Patienten individualisierten Gewebe-Äquivalenten profitieren. Größter Nachteil von bisherigen, mittels *Tissue Engineering* hergestellten Geweben ist die fehlende Vaskularisierung. Diese bedingt in größeren Konstrukten, aufgrund der Diffusionsgrenze von 100-200  $\mu\text{m}$ , eine Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, was schlussendlich zur Nekrose und Abstoßung des Gewebe-Äquivalents führt. Eine Prävascularisierung, vermittelt durch den Einsatz von Endothelzellen im Konstrukt, stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um dieser Problematik zu begegnen.

In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe prävascularisierte Schleimhaut-Äquivalente in Trikultur mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) sowie oralen Epithelzellen und Fibroblasten generieren, basierend auf kommerziell erhältlichen, klinisch zugelassenen Kollagenmatrices. Diese Gewebe-Äquivalente zeigten jedoch, im Vergleich zur Kokultur ohne HDMEC, eine inhibierte Differenzierung des Epitheliums, bedingt durch eine negative Beeinflussung der Zellen untereinander. Zudem konnte die Prävascularisierung nur oberflächlich in den Konstrukten generiert werden. Für den klinischen Einsatz sind ein funktionelles, terminal differenziertes Epithelium sowie die kontinuierliche Bildung einer Prävascularisierung durch das gesamte Gewebe-Äquivalent essentiell.

Das Ziel dieser Dissertation war die Etablierung eines funktionellen, kontinuierlich prävascularisierten und epithelial vollständig differenzierten Schleimhaut-Äquivalents in Trikultur sowie dessen grundlagenwissenschaftliche Charakterisierung. Ein Hauptfokus lag dabei auf der interzellulären Kommunikation, um aufzuklären, welche Signalmoleküle - wie Wachstumsfaktoren und Zytokine - an der zellulären Interaktion beteiligt sind und die Differenzie-

nung von Endothelzellen und Epithelium steuern. Biologisch relevante Faktoren wurden identifiziert und auf ihre Sekretion im Konstrukt hin analysiert. Anschließend wurde ihre Wirkung auf verschiedene zelluläre Prozesse im Kontext der Angiogenese, wie beispielsweise Vitalität, Proliferation, Differenzierung, Migration und Tubulogenese, untersucht. Diese Kenntnisse dienten der Verbesserung der Kultivierung, Differenzierung und Prävascularisierung der Schleimhaut-Äquivalente *in vitro*. In einem weiteren Schritt wurde das Verhalten und die Anastomose der Konstrukte *in vivo* im CAM-Assay sowie im Mausmodell analysiert.

Ein wesentlicher erster Schritt war die Optimierung der Isolation primärer Epithelzellen und Fibroblasten aus humanen Mundschleimhautproben sowie eine anschließende erfolgreiche Kultivierung. Daneben stand die Suche nach geeigneten Donorgeweben, die bei allen Patienten zur Verfügung stehen, zur Isolation autologer mikrovaskulärer Endothelzellen im Mittelpunkt.

Übergeordnetes Ziel der Dissertation war, optimale Voraussetzungen für eine schnelle und effiziente Anbindung eines prävascularisierten Schleimhaut-Äquivalents an das Blutgefäßsystem *in vivo* zu schaffen. Dies könnte das Einheilen künstlicher Transplantate deutlich fördern und die Erfolgchancen erheblich verbessern, sowie den Einsatz im klinischen Alltag realisieren. Zudem sollte die Analyse der interzellulären Kommunikation dazu beitragen, wichtige Grundlagen zum Verständnis physiologischer Interaktionen von Signalmolekülen und Zellen sowie Zellen untereinander aufzudecken, unter anderem in mittels *Tissue Engineering* generierten Gewebe-Äquivalenten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Adenin, #A2786	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin <i>from bovine serum</i> , #A2153	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Antibody diluent, ready-to-use</i> , #S0809	Agilent, Santa Clara, USA
Aqua dest.	Braun, Melsungen
bFGF, #F0291	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BODE Sterillium, #980468	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Calcein-AM (1 mg/ml)	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Choleratoxin, #C8052	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CnT-Prime	CELLnTEC Advanced Cell Systems, Bern, Schweiz
Ketamin (Ketanest)	Pfizer Pharma, Berlin
Kollagen I, #C5483	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagen IV, #sc-29010	Santa Cruz, Dallas, USA
Kollagenase II, #C2-22	Merck, Darmstadt
Dimethyl Sulfoxid ≥99.9%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase II, #17105-041	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Dispase II, #04 942 078 001	Roche, Basel, Schweiz
DMEM, #D6429-500ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM/HAM's F12 (1:1) (1X), #11320-074	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 10x	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 1x	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EGF, #E9644	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EGM-2 BulletKit, #CC-3162	Lonza, Walkersville, USA
<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>	PromoCell, Heidelberg
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin G-Lösung 0,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure Rotipuran p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 96 %	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS), #1027106	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Fibronektin, #33010018	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Filtropur Filtriereinheit	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Gelatin solution</i> , #G1393	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine, reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol, #G2025	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hemacolor <i>Rapid Staining</i> Lösungen 2 und 3	Merck, Darmstadt
HEPES, 1M, #H0887	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hico-Mic Mikroskopier-Einschlussmittel	Hico, Köln
Histopaque-1077 Ficoll	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Hydrocortison, #H0888	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Insulin solution human, #I9278	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Interleukin-8, #208-IL	R&D Systems, Minneapolis, USA
Isopropylalkohol p.a.	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Matrigel, Growth Factor Reduced, #356230	BD Biosciences, San Jose, USA
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nagellack	p2 cosmetics
Natriumchlorid p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium Heparin, #H3149	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natronlauge 1M	Merck, Darmstadt
Paraffin (Paraplast X-TRA)	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S) (Anti-Anti)	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Peroxidase <i>blocking solution</i>	Agilent, Santa Clara, USA
Puffer nach Weise Tabletten	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 95-97 %	Merck, Darmstadt
Sterillium (Desderman N)	Schülke, Norderstedt
<i>Target Retrieval Solution</i> pH 9, 10x, #S2375	Agilent, Santa Clara, USA
Terg-a-Zyme	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Terralin liquid	Schülke, Norderstedt
TRIS, #4855	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100, #T9284	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin, 2,5 %, #15090046	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Trypsin-EDTA, 0,25 %, #T4049	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
VEGF, #V7259	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Versene EDTA (0,02 %), #BE17-711E	Lonza, Walkersville, USA
<i>Wash Buffer</i> (20x), Dako Omnis, #GC807	Agilent, Santa Clara, USA
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth, Karlsruhe
Xylazin (Rompun)	Bayer, Leverkusen
Xylol	AppliChem, Darmstadt

## 2.1.2 Lösungen und Puffer

### 2.1.2.1 Lösungen

Gelatine-Lösung:	0,2 % Gelatine in DPBS
Kollagen I-Lösung:	50 µg/ml Kollagen I in DPBS
MTT-Lösung:	0,5 % MTT in DPBS

4 % Paraformaldehyd: 4 g PFA in 80 ml PBS unter dem Abzug erwärmen, unter Zugabe von 2 M NaOH lösen und abkühlen lassen. Mit 6 M HCl auf pH 7,2 einstellen. Mit PBS auf 100 ml auffüllen.

#### 2.1.2.2 Puffer

Kollagenase II Puffer: 3,9 g NaCl  
0,5 g KCl  
2,4g HEPES (1M)  
0,7 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O  
pH 7,2 einstellen, ad 1 l mit VE-Wasser,

TRIS Puffer 20 mM: 1,2114 g TRIS  
+ 450 ml Aqua dest.  
pH Wert 7,0 einstellen, ad 500 ml mit Aqua dest.

Puffer nach Weise: Zum Ansetzen des Puffers wurde eine Puffer-Tablette in 1 l Aqua dest. über Nacht gelöst.

#### 2.1.2.3 Enzyme

Kollagenase II-Lösung: 1 g Kollagenase II in Kollagenase II Puffer

Dispase II-Lösung: Stocklösung von 24 U/ml: in PBS  
Arbeitslösung von 2,4 U/ml: Stocklösung 1:10 in PBS

#### 2.1.2.4 Medienzusätze

Adenin: Stocklösung von 22 µg/ml: Adenin in 50 ml 0,2 M HCl bei 50°C lösen.

bFGF: Stocklösung von 1,25 µg/ml: bFGF in sterilem TRIS Puffer auf 25 µg/ml verdünnen, anschließend mit DPBS auf 1,25 µg/ml weiter verdünnen.

Choleratoxin: Stocklösung von 7,4 µg/ml: Choleratoxin auf eine Konzentration von 7,4 mg/ml in Aqua dest. ansetzen, dann mit DMEM/HAM's F12 (1:1) verdünnen.

EGF: Stocklösung von 20 µg/ml: EGF in DMEM + 10 % FCS lösen.

Hydrocortison: Stocklösung von 36 µg/ml: 1 mg Hydrocortison in 200 µl EtOH absolut lösen, anschließend 27,58 ml Aqua dest. zugeben.

Natriumheparin: Stocklösung von 50 mg/ml in sterilem Aqua dest. lösen.

#### 2.1.2.5 Verdünnungen der Zytokine und Wachstumsfaktoren

bFGF: Stocklösung von 25 µg/ml in PBS + 0,1 % BSA, anschließend mit Hungermedium entsprechend Versuchsansatz verdünnt.

IL-8: Stocklösung von 100 µg/ml in PBS + 0,1 % BSA, anschließend mit Hungermedium entsprechend Versuchsansatz verdünnt.

VEGF: Stocklösung von 20 µg/ml in H<sub>2</sub>O, anschließend mit Hungermedium entsprechend Versuchsansatz verdünnt.

### 2.1.3 Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche

DuoSet® ELISA Ancillary Reagent Kit 2, #DY008, R&D Systems

DuoSet® ELISA Human CXCL8/IL-8, #DY208, R&D Systems

DuoSet® ELISA Human eNOS, #DY950-05, R&D Systems

DuoSet® ELISA Human FGF basic, #DY233, R&D Systems

DuoSet® ELISA Human VEGF, #DY293B, R&D Systems

ELISA Kit Human VEGF, #KHG0111, Invitrogen

Human Cytokine ELISA Plate Array I (Chemiluminescence); #EA-4001, Signosis

Pierce™ BCA Protein Assay Kit, #23225, Thermo Scientific

Quantikine® ELISA Human Angiopoietin-2, #DANG20, R&D Systems

Universal LSAB2 Kit/HRP Rabbit/Mouse; #K0675, Dako, Agilent

### 2.1.4 Medien

ECFC-Medium: 500 ml EBM-2 Medium  
+ *SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors*  
+ 20 % FCS

Epithelzell-  
Kultivierungsmedium: 500 ml CnT-Prime  
+ 0,1 % P/S

FAD-Medium I: 60 % DMEM  
+ 30 % DMEM/HAM's 12  
+ 10 % FCS  
+ 1 % P/S  
+ 22 µg/ml Adenin  
+ 7,4 ng/ml Cholera toxin  
+ 9 ng/ml EGF  
+ 36 ng/ml Hydrocortison  
+ 4,6 µg/ml Insulin

FAD-Medium II: wie FAD-Medium I aber insgesamt 5,4 µg/ml Insulin

FAD-Hungermedium: 60 % DMEM  
+ 30 % DMEM/HAM's 12  
+ 1 % P/S

Fibroblasten-  
Medium: 500 ml DMEM  
+ 10 % FCS  
+ 1 % P/S

HDMEC-Medium: 500 ml *Endothelial Cell Growth Media MV*  
+ 15 % FCS  
+ 1 % P/S  
+ 2,5 ng/ml bFGF  
+ 10 µg/ml Natriumheparin  
+ 28 mM HEPES

HDMEC-  
Hungermedium: 500 ml *Endothelial Cell Growth Media MV*  
+ 1 % P/S  
+ 28 mM HEPES

### 2.1.5 Antikörper

Die für die Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 mit Angabe der verwendeten Verdünnung sowie Spezies aufgelistet.

Tabelle 1 - Auflistung der eingesetzten primären Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	eingesetzte Verdünnung
Anti-Human alpha smooth muscle Actin, #ab5694, abcam	<i>Rabbit polyclonal</i>	1:50 (IHC)
Anti-Human CD31 FLEX Ready-to-use, #IR610, Clone JC70A	<i>Mouse monoclonal</i>	Ready-to-use für Immunfluoreszenzfärbung
Anti-Human CD31, #M0823, Clone JC70A, Dako	<i>Mouse monoclonal</i>	1:100 (IHC)
Anti-Human CD34 Class II, #M7165, Clone QBEnd-10, Dako	<i>Mouse monoclonal</i>	1:1000 (IHC)
Anti-Human CD45, #M0701, Clones 2B11 + PD7/26, Dako	<i>Mouse monoclonal</i>	1:1000 (IHC)
Anti-Human Collagen IV, #ab6311, Clone COL-94, abcam	<i>Mouse monoclonal</i>	1:250 (IHC)
Anti-Human Cytokeratin 8/18, #ab17139, abcam	<i>Mouse monoclonal</i>	1:100 (IHC)
Anti-Human Cytokeratin 13, #ab58744, abcam	<i>Rabbit polyclonal</i>	1:500 (IHC)
Anti-Human Cytokeratin 19, #M0888, Clone RCK108, Dako	<i>Mouse monoclonal</i>	1:100 (IHC)
Anti-Human eNOS, #ab76198, Sigma-Aldrich	<i>Mouse monoclonal</i>	1:500 (IHC)
Anti-Human FGFR4 (5B5), #ab44971, abcam	<i>Mouse monoclonal</i>	1:50 (IHC)
Anti-Human Involucrin (SY5), #MA5-11803, Thermo-Fisher	<i>Mouse monoclonal</i>	1:100 (IHC)
Anti-Human Laminin, #L8271, clone LAM-89, Sigma-Aldrich	<i>Mouse monoclonal</i>	1:2500 (IHC)
Anti-Human Occludin, #ab168986, abcam	<i>Rabbit polyclonal</i>	1:150 (IHC)
Anti-Human Tenascin, #T2551, Clone BC-24, Sigma-Aldrich	<i>Mouse monoclonal</i>	1:5000 (IHC)
Anti-Human Vimentin, #550513, Clone RV202, BD	<i>Mouse monoclonal</i>	1:1000 (IHC)
Anti-Human vWF, #M 0616, Clone F8/86, Dako	<i>Mouse monoclonal</i>	1:1000 (IHC)

Tabelle 2 - Auflistung der eingesetzten sekundären Antikörper

Sekundäre Antikörper	aus Spezies	eingesetzte Verdünnung
Anti-Mouse Alexa Fluor® 488, #A11001, Thermo-Fisher	Goat	1:200
Anti-Rabbit Alexa Fluor® 594, #A11012, Thermo-Fisher	Goat	1:200

### 2.1.6 Microbeads

CD31 MicroBead Kit, #130-091-935

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Dynabeads® CD31 *Endothelial Cell*, #11155D

Thermo-Fisher, Waltham, USA

### 2.1.7 Biomaterialien

Geistlich Bio-Gide®

Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

µ-Slide *Angiogenesis*

bidi, Madison, USA

BD Microlance™ 3 30G 0,3x13mm

BD Biosciences, Bedford, USA

Befruchtete Eier

LSL Rhein-Main Hühnervermehrungsbetrieb

*Biopsy Punch* 6 mm

Stiefel Laboratorium, Offenbach

C-Chip Einweg-Zählkammer

NanoEnTek, Seoul, Südkorea

Chromatographie Papier

Whatman, UK

Corning® CellBIND® *cell culture 6-Well-Plate* #CLS3335

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Deckgläschen Menzel-Gläser,

VWR, Radnor, USA

*EASYstrainer* Zellsieb, 50 ml, 100 µm Poren

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Einmalhandschuhe Nitril Sempercare

Semperit, Wien, Österreich

Einmalhandschuhe Nitril Supreno

Microflex, Chemnitz

Einmalskalpelle (No. 23)

FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan

Einmalspritze BD Discardit II (5 ml, 10 ml)

BD Biosciences, Bedford, USA

Faltenfilter

Schleicher & Schuell, Keene, USA

Glas Pasteur-Pipetten (150 mm, 230 mm)

VWR, Radnor, USA

Klebeband Leukosilk

Söhngen, Taunusstein

Kryoröhrchen *Cryogenic Tubes* Nunc™, 375418

Thermo-Fisher, Waltham, USA

LUNA™ *Cell Counting Slides*

logos Biosystems, Südkorea

Membranen für Boyden-Kammer, 8 µm Poren

Neuroprobe, Gaithersburg, USA

Nadeln BD Microlance 3 *Needles*

BD Biosciences, Bedford, USA

Nalgene <i>Tissue Culture Filter Units</i> 0,2 µM (500 ml, 1000 ml)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus Parafilm „M“ <i>Laboratory Film</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Paraform Kassettenrahmen für IHC, #7026	Sakura Finetek, Torrance, USA
Paraform Schwammeinsatz für IHC, #7031	Sakura Finetek, Torrance, USA
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 101-1000 µl)	StarLab, Hamburg
Polypropylen (PP)-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>Polystyrene Cell Culture Microplates</i> , clear (6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well-Plates)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße <i>Safe-Lock</i> (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
<i>Safety-Multifly</i> 21G 200 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
S-Monovette EDTA KE/9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SteriFlip, 50 ml <i>Vacuum Filtration System</i> , 0,22 µm Millipore Express Plus Membrane	Merck Millipore, Billerica, USA
TC-Flaschen T75, Cell+ (#83.3911.302)	Sarstedt, Nümbrecht
Vakuumfiltrationseinheiten Filtropur 0,22 µm Poren (250 ml, 500 ml, 1000 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Inserts, PET, 0,4 µm Poren (für 6-, 12-, 24-Well-Plates)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> #690175, 75 cm <sup>2</sup> #658175, 175 cm <sup>2</sup> #660175)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (100 mm x 20 mm, #664160)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### 2.1.9 Gebrauchsmaterialien

Boyden-Kammer 48-Well Micro Chemotaxis Chamber	Neuroprobe, Gaithersburg, USA
<i>Cover Slides</i> für Immunhistochemie ( <i>Disposable Immunostaining Chamber</i> )	Thermo Scientific, Waltham, USA
Filtertemplate für Boyden-Kammer	Neuroprobe, Gaithersburg, USA
Mehrkanalpipetten Eppendorf <i>Research Plus</i> (10-100 µl, 30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Mikrochirurgisches Besteck	Aesculap, Braun, Tuttlingen
Nalgene <i>Cryo Freezing Container</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden
Pipetten Eppendorf <i>Research</i> (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe S1	Thermo Scientific, Waltham, USA
Racksysteme für Immunhistochemie	Thermo Scientific, Waltham, USA
Scheren	Labotec, Wiesbaden

## 2.1.10 Geräte

Absaughilfe Vacuboy	Integra Biosciences, Fernwald
AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Computer	Dell, Round Rock, USA
Cytospin Zentrifuge 1200	Hettich Universal, Tuttlingen
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Kronberg im Taunus
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Digitalmikroskop VHX-1000	Keyence, Osaka, Japan
Eismaschine	Ziegra, Hannover
Flächenbrüter 400 digital	Brutmaschinen-Janeschitz, Hammelburg
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (BIOREVO)	Keyence, Osaka, Japan
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80 °C	Nalge Nunc Int, Penfield, USA
GloMax®-Multi detection system	Promega, Madison, USA
Heißluftsterilisator Heraeus Oven	Thermo Scientific, Waltham, USA
HistoBath	Jung
Kamera AxioCam ICM1	Zeiss, Jena
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Labormikroskop DMRB	Leica, Wetzlar
Labormikroskop Invers DMIL LED	Leica, Wetzlar
Labormikroskop-Kamera DFC450C, DCF290	Leica, Wetzlar
LUNA™ Automated Cell Counter	logos Biosystems, Südkorea
M205 FA Fluoreszenz Stereo-Mikroskop	Leica, Wetzlar
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
pH-Meter 211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Schlittenmikrotom SM200R	Leica, Wetzlar
Schüttler MTS 4	IKA-Werke, Staufen
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank Steri Flow	Heraeus, Hanau
TCS SP2 Konfokalmikroskop	Leica, Wetzlar
TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica, Wetzlar
Tissue Tek Thermal-Dispensing-KryoKonsole	Miles Scientific, Naperville, USA
Tissue Tek VIP Einbettautomat	Miles Scientific, Naperville, USA
Vakuumpumpe Mini-Vac Power	PeqLab, Erlangen
Vortex VF2	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad Aqualine AL18	Lauda, Lauda-Köngishofen
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

### 2.1.11 Computerprogramme

AxioVision	Zeiss, Jena
BZ-II Viewer & Analyzer	Keyence, Osaka, Japan
LAS X	Leica, Wetzlar
Leica Confocal Software	Leica, Wetzlar
Microsoft Office 2010 & 2013	Microsoft, Redmond, USA
Photoshop CS5	Adobe Systems, San José, USA

### 2.1.12 Zellen und Gewebeproben

Für die Isolation von Epithelzellen und Fibroblasten wurden Gewebeproben der Mundschleimhaut freiwilliger Patienten der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie verwendet. Entnommen wurden diese im Rahmen einer unabhängig stattfindenden Operation in (Ethikantrag Landesärztekammer Rheinland-Pfalz: 837.439.05). Peripheres Blut für die Isolation von ECFCs wurde freiwilligen Patienten im Rahmen einer für sie anfallenden Punktion mit abgenommen oder aber von freiwilligen Spendern zur Verfügung gestellt (Ethikantrag Landesärztekammer Rheinland-Pfalz: 837.008.17). Jeder Patient unterschrieb eine Einverständniserklärung. Proben von Hautgewebe der Brust, Vulva oder Präputium zur Isolation von HDMEC fielen als Überschussmaterial bei chirurgischen Eingriffen an. Die Gewebeproben wurden nach Entnahme direkt in ausreichend sterilem Transportmedium (DMEM Vollmedium) in 50 ml Falcons überführt und bei 4 °C bis zur Präparation gelagert (maximal 24 h). Peripheres Blut wurde in Lithium-Heparin- oder EDTA-Röhrchen steril abgenommen und anschließend umgehend für die Zellisolation verwendet.

### 2.1.13 Tiere

Männliche, 6 Wochen alte *CD-1 Nude* Mäuse wurden von der Firma *Charles River Laboratories*, Sulzfeld Deutschland, über das *Translational Animal Research Center (TARC)* der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erworben. Für die Versorgung der Tiere war ebenfalls das TARC zuständig.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Gebrauchsmaterialien wurden zuvor durch Hitze, UV-Strahlung oder Alkohol sterilisiert. Verbrauchsmaterialien wurden entweder ebenso sterilisiert oder steril erworben. Benötigte Medien und Reagenzien wurden vor Benutzung im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt, mit Reinigungsalkohol (Terralin liquid oder 70 % Ethanol) desinfiziert und unter die sterile Werkbank gestellt.

### 2.2.2 Etablierung der Isolation primärer Zellen

#### 2.2.2.1 Isolation primärer mikrovaskulärer Endothelzellen

Zur Isolation mikrovaskulärer Endothelzellen aus Präputium wurde auf die etablierte Methode von Prof. Ron Unger aufgebaut [190], welche zusätzlich laborintern modifiziert wurde. Vorhautproben wurden durch zwei aufeinander folgende Inkubationen von 15-20 Sekunden in 70 % Ethanol desinfiziert und in PBS überführt. Das Bindegewebe mit sichtbaren Gefäßen wurde mit mikrochirurgischem Besteck und Einmalskalpell entfernt. Anschließend wurde das Präputium in ca. 6 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und für 16 h in 2,4 U/ml Dispase II bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Epidermis abpräpariert und verworfen. Es folgte ein zweiter enzymatischer Verdau des restlichen Gewebes, der mit unterschiedlichen Enzymlösungen (je 5 ml) ausgetestet wurde:

- 0,04 % Trypsin-Versene-Lösung, 2 h Inkubation bei 37 °C
- 1 mg/ml Kollagenase II-Lösung, 1 h Inkubation bei 37 °C

Die Enzymreaktion wurde nach der Inkubationszeit mit FCS abgestoppt. Im Anschluss wurden die Stücke mit dem sterilisierten Deckel eines 50 ml Falcons für 10 min sanft gequetscht. Die Lösung wurde über ein Zellsieb mit 100 µm Poren gegeben, wobei die verbliebenen Gewebestücke mehrmals mit PBS gewaschen und auf und ab pipettiert wurden, um möglichst viele Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 xg für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem PBS resuspendiert, um erneut zentrifugiert zu werden. Wiederum wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 15 ml HDMEC-Medium aufgenommen und in eine mit Gelatine beschichtete 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Bei sehr großen Gewebe-

proben ( $\geq 5 \text{ cm}^2$ ) wurde die Zellsuspension auf zwei  $75 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen wurden im Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ \% CO}_2$  und  $95 \text{ \%}$  Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach  $24 \text{ h}$  wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das alte Medium verworfen und  $15 \text{ ml}$  neues HDMEC-Medium zugeführt wurde. Innerhalb einer Woche wuchsen die Zellen als Mischkultur von HDMEC und Fibroblasten zu  $80\text{-}90 \text{ \%}$  Konfluenz. In diesem Stadium wurde die erste Bead-Isolation durchgeführt. Diese wurde automatisiert über den Miltenyi AutoMACS sowie manuell mittels *DynaBeads*<sup>®</sup> durchgeführt, wobei sich letzteres als erfolgreicher herausgestellt hat (Daten nicht gezeigt). Hierfür wurden die Zellen mit  $10 \text{ ml}$  PBS gewaschen, um im Anschluss mit  $2 \text{ ml}$   $0,25 \text{ \%}$  Trypsin-EDTA-Lösung dissoziiert zu werden. Die Reaktion wurde mit  $10 \text{ ml}$  Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein  $15 \text{ ml}$  Falcon überführt. Nach einem  $5 \text{ minütigen}$  Zentrifugationsschritt bei  $300 \text{ xg}$  wurden die Zellen in  $10 \text{ ml}$  DPBS +  $5 \text{ \%}$  FCS aufgenommen.  $10 \text{ }\mu\text{l}$  *Dynabeads*<sup>®</sup> *CD31 Endothelial Cell* Lösung wurde zugegeben und die Suspension für  $30 \text{ min}$  bei  $4^\circ\text{C}$  auf dem Rollenmischer mit ca.  $50 \text{ rpm}$  inkubiert. Anschließend wurde das Falcon in einen Magnetständer gestellt und die Bead-gebundenen Zellen für  $3 \text{ min}$  an den Magneten gebunden. Dann wurde der Überstand vollständig abgesaugt. Die Bead-gebundenen Zellen wurden in  $10 \text{ ml}$  DPBS resuspendiert und erneut für  $3 \text{ min}$  mit Hilfe des Magneten separiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal wiederholt, bevor die Bead-gebundenen Zellen in  $5 \text{ ml}$  HDMEC-Medium aufgenommen und in eine mit Gelatine-beschichtete  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflasche überführt wurden. Die Zellen wurden im Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ \% CO}_2$  und  $95 \text{ \%}$  Luftfeuchtigkeit inkubiert. Mediumwechsel erfolgte alle  $2\text{-}3$  Tage, je nach Stärke des Zellwuchses. Sofern eine zweite CD31-Bead-Isolation nötig war, wurde wieder wie oben beschrieben verfahren. Waren überwiegend Endothelzellen in der Kultur wurden sie nach der Bead-Isolation in eine mit Gelatine-beschichtete  $75 \text{ cm}^2$  Zellkulturflasche überführt. Zur Isolation von HDMEC aus Vulva- und Brusthaut wurde dasselbe Protokoll angewendet.

#### 2.2.2.2 Isolation Endothelialer Vorläuferzellen aus peripherem Blut

Zur Isolation endothelialer Vorläuferzellen (ECFC) aus peripherem Blut wurde auf der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode aufgebaut [191]. Zuvor wurden zwei 6-Well-Platten mit  $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$  Kollagen I-Lösung für mindestens  $60 \text{ min}$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  beschichtet. Freiwilligen Spendern wurde ca.  $35 \text{ ml}$  Blut durch periphere Venenpunktion in Lithium-Heparin- oder EDTA-Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde umgehend in  $50 \text{ ml}$  Falcons

überführt und 1:1 mit DPBS gemischt. In neuen 50 ml Falcons wurde je 25 ml Blut-DPBS-Gemisch 15 ml Ficoll Histopaque 1077 vorgelegt. Anschließend wurde 25 ml Blut-DPBS-Gemisch möglichst langsam auf das Histopaque pipettiert, wobei das Falcon schräg gehalten wurde, sodass sich die beiden Flüssigkeiten nicht durchmischten, sondern das Blut-DPBS-Gemisch sich auf dem Ficoll auflagerte. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 740 xg ohne Bremse. Die Ficoll Histopaque-Lösung weist mit 1,077 g/l eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) auf, jedoch eine geringere als beispielsweise Erythrozyten oder abgestorbene Zellen [192]. Durch die Dichtegradientenzentrifugation lagern sich die gewünschten PBMC in der Interphase zwischen Serum und Ficoll ab. Diese Interphase wurde möglichst vollständig, ohne aber zu viel der anderen Phasen mit zu überführen, abgenommen und in ein frisches 50 ml Falcon gegeben, um dort mit DPBS 1:1 verdünnt zu werden. Durch einen zweiten Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 505 xg wurden die Zellen gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wiederum in DPBS gelöst, um den Waschschrift zu wiederholen. Bei klarem Überstand wurden die Zellen in 36 ml ECFC-Medium aufgenommen, die Kollagen I-Beschichtungslösung wurde aus den 6-Well-Platten abgesaugt und die Zellsuspension in 3 ml/Well auf die insgesamt 12 6-Wells aufgeteilt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert, in der ersten Woche wurde jeden Tag das Medium gewechselt. Im Laufe der Kultivierung traten spenderabhängig nach zwei bis sechs Wochen die ersten Kolonien an ECFC auf. Sobald diese mindestens die Hälfte der Wachstumsfläche des 6-Wells ausfüllten wurden sie mit 2 ml DPBS gewaschen und mit 500 µl 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung dissoziiert. Anschließend konnten sie in Gelatine-beschichtete 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesiedelt werden. Bei mehreren bewachsenen 6-Wells konnten die Zellen vereint und bei Bedarf in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert werden.

### 2.2.2.3 Isolation primärer Epithelzellen und Fibroblasten aus oraler Mucosa

Zur Isolation primärer Epithelzellen aus Mundschleimhaut-Biopsien musste zunächst ein erfolgreiches Protokoll etabliert werden. Hierfür wurden verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Methoden getestet. Zunächst wurden die Mundschleimhaut-Proben zur Desinfektion in 70 % Ethanol, anschließend in BODE Sterillium, und danach wiederum

in 70 % Ethanol geschwenkt, jeweils für 15-20 Sekunden. Die Gewebe wurden in DPBS überführt und die folgenden Protokolle ausgetestet:

- (1) Enzymatischer Verdau mit Trypsin-EDTA: Mundschleimhaut-Stücke von ca. 5 mm<sup>2</sup> wurden in 15 ml Falcons in 10 ml 0,25 % Trypsin-EDTA über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler bei 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in kleine Stücke geschnitten und in 10 ml frischem 0,25 % Trypsin-EDTA für 30 min bei 37° C inkubiert, wobei der Ansatz alle 5 min invertiert wurde. Die Lösung wurde dann über ein Zellsieb mit 100 µm Poren gegeben und im Anschluss für 5 min bei 300 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml FAD-Medium resuspendiert und in eine spezielle 6-Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt.
- (2) Enzymatischer Verdau mit Dispase II und Trypsin-EDTA: Für diese Isolationsmethode wurde das publizierte Protokoll von Aasen und Belmonte als Orientierung verwendet [193]. Die Mundschleimhaut-Probe wurde mit einem Skalpell in ca. 4 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und in 10 ml 2,4 U/ml Dispase II-Lösung über Nacht bei 4 °C und 150 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Stücke noch weiter zerkleinert auf 1 mm<sup>2</sup> Größe. Sie wurden entweder mit der Schnittfläche nach unten in eine speziellen Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt und nach Adhärenz 1,5 ml FAD-Medium zugegeben (2a) oder in 10 ml Trypsin-EDTA für 30 min bei 37 °C inkubiert, um eine Einzelzellsuspension zu generieren (2b). Letztere wurde im Anschluss über ein Zellsieb mit 100 µm Poren gegeben und für 5 min bei 300 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml FAD-Medium resuspendiert und in eine spezielle 6-Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt.
- (3) Enzymatischer Verdau mit Kollagenase II: Die Mundschleimhaut-Proben wurden in ca. 4 mm<sup>2</sup> geschnitten und in 10 ml 5 mg/ml Kollagenase II-Lösung über Nacht bei 4 °C und 150 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Stücke entlang der Gewebegrenze in Epithel- und Bindegewebe getrennt. Das Epithelium wurde in 1 mm<sup>2</sup> Stücke geschnitten und mit der Schnittseite nach unten in eine spezielle 6-Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt, wobei nach Adhärenz 1,5 ml FAD-Medium zugegeben wurde (3a). Parallel wurden einige Stücke in 5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert, wobei der Ansatz

alle 5 min invertiert wurde (3b). Die Zellsuspension wurde anschließend über ein Zellsieb mit 100 µm Poren gegeben und für 5 min bei 300 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml FAD-Medium resuspendiert und in eine spezielle 6-Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt.

- (4) Enzymatisch-mechanische Isolation: Die Mundschleimhaut-Proben wurden mit einer Kanüle mehrmals punktiert und anschließend in 10 ml 0,04 % Trypsin-EDTA für 4 h bei 37 °C inkubiert. Das Epithelgewebe wurde im Anschluss vom Bindegewebe abpräpariert und in 1 mm breite Stücke geschnitten, welche mit der Schnittseite nach unten in eine spezielle 6-Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt wurden. Nach Adhärenz wurde 1,5 ml FAD-Medium pro Well zugegeben. Die Platten wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.
- (5) Nicht-enzymatische Auswachsmethode: sofern eine visuelle Differenzierung von Epithel- und Bindegewebe möglich war, wurden die Gewebe entlang dieser Grenze getrennt (Abbildung 5). Das Epithelium ist ein weißes, milchiges Gewebe, wohingegen das Bindegewebe rosafarben ist. Das Epithelgewebe wurde halbiert, parallel zur ursprünglichen Gewebegrenze. Anschließend wurden die länglichen Stücke in kleine Scheibchen von 1 mm Breite geschnitten und mit der Schnittfläche nach unten in ein Well einer speziellen 6-Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt. Nach Adhärenz wurde 1,5 ml FAD-Medium pro Well zugegeben. Die Platten wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

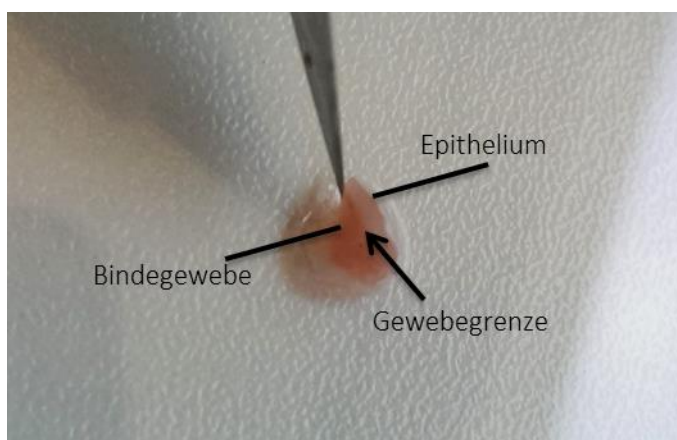


Abbildung 5 - Mundschleimhaut-Probe mit visuell gut differenzierbaren Geweben.

In Ansätzen mit Gewebestücken im Well wurde das Medium alle drei Tage komplett gewechselt, bis ein Auswachsen von Zellen beobachtet werden konnte, ab diesem Zeitpunkt

alle zwei Tage. Nachdem die Zellen ein gutes Stück vom Gewebe weg ausgewachsen waren, wurde von FAD-Medium auf CnT-Prime-Medium umgestellt. CnT-Prime zeigte sich als nicht erfolgreich zum Auswachsen, jedoch deutlich besser geeignet für die Kultivierung proliferierender, undifferenzierter Epithelzellen als FAD-Medium (Daten nicht gezeigt). Erreichten die Zellen 90 % Konfluenz, wurde das Gewebestück in ein leeres Well übersiedelt und erneut kultiviert. Die Zellen wurde mit 0,5 ml/Well 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung dissoziiert und in 5 ml CnT-Prime Medium in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt.

Im weiteren Verlauf wurden die Effekte einer Variation verschiedener Mediumzusätze, die im FAD-Medium enthalten sind, auf das Auswachsen (Protokoll 5) untersucht. Jeweils in separaten Ansätzen wurden die Konzentrationen folgender Supplemente erhöht: Adenin auf 33 µg/ml (+50 %) bzw. 44 µg/ml (+100 %); EGF auf 15,5 µg/ml (+70 %) bzw. 18 µg/ml (+100 %); Insulin auf 5,4 µg/ml (+18 %) bzw. 6,8 µg/ml (+ 47%). Zudem wurde das Auswachsen aus verschieden groß geschnittenen Gewebestücken analysiert: sehr kleine Stücke von ca. 0,5 mm<sup>2</sup> bis hin zu Stücken mit 6 mm<sup>2</sup>.

Bei mechanischer Trennung von Epithel- und Bindegewebe konnte letzteres zur Isolation primärer Fibroblasten verwendet werden. Es wurde dazu in kleinere Stücke von 1-2 mm<sup>2</sup> zerteilt und ebenfalls mit der Schnittfläche nach unten in eine spezielle 6-Well-Plate (*Corning® CellBIND® Surface*) überführt. Die Gewebestücke wurden zum Auswachsen ebenfalls in FAD-Medium kultiviert. Waren die Zellen ein Stück vom Gewebe weg ausgewachsen, so wurde das Medium auf Fibroblasten-Medium umgestellt. Hatte die Kultur 90 % Konfluenz im Well erreicht, wurden die Zellen mit 0,5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung dissoziiert und in 15 ml Fibroblasten-Medium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt.

#### 2.2.2.4 Immunhistologischer Nachweis der isolierten Zellen

Zur eindeutigen Identifikation der isolierten Zellen wurden immunhistologische Färbungen an Cytospins durchgeführt. Die Zellen wurden durch Cytospin-Zentrifugation auf Objektträger immobilisiert (maximale Beschleunigung, 10 min) und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie entweder zur Lagerung in Alufolie bei -20 °C weggefroren oder zur direkten Färbung in 100 % Ethanol fixiert. Nach letzterem wurden die Objektträger in Aqua dest. gewaschen und die fixierten Zellen mit einem Fettstift (Dako Pen) umrahmt, um einen abgeschlossenen Bereich für die Färbungen zu generieren. Anschließend wurde die

endogene Peroxidase für 10 min in einer feuchten Kammer geblockt, entweder mit *Peroxidase blocking solution* (Dako) oder mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Objektträger wurden erneut mit Aqua dest. gewaschen und in 1x *Wash Buffer* (Dako) überführt. Es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, ebenfalls in der feuchten Kammer, bei RT für 1 h oder über Nacht bei 4 °C. Zur Identifikation von Endothelzellen wurden CD31 und vWF Antikörper verwendet, für Epithelzellen wurden Cytokeratin 13 und Cytokeratin 8/18 Antikörper eingesetzt, wobei die jeweiligen Verdünnungen Tabelle 1 zu entnehmen sind. Zum Nachweis von Fibroblasten kam Tenascin, Vimentin und SMA zum Einsatz. Parallel wurden Negativkontrollen mitgeführt, die jeweils nur mit dem Antikörper-Diluent inkubiert wurden. Die weitere Visualisierung erfolgte mit dem *Universal LSAB™2 Kit/HRP Rabbit/Mouse (DAB+)* Kit der Firma Dako. Nach dreimaligem Waschen mit 1x *Wash Buffer* für je 2 min wurden die Objektträger mit dem Visualisierungsreagenz inkubiert, ebenfalls in der feuchten Kammer für 30 min bei RT. Anschließend wurden sie erneut 3x 2 min mit 1x *Wash Buffer* gewaschen. Die DAB-Lösung wurde jeweils frisch angesetzt, wobei das DAB-Chromogen 1:50 im DAB-Substrat-Puffer verdünnt wurde, und die Objektträger 10 min bei RT in der feuchten Kammer mit ihr inkubiert. Für die darauffolgende Mayers Hämalaun Färbung wurde Mayers Hämalaun Lösung durch einen Faltenfilter filtriert und die Objektträger nach zweimaligem Waschen in Aqua dest. für 1 min gefärbt. Anschließend wurden sie für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und in Aqua dest. überführt. Es folgte eine Alkoholreihe zum Wasserentzug, wobei die Präparate zunächst in 70 % Ethanol, dann 96 % Ethanol und zuletzt 2x 100 % Ethanol für je 2 min inkubiert wurden, um anschließend 3x 5 min in Xylol zu inkubieren. Danach wurden sie mit Entellan bzw. Hico-Mic Mikroskopiereinschlussmittel und von der Größe adäquaten Deckgläschen eingedeckelt.

#### 2.2.2.5 Zellkultur

#### 2.2.2.6 Kultivieren und Passagieren primärer Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in ihrem jeweiligen Medium (siehe Abschnitt 2.1.4) kultiviert, wobei die für die verschiedenen Zellkulturgefäße angepassten Volumina Tabelle 3 zu entnehmen sind. Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Zur Kultivierung von Endothelzellen wurden alle Kulturgefäße vorab mit einer 0,2 % Gelatine-Lösung beschichtet, mindestens für 30 min im Inkubator. Die

Gelatine-Lösung wurde vor Aussiedeln der Zellen abgesaugt. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem das alte Medium komplett abgesaugt und durch frisches ersetzt wurde. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie mit 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung dissoziiert und gesplittet bzw. passagiert. Dabei wurde zunächst ein Waschschrift durchgeführt, um Mediumreste, die die Trypsin-Reaktion stören würden, zu entfernen. Nach vollständiger Dissoziation der Zellen wurde 10 ml Medium zugegeben, um die Enzymreaktion abzustoppen. Die Zellen wurden anschließend entweder gesplittet, auf neue Flaschen verteilt oder aber für einen Versuch verwendet.

**Tabelle 3 - Zellkulturflaschen und -platten mit entsprechendem Medium, PBS-Wasch- und Trypsin-Dissoziations-Volumen**

Zellkulturgefäß	Volumen Medium	Volumen PBS (Waschen)	Volumen Trypsin (Dissoziation)
25 cm <sup>2</sup>	5 ml	5 ml	1 ml
75 cm <sup>2</sup>	15 ml	10 ml	2 ml
175 cm <sup>2</sup>	25 ml	15 ml	3 ml
6-Well-Plate	3 ml	1 ml	0,5 ml
12-Well-Plate	2 ml	1 ml	0,25 ml
24-Well-Plate	1 ml	0,5 ml	-
48-Well-Plate	0,5 ml	0,5 ml	-

### 2.2.2.7 Kryokonservierung primärer Zellen

Zur Kryokonservierung kultivierter Zellen wurden diese bei vollständiger Konfluenz, wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben, dissoziiert und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt, um bei 300 xg für 5 min zentrifugiert zu werden. Das Pellet wurde in einem der Zellzahl angemessenen Volumen Vollmedium gelöst (ca. 1 ml für  $1 \times 10^6$  Zellen). Zum Schutz der Zellen während der Kryokonservierung wurde bei Fibroblasten und endothelialen Zellen 10 % DMSO, bei Epithelzellen 10 % Glycerol zugegeben. Die Zellsuspension wurde dann auf Kryogefäße aufgeteilt, wobei 1-1,5 ml in je ein Kryogefäß pipettiert wurde. Diese wurden dann in Isopropyl- oder *Cool Cell* Behälter überführt und für 24 h bei -80 °C eingefroren.

Anschließend wurden die Kryogefäße in den flüssigen Stickstofftank zur längerfristigen Lagerung überführt.

Zur Re-Kultivierung kryokonservierter Zellen wurden die Kryogefäße im Wasserbad bei 37 °C bis zum vollständigen Auftauen inkubiert. Dann wurden sie in 2 ml Medium aufgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 xg wurde das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen Medium gelöst und in eine Zellkulturflasche überführt.

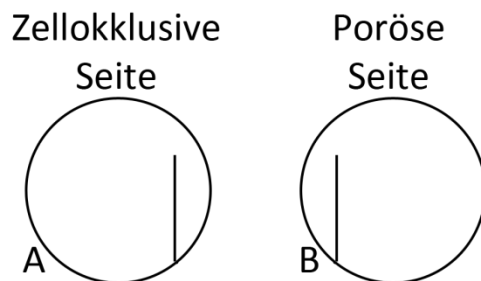
#### 2.2.2.8 Versuchsvorbereitung und Zellzählung

Nach Dissoziation konfluenten Zellen, wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben, konnten diese für Versuche verwendet werden. Hierfür musste, je nach Versuch, eine Zellsuspension mit entsprechend definierter Zellkonzentration angesetzt werden. Die dissoziierten Zellen wurden hierfür, nach Abstoppen der Enzymreaktion mit Medium, in ein 15 ml Falcon überführt. Aus diesem wurden 15 µl in eine *Neubauer Improved C-Chip* Zählkammer bzw. eine *LUNA™ Cell Counting Slide* pipettiert und ausgezählt. Wurde erstere verwendet, so mussten die Zellen manuell ausgezählt werden. Am Boden der Zählkammer befindet sich ein Aufbau aus vier Großquadraten, die sich wiederum in jeweils 16 kleinere Quadrate unterteilen. Alle Zellen innerhalb der vier Großquadrate wurden ausgezählt, wobei Zellen auf Randlinien nur an zwei Seiten miteinbezogen wurden. Aus den vier Feldern wurde der Mittelwert berechnet, welcher aufgrund des Volumens der Zählkammer ( $10^{-4} \text{ cm}^3$ ) mit  $10^4$  multipliziert die Zellzahl pro ml ergab. Alternativ wurde ein *LUNA™ Automated Cell Counter* verwendet, welcher die Zellzahl automatisch bestimmte.

#### 2.2.3 Kultivieren von Schleimhaut-Äquivalenten in Ko- und Trikultur

Zur Generierung eines *in vitro* Schleimhaut-Äquivalents in Kokultur (Fibroblasten und Endothelzellen bzw. ECFC) oder Trikultur (Fibroblasten und Endothelzellen/ECFC und Epithelzellen) wurden zurecht gestanzte Geistlich Bio-Gide®-Membranen mit 6 mm Durchmesser mit den entsprechenden Zellen besiedelt. Die Oberfläche der Membranen entspricht dabei ca. 0,28 cm<sup>2</sup>. Die Bio-Gide®-Membran setzt sich aus einem Bilayer zusammen: eine Seite ist zelloklusiv, die Zellen können nicht in die Membran eindringen. Hierauf wurden Epithelzellen zur Generierung eines mehrschichtigen Epitheliums

ausgesiedelt. Die andere Seite ist porös und durchlässig für Zellen. Hier wurden Fibroblasten und endotheliale Zellen ausgesiedelt, die in die Membran eindringen und in ihr eine Art Bindegewebe generieren sollen. Die Membranen wurden vor Besiedlung durch einen feinen Einschnitt markiert, um die unterschiedlichen Seiten eindeutig identifizieren zu können: mit der zelloklusiven Seite nach oben wurde der Schnitt am rechten Rand vorgenommen (Abbildung 6).



**Abbildung 6 - Markierung der Bio-Gide®-Membranen für die Besiedlung als Schleimhaut-Äquivalent zur Identifikation der Seiten:** Durch einen Schnitt an der rechten Seite (A, zelloklusive Seite oben) blieben die beiden verschiedenen Seiten der Bio-Gide®-Membran während der Kultivierung identifizierbar. Bei B ist die poröse Seite nach oben, der Schnitt befindet sich hier auf der linken Seite.

Vor Besiedlung wurden die Fibroblasten für mindestens 24 h auf HDMEC-Medium umgestellt. Die zurecht gestanzten Bio-Gide®-Membranen wurden in je ein Well einer 96-Well-Plate gelegt, mit der zu besiedelnden Seite nach oben. Fibroblasten wurden in einer Konzentration von  $5,6 \times 10^4$  Zellen/Membran, Epithel- und Endothelzellen in einer Konzentration von  $1,12 \times 10^5$  Zellen/Membran in 200  $\mu$ l Medium auf die Bio-Gide®-Membran aufgebracht (Tabelle 4). Wurde nach 24 h eine weitere Besiedlung mit einem anderen Zelltyp durchgeführt, so wurde die Membran in ein neues Well überführt und dort besiedelt. 24 h nach Besiedlung wurde die Membran in ein Well einer 24-Well-Plate überführt und 1 ml Medium zugegeben. Das Medium wurde alle 2-3 Tage komplett erneuert. Bei Kokultivierungen wurden mithilfe eines Transwell-Insertsystems realisiert, welches eine Versorgung der verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Medien ermöglichte. Die besiedelten Membranen wurden mit der zelloklusiven, mit Epithelzellen besiedelten Seite nach oben in das Insert gelegt, in welchem sie in FAD-Medium an der Luft-Medium-Grenze kultiviert

werden konnten. Die Endothelzellen und Fibroblasten auf der unteren Membranseite wurden durch HDMEC-Medium im Well darunter versorgt.

**Tabelle 4 - Zellzahl der verschiedenen eingesetzten Zelltypen für Besiedlung auf Bio-Gide®-Membranen**

Zelltyp	Zellzahl
Endothelzellen	$4 \times 10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup> , bzw. $1,12 \times 10^5$ Zellen/Membran
Fibroblasten	$2 \times 10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup> , bzw. $5,6 \times 10^4$ Zellen/Membran
Epithelzellen	$4 \times 10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup> , bzw. $1,12 \times 10^5$ Zellen/Membran

Zum Beenden der Kultivierung der Gewebeäquivalente wurden diese zunächst zum Waschen in DPBS überführt und anschließend in frisch angesetzten oder aufgetauten 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Präparate in DPBS bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

## 2.2.4 Analyse der Schleimhaut-Äquivalente

### 2.2.4.1 Konfokalmikroskopie

Nach Beenden der Kultivierung der Schleimhaut-Äquivalente wurden diese zunächst mittels Immunfluoreszenzfärbung am Konfokalmikroskop oder am Stereomikroskop bezüglich der Bildung gefäßähnlicher Strukturen und den zellulären Aufbau analysiert. Die fixierten Präparate zuerst 3x kurz mit 1 ml PBS gewaschen und im Anschluss zur Permeabilisierung der Zellen für 20 min in 0,2 % Triton-X inkubiert. Es folgten drei 10 min Waschschriffe in 1 ml PBS, welche auch im Folgenden immer bei RT und 300 rpm erfolgten. Anschließend wurden die Präparate über Nacht mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert: es wurde  $\alpha$ -CD31 verwendet, ein Endothelzell-spezifischer Antikörper, um die gefäßähnlichen Strukturen sichtbar zu machen. Dieser wurde 1:50 in PBS + 1 % BSA verdünnt und die Präparate für 1 h bei RT mit anschließender Inkubation bei 4 °C über Nacht damit inkubiert. Am nächsten Tag folgten wiederum drei 10 min Waschschriffe. Als Sekundärantikörper wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Antikörper eingesetzt, welche 1:200 in PBS + 1 % BSA verdünnt wurden. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei RT. Anschließend wurden die

Präparate noch 3x für 10 min mit 1 ml PBS gewaschen. Sie konnten nun lichtgeschützt bei 4 °C bis zur Mikroskopie aufbewahrt werden.

### 2.2.4.2 Immunhistologie

Die zuvor für die Konfokalmikroskopie verwendeten besiedelten Schleimhaut-Äquivalente wurden anschließend für immunhistochemische Färbungen weiterverwendet. Sofern sie nach Kultivierung direkt immunhistochemisch analysiert werden sollten, wurden sie wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben fixiert und bei Bedarf gelagert. Es folgte die Einbettung in Paraffin und das Schneiden der Präparate am Mikrotom. Die 5 µm dünnen Querschnitte wurden mit histologischen und immunhistologischen Methoden angefärbt.

#### 2.2.4.2.1 Herstellen von Paraffinschnitten

Zur Einbettung in Paraffin wurden die Schleimhaut-Äquivalente in Einbett-Kassetten zwischen zwei Schwammeinsätze gelegt und in den Tissue-Tek VIP Einbettautomaten überführt. Nach schrittweisem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie Xylol wurden die Biomembranen abschließend in Paraffin eingebettet (Tabelle 5). Anschließend wurden die Schleimhaut-Äquivalente an der Tissue-Tek Thermal-, Dispensing und Kryo-Konsole in Paraffinblöckchen eingebettet. Dafür wurde das erhärtete Paraffin verflüssigt, die Biomembranen in der Mitte geteilt und mit der Schnittfläche senkrecht in ein mit flüssigem Paraffin gefülltes Gussförmchen gestellt. Auf einer Kälteplatte konnte das Paraffin aushärten. Die Paraffin-Blöckchen wurden bei 4 °C gelagert. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden 5 µm dünne Querschnitte der eingebetteten Schleimhaut-Äquivalente hergestellt, die nachfolgend histologisch und immunhistologisch gefärbt wurden. Die Schnitte wurden zunächst in destilliertes Wasser, dann auf Objektträger überführt. In einem 50 °C warmen Wasserbad wurden sie auf den Objektträgern geglättet und anschließend senkrecht stehend bei 60 °C für 1-2 Stunden gebacken.

Tabelle 5 - Einbettprogramm des Tissue-Tek VIP Einbettautomaten

Zyklus	Substanz	Temperatur	Dauer
1x	Ethanol 50 %	40°C	1 Stunde
1x	Ethanol 70 %	40°C	1 Stunde
1x	Ethanol 80 %	40°C	1 Stunde
1x	Ethanol 90 %	40°C	1 Stunde
2x	Ethanol 100 %	40°C	1 Stunde
3x	Xylol	40°C	1 Stunde
4x	Paraffin	60°C	1 Stunde

#### 2.2.4.2.2 HE-Färbung

Die Objektträger mit den zu färbenden Schnitten wurden zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und in wässriges Milieu überführt. Zunächst wurden sie 3x 10 min in Xylol, anschließend 2x 5 min in 100 % Ethanol und darauf je 1x 5 min in 96 % und 70 % Ethanol inkubiert. Nach einmaligem Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte 10 min in Mayers Hämalaun gefärbt und im Anschluss 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Wiederum folgte ein Waschschriff in Aqua dest., nach dem die Objektträger für 5 min in Eosin gefärbt wurden. Anschließend wurden sie 1x in Aqua dest. und 1x in 70 % Ethanol gewaschen, 3 min in 96 % Ethanol und 2x 5 min in 100 % Ethanol inkubiert. Durch diese Alkoholreihe und die anschließende 3x 5 min Inkubation in Xylol wurden die Präparate entwässert und so für das Eindeckeln mit Entellan bzw. Hico-Mic vorbereitet.

#### 2.2.4.2.3 Immunhistologische Färbungen

Zur immunhistologischen Färbung verschiedener zellulärer Marker mussten die Präparate ebenfalls zunächst entparaffiniert und in wässriges Milieu überführt werden. Nach 3x 10 min Inkubation in Xylol folgten 2x 5 min 100 % Ethanol, 1x 5 min 96 % Ethanol und 1x 5 min 70 % Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Für die Färbung wurde das *Universal LSAB™2 Kit/HRP Rabbit/Mouse (DAB+)* Kit der Firma Dako verwendet. Zur Hitzedemaskierung der Schleimhaut-Äquivalente wurde der *Target Retrieval pH 9,0 Buffer 1:50* verdünnt und in einer Plastikkuvette in der Mikrowelle vorer-

wärmt. Zeitgleich wurde ein Dampfgarer aufgeheizt. Die Präparate wurden in einem passenden Einsatz in die Plastikküvette gestellt, die übrigen Plätze mit leeren Objektträgern aufgefüllt und die Präparate für 10 min im Dampfgarer hitzedemaskiert. Anschließend wurde die Küvette für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt und 2x mit Aqua dest. gewaschen. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 min in einer feuchten Kammer, entweder mit *Peroxidase blocking solution* (Dako) oder mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Objektträger wurden erneut mit Aqua dest. gewaschen und in 1x *Wash Buffer* (Dako) überführt. Bei starker Hintergrundfärbung der Membran wurde ein Proteinblock eingeschoben, bei dem die Schnitte 30 min in 3 % BSA (in DPBS) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte in Waschpuffer getränkt, mit *Cover Slides* bedeckt und in spezielle Racks überführt. Es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, bei Raumtemperatur für 1 h oder über Nacht bei 4 °C. Die eingesetzten Antikörper und jeweiligen Verdünnungen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Parallel wurden immer Negativkontrollen mitgeführt, die jeweils nur mit dem Antikörper-Diluent inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit 1x *Wash Buffer* für je 2 min wurden die Schleimhaut-Schnitte mit dem Visualisierungsreagenz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei handelt es sich um eine Streptavidin-HRP (*Horseradish Peroxidase*), welche kitspezifisch gegen *mouse*- und *rabbit*-Immunglobuline gerichtet und mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Anschließend wurden die Präparate erneut 3x 2 min mit 1x *Wash Buffer* gewaschen. Die DAB-Lösung wurde jeweils frisch angesetzt, wobei das DAB-Chromogen 1:50 im DAB-Substrat-Puffer verdünnt wurde, und die Objektträger mit je 100 µl für 10 min bei RT inkubiert. Die zuvor gebundene HRP katalysiert die Umsetzung des DAB und führt zu einer Farbreaktion. Für die anschließende Mayers Hämalaun Färbung wurde Mayers Hämalaun-Lösung 1:3 in Leitungswasser verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert. Die Objektträger wurden aus den Racks genommen, in Glasküvetten überführt und zweimal in Aqua dest. gewaschen. Nach 1 min Färbung in Mayers Hämalaun wurden sie für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend in Aqua dest. überführt. Es folgte eine Alkoholreihe zum Wasserentzug, wobei die Präparate zunächst in 70 % Ethanol, dann 96 % Ethanol und zuletzt 2x 100 % Ethanol für je 2 min inkubiert wurden, um anschließend 3x 5 min in Xylol zu inkubieren. Danach wurden sie mit Entellan bzw. Hico-Mic Mikroskopier-Einschlussmittel und von der Größe adäquaten Deckgläschen eingedeckelt.

## 2.2.5 Optimierung der Schleimhaut-Äquivalente

### 2.2.5.1 Optimierung der Besiedlungsreihenfolge

Zur Optimierung der Schleimhaut-Äquivalente wurde die Reihenfolge der Besiedlung beteiligter Zellen ausgetestet, um ein optimales Protokoll zur Generierung einer Prävaskularisierung bzw. Trikultur zu etablieren. Dabei wurden in Kokultur folgende Ansätze durchgeführt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch sowie immunhistochemisch analysiert:

- A:** Besiedlung mit HDMEC Tag 1, Besiedlung mit Fibroblasten 4 h später
- B:** Besiedlung mit HDMEC Tag 1, Besiedlung mit Fibroblasten 24 h später
- C:** Besiedlung mit Fibroblasten Tag 1, Besiedlung mit HDMEC 4 h später
- D:** Besiedlung mit Fibroblasten Tag 1, Besiedlung mit HDMEC 4 h später

In Trikultur wurde die Reihenfolge der Besiedlung mit Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen analysiert. Aufbauend auf den Ergebnissen zur Besiedlungsreihenfolge der Kokultivierung wurden die Fibroblasten stets an Tag 0 ausgesät. Anschließend wurden folgende Ansätze durchgeführt und fluoreszenzmikroskopisch sowie immunhistochemisch analysiert:

- E:** Besiedlung mit HDMEC Tag 1, Besiedlung mit Epithelzellen 7 Tage später
- F:** Besiedlung mit Epithelzellen Tag 1, Besiedlung mit HDMEC 8 Tage später
- G:** Besiedlung mit Epithelzellen Tag 1, Besiedlung mit HDMEC 14 Tage später

### 2.2.5.2 Optimierung der Prävaskularisierung

Ein essentieller Punkt des angestrebten Schleimhaut-Äquivalent ist eine durchgehende Prävaskularisierung durch die gesamte Membran. Um dies zu etablieren wurden verschiedene Methoden der Besiedlung ausgetestet.

#### 2.2.5.2.1 „Reinziehen“ der Endothelzellen durch Kapillarkräfte in die Membran

Trockene Bio-Gide®-Membranen wurden mit  $1,12 \times 10^5$  Endothelzellen in 25 µl bzw. 50 µl HDMEC Medium besiedelt, sodass sich die Flüssigkeit in die Membranen rein zog. Nach 1h wurden 200 µl Medium zugegeben. Ein Ansatz wurde nach 4 h beendet und fixiert, um die Tiefe der Endothelzellen immunhistochemisch zu bestimmen. Bei den anderen Ansätzen

wurden nach 4 h bzw. 24 h Fibroblasten auf die Membranen ausgesät. Die Kokulturen wurden 21 Tage kultiviert, anschließend beendet und fixiert und für die oben beschriebenen Analysen verwendet (Abschnitt 2.2.4).

#### 2.2.5.2.1 Zentrifugieren der Endothelzellen in die Membran

Als nächstes wurde eine Besiedlung durch Zentrifugieren ausgetestet. Hierbei wurde die Endothelzellsuspension in einer Konzentration von  $1,12 \times 10^5$  Zellen/200  $\mu$ l Medium pro Membran in der 96-Well-Platte auf die Membran gegeben und die Platte bei 300 xg für 10 min zentrifugiert. Ein Ansatz wurde nach 4 h beendet und fixiert, um die Tiefe der Endothelzellen immunhistochemisch zu bestimmen. Bei den anderen Ansätzen wurden nach 4 h bzw. 24 h Fibroblasten auf die Membranen ausgesät. Die Kokulturen wurden 21 Tage kultiviert, anschließend beendet, fixiert und für die oben beschriebenen Analysen verwendet (Abschnitt 2.2.4).

#### 2.2.5.2.2 Markierung der Endothelzellen mit magnetischen Beads zur Besiedlung mit einem Magneten

Zur Besiedlung mittels Magneten wurden pro Membran  $4 \times 10^5$  Endothelzellen mit magnetischen CD31 DynaBeads<sup>®</sup> markiert, wie dies auch zur Selektionierung bei Isolation durchgeführt wurde (Abschnitt 2.2.2.1). Anschließend wurden pro Membran 200  $\mu$ l dieser Zellsuspension auf die in einer 96-Well-Platte befindlichen Bio-Gide<sup>®</sup> gegeben. Die Platte wurde unter Zellkulturbedingungen für 10 min auf einen Magneten gestellt und anschließend noch 4 h kultiviert, bevor die Membranen beendet, fixiert und für die oben beschriebenen Analysen verwendet wurden (Abschnitt 2.2.4). In einem weiteren Ansatz wurden die Membranen für 24 h auf dem Magneten platziert, bevor sie nach weiteren 24 h beendet, fixiert und analysiert wurden.

#### 2.2.5.2.3 Injektion der Endothelzellen in die Membran

In einem weiteren Ansatz wurden HDMEC mittels BD Microlance Kanülen in einer Konzentration von  $8 \times 10^5$  Zellen/400  $\mu$ l Medium/Membran an mehreren Stellen in die Bio-Gide<sup>®</sup>-Membranen injiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Spitze der Kanüle innerhalb der Membran steckte als die Flüssigkeit injiziert wurde. Zum Teil wurden die Membranen anschließend für 4 h kultiviert, bevor sie beendet, fixiert und für die oben beschriebenen Analysen verwendet wurden (Abschnitt 2.2.4). In weiteren Ansätzen wurden die Mem-

branen nach 24 h mit  $2 \times 10^5$  Fibroblasten/Membran besiedelt und für insgesamt 21 Tage kultiviert, bevor auch sie beendet, fixiert und analysiert wurden.

## 2.2.6 Analyse der zellulären Kommunikation

### 2.2.6.1 Besiedlungen zur Entnahme von Zellkulturüberständen

Zur Analyse der interzellulären Kommunikation in den angestrebten Schleimhaut-Äquivalenten wurden Überstände von Kokulturen gesammelt und auf verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren untersucht. Zur Besiedlung wurde wie in Abschnitt 2.2.3 zur Kokultivierung beschrieben vorgegangen. Die besiedelten Membranen wurden in 24-Well-Plates kultiviert und jeweils 24 h vor Überstandsabnahme auf 1 ml Hungermedium umgestellt. Überstände wurden zu folgenden Zeitpunkten genommen: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 3 Tage, 7 Tage, 11 Tage, 15 Tage, 19 Tage, 21 Tage. Pro Versuch wurden die folgenden Ansätze im Triplet durchgeföhrt: Kokultur Fibroblasten und Endothelzellen auf der Bio-Gide®-Membran, Monokulturen beider Zelltypen auf der Bio-Gide®-Membran sowie im Well, Kokulturen im Insertsystem mit Kontakt sowie ohne Kontakt der Zellen (Tabelle 6). Die verschiedenen Ansätze einer Besiedlung wurden dabei mit Zellen eines Spenders je Zelltyp durchgeföhrt. Die Besiedlungen und Überstandsentnahmen wurden dreimal unabhängig durchgeföhrt. Die Überstände wurden aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Tabelle 6 - Besiedlungsansätze zur Überstandsentnahme

Ansatz		Fibroblasten	HDMEC
I	Kokultur auf der Bio-Gide®	+	+
II	Monokultur Fibroblasten auf Bio-Gide®	+	-
III	Monokultur Fibroblasten im Well	+	-
IV	Monokultur HDMEC auf Bio-Gide®	-	+
V	Monokultur HDMEC im Well	-	+
VI	Kokultur im Insertsystem mit Kontakt	auf Unterseite des Inserts	in Insert
VII	Kokultur im Insertsystem ohne Kontakt	in Well darunter	in Insert

### 2.2.6.2 Identifikation essentieller angiogener Faktoren im kokultivierten Schleimhaut-Äquivalent

Die gesammelten Überstände der Kultivierungen wurden mittels *Human Cytokine ELISA Plate Array* der Firma Signosis analysiert. Dieser ermöglichte es, in einer 96-Well-Platte 3x 32 verschiedene pro-angiogene Zytokine und Wachstumsfaktoren zu detektieren (Tabelle 7). Die ELISAs wurden dabei nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden 1:2 mit *Diluent Buffer* verdünnt. Es wurden jeweils die Überstände von Tag 3 und Tag 21 einer Kokultur gemessen. Nach Auftragen der Proben folgte eine Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde die Platte 3x mit *Assay wash buffer* gewaschen, getrocknet und mit der Biotin-markierten Antikörper-Mischung für 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte die Inkubation mit dem Streptavidin-HRP Konjugat für 30 min bei RT und leichtem Schütteln. Es folgte wiederum ein Waschschrift, wonach die beiden weiteren Waschungen für 10 min auf dem Schüttler inkubiert wurden. Die Substratlösung wurde frisch angesetzt und 2 min inkubiert. Im Anschluss folgte die Messung am Luminometer (1 min *integration time, no filter*). Die gemessenen Werte wurden gemittelt und der 21-Tages-Wert zum 3-Tages-Wert in Relation gesetzt. Die Daten wurden in Microsoft Office Excel 2013 ausgewertet.

**Tabelle 7 - Wachstumsfaktoren und Zytokine, die mittels des Human Cytokine ELISA analysiert wurden**

TNFa	VEGF	PDGF-BB	IL-10
IFNr	EGF	PIGF-1	FGFb
G-CSF	IL-6	b-NGF	Leptin
GM-CSF	Resistin	SCF	IGF-1
IL-1a	PAI-1	MCP-1	TGF-b
IL-8	IL-12	MIP-1a	Adipo
IP-10	IL-13	IL-2	IL-17a
Rantes	Eotaxin-3	IL-4	IL-1b

### 2.2.6.3 ELISA zur Quantifizierung der identifizierten Faktoren in den Zellkulturüberständen

Anhand des *Human Cytokine* ELISAs wurden Veränderungen in der Sekretion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren über die Kultivierungszeit analysiert. Faktoren, die eine besonders starke Veränderung zeigten, wurden in weiteren ELISAs in allen Überständen quantifiziert. Faktoren wurden ausgewählt nach Mittelwert ( $n=3$ ) und der Standardabweichung (SD). Nach Abzug der SD vom Mittelwert sollten die Werte nicht unterhalb des 100 % Wertes liegen. Zudem wurden die Werte der einzelnen Besiedlungen betrachtet: war ein Faktor bei mindestens zwei davon stark erhöht und bei der dritten nicht reduziert, wurde der Faktor auch ausgewählt. ELISAs wurden für die folgenden Faktoren durchgeführt: VEGF, IL-8, bFGF, eNOS und Angiopoetin-2 (Ang-2). Dabei wurden ausschließlich ELISA Kits der Firma R&D verwendet, je nach Verfügbarkeit *ready-to-use* (Ang-2) oder zum selber beschichten (VEGF, IL-8, bFGF, eNOS). Bei ersterem wurden die Platten über Nacht bei RT mit den Proben inkubiert. Mussten die Platten selbst beschichtet werden, so wurden sie zunächst über Nacht mit dem entsprechenden *Capture Antibody* bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschriffe mit *Wash Buffer* und eine Blockierung mit *Reagent Diluent* für mindestens 1 h bei RT. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und über Nacht bei RT inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde strikt nach Herstellerangaben für das jeweilige Kit vorgegangen. Am nächsten Tag folgten wieder Waschschriffe und im Anschluss die Inkubation mit dem *Detection Antibody* bzw. einem entsprechenden *Conjugate* für 2 h bei RT. Bei den ELISAs zum selber beschichten folgte nach erneutem Waschen eine Inkubation mit Streptavidin-HRP-Konjugat für 20 min bei Raumtemperatur. Bei allen ELISAs folgte nun, nach erneutem Waschen, die Inkubation mit *Substrate Solution* für 20 bzw. 30 min (letzteres bei den *ready-to-use* Kits). Nach Zugabe der *Stop Solution* wurden die Platten bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 560 nm) am ELISA Reader gemessen. Die gemessenen Werte aller Versuche wurden gemittelt. Die Daten wurden in Microsoft Office Excel 2013 ausgewertet. Dabei wurde anhand von mindestens fünf Werten des gemessenen Standards mittels linearer Regression eine Standardgerade berechnet. Ein Versuch wurde nur dann in die Ergebnisanalyse miteinbezogen, sofern das errechnete  $R^2$  der Standard-

reihe  $> 0,9$  war. Anhand dieser Standardgerade wurden die Konzentrationen der unbekanntenen Proben berechnet. Der Versuch wurde jeweils im Dreifachansatz durchgeführt.

## 2.2.7 Analyse zellulärer Parameter

### 2.2.7.1 Vitalitätsassay

Zur Analyse der Zellvitalität der in den Schleimhaut-Äquivalenten eingesetzten Zellen unter Behandlung mit den in den ELISAs analysierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wurden MTT-Vitalitätsassays durchgeführt. Hierbei wird das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) von vitalen Zellen zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazan reduziert [194]. Für den Versuch wurden in 96-Well-Plates je  $5 \times 10^3$  Zellen/Well in 100  $\mu\text{l}$  entsprechendem Medium ausplattiert, wobei jeweils Vierfachansätze durchgeführt wurden. Zur Kultivierung von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen wurden die Wells zuvor mit 60  $\mu\text{l}$  0,2 % Gelatine-Lösung beschichtet. Diese wurde vor Ausplattieren der Zellen wieder entfernt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C im Zellkultur-Inkubator wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt und mit Hungermedium getauscht. Nach weiteren 24 h erfolgte die Behandlung mit folgenden Zytokin- und Wachstumsfaktor-Konzentrationen:

**VEGF:** 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml

**IL-8:** 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1000 ng/ml

**bFGF:** 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$

Nach weiteren 24 h Inkubationszeit erfolgte der MTT-Vitalitätsassay. Hierfür wurden 20  $\mu\text{l}$  0,5 % MTT-Lösung pro Well zugegeben und die Platte für 3 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände entfernt und die Zellen mit 100  $\mu\text{l/Well}$  DPBS gewaschen. Es folgte eine 15 min Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  Isopropanol/Well auf dem Schüttler bei 500 rpm, um den Farbstoff aus den Zellen zu lösen. Die Extinktion der Überstände wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 570 nm und 650 nm Referenzwellenlänge mittels ELISA-Reader bestimmt. Die Daten wurden wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben ausgewertet.

### 2.2.7.2 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferation der in den Schleimhaut-Äquivalenten eingesetzten Zellen unter Behandlung mit den in den ELISAs analysierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren wurden BrdU-Proliferationsassays mit dem *Cell Proliferation ELISA BrdU* Kit der Firma Roche durchgeführt. Die Zellen wurden analog zum MTT-Vitalitätsassay in einer Konzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen/100  $\mu$ l Medium/Well ausplattiert und bis zum Versuchstag gleich behandelt. Dabei wurden die gleichen Zytokin- und Wachstumsfaktor-Konzentrationen eingesetzt wie in 2.2.7.1 angeführt. Am Versuchstag wurden 10  $\mu$ l/Well BrdU-Labeling-Solution (1:100 in DPBS verdünnt) zugegeben und die Platten für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Proliferierende Zellen bauen in dieser Zeit anstelle von Thymidin BrdU in ihre DNA ein, welches im Anschluss über eine Antikörper-vermittelte enzymatische Reaktion nachgewiesen werden kann. Nach 2 h wurden die Überstände verworfen und 200  $\mu$ l/Well Fix-Denat-Lösung zur Denaturierung und Fixierung der Zellen zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Überstände wiederum entfernt und die Zellen mit 100  $\mu$ l/Well BrdU-Antikörper-Lösung (Anti-BrdU-POD 1:100 verdünnt in *Antibody Dilution Solution*) für 60 min bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 200  $\mu$ l/Well Waschlösung (1:10 in DPBS verdünnt) und darauf die Inkubation mit 100  $\mu$ l/Well Substratlösung für 15 min lichtgeschützt bei RT. Die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase setzt in dieser Zeit das Substrat um und bewirkt eine Farbreaktion, welche mit 25  $\mu$ l/Well 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt wurde. Es kommt dabei zu einem Farbumschlag von blau zu gelb. Die Extinktion der Überstände wurde nach 1 min Schütteln bei 300 rpm mittels *ELISA-Reader* bei 450 nm Wellenlänge und 650 nm Referenzwellenlänge bestimmt. Die Daten wurden wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben ausgewertet.

### 2.2.7.3 Migrationsassay in der Boyden-Kammer

Mit Hilfe des Boyden-Kammer Migrationsassays kann die aktive Migration von Zellen in Richtung eines Chemotaxins untersucht werden. Die im *Human Cytokine ELISA* identifizierten Faktoren VEGF, IL-8 und bFGF sollten hierbei als Chemotaxine dienen, um ihre Wirkung auf die Migration von Endothelzellen zu analysieren. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf Hungermedium umgestellt. Hierfür wurde das alte Medium in der Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen einmal mit DPBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen,

und schließlich eine entsprechende Menge Hungermedium zugegeben. Die Membran, durch welche die Zellen aktiv migrieren, wurde mit Matrigel 1:10 in DPBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am Versuchstag wurden die Zellen wie in Abschnitt 0 beschrieben für den Versuch vorbereitet und auf eine Konzentration von  $6 \times 10^5$  Zellen/ml in Hungermedium eingestellt. Die Boyden-Kammer wurde in den unteren Wells mit 29 µl des entsprechenden Lockstoffes befüllt:

**VEGF:** 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml

**IL-8:** 1 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml

**bFGF:** 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml

**Hungermedium** als Negativkontrolle

Anschließend wurde die Membran mit der glänzenden Seite auf den befüllten unteren Kammerteil aufgelegt, der Dichtungsring und der obere Kammerteil ergänzt und mit Schrauben fixiert. Die oberen Wells wurden mit jeweils 50 µl der Zellsuspension luftblasenfrei befüllt. Die Boyden-Kammer wurde bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit für 16 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde der obere Teil entleert, die Kammer auseinandergebaut und die Membran mit der glänzenden Seite nach oben, auf der die migrierten Zellen adhären, kurz durch Puffer nach Weise gezogen. Die Rückseite wurde zweimal über einen Küchenschaber gezogen um nicht migrierte Zellen zu entfernen. Die Membran wurde kurz trocknen gelassen und anschließend die Zellen für 1 min in Methanol absolut fixiert. Nach Trocknung wurden die Zellen mittels *Hemacolor Rapid Staining Kit* der Firma Merck gefärbt: die Membran wurde zunächst dreimal durch die rot-orange Lösung (*Solution 2*), dann sechsmal durch die blaue Lösung (*Solution 3*) gezogen. Nach Waschen in Puffer nach Weise, bis keine Farbschlieren mehr auftraten, wurden die Membranen getrocknet. Sie wurden anschließend auf Objektträger überführt, mit Puffer nach Weise glatt gestrichen und mit Immersionsöl bedeckt. Ein passendes Deckgläschen wurde aufgelegt, die Luftblasen entfernt und das Deckglas mit durchsichtigem Nagellack fixiert. Nach Trocknen konnte mittels eines Filtertemplates die Wells auf dem Objektträger markiert und die migrierten Zellen ausgezählt werden. Je Well einer Boyden-Kammer wurden 4 Fotos aufgenommen und in Photoshop zu einem Bild zusammengefügt (*Photomerge*). Die gewanderten Zellen pro Well wurden mit dem *Cell Counter* Plugin für Fiji (ImageJ) gezählt. Jede Konzentration wurde in Vierfach-Ansätzen pro Versuch eingesetzt und die Versuche min-

destens dreimal unabhängig durchgeführt. Die Daten wurden wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben ausgewertet.

## 2.2.8 Analyse der Angiogenese *in vitro*

### 2.2.8.1 Tube Formation Assay

Um Aussagen treffen zu können, in wie weit die ermittelten Wachstumsfaktoren und Zytokine Einfluss auf die Angiogenese nehmen, wurden *in vitro* Tube Formation Assays mit HDMEC durchgeführt. Für den Assay wurden *Angiogenesis  $\mu$ -Slides* der Firma ibidi verwendet. In die inneren Wells wurden 15  $\mu$ l Matrigel pipettiert und die  $\mu$ -Slides für 1 h bei 4 °C inkubiert. Dies diente dazu, das Matrigel flüssig zu halten, sodass es in den Wells eine glatte Oberfläche bildete. Anschließend wurden die  $\mu$ -Slides zum Polymerisieren des Matrigels über Nacht bei 37 °C gelagert. Je Well wurden HDMEC in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/ 50  $\mu$ l Hungermedium ausgesät. Nach 1 h Adhäsionszeit erfolgte ein Mediumwechsel und die Behandlung mit den zu testenden Konzentrationen:

**VEGF:** 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml

**IL-8:** 1 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml

**bFGF:** 1  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml, 3  $\mu$ g/ml, 4  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml

Zusätzlich wurde Hungermedium als Negativkontrolle mitgeführt. Nach 6 h Inkubationszeit bei 37 °C im Zellkultur-Inkubator wurden die Zellen mit Calcein-AM (Endkonzentration 20  $\mu$ g/ml) fluoreszent gefärbt. Der Vitalfarbstoff wird in die Zellen aufgenommen, die dort die Acetoxymethyl-Gruppe abspalten. Das übrig bleibende Calcein fluoresziert grün (Anregung bei 494 nm). Am Mikroskop wurde mittig in den Wells je ein Foto aufgenommen. Die Bilder wurden von der Firma Wimasis auf Länge, Dichte und Anzahl an Verzweigungspunkten der *Tubes* ausgewertet. Jede Konzentration wurde pro Versuch im Triplet getestet und mindestens drei unabhängige Versuchsdurchgänge realisiert. Die erhobenen Daten wurden gemittelt und zur unbehandelten Kontrolle in Relation gesetzt. Die Daten wurden wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben ausgewertet.

### 2.2.8.2 Auswirkungen der ermittelten Faktoren auf die Prävasikularisierung im Schleimhaut-Äquivalent

Zur Analyse der Auswirkungen der Faktoren VEGF und IL-8 auf die Prävasikularisierung des Schleimhaut-Äquivalents wurden Kokulturen aus HDMEC der Vorhaut und Fibroblasten auf Bio-Gide®-Membranen angesetzt und mit den folgenden Zusätzen im Medium behandelt:

- I: 100 ng/ml VEGF
- II: 250 ng/ml IL-8
- III: 500 ng/ml IL-8
- IV: 100 ng/ml VEGF + 250 ng/ml IL-8
- V: 100 ng/ml VEGF + 500 ng/ml IL-8
- VI: Kontrolle, unverändertes HDMEC Medium

Für jeden Ansatz wurden drei Kokulturen angesetzt, wovon jeweils eine nach 7, 14 bzw. 21 Tagen beendet und konfokalmikroskopisch analysiert wurde, wie unter 2.2.4.1 beschrieben.

## 2.2.9 Analyse der Anastomose der Schleimhaut-Äquivalente *in vivo*

### 2.2.9.1 Mausmodell

Zur Analyse der Anastomose *in vivo* wurden in Kokultur besiedelte Schleimhaut-Äquivalente subkutan in den Rücken von männlichen Nacktmäusen (CD-1 Nude) transplantiert. Dabei wurden Kokulturen mit HDMEC und Fibroblasten generiert. Die Studie wurde genehmigt durch das *Committee on the USE of Live Animals in Teaching and Research* des Landes Rheinland-Pfalz (Ethikantrag: #G 13-1-091). Die Mäuse standen während der gesamten Prozedur unter Betäubung mit Ketamin (61,5 mg/kg Körpergewicht i.p.) und Xylazin (2,3 mg/kg Körpergewicht i.p.). Die Schleimhaut-Äquivalente wurden wie oben beschrieben über 21 Tage kultiviert. Sie wurden dann subkutan in zwei vorbereitete Taschen auf dem Rücken der Mäuse je rechts und links unterhalb des Schulterblattes gelegt und zur Befestigung an der Faszie vernäht. Die zellokklusive Seite wurde dabei nach unten orientiert. Nach 5 bzw. 10 Tagen wurden die Gewebe-Äquivalente entnommen und in 4 % PFA für 24 h fixiert. Anschließend wurden sie immunhistochemisch analysiert wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben.

### 2.2.9.2 CAM-Assay

Zur weiteren Analyse der Anbindung der *in vitro* generierten ko- sowie trikultivierten Schleimhaut-Äquivalente *in vivo* wurden CAM-Assays durchgeführt. Hier sollte zudem überprüft werden, ob das *in vitro* generierte Epithel ausreichend versorgt wird durch die gefäß-ähnlichen Strukturen im Äquivalent. Im Assay wird die Chorioallantoismembran (CAM) von befruchteten und sich entwickelnden Hühnereiern verwendet, die das respiratorische System des Embryos darstellt und ihn mit Sauerstoff sowie Nährstoffen versorgt. Die CAM entsteht durch Fusion des Chorions und der Allantois im sich entwickelnden Ei und ist stark vaskularisiert (Deryugina & Quigley, 2008, Wilting et al., 1991). Die befruchteten Eier wurden von der Firma LSL Rhein-Main Hühnervermehrungsbetrieb erworben. Sie wurden vor Versuchsbeginn im Flächenbrüter bei 38,3 °C für drei Tage bebrütet. An Tag 3 wurden die Eier mit Leukosilk Klebeband an ihrer Oberseite sowie am Eipol abgeklebt, anschließend wurde mittels steriler Kanüle und Spritze ein Loch möglichst nah am Eipol eingefügt und 5-8 ml Eiweiß abgezogen, ohne den Eidotter oder den Embryo zu verletzen. An der abgeklebten Oberseite wurde nun mit einer sterilen Schere ein 2-3 cm großes Loch in das Ei geschnitten. Durch dieses wurde zunächst geprüft, ob sich ein Embryo entwickelt hat. Die besiedelten Ko- und Trikulturen wurden dann direkt auf die CAM aufgelegt, optimalerweise auf einen Verzweigungspunkt größerer und kleinerer Gefäßen. Die Eier mit den aufgelegten Gewebe-Äquivalenten wurden mit Parafilm abgedeckt und weiter für 5 Tage bei den genannten Bedingungen bebrütet. An Tag 5 wurde die Membran inklusive etwas CAM außen herum entnommen und zur Fixierung über Nacht in 4 % PFA eingelegt. Zur Analyse der Anastomose wurden die Membranen immunhistochemisch untersucht, wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben.

### 2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Analysen wurde in Microsoft Excel 2013 sowie SPSS Statistics 23 durchgeführt. Es wurden für alle Experimente mit  $n > 10$  jeweils der Median und der Mittelwert berechnet. Bei einer Abweichung von weniger als 10 % beider konnte von einer Gaußverteilung ausgegangen werden, sodass der Mittelwert zur Darstellung der Ergebnisse verwendet wurde. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =

$p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). Lag die Abweichung über 10 % wurde der Median dargestellt. In diesem Fall wurde zur Berechnung der Signifikanz der Wilcoxon-Test herangezogen. Auch hier wurden signifikante Unterschiede zur Kontrolle mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). Bei Experimenten mit  $n < 10$  wurde der Mittelwert dargestellt. Hier wurde der T-Test analog zur Signifikanzberechnung herangezogen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung und Optimierung der Isolation primärer Zellen

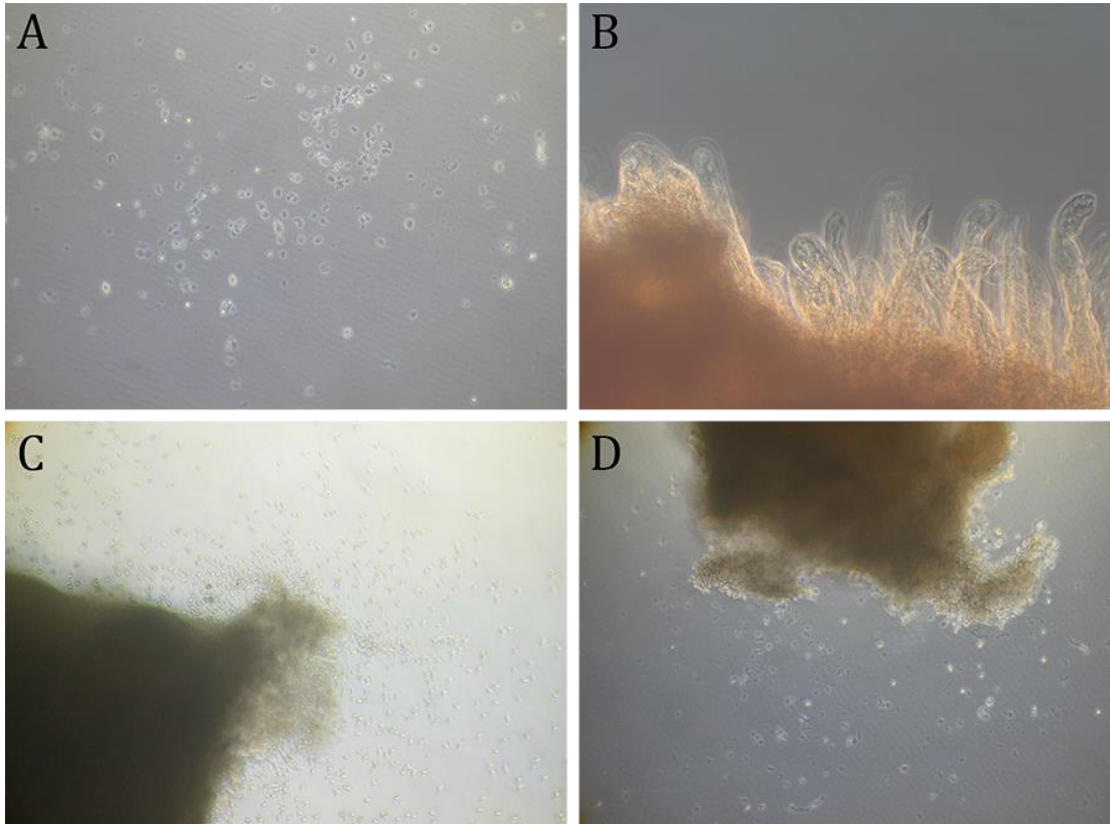
Für den späteren klinischen Einsatz eines *in vitro* generierten Schleimhaut-Äquivalents ist es essentiell, aus patienteneigenen Proben erfolgreich und zuverlässig primäre Zellen isolieren zu können. Das angestrebte Schleimhaut-Äquivalent basiert auf einer Trikultur aus Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Die ersten beiden Zelltypen wurden aus oraler Mucosa gewonnen. Für die Isolation endothelialer Zellen sind verschiedene Gewebe im Vergleich getestet worden.

#### 3.1.1 Etablierung und Optimierung der Isolation von Epithelzellen aus oraler Mucosa

Zur Etablierung einer geeigneten Methode der Epithelzellisolation aus humaner Mundschleimhaut wurden verschiedene beschriebene Methoden miteinander verglichen [193, 195, 196]. Der Fokus lag dabei auf rein enzymatischen Protokollen sowie auf einem rein mechanischen, im Vergleich mit dem bislang in der AG Brenner angewandten enzymatisch-mechanischen Standard [26].

Bei enzymatischer Präparation der Mundschleimhaut konnte keine zuverlässige Einzellsuspension generiert werden. Dies war unabhängig vom verwendeten Enzym (Trypsin-EDTA, Dispase II oder Kollagenase II). Nur sehr selten adhärirten wenige Zellen in den Kulturflaschen (Abbildung 7A). Diese starben in den meisten Fällen sehr schnell ab und waren nicht kultivierbar. In wenigen Fällen traten nach einigen Tagen Kultivierung Fibroblasten in der Kultur auf, welche die Flaschen überwucherten. Es konnte somit durch enzymatische Protokolle kein vitaler Monolayer an primären Epithelzellen erzielt werden. Des Weiteren zeigten enzymatisch vorbehandelte Gewebestücke kein Auswachsen von Epithelzellen (Abbildung 7B, D). Bei Einsatz von Trypsin-EDTA (Protokoll (1), siehe Seite 40) oder Dispase II (Protokoll (2), siehe Seite 40) waren die Gewebestücke nach Verdau sehr schwierig händelbar, da sie klebrig und schleimig waren und sich schlecht weiter präparieren ließen. Dies gestaltete sich nach Kollagenase II-Behandlung (Protokoll (3), siehe Seite 40) einfacher, die Gewebe waren hier nicht so stark angedaut. Jedoch führte auch dieses enzymatische Protokoll nicht zum Auswachsen von Epithelzellen und daher nicht zu einer Epithelzellkultur. Ein öfter auftretendes Phänomen war das kurzzeitige Auftauchen von

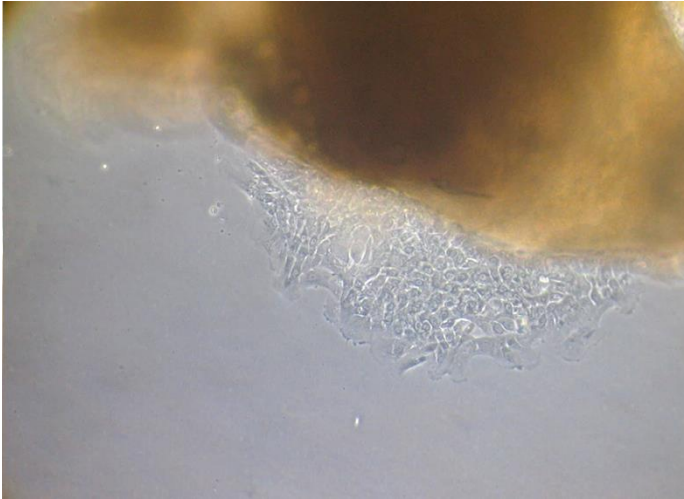
kleinen, runden, nicht charakterisierten Zellen, die direkt nach Ausbringen der Gewebestücke in den Wells auftraten (Abbildung 7 C, D). Diese waren nicht weiter kultivierbar und starben innerhalb weniger Tage ab. Zum Teil sah es aus, als würden sie aus den Gewebestücken auswachsen, jedoch war dies zeitlich sehr begrenzt und auch hier blieben die Zellen nicht vital.



**Abbildung 7 - Exemplarische Darstellung enzymatisch behandelte Mundschleimhaut-Proben.** Abgebildet sind Mundschleimhaut-Proben, die zur Isolation von Epithelzellen enzymatisch nach Protokoll (2), Behandlung mit Dispase II (A, B) bzw. Protokoll (1), Behandlung mit Trypsin-EDTA (C, D) präpariert wurden. Diese Ergebnisse zeigten sich jedoch vergleichbar bei allen rein enzymatischen Protokollen. A: Erzielte Einzelzellsuspensionen starben sehr schnell ab. B: Nach enzymatischer Behandlung zeigten die Gewebestücke kein Auswachsen von Epithelzellen. C & D: In wenigen Fällen konnten kleine, runde Zellen beobachtet werden, die direkt nach Ausbringen der Gewebestücke in den Wells auftraten, jedoch sehr schnell abstarben.

Die mechanische Trennung von Binde- und Epithelgewebe reduzierte das Auswachsen von Fibroblasten deutlich. Eine rein mechanische Isolationsmethode nach Protokoll (5) (siehe Seite 41) führte in ca. 55 % der Mundschleimhaut-Biopsien zu einem Auswachsen von Epithelzellen (Abbildung 8), wobei dieses frühestens nach drei Tagen auftrat. Eine ähnliche Erfolgsquote konnte durch das bisherige, enzymatisch-mechanische Standardprotokoll (4) (siehe Seite 41) des Labors der Arbeitsgruppe Brenner erzielt werden [26]. Es konnte somit

gezeigt werden, dass eine enzymatische Behandlung der Mundschleimhaut-Proben zur Erzielung einer vitalen Epithelzellkultur nicht notwendig war.



**Abbildung 8 - Exemplarische Darstellung einer Mundschleimhaut-Probe, die dem rein mechanischen Isolationsprotokoll (5) unterzogen wurde.** Von den so behandelten Mundschleimhaut-Proben trat in 55 % ein Auswachsen von Epithelzellen nach frühestens drei Tagen auf.

Zur weiteren Optimierung der Isolationsmethode nach Protokoll (5) wurden verschiedene Medienzusätze in ihrer Konzentration variiert, um die Auswirkungen dieser auf das Auswachsen von Epithelzellen und dessen Geschwindigkeit zu analysieren (Tabelle 8). Eine Erhöhung von Adenin auf das 1,5- bzw. 2-fache führte zu einer Reduktion des Auswachsens von Epithelzellen auf ca. 20 %. Bei Veränderung der EGF-Konzentration auf das 1,7- bzw. 2-fache konnten keine Auswirkungen beobachtet werden. Bei Erhöhung der Insulinkonzentration im Medium um bereits 18 % konnte das Auswachsen von Epithelzellen zuverlässig in 100 % der Gewebeproben erzielt werden. Zudem wurde die Auswachs-Geschwindigkeit deutlich erhöht, ein Auswachsen konnte bereits nach einem Tag beobachtet werden (Abbildung 9A). Im Durchschnitt trat im veränderten FAD-Medium II Epithelzellauswuchs nach ein bis drei Tagen auf (Abbildung 9A, B). Nach sieben bis zwölf Tagen waren die Epithelzellen im 6-Well zu einem Monolayer ausgewachsen (Abbildung 9C), was im optimierten FAD-Medium II ebenfalls beschleunigt war (nicht dargestellt). Die Zellen zeigten sich im optimierten FAD-Medium II sehr vital und proliferativ sowie gut kultivier- und passagierbar, Passagen bis hin zu 8 waren ohne Probleme möglich (Abbildung 9D).

Tabelle 8 - Variationen in der Konzentration der Medienzusätze im FAD-Medium und ihre Auswirkungen auf das Auswuchsverhalten von Epithelzellen aus Mundschleimhaut-Biopsien

Zusatz	Adenin		EGF		Insulin	
Konzentration	33 µg/ml (+50%)	44 µg/ml (+100%)	15,3 µg/ml (+70%)	18 µg/ml (+100%)	5,4 µg/ml (+18%)	6,8 µg/ml (+47%)
Änderung im Auswachsen	↓	↓	-	-	↑	↑

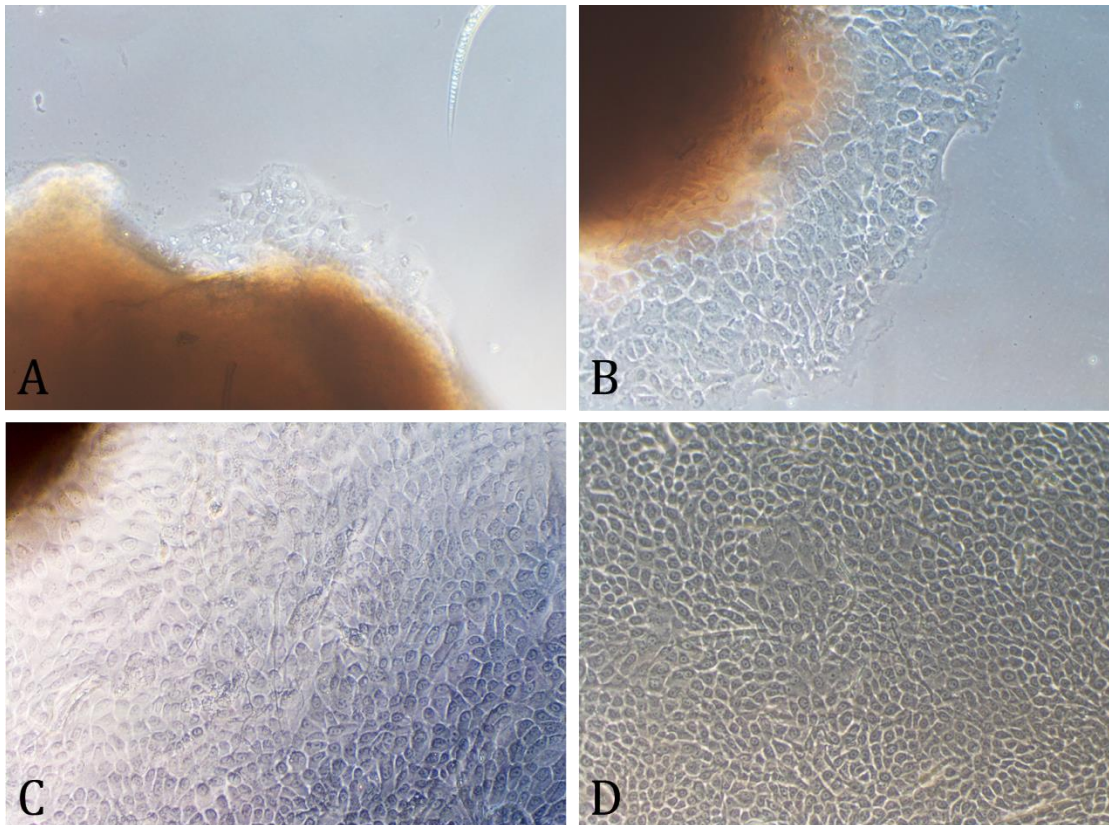


Abbildung 9 - Exemplarische Darstellung von Mundschleimhaut-Proben, die dem rein mechanischen Isolationsprotokoll (5) unterzogen und in optimiertem FAD-Medium II kultiviert wurden. A & B: Bei Kultivierung in optimiertem FAD-Medium II zeigte sich ein Auswuchs an Epithelzellen durchschnittlich nach 1 bis 3 Tagen (A respektive B), wobei dieser zuverlässig in 100 % der Proben beobachtet werden konnte. C: Nach 7 bis 12 Tagen waren die Epithelzellen im 6-Well zu einem Monolayer ausgewachsen. D: Die Zellen waren im optimierten FAD-Medium II sehr vital und proliferativ sowie gut kultivier- und passagier-bar.

### 3.1.1.1 Immunhistochemische Charakterisierung der aus Mundschleimhaut isolierten Epithelzellen

Um den epithelialen Ursprung der aus Mundschleimhaut isolierten Zellen zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen verschiedener epithelialer wie auch fibroblastärer Marker durchgeführt. Die isolierten Zellen waren durchgehend positiv für Zytokeratin 13 (Abbildung 10A), zu ca. 95 % positiv für Zytokeratin 8/18 (Abbildung 10B) und zu ca. 98 % positiv für Zytokeratin 19 (Abbildung 10C). Alle Zellen waren negativ für Involucrin (Abbildung 10D), FGFR4 (Abbildung 11A) sowie SMA (Abbildung 11B).

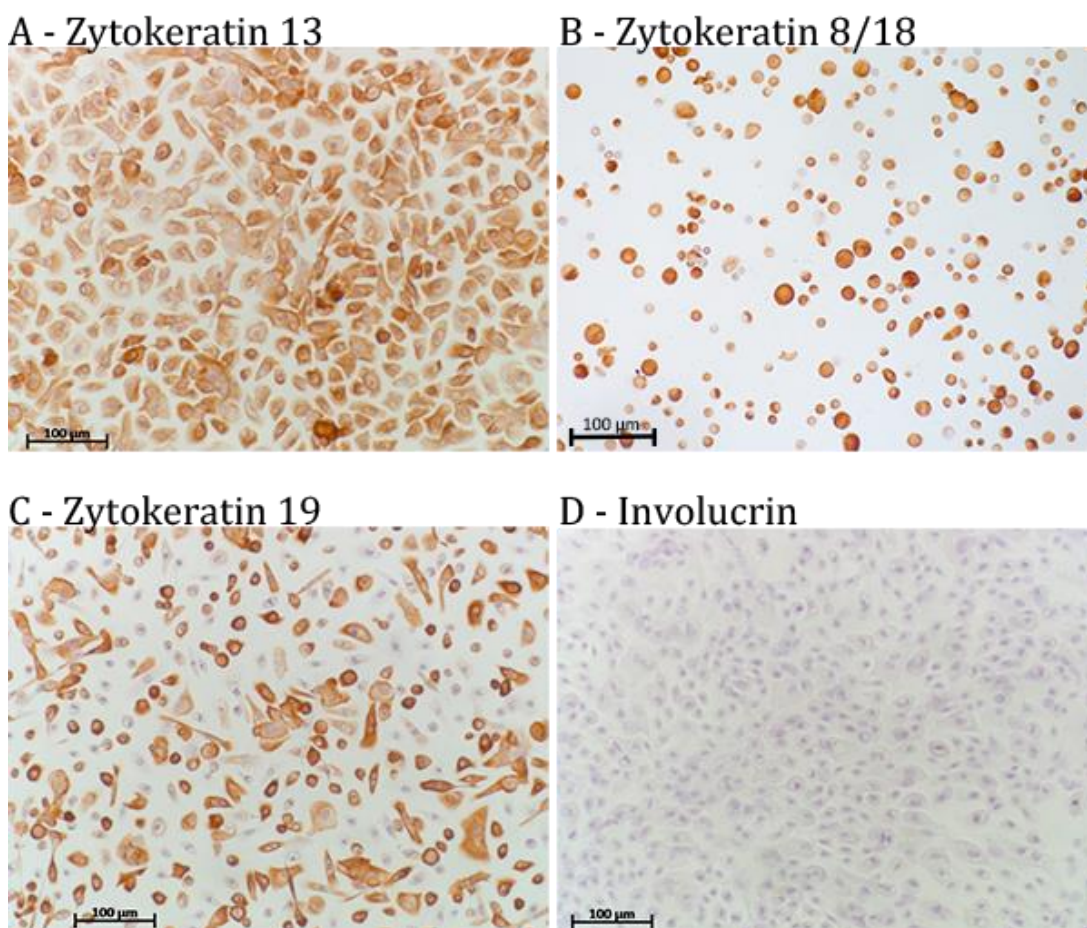
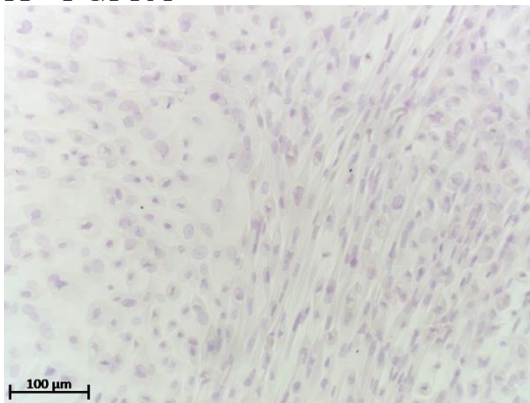


Abbildung 10 - Immunhistochemische Analyse verschiedener epithelialer Marker zur Charakterisierung der isolierten Zellen. Nachgewiesen wurde die Expression der epithelialen Marker Zytokeratin 13 (A), 8/18 (B) und 19 (C). Der epitheliale terminale Marker Involucrin zeigte sich negativ (D).

A - FGFR4



B -  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin

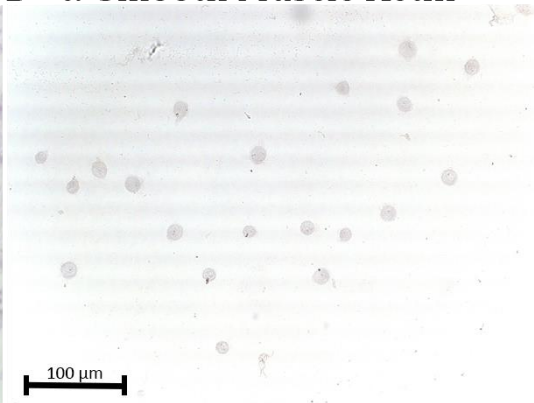


Abbildung 11 - Immunhistochemische Analyse fibroblastärer Marker zur Charakterisierung der isolierten Zellen. Eine Expression der fibroblastären Marker FGFR4 (A) und  $\alpha$ -smooth muscle actin (B) konnte nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Etablierung und Optimierung der Isolation von Fibroblasten aus oraler Mucosa

Primäre Fibroblasten waren sehr einfach isolierbar aus dem mechanisch abpräparierten Bindegewebe nach Protokoll (5). Aus allen Mundschleimhaut-Proben konnten parallel Bindegewebsstücke gewonnen werden, aus denen längliche Zellen auswuchsen (Abbildung 12A). Während der weiteren Kultivierung konnten sie morphologisch gut von anderen Zelltypen unterschieden werden. Sie zeigten eine spindelförmige Wuchsform, die bei zunehmender Konfluenz gebürstet erschien (Abbildung 12B), und waren immunhistochemisch positiv für SMA (Abbildung 13D). Sie zeigten sich zudem negativ für die epithelialen Marker Zytokeratin 8/18, 13 und 19 (Abbildung 13B, C, D) wie den endothelialen Marker CD31 (Abbildung 13E).

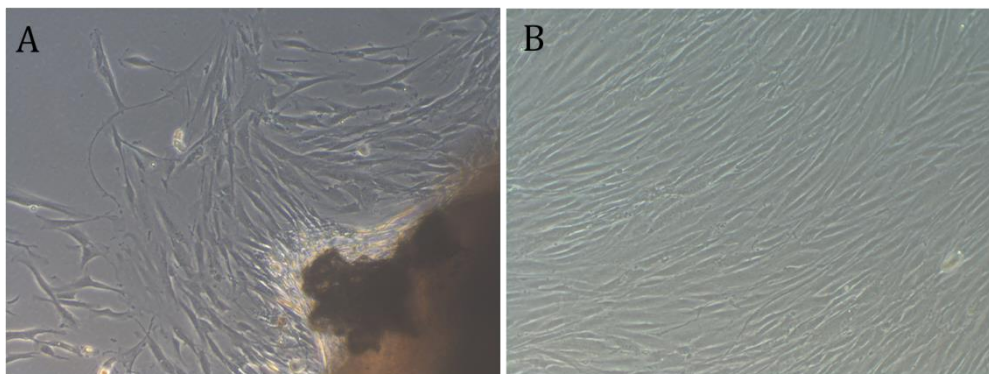
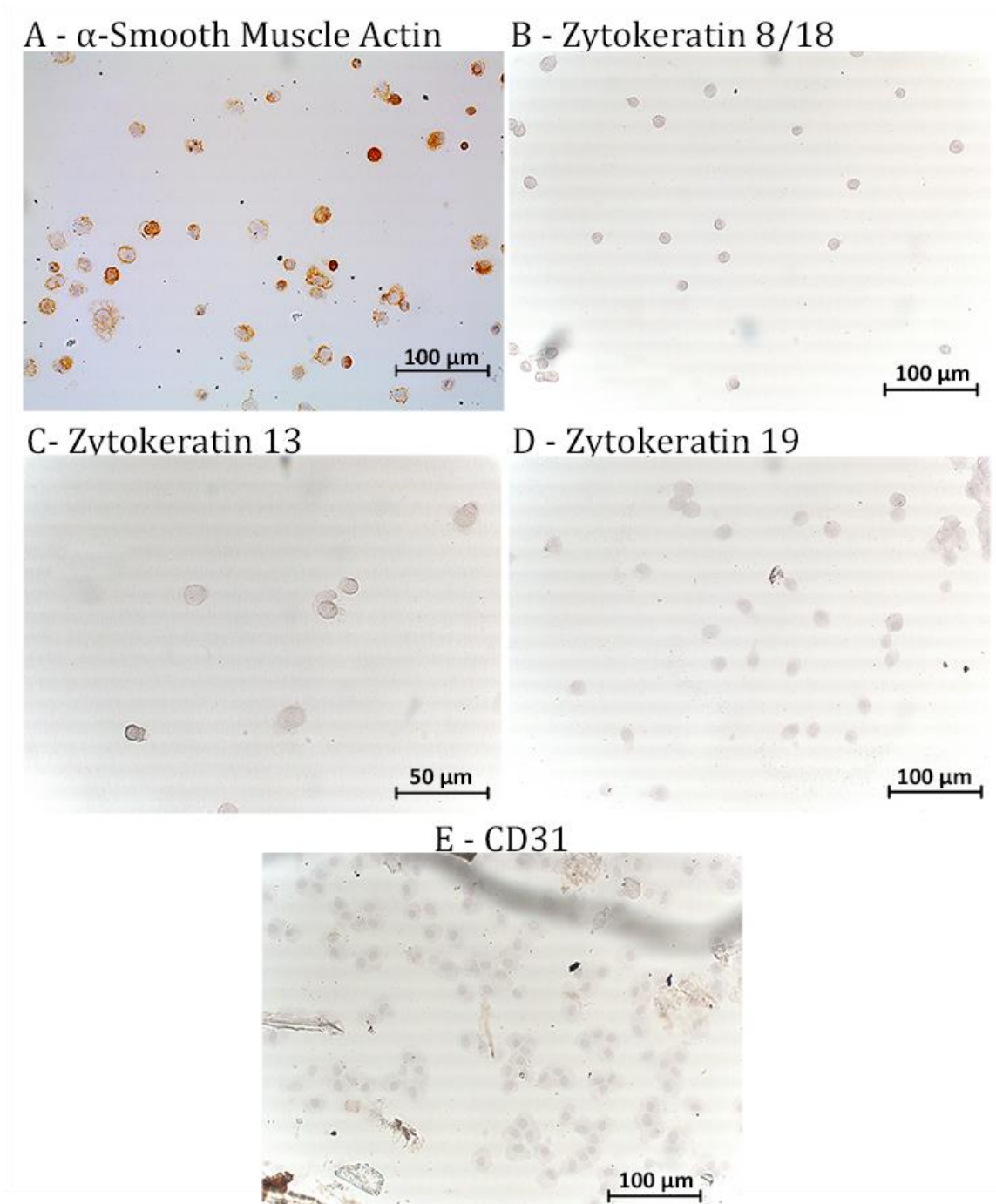


Abbildung 12 - Exemplarische Darstellung der Isolation und Charakterisierung von aus Mundschleimhaut isolierten Fibroblasten. **A:** Aus den abpräparierten Bindegewebsstücken konnten Fibroblasten isoliert werden. Diese zeigten schon bei Auswachsen eine charakteristische längliche Morphologie. **B:** Die ausgewachsenen Fibroblasten konnten auch in der weiteren Kultur morphologisch deutlich von anderen Zelltypen unterschieden werden. Sie zeigten eine spindelförmige Wuchsform, die bei Konfluenz gebürstet erschien.

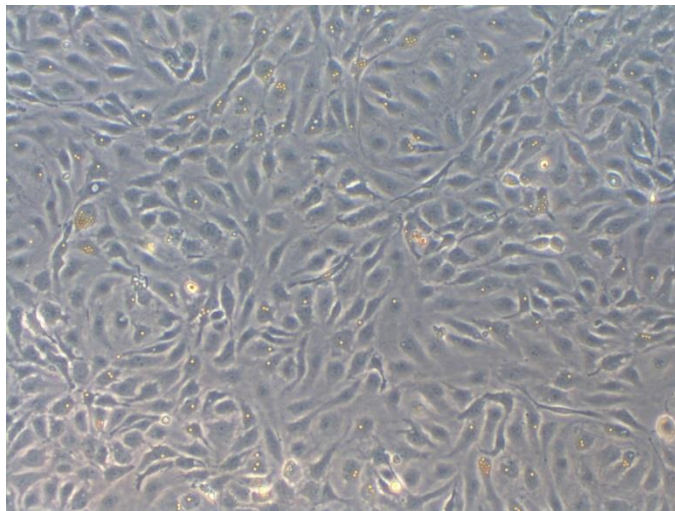


**Abbildung 13 – Immunhistochemische Analyse fibroblastärer, epithelialer und endothelialer Marker zur Charakterisierung der isolierten Zellen.** Die Zellen waren positiv für den fibroblastären Marker  *$\alpha$ -smooth muscle actin* (A) sowie negativ für die epithelialen Marker Zytokeratin 8/18 (B), Zytokeratin 13 (C), Zytokeratin 19 (D) und den endothelialen Marker CD31 (E).

### 3.1.3 Etablierung und Optimierung der Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen

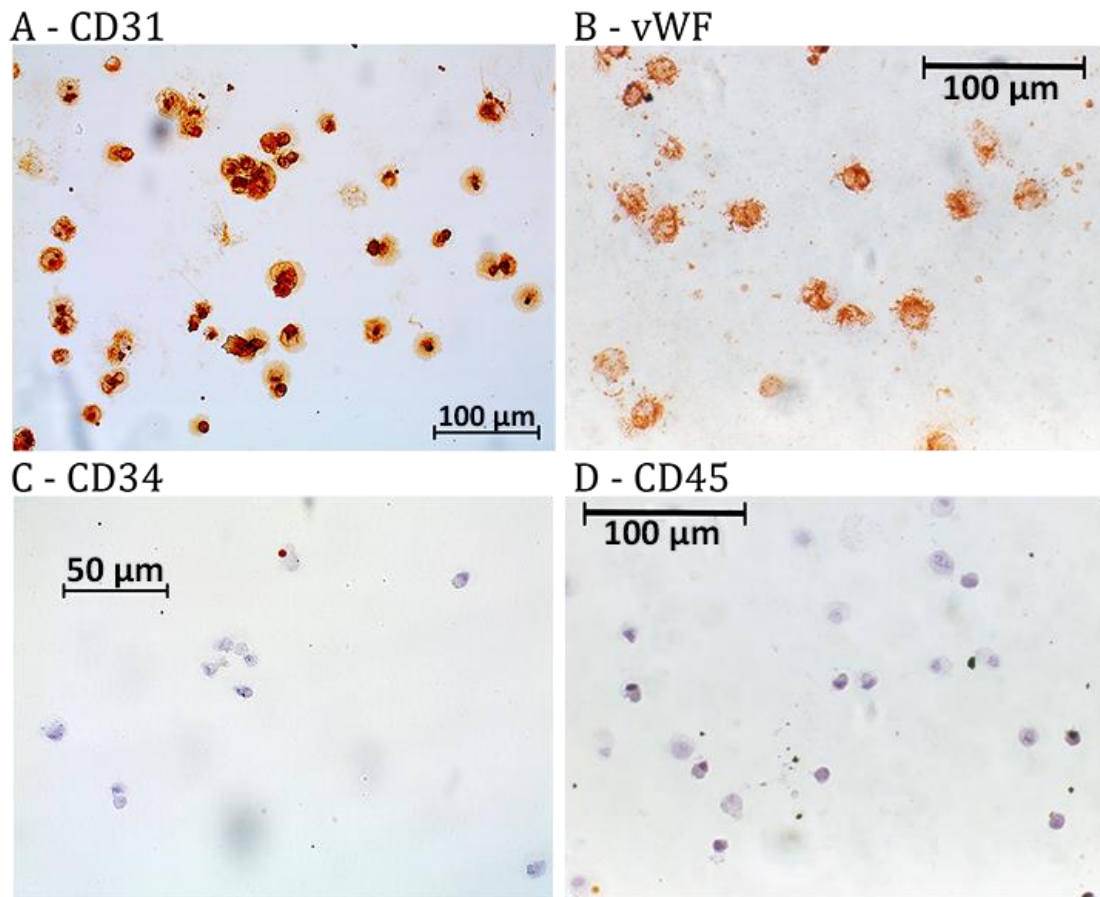
#### 3.1.3.1 Isolation aus Präputium

Zur Isolation humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus Präputium wurde auf der etablierten Methode der Arbeitsgruppe Unger [190] in Kombination mit einem laborinternen Protokoll aufgebaut. Ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase II eignete sich dabei besser, hier konnten in allen Fällen Endothelzellen isoliert werden. Bei Verwendung von Trypsin konnte nicht immer eine vitale Einzelzellsuspension erzielt werden. Durch Kollagenase II-Behandlung wurde eine vitale Mischkultur erzielt, wobei die Zellen nach 5-7 Tagen zu 80-90 % konfluent gewachsen waren. Endothelzellen und Fibroblasten waren visuell deutlich voneinander zu unterscheiden. Fibroblasten zeigten eine Wuchsform wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.1.2), die Endothelzellen wiesen eine charakteristische pflastersteinartige Morphologie auf (Abbildung 14).



**Abbildung 14 - Charakteristische Wuchsform von Endothelzellen in Monokultur.** In Monokultur zeigen Endothelzellen eine pflastersteinartige Morphologie. An den Zellen sind als kleine, helle Kügelchen die magnetischen Beads zu erkennen, welche mit CD31-Antikörper gekoppelt sind.

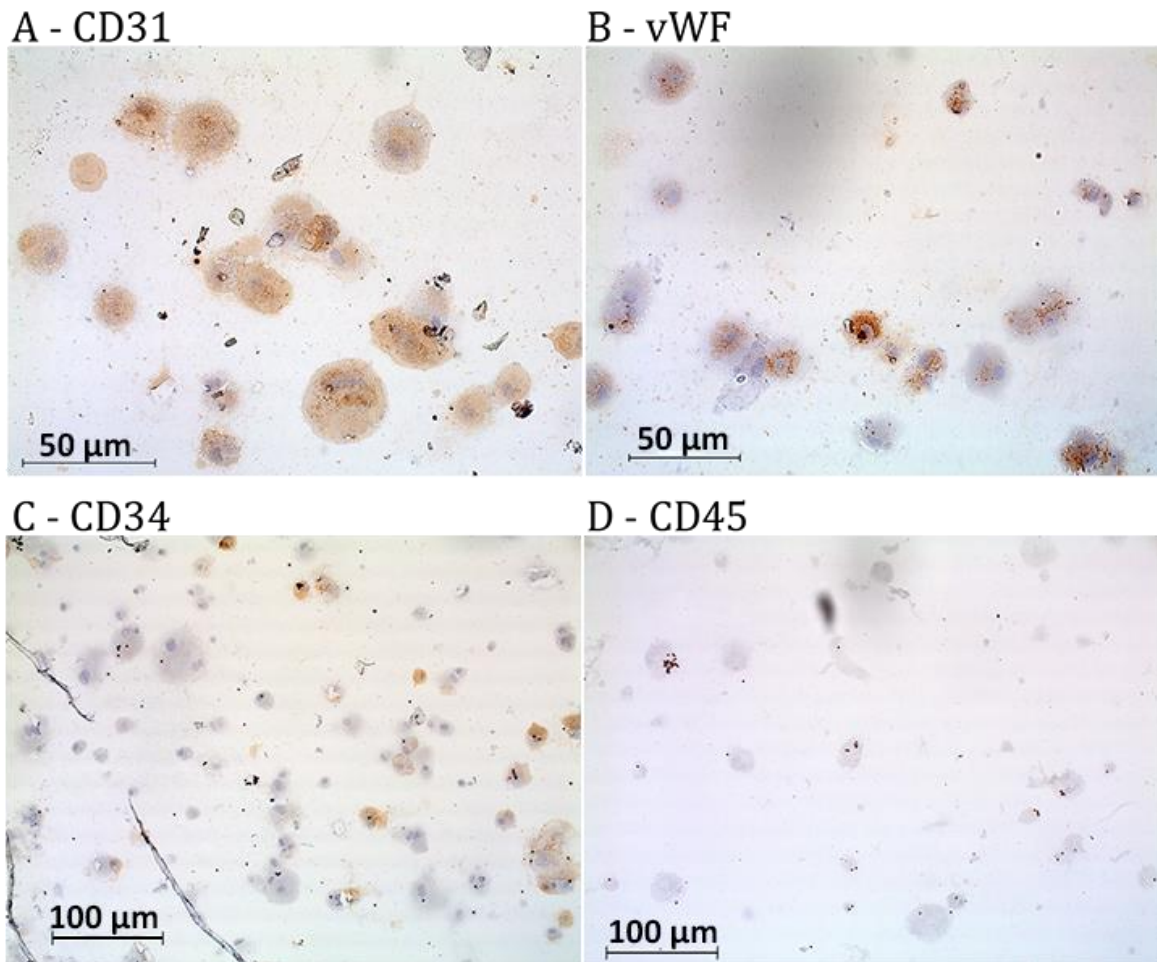
Mittels magnetischer Beads, die mit Antikörpern gegen CD31 gekoppelt sind, konnten über ein bis zwei Trennungsschritte die Endothelzellen zuverlässig aus der Mischkultur isoliert und kultiviert werden. Die isolierten Endothelzellen waren bei immunhistochemischer Analyse durchgehend positiv für CD31 (Abbildung 15A) sowie vWF (Abbildung 15B) und negativ für CD34 (Abbildung 15C) und CD45 (Abbildung 15D). Sie waren zudem negativ für die fibroblastären Marker SMA und FGFR4 sowie die epithelialen Marker Zytokeratin 8/18, 13 und 19 (nicht dargestellt).



**Abbildung 15 – Immunhistochemische Analyse verschiedener zellulärer Marker, um die aus Präputium isolierten Zellen zu charakterisieren.** Die als Endothelzellen isolierten Zellen wurden nach magnetischer Selektionierung immunhistochemisch analysiert. Die endothelialen Marker CD31 (A) und vWF (B) waren positiv. CD34 (C) als Marker endothelialer Vorläuferzellen und CD45 (D) als Leukozyten-Marker konnten nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.3.2 Isolation aus Vulva-Haut

Zur Isolation humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus Vulva-Haut (vHDMEC) wurde analog vorgegangen wie zur Isolation aus Präputium. Auch hier führte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase II durchgehend zu besseren Ergebnissen. Die Zellen waren bei immunhistochemischer Analyse durchgehend positiv für CD31 (Abbildung 16A) und zu ca. 90 % positiv für vWF (Abbildung 16B). Für CD34 waren ca. 20 % der Zellen positiv (Abbildung 16C), für CD45 alle Zellen negativ (Abbildung 16D). Die Analysen der epithelialen Marker Zytokeratin 8/18 und 13 sowie der fibroblastären Marker FGFR4 und SMA waren durchgehend negativ (nicht dargestellt).



**Abbildung 16 - Immunhistochemische Analyse verschiedener zellulärer Marker, um die aus Vulva-Haut isolierten Zellen zu charakterisieren.** Die isolierten Zellen wurden nach magnetischer CD31-Selektionierung immunhistochemisch analysiert. Die endothelialen Marker CD31 (A) und vWF (B) waren durchgehend positiv. CD34 (C) war in 20 % der Zellen positiv. CD45 (D) konnte nicht nachgewiesen werden. An den Zellen sind als kleine, helle Kügelchen die magnetischen Beads zu erkennen, welche an CD31-Antikörper gekoppelt sind.

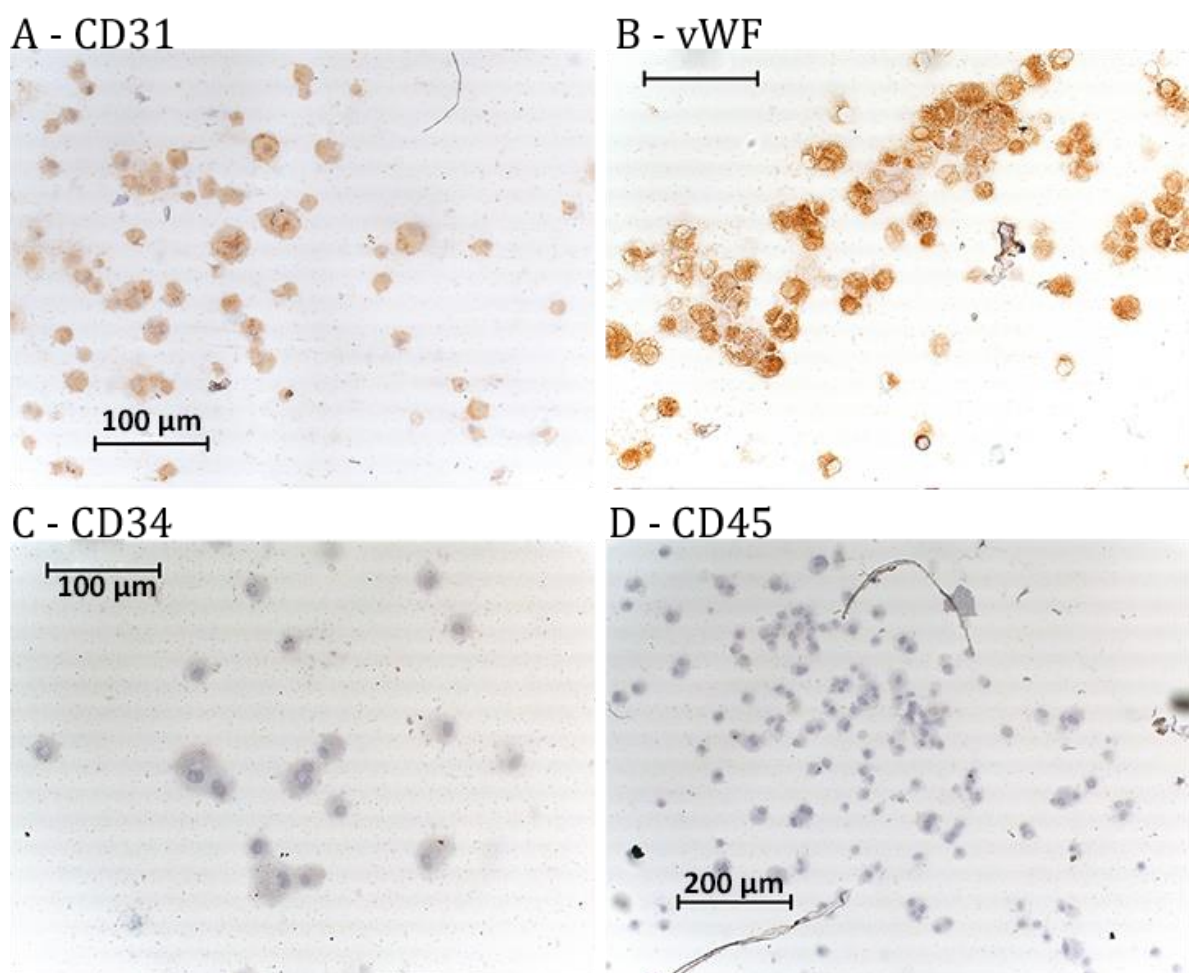
### 3.1.3.3 Isolation aus Haut

Bei der Isolation von Endothelzellen aus Haut (hHDMEC) im Bereich der weiblichen Brust konnte keine reine Endothelzellkultur generiert werden. Auch nach mehrmaliger CD31-MACS-Trennung traten stets Fibroblasten in der Kultur auf, weshalb kein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt wurde. Die Zellen waren morphologisch jedoch deutlich von den Fibroblasten unterscheidbar und zeigten eindeutig endothelialen Charakter. Zudem banden sie die CD31-markierten Beads.

### 3.1.3.4 Isolation endothelialer Vorläuferzellen aus peripherem Blut

Als Alternative zur Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen aus Gewebeproben wurde die Isolation von späten endothelialen Vorläuferzellen (*Endothelial Colony Forming Cells*,

ECFC) aus peripherem Blut freiwilliger Spender ausgetestet. Die Isolationsmethode war in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert [191]. Der Gewinn von ECFC aus Blut zeigte sich dabei spenderabhängig: In 5 von 7 eingesetzten Blutproben konnten ECFC gewonnen werden. Diese waren in immunhistochemischen Analysen durchgehend positiv für die endothelialen Marker CD31 sowie vWF (Abbildung 17A, B). CD34, ein Marker für endotheliale Vorläuferzellen, zeigte sich in den kultivierten Zellen negativ (Abbildung 17C), ebenso der Leukozyten-Marker CD45 (Abbildung 17D). Die Zellen waren zudem negativ für den epithelialen Marker Zytokeratin 13 und den fibroblastären Marker SMA (nicht dargestellt).



**Abbildung 17 - Immunhistochemische Analyse verschiedener zellulärer Marker, um die aus peripherem Blut isolierten Zellen zu charakterisieren.** Die isolierten Zellen waren durchgehend positiv für die endothelialen Marker CD31 (A) und vWF (B). CD34, als Marker endothelialer Vorläuferzellen (C) sowie der Leukozyten-Marker CD4 (D) waren durchgehend negativ.

## 3.2 Etablierung und Optimierung eines *in vitro* Schleimhaut-Äquivalents

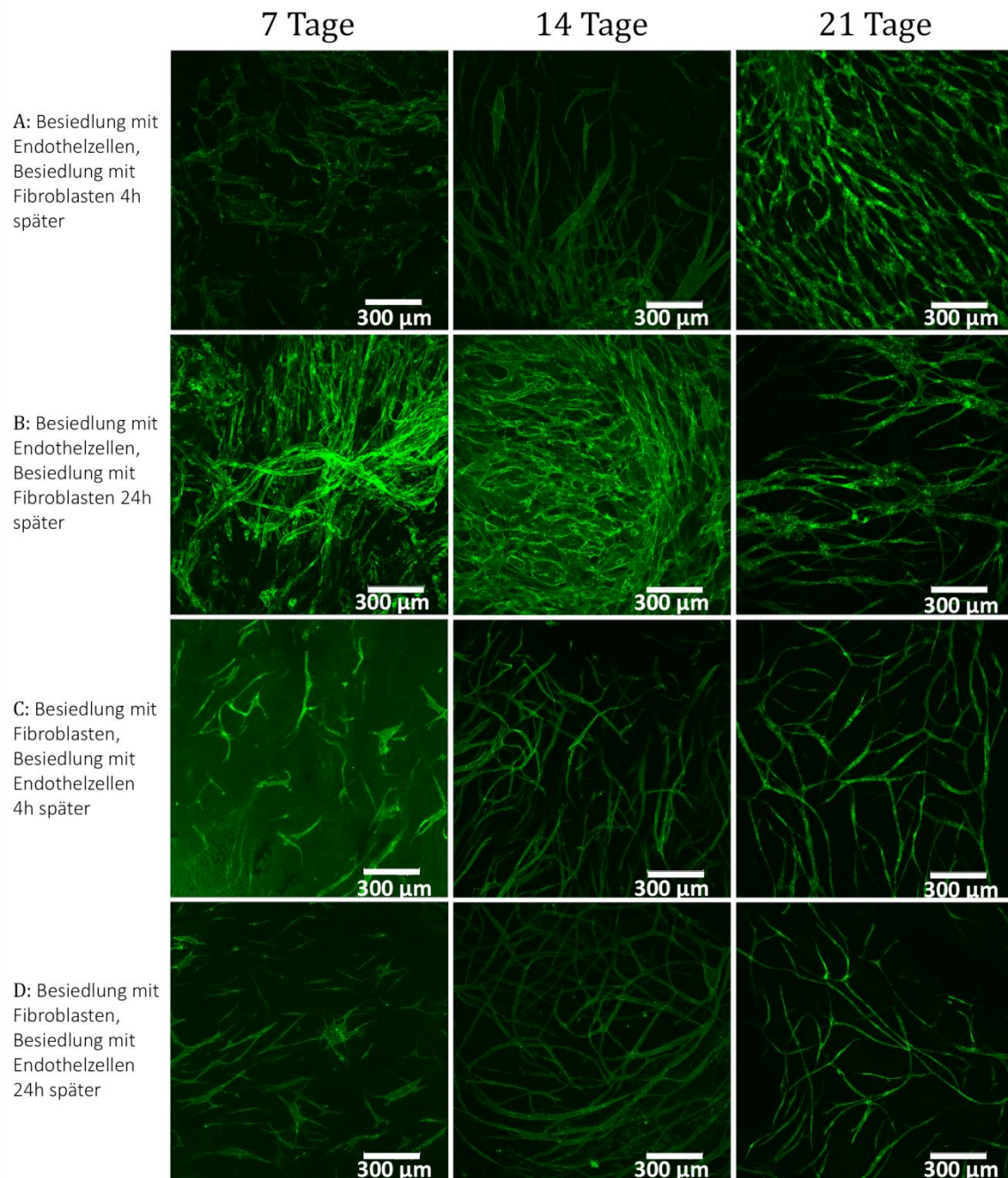
### 3.2.1 Optimierung der Besiedlungsparameter

Zur Generierung prävascularisierter Schleimhaut-Äquivalente in Trikultur müssen die Parameter der Besiedlung an alle beteiligten Zelltypen angepasst werden. In diesem Kontext wurden die Auswirkungen verschiedener Reihenfolgen der Besiedlung sowie verschiedene Kultivierungsmedien analysiert. Desweiteren wurden unterschiedliche Besiedlungsmethoden ausgetestet (Vergleich Kapitel 2.2.5.2), um eine tiefere Invasion der Endothelzellen zu erzielen, welche essentiell für eine durchgehende Prävascularisierung des Konstrukts ist.

#### 3.2.1.1 Optimierung der Besiedlungsreihenfolge

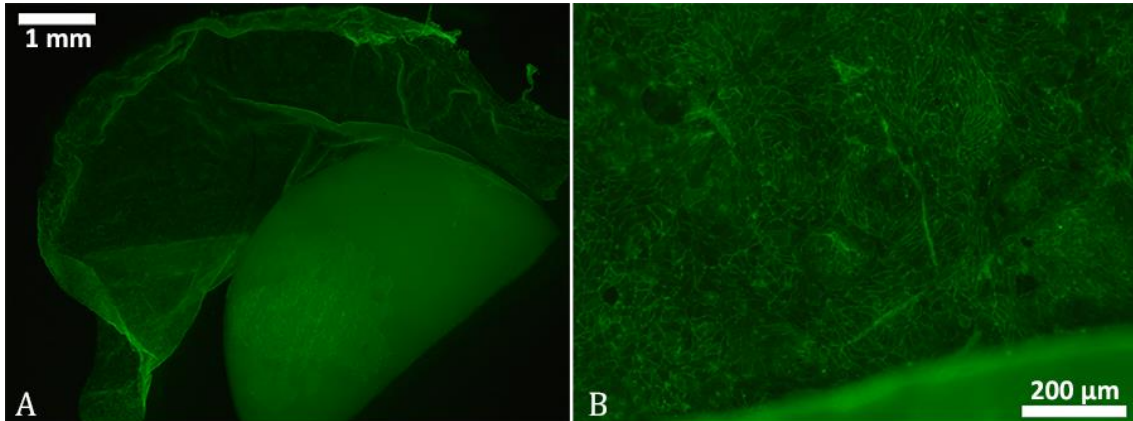
Zur Optimierung der Schleimhaut-Äquivalente wurden zunächst verschiedene Besiedlungsreihenfolgen in Ko- und Trikulturen ausgetestet und auf ihre Prävascularisierung sowie Epithelbildung analysiert (Vergleich Kapitel 2.2.5.1). In Kokultur zeigte sich eine Besiedlung mit Fibroblasten vor den Endothelzellen deutlich vorteilhaft (Abbildung 18C, D). Hier traten bereits nach sieben Tagen Ansätze von gefäßähnlichen Strukturen (*capillary-like structures*, CLS) auf. Diese zeigten sich im Ansatz, in dem Endothelzellen 24 h nach Fibroblasten ausgesät wurden (Abbildung 18 D), verstärkt gegenüber dem 4 h Ansatz (Abbildung 18 C). In den Ansätzen, in denen Endothelzellen vor Fibroblasten ausgesät wurden, zeigte sich im Vergleich ein flächigeres Wachstums der Endothelzellen und eine weniger ausgeprägte Netzwerkstruktur (Abbildung 18 A, B). Für alle folgenden Versuche wurden die Fibroblasten 24 h vor den Endothelzellen auf die Membranen ausgesät.

Im nächsten Schritt wurde die Reihenfolge der Besiedlung in Trikultur analysiert, bestehend aus Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten. Hierbei zeigte sich eine vorhergehende Besiedlung mit Epithelzellen vor den Endothelzellen effizienter für die Bildung eines differenzierten Epitheliums, unabhängig davon, ob die Epithelzellen 7 oder 14 Tage vor Endothelzellen ausgesät wurden. Bei dieser Kultivierungsmethode war makroskopisch



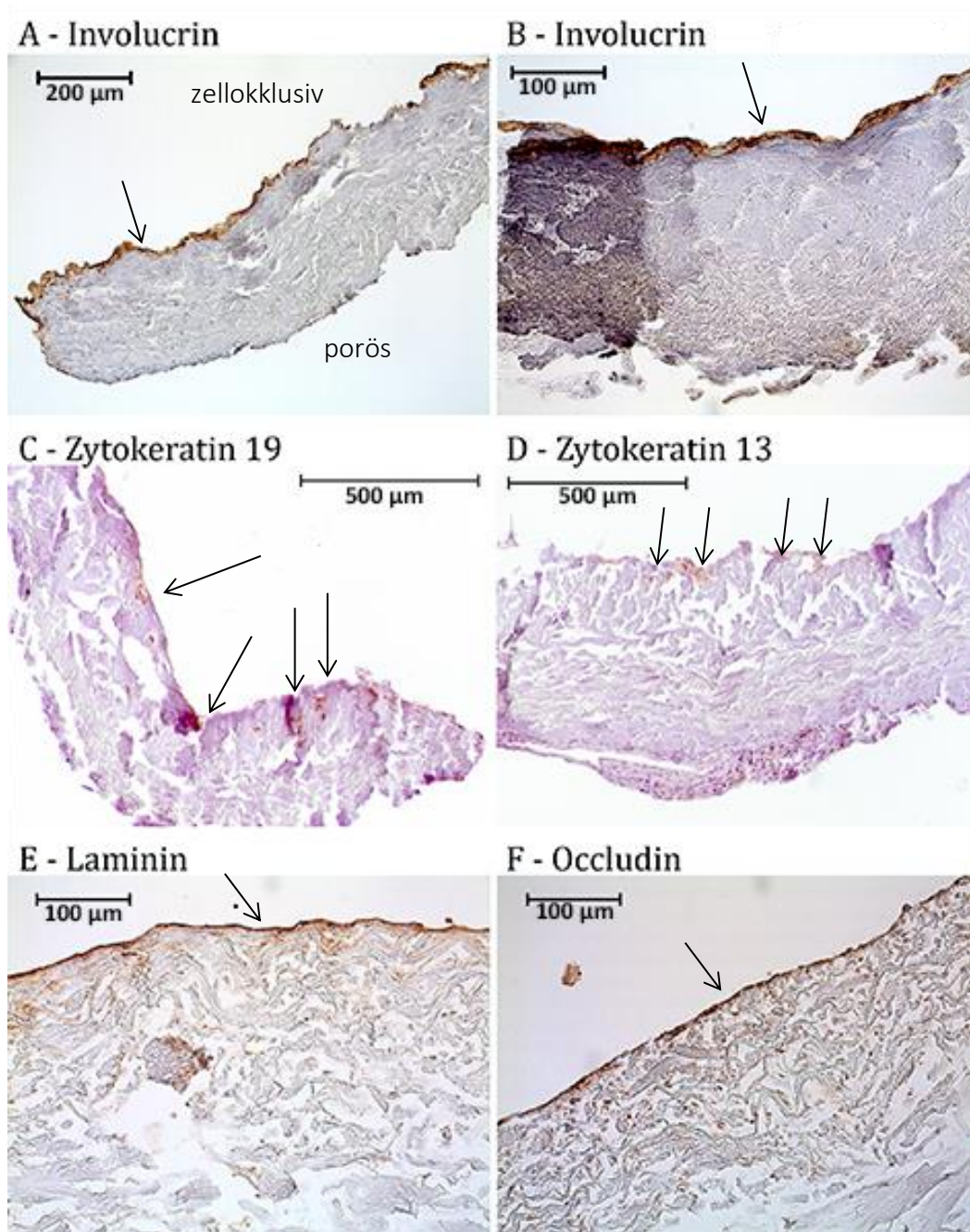
**Abbildung 18 - Exemplarische Darstellung der Prävasikularisierung in Schleimhaut-Äquivalenten, die in unterschiedlichen Reihenfolgen mit Zellen besiedelt wurden.** Zur Optimierung des Besiedlungsprotokolls der Schleimhaut-Äquivalente wurden Bio-Gide® Membranen in unterschiedlicher Reihenfolge in Kokultur mit HDMEC und Fibroblasten besiedelt und für 7, 14 bzw. 21 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Membranen fixiert und CD31 immunfluoreszent nachgewiesen. **A:** An Tag 1 wurden zuerst Endothelzellen, nach 4 h Fibroblasten auf die Membranen ausgesät. **B:** An Tag 1 wurden zuerst Endothelzellen, nach 24 h Fibroblasten auf die Membranen ausgesät. **C:** An Tag 1 wurden zuerst Fibroblasten, nach 4 h Endothelzellen auf die Membranen ausgesät. **D:** An Tag 1 wurden zuerst Fibroblasten, nach 24 h Endothelzellen auf die Membranen ausgesät.

oftmals eine Epithelschicht erkennbar, die sich bei Fixierung zum Teil von der Membran löste und als „Fahne“ an dieser hing (Abbildung 19A). In stärkerer Vergrößerung wurde die typische epitheliale Morphologie und Wuchsform der Zellen deutlich (Abbildung 19B). Diese „Fahne“ trat bei vorangehender Besiedlung mit Endothelzellen nicht auf (nicht dargestellt).



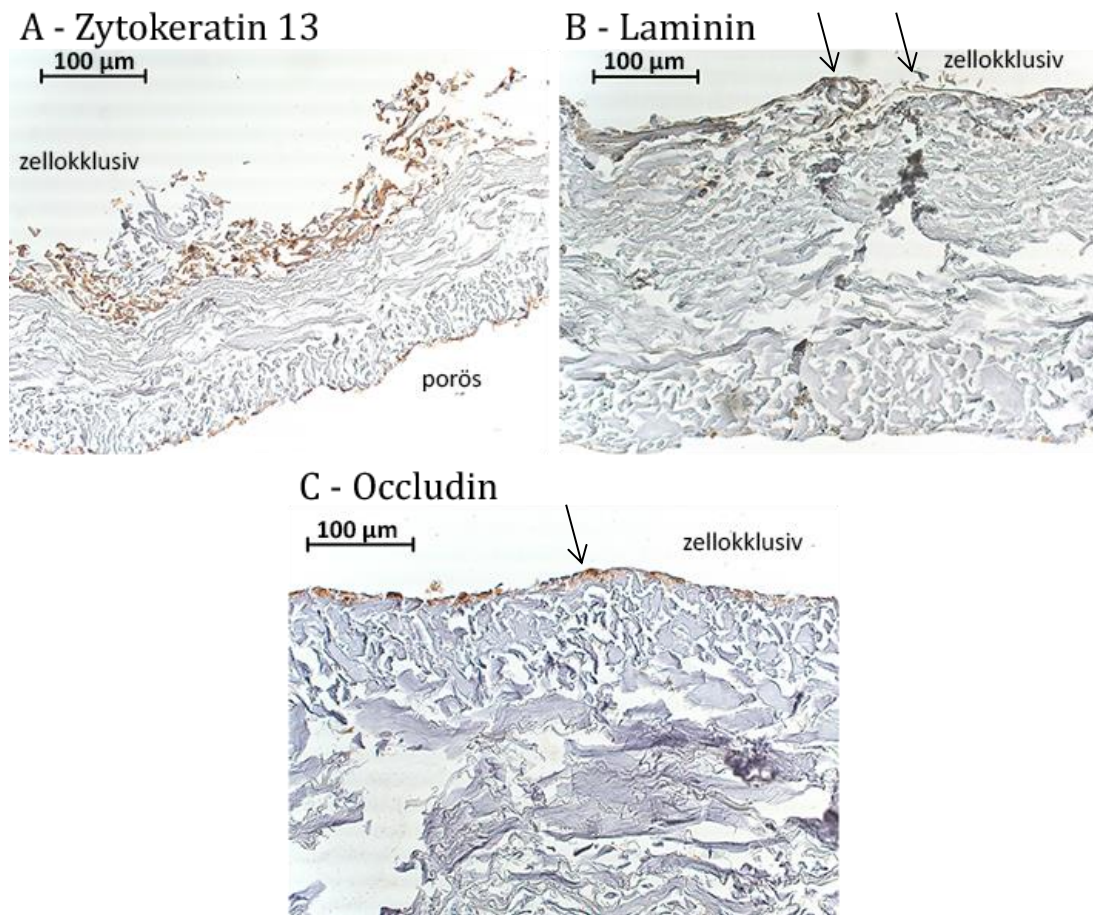
**Abbildung 19 - Exemplarische Darstellung einer Epithelschicht auf trikultivierten Schleimhaut-Äquivalenten.** Die in Trikultur besiedelten Schleimhaut-Äquivalente wurden konfokalmikroskopisch analysiert. Die Membranen wurden zunächst mit Fibroblasten besiedelt, 24 h später mit Epithelzellen und 8 Tage später mit HDMEC. **A:** Die Bildung eines Epitheliums, welches sich bei Fixierung der Membranen ablöste, zeigte sich unter dem Konfokalmikroskop deutlich durch eine an der Membran hängende „Fahne“. **B:** Bei stärkerer Vergrößerung ist das typische epitheliale Wachstumsverhalten der Zellen deutlich erkennbar.

Wurden die Epithelzellen vor den Endothelzellen ausgesät, so war der Epithelzell-*Multi-Layer* auf der zellokklusiven Membranseite durchgehend differenziert, wie durch Involucrin-Färbung demonstriert werden konnte (Abbildung 20A, B). Durch Zytokeratin 19 konnten undifferenzierte, basale Epithelzellen vereinzelt in Inseln nachgewiesen werden (Abbildung 20C, schwarze Pfeile). Auch Zytokeratin 13, war nur vereinzelt in Inseln gefärbt (Abbildung 20D, schwarze Pfeile). Laminin und Occludin sind Marker für die Bildung einer Basalmembran, beide konnten in den gefärbten Schleimhaut-Äquivalenten durch eine durchgehende Färbung auf der zellokklusiven Seite nachgewiesen werden (Abbildung 20E, F).



**Abbildung 20 - Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse epithelialer Marker eines in Trikultur zuerst mit Epithelzellen, anschließend mit HDMEC besiedelten Schleimhaut-Äquivalents.** Die Membranen wurden zunächst mit Fibroblasten besiedelt, 24 h später mit Epithelzellen und 8 Tage später mit HDMEC. Nach 32-tägiger Kultivierung wurden sie immunhistochemisch auf folgende epitheliale Marker analysiert: Involucrin (A & B), Zytokeratin 19 (C), Zytokeratin 13 (D), Laminin (E) und Occludin (F). Die obere Seite ist bei allen dargestellten Membranen die zelloklusiv Seite. Die schwarzen Pfeile deuten auf positiv gefärbte Stellen hin.

Bei Besiedlung der Schleimhaut-Äquivalente mit Endothelzellen sieben Tage vor den Epithelzellen waren deutlich mehr Zellen positiv für Zytokeratin 13 (Abbildung 21A). Hier konnte kein Involucrin nachgewiesen werden. In einigen Ansätzen waren wenige für Laminin und Occludin positive Zellen (Abbildung 21B, C, schwarze Pfeile).



**Abbildung 21 - Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse epithelialer Marker eines in Trikultur zuerst mit HDMEC, anschließend mit Epithelzellen besiedelten Schleimhaut-Äquivalents.** Die Membranen wurden zunächst mit Fibroblasten besiedelt, 24 h später mit HDMEC und 8 Tage später mit Epithelzellen. Nach 32-tägiger Kultivierung wurden sie immunhistochemisch auf folgende epitheliale Marker (**A & D**) sowie Bestandteile der Basalmembran (**B & C**) analysiert: Involucrin (**A**), Occludin (**B**), Laminin (**C**), Zytokeratin 13 (**D**). Die obere Seite ist bei allen dargestellten Membranen die zelloklusive Seite.

Zudem wurden die trikultivierten Schleimhaut-Äquivalente, bei denen zuerst Epithelzellen und später Endothelzellen ausgesiedelt worden waren, immunhistochemisch auf endotheliale und fibroblastäre Marker analysiert. Bei Färbung von CD31 zeigte sich zum einen eine durchgehende Färbung auf sowie teilweise in der porösen Seite der Membran (Abbildung 22A). Zusätzlich konnten gefäßähnliche Strukturen innerhalb der Schleimhaut-Äquivalente nachgewiesen werden (Abbildung 22B). Der endotheliale Marker vWF war im Bereich der porösen Seite der Membranen stark gefärbt und wurde in Richtung der zelloklusiven Seite schwächer (Abbildung 22C). Tenascin lässt einen indirekten Nachweis von Fibroblasten zu. Auch hier zeigte sich eine starke Färbung auf der porösen Seite, die in Richtung der zelloklusiven schwächer wurde (Abbildung 22D).

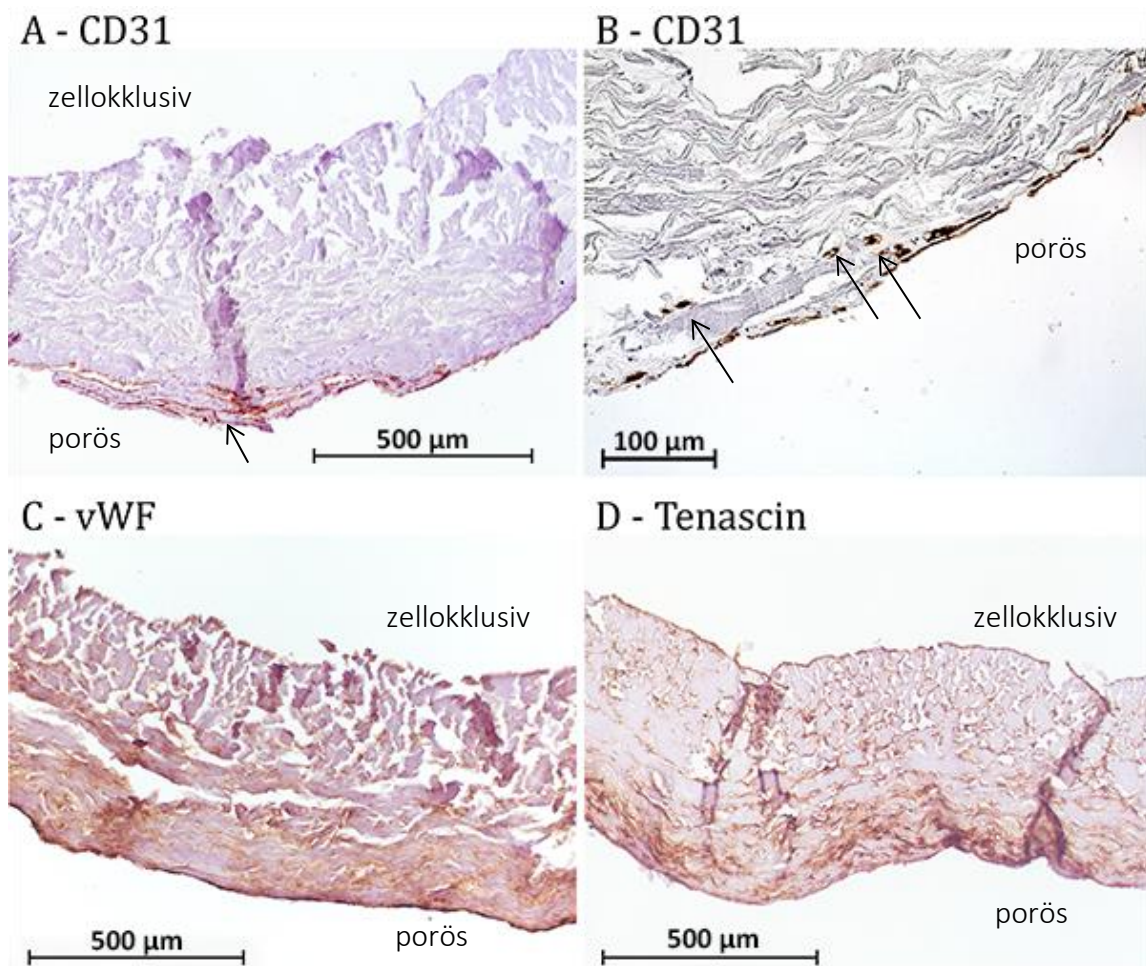
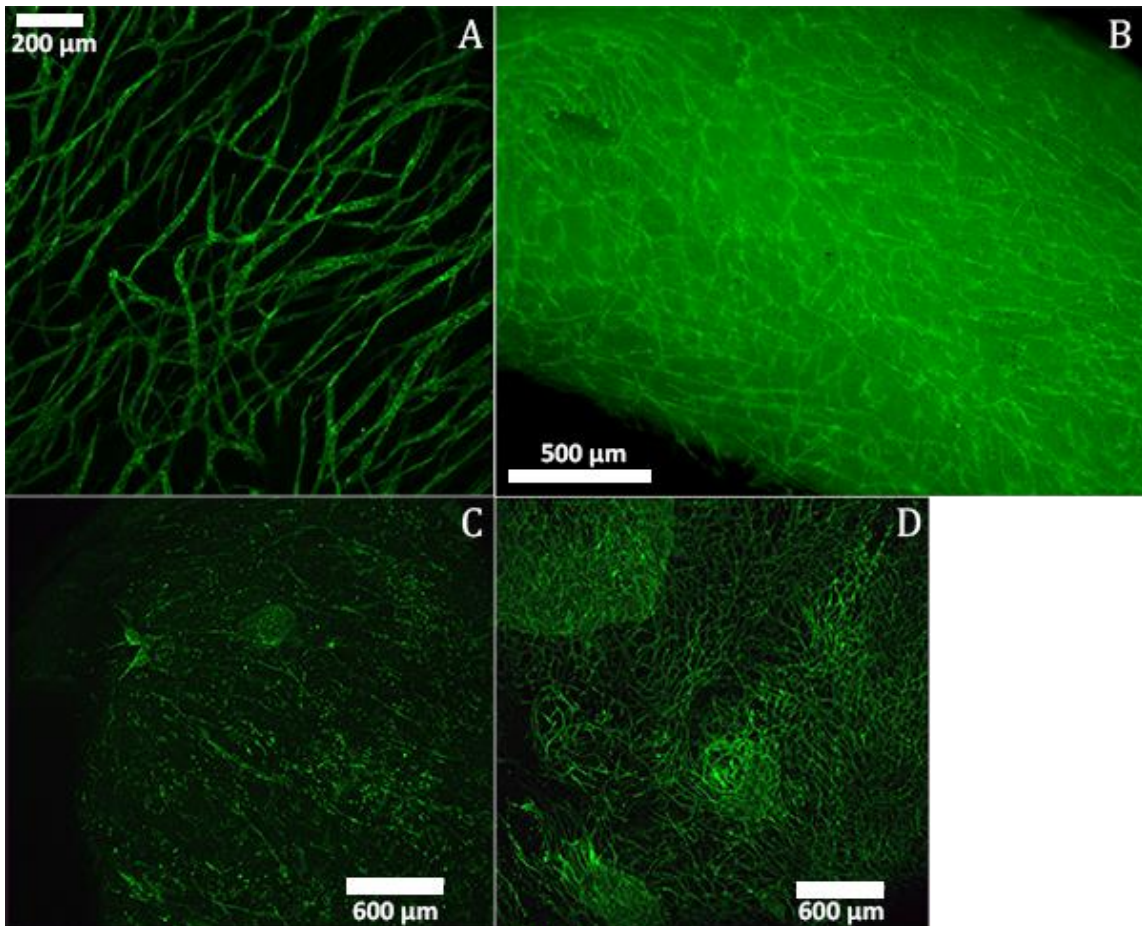


Abbildung 22 - Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse der endothelialen Marker CD31 und vWF sowie Tenascin als indirekten Fibroblasten-Nachweis eines in Trikultur zuerst mit Epithelzellen, anschließend mit HDMEC besiedelten Schleimhaut-Äquivalents. Die Membranen wurden zunächst mit Fibroblasten besiedelt, 24 h später mit Epithelzellen und 8 Tage später mit HDMEC. Nach 32-tägiger Kultivierung wurden sie immunhistochemisch auf folgende Marker analysiert: CD31 (A & B), vWF (C) und Tenascin (D). Alle dargestellten Membranen sind mit der zelloklusiven Seite nach oben und der porösen Seite nach unten orientiert.

Die Bildung gefäßähnlicher Strukturen zeigte sich von der 7 Tage vorangehenden Besiedlung mit Epithelzellen nicht beeinträchtigt: Hier bildeten sich vollständig ausdifferenzierte CLS, die über die gesamte Membran ausgebreitet waren (Abbildung 23A, B). Bei einer vorangehenden Kultivierung von Epithelzellen über 14 Tage konnte keine durchgehende Bildung von CLS erzielt werden (Abbildung 23C). Wurden die Endothelzellen 7 Tage vor den Epithelzellen ausgesät, so zeigten sich ausdifferenzierte CLS (Abbildung 23D).



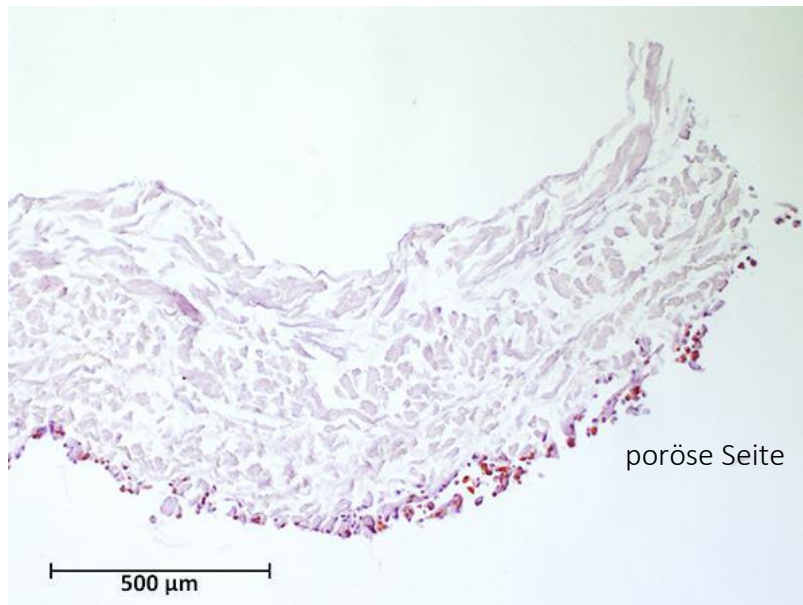
**Abbildung 23 - Exemplarische Darstellung der Bildung gefäßähnlicher Strukturen in trikultivierten Schleimhaut-Äquivalenten.** Die in Trikultur besiedelten Schleimhaut-Äquivalente wurden konfokalmikroskopisch auf CD31 analysiert. **A & B:** Die Membranen wurden zuerst mit Fibroblasten besiedelt, 24 h später mit Epithelzellen und 8 Tage später mit HDMEC. Die Bildung von CLS trat dabei über die gesamte Membran auf. **C:** Die Membranen wurden zuerst mit Fibroblasten besiedelt, 24 h später mit Epithelzellen und 14 Tage später mit HDMEC. **D:** Die Membranen wurden zuerst mit Fibroblasten besiedelt, 24 h später mit Endothelzellen und 7 Tage später mit Epithelzellen.

### 3.2.1.2 Optimierung der Prävasikularisierung

Eine funktionelle Prävasikularisierung ist essentiell für den gewünschten späteren Einsatz der Schleimhaut-Äquivalente im Patienten. Hierfür wiederum ist eine durchgehende Bildung gefäßähnlicher Strukturen unerlässlich. Da die Endothelzellen bislang nur oberflächlich in die Membranen migrierten und infolgedessen auch nur oberflächlich CLS bildeten, wurden verschiedene Methoden in Kokultur von Fibroblasten und HDMEC aus Präputium ausgetestet, um eine tiefere Migration und damit eine verbesserte Prävasikularisierung zu erzielen (Vergleich Abschnitt 2.2.5.2).

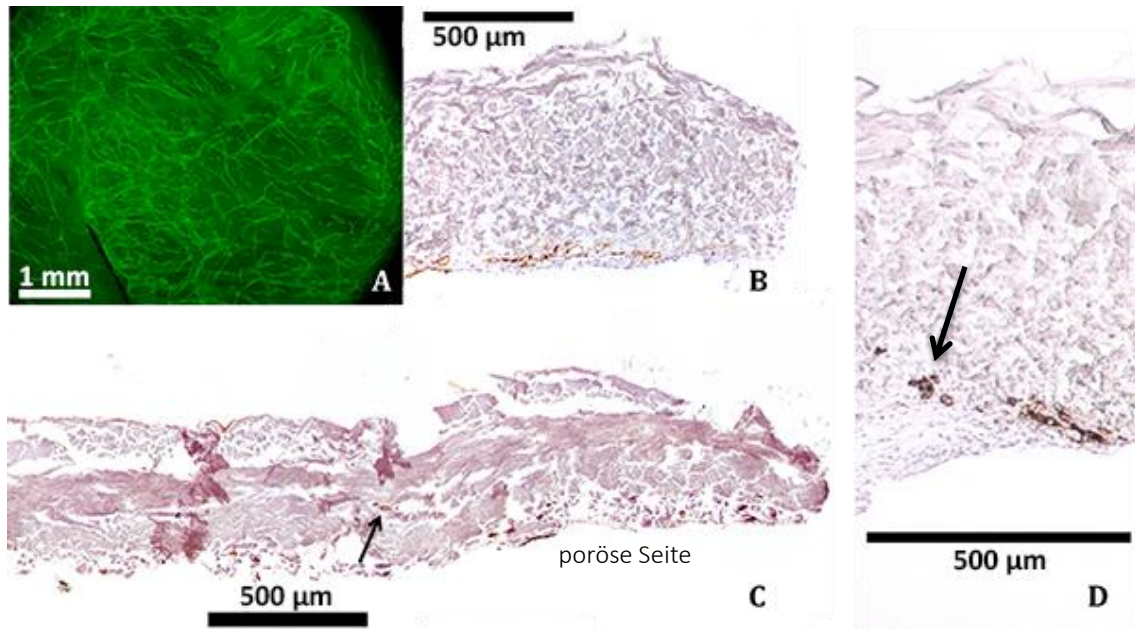
### 3.2.1.2.1 Reinziehen der Endothelzellen durch Kapillarkräfte in die Membran

Zunächst wurde getestet, ob eine Besiedlung von trockenen Membranen durch Kapillarkräfte eine Saugwirkung auf die Zellsuspension hat, sodass diese tiefer in die Membran gelangt. Einer der Ansätze wurde nach 4 h beendet und immunhistochemisch analysiert. CD31-positive Zellen konnten in diesem nur oberflächlich in der Membran nachgewiesen werden (Abbildung 24).



**Abbildung 24 - Bio-Gide®-Membran, die mittels Kapillarkräfte durch Reinziehen der Zellsuspension trocken besiedelt wurde.** Um eine Besiedlung der trockenen Membran zu ermöglichen, wurden die Endothelzellen ( $1,12 \times 10^5$  Zellen/50 µl Medium/Membran) an Tag 1 auf die poröse Seite (unten) ausgesät. Zur Analyse, wie tief die Endothelzellen dadurch gelangt waren, wurde die Kultivierung nach 4 h beendet, die Membran fixiert und anschließend immunhistochemisch CD31 nachgewiesen. Positiv gefärbte Zellen trat nur oberflächlich auf.

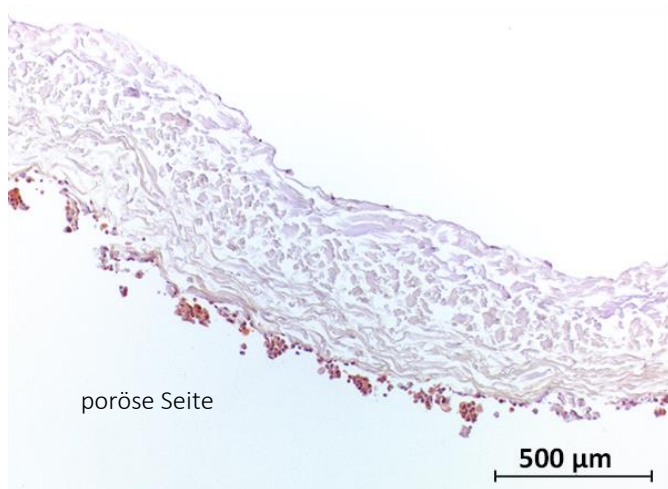
Die anderen Ansätze wurden in Kokultur über 21 Tage kultiviert. Die Bildung von CLS in diesen war durch die Besiedlungsweise nicht gestört (Abbildung 25A, B). In zwei der drei in dieser Weise durchgeführten Besiedlungen konnten vereinzelt CLS tiefer innerhalb der Membran gefärbt werden (Abbildung 25C, D). Obwohl die tieferen CLS nur vereinzelt auftraten, wurden die Membranen im weiteren Verlauf trocken besiedelt.



**Abbildung 25 - Bio-Gide®-Membranen, die mittels Kapillarkräfte durch Reinziehen der HDMEC-Zellsuspension trocken besiedelt wurden.** Um eine Besiedlung der trockenen Membran zu ermöglichen, wurden die Endothelzellen ( $1,12 \times 10^5$  Zellen/25  $\mu$ l Medium/Membran) an Tag 1 auf die poröse Seite (immer unten) ausgesät. Nach 24 h folgte die Besiedlung mit Fibroblasten ( $5,6 \times 10^4$  Zellen/200  $\mu$ l Medium/Membran). Die Membranen wurden in HDMEC-Medium für 21 Tage kultiviert. **A:** Aufsicht auf die besiedelte Bio-Gide® Membran mit Fluoreszenzfärbung von CD31. **B, C & D:** Querschnitt der besiedelten Bio-Gide® Membran mit immunhistochemischer Färbung von CD31. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die innenliegenden gefäßähnlichen Strukturen.

### 3.2.1.2.2 Zentrifugieren der Endothelzellen in die Membran

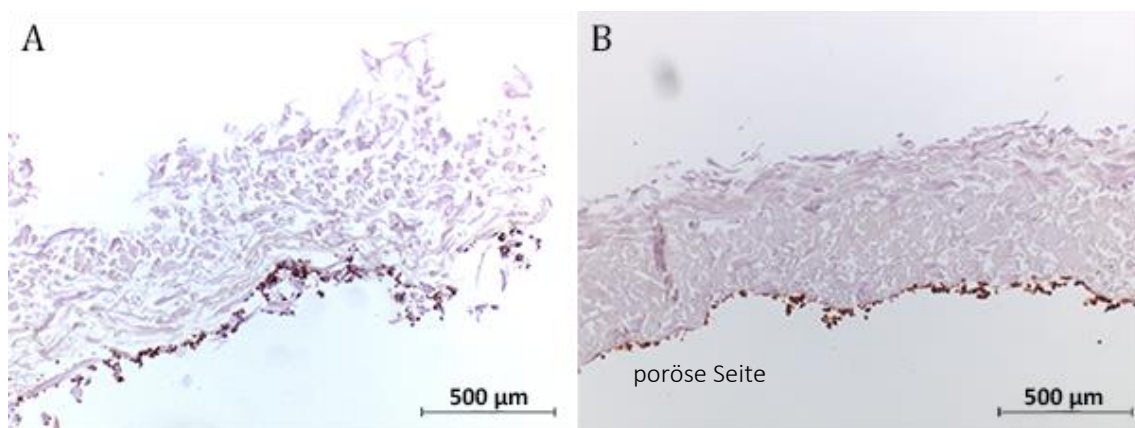
Um eine tiefere Prävascularisierung zu erzielen, wurde als nächstes eine Besiedlung durch Zentrifugieren ausgetestet. Im Ansatz, der nach 4 h beendet und fixiert wurde, konnten CD31-positive Zellen nur oberflächlich nachgewiesen werden (Abbildung 26). Auch nach einer längeren Kultivierung in Kokultur über 21 Tage zeigte sich keine tiefere Invasion von Endothelzellen in die Membran (nicht dargestellt). Die Methode erwies sich daher als nicht erfolgreich.



**Abbildung 26 - Bio-Gide®-Membran, die mittels Zentrifugation der HDMEC-Zellsuspension besiedelt wurde.** Zur Besiedlung wurden  $1,12 \times 10^5$  Endothelzellen in 200 µl Medium pro Membran auf die poröse Seite (unten) ausgesät und anschließend direkt 10 min bei 300 xg zentrifugiert. Die Membranen wurden nach 4 h Kultivierung beendet und immunhistochemisch auf CD31 analysiert. Positive Färbung trat nur oberflächlich auf.

### 3.2.1.2.3 Markierung mittels magnetischer Beads

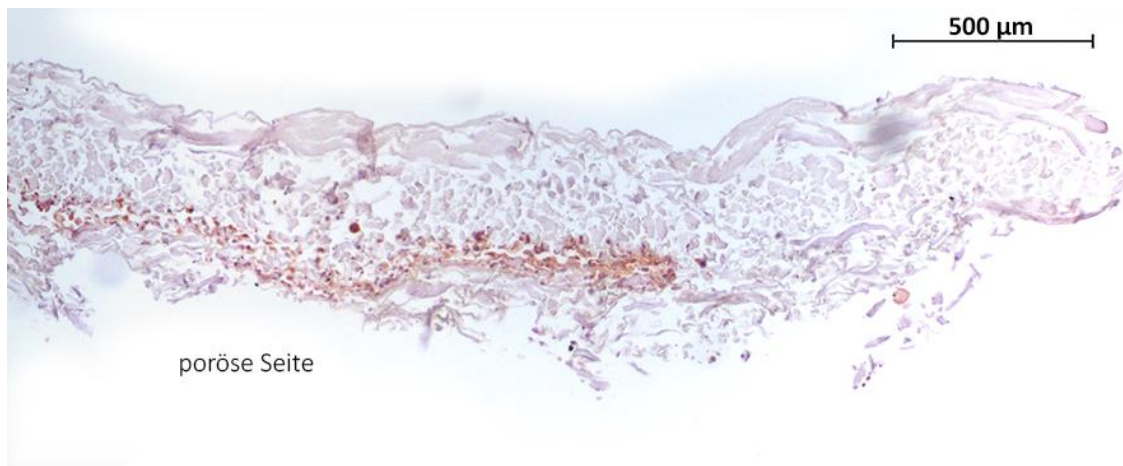
Eine Markierung der Endothelzellen mit magnetischen Beads vor Besiedlung und die anschließende Kultivierung auf einem Magneten brachte weder bei 10 min (Abbildung 27A), noch bei 24 h Inkubationszeit auf dem Magneten (Abbildung 27B) eine tiefere Besiedlung mit sich. Die Endothelzellen waren in beiden Fällen nur an der Oberfläche der Membran lokalisiert. Auch diese Methode erwies sich somit als nicht erfolgreich.



**Abbildung 27 - Bio-Gide®-Membranen, die mit magnetisch markierten Endothelzellen durch Inkubation auf einem Magneten besiedelt wurde.** Die Endothelzellen wurden vor Besiedlung mit magnetischen DynaBeads® markiert. Pro Membran wurden  $4 \times 10^5$  Endothelzellen in 200 µl Medium auf die poröse Seite (unten) ausgesät und anschließend direkt für 10 min (A) bzw. 24 h (B) unter Zellkulturbedingungen auf einem Magneten inkubiert. Nach weiteren 24 h Kultivierung wurden die Membranen fixiert und immunhistochemisch auf CD31 analysiert. Positive Färbung trat nur oberflächlich auf.

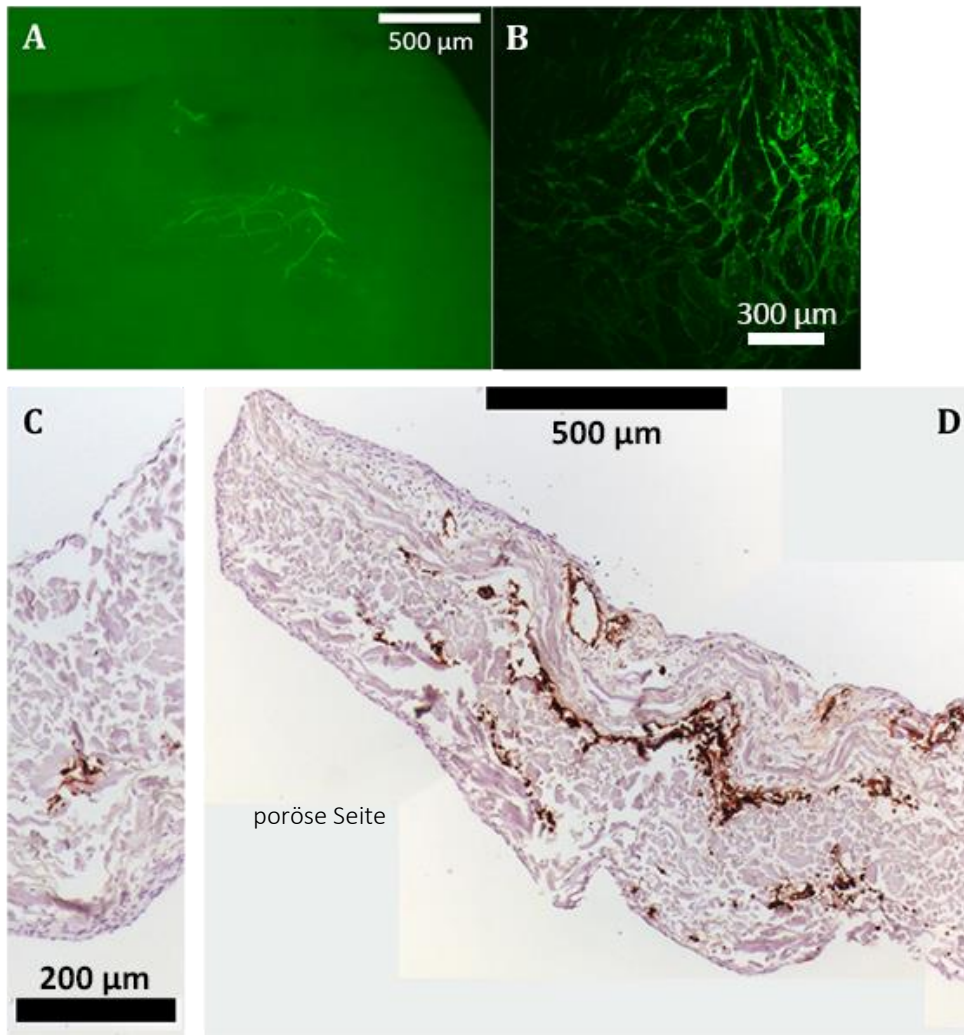
#### 3.2.1.2.4 Injizieren der Endothelzellen in die Membran

Des Weiteren wurde ausgetestet, ob die Endothelzellen mit Hilfe einer Spritze in die Membran gebracht werden können, um eine Lokalisation direkt in der Membran zu erzielen. Hierbei zeigte sich im 4 h kultivierten Ansatz eine tiefe Lokalisation der Endothelzellen innerhalb der Membran (Abbildung 28).



**Abbildung 28 - Bio-Gide®-Membran, die durch Injizieren mit Endothelzellen besiedelt wurde, nach 4 h Kultivierung.** Die Bio-Gide®-Membranen wurden mit  $8 \times 10^5$  Endothelzellen in 400 µl Medium pro Membran mittels Injizieren besiedelt. Nach 4 h Kultivierung wurden die Membranen fixiert und immunhistochemisch auf CD31 analysiert. Eine tiefe Lokalisation der Endothelzellen konnte erzielt werden.

Eine weitere Kultivierung der Kokulturen über 21 Tage führte zur Bildung von CLS (Abbildung 29A, B). Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine tiefere Lokalisation von Endothelzellen in den Membranen (Abbildung 29C, D). In einigen Besiedlungen konnte eine durchgehende Bildung von CLS erzielt werden (Abbildung 29D). Jedoch zeigten sich zum Teil mechanische Verletzungen der Membran, die vermutlich durch das Einführen der Kanüle entstanden waren (Abbildung 29D). Es konnte somit demonstriert werden, dass eine tiefere Besiedlung mit Endothelzellen möglich ist und diese zur Bildung von CLS führt.



**Abbildung 29 - Bio-Gide®-Membranen, die durch Injizieren mit Endothelzellen besiedelt wurden nach 21-tägiger Kultivierung.** Die Bio-Gide®-Membranen wurden mit  $8 \times 10^5$  Endothelzellen in  $400 \mu\text{l}$  Medium pro Membran mittels Injizieren besiedelt. Nach 24 h Kultivierung wurden die Membranen mit Fibroblasten besiedelt und über 21 Tage kultiviert. Anschließend wurden sie beendet, fixiert und mittels Immunfluoreszenz (**A & B**) sowie immunhistochemischer (**C & D**) Färbungen auf CD31 untersucht. Dabei konnte eine Bildung von CLS nachgewiesen werden.

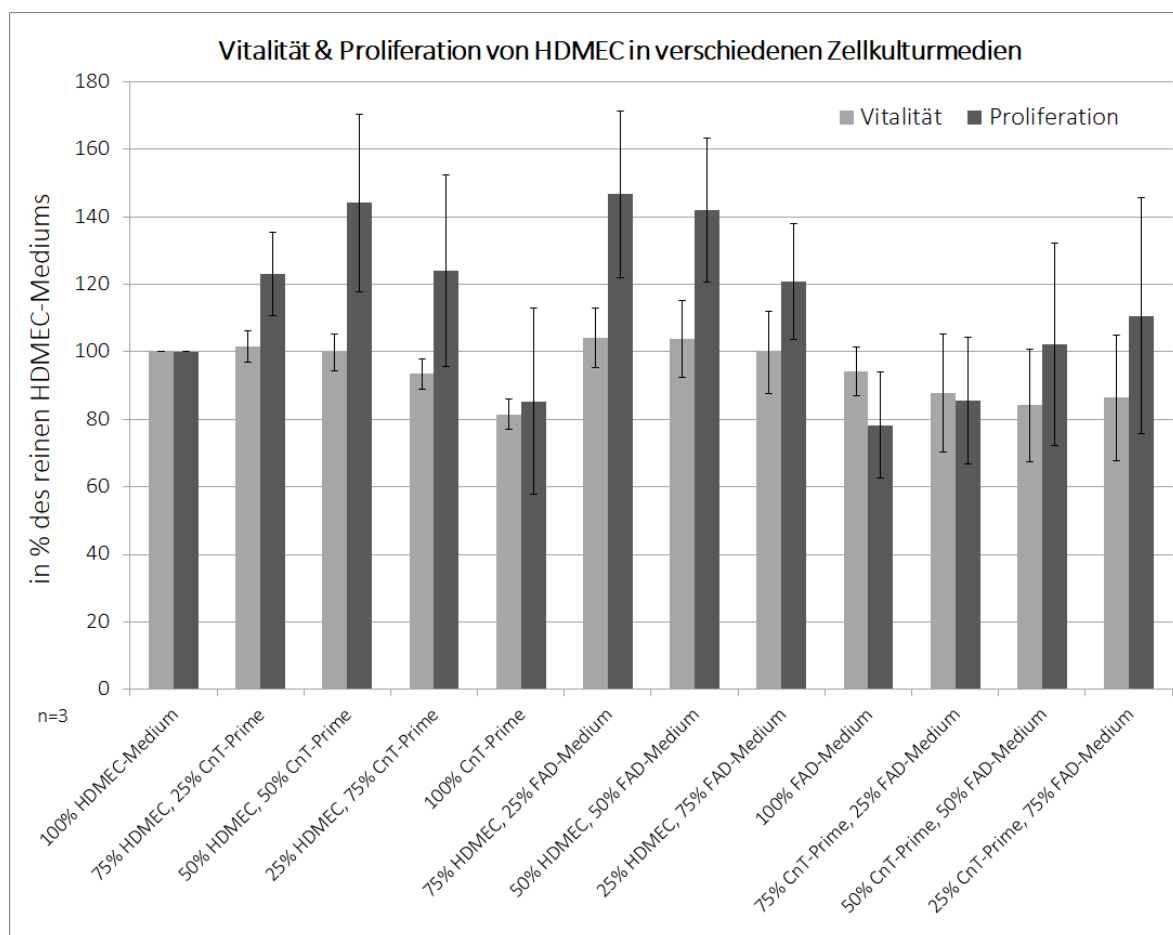
### 3.2.1.3 Optimierung des Kultivierungsmediums

Da das angestrebte Schleimhaut-Äquivalent mittels drei verschiedener Zelltypen generiert wird, wurde zunächst die Wirkung verschiedener Kultivierungsmedien auf Proliferation und Vitalität von HDMEC und Epithelzellen getestet. Im nächsten Schritt wurde die Prävascularisierung sowie die Bildung eines Epitheliums in diesen Medien analysiert.

Die Vitalität von HDMEC war dabei in gemischten Medien, in denen Endothelzellmedium enthalten war, annähernd unverändert (Abbildung 30, hellgraue Balken). Einzig bei einem Mischverhältnis von 25 % Endothelzell- und 75 % CnT-Prime-Medium reduzierte sich die Vitalität um 7 %. 100 % CnT-Prime reduzierte die Vitalität um 18 %, 100 % FAD-Medium

um 5 %. Gemischte Medien aus CnT-Prime und FAD-Medium reduzierten die Vitalität um 12 % bis 16 %.

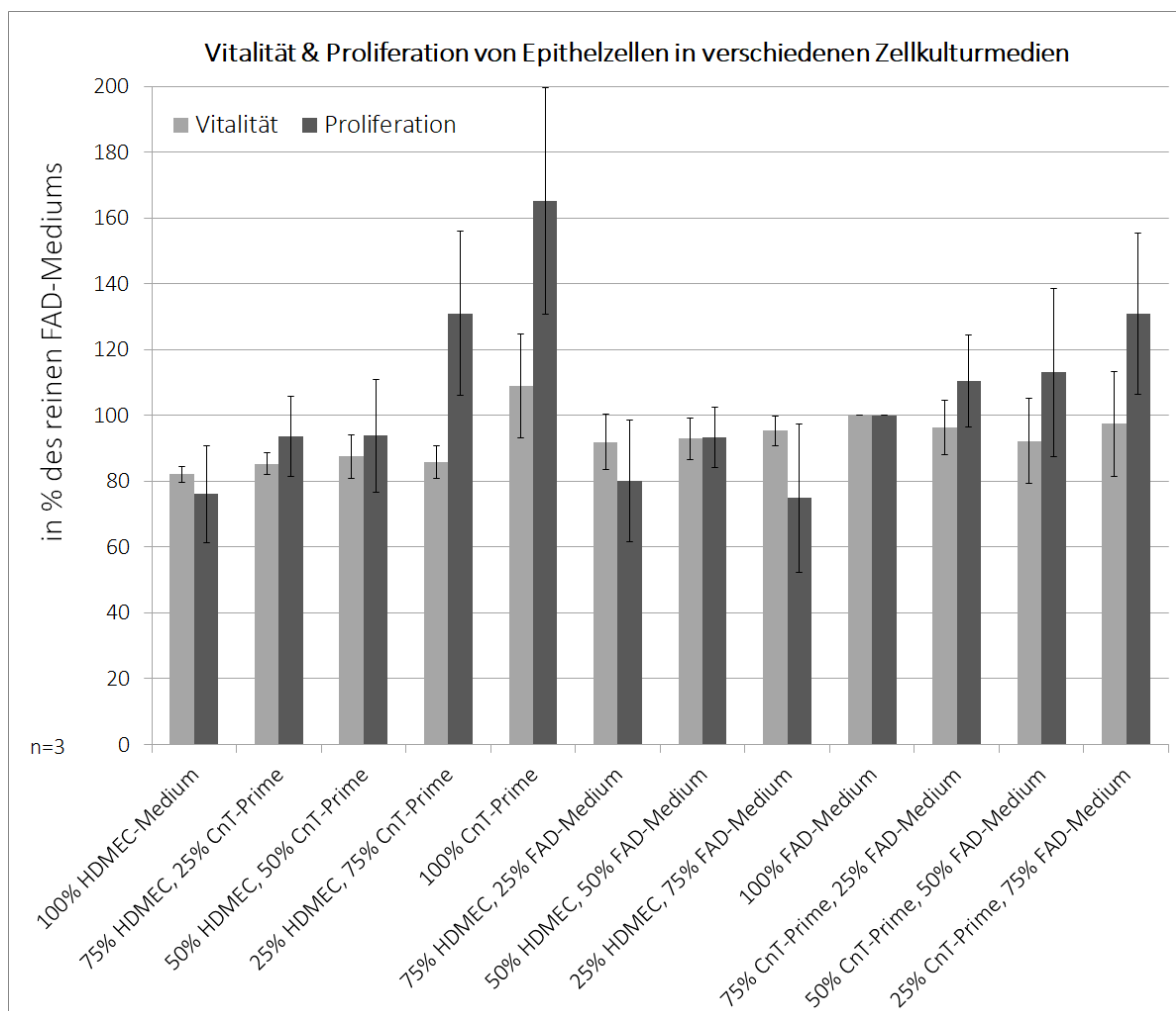
Die Proliferation der Endothelzellen zeigte sich reduziert bei reinem CnT-Prime (-15 %), reinem FAD-Medium (-22 %) sowie einer Mischung von 75 % CnT-Prime und 25 % FAD-Medium (-15 %) (Abbildung 30, dunkelgraue Balken). Alle Mischmedien, die Endothelzellmedium enthielten, erhöhten die Proliferation durchweg um 20 % bis 45 %. Gemischtes Medium aus 25 % CnT-Prime und 75 % FAD-Medium erhöhte die Proliferation um 10 % (Abbildung 30).



**Abbildung 30 - Vitalität und Proliferation von HDMEC unter Kultivierung in verschiedenen Medien.** Die Vitalität (hellgraue Balken) und Proliferation (dunkelgraue Balken) von HDMEC in verschiedenen Zellkulturmedien wurden mittels MTT- respektive BrdU-Inkorporations-Assay ermittelt. Eingesetzt wurden jeweils 100 % HDMEC-Medium, 100 % CnT-Prime sowie 100 % FAD-Medium als Epithelzellmedien und jeweils folgende Mischverhältnisse dieser: 75 % zu 25 %, 50 % zu 50 %, 25 % zu 75 %. Zellen, die in reinem HDMEC-Medium kultiviert wurden, dienten als Kontrolle, ihre Vitalität bzw. Proliferation wurde als 100 % definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Versuchsdurchläufen. Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

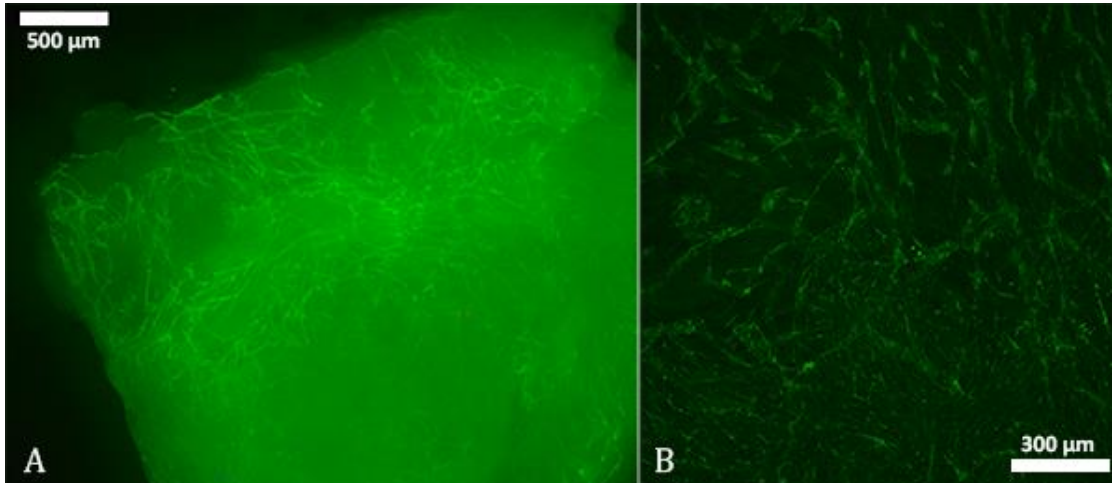
Die Vitalität der Epithelzellen war in allen eingesetzten Medien und Medienmischungen, mit Ausnahme von 100 % CnT-Prime, um bis zu 18 % zum FAD-Medium reduziert (Abbildung 31). 100 % CnT-Prime erhöhte die Vitalität um ca. 10 %.

Mischmedien aus FAD- und HDMEC-Medium reduzierten die Proliferation der Epithelzellen um 6 % bis 25 %. Mischmedien aus CnT-Prime und FAD-Medium steigerten die Proliferation um 10 % bis 30 %. 100 % CnT-Prime führte zu einer Proliferationssteigerung von 65 %. Die Kombination von 25 % HDMEC-Medium plus 75 % CnT-Prime erhöhte die Proliferation um 30 %. Andere Mischverhältnisse dieser beiden Medien führten zu einer Reduktion um 7 % bis 24 % (Abbildung 31).



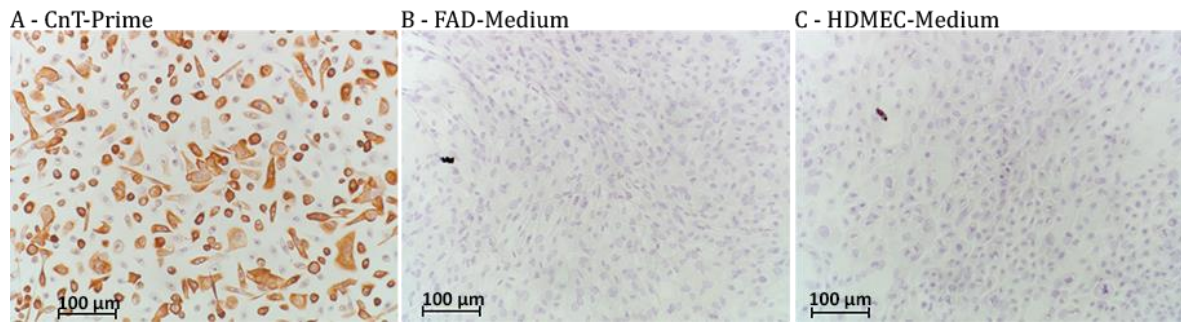
**Abbildung 31 - Vitalität und Proliferation von Epithelzellen unter Kultivierung in verschiedenen Medien.** Die Vitalität (hellgraue Balken) und Proliferation (dunkelgraue Balken) von Epithelzellen in verschiedenen Zellkulturmedien wurden mittels MTT- respektive BrdU-Inkorporations-Assay ermittelt. Eingesetzt wurden jeweils 100 % HDMEC-Medium, 100 % CnT-Prime sowie 100 % FAD-Medium als Epithelzellmedien und jeweils folgende Mischverhältnisse dieser: 75 % zu 25 %, 50 % zu 50 %, 25 % zu 75 %. Zellen, die in reinem FAD-Medium kultiviert wurden, dienten als Kontrolle, ihre Vitalität bzw. Proliferation wurde als 100 % definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Versuchsdurchläufen. Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Eine Prävascularisierung im Schleimhaut-Äquivalent konnte bei Verwendung aller drei reinen Medien beobachtet werden (Abbildung 32, Vergleich zu Endothelzellmedium Abbildung 18). In FAD-Medium zeigte sich die Bildung von CLS sehr zuverlässig (Abbildung 32A). In CnT-Prime Medium war sie nicht immer erfolgreich, hier zeigte sich oftmals keine vollständige Ausdifferenzierung, sondern ein flächiger Wuchs von Endothelzellen (Abbildung 32B).



**Abbildung 32 - Exemplarische Darstellung von in verschiedenen Medien kultivierten Schleimhaut-Äquivalenten.** Dargestellt sind tri-kultivierte Schleimhaut-Äquivalente, die 21 Tage in FAD-Medium (A) bzw. CnT-Prime (B) kultiviert wurden. Anschließend wurden sie fluoreszenzmikroskopisch auf CD31 analysiert.

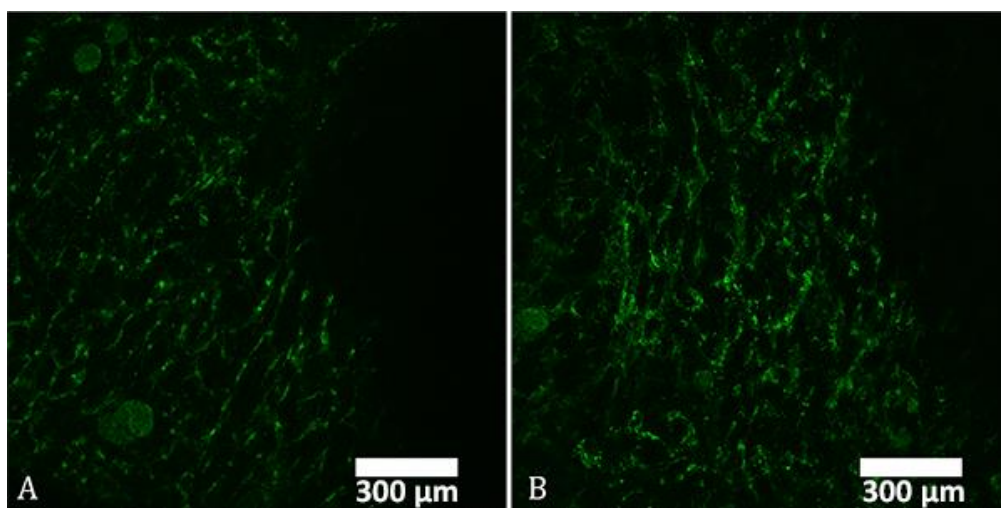
Die Bildung eines Epithels konnte bei Verwendung von reinem Endothelzellmedium wie auch bei Verwendung von CnT-Prime nicht beobachtet werden. Einzig in FAD-Medium zeigten sich die oben beschriebenen Ausbildungen eines Epitheliums (Vergleich Abbildung 19, Abbildung 20). Bei immunhistochemischer Färbung konnte Zytokeratin 19 in epithelialen Monokulturen nachgewiesen werden, sofern die Zellen in CnT-Prime kultiviert wurden (Abbildung 33A). Bei Kultivierung in FAD- oder Endothelzellmedium (HDMEC-Medium) war kein Nachweis möglich (Abbildung 33B, C). Immunhistochemische Färbungen von Involucrin an analogen Epithelzellpräparaten wiesen bei allen drei eingesetzten Medien keine Färbung auf (nicht dargestellt).



**Abbildung 33 - Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 19 an Epithelzellen.** Epithelzellen wurden in verschiedenen Medien (CnT-Prime, FAD- sowie HDMEC-Medium) in Monokultur auf *Chamber Slides* kultiviert und anschließend einer immunhistochemischen Färbung von Zytokeratin 19 unterzogen. Die Zellen zeigten sich positiv, sofern sie in CnT-Prime Medium kultiviert worden waren.

### 3.2.2 Beurteilung der Eignung von endothelialen Zellen aus Blut und alternativen Geweben

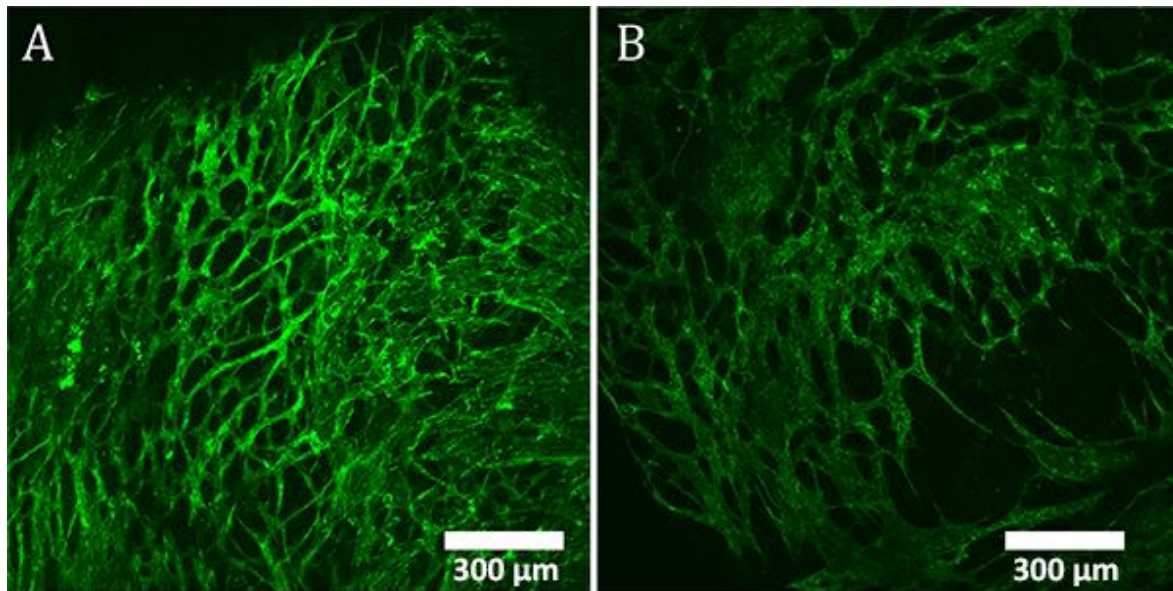
Die aus Brust- sowie Vulva-Haut und peripherem Blut gewonnenen endothelialen Zellen wurden zusammen mit Fibroblasten auf Bio-Gide®-Membranen kultiviert, um die Bildung einer Prävascularisierung und damit ihre Eignung für den Einsatz im Schleimhaut-Äquivalent zu analysieren. Aus Brusthaut konnte, wie in Abschnitt 3.1.3.3 beschrieben, keine reine Endothelzell-Kultur gewonnen werden, sondern nur Mischkulturen mit Fibroblasten. Diese wurden auf die Bio-Gide®-Membran gegeben und für 21 Tage kultiviert. Bei anschließender fluoreszenzmikroskopischer Analyse von CD31 konnten CLS nachgewiesen werden (Abbildung 34). Sie zeigten sich jedoch nicht so definiert wie bei Verwendung von Endothelzellen aus Präputium (Vergleich Abbildung 18).



**Abbildung 34 - Kokultiviertes Schleimhaut-Äquivalent mit Endothelzellen und Fibroblasten aus Brusthaut.** Eine Mischkultur von Endothelzellen und Fibroblasten wurde zur Generierung von Schleimhaut-Äquivalenten verwendet, für 21 Tage kultiviert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch auf CD31 analysiert. Die Bildung von CLS konnte erzielt werden, sie zeigten sich jedoch nicht deutlich definiert.

Bei Verwendung von Endothelzellen aus Vulva-Haut konnte bislang keine Prävascularisierung generiert werden. Eine Besiedlung mit diesen Zellen konnte jedoch bisher nur einmal durchgeführt werden und muss für weitere Aussagen wiederholt werden.

Der Einsatz von ECFC bei der Besiedlung der Schleimhaut-Äquivalente zeigte in Ko- wie auch in Trikultur eine gute und zuverlässige Prävascularisierung (Abbildung 35).



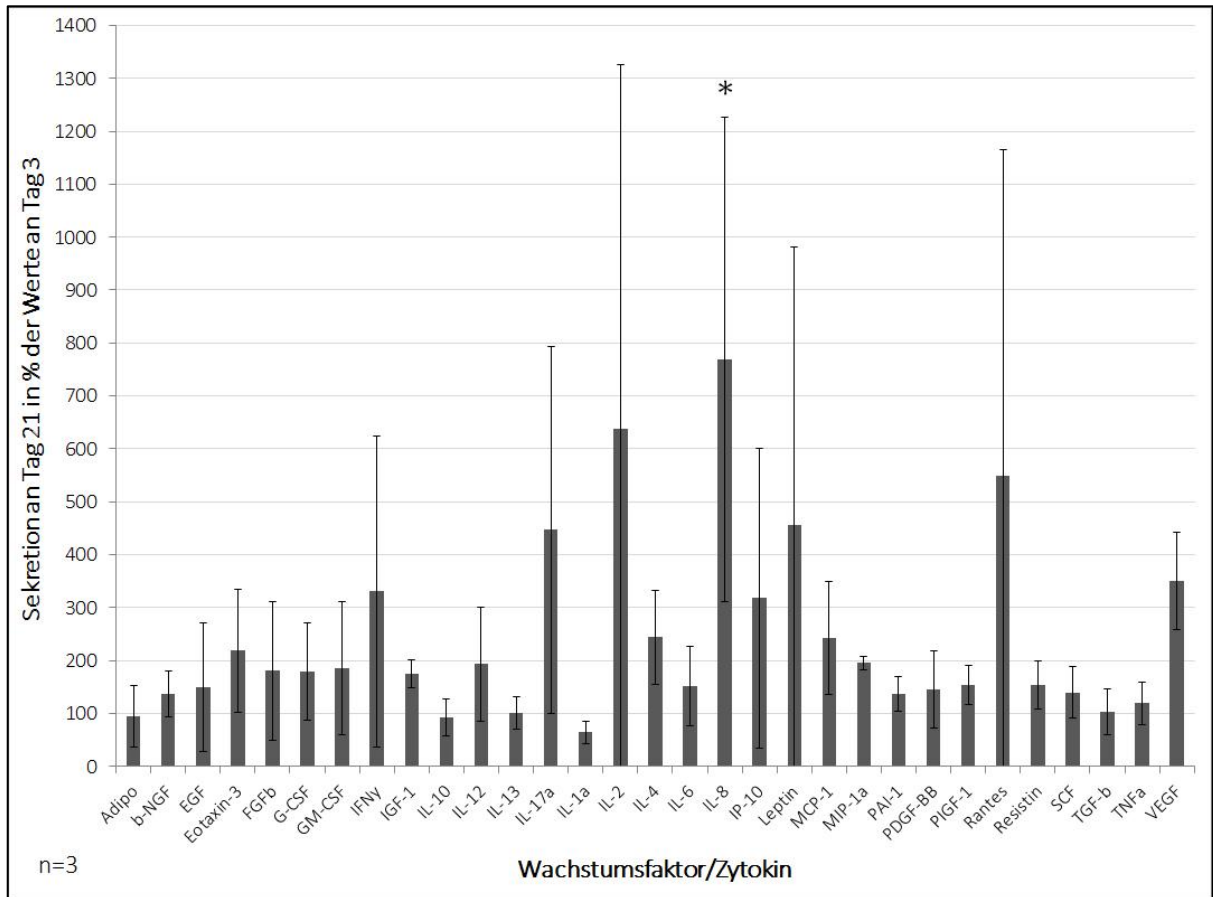
**Abbildung 35 - Mit endothelialen Progenitorzellen in Ko- bzw. Trikultur besiedelte Schleimhaut-Äquivalente.** Endotheliale Progenitorzellen wurden aus humanem, peripherem Blut isoliert und für den Einsatz im Schleimhaut-Äquivalent getestet. Dabei wurden Kokulturen (A) und Trikulturen (B) besiedelt, die nach 21-tägiger Kultivierung fluoreszenzmikroskopisch auf CD31 analysiert wurden. Es zeigte sich eine deutliche Bildung gefäßähnlicher Strukturen.

### 3.3 Parakrine Kommunikation im Schleimhaut-Äquivalent

#### 3.3.1 Identifikation von sezernierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Schleimhaut-Äquivalent

Mittels *Human Cytokine ELISA Plate Array* wurde die Sekretion von 32 pro-angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen an Tag 3 und Tag 21 der Kokultivierung analysiert und verglichen, um die parakrine Kommunikation zu analysieren. Es zeigte sich, dass bis auf IL-1a, IL-10 und Adiponektin alle Wachstumsfaktoren an Tag 21 höher sezerniert wurden als an Tag 3 (Abbildung 36). Die Sekretion von IL-8 war signifikant um das 6,7-fache erhöht ( $p = 0,033$ ). IL-2 wies eine Erhöhung um das 5,4-fache auf. Leptin und IL-17a waren um ca. das 3,5-fache erhöht, Rantes um das 4,5-fache. VEGF wies eine Erhöhung um das 2,5-fache auf. IP10 und IFN $\gamma$  wurden um das 2,2- respektive das 2,3-fache erhöht. Eotaxin-3 zeigte

sich um das 1,2-fache erhöht, MCP-1 sowie IL-4 um das 1,4-fache. Eine Erhöhung um 30 % bis 100 % zeigte sich bei G-CSF, EGF, Resistin, PAI-1, IL-12, IL-13, PDGF-BB, PIGF-1, b-NGF, SCF, bFGF und IGF-1.



**Abbildung 36 - Veränderung der Sekretion verschiedener pro-angiogener Wachstumsfaktoren während der 21-tägigen Kokultivierung.** Überstände von Kokulturen (n=3) wurden über 21 Tage gesammelt und anschließend mittels *Human Cytokine ELISA Plate Array* analysiert. Die Sekretion von 32 pro-angiogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen an Tag 21 wurde prozentual zu der an Tag 3 (100 %) gesetzt, um Veränderungen während der Kultivierung festzustellen. Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet und signifikante Unterschiede zur Kontrolle ab  $p < 0.05$  mit einem Stern markiert.

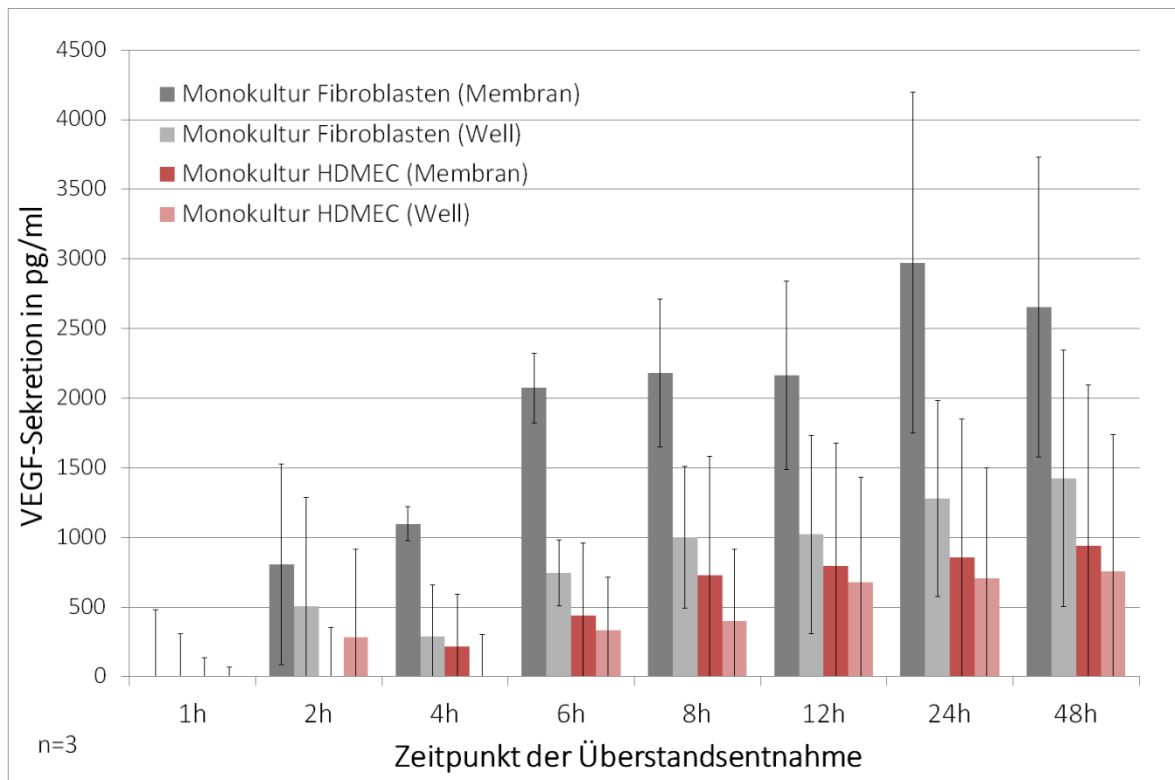
### 3.3.2 Quantifizierung der VEGF-Sekretion

VEGF spielt in der Angiogenese eine essentielle Rolle, wie einleitend beschrieben wurde. Aus diesem Grund wurde die VEGF-Sekretion im Schleimhaut-Äquivalent quantifiziert und in unterschiedlichem Kontext analysiert.

#### 3.3.2.1 Einfluss der Kollagenmembran auf die Sekretion von VEGF

Fibroblasten sezernierten in Monokultur stärker VEGF als HDMEC, insbesondere auf der Bio-Gide®-Membran ml (Abbildung 37). Zudem zeigten die Fibroblasten eine deutliche Steigerung der Sekretion über die Zeit: während in der ersten Stunde in keinem der Ansätze VEGF sezerniert wurde, betrug die Sekretion von Fibroblasten nach 2 h etwa 800 pg/ml auf der Bio-Gide®-Membran bzw. 500 pg/ml im Well. Bis zur sechsten Kultivierungsstunde erhöhte sich die VEGF-Sekretion durch Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran auf 2000 pg/ml, durch Fibroblasten im Well auf 750 pg/ml. Beide Ansätze steigerten ihre VEGF-Sekretion über die nächsten sechs Stunden vergleichsweise wenig. Anschließend steigerten sie sich auf eine maximale VEGF-Konzentration von ca. 3000 pg/ml nach 24 h auf der Membran bzw. 1280 pg/ml nach 48 h im Well.

Auch die HDMEC zeigten die Tendenz einer höheren VEGF-Sekretion auf der Bio-Gide®-Membran sowie eine Steigerung dieser über die Kultivierungsdauer. Während der ersten Stunde schütteten HDMEC ebenfalls kein VEGF aus. Bis zur sechsten Stunde steigerte sich die Sekretion auf 440 pg/ml auf der Bio-Gide®-Membran bzw. 330 pg/ml im Well. Die Maximalwerte nach 48 h betragen auf der Membran knapp 940 pg/ml VEGF, im Well knapp 755 pg/ml (Abbildung 37).

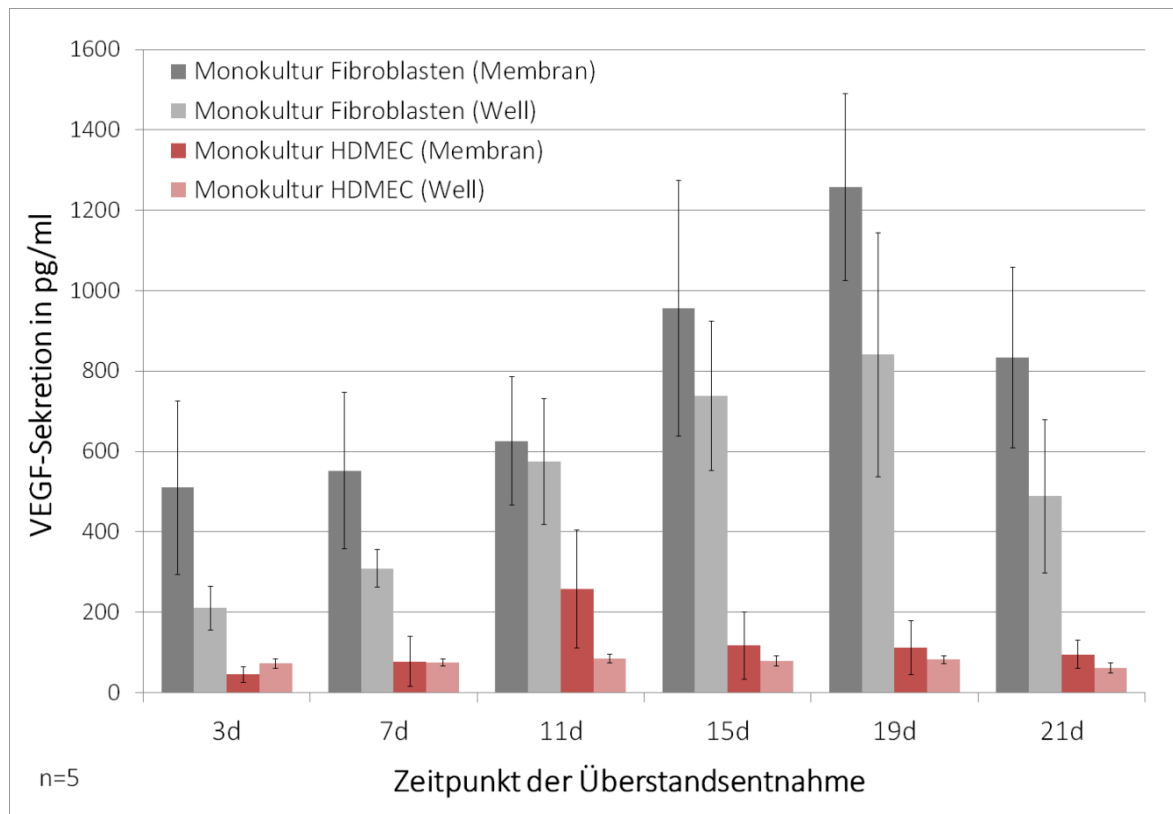


**Abbildung 37 - Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über die 21-tägige Kultivierung sezernierten die Fibroblasten ebenfalls verstärkt VEGF im Vergleich zu den HDMEC (Abbildung 38). Zudem schütteten die Fibroblasten auch hier auf der Bio-Gide®-Membran mehr VEGF aus als im Well. Über die Kultivierungszeit nahm ihre VEGF-Sekretion kontinuierlich zu: an Tag 3 betrug sie 500 pg/ml auf der Bio-Gide®-Membran, an Tag 19 zeigte sich das Maximum mit knapp 1260 pg/ml VEGF. Im Well steigerte sich die Sekretion von 210 pg/ml an Tag 3 auf das Maximum von 840 pg/ml an Tag 19. An Tag 21 sezernierten die Fibroblasten wieder etwas weniger VEGF mit 835 pg/ml auf der Bio-Gide®-Membran bzw. 490 pg/ml im Well (Abbildung 38).

HDMEC sezernierten in Monokultur deutlich weniger VEGF als die Fibroblasten und steigerten die Sekretion vergleichsweise kaum über die Kultivierungsdauer (Abbildung 38). Sie lag auf der Bio-Gide® Monokultur zwischen 45 pg/ml an Tag 3 und maximal 260 pg/ml an Tag 11, wobei sie anschließend wieder abnahm bis auf 95 pg/ml an Tag 21. Im Well betrug

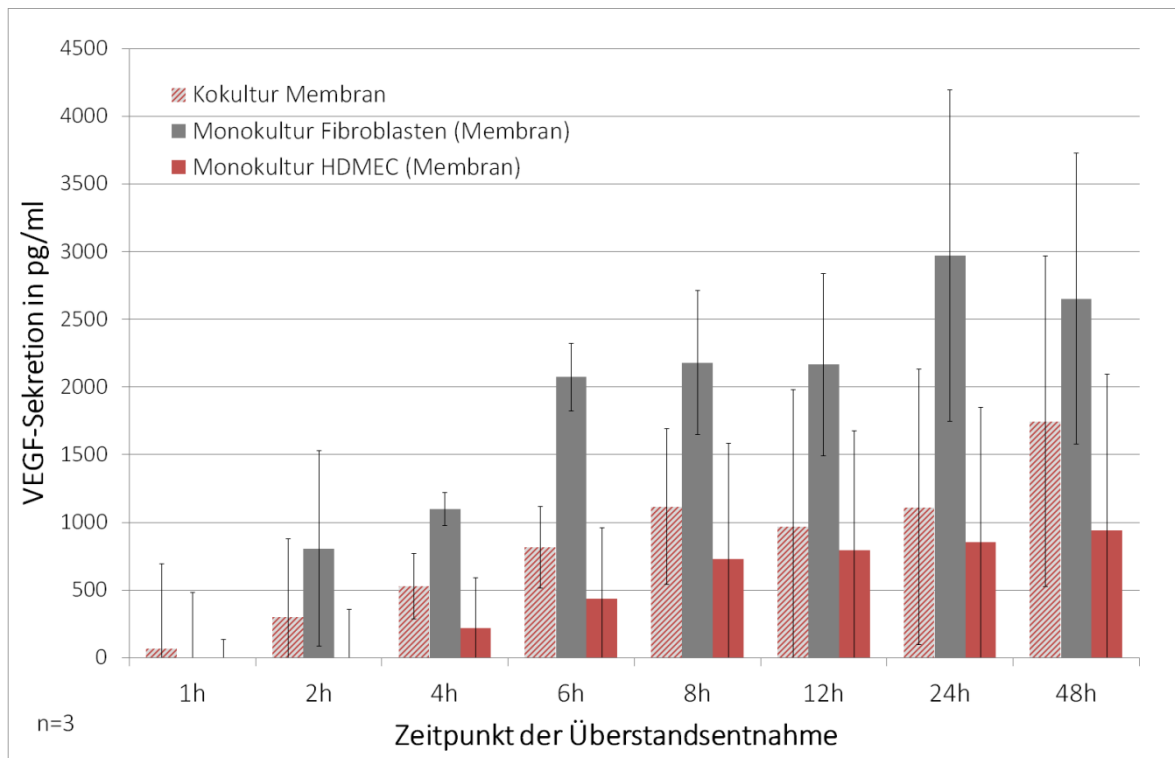
die VEGF-Sekretion von HDMEC an Tag 3 70 pg/ml, stieg an Tag 11 auf 85 pg/ml und fiel dann wieder ab auf 60 pg/ml an Tag 21 (Abbildung 38).



**Abbildung 38 - Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

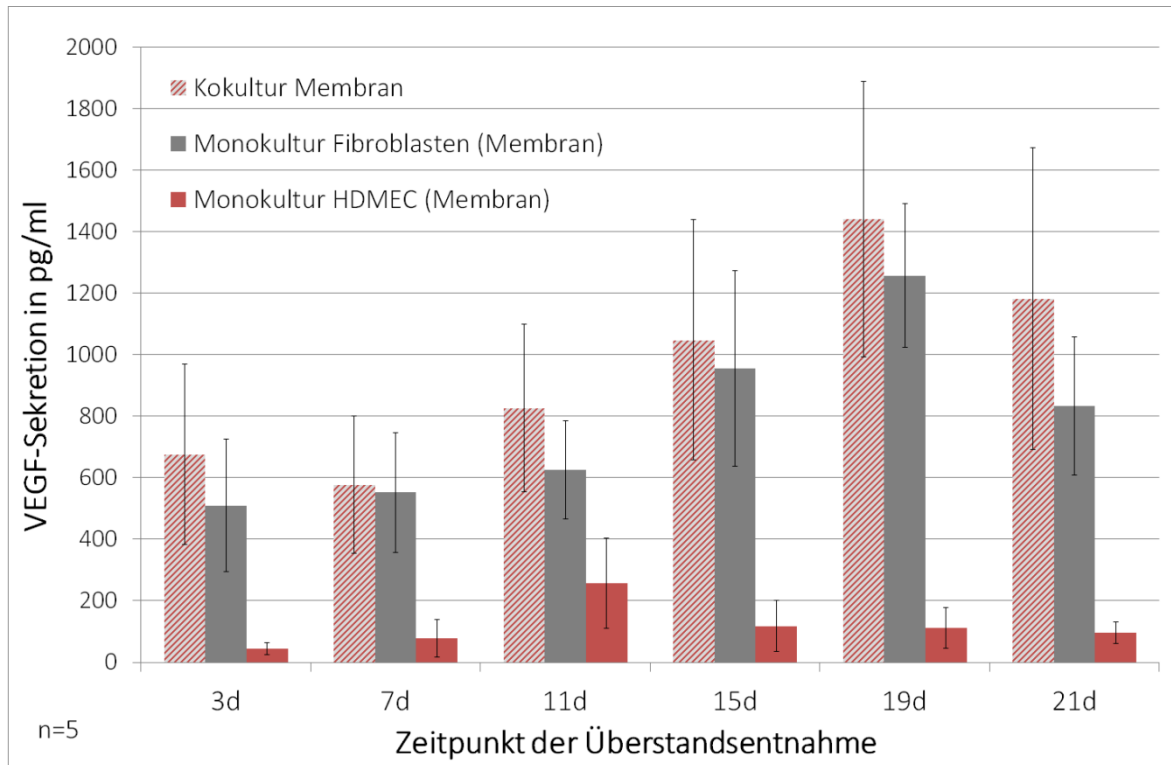
### 3.3.2.2 Einfluss der Kokultivierung auf die Sekretion von VEGF

Die beschriebene Sekretion von VEGF durch Monokulturen auf Bio-Gide®-Membranen wurde mit der Sekretion von entsprechenden Kokulturen aus Fibroblasten und HDMEC verglichen. Dabei lag die VEGF-Konzentration in der Kokultur durchgehend über der, die von HDMEC in Monokultur ausgeschüttet wurde, jedoch unter der von Fibroblasten sezernierten. Innerhalb der ersten acht Stunden erhöhte sich die VEGF-Sekretion in Kokultur um 200 bis 300 pg/ml pro Stunde. In Kokultur betrug die Konzentration nach einer Stunde 70 pg/ml VEGF und steigerte sich auf ihr Maximum von 1750 pg/ml nach 48 h (Abbildung 39).



**Abbildung 39 - Sekretion von VEGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

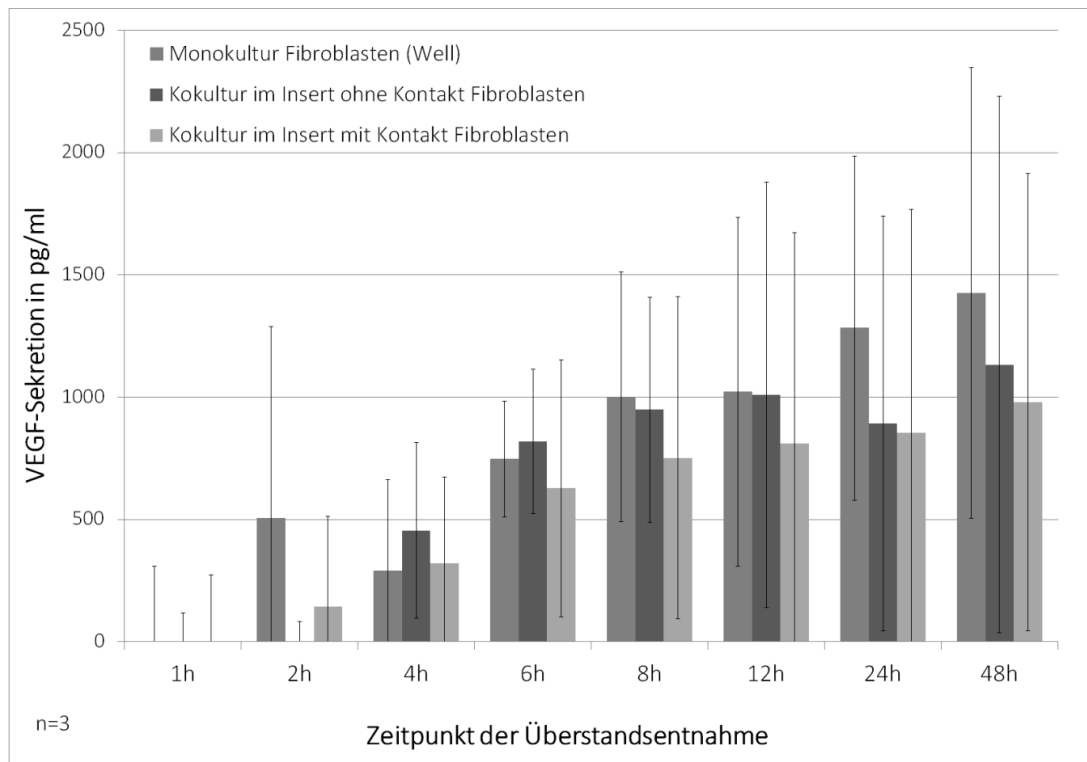
Über die 21-tägige Kultivierung steigerte sich die VEGF-Sekretion durch die Kokulturen ebenfalls von 675 pg/ml an Tag 3 bis auf ihr Maximum von 1440 pg/ml VEGF an Tag 19. An Tag 21 betrug die Sekretion 1180 pg/ml VEGF. Über die 21-tägige Kultivierungszeit lag die Konzentration an durch Kokulturen sezerniertem VEGF durchgehend über der von den Monokulturen ausgeschütteten Konzentration (Abbildung 40).



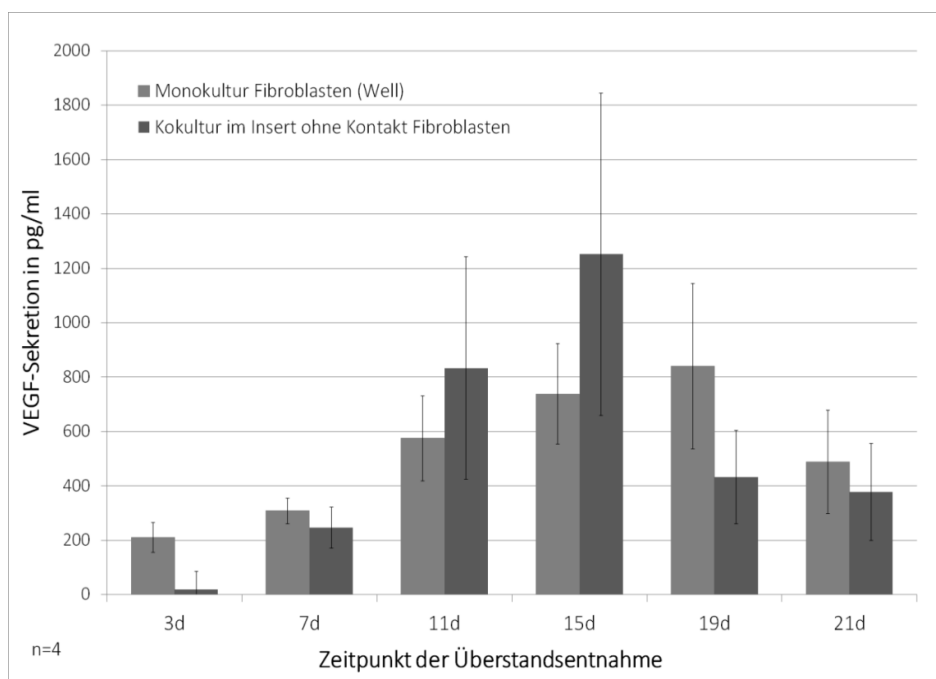
**Abbildung 40 - Sekretion von VEGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Bio-Gide® Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Zusätzlich wurde die VEGF-Sekretion der einzelnen Zelltypen in der Insertsysten-Kokultur mit bzw. ohne interzellulären Kontakt mit der Sekretion in Monokultur in Wells analysiert. Fibroblasten sezernierten in Monokultur, mit Ausnahme des 4- und 6-Stunden-Werts, stärker VEGF als in Kokultur. Die Kokulturen sezernierten bis zu 12. Kultivierungsstunde weniger VEGF als die Monokulturen. Die Kokulturen mit zellulärem Kontakt sezernierten im Vergleich am wenigsten VEGF. Nach 24 h und 48 h zeigte sich die Konzentration in Monokulturen gegenüber beiden Kokultur-Ansätzen deutlich erhöht (Abbildung 41).

Über die 21-tägige Kultivierung sezernierten die Fibroblasten in Monokultur an Tag 3, 7, 19 und 21 mehr VEGF als die Fibroblasten in Kokultur ohne interzellulären Kontakt. An Tag 11 sowie 15 wiesen letztere eine stärkere VEGF-Sekretion auf, mit einem Maximum von 1250 pg/ml an Tag 15 (Abbildung 42).

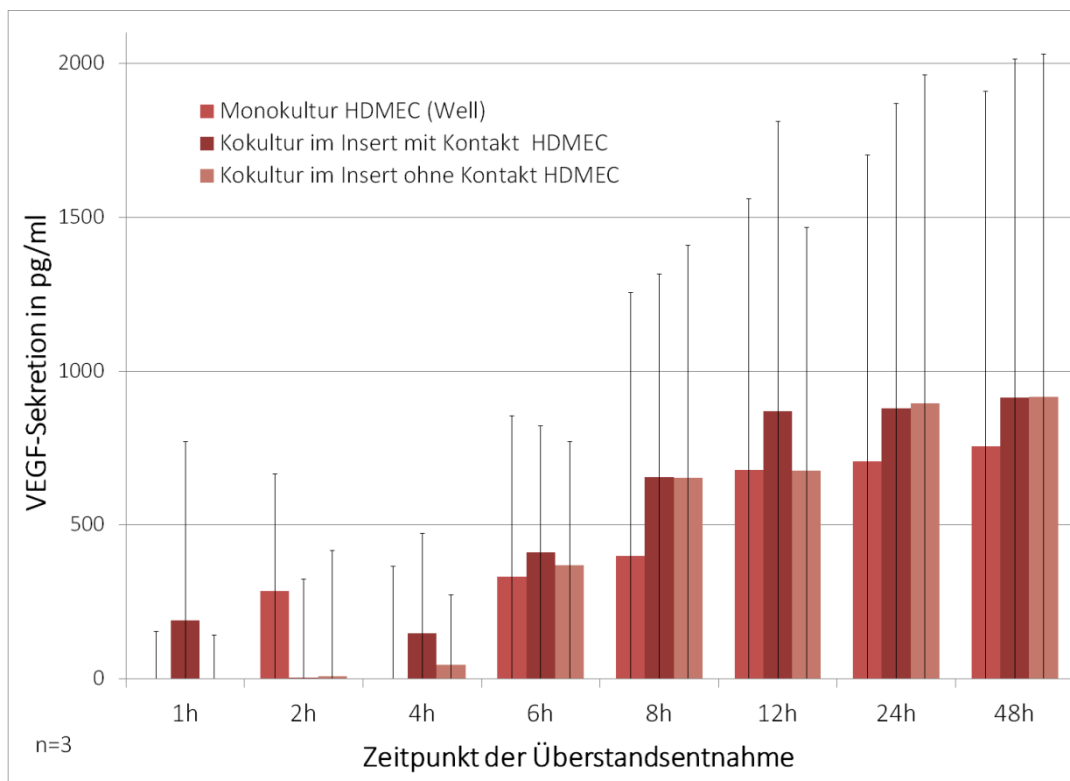


**Abbildung 41 - Sekretion von VEGF durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten (erste, mittelgraue Balken) mit der von Fibroblasten in Kokultur mit HDMEC mit (zweite, dunkelgraue Balken) bzw. ohne (dritte, hellgraue Balken) direkten zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

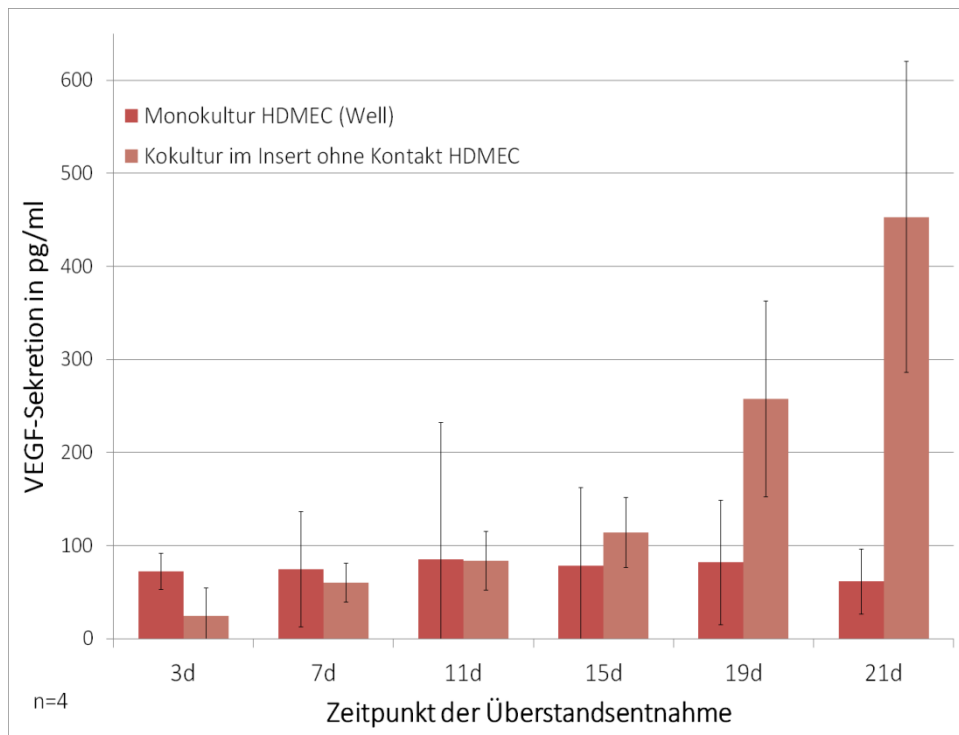


**Abbildung 42 - Sekretion von VEGF durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten (erste, mittelgraue Balken) mit der von Fibroblasten in Kokultur mit HDMEC ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, dunkelgraue Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Die VEGF-Sekretion durch HDMEC lag in den ersten 48 h der Kultivierung in den Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt höher als in den Monokulturen (Abbildung 43). Sie sezernierten dabei nach 48 h ca. 915 pg/ml VEGF. Über die 21-tägige Kultivierung zeigten HDMEC in Monokultur an Tag 3 eine höhere VEGF-Sekretion als die HDMEC in Kokultur. An Tag 7 und 11 sezernierten alle Ansätze ungefähr gleich viel VEGF. Ab Tag 15 stieg die VEGF-Sekretion im Kokultur-Ansatz jedoch deutlich über die in Monokultur sezernierte Konzentration, mit einem Maximum von 450 pg/ml VEGF an Tag 21 (Abbildung 44).



**Abbildung 43 - Sekretion von VEGF durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von HDMEC (erste, mittelrote Balken) mit der von HDMEC in Kokultur mit Fibroblasten mit (zweite, dunkelrote Balken) bzw. ohne (dritte, hellrote Balken) direkten zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

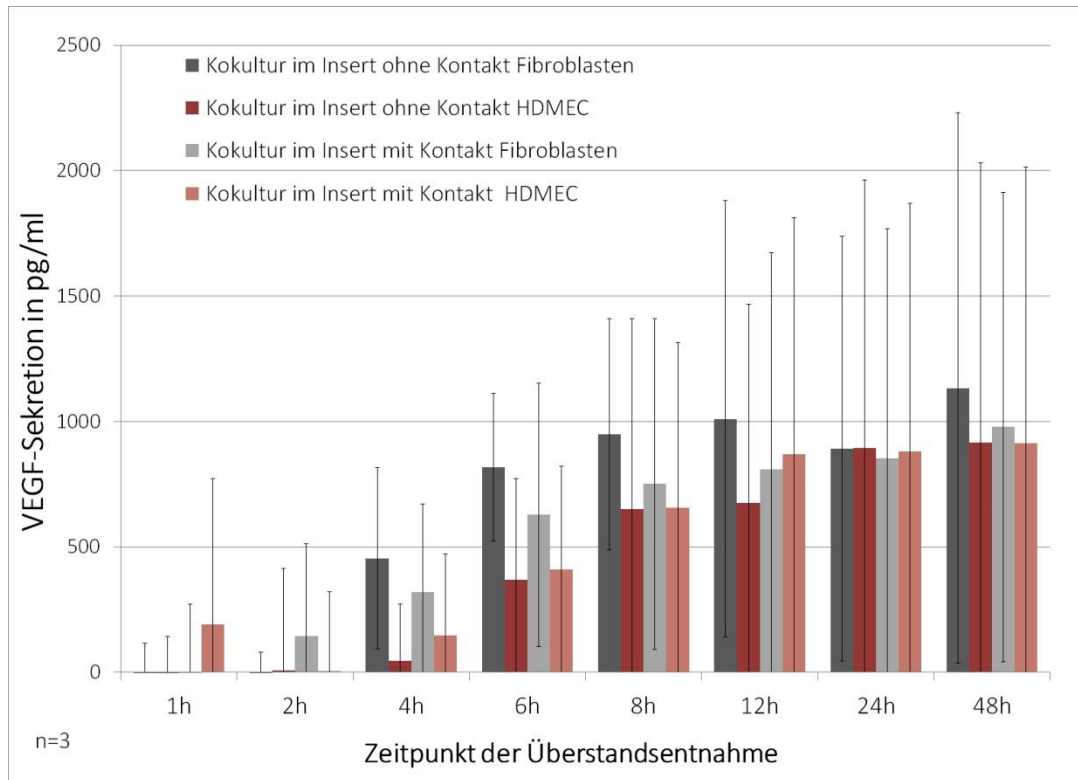


**Abbildung 44 - Sekretion von VEGF durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Monokulturen von HDMEC (erste, mittelrote Balken) mit der von HDMEC in Kokultur mit Fibroblasten ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, hellrote Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.3.2.3 Einfluss von interzellulärer und parakriner Kommunikation auf die Sekretion von VEGF

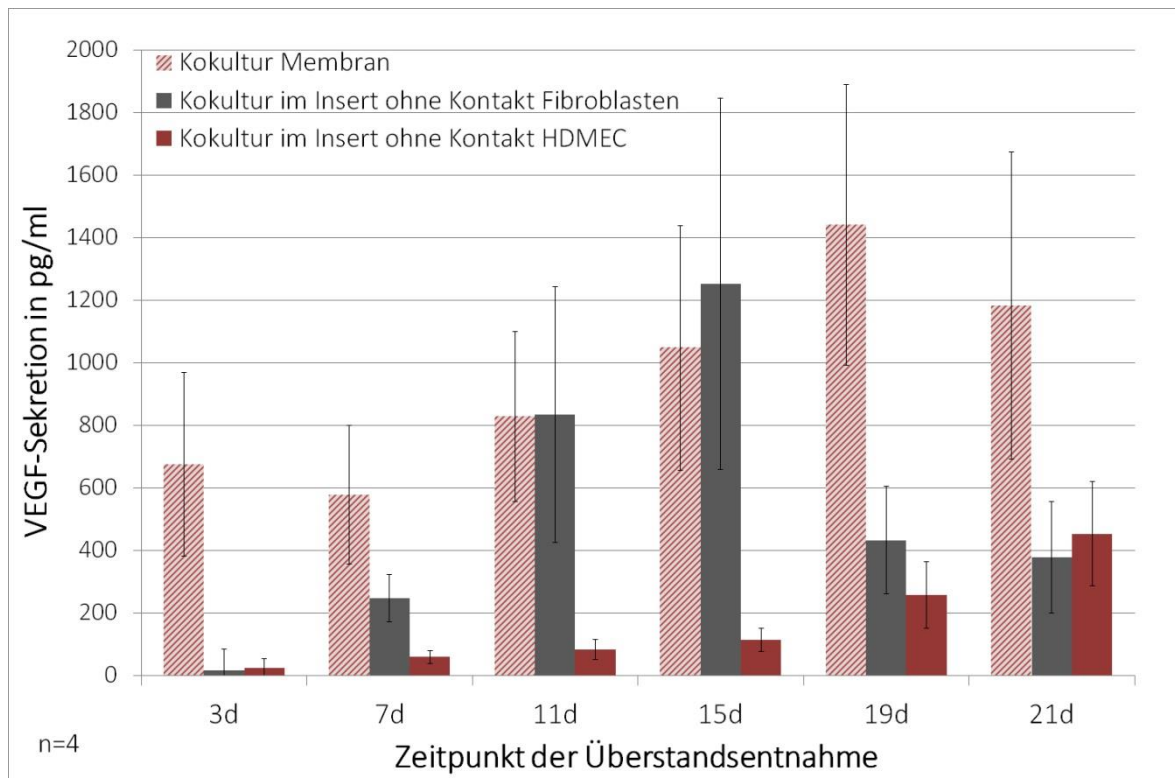
In Kokulturen mit Zell-Zell-Kontakt war die Sekretion von VEGF durch Fibroblasten fast durchgehend niedriger als die von Fibroblasten, die keinen direkten zellulären Kontakt zu HDMEC hatten. Letztere sezernierten bis zur vierten Stunde ca. 455 pg/ml VEGF. Dies steigerte sich kontinuierlich bis auf ein Maximum von 1130 pg/ml VEGF nach 48 h. Fibroblasten mit zellulärem Kontakt zu HDMEC sezernierten innerhalb der ersten zwei Stunden ca. 145 pg/ml VEGF, was sich im weiteren Verlauf bis auf 980 pg/ml VEGF nach 48 h steigerte (Abbildung 45).

Die HDMEC sezernierten durchgehend weniger VEGF als die Fibroblasten. Im Vergleich zeigte sich meist kein Unterschied in der VEGF-Sekretion von HDMEC mit bzw. HDMEC ohne zellulären Kontakt zu Fibroblasten. Die VEGF-Sekretion stieg von anfangs 190 pg/ml in den Kokulturen ohne Kontakt bzw. 45 pg/ml in den Kokulturen mit Kontakt bis auf ein gemeinsames Maximum von 915 pg/ml VEGF nach 48 h (Abbildung 45).



**Abbildung 45 - Sekretion von VEGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit und ohne zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über die 21-tägige Kultivierung sezernierten die Kokulturen auf den Bio-Gide®-Membranen fast durchgehend mehr VEGF als die Kokulturen ohne direkten zellulären Kontakt. Einzig an Tag 11 und Tag 15 zeigten die Fibroblasten in Kokultur ohne Zell-Zell-Kontakt eine ähnlich starke oder höhere VEGF-Sekretion als die Kokulturen auf Bio-Gide®. Auf der Bio-Gide® sezernierten die Zellen an Tag 3 ca. 675 pg/ml, was sich auf ein Maximum von 1440 pg/ml an Tag 19 steigerte. In Kokulturen ohne interzellulären Kontakt sezernierten beide Zelltypen an Tag 3 vergleichsweise nur minimal VEGF. Die Fibroblasten steigerten ihre VEGF-Sekretion anschließend auf ein Maximum von 1250 pg/ml an Tag 15. Anschließend sank die VEGF-Sekretion durch Fibroblasten wieder ab. Die HDMEC in Kokulturen ohne Kontakt sezernierten durchgehend weniger VEGF, steigerten sich aber von 25 pg/ml an Tag 3 auf 450 pg/ml an Tag 21 (Abbildung 46).



**Abbildung 46 - Sekretion von VEGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von VEGF in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit und ohne zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels VEGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.3.3 Quantifizierung der Interleukin-8-Sekretion

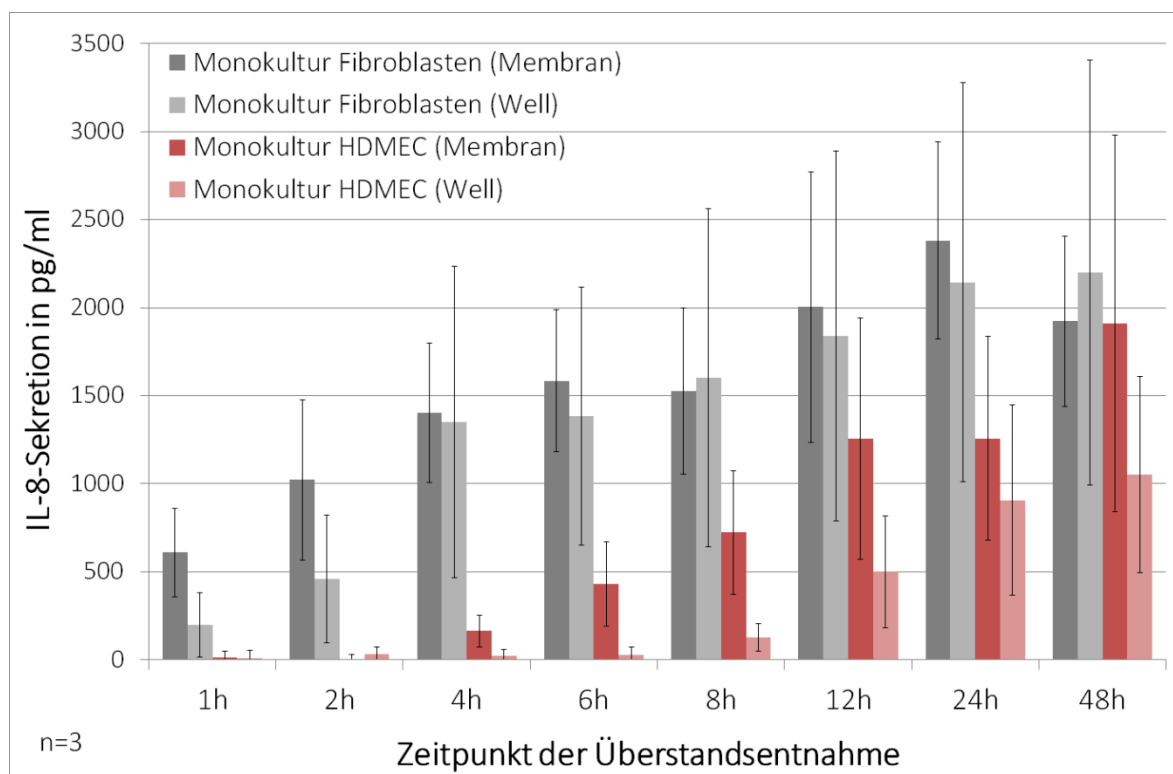
Interleukin-8, auch IL-8 oder CXCL8, zeigte im *Multi Cytokine ELISA* die stärkste Steigerung der Sekretion und wurde aufgrunddessen eingehender analysiert. IL-8 ist ein pro-inflammatorisches Chemokin, welches zudem fördernd auf Proliferation, Migration und Invasion von Endothelzellen wirken kann und damit als wichtiger Initiator und Unterstützer der Angiogenese *in vivo* gilt [197–199].

#### 3.3.3.1 Einfluss der Kollagenmembran auf die Sekretion von IL-8

Die Sekretion von IL-8 durch Fibroblasten in Monokultur zeigte sich in den ersten zwei Stunden der Kultivierung auf den Bio-Gide®-Membranen deutlich höher als bei Kultivierung ohne Membran. Die IL-8-Sekretion stieg bei beiden Ansätzen stetig. Im Well sezernierten die Fibroblasten innerhalb der ersten Stunde etwa 200 pg/ml IL-8, was sich auf ein

Maximum von 2200 pg/ml nach 48 h steigerte. Auf der Bio-Gide®-Membran sezernierten sie innerhalb der ersten Stunde 610 pg/ml IL-8 und erreichten ihr Maximum von 2380 pg/ml IL-8 nach 24 h (Abbildung 47).

Die IL-8-Sekretion der HDMEC lag durchgehend unterhalb der von den Fibroblasten. HDMEC in Monokultur auf Bio-Gide®-Membranen sezernierten durchgehend mehr IL-8 als im Well. Beide Ansätze steigerten die Sekretion kontinuierlich und erreichten ihr Maximum von 1910 pg/ml IL-8 auf der Membran bzw. 1050 pg/ml IL-8 im Well nach 48 h (Abbildung 47).

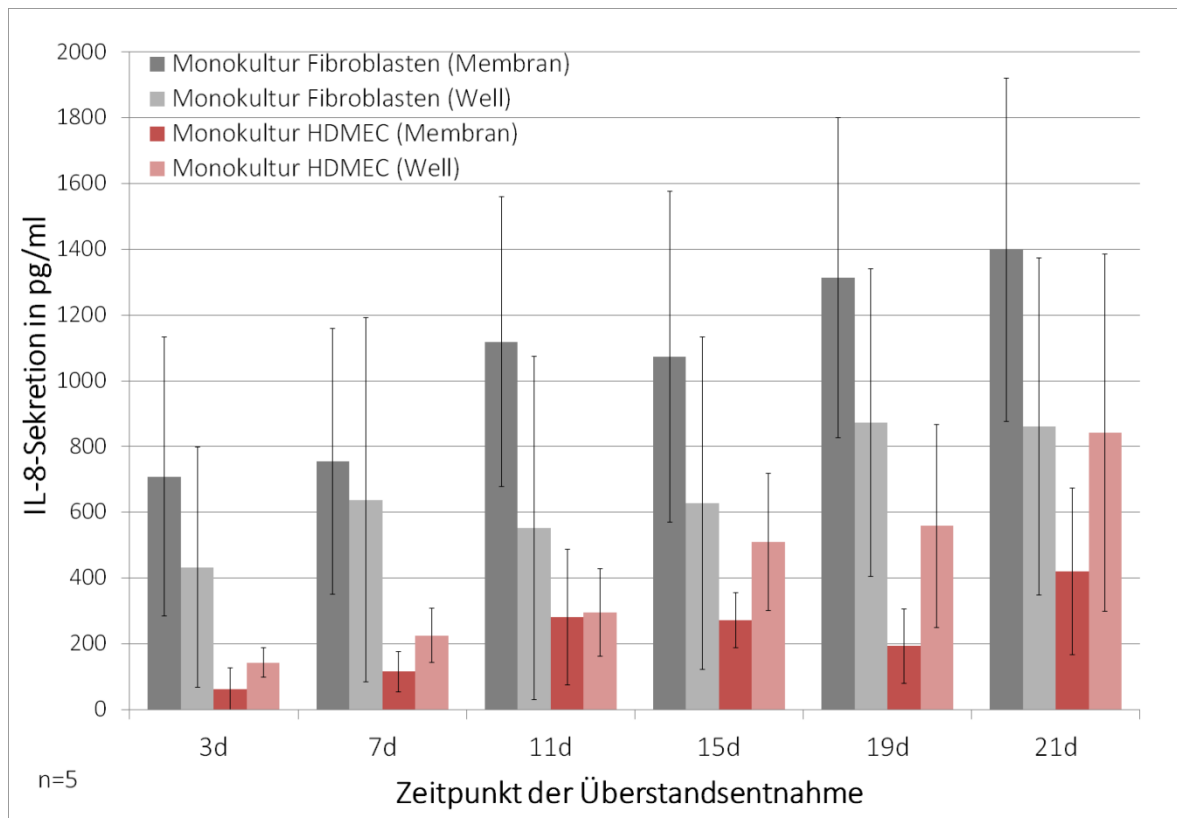


**Abbildung 47 - Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels IL-8-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Bei 21-tägiger Kultivierung sezernierten ebenfalls die Fibroblasten in Monokultur auf Bio-Gide®-Membranen am stärksten IL-8. Die Sekretion stieg von 710 pg/ml an Tag 3 auf ihr Maximum von 1400 pg/ml an Tag 21. Auch bei den Fibroblasten in Monokultur im Well steigerte sich die IL-8-Sekretion über die Zeit. An Tag 3 betrug sie 430 pg/ml, was sich auf

das Maximum von 870 pg/ml an Tag 19 steigerte (Abbildung 48).

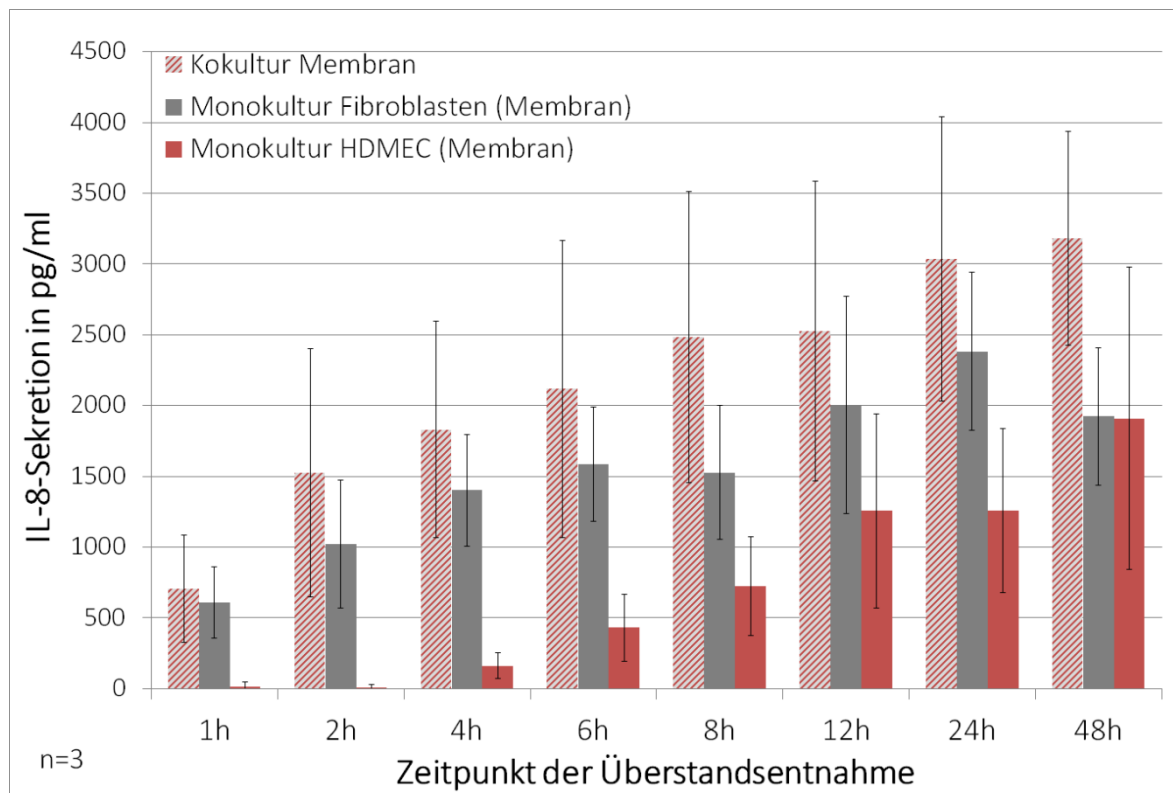
Die Endothelzellen zeigten durchgehend eine niedrigere IL-8-Sekretion als die Fibroblasten. Dabei sezernierten die HDMEC im Well stärker IL-8: die Konzentration stieg von 140 pg/ml an Tag 3 auf das Maximum von 840 pg/ml IL-8 an Tag 21. Auf der Bio-Gide®-Membran betrug die IL-8-Konzentration an Tag 3 60 pg/ml. Sie erreichte ihr Maximum von 420 pg/ml IL-8 an Tag 21 (Abbildung 48).



**Abbildung 48 - Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels IL-8-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

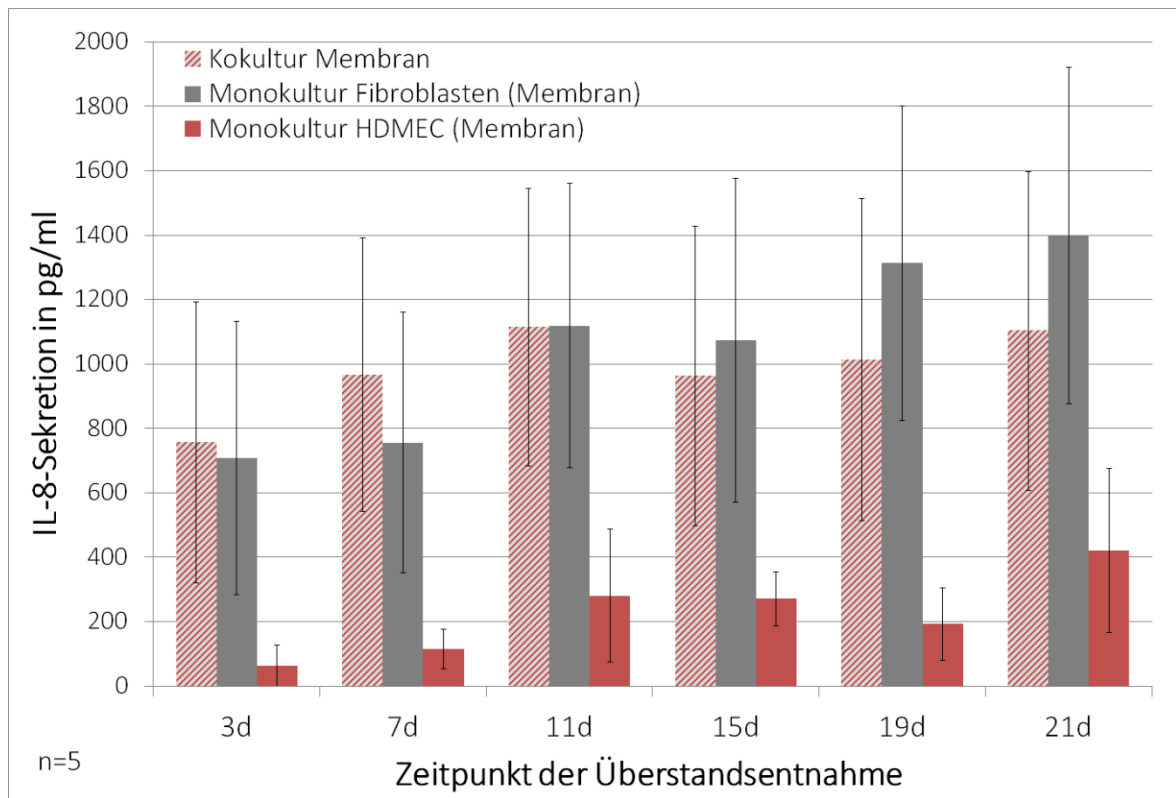
### 3.3.3.2 Einfluss der Kokultivierung auf die Sekretion von IL-8

Bei Kokultivierung von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide®-Membranen zeigte sich durchgehend eine stärkere IL-8-Sekretion als in den entsprechenden Monokulturen. Sie stieg kontinuierlich über die ersten 48 h der Kultivierung an. Nach einer Stunde betrug sie 705 pg/ml und steigerte sich bis zur 48 h-Entnahme auf 3180 pg/ml (Abbildung 49).



**Abbildung 49 - Sekretion von IL-8 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels IL-8-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über die 21-tägige Kultivierung zeigte sich die IL-8-Sekretion an Tag 3 und 7 ebenfalls in Kokultur am stärksten mit 755 pg/ml respektive 970 pg/ml. An Tag 11 zeigte sich kein Unterschied zwischen der von Kokulturen bzw. Fibroblasten in Monokultur sezernierten IL-8-Konzentration, beide sezernierten ca. 1115 pg/ml. An den folgenden Tagen sezernierten die Fibroblasten in Monokultur durchgehend mehr IL-8 als die Kokulturen. Bei letzteren betrug die IL-8-Konzentration an Tag 21 1100 pg/ml (Abbildung 50).



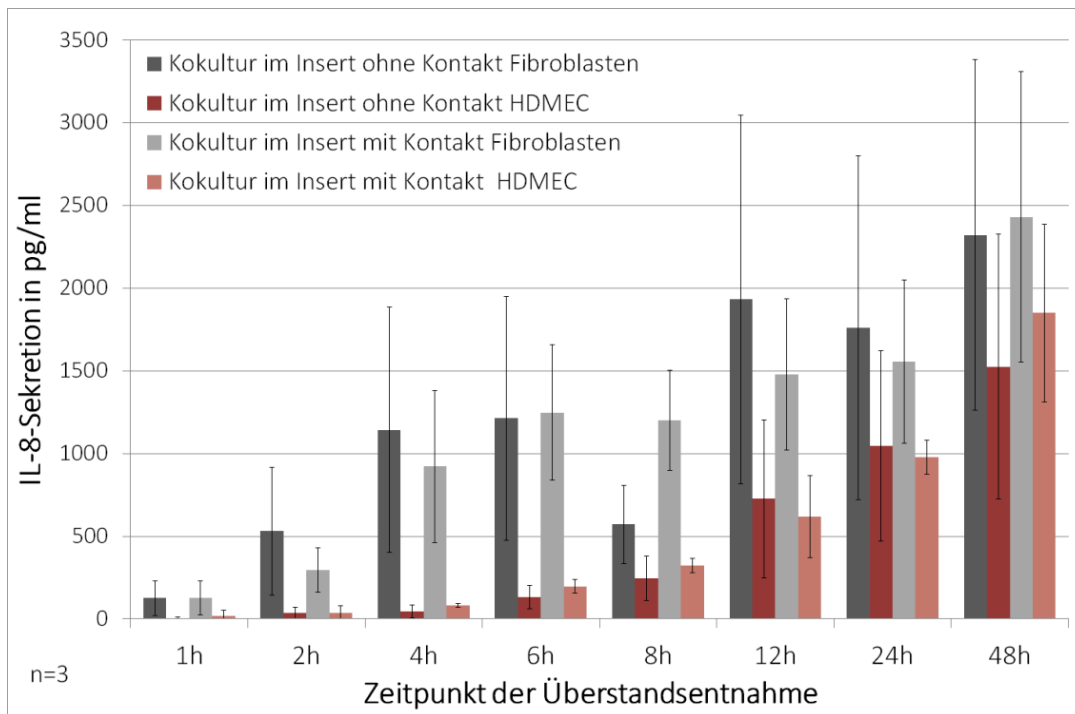
**Abbildung 50 - Sekretion von IL-8 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Bio-Gide® Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels IL-8-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Bei Vergleich der IL-8-Sekretion durch Fibroblasten bzw. HDMEC in den Insert-Kokulturen mit den jeweiligen Monokulturen im Well zeigten sich keine Unterschiede. Die Daten sind aus diesem Grund nicht dargestellt.

### 3.3.3.3 Einfluss von interzellulärer und parakriner Kommunikation auf die Sekretion von IL-8

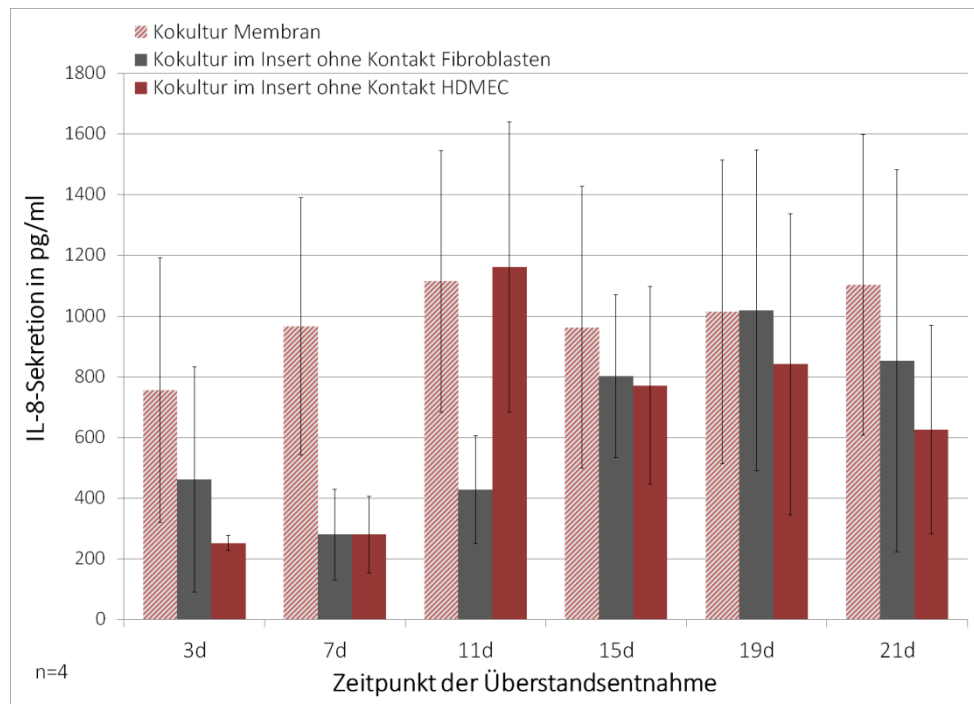
Bei Vergleich der Kokulturen mit und ohne direktem zellulären Kontakt zeigte sich die IL-8-Sekretion der Fibroblasten bzw. HDMEC jeweils ähnlich stark. Sie stieg in beiden über die Kultivierungszeit kontinuierlich an. Die Fibroblasten sezernierten dabei durchgehend mehr IL-8 als die HDMEC. Nach 1 h Kultivierungszeit sezernierten Fibroblasten mit und ohne Zell-Zell-Kontakt IL-8 in einer Konzentration von ca. 125 pg/ml. Beide Kokultur-Ansätze erreichten ihre Maxima nach 48 h mit 2320 pg/ml IL-8 im Ansatz ohne und 2430 pg/ml im Ansatz mit Kontakt (Abbildung 51).

Die HDMEC sezernierten bis zur sechsten Kultivierungsstunde vergleichsweise wenig IL-8 in Konzentrationen von 130 pg/ml im Ansatz ohne und 200 pg/ml im Ansatz mit interzellulärem Kontakt. Ihre Maxima wurden ebenfalls nach 48 h erreicht, mit Konzentrationen von 1525 pg/ml IL-8 im Ansatz ohne bzw. 1850 pg/ml IL-8 im Ansatz mit direktem zellulären Kontakt (Abbildung 51).



**Abbildung 51 - Sekretion von IL-8 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von IL-8 in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit und ohne zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels IL-8-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über die 21-tägige Kultivierung sezernierten die Kokulturen auf der Bio-Gide®-Membran bis auf die Tage 11 und 19 mehr IL-8 als die Ansätze im Insertsystem. An Tag 11 sezernierten die HDMEC im Insertsystem mit 1160 pg/ml am meisten IL-8. Dieser Wert entsprach auch ihrem Maximum. Die Fibroblasten im Insertsystem schütteten zu diesem Zeitpunkt 430 pg/ml IL-8 aus, die Kokulturen auf der Bio-Gide®-Membran ihr Maximum von 1115 pg/ml. Zu den nächsten Überstandsentsnahmen sezernierten die HDMEC im Insertsystem wiederum am wenigsten IL-8. Die Fibroblasten erreichten ihr Maximum an Tag 19 mit 1120 pg/ml IL-8. Zu dieser Entnahme sezernierten die HDMEC 840 pg/ml, die Membran-Kokulturen 1015 pg/ml (Abbildung 52).



**Abbildung 52 - Sekretion von IL-8 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von IL-8 in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) ohne zellulären Kontakt mit denen auf Bio-Gide® Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels IL-8-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.3.4 Quantifizierung der bFGF-Sekretion

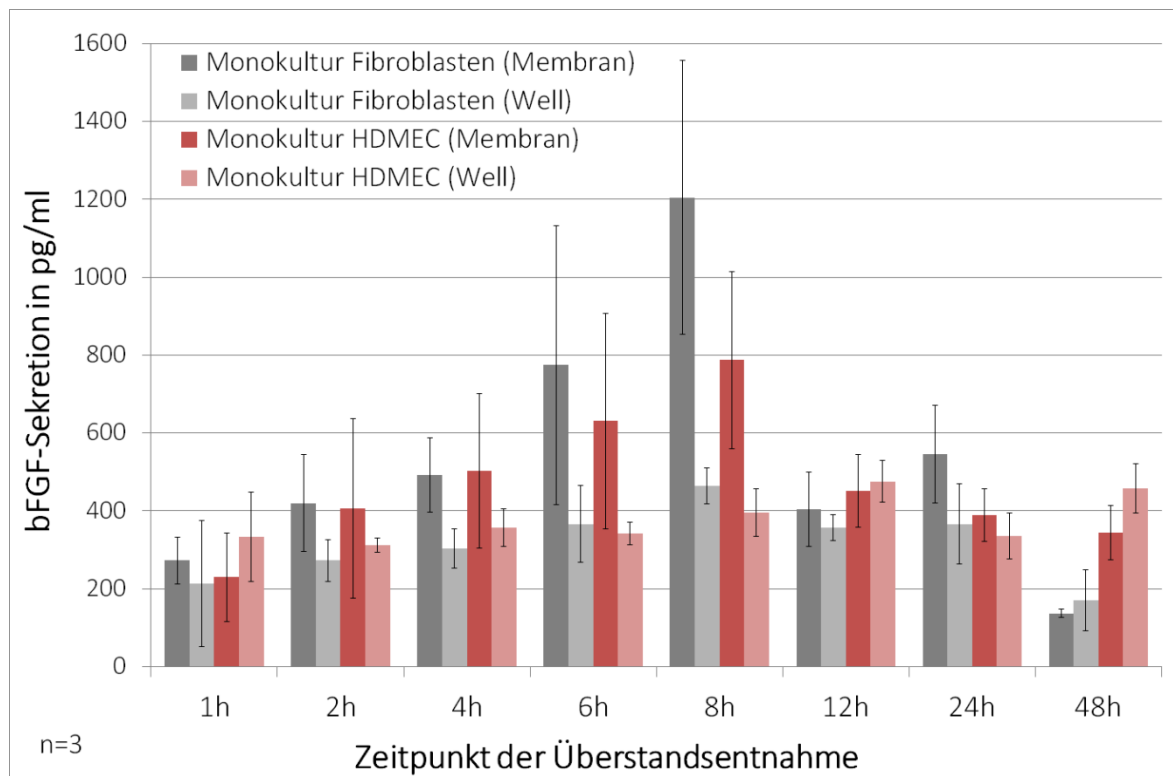
Aufgrund seiner starken pro-angiogenen Eigenschaften [200, 201] wurde auch die bFGF-Sekretion genauer quantifiziert und analysiert.

#### 3.3.4.1 Einfluss der Kollagenmembran auf die Sekretion von bFGF

Bei Vergleich der fibroblastären Monokulturen auf der Bio-Gide®-Membran und im Well zeigte sich bis auf den 48 h Wert stets eine höhere bFGF-Sekretion durch Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran. Diese stieg von anfangs 270 pg/ml bFGF stetig bis auf ihr Maximum von 1205 pg/ml nach 8 h. Auch im Well stieg die Sekretion stetig an, von anfangs 210 pg/ml auf 465 pg/ml nach 8 h. Im Anschluss sank die bFGF-Sekretion der Fibroblasten in beiden Ansätzen (Abbildung 53).

Die HDMEC sezernierten, bis auf den 1 h-, den 12 h- und den 48 h-Wert, ebenfalls verstärkt bFGF auf den Bio-Gide®-Membranen. Hier stieg die Konzentration ebenso stetig von

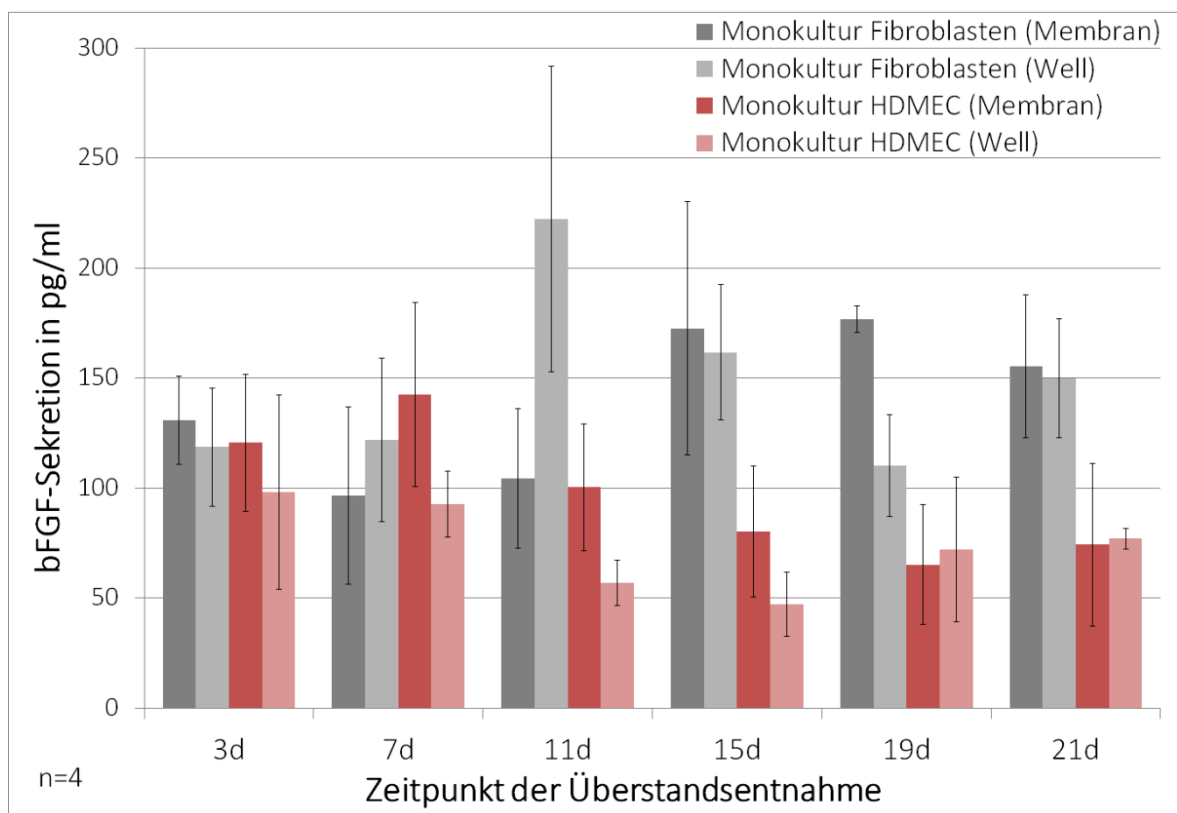
230 pg/ml zu Beginn bis auf ihr Maximum von 790 pg/ml nach 8 h. Im Well schwankte die bFGF-Sekretion durch HDMEC zu den ersten vier Zeitpunkten zwischen 310 pg/ml und 360 pg/ml. Ihr Maximum von 450 pg/ml bFGF erreichte sie nach 12 h (Abbildung 53).



**Abbildung 53 - Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Die bFGF-Sekretion von Fibroblasten und HDMEC zeigte sich über die 21-tägige Versuchsdauer höher bei Kultivierung auf der Bio-Gide®-Membran, mit Ausnahme des 7- und 11-Tages-Werts bei den Fibroblasten und des 19-Tages-Werts bei den HDMEC. Die Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran sezernierten schwankende Konzentrationen zwischen 95 pg/ml und 160 pg/ml bFGF, wobei ihr Maximum an Tag 19 erreicht wurde. Auch im Well schwankten die Werte zwischen Konzentrationen von 110 pg/ml und 220 pg/ml bFGF an Tag 11 (Abbildung 54).

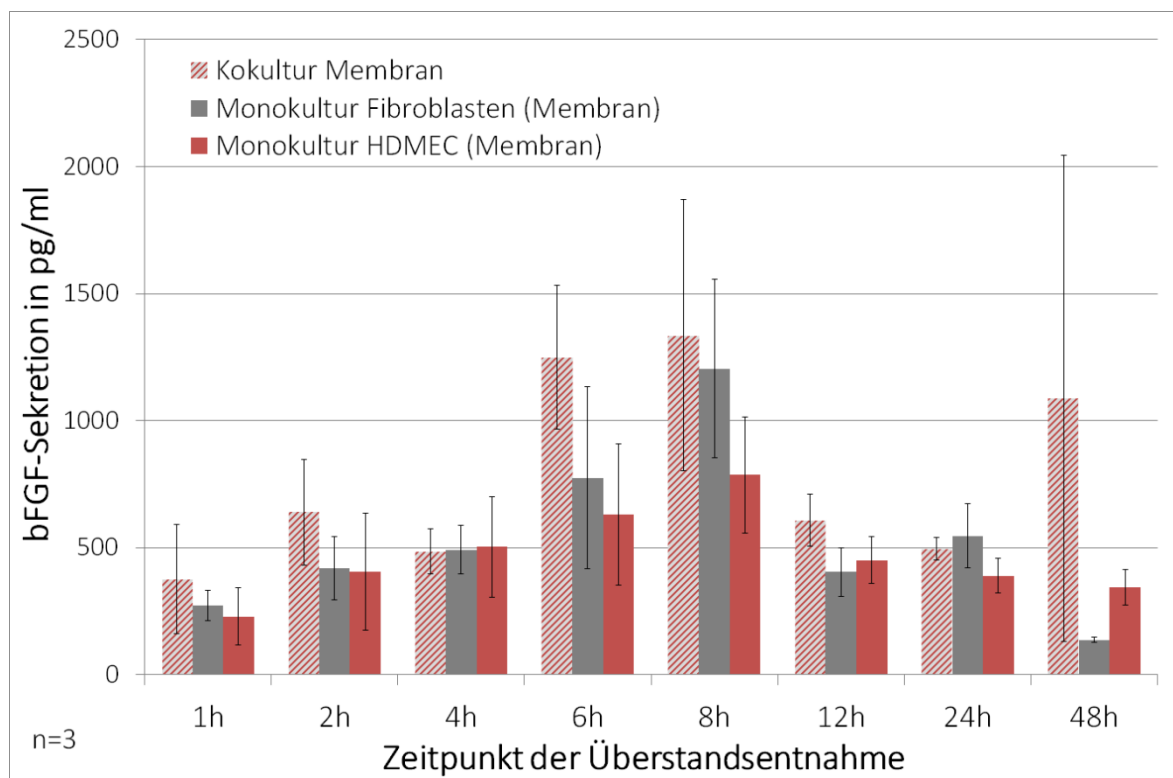
Die bFGF-Sekretion durch HDMEC sank über die Versuchsdauer ab. An Tag 3 sezernierten sie 120 pg/ml bFGF auf der Membran bzw. 100 pg/ml bFGF im Well. Dies sank bis auf ihr Minimum von 65 pg/ml bFGF auf der Membran an Tag 19 bzw. auf 50 pg/ml bFGF im Well an Tag 15 (Abbildung 54).



**Abbildung 54 - Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

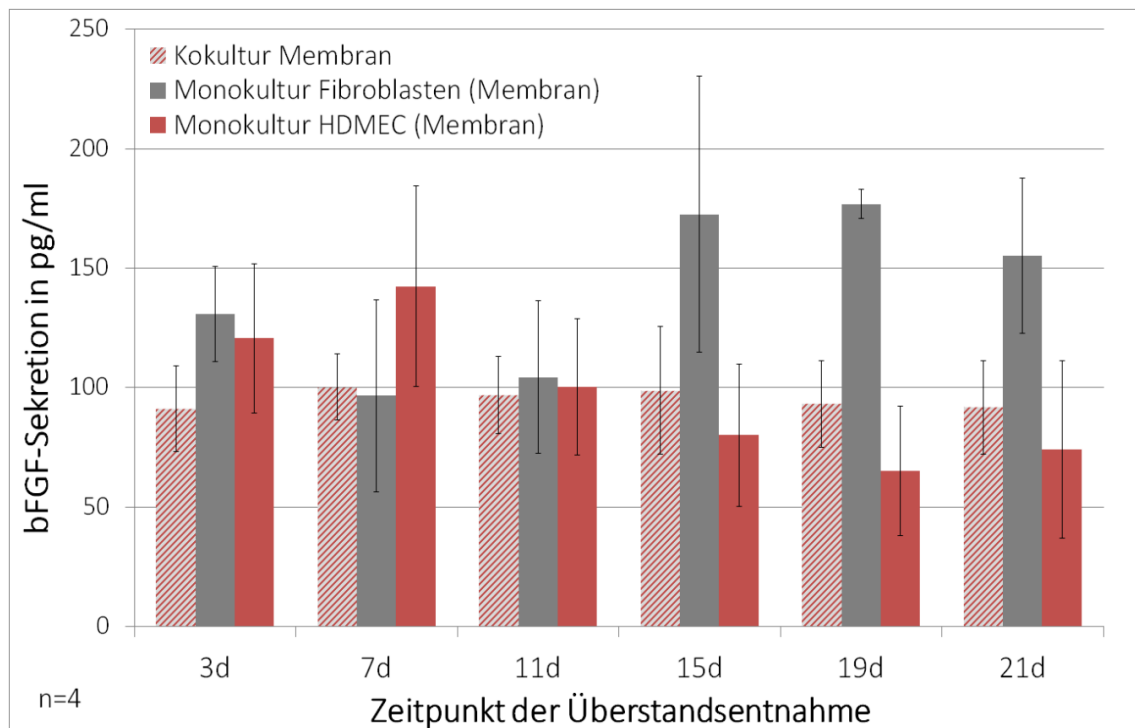
### 3.3.4.2 Einfluss der Kokultivierung auf die Sekretion von bFGF

Bei Vergleich der Kokulturen mit den Monokulturen auf der Bio-Gide®-Membran zeigte sich fast durchgehend eine stärkere bFGF-Sekretion durch die in Kokultur kultivierten Zellen. Die bFGF-Sekretion steigerte sich dabei von 375 pg/ml nach einer Stunde bis auf ihr Maximum von 1335 pg/ml nach 8 h. Anschließend sank die bFGF-Sekretion ab, bis auf 495 pg/ml nach 24 h. Zum 48 h-Wert steigerte sie sich nochmals auf 1090 pg/ml bFGF. Nach vier sowie 24 Stunden lag die bFGF-Sekretion durch Fibroblasten in Monokultur leicht höher als die der Kokulturen (Abbildung 55).



**Abbildung 55 - Sekretion von bFGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Kollagenmatrices. Dabei wurden bFGF 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

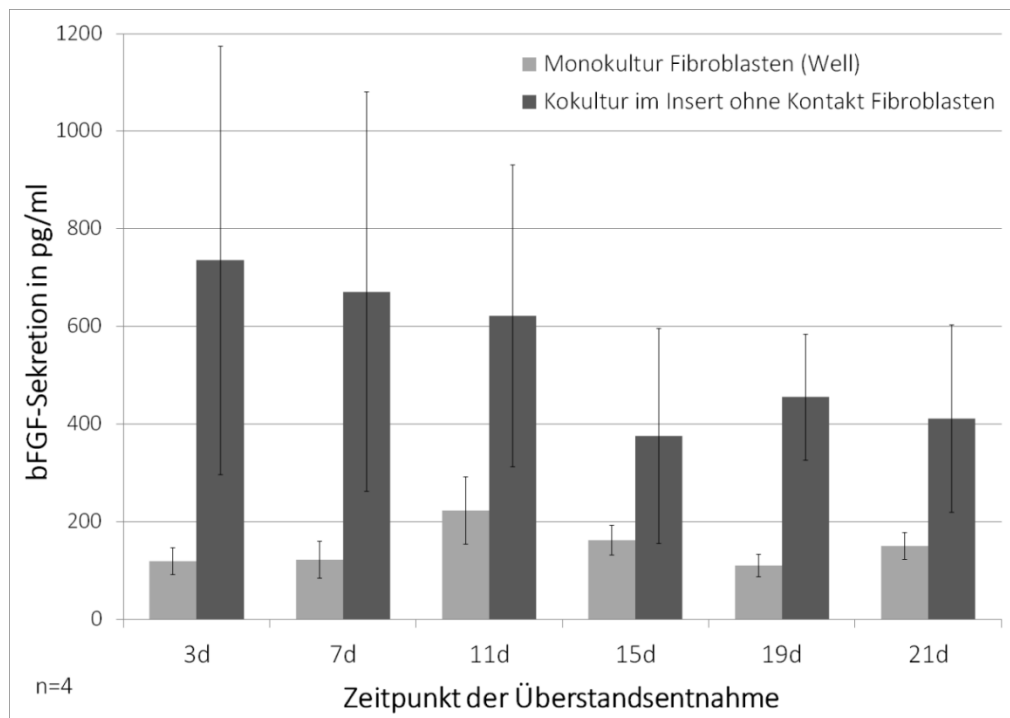
Über die 21-tägige Kultivierung sezernierten die Kokulturen auf den Bio-Gide®-Membranen bFGF relativ konstant zwischen 90 pg/ml und 100 pg/ml. Ihre bFGF-Sekretion lag dabei mit Ausnahme von Tag 11 durchgehend unterhalb der fibroblastären bFGF-Sekretion. An den Tagen 3 bis 11 sezernierten die Kokulturen weniger bFGF als die endothelialen Monokulturen, an den Tagen 15 bis 21 dagegen mehr (Abbildung 56).



**Abbildung 56 - Sekretion von bFGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Bio-Gide® Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

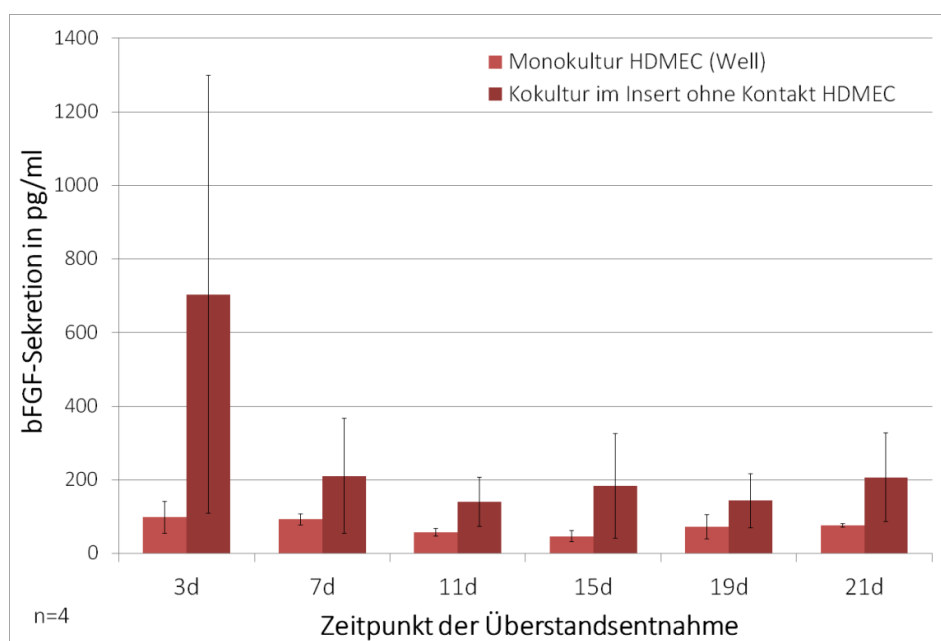
Beim Vergleich der Monokulturen im Well mit dem entsprechenden Kokultur-Part im Insertsystem zeigten sich über die kurzen Kultivierungszeiten keine Unterschiede der bFGF-Sekretion (nicht dargestellt).

Über die längere Versuchsdauer sezernierten Fibroblasten in Kokultur eine deutlich höhere Menge an bFGF im Gegensatz zu fibroblastären Monokulturen im Well. In letzterer sezernierten die Fibroblasten zwischen 120 pg/ml und 160 pg/ml bFGF, mit einem Maximum an Tag 11 mit 220 pg/ml. In Kokultur im Insertsystem sezernierten sie an Tag 3 ihr Maximum von 735 pg/ml bFGF. Die Konzentration sank anschließend im Verlauf des Versuchs stetig, bis auf einen Wert von 375 pg/ml bFGF an Tag 15. Anschließend stieg die bFGF-Konzentration wieder etwas an (Abbildung 57).



**Abbildung 57 - Sekretion von bFGF durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten (erste, mittelgraue Balken) mit der von Fibroblasten in Kokultur mit HDMEC ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, dunkelgraue Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Auch bei den HDMEC zeigte sich diese Tendenz einer höheren Sekretion von bFGF bei Kokultivierung im Insertsystem ohne Zellkontakt. An Tag 3 sezernierten die HDMEC im Well knapp 100 pg/ml bFGF, wohingegen die HDMEC im Insertsystem 705 pg/ml bFGF ausschütteten, jedoch mit einer großen Varianz zwischen den Versuchsdurchläufen. Die bFGF-Sekretion der HDMEC im Well sank mit zunehmender Versuchsdauer bis auf 50 pg/ml bFGF an Tag 15. An Tag 21 war sie nochmals gesteigert bei 80 pg/ml bFGF. Im Insertsystem sank die sezernierte bFGF-Menge ebenfalls und schwankte zu den anderen Zeitpunkten zwischen 140 pg/ml und 210 pg/ml bFGF (Abbildung 58).



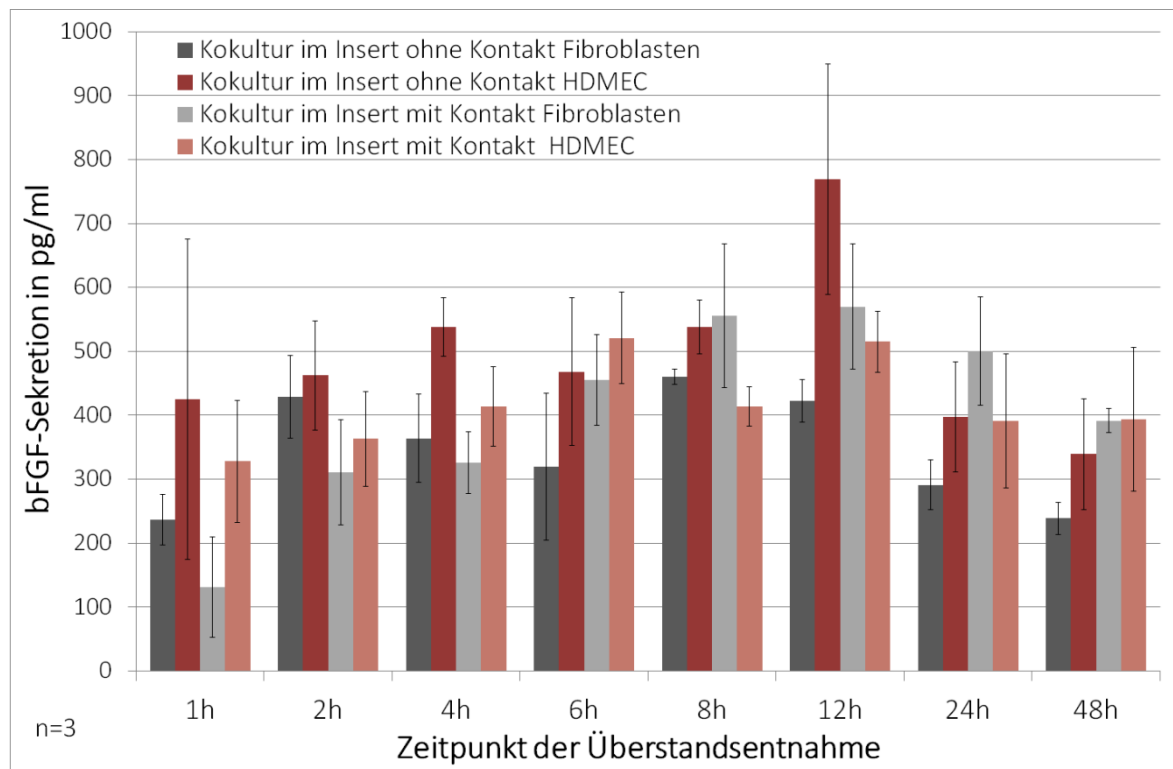
**Abbildung 58 - Sekretion von bFGF durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Monokulturen von HDMEC (erste, mittelrote Balken) mit der von HDMEC in Kokultur mit Fibroblasten ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, hellrote Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.3.4.3 Einfluss von zellulärer und parakriner Kommunikation auf die Sekretion von bFGF

Bei Kokultivierung ohne Kontakt sezernierten die HDMEC durchgehend mehr bFGF als die Fibroblasten. Bei den HDMEC erhöhte sich die bFGF-Sekretion bis zur 12. Stunde stetig von 425 pg/ml auf 770 pg/ml. Anschließend sank sie wieder auf 340 pg/ml bFGF nach 48 h. Die zugehörigen Fibroblasten sezernierten nach 1 h 240 pg/ml bFGF, was im Folgenden ebenfalls anstieg. Die Werte zeigten sich hier schwankend mit Konzentrationen zwischen

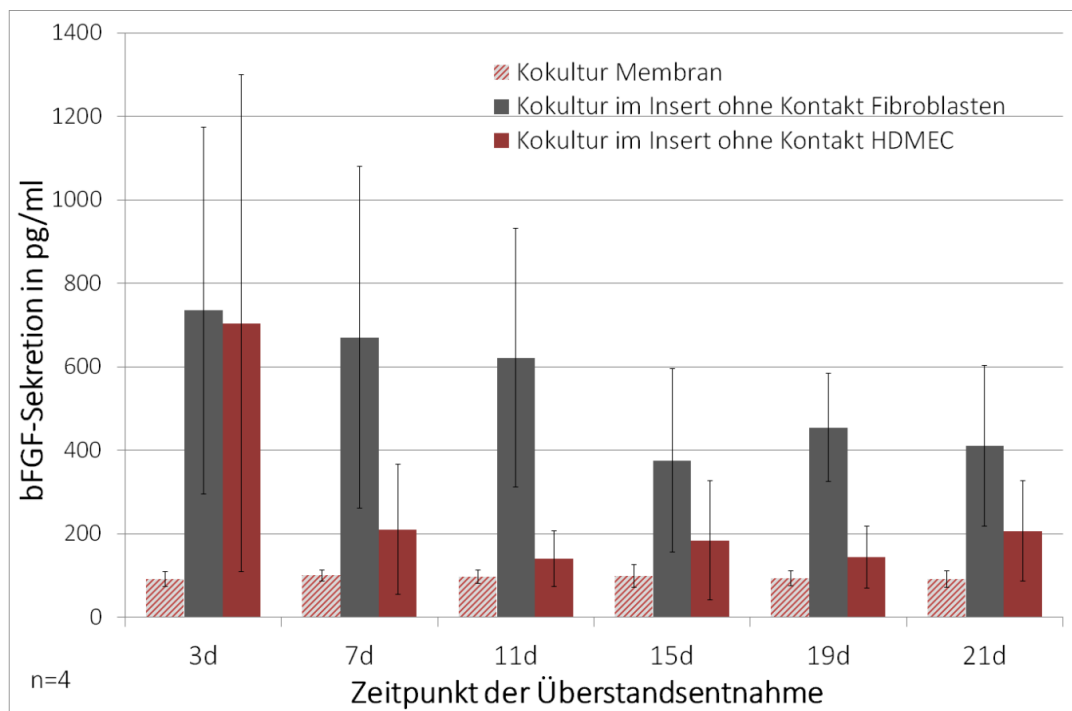
240 pg/ml und dem Maximalwert von 460 pg/ml bFGF nach 8 h (Abbildung 59).

Im Ansatz der Kokulturen mit zellulärem Kontakt war eine stärkere bFGF-Sekretion durch HDMEC als durch Fibroblasten nur bis einschließlich der sechsten Stunde zu beobachten. Anschließend sezernierten die Fibroblasten vermehrt bFGF. Die durch HDMEC sezernierte bFGF-Konzentration betrug nach 1 h 330 pg/ml und stieg dann stetig an bis auf ihr Maximum von 520 pg/ml nach 6 h. Auch die von Fibroblasten sezernierte Menge stieg kontinuierlich von 130 pg/ml bFGF nach 1 h auf ihren Maximalwert von 570 pg/ml bFGF nach 12 h. Anschließend sank sie bFGF-Sekretion in beiden Ansätzen wieder ab (Abbildung 59).



**Abbildung 59 - Sekretion von bFGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit und ohne zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über eine längere Versuchsdauer sezernierten die Kokulturen ohne zellulären Kontakt durchgehend stärker bFGF als die Kokulturen auf der Bio-Gide®-Membran. Die Sekretion auf der Bio-Gide®-Membran wies kontinuierlich Werte zwischen 90 pg/ml und 100 pg/ml bFGF auf. Im Insertsystem zeigte sich an Tag 3 eine bFGF-Sekretion der Fibroblasten von 735 pg/ml und der HDMEC von 705 pg/ml. Beide sanken über die weitere Kultivierungszeit (Abbildung 60).



**Abbildung 60 - Sekretion von bFGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von bFGF in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) ohne zellulären Kontakt mit der Kokultur auf der Bio-Gide® Membran (rot-grau gestreifte Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels bFGF-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.3.5 Quantifizierung der eNOS-Sekretion

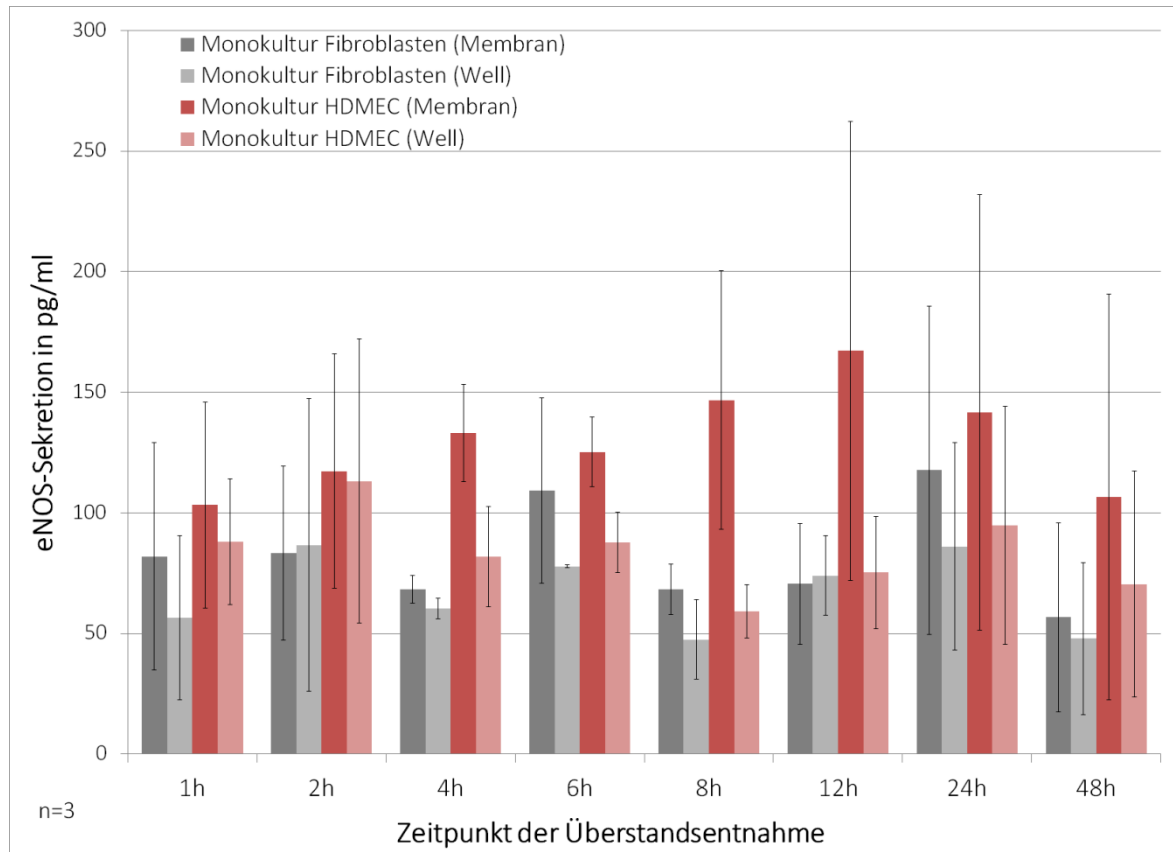
Zusätzlich zu den im *Multi Cytokine ELISA* nachgewiesenen Molekülen wurde die Sekretion der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) analysiert, da diese zur Bestimmung der Funktionalität und Differenzierung von Endothelzellen herangezogen werden kann [202].

#### 3.3.5.1 Einfluss der Kollagenmembran auf die Sekretion von eNOS

Die eNOS-Sekretion war bei monokultivierten Zellen auf der Bio-Gide®-Membran stärker als im Well, insbesondere bei den HDMEC. Deren eNOS-Sekretion war zudem durchgehend höher als die der Fibroblasten. Die HDMEC auf der Bio-Gide®-Membran sezernierten innerhalb der ersten Stunde 100 pg/ml eNOS, was sich über die Versuchsdauer durchgehend steigerte bis auf ihr Maximum von 170 pg/ml eNOS nach 12 h. Im Well zeigten sich die Werte schwankend: ausgehend von anfangs 90 pg/ml eNOS wurde der Maximalwert von

115 pg/ml nach 2 h erreicht. Anschließend schwankte die Konzentration zwischen 60 pg/ml und 95 pg/ml (Abbildung 61).

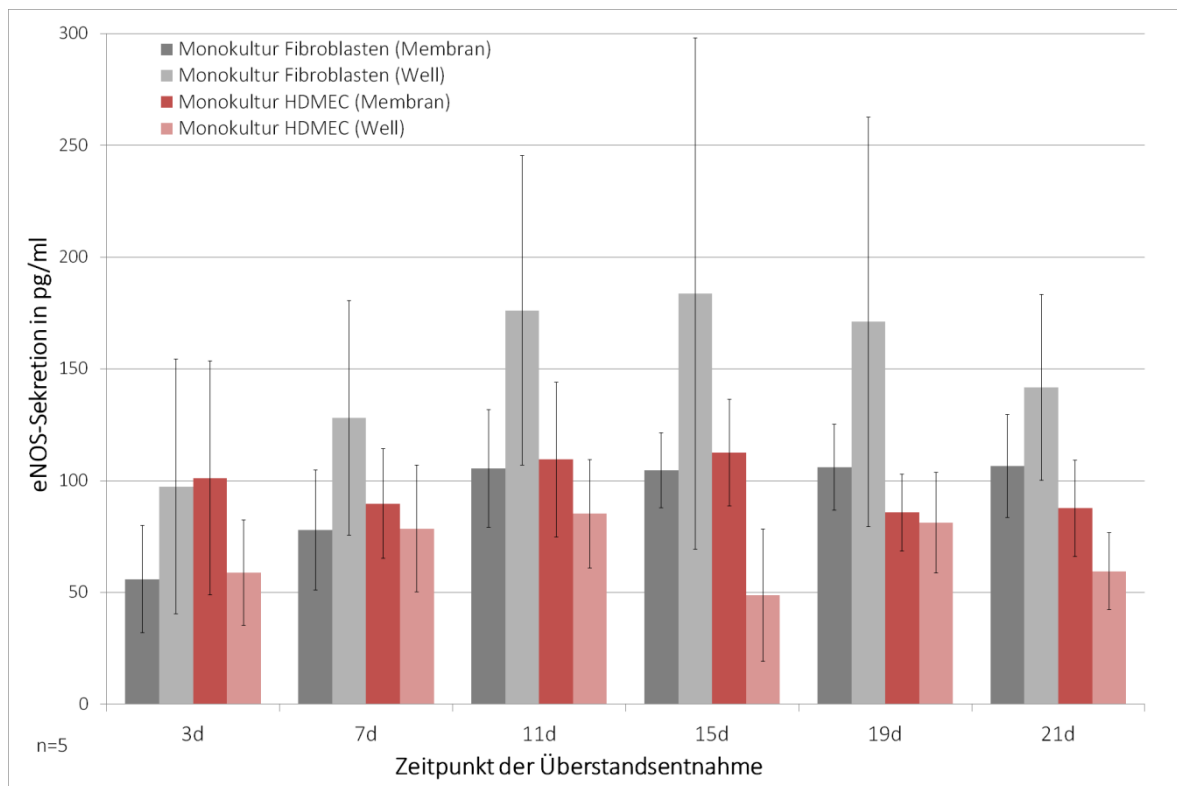
Die Fibroblasten sezernierten innerhalb der ersten Stunde knapp 80 pg/ml eNOS auf der Bio-Gide®-Membran bzw. 55 pg/ml im Well. Auf der Membran erreichte die eNOS-Sekretion ihr Maximum von 120 pg/ml nach 24 h. Im Well wurde nach zwei Stunden die maximale Menge von 120 pg/ml eNOS erreicht (Abbildung 61).



**Abbildung 61 - Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über 21 Tage betrachtet sezernierten die Fibroblasten in Monokultur im Well am meisten eNOS. Sie stieg von 100 pg/ml an Tag 3 auf ihren Maximalwert von 180 pg/ml an Tag 15. Anschließend fiel sie wieder ab. Auf der Bio-Gide®-Membran sezernierten die Fibroblasten nach drei Tagen 55 pg/ml eNOS. Die Konzentration stieg im weiteren Verlauf bis auf ihr Maximum von 105 pg/ml eNOS, in dessen Größenordnung die Konzentration an allen weiteren Versuchstagen lag (Abbildung 62).

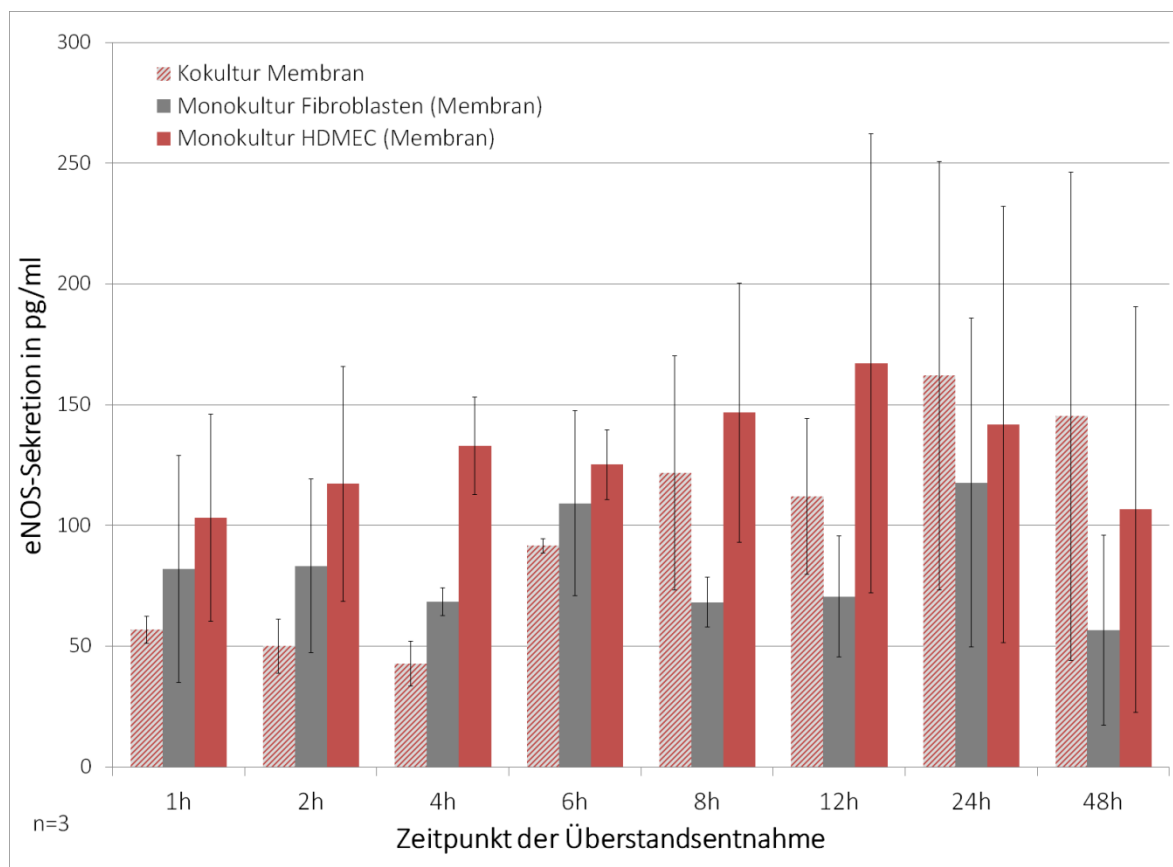
Die HDMEC sezernierten auf der Bio-Gide®-Membran durchgehend mehr eNOS als im Well. Auf der Membran betrug die eNOS-Konzentration an Tag 3 100 pg/ml und steigerte sich leicht auf ihr Maximum von 110 pg/ml nach 15 Tagen. Im Well betrug die eNOS-Konzentration an Tag 3 60 pg/ml. Diese stieg auf ihr Maximum von 85 pg/ml eNOS an Tag 11. Anschließend sank in beiden endothelialen Ansätzen die eNOS-Sekretion ab (Abbildung 62).



**Abbildung 62 - Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

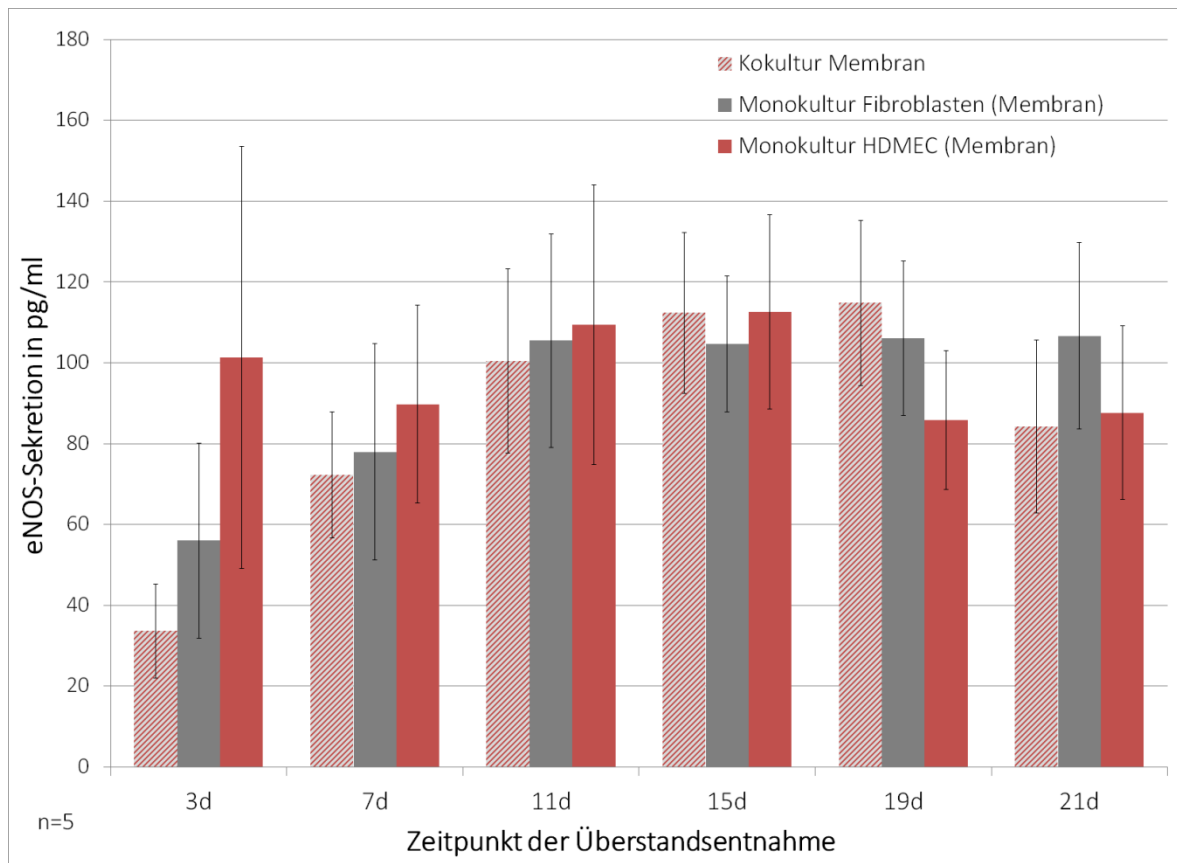
### 3.3.5.2 Einfluss der Kokultivierung auf die Sekretion von eNOS

In Kokultur von Fibroblasten und HDMEC auf den Bio-Gide®-Membranen zeigte sich in den ersten sechs Stunden eine niedrigere eNOS-Sekretion als in den entsprechenden Monokulturen. Ab der achten Stunde sezernierten die Kokulturen stärker eNOS als die monokultivierten Fibroblasten. Nach 24 h und 48 h zeigte sich die eNOS-Sekretion in Kokultur zudem höher als die der monokultivierten Endothelzellen. In der Kokultur steigerte sich die eNOS-Sekretion von anfangs 60 pg/ml bis auf das Maximum von 160 pg/ml nach 24 h (Abbildung 63).



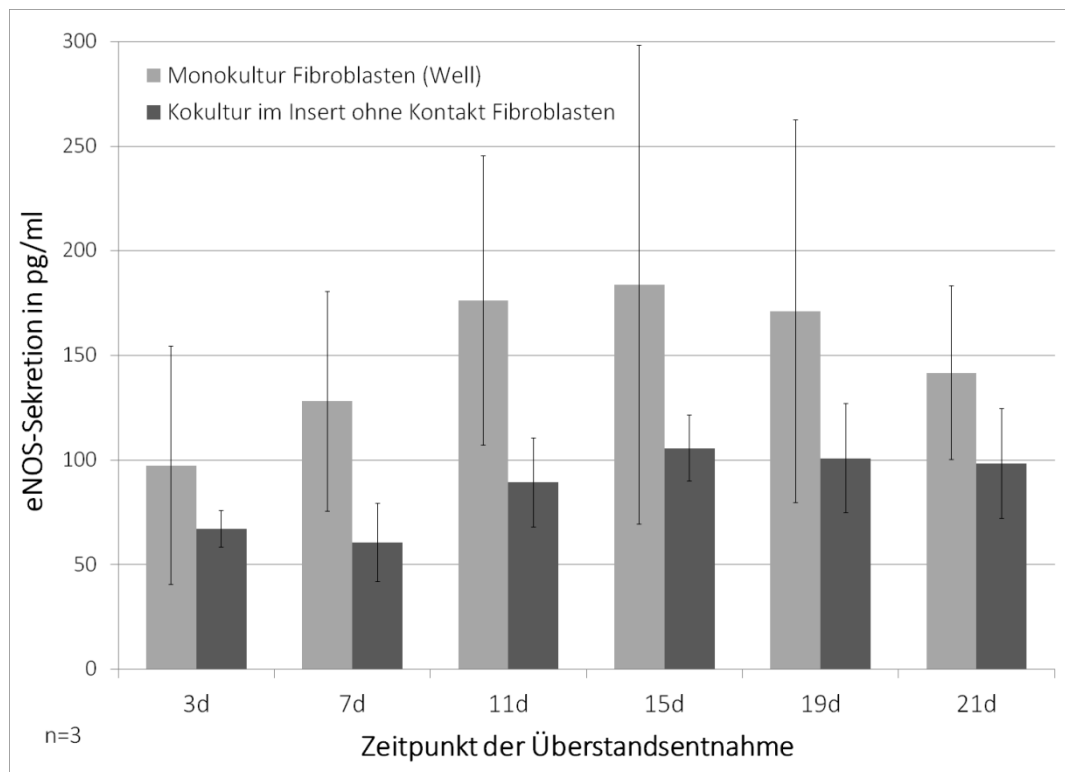
**Abbildung 63 - Sekretion von eNOS in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über die 21-tägige Versuchsdauer sezernierten die Zellen in Kokultur an Tag 15 und 19 eNOS stärker als die Monokulturen. An allen weiteren Tagen lag der Kokultur-Wert unter der eNOS-Sekretion der fibroblastären sowie der endothelialen Monokulturen. In der Kokultur steigerte sich die Sekretion von 35 pg/ml eNOS an Tag 3 bis auf ihr Maximum von 115 pg/ml eNOS an Tag 19. An Tag 21 war die eNOS-Sekretion nochmals reduziert (Abbildung 64).



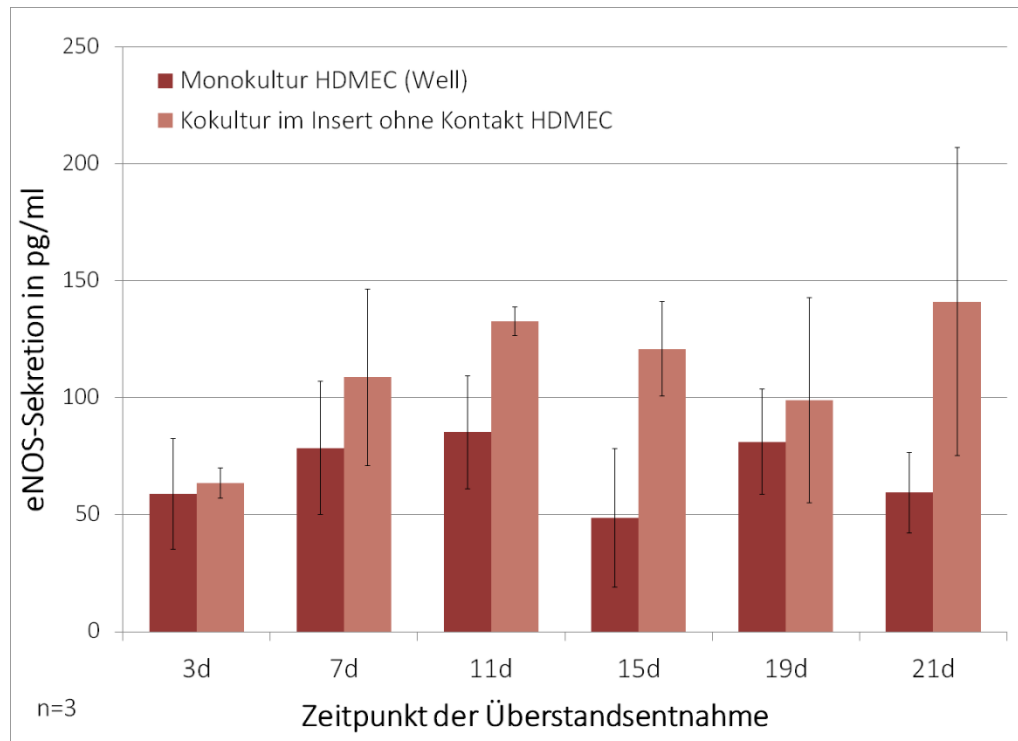
**Abbildung 64 - Sekretion von eNOS in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Bio-Gide® Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über 21 Tage betrachtet sezernierte die fibroblastäre Monokultur im Well deutlich mehr eNOS als die Fibroblasten in der Insertsystm-Kokultur (Abbildung 65). An Tag 3 sezernierten die Fibroblasten in Monokultur 100 pg/ml eNOS, was sich bis auf das Maximum von 185 pg/ml an Tag 15 steigerte. In der Kokultur im Insertsystm sezernierten die Fibroblasten an Tag 3 70 pg/ml eNOS. Die Konzentration erreichte ebenfalls an Tag 15 ihr Maximum mit 105 pg/ml (Abbildung 65). Im Versuchsansatz über drei Tage zeigten sich hier keine nennenswerten Unterschiede, weshalb die Daten nicht dargestellt sind.



**Abbildung 65 - Sekretion von eNOS durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten (erste, mittelgraue Balken) mit der von Fibroblasten in Kokultur mit HDMEC ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, dunkelgraue Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Auch bei Betrachtung der HDMEC in Monokultur im Well mit denen in Kokultur im Insertsystem zeigte sich nur über die lange Versuchsdauer von 21 Tagen ein Unterschied. Die HDMEC in Kokultur im Insertsystem sezernierten, verglichen mit den Monokulturen im Well, durchgehend verstärkt eNOS. In Kokultur lag das Maximum bei 140 pg/ml eNOS an Tag 21, in der Monokultur bei 85 pg/ml an Tag 11 (Abbildung 66).



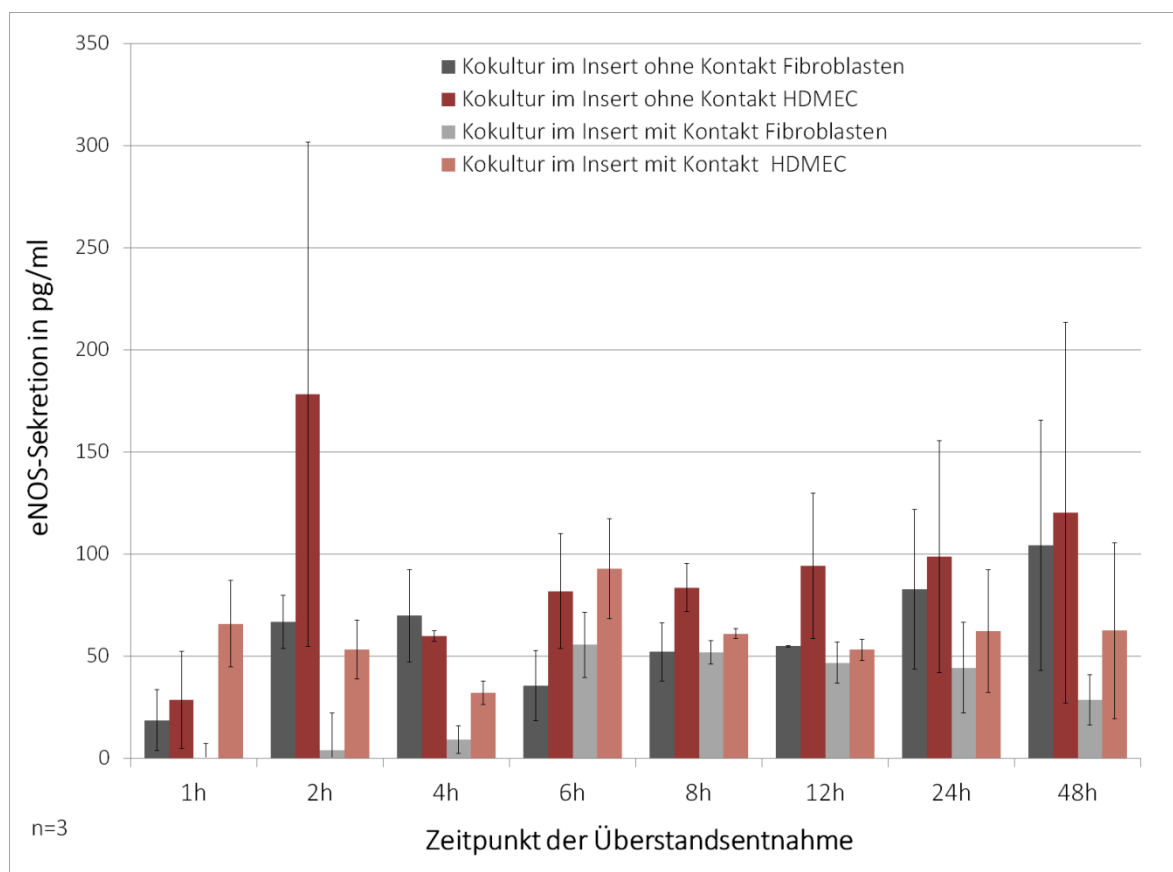
**Abbildung 66 - Sekretion von eNOS durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Monokulturen von HDMEC (erste, mittelrote Balken) mit der von HDMEC in Kokultur mit Fibroblasten ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, hellrote Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.3.5.3 Einfluss von zellulärer und parakriner Kommunikation auf die Sekretion von eNOS

Bei Betrachtung des Einflusses von zellulärem Kontakt in Kokultur auf die eNOS-Sekretion zeigte sich durchgehend eine stärkere Sekretion in den Ansätzen, die keinen zellulären Kontakt hatten, mit Ausnahme des 1 h- und 6 h-Werts der HDMEC (Abbildung 67). In so gut wie allen Ansätzen sezernierten die HDMEC stärker eNOS als die Fibroblasten. Eine Ausnahme war hier der 4 h-Wert der Ansätze ohne interzellulären Kontakt. Die eNOS-Konzentration, die von den Fibroblasten in Kokultur ohne Kontakt sezerniert wurde, stieg von anfangs 20 pg/ml bis auf ihr Maximum von 105 pg/ml nach 48 h. Die entsprechenden

HDMEC sezernierten innerhalb der ersten Stunde 30 pg/ml eNOS. Die Konzentration stieg, mit Ausnahme des 4 h-Werts, kontinuierlich über die Versuchsdauer auf ihr Maximum von 120 pg/ml nach 48 h an (Abbildung 67).

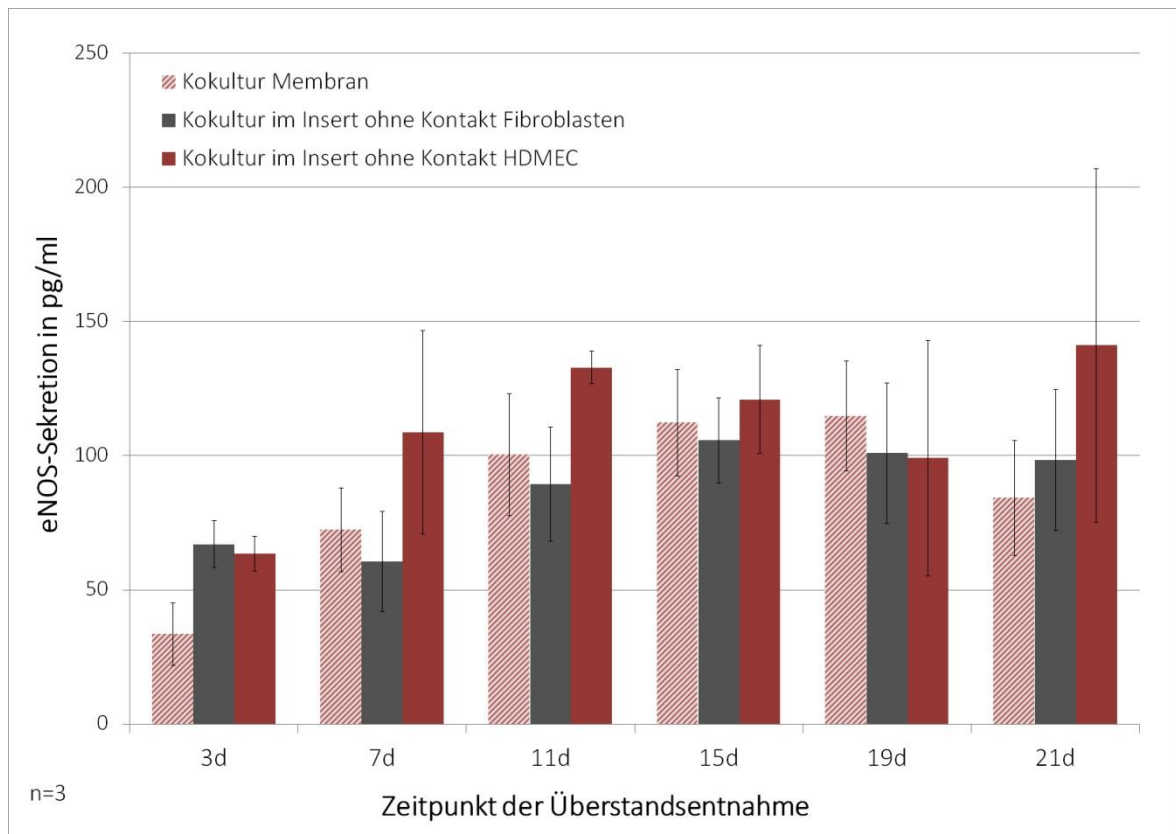
In den Kokulturen mit zellulärem Kontakt zeigte sich ebenfalls die endotheliale eNOS-Sekretion durchgehend stärker als die der Fibroblasten. Beide erreichten ihr Maximum zum 6 h-Wert mit 92 pg/ml eNOS bei den HDMEC und 55 pg/ml bei den Fibroblasten. Zuvor stieg die von den Fibroblasten sezernierte Menge an eNOS kontinuierlich an. Nach Erreichen des Maximalwerts fiel ihre eNOS-Sekretion wieder ab (Abbildung 67).



**Abbildung 67 - Sekretion von eNOS in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit und ohne zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Über 21 Tage betrachtet zeigte sich die eNOS-Sekretion aller Ansätze bis Tag 15 steigend und anschließend bis Tag 21 wieder sinkend. Die Kokulturen auf der Bio-Gide®-Membran sezernierten dabei mit Ausnahme von Tag 3 und Tag 21 mehr eNOS als die Fibroblasten in

der Insert-Kokultur, sowie mit Ausnahme des 19. Tages durchgehend weniger eNOS als die Endothelzellen in der Insert-Kokultur. Die eNOS-Sekretion der Bio-Gide®-Kokultur steigerte sich kontinuierlich bis auf ihr Maximum von 115 pg/ml an Tag 19. Die Fibroblasten im Insertsystem erreichten ihr Maximum von 80 pg/ml eNOS an Tag 15, die HDMEC ihres von 140 pg/ml eNOS an Tag 21 (Abbildung 68).



**Abbildung 68 - Sekretion von eNOS in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von eNOS in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit und ohne zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels eNOS-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

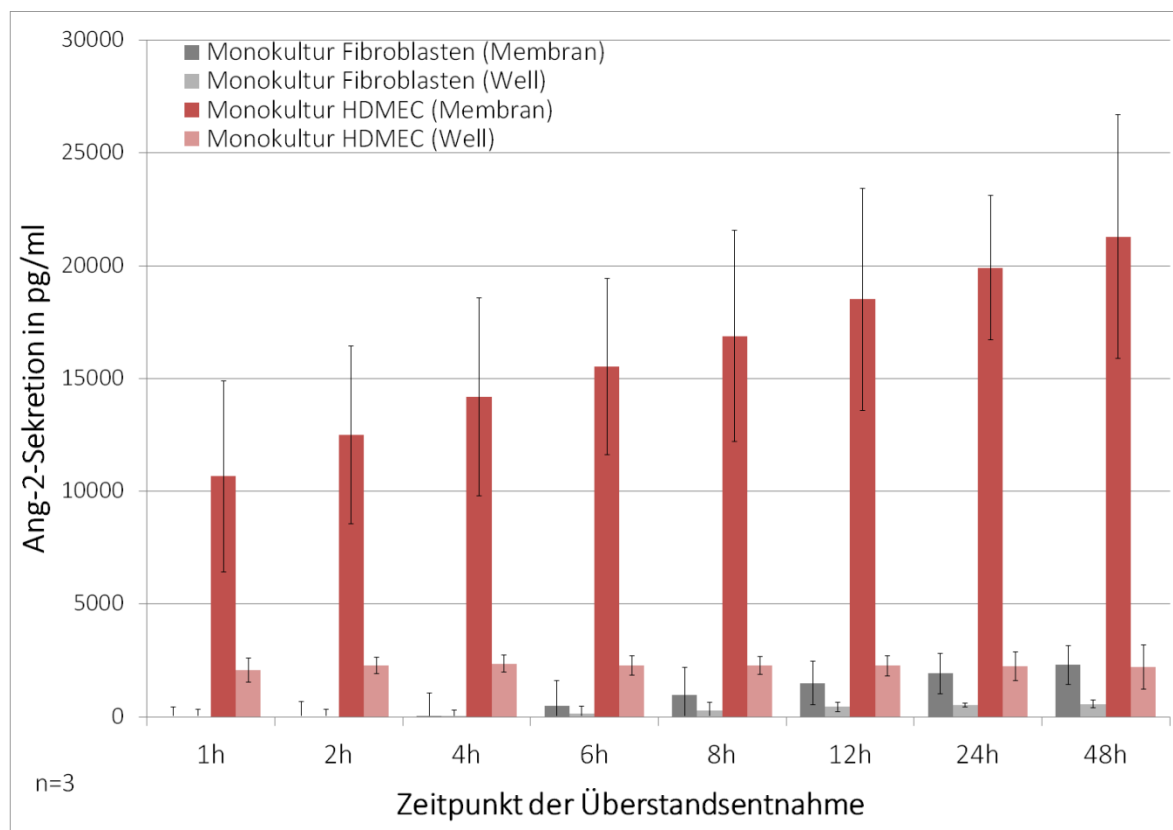
### 3.3.6 Quantifizierung der Angiopoetin-2-Sekretion

Angiopoetin-2 (Ang-2) wurde ebenfalls aufgrund seiner pro-angiogenen Eigenschaften genauer analysiert. Ang-2 ist ein sezernierter Faktor, der endothelzellspezifisch und kontext-abhängig über die Tie2-Kaskade Einfluss auf die Angiogenese nimmt [203]. In Abhängigkeit der VEGF-Konzentration wirkt Ang-2 entweder pro-angiogen, indem es das Ausprossen von Gefäßen fördert, oder pro-apoptotisch auf Endothelzellen [204].

### 3.3.6.1 Einfluss der Kollagenmembran auf die Sekretion von Ang-2

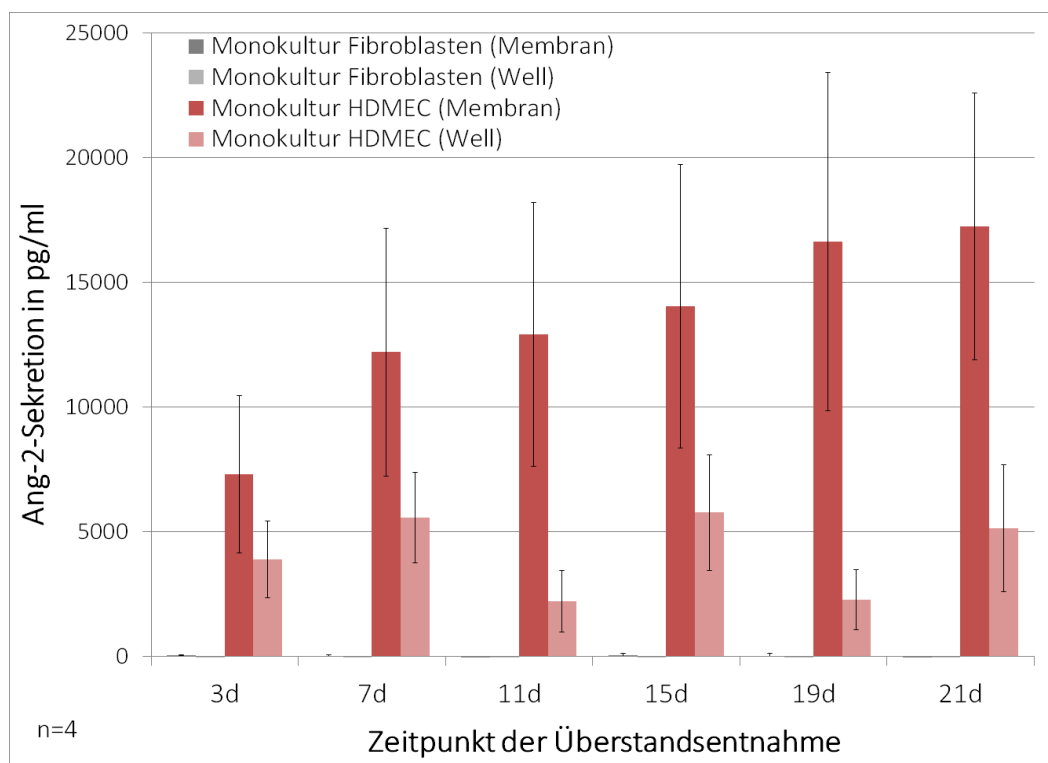
Bei Vergleich der Ang-2-Sekretion durch HDMEC zeigte sich durchweg eine deutlich höhere Ang-2-Sekretion der endothelialen Monokulturen auf der Bio-Gide®-Membran. Diese stieg kontinuierlich an bis auf ihr Maximum von 21,3 ng/ml Ang-2 nach 48 h. Die durch HDMEC im Well sezernierte Ang-2-Konzentration schwankte im Verlauf des Versuchs zwischen 2 und 2,3 ng/ml Ang-2 (Abbildung 69).

Auch bei Betrachtung der entsprechenden Fibroblasten-Kulturen zeigte sich eine stärkere Sekretion von Ang-2 auf der Bio-Gide®-Membran als im Well. Die Fibroblasten begannen in beiden Ansätzen erst ab der vierten Stunde Ang-2 zu sezernieren. Die Konzentration steigerte sich anschließend kontinuierlich bis auf Maxima nach 48 h. Auf der Membran sezernierten die Fibroblasten hier 2300 pg/ml Ang-2, im Well 555 pg/ml Ang-2 (Abbildung 69).



**Abbildung 69 - Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

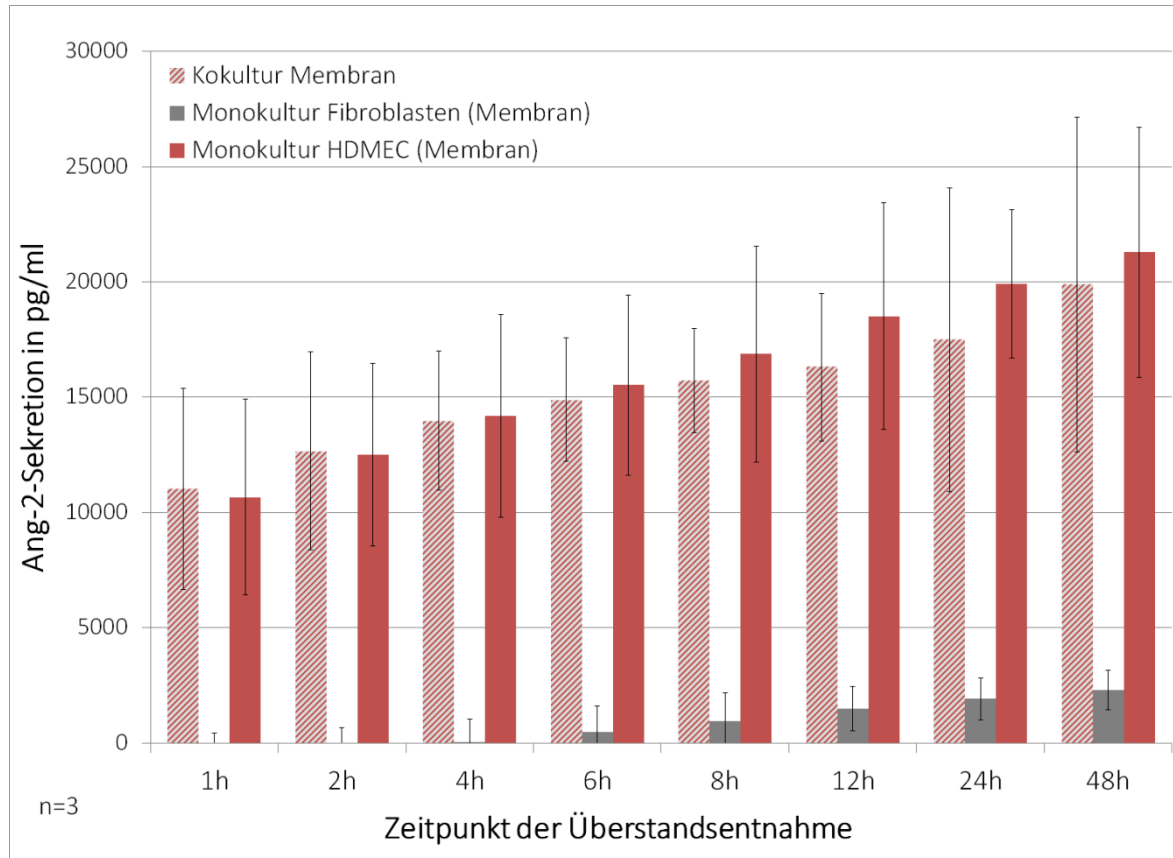
Auch über die 21-tägige Kultivierung zeigte sich die stärkste Ang-2-Sekretion in den endothelialen Monokulturen auf der Bio-Gide®-Membran. Die Konzentration stieg in diesen kontinuierlich bis auf ihr Maximum von 17,3 ng/ml Ang-2 an Tag 21. Im Well sezernierten die HDMEC schwankende Konzentrationen an Ang-2 zwischen 2,2 und 5,8 ng/ml. Die Fibroblasten auf der Bio-Gide®-Membran sezernierten nur sehr geringe Dosen an Ang-2, die zwischen 15 pg/ml und 70 pg/ml schwankten. Im Well lag die fibroblastäre Ang-2-Sekretion unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 70).



**Abbildung 70 - Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) auf Kollagenmatrices (dunklerer Farbton) mit den entsprechenden Monokulturen in Wells von Zellkulturschalen (hellerer Farbton). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.3.6.2 Einfluss der Kokultivierung auf die Sekretion von Ang-2

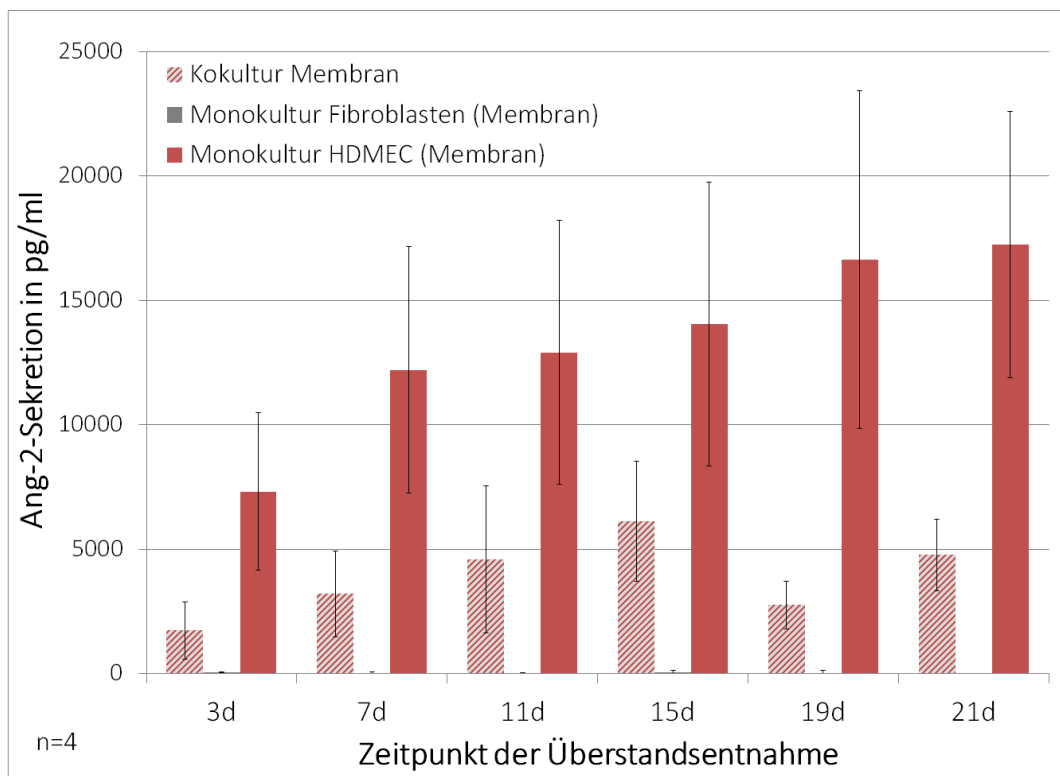
Kokulturen auf der Bio-Gide®-Membran sezernierten eine über die Kultivierungszeit kontinuierlich steigende Konzentration an Ang-2. Diese lag jeweils etwas unterhalb der Sekretion der endothelialen Monokulturen, jedoch deutlich über der durch monokultivierte Fibroblasten sezernierten Menge. Die Ang-2-Sekretion in Kokultur stieg von anfangs 11 ng/ml bis auf ihr Maximum von 19,8 ng/ml nach 48 h (Abbildung 71).



**Abbildung 71 - Sekretion von Ang-2 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

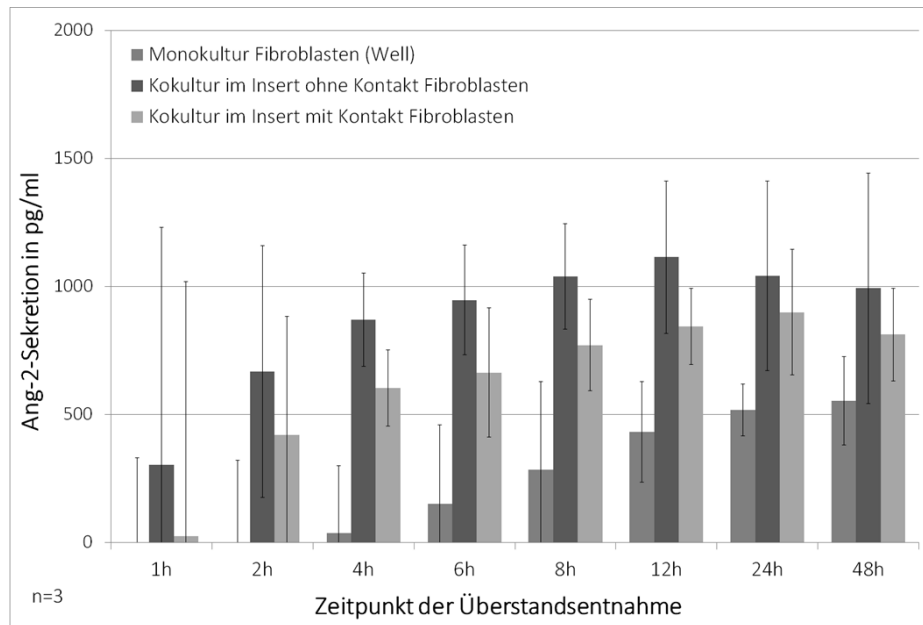
Über eine längere Kultivierung von 21 Tagen sezernierten die HDMEC-Monokulturen auf der Bio-Gide®-Membran am stärksten Ang-2, wobei die Sekretion durchgehend mehr als doppelt so stark, zum Teil mehr als vierfach so stark war wie in Kokultur. In Kokultur steigerte sich die Ang-2-Sekretion von anfangs 1,7 ng/ml bis auf ihr Maximum von 6,1 ng/ml an Tag 15. Anschließend fiel sie an Tag 19 auf 2,8 ng/ml und betrug an Tag 21 4,8 ng/ml.

Die Fibroblasten sezernierten, wie oben beschrieben, durchgehend weniger als 100 pg/ml Ang-2 (Abbildung 72).

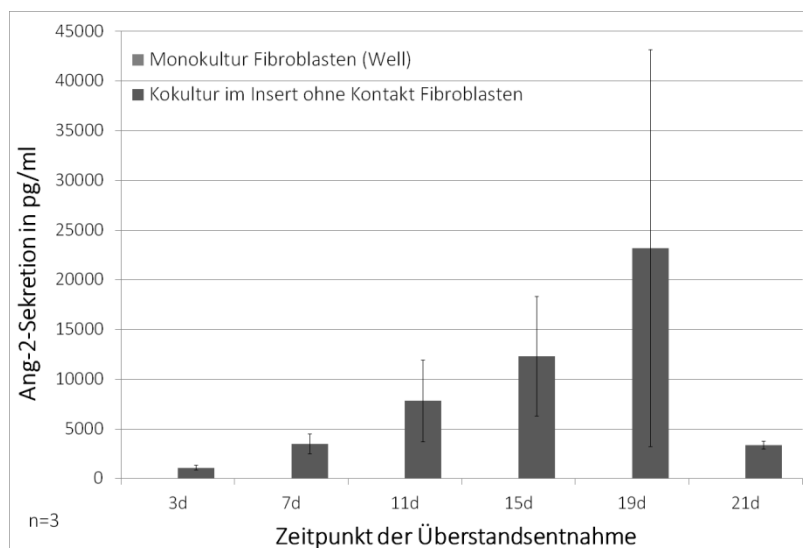


**Abbildung 72 - Sekretion von Ang-2 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit Kokulturen (rot-grau gestreift) beider auf Bio-Gide® Kollagenmatrices. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels Ang-2ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Fibroblasten sezernierten in den Insert-Kokulturen über die ersten 48 h durchgehend stärker Ang-2 als die entsprechende Well-Monokultur. Die Kokulturen ohne direkten zellulären Kontakt schütteten dabei am stärksten Ang-2 aus. Sie steigerten die Sekretion von anfangs 300 pg/ml auf maximal 1115 pg/ml. In Kokultur mit direktem zellulären Kontakt sezernierten die Fibroblasten anfangs 25 pg/ml und steigerten sich kontinuierlich auf maximal 900 pg/ml. In Monokultur stieg die Ang-2-Sekretion von 35 pg/ml nach 4 h kontinuierlich auf 550 pg/ml an (Abbildung 73). Über die 21-tägige Versuchsdauer lag die Ang-2-Konzentration im monokultivierten Well unterhalb der Detektionsgrenze. Die Fibroblasten ohne zellulären Kontakt sezernierten steigende Ang-2-Mengen von 1100 pg/ml bis zu einem Maximum von 23210 pg/ml an Tag 19 (Abbildung 74).

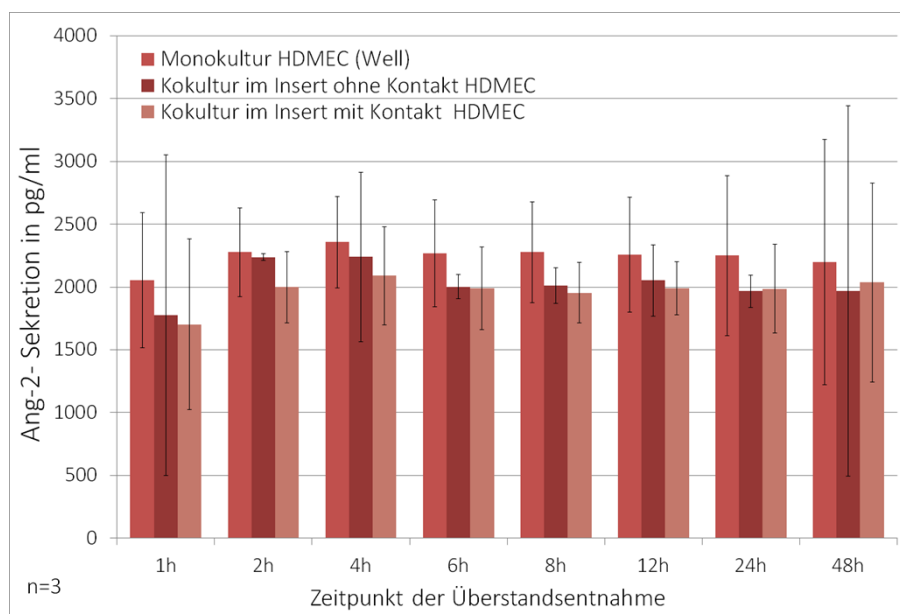


**Abbildung 73 - Sekretion von Ang-2 durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten (erste, mittelgraue Balken) mit der von Fibroblasten in Kokultur mit HDMEC mit (zweite, dunkelgraue Balken) bzw. ohne (dritte, hellgraue Balken) direkten zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an

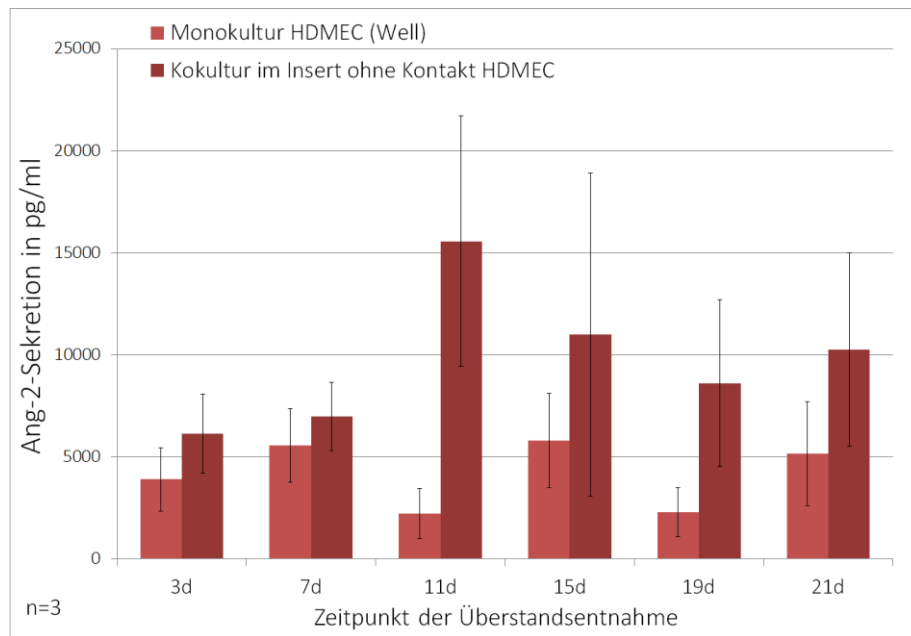


**Abbildung 74 - Sekretion von Ang-2 durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten (erste, mittelgraue Balken) mit der von Fibroblasten in Kokultur mit HDMEC ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, dunkelgraue Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Die HDMEC sezernierten in Monokultur im Well und in den Insert-Kokulturen über die ersten 48 h annähernd konstante Mengen Ang-2. Dabei lag die Sekretion der monokulti- vierten HDMEC durchgehend am höchsten mit Werten zwischen 2050 pg/ml und 2350 pg/ml. Tendenziell zeigt sich kein Unterschied in der Ang-2-Sekretion zwischen den beiden Insert-Kokulturen. Hier betrug die Ang-2-Konzentration innerhalb der ersten 48 h zwischen 1700 pg/ml und 2240 pg/ml (Abbildung 75). Über die 21-tägige Versuchsdauer steigerte sich die von HDMEC in Kokultur ohne direkten zellulären Kontakt sezernierte Ang-2-Menge von 6150 pg/ml an Tag 3 auf ein Maximum von 15600 pg/ml an Tag 11. Im weiteren Verlauf lag die Konzentration zwischen 8600 pg/ml und 11000 pg/ml Ang-2. Die HDMEC in Kokultur sezernierten damit durchgehend stärker Ang-2 als in Monokultur im Well. In dieser schütteten die HDMEC variierende Mengen Ang-2 aus, die zwischen 2225 pg/ml und 5780 pg/ml lagen (Abbildung 76).



**Abbildung 75 - Sekretion von Ang-2 durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von HDMEC (erste, mittelrote Balken) mit der von HDMEC in Kokultur mit Fibroblasten mit (zweite, dunkelrote Balken) bzw. ohne (dritte, hellrote Balken) direkten zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels Ang-2 -ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.



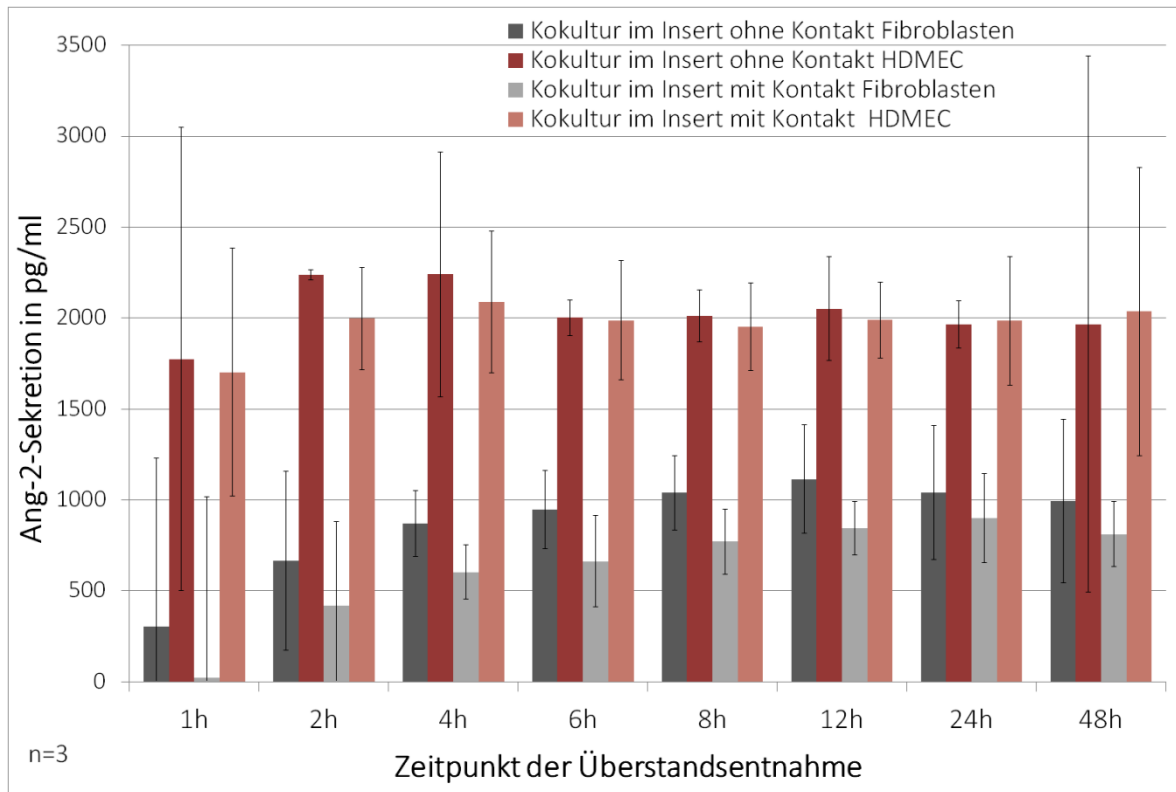
**Abbildung 76 - Sekretion von Ang-2 durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von HDMEC (erste, mittelrote Balken) mit der von HDMEC in Kokultur mit Fibroblasten ohne direkten zellulären Kontakt (zweite, hellrote Balken). Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

5

### 3.3.6.3 Einfluss von zellulärer und parakriner Kommunikation auf die Sekretion von Angiopoetin-2

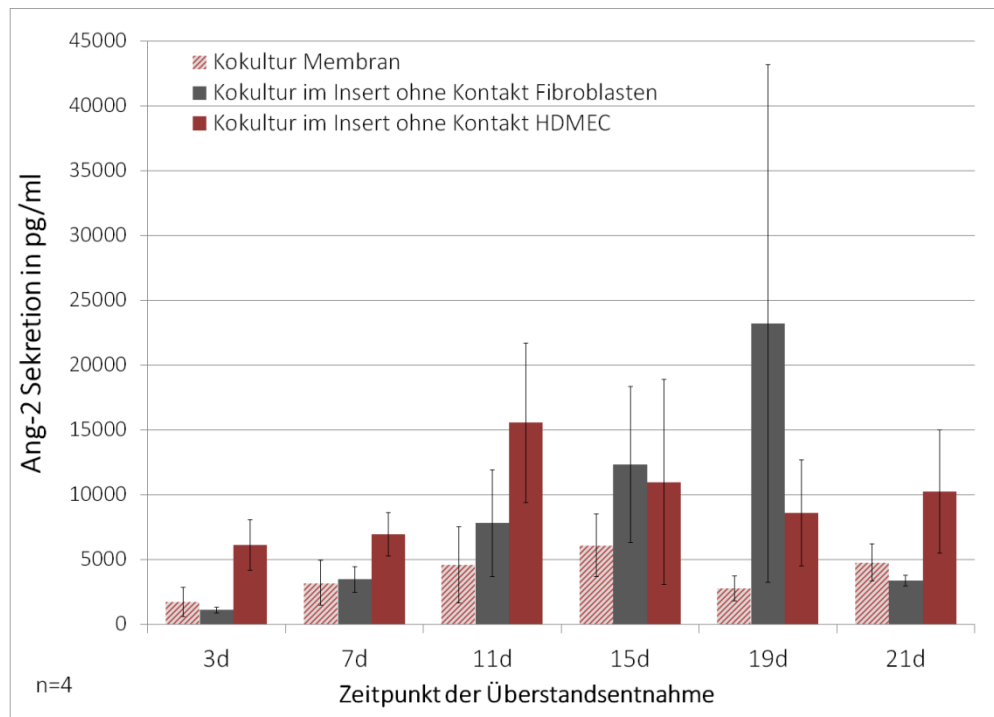
Bei Betrachtung der verschiedenen in Insertsystemen besiedelten Kokulturen zeigte sich eine stärkere Ang-2-Sekretion durch die beteiligten HDMEC als durch die Fibroblasten. Über die ersten vier Stunden sezernierten die HDMEC in beiden Ansätzen leicht steigenden Konzentrationen an Ang-2. Dabei lag die Sekretion in der Kokultur ohne interzellulären Kontakt zu Fibroblasten leicht über der mit interzellulärem Kontakt. Ab einer Kokultur von 6 h sezernierten beide HDMEC-Ansätze durchgehend ca. 2 ng/ml Ang-2 und es konnte im weiteren Verlauf keine weitere Steigerung nachgewiesen werden (Abbildung 77).

Auch in den Ansätzen der Fibroblasten sezernierte die Kultur ohne interzellulären Kontakt etwas mehr Ang-2 als die mit Kontakt zu Endothelzellen. Beide steigerten ihre Sekretion kontinuierlich, bis sie ihr jeweiliges Maximum erreicht hatten. Bei der Kokultur ohne Kontakt lag dies bei 1,1 ng/ml Ang-2 nach 12 h, in der Kokultur mit Kontakt bei 0,9 ng/ml Ang-2 zum 24 h-Wert (Abbildung 77).



**Abbildung 77 - Sekretion von Ang-2 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) mit und ohne zellulären Kontakt. Dabei wurden Zellkulturüberstände 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h sowie 48 h nach Kulturbeginn abgenommen und mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuchsdurchläufe. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an

Über eine längere Versuchsdauer sezernierten die HDMEC in Kokultur im Insertsystem durchgehend mehr, zum Teil doppelt so viel Ang-2 wie die Kokulturen auf den Bio-Gide®-Membranen. Mit Ausnahme des 15. und des 19. Tages sezernierten die HDMEC im Insertsystem zudem mehr als ihre kokultivierten Fibroblasten. Sie steigerten ihre Ang-2-Sekretion bis auf ihr Maximum von 15,6 ng/ml an Tag 11. Anschließend reduzierte sich die Ang-2-Sekretion durch die HDMEC wieder. Die entsprechenden Fibroblasten sezernierten steigende Ang-2-Konzentrationen, bis ihr Maximum von 23,2 ng/ml Ang-2 an Tag 19 erreicht war. Dabei sezernierten sie mit Ausnahme des 3. und des 21. Tages mehr Ang-2 als die Membran-Kokulturen. In Kokultur auf den Bio-Gide®-Membranen steigerte sich die Ang-2-Sekretion ebenfalls kontinuierlich, bis sie an Tag 15 ihr Maximum von 6,2 ng/ml betrug (Abbildung 78).



**Abbildung 78 - Sekretion von Ang-2 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung.** Verglichen wurde die Sekretion von Ang-2 in Kokulturen von Fibroblasten (graue Balken) sowie HDMEC (rote Balken) ohne zellulären Kontakt mit der Kokultur auf der Bio-Gide® Membran. Dabei wurden Zellkulturüberstände nach 3, 7, 11, 15, 19 und 21 Tagen Kultivierung abgenommen, wobei 24 h vor Abnahme das Medium auf Hungermedium umgestellt wurde. Die Überstände wurden mittels Ang-2-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

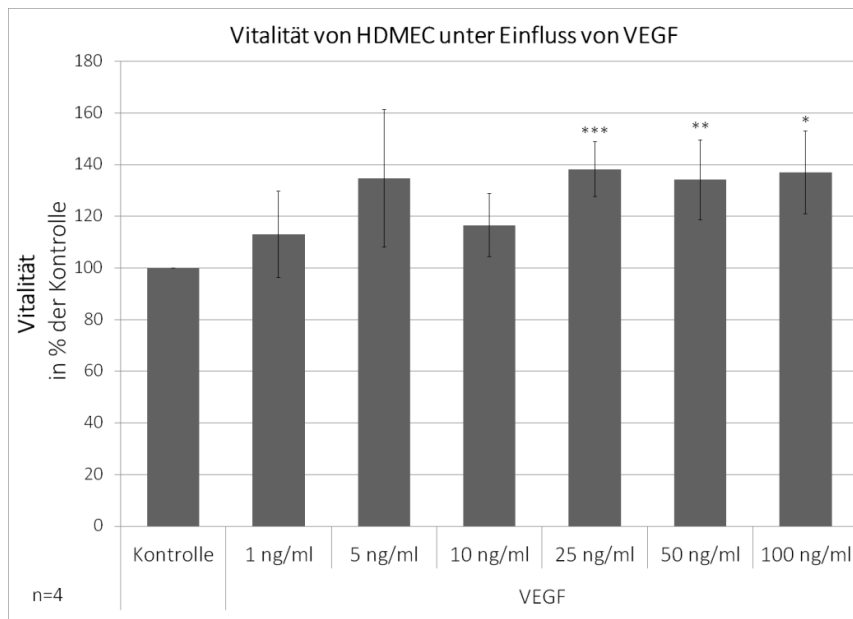
### 3.4 Einfluss der ermittelten Faktoren auf zelluläre Parameter im Kontext der Angiogenese

Die in den Überständen identifizierten und quantifizierten Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Angiogenese analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die jeweiligen Faktoren zur Optimierung der Prävasikularisierung geeignet sind. Im Kontext der Angiogenese sind die Vitalität, die Proliferation und die Migration essentielle zelluläre Parameter und wurden in verschiedenen Assays analysiert. Des Weiteren wurde die *Tube Formation* als *in vitro* Angiogenese Assay begutachtet. Als Abschluss wurde die Bildung gefäßähnlicher Strukturen im Schleimhaut-Äquivalent unter Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren analysiert.

#### 3.4.1 Einfluss auf die Vitalität

Eine Behandlung mit VEGF steigerte die Vitalität von HDMEC durchgehend. Am geringsten fördernd wirkten 1 ng/ml und 10 ng/ml VEGF. 5 ng/ml VEGF erhöhte die Vitalität um 35 %.

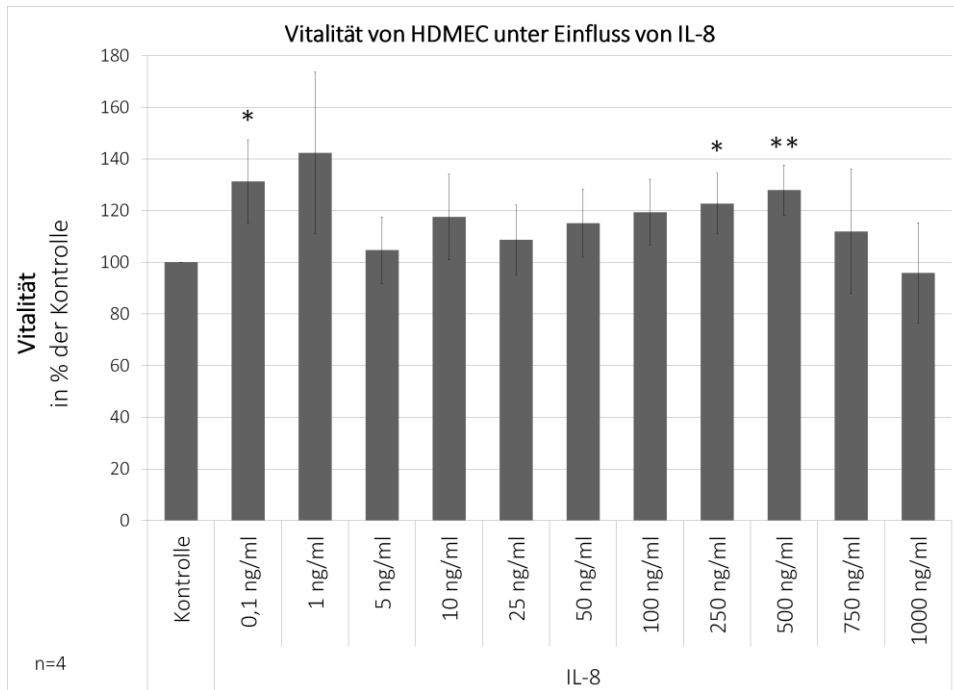
Die weiteren VEGF-Konzentrationen bewirkten alle eine signifikante, ähnlich starke Erhöhung der Vitalität um bis zu 40 % ( $p \leq 0,012$ ) (Abbildung 79).



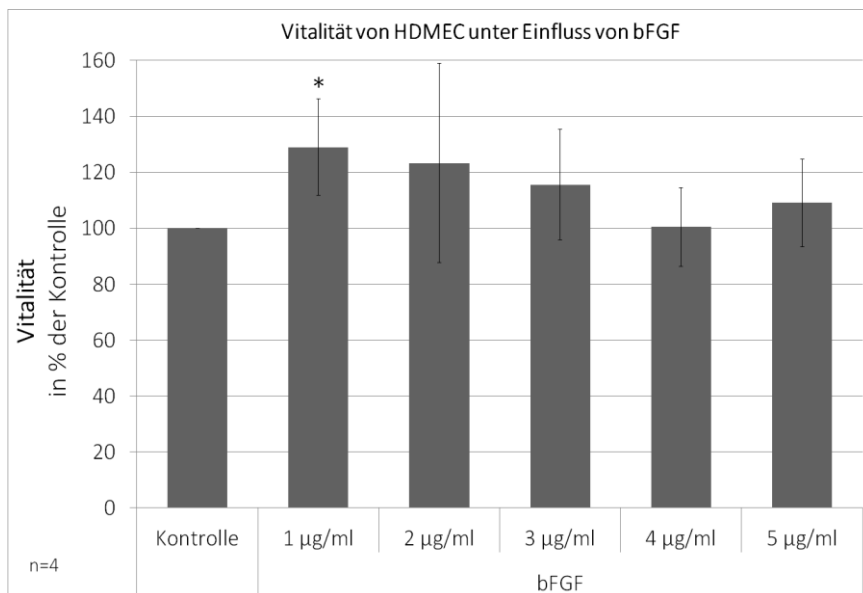
**Abbildung 79 - Vitalität von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen über 24 h.** Die Vitalität von HDMEC unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an VEGF über 24 h wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle, ihre Vitalität wurde als 100 % definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche ( $n=4$ ). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Eine Behandlung mit IL-8 steigerte die Vitalität von HDMEC ebenfalls. Hier trat die stärkste Steigerung mit 30 % bis 45 % unter 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 500 ng/ml IL-8 auf. Eine signifikante Erhöhung der Vitalität zeigte sich unter Behandlung mit 0,1 ng/ml IL8 um 130 % ( $p = 0,015$ ), 250 ng/ml IL-8 um 123 % ( $p = 0,016$ ) und 500 ng/ml IL8 um 130 % ( $p = 0,005$ ). Konzentrationen von 5 ng/ml bis 500 ng/ml IL-8 bewirkten fast kontinuierlich eine Steigerung der Vitalität. Verglichen dazu wirkten höhere IL-8-Konzentrationen wieder reduzierend (Abbildung 80).

Bei Behandlung von HDMEC mit verschiedenen Konzentrationen an bFGF erhöhte sich die Vitalität im Vergleich zu der Kontrolle leicht. Die stärkste Steigerung trat unter 1  $\mu\text{g/ml}$  bFGF auf, diese Konzentration erhöhte die Vitalität signifikant um ca. 30 % ( $p = 0,04$ ). Verglichen damit reduzierte sich die Vitalität mit steigender bFGF-Konzentration wieder. 4  $\mu\text{g/ml}$  bFGF zeigte keine Auswirkung auf die Vitalität (Abbildung 81).



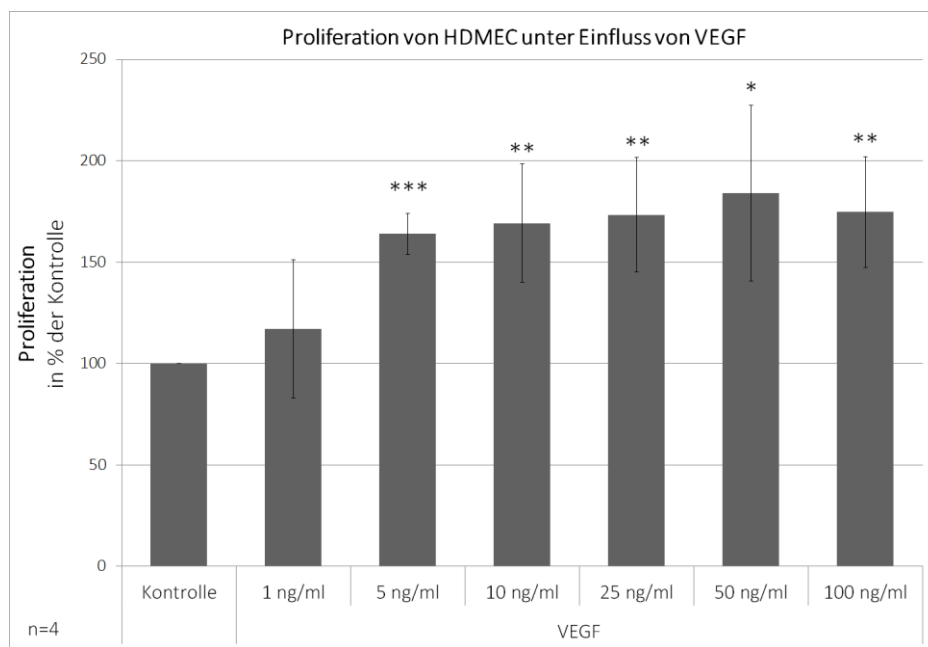
**Abbildung 80 - Vitalität von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen IL-8-Konzentrationen über 24 h.** Die Vitalität von HDMEC unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an IL-8 über 24 h wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle, ihre Vitalität wurde als 100 % definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche (n=4). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 81 - Vitalität von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen bFGF-Konzentrationen über 24 h.** Die Vitalität von HDMEC unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an bFGF über 24 h wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle, ihre Vitalität wurde als 100 % definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche (n=3). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ ).

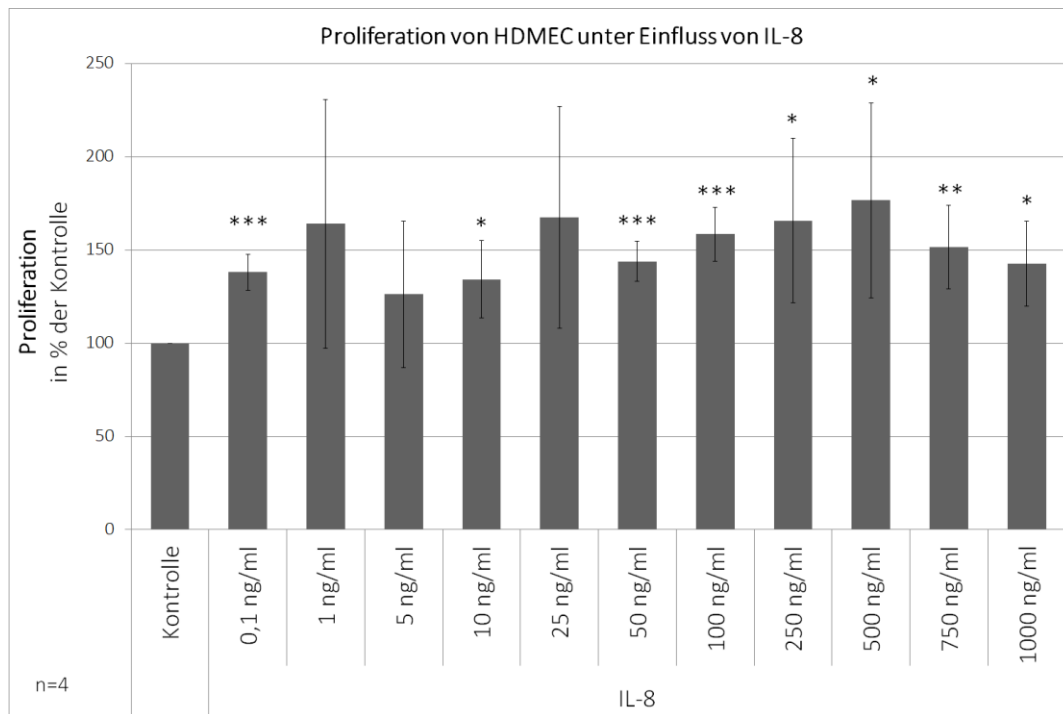
### 3.4.2 Einfluss auf die Proliferation

VEGF führte durchgehend zu einer zum Teil signifikanten Erhöhung der endothelialen Proliferation. 1 ng/ml VEGF erhöhte die Proliferation um 17 %. Konzentrationen von 5 ng/ml bis 50 ng/ml VEGF steigerten die Proliferation kontinuierlich um 64 % bis maximal um 84 % ( $p \leq 0,015$ ). 100 ng/ml VEGF führte zu einer Steigerung um 75 % ( $p = 0,003$ ) (Abbildung 82).



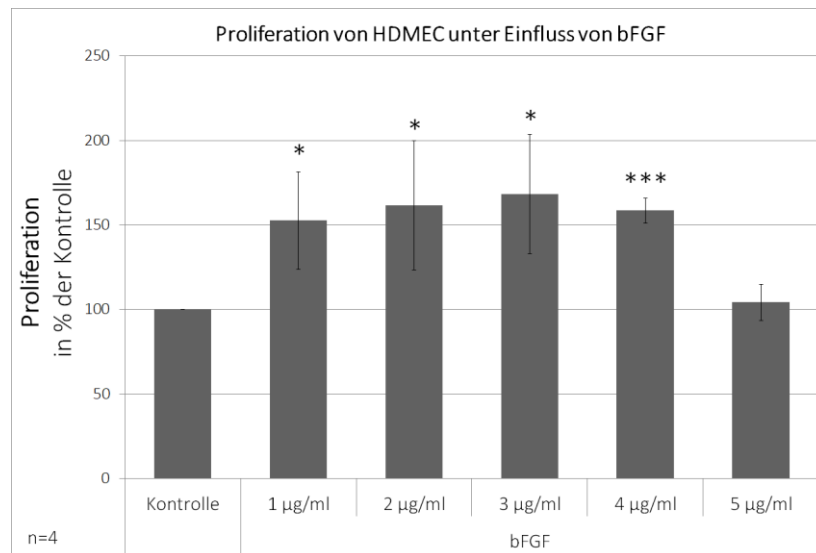
**Abbildung 82 - Proliferation von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen über 24 h.** Die Proliferation von HDMEC unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an VEGF über 24 h wurde mittels BrdU-Inkorporations-ELISA ermittelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle, ihre Proliferation wurde als 100 % definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche (n=4). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

IL-8 wirkte durchgehend steigernd auf die Proliferation der HDMEC. 1 ng/ml, 25 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml IL-8 erhöhten die Proliferation am stärksten um 65 % bis 77 %. Konzentrationen von 5 ng/ml bis 500 ng/ml bewirkten fast durchgehend eine kontinuierliche Steigerung der Proliferation von 26 % auf 77 %. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen reduzierte sich die steigernde Wirkung wieder, hier war die Proliferation um 40 % bis 50 % gesteigert (Abbildung 83).



**Abbildung 83 - Proliferation von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen IL-8-Konzentrationen über 24 h.** Die Proliferation von HDMEC unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an IL-8 über 24 h wurde mittels BrdU-Inkorporations-ELISA ermittelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle, ihre Proliferation wurde als 100% definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche (n=4). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Die Behandlung mit bFGF in Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$  bis 4  $\mu\text{g/ml}$  führte zu einer signifikant gesteigerten Proliferation der Endothelzellen ( $p \leq 0,02$ ). Sie zeigte sich um 50 % bis 70 % erhöht. Die fördernde Wirkung nahm dabei bis 3  $\mu\text{g/ml}$  bFGF mit steigender Konzentration zu. 5  $\mu\text{g/ml}$  bFGF zeigte mit einer Erhöhung von 4 % nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation (Abbildung 84).

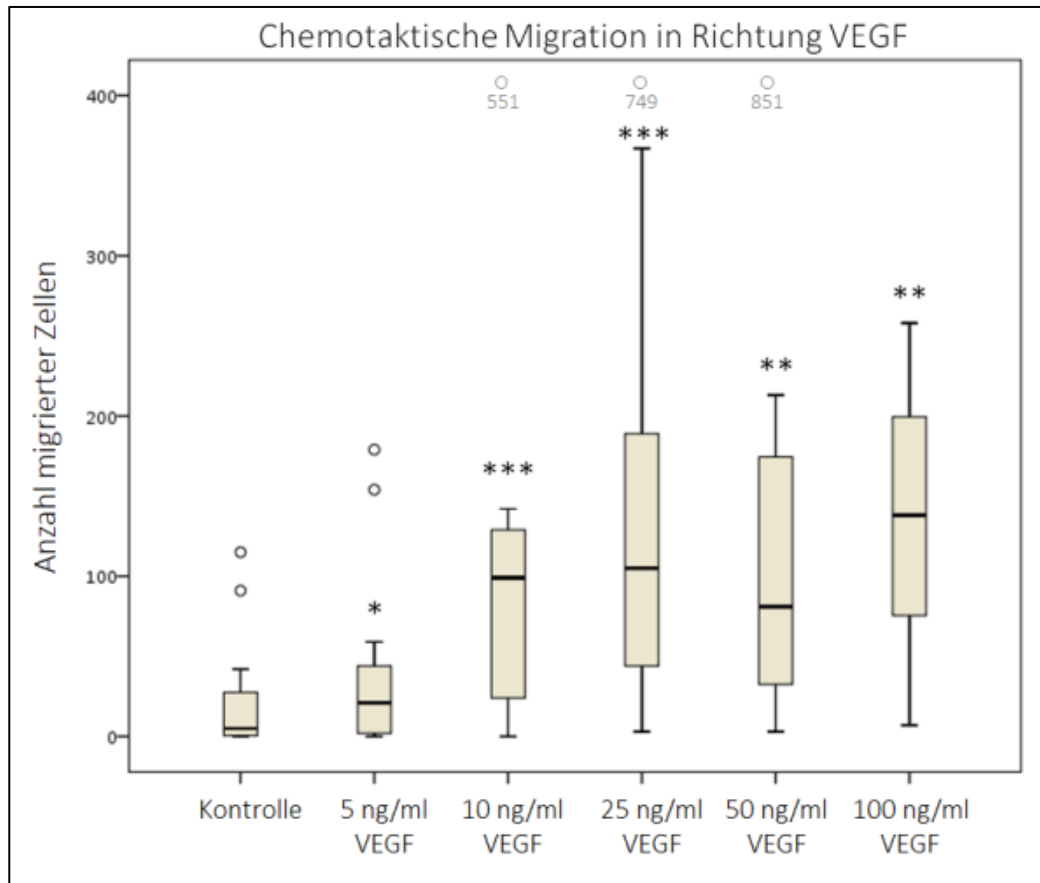


**Abbildung 84 - Proliferation von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen bFGF-Konzentrationen über 24 h.** Die Proliferation von HDMEC unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an bFGF über 24 h wurde mittels BrdU-Inkorporations-ELISA ermittelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle, ihre Proliferation wurde als 100 % definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche (n=4). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittels T-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.4.3 Einfluss auf die chemotaktische Migration

Zur Analyse der gezielten zellulären Migration, wie sie während der Angiogenese stattfindet, wurden Migrationsassays in der Boyden-Kammer durchgeführt und die chemotaktische Wirkung der Wachstumsfaktoren analysiert. Die eingesetzten HDMEC zeigten sehr unterschiedliche, Spender-individuelle Ergebnisse.

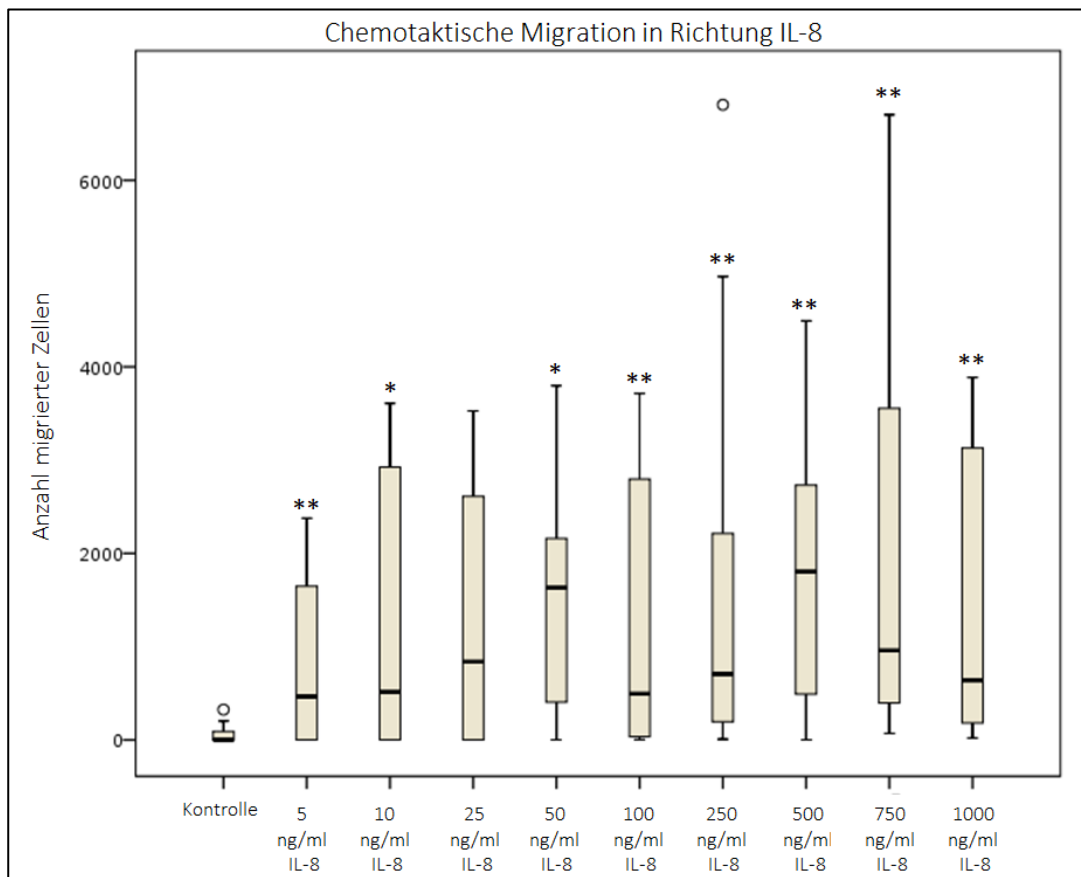
Die chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung von VEGF war mit steigender Konzentration des Chemotaxins durchgehend signifikant gesteigert (Abbildung 85). Da die Ergebnisse keine Gauß-Verteilung aufwiesen, wurde an Stelle des Mittelwerts der Median dargestellt. Dieser lag in der Kontrolle bei 5 gewanderten Zellen pro Well, mit einem 25 %-(Q1) und 75 %-Quartil (Q3) von 0,25 bzw. 27,75. Minimal- (Min) und Maximalwert (Max) lagen bei 0 und 42 gewanderten Zellen pro Well. Im Vergleich zur Kontrolle bewirkte 5 ng/ml VEGF eine signifikant gesteigerte chemotaktische Migration ( $p = 0,017$ ). Der Median lag hier bei 21 gewanderten Zellen pro Well (Q1: 1, Q3: 46; Min: 0, Max: 59). Die Migration erhöhte sich fast durchgehend konzentrationsabhängig bis hin zu 100 ng/ml VEGF. Hier lag der Median bei 138 gewanderten Zellen pro Well (Q1: 75,5, Q3: 199,5; Min: 7, Max: 258) ( $p = 0,0038$ ) (Abbildung 85).



**Abbildung 85 - Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung verschiedener VEGF-Konzentrationen über 16 h.** Die Migration von HDMEC in Richtung verschiedener Konzentrationen von VEGF wurde im Boyden-Kammer Migrationsassay analysiert. Die Membranen wurden dabei mit Matrigel beschichtet. Als Kontrolle diente die Migration in Richtung Hungermedium. Dargestellt sind Boxplots aus dem Median, dem 1. und 3. Quartil der gesamten ermittelten Werte (n=19) aller durchgeführten Versuche (n=5). Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). Die Kreise geben Ausreißer an.

Die chemotaktische Migration von HDMEC war bei Verwendung von IL-8 als Chemotaxin im Vergleich zur Kontrolle durchgehend gesteigert. Der Median der Kontrolle lag bei einer gewanderten Zelle pro Well (Q1: 0, Q3: 75,25; Min: 0; Max: 204). Mit steigender Konzentration von 5 ng/ml bis 500 ng/ml IL-8 erhöhte sich die Migration durchgehend, mit Ausnahme der Behandlungen mit 100 ng/ml und 250 ng/ml IL-8. 5 ng/ml IL-8 steigerte die Migration signifikant ( $p = 0,006$ ). Hier betrug der Median 465,5 migrierte Zellen pro Well (Q1: 2,75, Q3: 1463,25; Min: 2,75, Max: 2377). Unter 500 ng/ml IL-8 erhöhte sich der Median signifikant auf 1805 migrierte Zellen pro Well (Q1: 492, Q3: 2731; Min: 2, Max: 4492) ( $p = 0,0015$ ). Im Vergleich dazu bewirkten 100 ng/ml und 250 ng/ml IL-8 eine weniger starke Steigerung der Migration. Hier betrug der Median 495 respektive 707 gewanderte Zellen pro Well. Auch Konzentrationen über 500 ng/ml IL-8 erhöhten die Migra-

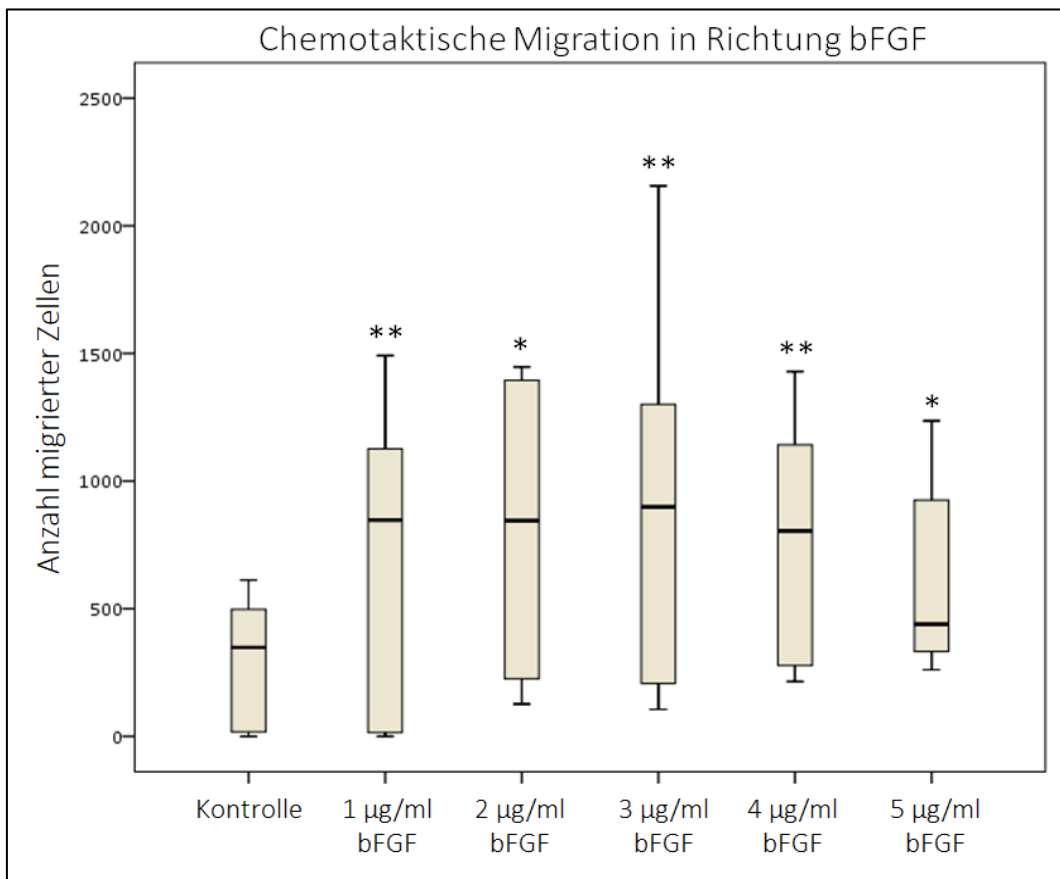
tion im Vergleich weniger stark. Abgesehen von 25 ng/ml IL-8 bewirkten alle Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der Chemotaxis (Abbildung 86).



**Abbildung 86 - Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung verschiedener IL-8-Konzentrationen über 16 h.** Die Migration von HDMEC in Richtung verschiedener Konzentrationen von IL-8 wurde im Boyden-Kammer Migrationsassay analysiert. Die Membranen wurden dabei mit Matrigel beschichtet. Als Kontrolle diente die Migration in Richtung Hungermedium. Dargestellt sind Boxplots aus dem Median, dem 1. und 3. Quartil der gesamten ermittelten Werte (n=16) aller durchgeführten Versuche (n=4). Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ). Die Kreise geben Ausreißer an.

Bei Einsatz von bFGF als Chemotaxin war die Migration von HDMEC durchgehend signifikant gesteigert. Der Median der Kontrolle lag bei 348 gewanderten Zellen pro Well (Q1: 26,25, Q3: 465,25; Min: 0, Max: 612). Im Vergleich dazu war die Migration in Richtung 1  $\mu\text{g/ml}$  bis 4  $\mu\text{g/ml}$  bFGF jeweils ähnlich stark gesteigert. Der Median unter Behandlung von 1  $\mu\text{g/ml}$  bFGF lag bei 847 gewanderten Zellen (Q1: 19,25, Q3: 1123,25; Min: 0, Max: 1492) ( $p = 0,008$ ). Unter Behandlung mit 4  $\mu\text{g/ml}$  bFGF betrug der Median 804,5 gewanderte Zellen pro Well (Q1: 286,25, Q3: 1138,5; Min: 215, Max: 1429) ( $p = 0,002$ ). 5  $\mu\text{g/ml}$  bFGF führte zu einer nicht so starken, jedoch immer noch signifikanten Steigerung der

Migration ( $p = 0,015$ ). Hier lag der Median bei 439,5 migrierten Zellen pro Well (Q1: 348,25, Q3: 809,75; Min: 261, Max: 1236) (Abbildung 87).



**Abbildung 87 - Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung verschiedener bFGF-Konzentrationen über 16 h.** Die Migration von HDMEC in Richtung verschiedener Konzentrationen von bFGF wurde im Boyden-Kammer Migrationsassay analysiert. Die Membranen wurden dabei mit Matrigel beschichtet. Als Kontrolle diente die Migration in Richtung Hungermedium. Dargestellt sind Boxplots aus dem Median, dem 1. und 3. Quartil der gesamten ermittelten Werte ( $n=12$ ) aller durchgeführten Versuche ( $n=3$ ). Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet, signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ). Die Kreise geben Ausreißer an.

#### 3.4.4 Einfluss auf angiogene Parameter *in vitro*

Um Rückschlüsse ziehen zu können, in wie weit die ermittelten Faktoren Einfluss auf die Angiogenese nehmen, wurden *in vitro Tube Formation Assays* durchgeführt und die Auswirkungen der Wachstumsfaktoren auf die Dichte, Länge und Anzahl an Verzweigungspunkten der *Tubes* im Gefäßmodell analysiert.

Eine Behandlung mit VEGF erhöhte alle drei analysierten angiogenen Parameter. Die Dichte der Gefäße wurde am Stärksten durch Behandlung mit 1 ng/ml und 50 ng/ml VEGF

gefördert, mit Erhöhungen um das 3,1- respektive 3,5-fache. Mit steigender VEGF-Konzentration nahm die fördernde Wirkung auf die Gefäßdichte kontinuierlich ab, mit Ausnahme von 50 ng/ml VEGF. Die Gesamtlänge der *Tubes* zeigte sich von VEGF-Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 50 ng/ml relativ gleichförmig um 100 % bis 130 % gesteigert. 100 ng/ml VEGF erhöhte die Länge der *Tubes* um 70 %. Am stärksten stimulierten die VEGF-Konzentrationen die Anzahl an Verzweigungspunkten der *Tubes*. Hier bewirkten Konzentrationen von 1 ng/ml bis 50 ng/ml VEGF die stärksten Steigerungen um das 3,7- bis 4,5-fache. 100 ng/ml VEGF wirkte am schwächsten stimulierend auf die Verzweigungspunkte mit einer Erhöhung um das 2,8-fache (Abbildung 88).

IL-8 wirkte in Konzentrationen von 1 bis 250 ng/ml ebenfalls durchgehend fördernd auf die untersuchten Angiogenese-Parameter. Die steigernde Wirkung nahm mit zunehmender Konzentration stetig zu. Die Dichte der *Tubes* zeigte sich durch die Konzentrationen um das 2,4- bis 3,3-fache erhöht. Die Länge der *Tubes* wurde um 100 % bis 130 % erhöht. Am stärksten wurde die Anzahl an Verzweigungspunkten stimuliert. Hier bewirkte IL-8 in allen Konzentrationen eine Erhöhung um das 3,9- bis 4,4-fache. Bei allen drei untersuchten Parametern bewirkte die höchste getestete Konzentration von 500 ng/ml IL-8 die geringste Steigerung. Die Dichte und Länge der *Tubes* wurden unter dieser Konzentration um 30 % respektive 25 % erhöht, die Anzahl an Verzweigungspunkten wiederum um knapp 100 % (Abbildung 89).

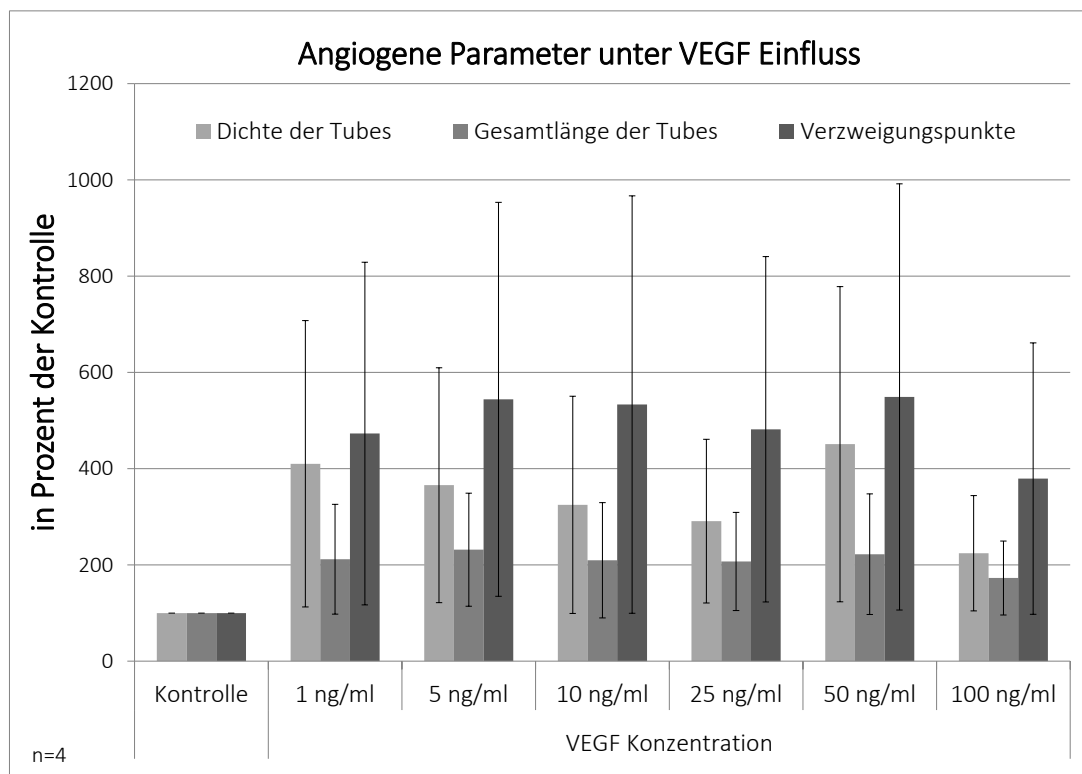


Abbildung 88 - Auswirkungen von VEGF auf die angiogenen Parameter von HDMEC *in vitro*. Mittels Tube Formation Assay wurden angiogene Parameter von HDMEC auf Matrigel unter 6-stündiger Behandlung mit VEGF analysiert. Dargestellt sind die Dichte der Tubes (prozentuale von Tubes bedeckte Fläche, hellgraue Balken), die Gesamtlänge der Tubes (mittelgraue Balken) sowie ihre Anzahl an Verzweigungspunkten (dunkelgraue Balken) in Relation zu den gleichen Parametern unbehandelter Zellen (Kontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

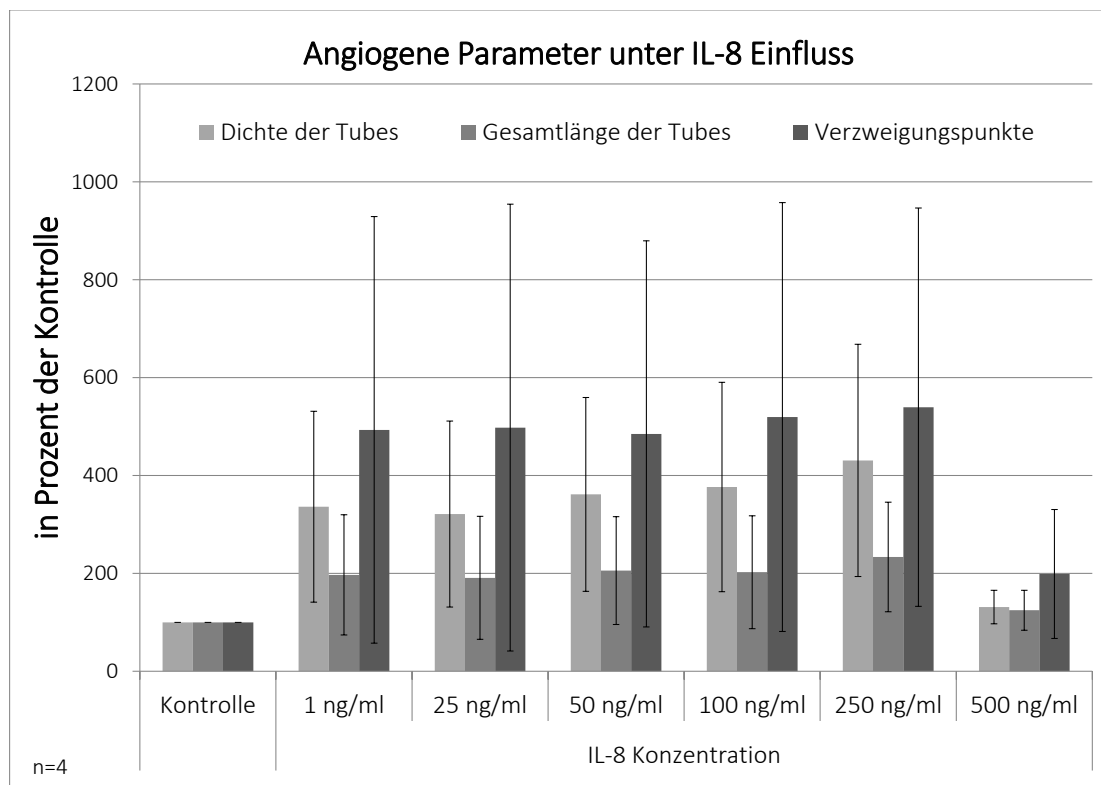
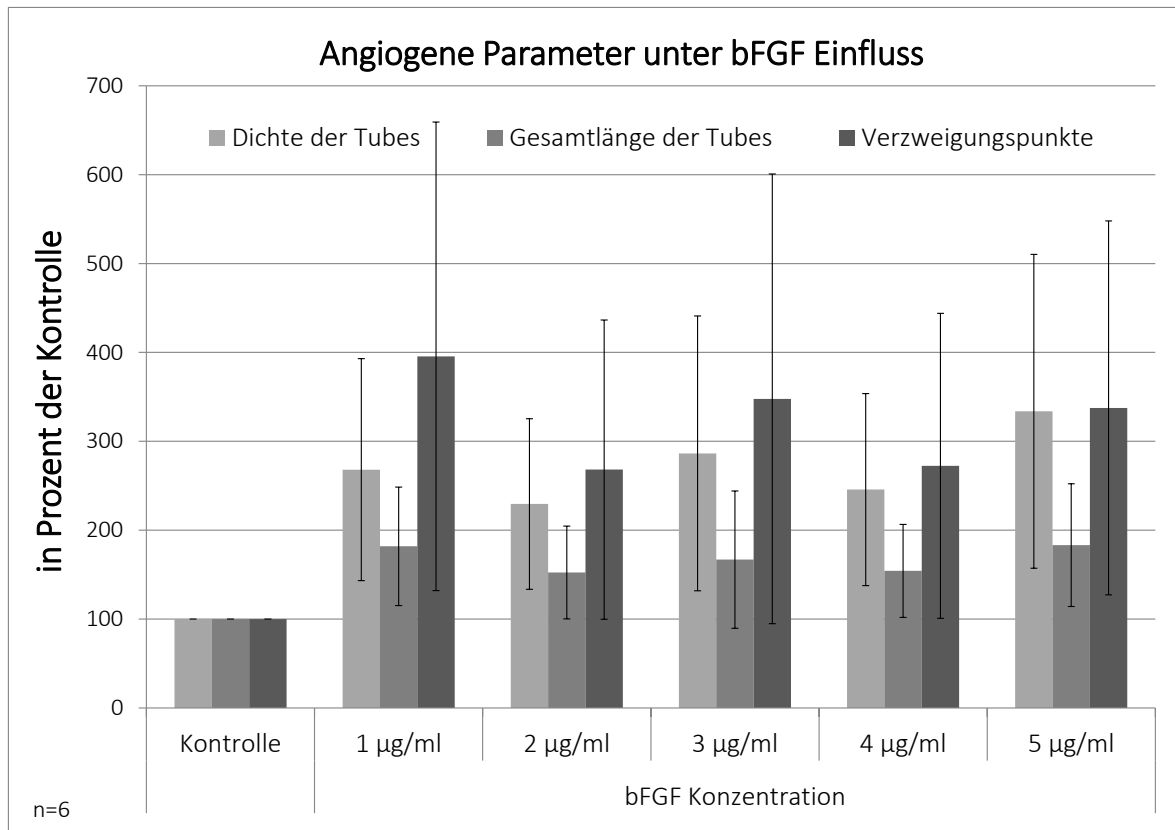


Abbildung 89 - Auswirkungen von IL-8 auf die angiogenen Parameter von HDMEC *in vitro*. Mittels Tube Formation Assay wurden angiogene Parameter von HDMEC auf Matrigel unter 6-stündiger Behandlung mit IL-8 analysiert. Dargestellt sind die Dichte der Tubes (prozentuale von Tubes bedeckte Fläche, hellgraue Balken), die Gesamtlänge der Tubes (mittelgraue Balken) sowie ihre Anzahl an Verzweigungspunkten (dunkelgraue Balken) in Relation zu den gleichen Parametern unbehandelter Zellen (Kontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Auch bFGF induzierte eine Erhöhung von allen drei angiogenen Parametern (Abbildung 90). Die Dichte der *Tubes* zeigte sich durch alle bFGF-Konzentrationen um das 1,3- bis 2,3-fache erhöht. Die Länge der *Tubes* wurde um 50 % bis 80 % gesteigert. Der stärkste Effekt trat bei der Anzahl an Verzweigungspunkten auf. Dabei bewirkte 1 µg/ml bFGF die stärkste Erhöhung um das 2,95-fache, die anderen getesteten Konzentrationen bewirkten Steigerungen um das 1,7- bis 2,5-fache (Abbildung 90).



**Abbildung 90 - Auswirkungen von bFGF auf die angiogenen Parameter von HDMEC *in vitro*.** Mittels *Tube Formation Assay* wurden angiogene Parameter von HDMEC auf Matrigel unter 6-stündiger Behandlung mit bFGF analysiert. Dargestellt sind die Dichte der *Tubes* (prozentuale von *Tubes* bedeckte Fläche, hellgraue Balken), die Gesamtlänge der *Tubes* (mittelgraue Balken) sowie ihre Anzahl an Verzweigungspunkten (dunkelgraue Balken) in Relation zu den gleichen Parametern unbehandelter Zellen (Kontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Versuchsdurchläufen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

### 3.4.5 Einfluss auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen im Schleimhaut-Äquivalent

Um die Auswirkungen von VEGF und IL-8 auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen (CLS) im Schleimhaut-Äquivalent zu analysieren, wurde eine Besiedlung durchgeführt, bei der die Membranen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Mischungen der beiden

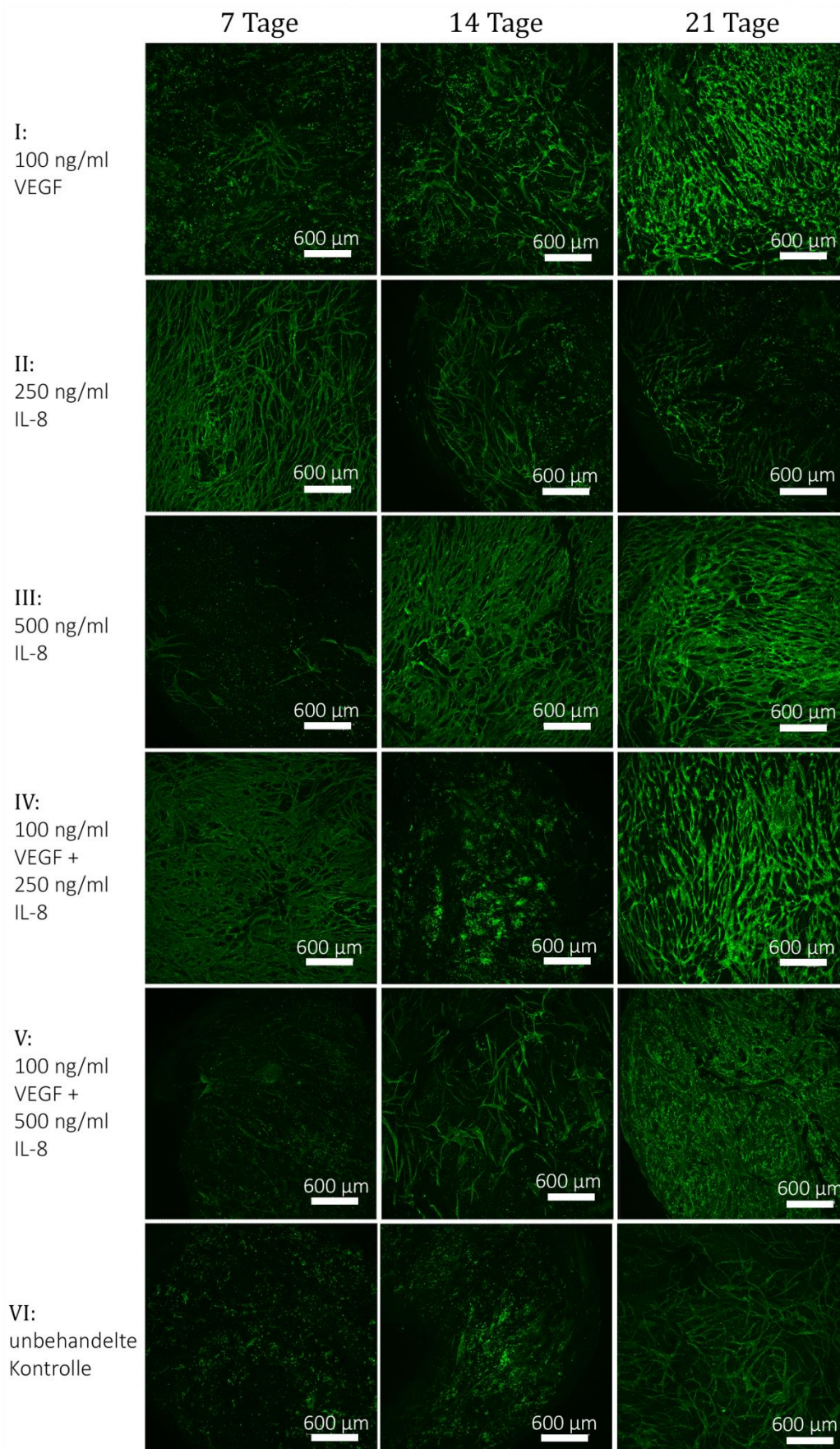
Wachstumsfaktoren behandelt wurden. Da der Versuch bislang nur einmal durchgeführt wurde, sind die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse exemplarisch zu bewerten und müssen in weiteren Versuchen bestätigt werden.

Bei Behandlung der Membranen mit 250 ng/ml IL-8 alleine oder in Kombination mit 100 ng/ml VEGF zeigte sich eine ausdifferenzierte und durchgehende Bildung von CLS bereits nach 7 Tagen (Abbildung 91 II, IV). Weder 100 ng/ml VEGF alleine noch 500 ng/ml IL-8 alleine noch eine Kombination beider führte in dieser Zeit zu einer ähnlichen Prävasкулярisierung (Abbildung 91 I, III, V). Auch eine standardgemäße Kultivierung (nach Abschnitt 2.2.3) in HDMEC-Medium ohne Zusätze führte nicht innerhalb einer Woche zu solchen CLS (Abbildung 91 VI).

Bei Behandlung mit 250 ng/ml IL-8 zeigten sich nach 14 Tagen die CLS peripher der Membran deutlich ausgeprägt, mittig fehlten sie. Dagegen zeigten sich die CLS in den Membranen, die mit 500 ng/ml IL-8 behandelt worden waren, nun ausdifferenziert und durchgehend. Im Ansatz mit einer Kombinationsbehandlung von 500 ng/ml IL-8 und 100 ng/ml VEGF zeigten sich erst Ansätze einer Prävasкулярisierung. Diese konnte auch in der mit 100 ng/ml VEGF behandelten Membran beobachtet werden.

Nach 21 Tagen zeigte sich die Prävasкулярisierung in den mit 250 ng/ml IL-8 behandelten Membranen ebenfalls nur peripher. Dagegen zeigte sich eine deutliche Bildung von CLS in den Ansätzen mit einer Behandlung mit 100 ng/ml VEGF alleine, 500 ng/ml IL-8 alleine sowie der Kombination von 100 ng/ml VEGF und 250 ng/ml IL-8.

Bei Behandlung mit 500 ng/ml IL-8 plus 100 ng/ml VEGF zeigten sich nach 7 sowie 21 Tagen keine CLS. Da nach 14 Tagen Ansätze von CLS zu sehen sind, könnte dies auf die mechanische Behandlung während und/oder nach der Behandlung zurückzuführen sein. Um eine definitive Aussage treffen zu können, müssen weitere Versuche zur Behandlung mit den Wachstumsfaktoren durchgeführt werden (Abbildung 91).



**Abbildung 91 - Analyse der Auswirkungen von VEGF und IL-8 auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen im Schleimhaut-Äquivalent.** Kokulturen von HDMEC aus Präputium und Fibroblasten wurden auf Bio-Gide® Membranen für 7, 14 bzw. 21 Tage kultiviert und währenddessen mit 100 ng/ml VEGF (I), 250 ng/ml IL-8 (II), 500 ng/ml IL-8 (III) oder einer Kombination aus 100 ng/ml VEGF + 250 ng/ml IL-8 (IV) respektive 500 ng/ml IL-8 (V) behandelt. Zum Vergleich wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt (VI). Anschließend wurden die Membranen fluoreszenzmikroskopisch auf die Ausbildung von CLS untersucht.

## 3.5 *In vivo*-Anastomosierung der Schleimhaut-Äquivalente

### 3.5.1 Mausmodell

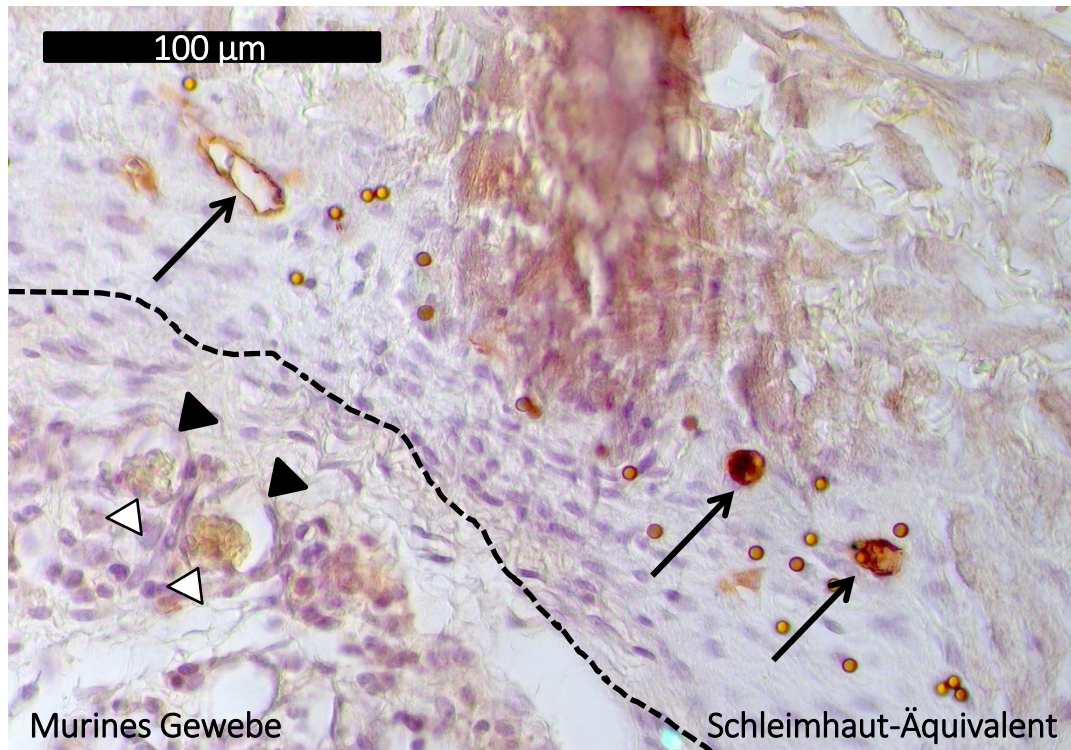
Zur Beurteilung der Anastomose von prävascularisierten Schleimhaut-Äquivalenten *in vivo* wurden Kokulturen von Endothelzellen (HDMEC bzw. ECFC) und Fibroblasten, welche über 21 Tage kultiviert worden waren, subkutan dorsal in Nacktmäuse transplantiert. Nach 5 bzw. 10 Tagen wurden die Gewebe-Äquivalente wieder entnommen und immunhistochemisch analysiert. Die transplantierten Schleimhaut-Äquivalente in Kokultur von HDMEC und Fibroblasten waren nach Färbung mikroskopisch gut vom umgebenden, murinen Gewebe zu unterscheiden (Abbildung 92). Es zeigte sich eine vollständige Invasion von Fibroblasten durch das gesamte Gewebe-Äquivalent, visualisiert durch immunhistochemische Färbung von Tenascin (Abbildung 92).



**Abbildung 92 – Immunhistochemischer Nachweis von Tenascin im Maus-Präparat.** Das in Mäuse subkutan transplantierte Schleimhaut-Äquivalent (gestrichelte Umrahmung) wurde nach Entnahme immunhistochemisch analysiert. Tenascin diente zur indirekten Visualisierung von Fibroblasten (braune Färbung).

Zur eindeutigen Differenzierung der durch humane Endothelzellen gebildeten gefäßähnlichen Strukturen von den murinen Blutgefäßen wurde eine CD31-Färbung mit einem Antikörper etabliert, welcher keine Reaktivität gegenüber murinen Antigenen aufwies. Während die gefäßähnlichen Strukturen innerhalb des Schleimhaut-Äquivalents eine

deutliche braune Färbung aufweisen, sind die murinen Gefäße nicht angefärbt (Abbildung 93). In letzteren sind deutlich Erythrozyten sichtbar (Abbildung 93). Zum Teil konnte eine Bildung gefäßähnlicher Strukturen bis tief halb innerhalb der Membran nachgewiesen werden (Abbildung 94).



**Abbildung 93 - Immunhistochemische Färbung von CD31 mittels human-spezifischem CD31-Antikörper im Maus-Präparat.** Das in Mäuse subkutan transplantierte Schleimhaut-Äquivalent wurde nach Entnahme immunhistochemisch analysiert. Ein humanspezifischer CD31-Antikörper diente zur eindeutigen Identifikation von humanen Endothelzellen (braune Färbung), wodurch *in vitro* gebildete gefäßähnliche Strukturen visualisiert werden konnten (schwarze Pfeile). Murine Gefäße wurden nicht detektiert (schwarze Pfeilspitzen). Innerhalb der murinen Gefäße sind Erythrozyten sichtbar (weiße Pfeilspitzen). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Trennlinie zwischen Schleimhaut-Äquivalent und murinem Gewebe. Das Präparat wurde mit Mayers Hämalaun gegengefärbt. Der schwarze Balken entspricht 100 µm.

Zur Beantwortung der Frage, ob die gefäßähnlichen Strukturen der Schleimhaut-Äquivalente Anschluss an das murine Blutgefäßsystem finden, wurden parallele Schnitte mittels CD31-Färbung auf humane gefäßähnliche Strukturen sowie mittels HE-Färbung auf Erythrozyten analysiert (Abbildung 95). Bereits 5 Tage nach der Transplantation konnten Erythrozyten (Abbildung 95B) in den gefäßähnlichen Strukturen (Abbildung 95A, B) nachgewiesen werden.

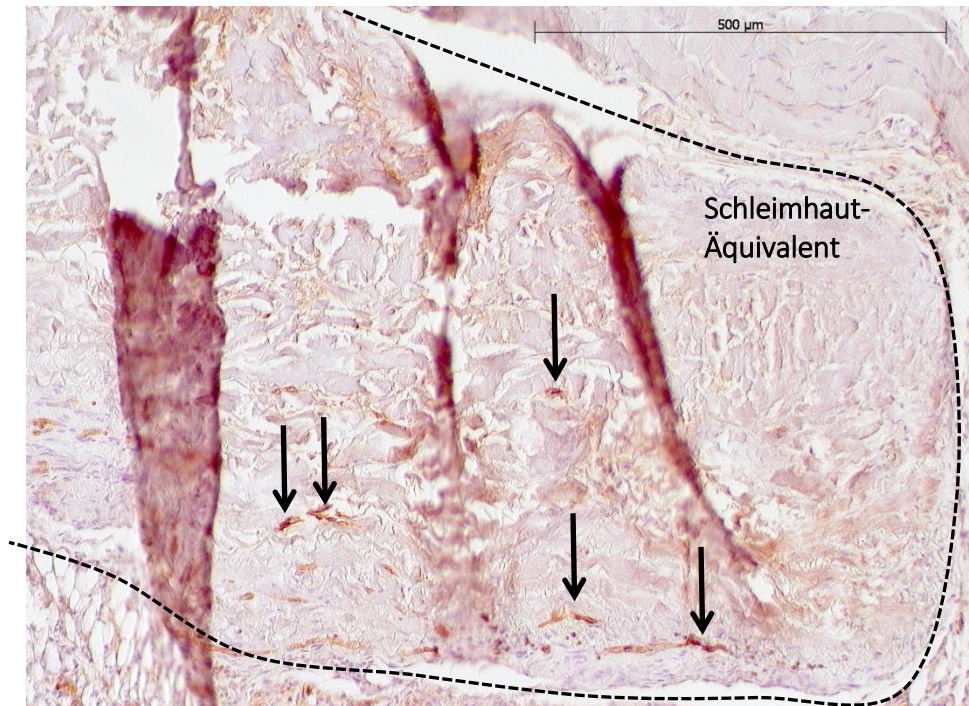


Abbildung 94 - Immunhistochemische Färbung von CD31 zum Nachweis gefäßähnlicher Strukturen tief in der Bio-Gide® Membran im Maus-Präparat. Das in Mäuse subkutan transplantierte Schleimhaut-Äquivalent wurde nach Entnahme immunhistochemisch analysiert. Ein humanspezifischer CD31-Antikörper diente zur eindeutigen Identifikation von humanen Endothelzellen (braune Färbung), wodurch *in vitro* gebildete gefäßähnliche Strukturen visualisiert werden konnten (schwarze Pfeile). Diese konnten zum Teil bis tief in die Membran nachgewiesen werden.

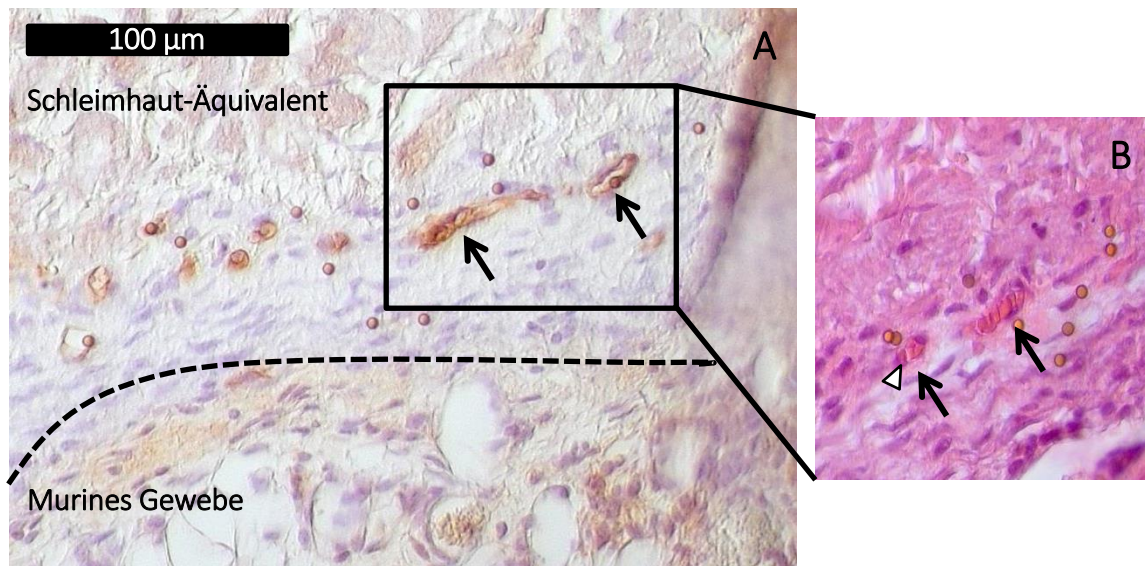
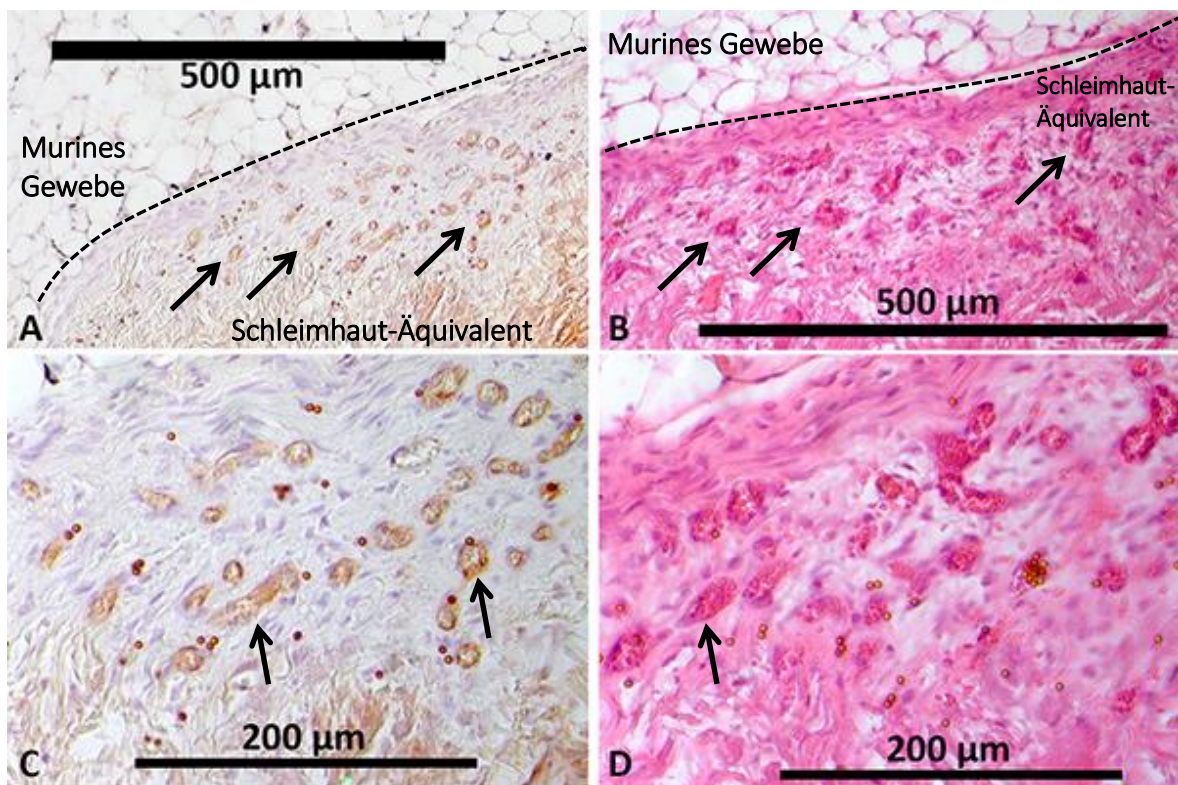


Abbildung 95 - Immunhistochemische Färbung von CD31 sowie HE-Färbung zwei paralleler Schnitte zur Analyse der Anastomose an das murine Blutgefäßsystem nach 5 Tagen. 5 Tage nach Transplantation wurden die Schleimhaut-Äquivalente entfernt und immunhistochemisch (A) auf CD31 analysiert, sowie (B) HE gefärbt. Spezifische, durch humane Endothelzellen gebildete gefäßähnliche Strukturen (A, braune Färbung, schwarze Pfeile) konnten parallel in der HE Färbung gefunden werden (B, schwarze Pfeile). In letzterer zeigte sich deutlich, dass Erythrozyten in den gefäßähnlichen Strukturen vorhanden waren (B, weiße Pfeilspitze). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Trennlinie zwischen Schleimhaut-Äquivalent und murinem Gewebe. Der schwarze Balken entspricht 100 µm.

Bei Analyse der Transplantate, die erst nach 10 Tagen wieder aus den Mäusen entnommen wurden, zeigte sich bei CD31-Färbung eine dichte Bildung gefäßähnlicher Strukturen im Schleimhaut-Äquivalent, die bis ca. ein Drittel in die Membran hinein reichte (Abbildung 96A, C). In parallelen HE-Färbungen konnten dieselben Stellen gefunden werden, welche deutlich Erythrozyten innerhalb der CLS zeigten (Abbildung 96B, D). Bei stärkerer Vergrößerung waren Erythrozyten auch in der CD31-Färbung innerhalb der CLS erkennbar (Abbildung 96C).

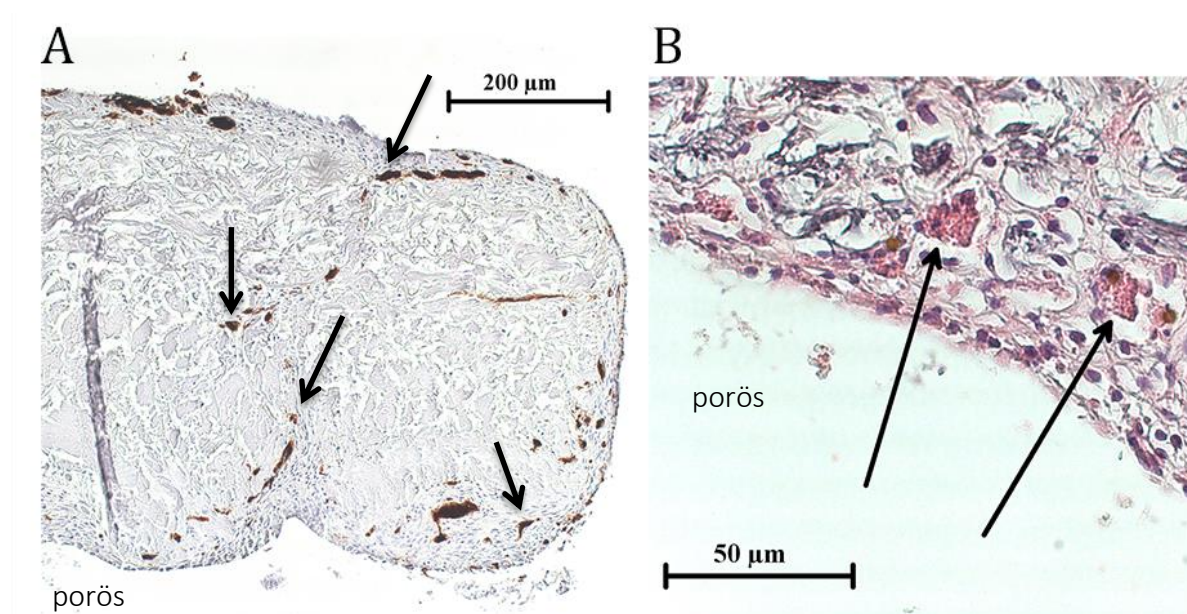


**Abbildung 96 - Immunhistochemische Färbung von CD31 sowie HE-Färbung zwei paralleler Schnitte zur Analyse der Anastomose an das murine Blutgefäßsystem nach 10 Tagen.** 10 Tage nach Transplantation wurden die Schleimhaut-Äquivalente entfernt und immunhistochemisch (A, C) auf CD31 analysiert, sowie (B, D) HE gefärbt. Bei C handelt es sich um einen Ausschnitt aus A, bei D um einen Ausschnitt aus B. Spezifische, durch humane Endothelzellen gebildete gefäßähnliche Strukturen (A, C braune Färbung, schwarze Pfeile) konnten parallel in der HE Färbung gefunden werden (B, D schwarze Pfeile). In letzterer zeigte sich deutlich, dass Erythrozyten in den gefäßähnlichen Strukturen vorhanden waren. Erythrozyten konnten bei größerer Vergrößerung auch in der immunhistochemischen CD31-Färbung gefunden werden (C, braune Färbung, schwarze Pfeile). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Trennlinie zwischen Schleimhaut-Äquivalent (unterer Teil) und murinem Gewebe (oberer Teil).

### 3.5.2 CAM-Assay

Zur weiteren Analyse der Anastomose sowie um Aufschluss zu erhalten, in wie weit das Epithelium des Schleimhaut-Konstrukts *in vivo* überlebensfähig ist, wurden CAM-Assays durchgeführt. Die Entnahme, das Einbetten und Schneiden sowie die Immunhistochemie der CAM-Haut gestaltete sich aufgrund der Fragilität der CAM schwierig, weshalb diese histologisch nicht analysiert werden konnten. Hier beschreiben sind die Ergebnisse zu den Analysen des Schleimhaut-Äquivalents.

Wie bereits in der Maus zeigte sich eine Bildung gefäßähnlicher Strukturen innerhalb der Membranen, nachgewiesen durch CD31-Färbung, welche über die gesamte Membran verteilt und auch tiefer innerhalb dieser zu finden war (Abbildung 97A). Bei Vergleich analoger HE-Färbungen konnten zum Teil Erythrozyten an den Stellen gefäßähnlicher Strukturen gefunden werden (Abbildung 97B).

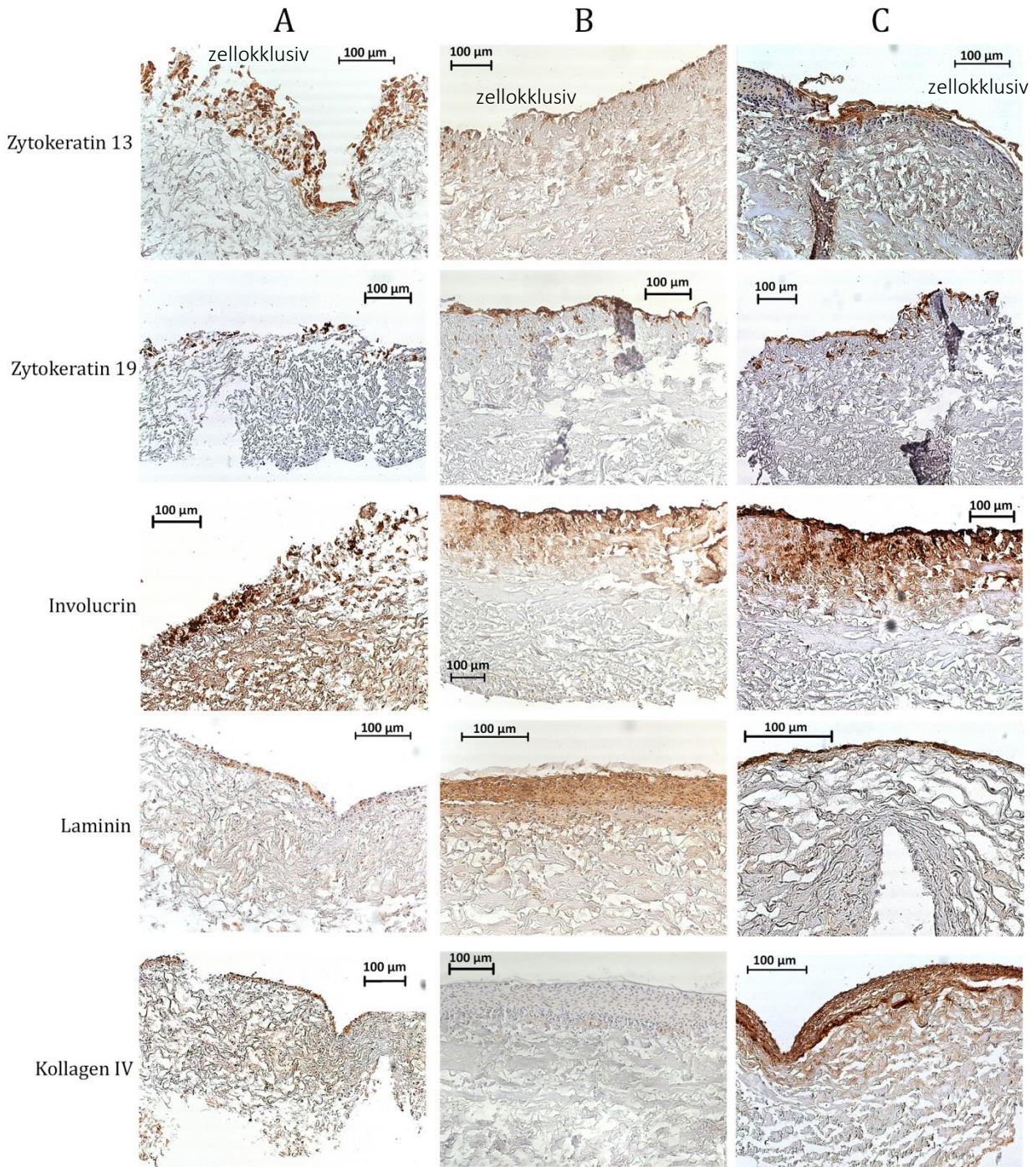


**Abbildung 97 - Immunhistochemische Färbung von CD31 sowie HE-Färbung paralleler Schnitte zur Analyse der Anastomose an das Blutgefäßsystem der CAM nach 5 Tagen.** 5 Tage nach Auflegen der Schleimhaut-Äquivalente auf die CAM befruchteter Hühnereier wurden diese entfernt und immunhistochemisch auf humanes CD31 analysiert. Dabei konnten gefäßähnliche Strukturen bis tief in die Bio-Gide® Membran nachgewiesen werden (A). In parallelen HE-Färbungen zeigten sich in den gefäßähnlichen Strukturen Erythrozyten (B, schwarze Pfeile).

Bei Analyse der Epithelisierung der Schleimhaut-Äquivalente nach Kultivierung auf der CAM zeigte sich ein inhomogenes Bild. Die Membranen wiesen in der Immunhistochemie zum Teil eine starke Hintergrundfärbung auf. Diese könnte auf Moleküle der CAM, die sich in der Membran eingelagert haben, zurückführbar sein.

Auf der zelloklusiven Seite konnte in zwei der drei Ansätze eine durchgehende Zellschicht Zytokeratin 13-positiver Zellen gefärbt werden (Abbildung 98B, C). In diesen war zudem eine durchgehende Zellschicht positiv für die Expression von Zytokeratin 19 und Involucrin. Involucrin war von den drei Markern am intensivsten gefärbt mit einer kontinuierlichen, mehrreihigen Schicht auf der zelloklusiven Seite sowie einer schwächer werdenden Färbung in Richtung der porösen Seite. Bei Membran A zeigten sich bei Färbung aller drei Marker vereinzelte positive Zellen, die nicht zu einem kontinuierlichen Layer organisiert waren (Abbildung 98A).

Laminin und Kollagen IV als Bestandteile der Basalmembran konnten zum Teil auf der zelloklusiven Seite nachgewiesen werden. Bei Membran A konnten beide Moleküle als eine dünne, schwach gefärbte Schicht detektiert werden (Abbildung 98A). Membran B wies eine starke Färbung von Laminin auf, jedoch keine von Kollagen IV (Abbildung 98B). Hier konnte eine ungefärbte, aufgelagerte Zellschicht beobachtet werden, die über der Laminin-Färbung lag. In Membran C konnte eine der zelloklusiven Seite aufgelagerte, Laminin-positive Schicht nachgewiesen werden (Abbildung 98C). Kollagen IV war hier in einer breiteren, in die Membran hinein reichenden Schicht detektierbar. Dabei zeigte sich in ca. 50 µm Tiefe eine intensiver gefärbte Schicht. Zwischen den Präparaten, die auf CAM-Häute unterschiedlicher Eier transferiert worden waren, traten große Unterschiede auf.



**Abbildung 98 - Immunhistochemische Analyse zur Analyse der Epithelialisierung der Schleimhaut-Äquivalente nach 5 Tagen auf der CAM.** 5 Tage nach Auflegen der Schleimhaut-Äquivalente auf die CAM befruchteter Hühnereier wurden diese entfernt und immunhistochemisch auf verschiedene Marker analysiert. Gefärbt wurden Zytokeratin 13, Zytokeratin 19, Involucrin, Laminin und Kollagen IV. Dargestellt sind die Färbungen dreier Membranen (A, B, C). Die zelloklusiv Seite befindet sich bei allen dargestellten Membranen oben.

## 4 Diskussion

### 4.1 Isolationsbedingungen primärer Epithelzellen

Zur Generierung funktioneller Schleimhaut-Äquivalente ist es essentiell, eine verlässliche Isolation primärer Zellen zu gewährleisten. Für die spätere Verwendung in der Medizin ist der Einsatz autologer Zellen unumgänglich. Die Isolation von Epithelzellen aus gut zugänglichem Gewebe, wie Mundschleimhaut, musste zunächst zuverlässig etabliert werden. Eine enzymatische Präparation der Mundschleimhaut-Proben war weniger erfolgreich als ein rein mechanisches Isolationsprotokoll, durch das ein zusammenhängendes Auswachsen der Epithelzellen in einer Art Zell-*Sheet* erzielt werden konnte. Diese Art des Wachstums ist auch bei der Re-Epithelialisierung von Wunden beschrieben. Poujade *et al.* postulierten, dass Epithelzellen durch verfügbaren Platz („*free space*“) stimuliert werden, kollektiv zu migrieren [205]. Möglicherweise simuliert die mechanische Präparation entlang der Epitheliumgrenze eine Wunde, welche die kollektive Migration der Epithelzellen in Richtung des verfügbaren Platzes stimuliert. Für diese Art der Migration sind interzelluläre Kontakte zwischen den Epithelzellen essentiell [206]. Ein Vorteil gegenüber dem enzymatischen Verdau, bei dem eine Einzelzellsuspension erzielt wird, könnte bei der rein mechanischen Präparation das Aufrechterhalten von Zell-Zell-Kontakten sein. Verdauungsenzyme wie Trypsin und Dispase degradieren wichtige Oberflächenmoleküle wie die interzellulären Adhäsionsmoleküle E-Cadherin und Integrine, sowie membranständige Rezeptoren [207, 208]. Darüber könnte eine Inkubation mit diesen Enzymen in einer Reduktion der Migration und des Wachstums von Epithelzellen resultieren. Der Einsatz eines inhibitorischen E-Cadherin-Antikörpers führte beispielsweise zu einer unkoordinierten epithelialen Migration und einem ungleichmäßigen Wundschluss [206]. Das rein mechanische Isolationsprotokoll schien somit am besten dazu geeignet, eine zuverlässige und vitale Epithelzellkultur zu erzielen. Aus diesem Grund wurde die rein mechanische Methode mit anschließendem Auswachsen der Zellen gegenüber der deutlich aufwendigeren enzymatischen favorisiert.

Um die Auswachsrate weiter zu steigern, wurde der Effekt von Variationen der einzelnen Supplemente des FAD-Mediums untersucht. Eine Erhöhung der Insulinkonzentration führte zu einem besseren und schnelleren Auswachsen von Epithelzellen. Insulin ist ein

essentielles Hormon und seine wachstumsfördernde Wirkung auf Zellkulturen ist seit 1924 bekannt [209, 210]. In der Literatur konnten Proliferationssteigerungen bei Behandlung mit Insulin an verschiedenen primären humanen Zellen beobachtet werden, wie Astrozyten, Brustkrebszellen und arterielle Muskelzellen [211–213]. Basierend auf diesen Studien und den beschriebenen Ergebnissen scheint Insulin das Auswachsen von Epithelzellen durch die Stimulation der Zellproliferation zu beschleunigen. Eine rein mechanische Gewebepräparation in Kombination mit einer erhöhten Insulinkonzentration im Kultivierungsmedium erzielte die gewünschte einfach generierbare, zuverlässige und funktionelle Epithelzellkultur. Anhand der immunhistochemischen Analyse konnte der epitheliale, basale Ursprung der isolierten Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Sie waren positiv für basale und intermediäre Marker, nicht jedoch für Marker von terminaler Differenzierung. Dies zeigt, dass sich Mundschleimhaut hervorragend als Donorgewebe zur Isolation autologer Epithelzellen eignet. Eine kleine Biopsie reichte aus, um eine vitale Zellkultur zu erzielen.

In der Literatur finden sich verschiedene Methoden zur Generierung primärer Epithelzellkulturen. Meistens basieren diese Protokolle auf enzymatischen Verdauungsschritten der Gewebe [90, 196, 214]. Diese sind zeitaufwendig, umständlich und zeigten sich im Rahmen dieser Arbeit als nicht notwendig. Oft findet auch ein sogenannter *Feeder Layer* aus murinen NIH/3T3 Fibroblasten Einsatz [215, 216]. Andere Arbeitsgruppen setzen Magnet- oder Fluoreszenz-basierte Sortierungstechniken ein, um die sehr häufig auftretenden Kontaminationen mit Fibroblasten zu vermeiden [217, 218]. Diese Prozedur ist zeitintensiv und führt zu einer relativ geringen Ausbeute an Epithelzellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine schnelle, einfache und zuverlässige Isolationsmethode durch eine rein mechanische Präparation und geeignetes Medium erzielt werden, die nicht auf einen *Feeder Layer* angewiesen ist und zu einer stabilen Primärkultur führt.

## 4.2 Vergleich verschiedener Donorgewebe zur Gewinnung von mikrovaskulären Endothelzellen

Um Alternativen zur Isolation von Endothelzellen aus dem Präputium zu entwickeln, das als autologes Material nicht von allen Patienten zur Verfügung steht, wurde Haut aus dem Bereich von Vulva und Brust verwendet. Die isolierten HDMEC aus Präputium und Vulva-

haut konnten eindeutig als Endothelzellen identifiziert werden; sie exprimierten durchgehend die endothelialen Marker CD31 und vWF, nicht jedoch CD45 oder epitheliale bzw. fibroblastäre Marker. Dass es sich um mikrovaskuläre, ausdifferenzierte Endothelzellen handelt, zeigte eine fast durchgehende negative CD34-Färbung. Eine Expression von CD34 ist in endothelialen Progenitorzellen beschrieben, aber auch in makrovaskulären Endothelzellen der Nabelschnurvene, wohingegen Müller *et al.* in mikrovaskulären Endothelzellen nur eine sehr schwach positive Expression nachwies [219, 220]. Die gefundene, sehr geringe positive CD34-Färbung der vHDMEC könnte auf einen Anteil an endothelialen Vorläuferzellen zurückzuführen sein. Für Vulvagewebe wurde dasselbe Isolationsprotokoll verwendet wie für Präputium, da sich in der Literatur bisher keine Studie zur Isolation von HDMEC aus Vulvagewebe findet. Nur einige wenige Arbeitsgruppen beschrieben die Isolation fibroblastärer oder epithelialer Zellen aus humaner Vulva oder Vagina [81, 221–223]. Eine neuere Publikation demonstrierte die Isolation von heterogenen Zellpopulationen aus Vaginalbiopsien mittels Auswachsen, in denen sie jedoch keine Endothelzellen nachweisen konnten [224]. Das Zusammenspiel der nachgewiesenen Marker unterstützt jedoch die Aussage, dass es sich bei den isolierten vHDMEC um eine reine Endothelzellkultur handelte.

Wie in Vorarbeiten [225, 226], aber auch in dieser Arbeit demonstriert wurde, sind die aus Präputium isolierten HDMEC zur Konstruktion von prävaskularisierten Schleimhaut-Äquivalenten geeignet: Sie bildeten in Ko- und Trikultur ein differenziertes Netzwerk gefäßähnlicher Strukturen aus. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der HDMEC und vHDMEC hinsichtlich Isolation, Morphologie, Wachstumsverhalten und Marker-Profil lässt sich schlussfolgern, dass auch vHDMEC für die Konstruktion prävaskularisierter Schleimhaut-Äquivalente eingesetzt werden können. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht hinreichend demonstriert werden.

Als eine weitere Alternative zu Präputium wurde Haut aus dem Bereich der weiblichen Brust verwendet. Auch für dieses Gewebe wurde die für Präputium beschriebene Methode angewandt. Eine immunhistochemische Charakterisierung der Endothelzellen war hierbei nicht möglich, da nur Mischkulturen mit Fibroblasten erzielt werden konnten. Diese Mischkultur zeigte in ersten Analysen die Bildung von vaskulären Strukturen auf der Bio-Gide®-Membran. Die Möglichkeit, mikrovaskuläre Endothelzellen aus Hautgewebe zu

isolieren, die dann zur Prävaskularisierung von Gewebe-Äquivalenten eingesetzt werden können, besteht somit.

Eine weitaus einfachere und auf jeden Patienten anwendbare Alternative stellt die Isolation von ECFC aus peripherem Blut dar. ECFC haben das Potential, in reife Endothelzellen zu differenzieren und können dann für *in vitro* generierte Gewebe eingesetzt werden [227, 228]. Die isolierten Zellen waren alle positiv für die endothelzellspezifischen Marker CD31 und vWF, was ihren endothelialen Charakter bestätigt [220]. CD34 war bei den kultivierten ECFC durchgehend negativ, was darauf schließen lässt, dass die isolierten Vorläuferzellen eine Differenzierung in reife Endothelzellen durchlaufen haben [229]. Der Leukozyten-Marker CD45 wurde von den isolierten Zellen nicht exprimiert, was eine Kontamination mit hämatopoetischen Zellen während der Isolationsprozedur ausschließt [230]. Auch ein epithelialer oder fibroblastärer Charakter der Zellen konnte immunhistochemisch ausgeschlossen werden. Bei Einsatz zur Prävaskularisierung zeigten die Zellen zuverlässig eine Bildung gefäßähnlicher Strukturen und sind somit für den Einsatz in Gewebe-Äquivalenten geeignet. Die Bildung von CLS durch ECFC war dabei etwas schlechter als bei HDMEC, weshalb ein weiterführender, umfassender Vergleich beider hinsichtlich der Prävaskularisierung erfolgen sollte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Isolation von endothelialen Zellen aus verschiedenen humanen Gewebeproben sowie Blut erfolgreich und zuverlässig etabliert werden konnte. Im Falle von Brusthaut sollte die Generation einer reinen Endothelzellkultur noch abschließend erzielt werden, um immunhistochemische Analysen zur eindeutigen Identifikation der isolierten Zellen durchführen zu können. Den anderen isolierten Zellen konnte durchgehend ein endothelialer Charakter nachgewiesen werden. Die besten Ergebnisse zur Prävaskularisierung von Gewebe-Äquivalenten zeigten sich unter Verwendung von HDMEC aus Präputium und ECFC.

#### 4.3 Molekulare Interaktion der Zellen im Schleimhaut-Äquivalent im Kontext der Prävaskularisierung

Bei der Generierung eines funktionellen prävaskularisierten Schleimhaut-Äquivalents in Trikkultur spielen verschiedene Parameter eine Rolle. Dazu gehört eine optimierte Besiedlungsreihenfolge der beteiligten Zellen, um deren Differenzierung zu fördern und negative

Wechselwirkungen zu vermeiden. Für die Etablierung eines funktionellen Schleimhaut-Äquivalents erwies sich folgende Besiedlungsreihenfolge als am besten geeignet: Fibroblasten an Tag 0, Epithelzellen an Tag 1, HDMEC an Tag 8.

In den Kokulturen zeigte sich eine schnellere, zuverlässigere und ausdifferenzierte Prävas-kularisierung, sofern die Fibroblasten zeitlich vor den HDMEC ausgesät wurden. Bei Invasion der Fibroblasten in das Biomaterial hinein konnte eine verstärkte fibroblastäre Sekretion von VEGF, IL-8, bFGF und Ang-2 nachgewiesen werden. Vermutlich entsteht durch die Anhäufung dieser pro-angiogenen Zytokine ein optimales Milieu für die Endothelzellen hinsichtlich der Ausbildung einer Prävas-kularisierung. Die Bio-Gide®-Membran, die aus Kollagenen des Typs I und III besteht (Angaben des Herstellers), wirkte sowohl auf die fibroblastäre als auch die endotheliale Zytokin-Sekretion steigernd. VEGF, IL-8 und bFGF wurden dabei verstärkt von den Fibroblasten ausgeschüttet, eNOS und Ang-2 von den HDMEC. Vermittelt wird dies sehr wahrscheinlich über ein Zusammenspiel der Kollagen-Bestandteile und der Dreidimensionalität der Matrix. So sezernierten Tumorzellen, die in dreidimensionalen (3D) Kollagen-*Scaffolds* kultiviert wurden, verstärkt VEGF, IL-8 und bFGF (Liu et al., 2014). Verschiedene Studien demonstrierten einen Einfluss von Kollagen auf morphologische und mechanische Charakteristika sowie zelluläre Prozesse von Fibroblasten, wie unter anderem auf die Migration [231–233]. Darüber hinaus förderten 3D-Kollagengerüste die fibroblastäre wie auch endotheliale Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP), die zur Remodellierung der *Scaffolds* beitragen [234, 235]. Die Stimulation der Wachstumsfaktor-Sekretion ist in diesem Kontext dagegen kaum untersucht. Einige wenige Arbeitsgruppen beschrieben eine Förderung pro-angiogener Eigenschaften von Fibroblasten durch 3D-Matrices, wie eine gesteigerte Expression von VEGF und eine erhöhte Deposition von EZM-Komponenten (Newman et al., 2011; Pinney et al., 2000). Kahn *et al.* beschrieben eine gesteigerte Expression von IL-8 in HUVEC, die in Kollagengelen kultiviert wurden [236]. Zelluläre Interaktionen mit Kollagenen werden zum größten Teil durch Integrine vermittelt [237, 238]. Integrine wiederum können intrazelluläre Signalwege initiieren, wie u.a. den PI3K-AKT-, den MAP-Kinase- oder den ERK-Signalweg [239–241]. Die beobachtete, gesteigerte Zytokin-Sekretion im Schleimhaut-Äquivalent könnte über solche Kollagen-Integrin-Wechselwirkungen induziert worden sein. So führte in Endothelzellen des Gehirns die Aktivierung des  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrins über den ERK-Signalweg

zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion [242]. Die Inhibition von  $\alpha$ v-Integrin resultierte in einer reduzierten endothelialen VEGF-Sekretion [243, 244]. Die Autoren konnten in diesem Kontext eine essentielle Beteiligung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs an der den Integrinen nachgeschalteten Signalübertragung ausmachen [244]. Auch Scatena *et al.* demonstrierten eine Integrin-vermittelte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in Endothelzellen [245]. Neben der VEGF-Expression reguliert NF- $\kappa$ B zudem die Expression von IL-8 [246, 247]. Erstaunlicherweise führte die Inhibition des  $\alpha$  $\beta$ 3-Integrins in Fibroblasten dagegen zu einer gesteigerten VEGF-Expression [243]. Jedoch aktivierte die Kultivierung in 3D-Kollagenmatrices in Fibroblasten den NF- $\kappa$ B-Signalweg [248], sodass in diesen Zellen eine Stimulation über andere Mitglieder der Integrin-Familie denkbar ist.  $\beta$ 1-Integrine vermittelten beispielsweise in mesenchymalen Stammzellen die Aktivierung des ERK- und Rho-Signalwegs und darüber eine Steigerung der VEGF-Sekretion [249]. In endometrialen Stromazellen stimulierten  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrine die IL-8-Sekretion [250]. Darüber hinaus konnte in Fibroblasten und Endothelzellen eine Integrin-vermittelte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs nachgewiesen werden [241, 251], der wiederum Expressionssteigerungen von VEGF, bFGF und eNOS bewirken kann [251–253]. Integrine fördern zudem die eNOS-Aktivität [254].

Neben der stimulierenden Wirkung der Kollagenmatrix auf die Zytokinsekretion ist auch eine Hypoxie-induzierte Stimulation nicht auszuschließen, müsste jedoch in weiteren Experimenten genauer analysiert werden. Hypoxie ist mit das stärkste Stimulans der Sekretion pro-angiogener Moleküle durch Fibroblasten, aber auch Endothelzellen [255–259]. Bei zweidimensionaler Kultivierung in Wells konnte ab einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$ /ml pro Well einer 24-Well-Kulturschale eine Reduktion des Sauerstoffgehalts von ca. 18 % auf 8–10 % beobachtet werden [260]. In Geweben liegt die ausreichende Sauerstoffkonzentration zum Teil noch niedriger [261, 262], sodass in dieser 2D-Zellkultur vermutlich kein hypoxisches Milieu vorlag. Andere Studien beschreiben Hypoxie in Zellkultur bei ca. 2 % Sauerstoffgehalt [263]. Jedoch verdeutlicht diese Studie [260] den Sauerstoff-Verbrauch der Zellen mit zunehmender Zellzahl in Kultur. Ob in einem physiologischen Gewebe Hypoxie herrscht, hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie dem Sauerstoffpartialdruck sowie dem jeweiligen Gewebe und seinen spezifischen Anforderungen. Zum Teil tolerieren die Gewebe auch sehr niedrige Sauerstoffbedingungen bis 2 % [261, 262]. In 3D-*Scaffolds*

beobachteten Volkmer *et al.*, dass die die Sauerstoffkonzentration innerhalb von 5 Tagen bis auf unter 1 % sank [260]. Dies hatte eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen zur Folge [260], sodass hier von einem hypoxischen Milieu ausgegangen werden kann. Auch andere Studien beschreiben ein hypoxisches Milieu in Biomaterialien und dessen Auswirkungen auf das Zellüberleben [103, 264, 265]. Die chemotaktische Wirkung der Bio-Gide®-Kollagenmembran [266] könnte die Zellen veranlassen, in die Matrix zu migrieren. Dort könnte sich durch die erhöhte Anzahl an Zellen ein hypoxisches Milieu einstellen, welches wiederum zur beobachteten Steigerung der Zytokinsekretion geführt haben könnte. Beispielsweise schütteten die HDMEC in Monokultur auf der Bio-Gide®-Membran deutlich mehr Ang-2 aus als in 2D-Kultur im Well. Während die Endothelzellen im Well durchgehend ungefähr die gleiche Menge an Ang-2 sezernierten, stieg die Konzentration bei den Membran-Monokulturen kontinuierlich an. Dies könnte durch zunehmende hypoxische Bedingungen innerhalb der Bio-Gide®-Membran stimuliert worden sein. Die in den angeführten Studien verwendeten 3D-Matrices waren jedoch durchgehend größer als die eingesetzten Bio-Gide®-Membranen. Für definitive Aussagen bezüglich einer Hypoxie-vermittelten Zytokin-Sekretion in den Schleimhaut-Äquivalenten muss daher untersucht werden, ob innerhalb der Bio-Gide®-Membran ein hypoxisches Milieu herrscht oder sich einstellt.

Fibroblasten beginnen bei Kultivierung in 3D-Kollagenmatrices erst nach einer initialen Lag-Phase von 8-16 h zu migrieren [267]. Auch im Schleimhaut-Äquivalent ist zu erwarten, dass die Fibroblasten nach einiger Zeit anfangen, in das Biomaterial hinein zu wandern. Durch die um 24 h zeitversetzte Aussaat von HDMEC könnte dann eine tiefere Lokalisation der Fibroblasten gegeben sein. Fibroblasten sezernieren lösliche Moleküle, die chemotaktisch auf Endothelzellen wirken [268]. Dazu gehören auch die analysierten Faktoren VEGF, IL-8 und bFGF, die in den Schleimhaut-Äquivalenten deutlich verstärkt sezerniert wurden und zudem in der Boyden-Kammer die Migration der HDMEC stimulierten. Eine Zytokin-Sekretion durch tiefer lokalisierte Fibroblasten könnte somit die Migration der HDMEC in die Bio-Gide®-Membran unterstützen, weshalb die frühere Aussaat der Fibroblasten einen Vorteil brachte. Neben der direkten chemotaktischen Wirkung der Moleküle auf die Endothelzellen könnte die gesteigerte Zytokin-Sekretion im Schleimhaut-Äquivalent die Interaktion der Zellen mit der Matrix in einer Art *Feedback-Loop* weiter stimulieren. VEGF

fördert beispielsweise die endotheliale Expression und Exponierung von Integrinen [269]. Darüber könnte die Invasion der Zellen in das Biomaterial hinein weiter unterstützt werden. Fibroblasten interagieren mit Kollagenen, wodurch ihre MMP-Sekretion stimuliert wird und diese wiederum eine Remodellierung von Kollagenmatrices bewirken [233, 234]. Dies könnte auch in der Bio-Gide®-Membran auftreten und die endotheliale Adhäsion und Migration in diese hinein erleichtern. Seandel *et al.* demonstrierten im CAM-Assay, dass eine MMP-vermittelte Umstrukturierung von Kollagen I-*Scaffolds* für deren Vaskularisierung durch einwandernde Endothelzellen notwendig war [270]. Bei Einsatz von nicht-remodellierbarem Kollagen I aus Kollagenase-resistenten Mäusen konnte keine Vaskularisierung und zudem keine Invasion von Endothelzellen erzielt werden. Dagegen blieb die Invasion durch andere Zelltypen unverändert [270]. Im Hinblick auf die Prävaskularisierung unterstreicht dies die Notwendigkeit einer Umstrukturierung der Bio-Gide®-Membran, die im Schleimhaut-Äquivalent vermutlich durch die Fibroblasten vermittelt wird. Die vorangestellte Kultivierung scheint diesen mehr Zeit für die Remodellierung zu geben, wodurch die Adhäsion der Endothelzellen an und ihre Migration in das Biomaterial hinein erleichtert und beschleunigt, aber auch die Vaskularisierung unterstützt werden könnte. Kollagene bzw. Integrin-Interaktionen sind essentiell an der Bildung von CLS beteiligt: Mehrere Studien belegen eine pro-angiogene Wirkung von Kollagenen [271, 272]. Die Inhibition verschiedener Integrine auf Endothelzellen führte zu einer gehemmten Lumenbildung *in vitro* und einer gestörten Vaskulogenese *in vivo* [273–275]. Im Kontext der Angiogenese, aber auch der Wundheilung, ist die physiologische Remodellierung der EZM ein essentieller Regulationsmechanismus. Dabei werden sogenannte kryptische Domänen freigelegt, die Bindestellen für Zellen darstellen und u.a. ihre Adhäsion fördern können, beispielsweise für Integrine in Kollagenen [276, 277]. Hinsichtlich der Wundheilung besteht die Theorie, dass beschädigte Wundgewebe für Zellen erkennbar werden und die Regeneration beschleunigt wird [278]. Im Rahmen der Angiogenese konnten verschiedene solcher kryptischer Epitope auf Integrinen identifiziert werden, die pro- oder anti-angiogene Wirkungen vermitteln [279–282]. Ames *et al.* identifizierten eine kryptische Domäne in Typ I-Kollagenen, die durch Makrophagen freigelegt wird und die Angiogenese fördert [279]. Eine weitere Arbeitsgruppe wies ein Epitop in Kollagen IV nach, das durch MMP-Verdau zugänglich wird und essentiell für die endotheliale Migration und retinale Neovaskularisierung ist [280]. Zudem können auch weitere pro- und anti-angiogene Peptide aus Kollagenen und anderen

EZM-Komponenten freigesetzt werden [283, 284]. So erzeugte die Remodellierung von Kollagen I durch Fibroblasten Integrin-unabhängige Bindestellen für Makrophagen, wodurch deren Adhäsion gefördert wurde [285]. Diese Beispiele unterstreichen die Relevanz einer Umstrukturierung der Bio-Gide®-Membran durch Fibroblasten für die Prävasikularisierung. Auch in diesem Kontext sind autokrine und parakrine *Feedback-Loops* durch die analysierten Moleküle denkbar. So kann Stickstoffmonoxid (NO), synthetisiert durch aktivierte eNOS, die Expression und Sekretion von MMP fördern [286]. Die Aktivität von eNOS wird wiederum durch Integrine, aber auch VEGF- bzw. bFGF-vermittelt über den PI3K-Signalweg reguliert [254, 287, 288]. Wie bereits angesprochen wirkt VEGF ebenfalls stimulierend auf die Integrin-Expression und Präsentation auf Zellen [269]. Die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Membran über Integrine könnte die beobachtete Sekretionssteigerung der Zytokine anregen, die dann über die weitere Kultivierung wiederum durch Stimulation der zellulären Interaktion mit der Matrix und deren Remodellierung zur Verbesserung der Migration und Prävasikularisierung beitragen können.

Die beobachtete frühere Initiation der Tubulogenese und verbesserte Bildung von CLS bei Vor-Inkubation der Schleimhaut-Äquivalente mit Fibroblasten kann ebenfalls auf deren gesteigerte Zytokin-Konzentration in den Membranen zurückgeführt werden. Neben ihrer chemotaktischen Wirkung förderten die sezernierten Faktoren VEGF, IL-8 und bFGF zusätzlich die *Tube Formation* der HDMEC. Die analysierten Faktoren sind alle essentiell an der Gefäßbildung beteiligt. VEGF und bFGF sind als hauptsächliche Initiatoren der Angiogenese beschrieben [289]. Auch IL-8 hat pro-angiogene Wirkung [290, 291] und wird während der Tubulogenese heraufreguliert [292]. eNOS unterstützt die VEGF-vermittelten pro-angiogenen Effekte [293] und trägt zudem zur Tubulogenese *in vitro* bei [294]. Das Angiopoetin Ang-2 wirkt durch Destabilisierung der Gefäße initiierend auf die Angiogenese [295] und wird ebenfalls während der *Tube Formation* verstärkt exprimiert [296]. Im Kontext der Prävasikularisierung ist die Zytokin-Sekretion im Zusammenwirken mit der Kokultivierung der beteiligten Zellen zu betrachten. Zwar demonstrierten Montesano *et al.* eine Stimulation von Endothelzellen durch 3D-Kollagen I-Matrices, die eine Organisation der Zellen in kapillarähnliche Strukturen bewirkte (Montesano et al., 1983), auf den Bio-Gide®-Membranen konnte jedoch keine Prävasikularisierung durch monokultivierte Endothelzellen erzielt werden. Auch in der Literatur wird ansonsten durchgehend eine Kokultivierung mit mesen-

chymalen Zellen als Voraussetzung für die Gefäßbildung angesehen [174, 268, 297]. Durch die Kultivierung von zwei oder mehr Zelltypen in Gewebekonstrukten wird ein physiologisches Milieu simuliert und eine Näherung an die *in vivo* Situation erzielt. Die beteiligten Zellen beeinflussen sich dabei gegenseitig über autokrine und parakrine Kommunikation sowie über direkten interzellulären Kontakt über *gap junctions* und juxtakrine Signalübertragung [298]. Diese zellulären Wechselwirkungen bedingen bei Auswahl geeigneter Zellen eine Förderung zellspezifischer Differenzierungen, die sich im Rahmen des *Tissue Engineering* positiv auf die Gewebebildung auswirken [68, 92, 174, 268, 297]. In diversen Experimenten, die sich in verwendeten Zellen, Biomaterialien oder der Art der Kultivierung unterschieden, führten Kokultivierungen zu einer Hochregulation von VEGF [268, 299, 300], bFGF [301] und Ang-2 [302, 303]. Saito *et al.* beschrieben die Notwendigkeit eines basalen Levels an VEGF, das von den kokultivierten Fibroblasten sezerniert wurde, für die endotheliale Ausbildung von *Tubes in vitro* [297]. Die Kokultivierung von HUVEC und Stammzellen des Knochenmarks bewirkte eine Steigerung der VEGF-Sekretion durch die Stammzellen, wobei das ausgeschüttete VEGF die Tubulogenese der HUVEC stimulierte [299]. Auch in weiteren Studien wird die Zytokin-Sekretion der mit-kultivierten Zellen als notwendig für die Ausbildung von CLS in Gewebe-Äquivalenten beschrieben [268, 273]. Im Rahmen dieser Arbeit erhöhte die Insert-Kokultivierung von Endothelzellen und Fibroblasten die endotheliale Sekretion von VEGF, bFGF, eNOS und Ang-2 sowie die fibroblastäre Sekretion von bFGF und Ang-2 bei Vergleich mit den jeweiligen Monokulturen im Well. Diese Sekretionssteigerung beider Zelltypen kann auf eine wechselseitige Stimulation über lösliche Moleküle zurückgeführt werden, wobei insbesondere eine gegenseitige Stimulation der analysierten pro-angiogenen Zytokine denkbar ist. In Endothelzellen konnte eine Steigerung der VEGF-Sekretion durch IL-8 nachgewiesen werden [304]. Da die IL-8-Sekretion bei Kultivierung auf der Bio-Gide®-Membran stimuliert wurde, könnte dies im Schleimhaut-Äquivalent zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion führen. Auch bFGF induzierte eine Freisetzung von VEGF in verschiedenen Zellen [305–307], was die beobachtete synchrone Erhöhung der bFGF- und VEGF-Sekretion erklärt. VEGF und bFGF wiederum vermitteln in Endothelzellen eine Steigerung der Ang-2-Expression [308, 309]. Dieser Effekt könnte ebenfalls Einfluss auf die Ang-2-Ausschüttung im Schleimhaut-Äquivalent ausüben. Die gesteigerte VEGF- und Ang-2-Konzentration in Kokultur könnte den PI3K-AKT-Signalweg aktivieren, welcher die bFGF-Expression fördert [129, 253]. Zudem können VEGF und

bFGF fördernd auf die Expression und Aktivität von eNOS wirken [288, 310, 311], wodurch die synchrone Erhöhung der Sekretion dieser Zytokine in Mono- wie auch Kokulturen erklärbar ist. Die Interaktion der kokultivierten Zellen miteinander sowie mit der 3D-Kollagenmembran bewirkt im Schleimhaut-Äquivalent eine Sekretionssteigerung von pro-angiogenen Zytokinen, die wiederum förderlich für die Bildung von CLS zu sein scheinen. Die analysierten Zytokine VEGF, IL-8 und bFGF stimulierten Vitalität, Proliferation und Migration von HDMEC wie auch die Tubulogenese im *Tube Formation Assay* - Prozesse, die notwendig für die Angiogenese sind. Die durch die 3D-Kollagenmembran sowie die Kokultur gesteigerte Zytokin-Sekretion scheint daher die molekulare Grundlage der Prävas-kularisierung zu sein.

Ein direkter Zell-Zell-Kontakt wird häufig als essentielle Bedingung für eine Vaskularisierung beschrieben [174, 312]. Jedoch gibt es auch Beobachtungen, dass ein direkter interzellulärer Kontakt eher für die Reifung und Aufrechterhaltung als für die Initiation solcher Strukturen notwendig ist [268, 313]. In der vorliegenden Arbeit führte eine räumlich getrennte Kokultivierung in Insert-Zellkulturschalen zu einer verstärkten endothelialen Sekretion von VEGF, bFGF und eNOS sowie zu einer gesteigerten Ausschüttung von VEGF und Ang-2 durch Fibroblasten. Auch in diesem Kontext ist die bereits diskutierte gegenseitige Stimulation der analysierten Faktoren wahrscheinlich. Der direkte zelluläre Kontakt scheint die Zellen jedoch in gewisser Weise in ihrer Zytokin-Sekretion zu inhibieren, da diese in Insert-Kokulturen mit Kontakt schwächer war als in Insert-Kokulturen ohne Kontakt. Auch auf der Bio-Gide®-Membran steigerten die Zellen in Kokultur ihre Zytokin-Sekretion nicht additiv, zum Teil wurden die Faktoren sogar weniger stark oder nur annähernd gleich stark sezerniert wie in den Membran-Monokulturen. Die direkte Kommunikation über Zell-Zell-Kontakte hat somit Auswirkungen auf die Zytokin-Ausschüttung. Dabei ist eine Anpassung der Sekretion denkbar oder aber eine gesteigerte Aufnahme der sezernierten Moleküle durch die Zellen. Die Kokultivierung von HUVEC und Osteoblasten bewirkte eine verstärkte Expression von VEGFR2 in den Endothelzellen [302], was über Rezeptor-Internalisierung eine erhöhte Aufnahme von VEGF bewirken könnte. Des Weiteren konnte eine gesteigerte VEGF-Aufnahme durch erhöhte VEGFR2-Expression in Endothelzellen beobachtet werden, bei denen durch Interaktion mit Laminin Integrin  $\alpha 6$  heraufreguliert war [314]. Fibroblasten in Kokultur sezernieren verstärkt EZM-Kompo-

zenten, unter anderem auch Laminin [273], sodass hierüber eine Stimulation der VEGFR2-Expression und VEGF-Aufnahme der Endothelzellen denkbar ist. Nakayama *et al.* konnten eine gesteigerte VEGF-Aufnahme durch retinale Endothelzellen während der sprossenden Angiogenese nachweisen [315]. Durch die Sprossung der Endothelzellen im Rahmen der CLS-Bildung im Schleimhaut-Äquivalent könnte somit ebenfalls eine gesteigerte VEGF-Aufnahme stattgefunden haben. Dies würde die gegenüber den Monokulturen nicht additiv gesteigerte VEGF-Konzentration erklären. Eine erhöhte Internalisierung könnte für alle analysierten Wachstumsfaktoren in der Kokultur zu einer verminderten nachweisbaren Menge geführt haben.

Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten die Initiation der Angiogenese in Kokulturen, bei denen die Endothelzellen räumlich getrennt von Fibroblasten kultiviert wurden [268]. Auch Kulturmedien, die von Fibroblasten konditioniert oder aber Zell-unabhängig mit einem Gemisch an Wachstumsfaktoren versetzt waren, initiierten die Bildung von CLS in Abwesenheit von mesenchymalen Zellen [273, 313, 316]. Dies unterstreicht die Bedeutung der Kommunikation über lösliche Moleküle in mittels *Tissue Engineering* generierten Geweben. Die dabei erzielten CLS waren jedoch unorganisiert, konnten keine Lumen ausbilden und zeigten wenig Ausreifung. Bei Anwesenheit von Fibroblasten reiften die CLS vollständig aus [268, 273]. Dies deutet daraufhin, dass die Endothelzellen über lösliche Faktoren die Fibroblasten rekrutieren und diese im direkten Kontakt die Differenzierung und Stabilität der CLS unterstützen. Fibroblasten fördern die Angiogenese nicht nur durch Sekretion pro-angiogener Faktoren, sondern auch durch die Deposition von EZM-Bestandteilen [317]. Die Inhibition der fibroblastären EZM-Deposition führte zu einer reduzierten endothelialen Tubulogenese in Kollagenschwämmen, wobei für die Gefäßbildung zusätzlich die Anwesenheit vitaler Fibroblasten wesentlich war [317]. Die Autoren schlossen daraus die Notwendigkeit eines Zusammenspiels von sezernierten EZM-Komponenten und angiogenen Faktoren. Bei Kokultivierung mit Endothelzellen bzw. Keratinozyten konnte in Fibroblasten eine gesteigerte Expression EZM-relevanter Gene beobachtet werden [273, 318]. Im Schleimhaut-Äquivalent könnte die Kokultivierung mit den HDMEC somit die EZM-Deposition der Fibroblasten stimulieren und darüber wiederum die Tubulogenese gefördert werden. Im Rahmen der physiologischen Angiogenese ist die Ausreifung neugebildeter Gefäße von einer Auskleidung durch murale Zellen begleitet [130, 147]. Endothelzellen schütten dabei Zytokine aus, die Fibroblasten, Perizyten und glatte Muskelzellen

rekrutieren, welche zur Stabilisierung und Ausreifung der Vaskularisierung *in vivo* beitragen [126, 130, 319]. Bei *in vitro*-Kokultivierung rekrutieren Endothelzellen ebenfalls Fibroblasten, wobei diese dadurch zur Differenzierung in Perizyten angeregt werden [320]. Die Inhibition der Rekrutierung von Fibroblasten führte zu einer verminderten Anzahl an Gefäßen [320], was wiederum die Notwendigkeit eines direkten interzellulären Kontaktes unterstreicht. Dieser scheint somit insbesondere für die finalen Prozesse der Angiogenese essentiell zu sein, wohingegen lösliche Moleküle eher an der Initiation der Tubulogenese sowie der Rekrutierung unterstützender Zellen beteiligt zu sein scheinen. In den Kokultur-Ansätzen ohne direkten Kontakt könnte die beobachtete stärkere Zytokin-Sekretion eventuell auf eine angestrebte Rekrutierung der Fibroblasten zurückgeführt werden. Die fehlende „Antwort“ durch das Erreichen von Zell-Zell-Kontakten könnte hier die Sekretion weiter stimulieren und die niedrigere Sekretion in Kokulturen mit zellulärem Kontakt erklären. Die sezernierten Zytokine können über eine Hochregulation interzellulärer Adhäsionsmoleküle Einfluss auf die Interaktion der Zellen und die Bildung von CLS im Schleimhaut-Äquivalent nehmen. Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), E-Selektin und Integrine sind an der Invasion von Endothelzellen in Kollagenmatrices sowie an der sprossenden Angiogenese beteiligt [321]. VEGF bewirkt eine Hochregulation der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin [322], bFGF und verschiedene Interleukine vermitteln eine Steigerung von CAM in Endothelzellen und Fibroblasten [323–325]. Bei direktem Zellkontakt könnten diese Moleküle eine andere Signaltransduktion vermitteln, als wenn kein zellulärer Kontakt hergestellt werden kann und darüber Anteil an der differenziellen Zytokin-Sekretion der beiden Ansätze haben.

In Kokultivierungen und Gewebe-Äquivalenten zeigen Zellen oftmals eine deutlich gesteigerte Vitalität und ein verlängertes Überleben im Vergleich mit entsprechenden Monokulturen [174, 326]. Die beobachtete gesteigerte Zytokin-Sekretion kann hierbei in autokriner und parakriner Weise unterstützend wirken. VEGF, IL-8 und bFGF erhöhten in den zellulären Analysen die Vitalität der HDMEC. Unter physiologischen Bedingungen sezernieren ruhende Endothelzellen basal VEGF, um über autokrine und parakrine Mechanismen ihr Überleben und ihre Vitalität zu garantieren [126, 129, 131] Bei Kokultivierung auf der Bio-Gide®-Membran wurde durchgehend VEGF sezerniert, was dessen unterstützende

Funktion verdeutlicht. Wie VEGF ist auch eNOS *in vivo* essentiell an der vaskulären Homöostase beteiligt [327]. Im Zellkulturmodell erreichte die eNOS-Sekretion ein Maximum, das sich nicht additiv aus der Sekretion der Zellen in Monokultur zusammensetzte. Dies lässt darauf schließen, dass die optimale Konzentration für die Stabilisierung der CLS in Kokultur auf der Membran erreicht und aufrechterhalten wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Prävaskularisierung im Schleimhaut-Äquivalent sowohl die sezernierten Faktoren, die 3D-Kollagenmembran als auch ein direkter zellulärer Kontakt von essentieller Bedeutung und in einem komplexen Zusammenspiel an der Ausbildung von CLS beteiligt sind. Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten die Notwendigkeit einer direkten Anwesenheit von Fibroblasten für die Ausbildung von Gefäßstrukturen durch Endothelzellen [268, 273, 317]. Die Fibroblasten sezernierten dabei pro-angiogene Moleküle und EZM-Komponenten. Die Inhibition jeweils eines einzelnen der sezernierten pro-angiogenen Moleküle reduzierte die Tubulogenese der Endothelzellen, was deren kombinatorische Wirkung unterstreicht [273]. Fibroblasten-konditioniertes Medium führte jedoch nicht zu einer erfolgreichen Prävaskularisierung [268] und auch der Einsatz von EZM-Komponenten, die durch Fibroblasten sezerniert worden waren, war nicht hinreichend für die Ausbildung von Gefäßen [317].

Im Rahmen dieser Arbeit stimulierte sowohl die Kokultivierung als auch die 3D-Kollagenmembran die Sekretion pro-angiogener Moleküle sehr stark (Tabelle 9). Die interzelluläre Kommunikation lief zu einem großen Teil über lösliche Moleküle ab, wobei eine gegenseitige Stimulation der Zytokine untereinander in autokriner und parakriner Weise wahrscheinlich ist. In Kokultur wurden die analysierten Faktoren, mit Ausnahme von IL-8, deutlich verstärkt sezerniert. Das Fehlen eines direkten zellulären Kontaktes stimulierte die Sekretion von VEGF in Fibroblasten sowie bFGF, eNOS und Ang-2 in beiden Zelltypen noch zusätzlich. Die IL-8-Sekretion schien dagegen basal reguliert und nicht durch zelluläre Interaktionen stimuliert zu werden. Eine basale Sekretion von IL-8 durch Fibroblasten konnten auch Shen *et al.* nachweisen [328]. Dagegen wirkte die 3D-Kollagenmatrix sehr stark fördernd auf die IL-8-Sekretion der Zellen, wie auch die Ausschüttung aller anderen analysierten Moleküle. Bei Kokultivierung der Zellen auf der Bio-Gide®-Membran zeigte sich mit Ausnahme von VEGF keine additiv gesteigerte Sekretion. Die direkte zelluläre Interaktion scheint somit eine Anpassung der Zytokin-Ausschüttung vermittelt zu haben,

eventuell über veränderte Anforderungen der Zellen durch die Ausbildung von CLS. Die durchgeführten Analysen unterstreichen das komplexe Zusammenspiel der interzellulären Kommunikation im Kontext der Angiogenese in Gewebe-Äquivalenten. Sie geben dabei einen Einblick, in wie fern die Prävasikularisierung und Differenzierung von Gewebe-Äquivalenten *in vitro* gefördert und eventuell beschleunigt werden kann. Eine Inkubation mit VEGF und IL-8, die vermehrt von den Fibroblasten ausgeschüttet werden, sowie bFGF könnte die Initiation der Tubulogenese im Schleimhaut-Äquivalent positiv beeinflussen. Im nachfolgenden Kapitel wird der Einfluss dieser Moleküle auf angiogene Parameter im Kontext des Gewebe-Äquivalents diskutiert.

**Tabelle 9 - Analyse der Zytokin-Sekretion im Schleimhaut-Äquivalent.**

↑ = gesteigerte Sekretion; ↑↑ = stark gesteigerte Sekretion; ↑↑↑ = sehr stark gesteigerte Sekretion;  
- = keine Veränderung; > = stärkere Sekretion; ≥ = gleich starke Sekretion;

	Kokultivierung vs. Monokultivierung	Kokultivierung ohne vs. mit Kontakt	BioGide vs. Well Monokultur	Kokultivierung auf BioGide Membran vs. Monokulturen auf Membran	stärkere Sekretion von
VEGF	Fibroblasten - HDMEC ↑↑	Fibroblasten ↑↑ HDMEC -	Fibroblasten ↑↑↑ HDMEC ↑	<i>erste 48 h:</i> Fibroblasten > Kokultur > HDMEC <i>21 d:</i> Kokultur > Fibroblasten > HDMEC	Fibroblasten
	Fibroblasten - HDMEC -	Fibroblasten - HDMEC -	Fibroblasten ↑↑ HDMEC ↑↑ (erste 48h)	<i>erste 48 h:</i> Kokultur > Fibroblasten > HDMEC <i>21 d:</i> Kokultur ≥ Fibroblasten > HDMEC	Fibroblasten
bFGF	Fibroblasten ↑↑↑↑ HDMEC ↑↑↑↑	Fibroblasten erste 48h: - längere Kultivierung: ↑↑ HDMEC ↑	Fibroblasten ↑↑ HDMEC ↑↑	<i>erste 48 h:</i> Kokultur > Fibroblasten > HDMEC <i>21 d:</i> Fibroblasten >/≥ Kokultur ≥ HDMEC	+/- gleich
	Fibroblasten ↓ HDMEC ↑↑	Fibroblasten ↑ erste 48h HDMEC ↑	Fibroblasten - HDMEC ↑↑	<i>erste 48 h:</i> HDMEC > Kokultur ≥ Fibroblasten <i>21 d:</i> HDMEC ≥ Kokultur ≥ Fibroblasten	HDMEC
Ang-2	Fibroblasten ↑↑ HDMEC - (erste 48h), ↑↑ (über 21d)	Fibroblasten ↑↑ HDMEC - (erste 48h), ↑ (über 21d)	Fibroblasten ↑↑↑ HDMEC ↑↑↑	<i>erste 48 h:</i> HDMEC ≥ Kokultur > Fibroblasten <i>21 d:</i> HDMEC > Kokultur > Fibroblasten	HDMEC

Bei Trikulturierung schien eine Besiedlung mit Epithelzellen vor den HDMEC einen Vorteil für die Ausbildung des Epitheliums zu bieten, unabhängig davon, ob die HDMEC sieben oder 14 Tage später ausgesät wurden. In den trikultivierten Schleimhaut-Äquivalenten waren Inseln von Zytokeratin 19-positiven Zellen nachweisbar, die demonstrieren, dass basale Epithelzellen vorhanden waren [329]. In nativer Mundschleimhaut ändert sich das Zytokeratin-Profil der Epithelzellen bei Übergang in das *Stratum basale* und die Epithelzellen exprimieren verstärkt Zytokeratin 13, was auch in den Schleimhaut-Äquivalenten nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigt, dass die Zellen vom basalen in den intermediären Typ differenziert sind [23, 25]. Die beobachtete mehrschichtige, durchgehende Anordnung von Involucrin-positiven Zellen auf der zelloklusiven Seite der BioGide®-Membran demonstriert eine terminale Differenzierung der Epithelzellen, wie sie so

auch in nativer Mundschleimhaut nachweisbar ist [92, 330]. Dies konnte zusätzlich durch Nachweis von Occludin- sowie Laminin bestätigt werden. Laminin als Bestandteil der Basalmembran wird nur von differenzierten und funktionellen Epithelien sezerniert [331, 332]. Occludin ist ein essentielles Protein der *Tight junctions*, worüber sich die Integrität und Funktionalität der Epithelschicht analysieren lässt [333]. Eine deutliche Expression dieser Faktoren zeigte sich so stark nur bei Aussaat der Epithelzellen vor den Endothelzellen, was die Aussage zulässt, dass diese Reihenfolge der Besiedlung besser für die Bildung eines funktionellen, terminal differenzierten Epitheliums geeignet ist.

Der Einsatz mesenchymaler Zellen fördert und kontrolliert die Epithelialisierung von artifizialen Geweben [90]. Bei Kokultivierung der oralen Fibroblasten und Epithelzellen konnte eine gute Differenzierung und Ausbildung eines Epitheliums beobachtet werden [226]. Die Interaktion mit Epithelzellen stimuliert die fibroblastäre Sekretion von Zytokinen und EZM-Komponenten, die wiederum zur Epithelialisierung beitragen [334–336]. Die Differenzierung des Epitheliums wird dabei von einem komplexen Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren kontrolliert. Mehrere Wachstumsfaktoren wurden als relevant identifiziert, unter anderem KGF (*keratinocyte growth factor*) [334], EGF (*epidermal growth factor*) [337], TGF (*transforming growth factor*) [335], IL-6 [338] und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) [334]. Im Schleimhaut-Äquivalent vermitteln die zellulären Interaktionen über die Kultivierungsdauer Veränderungen im Sekretionsprofil der Fibroblasten und HDMEC. Bei nachfolgender Aussaat der Epithelzellen könnte die vorangeschrittene Prävaskularisierung entweder eine Ausschüttung von Faktoren mit sich bringen, die negativ auf die Epithelbildung wirken, oder aber eine Reduktion von fördernden Zytokinen. Von den analysierten Faktoren waren in Kokultur nur bFGF und Ang-2 gegenüber der Fibroblasten-Monokultur deutlich verändert und könnten somit Auswirkungen auf die Epithelialisierung haben. Die Sekretion proliferationsfördernder Moleküle durch Fibroblasten, wie unter anderem bFGF [339], ist relevant für die Ausbildung des Epitheliums [340]. Die reduzierte Sekretion von bFGF bei Kokultivierung von HDMEC und Fibroblasten könnte daher die ausbleibende Epithelialisierung bewirken. Des Weiteren ist eine strenge Balance verschiedener Moleküle für die Epithelialisierung wichtig, zum Beispiel zur Unterbindung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) [341, 342]. Diese Balance könnte bei vorangehender Aussaat von HDMEC gestört sein und die Epithelbildung hemmen. Diverse Wachstumsfaktoren können die EMT induzieren

[343]. In einem Tumormodell führte die endotheliale Sekretion von EGF zur EMT [344], sodass eine negative Stimulation durch die HDMEC durchaus denkbar ist. Zudem kann aber auch eine Veränderung der Matrix oder eine erhöhte Konzentration an MMP zur EMT führen [345, 346]. Die Interaktion mit Kollagen vermittelt in Fibroblasten eine verstärkte Sekretion von MMP [234, 235]. Dies sowie die Remodellierung der Matrix durch Fibroblasten könnten bei einer späteren Aussaat von Epithelzellen die EMT fördern und so die Bildung eines Epithels inhibieren. Um definitive Aussagen diesbezüglich zu treffen muss in weiteren Experimenten die interzelluläre Kommunikation in Kokulturen von Epithelzellen und Fibroblasten sowie in Trikulturen mit HDMEC analysiert werden.

Die Bildung von CLS war im Schleimhaut-Äquivalent durch eine Besiedlung mit Epithelzellen sieben Tage vor den HDMEC unbeeinflusst. Wurden die Zellen jedoch 14 Tage nach den Epithelzellen auf die Membran gebracht, so konnte keine durchgehende Prävasikularisierung erzielt werden. Die fortgeschrittene Differenzierung der Epithelzellen, die nach 14 Tagen Kultivierung aufgrund der immunhistochemischen Analyse anzunehmen ist, könnte hierbei einen negativen Einfluss auf die Differenzierung der Endothelzellen ausüben. Wie einleitend beschrieben verändern die Epithelzellen im Laufe ihrer Differenzierung ihre Charakteristika, sie sezernieren beispielsweise nur in ausdifferenziertem Stadium eine Basalmembran [332]. Solch eine Veränderung des sekretorischen Profils ist auch hinsichtlich der Sekretion pro- sowie anti-angiogener Faktoren denkbar. Spencer *et al.* beobachteten in einer räumlich getrennten Kokultivierung von Epithelzellen der Retina und HUVEC eine gesteigerte Sekretion anti-angiogener Moleküle durch beide Zelltypen sowie eine reduzierte Expression pro-angiogener Moleküle in den Endothelzellen [326]. In Trikulturen mit Epithelzellen der Cornea reduzierten diese die Fibroblasten-stimulierte angiogene Differenzierung von Endothelzellen [347]. Epithelzellen bewirken somit eine Reduktion der angiogenen Eigenschaften von Endothelzellen. Die Prävasikularisierung im Schleimhaut-Äquivalent war nicht beeinträchtigt, sofern die HDMEC bereits 8 Tage nach den Epithelzellen ausgesät wurden. Die negative Wirkung der Epithelzellen könnte in unserem Modell daher eventuell erst mit fortschreitender Differenzierung einsetzen. In diesem Kontext ist auch eine Reduktion der analysierten pro-angiogenen Moleküle, die von den Fibroblasten in Kokultur sezerniert wurden, im Laufe der Epithelialisierung denkbar. Orale Epithelzellen besitzen Rezeptoren für IL-8 [348] sowie bFGF [349] und retinale

Epithelzellen exprimieren zudem VEGFR [350, 351]. Eine epitheliale Bindung dieser Zytokine und damit verbundene Internalisierung könnte somit zu einer reduzierten Konzentration geführt und die CLS-Bildung inhibiert haben. Des Weiteren könnte die fibroblastäre Sekretion pro-angiogener Moleküle durch die Epithelzellen verändert worden sein. Die Fibroblasten wurden jeweils zuerst auf die Membranen ausgesät und zeigten in allen Trikultur-Ansätzen eine durchgehende Invasion in die Matrix. Sie scheinen daher durch die anderen Zelltypen und deren interzelluläre Kommunikation nicht negativ beeinflusst zu werden. Die Kokultivierung von HDMEC und Fibroblasten mit zellulärem Kontakt auf der Bio-Gide®-Membran bewirkte jedoch Veränderungen in der Zytokin-Sekretion, die auch bei Ko- oder Trikultur mit Epithelzellen auftreten könnten. Auch in diesem Kontext müssen weitere Analysen der interzellulären Kommunikation durchgeführt werden, um definitive Aussagen treffen zu können.

#### 4.4 Optimierung der Besiedlungsmethode der HDMEC

Zur Generierung einer Prävaskularisierung, die sich durch die gesamte Membran zieht, wurden verschiedene Besiedlungsmethoden der HDMEC ausgetestet. Bei Besiedlung von trockenen Membranen konnten vereinzelt CLS tiefer in der Membran nachgewiesen werden, weshalb diese Methode fortgeführt wurde. Eine durchgehende Verbesserung und tiefe Lokalisation der CLS konnte jedoch ausschließlich durch die Injektion der Zellsuspension in die Membranen erzielt werden. Zum Teil traten dabei mechanische Verletzungen der *Scaffolds* auf, sichtbar durch Löcher. Inwieweit diese einen Nachteil für den Einsatz der Konstrukte *in vivo* bedeuten, muss in weiteren Experimenten analysiert werden. Zudem muss ausgetestet werden, ob diese Besiedlungsmethode in Trikultur ebenfalls anwendbar ist. Wie zuvor beschrieben, war eine Besiedlung mit Epithelzellen vor den HDMEC besser geeignet. Ob sich eine Injektion auch nach der Epithelzellbesiedlung noch durchführen lässt, muss untersucht werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Injektion der Endothelzellen in die Membran eine tiefe und durchgehende Lokalisation der CLS erzielt werden konnte. Diese Methode stellt daher eine vielversprechende Alternative für die Konstruktion prävaskularisierter Gewebe-Äquivalente dar.

## 4.5 Optimierung der Prävasikularisierung durch Einsatz von Zytokinen

Die zuvor als relevant gefundenen Faktoren VEGF, IL-8 und bFGF wurden auf ihre Auswirkungen auf zelluläre Parameter, die relevante Prozesse für die Angiogenese darstellen, analysiert. Hierbei sollte ermittelt werden, ob diese Faktoren zur Optimierung der Prävasikularisierung eingesetzt werden können. Alle drei Zytokine förderten die Vitalität, Proliferation, chemotaktische Migration und *Tube Formation* der HDMEC.

### 4.5.1 Förderung angiogener Prozesse durch VEGF

In Endothelzellen stellt VEGFR2 die Hauptform der VEGF-Rezeptoren dar und vermittelt nach Aktivierung durch VEGF-A alle relevanten Prozesse der Angiogenese [128]. Die Komplexität des VEGF-VEGFR-Signalings ist dabei bis heute noch nicht vollständig verstanden [138]. Wie einleitend beschrieben, wirkt VEGF zum einen pro-angiogen und stimuliert die Bildung neuer Gefäße [108]. Zum anderen sezernieren in ausdifferenzierten Gefäßen sowohl die Endothelzellen als auch die umgebenden muralen Zellen niedrigere Konzentrationen an VEGF, die als Erhaltungsdosis die Stabilität, Integrität sowie Vitalität der Gefäße und gefäßbildenden Zellen garantieren [108, 128, 131]. Die *Tube Formation* während der Angiogenese beruht auf dynamischen Prozessen, die ein Aussprossen, eine Verlängerung und ein Verzweigen der Gefäße umfasst. Endothelzellen tragen hierzu durch Migration und Proliferation bei [352]. Im Rahmen dieser Arbeit führte VEGF in HDMEC zu einer Erhöhung beider Prozesse sowie der Vitalität, und auch die Tubulogenese im *Tube Formation Assay* war unter VEGF-Einfluss gesteigert. Die Aktivierung von VEGFR2 durch VEGF-A führt zur Dimerisierung und anschließenden Autophosphorylierung des Rezeptors [138]. Dies generiert Bindestellen zur Rekrutierung von Adaptermolekülen und Kinasen, worüber verschiedene intrazelluläre Signalwege initiiert werden können [128, 353, 354]. Ein Hauptakteur im Kontext der Angiogenese ist der PI3K-AKT-Signalweg, der Vitalität, Proliferation und Migration von Endothelzellen reguliert [128, 355]. Bei Aktivierung des VEGFR2 wird die PI3K über Kinasen der SRC (*sarcoma*)-Familie (SFKs) in Kombination mit der Rezeptortyrosinkinase (RTK) AXL oder VE-Cadherin an die Zellmembran rekrutiert [356, 357]. Dort phosphoryliert die PI3K das Membranlipid PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat) zum *Second Messenger* PIP<sub>3</sub> (Phosphatidyl-inositol-(3,4,5)-triphosphat) [128]. AKT bindet über eine PH (Pleckstrin-Homologie)-Domäne an PIP<sub>3</sub> und wird darüber eben-

falls an die Membran rekrutiert, wo sie durch die PDK (*Phosphoinositide-dependent kinase*)-1, die MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) ERK 5 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) oder mTORC-2 (*mechanistic target of rapamycin complex*) phosphoryliert und so aktiviert wird [128, 353, 358]. AKT unterstützt durch die Inhibition pro-apoptischer Moleküle und die Stimulation der Expression anti-apoptischer Moleküle das Überleben von Endothelzellen [128, 354].

Im Rahmen der natürlichen Angiogenese müssen die Endothelzellen verstärkt proliferieren, um neue Gefäße zu bilden [127, 140]. Unter VEGF-Einfluss konnte dieser Effekt auch *in vitro* beobachtet werden. Neben der Überlebens-fördernden Wirkung kann AKT zudem die endotheliale Proliferation steigern, indem sie das Fortschreiten des Zellzyklus bewirkt [359, 360]. Die PI3K kann zudem fördernd auf die Proliferation wirken, indem sie die nachgeschaltete Kinase p70 S6K aktiviert, welche über Phosphorylierung der ribosomalen 40S Untereinheit Einfluss auf die Proteinexpression nimmt [361, 362]. Zusätzlich kann VEGF PI3K-unabhängig auf die Proliferation wirken: Die Autophosphorylierung von VEGFR2 generiert eine Bindestelle für die Phospholipase C (PLC), welche anschließend die Proteinkinase C (PKC) aktiviert [363]. PKC induziert eine Signaltransduktionskaskade, welche in der Aktivierung von ERK1/2 resultiert, wobei ERK1/2 über zytosolische sowie nukleäre Moleküle und Transkriptionsfaktoren Genregulationen vermittelt, die eine Steigerung der Proliferation zur Folge haben [364]. Wang *et al.* konnten zeigen, dass die PLC-vermittelte Aktivierung der PKC zudem zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der Proteinkinase D (PKD) führt [365]. Ein molekulares *Target* in Endothelzellen, das durch PKD phosphoryliert wird, ist die Histondeacetylase 7 (HDAC 7), die im Nukleus die Expression verschiedener Gene inhibiert. Die Phosphorylierung von HDAC 7 bedingt einen Transfer ins Zytoplasma, sodass die Genrepression wegfällt und für die Proliferation wie auch die Migration relevante Gene exprimiert werden [365].

Die chemotaktische Migration in Richtung von VEGF ist essentiell an der Tubulogenese beteiligt [352]. Sie zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit durchgehend signifikant gesteigert, wobei die Stimulation konzentrationsabhängig auftrat. Die Aktivierung von VEGFR2 durch VEGF kann diverse pro-migratorische Signalwege auslösen. Eine essentielle Rolle hierbei spielt der FAK (*focal adhesion kinase*)-Signalweg. FAK ist eine zytosolische Tyrosinkinase, welche über verschiedene Wege Einfluss auf die Migration nehmen kann [366–369]. Die

Aktivierung des VEGFR2 führt zur Assoziation von SRC an den Rezeptor [370]. Zudem vermittelt sie eine Autophosphorylierung von VEGFR2 an Tyr1175, wodurch eine Bindestelle für SHB (*SH2 domain-containing adaptor protein B*) erzeugt wird [371]. Durch die räumliche Nähe ist SRC in der Lage, SHB zu phosphorylieren, wodurch nachfolgend die Aktivierung von FAK und PI3K ermöglicht wird [371]. Eliceiri *et al.* demonstrierten, dass die VEGF-VEGFR2-vermittelte Aktivierung von SRC zur Bildung von FAK-Integrin-Komplexen führt, welche an der Chemotaxis beteiligt sind [367]. Dabei ist eine direkte Rekrutierung der FAK durch SHB denkbar [372]. Die FAK-SRC-Interaktion bewirkt über verschiedene nachgeschaltete Moleküle eine Steigerung der Migration durch den sogenannten *focal adhesion turnover* [366, 368, 373]. Durch dynamische Ab-, Auf- und Umbauprozesse werden die durch Integrine gebildeten *focal adhesions* kontrolliert verändert und eine zelluläre Migration ermöglicht [367, 374]. Auch an diesen Abläufen ist die PI3K essentiell beteiligt, ihre Inhibition hemmte die endotheliale VEGF-induzierte Migration vollständig [371]. Die Aktivierung von VEGFR2 durch VEGF führte *in vitro* zu einer erhöhten Interaktion der PI3K mit FAK und zu einer gesteigerten Migration der untersuchten Endothelzellen [375]. Die Rekrutierung der PI3K an die Membran kann in diesem Kontext von der RTK AXL vermittelt werden, deren Inhibition ebenfalls die VEGF-A-vermittelte Migration komplett unterband [356]. Graupera *et al.* konnten eine spezifische Beteiligung der PI3K-Isoform p110 $\alpha$  an der endothelialen Migration durch Regulation der GTPase RhoA nachweisen [376]. Darüber hinaus zeigten sich die GTPase Rac1 und die endothelspezifische GTPase RhoJ stark an der endothelialen Chemotaxis beteiligt [377, 378]. RhoA, RhoJ und Rac1 wirken sich dabei auf die Kontraktion der Mikrotubuli und Intermediärfilamente des Zytoskeletts aus, sowie auf den *focal adhesion turnover* [138, 378]. Ein weiterer wichtiger Signalweg im Kontext der VEGF-VEGFR2-induzierten Migration ist der Ang-Tie-Signalweg, der in VEGF-aktivierten Endothelzellen die PI3K aktiviert [129]. Zusätzlich kann die Aktivierung von Tie2 auch PI3K unabhängig über Adaptermoleküle fördernd auf die Migration wirken [379]. Auch im Kontext der Migration zeigt sich somit ein komplexes Zusammenspiel verschiedener VEGFR-nachgeschalteter Signalwege, die auch Einfluss auf die Tubulogenese nehmen können.

Bei Analyse der angiogenen Parameter im *Tube Formation Assay* zeigten sich große Variationen in der Tubulogenese von HDMEC verschiedener Spender. Eine solche Spender-Indi-

vidualität bei Experimenten mit primären Zellen wurde von uns bereits beobachtet und ist auch in der Literatur bekannt [380, 381]. VEGF wirkte im *Tube Formation Assay* steigernd auf die Länge und Dichte der *Tubes* sowie auf die Anzahl ihrer Verzweigungspunkte. Der stärkste Effekt war auf die Anzahl an Verzweigungspunkten zu beobachten, die Gesamtlänge der *Tubes* war am geringsten gesteigert. Die Proliferation und Migration der Endothelzellen sind essentiell an der Angiogenese beteiligt [150], sodass die beobachtete steigernde Wirkung von VEGF auf diese Prozesse auch zur Steigerung der *Tube Formation* geführt haben könnte. Arima *et al.* konnten *in vitro* die Elongation und das Verzweigen von endothelialen *Tubes* zum größten Teil auf die zelluläre Migration zurückführen [352]. Sie demonstrierten, dass die Endothelzellen kollektiv migrierten, um die Verzweigungen zu verlängern und zeigten in diesem Kontext einen deutlichen fördernden Effekt von VEGF [352]. Die zuvor angeführten Signalwege, die Proliferation und Migration der Zellen regulieren, sind auch im Kontext der Tubulogenese relevant. So führte die Inkubation von Endothelzellen mit einem spezifischen PI3K-Inhibitor zu einer reduzierten *Tube Formation* [382]. Bei *Knockdown* von RhoJ waren die *Tubes* kürzer, weniger verzweigt und ihre Anzahl vermindert [378]. Wie beschrieben wirkt sich der PI3K-Signalweg über Rho auf die Migration aus. Die durch den PI3K-Signalweg geförderte Migration könnte somit an der *Tube Formation* beteiligt sein. Auch der ERK1/2-Signalweg ist an der Vaskulogenese von Endothelzellen *in vitro* beteiligt, da ein ERK1/2-Inhibitor die *Tube Formation* reduzierte [382]. Heidemann *et al.* spekulierten, dass ERK1/2 *downstream* von PI3K aktiviert wird, da die Inhibition der PI3K zu einer Reduktion der Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 führte [382]. Roberts *et al.* beobachteten eine reduzierte Tubulogenese der HDMEC bei Inhibition von ERK5, wobei sich kein Einfluss des *Silencing* auf die Proliferation zeigte [358]. Umgekehrt stimulierte die Überexpression von ERK5 die *Tube Formation* auch in Abwesenheit von VEGF [358].

#### 4.5.2 Förderung angiogener Prozesse durch IL-8

Eine Behandlung mit IL-8 förderte die endotheliale Vitalität, Proliferation sowie *Tube Formation* und bewirkte zudem eine Steigerung der chemotaktischen Migration. IL-8 (auch CXCL8) gehört zur Familie der CXC-Chemokine mit ELR (Glu-Leu-Arg)-Aminosäure-Motiv [383]. IL-8 wirkt über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, deren Expression in Endothelzellen gewebespezifisch reguliert wird [382, 384]. Bei Einsatz von

Antikörpern gegen IL-8 sowie CXCR1 bzw. CXCR2 beobachteten Li *et al.* eine gesteigerte Anzahl an apoptotischen HUVEC sowie eine reduzierte Expression von Genen, die das Überleben der Zellen fördern [385]. Die Aktivierung von CXCR1 und -2 führt zu einer nachgeschalteten Aktivierung diverser Moleküle und Signalwege [384, 386]. Ein *Target* ist die PI3K, die wiederum stimulierend auf AKT wirken kann. Wie zuvor beschrieben bewirkt AKT eine Veränderung der Regulation pro- sowie anti-apoptotischer Gene, was eine Steigerung der Vitalität der Zellen zur Folge hat [128, 129, 384]. Des Weiteren wirkt der PI3K-AKT-Signalweg proliferationssteigernd und könnte den beobachteten stimulierenden Effekt der IL-8-Behandlung auf die Proliferation vermittelt haben. Eine proliferationsfördernde Wirkung von IL-8 wurde bereits in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen beschrieben [382, 384, 385, 387]. Durch IL-8-CXCR-Interaktion wird als ein weiteres *Target* die PLC aktiviert, deren positiver Effekt auf die Proliferation zuvor diskutiert wurde [365, 384]. Ein weiterer essentieller, durch IL-8-vermittelter Signalweg ist der ERK-Signalweg. Die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten CXC-Rezeptoren führt hier über die Adaptermoleküle SOS (*sons of sevenless*) und Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) zur Stimulation der Ras (*Rat sarcoma*)-GTPase [384, 388]. Ras wiederum aktiviert seine hauptsächliche Effektor kinase Raf (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*), was zur Initiation der Raf/MEK/ERK-Kaskade führt [388], die neben der Proliferation [364] auch die Tubulogenese fördert [382].

Sowohl die Tubulogenese als auch die chemotaktische Migration wurden im Rahmen dieser Arbeit durch IL-8-Behandlung deutlich gefördert, wobei die Migration essentiell für die Tubulogenese ist [352]. Die HDMEC zeigten eine gesteigerte Chemotaxis in Richtung aller getesteter IL-8-Konzentrationen. 5 ng/ml sowie die Konzentrationen von 100 bis 1000 ng/ml IL-8 führten dabei zu einer sehr signifikanten Erhöhung. IL-8 hat als chemotaktisches Zytokin (Chemokin) eine gut beschriebene pro-migratorische Wirkung in verschiedenen Tumorzelllinien [198, 384]. Li *et al.* konnten durch Einsatz inhibitorischer Antikörper gegen IL-8 sowie CXCR2 eine reduzierte Migration von HDMEC und HUVEC beobachten, wobei die Inhibition von CXCR1 keinen Effekt hatte [385]. Die Aktivierung von CXCR1 und -2 führt zu einer nachgeschalteten Aktivierung von kleinen G-Proteinen wie Rho und Rac1 [384, 386]. Wie bereits für VEGF beschrieben, können diese kleinen GTPasen förderlich auf die endotheliale Chemotaxis wirken, da sie die Umstrukturierung des Zyto-

skeletts und den *focal adhesion turnover* stimulieren [138, 376–378]. Neben der direkten Wirkung der CXCR auf die kleinen GTPasen konnten Lai *et al.* zudem eine IL-8/CXCR1/2-vermittelte Aktivierung der PI3K in Endothelzellen nachweisen, die nachgeschaltet über Rac1-RhoA deren Migration fördert [389]. Eine Inhibition der PI3K hemmt die endotheliale Chemotaxis [390]. In verschiedenen Zelllinien und primären Zellen konnte unter IL-8-Einfluss zudem eine Transaktivierung von RTK wie VEGFR2 und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) nachgewiesen werden [387, 390, 391]. Eine solche, von IL-8 ausgehende Transaktivierung könnte ebenfalls Signalwege induzieren, welche steigernd auf Überleben, Proliferation, Migration sowie Tubulogenese der Endothelzellen wirken. Die Inhibition des EGFR bewirkte beispielsweise eine Reduktion der IL-8-induzierten endothelialen Migration [390]. Wie zuvor beschrieben, sind der PI3K- und der ERK-Signalweg durch Stimulation der Migration relevant für die Tubulogenese *in vitro*, wobei beide Signalwege von IL-8 aktiviert werden können [382, 384, 389]. Li *et al.* beobachteten eine gesteigerte *Tube Formation in vitro* bei Inkubation von HUVEC mit IL-8, wohingegen die Verwendung eines IL-8-Antikörpers die Tubulogenese hemmte [392, 393]. Auch der Einsatz von Antikörpern gegen CXCR1 und CXCR2 führten zur Reduktion der *Tube Formation* [385], was die Aussage zulässt, dass IL-8 essentiell an der endothelialen Tubulogenese beteiligt ist. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Tube Formation* der HDMEC durch IL-8 in allen eingesetzten Konzentrationen gesteigert.

#### 4.5.3 Förderung angiogener Prozesse durch bFGF

Eine Behandlung mit bFGF förderte alle untersuchten angiogenen Prozesse der HDMEC. Dabei zeigte bFGF eine schwächere Wirkung als VEGF und IL-8 auf die Vitalität, Proliferation und Tubulogenese. Der Wachstumsfaktor bFGF ist der am besten untersuchte sowie der häufigste Vertreter der FGF-Familie und wirkt stark pro-angiogen [394]. *In vivo* hat bFGF zudem eine stabilisierende Wirkung auf bestehende Gefäße, da es für die Rekrutierung von muralen Zellen verantwortlich ist [126, 319]. Für die FGF-Familie sind verschiedene Rezeptoren (FGFR) beschrieben, wobei bFGF über FGFR1 wirkt [395]. Eines der zwei Haupt-*Targets* der FGFR ist das FGFR *substrate 2* (FRS2). FRS2 interagiert direkt mit der Juxtamembran-Region des Rezeptors und führt über die Rekrutierung von Adaptermolekülen wie SOS oder GRB2 zur Aktivierung des ERK- sowie des PI3K-Akt-Signalwegs [396, 397]. Ein weiteres Haupt-*Target* der FGFR ist die PLC $\gamma$ , die über ihre SH2-Domäne an

die phosphorylierte intrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet [396]. Wie zuvor beschrieben wirken alle diese Signalwege fördernd auf Vitalität, Proliferation und Migration von Endothelzellen. Die Arbeitsgruppe um Guo schrieb die Stimulation der Proliferation und Migration von ECFC durch bFGF der Aktivierung von PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) und des ERK-Signalwegs zu [398]. Sie demonstrierten eine Förderung beider Prozesse durch bFGF, die durch Inhibition von PDGFR bzw. ERK zum Teil wieder aufgehoben wurde [398]. Eine weitere Studie beschrieb eine konzentrationsabhängige Reduktion der bFGF-induzierten Migration von Endothelzellen bei Einsatz eines ERK1/2- bzw. eines p38 MAPK-Inhibitors [399]. Auch Tong *et al.* demonstrierten eine Beteiligung von ERK, p38 MAPK, AKT und PI3K an der bFGF-induzierten Chemotaxis von HUVEC [395]. Die RTK AXL, die essentiell für die VEGF-vermittelte Migration über den PI3K-AKT-Signalweg ist, zeigte dabei keine Auswirkungen auf die bFGF-induzierte Migration [356], was eine Rekrutierung der PI3K über VE-Cadherin nahelegt [357]. Des Weiteren bewirkt bFGF, wie auch VEGF, eine Assoziation von SHB und FAK [372], sodass die beobachtete Steigerung der Chemotaxis in Richtung von bFGF ebenfalls über FAK vermittelt sein könnte.

Die genannten Signalwege fördern neben der Migration auch die Proliferation und Tubulogenese. Im *Tube Formation Assay* stimulierte bFGF alle untersuchten angiogenen Parameter, wobei sich keine Konzentrationsabhängigkeit zeigte. Die stimulatorische Wirkung des PI3K-AKT- und des ERK1/2-Signalwegs auf die *Tube Formation* wurde zuvor schon für VEGF und IL-8 diskutiert. Im Rahmen der bFGF-vermittelten Tubulogenese wirkt die PI3K zudem in Kombination mit der PLC $\gamma$  [400]. Jeong *et al.* konnten die *Tube Formation* von HUVEC unter bFGF-Behandlung zusätzlich auf die Aktivierung der p38 MAPK sowie AKT zurückführen [401]. Die p38 MAPK scheint dabei als Feinregulator der bFGF-vermittelten Tubulogenese zu dienen. Ihre Inhibition führte bei bFGF-Behandlung zu einer Erhöhung der endothelialen *Tube Formation* sowie im CAM-Assay zu einer gesteigerten Vaskularisierung, die jedoch unorganisiert und abnormal ausfiel [402]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte dies zwar nicht beobachtet werden, die beschriebenen Effekte verdeutlichen jedoch eine potentiell negative Entwicklung von CLS unter bFGF-Behandlung im Schleimhaut-Äquivalent. Auch aus diesem Grund wurde bFGF nicht zur Optimierung der Prävascularisierung der Schleimhaut-Äquivalente eingesetzt.

#### 4.5.4 Einsatz von VEGF und IL-8 zur Optimierung der Prävas­kularisierung im Schleimhaut-Äquivalent

VEGF wirkte stimulierend auf alle zellulären Aspekte der Angiogenese. Der Faktor schien daher ein vielversprechender Kandidat für die Förderung der Prävas­kularisierung im Schleimhaut-Äquivalent zu sein. Auch IL-8 stellte sich als geeigneter Kandidat heraus. Beide Zytokine wurden einzeln und auch in Kombination zur Optimierung der Prävas­kularisierung *in vitro* eingesetzt, mit dem Ziel, eine möglichst schnelle und stabile Bildung von CLS zu generieren. bFGF wurde aus verschiedenen Gründen von dieser Analyse ausgeschlossen. Zum einen wirkte bFGF in den zellulären Analysen am schwächsten steigernd auf die angiogenen Prozesse, sodass die anderen Moleküle präferiert wurden. Zum anderen wurde bFGF aufgrund seiner potentiell onkogenen bzw. tumorigenen Eigenschaften [403–405] zurückgestellt, da diese einem Einsatz im Patienten im Wege stehen würden.

IL-8 in einer Konzentration von 250 ng/ml bewirkte bereits nach sieben Tagen eine ausgeprägte, stark verzweigte und dichte Vaskularisierung und schien somit die Initiation der Angiogenese im Schleimhaut-Äquivalent zu begünstigen. Dies stimmt mit den zellulären Analysen überein, in denen 250 ng/ml IL-8 deutlich fördernd auf Vitalität, Proliferation, Chemotaxis und die Tubulogenese wirkte. Im *Tube Formation Assay*, der als Modell der angiogenen Initiation herangezogen werden kann, führte die geringere IL-8-Konzentration zu besseren Ergebnissen. 500 ng/ml IL-8 bewirkte ansonsten durchgehend eine stärkere Steigerung der pro-angiogenen Prozesse. Im Schleimhaut-Modell bewirkte 500 ng/ml IL-8 erst nach 14 Tagen eine Verbesserung der Prävas­kularisierung, sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber IL-8 in einer Konzentration von 250 ng/ml. Es ist somit denkbar, dass die niedrigere IL-8-Konzentration die Anfänge der Angiogenese stimuliert, wohingegen zur weiteren Aufrechterhaltung und Förderung über die längere Kultivierungsdauer 500 ng/ml IL-8 besser geeignet ist.

Die Behandlung mit 100 ng/ml VEGF führte gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu einer verbesserten Prävas­kularisierung. VEGF steigerte das Überleben der HDMEC sowie ihre Proliferation, Chemotaxis und Tubulogenese durchgehend und verbesserte scheinbar darüber im Schleimhaut-Äquivalent die Prävas­kularisierung. In Kombination mit 250 ng/ml IL-8 verstärkte sich dieser Effekt deutlich. Ähnliche Effekte konnten auch von anderen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Versuchsansätzen beobachtet werden. Die Kombina-

tion von VEGF mit weiteren Wachstumsfaktoren wie Ang-1 und PDGF führte zu einer erhöhten Tubulogenese und Reifung von Gefäßstrukturen im Vergleich zu einer alleinigen VEGF-Behandlung [157, 166, 406, 407]. Die Verbesserung der untersuchten angiogenen Prozesse unter VEGF sowie IL-8-Einfluss scheint sich in Kombination beider noch zu verstärken und dadurch die Prävasikularisierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weiter zu unterstützen.

Die alleinige Behandlung mit 250 ng/ml IL-8 zeigte nach sieben Tagen jedoch bessere Ergebnisse als in Kombination mit VEGF. Auch nach 14 Tagen war die Prävasikularisierung unter 500 ng/ml IL-8 stärker ausgeprägt als bei Kombinationsbehandlung von IL-8 mit VEGF. Nach 21 Tagen war die Prävasikularisierung unter Behandlung mit 500 ng/ml IL-8 sowie einer Kombination von 250 ng/ml IL-8 mit VEGF ungefähr gleich ausdifferenziert. Die Angiogenese wird durch eine strenge Balance pro- und anti-angiogener Faktoren reguliert und kontrolliert [116]. In Kokulturen stimulieren die Zellen sich gegenseitig zur Zytokin-Sekretion. Die Supplementation mit weiteren Wachstumsfaktoren kann dabei schnell zu einer Dysbalance führen und die Angiogenese eher hemmen als fördern [408, 409]. Ein Zuviel an pro-angiogenen Wachstumsfaktoren ist dabei genauso inhibierend wie ein Zuwenig. So resultierte die exogene Zugabe von VEGF und bFGF zu einer Kokultur aus HUVEC und Osteoblasten in einer reduzierten Tubulogenese der Endothelzellen [408]. Bei Kombination von VEGF und IL-8 könnte eine solche negative Wirkung aufgetreten sein. Obwohl beide Faktoren die Angiogenese und ihre zellulären Prozesse fördern, erzielte eine alleinige Behandlung mit IL-8 hinsichtlich der Prävasikularisierung bessere Ergebnisse.

Bedacht werden muss in diesem Kontext der Einfluss der Kollagenmatrix und der interzellulären Kommunikation zwischen den Zellen. Diese beiden Faktoren waren in den Analysen der zellulären Parameter nicht beteiligt, spielen jedoch bei der Generierung der Schleimhaut-Äquivalente eine tragende Rolle. So zeigte sich in den Sekretionsanalysen Stimulationen durch die Kollagenmatrices und die direkte sowie parakrine Zellkommunikation. Zu erwähnen ist zudem, dass die Besiedlung unter Einfluss von IL-8 und VEGF bislang nur einmal durchgeführt wurde. Die Ergebnisse müssen daher in weiteren Experimenten verifiziert werden und können nur als erste Anhaltspunkte dienen. Jedoch scheint sich exogenes IL-8 positiv auf die Prävasikularisierung auszuwirken und könnte daher für die Optimierung und Etablierung einer schnellen Bildung von CLS herangezogen werden. Dabei

wirkte sich 250 ng/ml IL-8 positiv auf die Initiation der Prävasikularisierung aus. Im weiteren Verlauf sollte die IL-8-Konzentration auf 500 ng/ml erhöht werden, da die Prävasikularisierung nach 14 sowie 21 Tagen unter dieser Konzentration stärker ausgeprägt war.

#### 4.6 Anastomosierung der Schleimhaut-Äquivalente *in vivo*

Die Anastomosierung von prävasikularisierten Schleimhaut-Äquivalenten wurde in der Nacktmaus sowie auf der CAM embryonisierter Hühnereier analysiert. Die in Mäuse transplantierten Konstrukte zeigten eine vollständige Invasion von Fibroblasten nach 5 wie auch 10 Tagen. Nach Transplantation schien somit ein geeignetes Milieu für das Überleben der Zellen im Äquivalent geherrscht zu haben. Durch immunhistochemische Färbung von CD31 konnten die im Gewebe-Äquivalent gebildeten CLS nachgewiesen werden. Murine Gefäßen wurden durch den human-spezifischen Antikörper nicht angefärbt, sodass eine eindeutige Identifikation der *in vitro* entwickelten CLS gegeben war. In den transplantierten Schleimhaut-Äquivalenten konnte eine tiefe Invasion von CLS durch die HDMEC beobachtet werden. Auch im CAM-Assay kultivierte Äquivalente zeigten eine tiefe Lokalisation von CLS. Bei ausschließlicher Kultivierung der Schleimhaut-Äquivalente *in vitro* konnte eine solche Lokalisation tief in der Membran nur durch Hineinspritzen der Endothelzellen erreicht werden. Die *in vivo* eingesetzten Konstrukte wurden jedoch nach dem Standardprotokoll (Vergleich Abschnitt 2.2.3, Seite 45) auf trockenen Membranen besiedelt und zeigten dennoch eine tiefe Infiltration der CLS mit einer hohen Dichte. Die trockene Besiedlung der Membranen führte *in vitro* zwar nur teilweise zu einer Verbesserung der Invasion der Endothelzellen, *in vivo* scheint diese Vorgehensweise jedoch einen deutlichen Vorteil darzustellen. Die physiologische Umgebung der *in vivo* implantierten Gewebe-Äquivalente schien somit einen positiven Effekt auf die Lokalisation der CLS auszuüben. Im Äquivalent könnten nach Transplantation hypoxischere Bedingungen gegenüber der *in vitro*-Kultivierung vorherrschen, also *in vitro*, was zu einer tieferen Infiltration der Zellen in die Membran führen könnte. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass sich im CAM-Assay verstärkt CLS in Richtung der zelloklusiven Seite, also der in Richtung der Luft orientierten Seite, ausgebildet haben. Hypoxie bewirkt in Endothelzellen eine Heraufregulation verschiedener Integrine, die wichtig für Proliferation und Migration sind [126,

410]. Beide zellulären Prozesse könnten in den Äquivalenten durch das hypoxische Milieu stimuliert werden und die Ausbreitung der CLS fördern.

Anhand paralleler HE- und CD31-Färbungen konnten in den prävascularisierten Schleimhaut-Äquivalenten bereits 5 Tage nach Transplantation in die Maus bzw. auf die CAM Erythrozyten nachgewiesen werden. Diese zeigten in der HE-Färbung eine charakteristische Färbung und Morphologie. Die CLS der Schleimhaut-Äquivalente wurden *in vivo* innerhalb von 5 Tagen an das Gefäßsystem angebunden und mit Blut versorgt. Bei Entnahme der Äquivalente zehn Tage nach Transplantation in die Maus konnte in diesen eine sehr dichte Prävascularisierung mit durchgehender Infiltration von Erythrozyten nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich wieder eine Förderung der Prävascularisierung nach Implantation *in vivo*, wie zuvor schon für die CAM-Assays beschrieben wurde. Die tiefe Lokalisation und hohe Anzahl der CLS unterstreicht eine positive Wirkung des physiologischen Milieus. Eine weitere Stabilisierung und Ausreifung *in vivo* von zuvor *in vitro* generierten Prävascularisierungen ist somit denkbar. Die gesteigerte Prävascularisierung sowie die durchgehende Infiltration von Fibroblasten demonstriert, dass die Anbindung zeitnah stattfand und zu einer ausreichenden Versorgung des Transplantats führte. Für den klinischen Einsatz von Gewebe-Äquivalenten ist eine zeitnahe Anbindung nach Transplantation essentiell, um die Versorgung zu gewährleisten [99, 100]. Die Geschwindigkeit, mit der Blutgefäße des Empfängerorganismus in ein Transplantat einwachsen, beträgt ungefähr 5 µm/h [170]. Große dreidimensionale Gewebekonstrukte können darüber nicht ausreichend schnell versorgt werden. Im Vergleich benötigt eine nicht-prävascularisierte Bio-Gide®-Membran ca. 14 Tage, um vaskularisiert zu werden [411]. Die zeitnahe Anastomose der CLS *in vivo* demonstriert, dass eine Prävascularisierung von Gewebe-Äquivalenten *in vitro* eine vielversprechende Methode ist, um die Versorgung der Konstrukte nach Transplantation zu gewährleisten. Nekrosen und Abstoßung von künstlichen Geweben könnten dadurch deutlich reduziert werden, sodass ein routinemäßiger klinischer Einsatz ermöglicht wird.

Bei immunhistochemischer Analyse der tri-kultivierten Schleimhaut-Äquivalente der CAM zeigten sich deutliche Variationen. Die erzielten Ergebnisse sind daher mit Vorsicht zu betrachten. Problematisch war insbesondere eine starke Hintergrundfärbung. Diese kann eventuell auf unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper mit Molekülen, die aus

der CAM in das Biomaterial eingewandert sind, zurückgeführt werden.

Zwei der drei trikultivierten Schleimhaut-Äquivalente hatten nach Kultivierung auf der CAM einen durchgehenden *Multi-Layer* an Epithelzellen auf der zelloklusiven Seite, nachgewiesen durch Involucrin-Färbung. Zusätzlich zu dieser ausdifferenzierten Epithelschicht konnten mittels Färbung von Zytokeratin 13 und 19 intermediäre sowie basale Epithelzellen nachgewiesen werden. Das Zytokeratin-Profil legt nahe, dass eine Organisation der Epithelzellen in die anatomischen Schichten nativer oraler Mucosa stattgefunden hat [23, 25]. Der Nachweis einer terminalen Differenzierung mittels Involucrin demonstriert die physiologische Funktionalität der Epithelzellen [92, 330]. Diese wird zudem durch die Sekretion von Laminin und Kollagen IV unterstrichen, die Bestandteile der natürlichen Basalmembran darstellen [24]. Nur ausgereifte, differenzierte Epithelzellen sezernieren eine Basalmembran [331, 332]. Eine solche konnte jedoch nur in zwei der drei Ansätze nachgewiesen werden. Zum Teil zeigte sich somit eine physiologische Organisation der Epithelzellen in eine Art Epithelium mit einer funktionellen und strukturellen Ausdifferenzierung *in vivo* im CAM-Assay. Die Versorgung des Epithels scheint in diesem Modell über die Anastomose der CLS an das Blutgefäßsystem der CAM gewährleistet zu sein.

Wie einleitend beschrieben wurde, erzielten auch andere Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Zellen sowie Biomaterialien eine Anastomose an das Blutgefäßsystem *in vivo* innerhalb von 5-14 Tagen nach Implantation [161, 176–178]. Die Anbindung eines trikultivierten Schleimhaut-Äquivalents auf einem klinisch zugelassenen *Scaffold*, wie die in dieser Arbeit eingesetzte Bio-Gide®-Membran, konnte in der Literatur nicht gefunden werden und ist zum jetzigen Zeitpunkt einzigartig. Die Experimente zur Anastomose unterstreichen dabei die Eignung für den Einsatz als trikultiviertes, prävascularisiertes Gewebe-Äquivalent für klinische Anwendungen.

## 4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Eignung verschiedener Gewebe zur Gewinnung autologer Zellen, die im weiteren Verlauf für *Tissue Engineering* einsetzbar sind, demonstriert werden. In diesem Kontext zeigten sich erste Analysen hinsichtlich der Bildung gefäßähnlicher Strukturen durch Endothelzellen aus Brust- und Vulva-Hautgewebe sowie Blut vielversprechend. Die Eignung der Zellen muss jedoch in weiteren Experimenten bestätigt werden. Insbesondere die aus dem Blut gewonnenen ECFC sind interessante Kandidaten, da sie ohne operativen Eingriff gewonnen werden können und so eine geringere Belastung für den Patienten darstellen. Dies ebnet den Weg für einen möglichen zukünftigen Einsatz im klinischen Alltag. Die in dieser Arbeit an den HDMEC durchgeführten Analysen der interzellulären Kommunikation sowie zellulärer Parameter könnten im Weiteren auch an den ECFC durchgeführt werden. Eine solche grundlagenwissenschaftliche Aufklärung könnte die Kenntnis der Kommunikation in Gewebe-Äquivalenten vertiefen. Zudem stellen die ECFC einen derzeit noch nicht umfassend erforschten Zelltyp dar. Es wäre daher spannend, ihre angiogenen Parameter unter Einfluss der sezernierten Faktoren zu analysieren. Darüber könnten Rückschlüsse auf die Art und Weise ihrer Beteiligung an der Angiogenese gezogen werden. In einem nächsten Schritt muss der Einsatz von ECFC in Trikultur mit Fibroblasten und Epithelzellen analysiert werden, um ihre Eignung für die Generierung eines Schleimhaut-Äquivalents abschließend zu beurteilen. Final sollte die Anastomose *in vivo*, analog zu den in dieser Arbeit mit HDMEC durchgeführten Versuchen, im Mausmodell sowie im CAM-Assay untersucht werden. Dies ist insofern relevant, als dass die prävasikularisierten Strukturen nach Transplantation in den Patienten möglichst zeitnah an das humane Gefäßsystem angebunden werden sollen und die Inoskulation *in vivo* daher im Vorfeld bestätigt werden sollte.

Bei der Generierung eines Schleimhaut-Äquivalents *in vitro* konnten weitere Fortschritte bezüglich Besiedlungsreihenfolgen, Besiedlungsmethoden und geeigneter Kultivierungsmedien erzielt werden. Es zeigte sich, dass ein Aufbringen der HDMEC mittels Injektion möglich ist und eine vitale Prävasikularisierung erzielt. Dies könnte der beschriebenen Problematik einer unzureichend tiefen Bildung von CLS entgegenwirken. In diesem Kontext muss geklärt werden, inwieweit sich diese Besiedlungsmethode mit der Kultivierung von Epithelzellen auf der Membran vereinbaren lässt. Abschließend sollten weitere *in vivo*

Analysen der Trikulturen hinsichtlich der Anastomose durchgeführt werden, beispielsweise in der Maus. Dabei wäre es sinnvoll, die Konstrukte nicht nur subkutan sondern auch oberflächlich mit direktem Luft-Kontakt zu implantieren, um ihre Anbindung und ihr Überleben in dieser Lokalisation zu beurteilen.

Die durchgeführten Sekretionsanalysen in Mono- und Kokulturen in Insertsystemen sowie auf der Bio-Gide®-Membran gaben erste Anhaltspunkte hinsichtlich der interzellulären Kommunikation in Gewebe-Äquivalenten. VEGF und IL-8 wurden dabei verstärkt durch Fibroblasten ausgeschüttet, eNOS und Ang-2 durch HDMEC. Die bFGF-Sekretion ähnelte sich bei beiden. Neben den Sekretionsanalysen könnten Untersuchungen der Genexpression und die beteiligten Signalwege der genannten Faktoren in den Zellen weiteren Aufschluss über die Initialisierung der ablaufenden Kommunikation geben. Dabei sollten auch Moleküle der Zell-Zell-Kommunikation analysiert werden, die an den Interaktionen beteiligt sind und die Prävasikularisierung beeinflussen könnten. Nennenswert sind hier VE-Cadherin, Integrine oder Connexin 43 [300, 314]. Zudem könnte eine Analyse der Kommunikation über Vesikel und Exosomen interessant sein.

In den Analysen zeigte sich ein stark fördernder Einfluss der Kollagenmembran auf die Zytokin-Sekretion. Um diesen Ergebnissen weiter nachzugehen sollten Moleküle analysiert werden, die an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt sind, wie beispielsweise VE-Cadherin und Integrine [129, 130, 314, 412]. Eventuell könnten weitere Biomaterialien hinsichtlich ihrer fördernden Eignung mittels Sekretionsanalysen sowie der Bildung von CLS analysiert werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, in welcher Art die Zusammensetzung der Gerüststrukturen solcher Gewebe-Äquivalente dazu eingesetzt werden kann, um die Prävasikularisierung zu unterstützen.

Die Sekretion von VEGF und IL-8 profitierte von direkten zellulären Kontakten der Fibroblasten und Endothelzellen, wohingegen bFGF, eNOS und Ang-2 durch lösliche Faktoren stimuliert wurden. Hinsichtlich dieser Ergebnisse könnten Analysen nachgeschalteter Signalwege, die durch die Faktoren initiiert werden, zu einem vertiefenden Verständnis beitragen. Dabei könnten an den Signalkaskaden beteiligte Moleküle und Kinasen, wie u.a. AKT, ERK1/2, PI3K und das Ang/Tie-System auf ihre Expression und Aktivität hin untersucht werden. Dies wäre auch im Hinblick auf die zellulären Analysen sinnvoll. In diesen zeigten sich die Vitalität, die Proliferation, die chemotaktische Migration sowie verschiedene

angiogene Parameter durch den Einsatz von VEGF, IL-8 und bFGF gesteigert. Hier wäre es interessant, die daran beteiligten Signalwege zu identifizieren. Darüber könnte im Anschluss eine Anpassung des Kultivierungsmediums vorgenommen werden, das den zeitlichen Bedürfnissen der Gewebe-Äquivalente entspricht. So sollte zu Beginn der Kultivierung die Angiogenese und Sprossung gefördert werden, im weiteren Verlauf jedoch eher die Stabilität der Gefäße. Die so erzielten Ergebnisse könnten die Generierung des prävascularisierten Gewebeäquivalents unter Verwendung autologer Zellen so weit optimieren, dass es für den Einsatz am Patienten geeignet sein sollte.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Lanza R P., Langer R S., Vacanti J (Eds.) (2014). *Principles of tissue engineering* (4th edn). Amsterdam: Elsevier Acad. Press.
2. 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: 403–430, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
3. Sadri-Ardekani H, Atala A (2015). Regenerative medicine for the treatment of reproductive system disorders: Current and potential options. *Advanced drug delivery reviews* 82-83: 145–152, doi: 10.1016/j.addr.2014.10.019.
4. Callens N, Cuyper G de, Sutter P de, et al. (2014). An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia. *Human reproduction update* 20(5): 775–801, doi: 10.1093/humupd/dmu024.
5. Kimberley N, Hutson J M, Southwell B R, et al. (2012). Vaginal agenesis, the hymen, and associated anomalies. *Journal of pediatric and adolescent gynecology* 25(1): 54–58, doi: 10.1016/j.jpog.2011.08.003.
6. Fillmore W J, Rieck K L (2014). Buccal mucosa grafting for male urethroplasty: Long-term follow up of patients' experience with a team approach and primary closure. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 26(4): 437–442, doi: 10.1016/j.ajoms.2013.04.013.
7. Hampson L A, McAninch J W, Breyer B N (2014). Male urethral strictures and their management. *Nature reviews. Urology* 11(1): 43–50, doi: 10.1038/nrurol.2013.275.
8. Raya-Rivera A, Esquiliano D R, Yoo J J, et al. (2011). Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: An observational study. *Lancet (London, England)* 377(9772): 1175–1182, doi: 10.1016/S0140-6736(10)62354-9.
9. Baskin L S, Ebberts M B (2006). Hypospadias: Anatomy, etiology, and technique. *Journal of pediatric surgery* 41(3): 463–472, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2005.11.059.
10. Mossey P A, Shaw W C, Munger R G, et al. (2011). Global oral health inequalities: Challenges in the prevention and management of orofacial clefts and potential solutions. *Advances in dental research* 23(2): 247–258, doi: 10.1177/0022034511402083.
11. Tompkins J J, Vaughn C A, Shaikh F A, et al. (2015). Palatopharyngoplasty with bilateral buccal mucosal graft repair to alleviate oropharyngeal stenosis. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 79(9): 1579–1581, doi: 10.1016/j.ijporl.2015.06.022.
12. Dhillon M, Mohan R S, Raju S M, et al. (2013). Ackerman's tumour of buccal mucosa in a leprosy patient. *Leprosy review* 84(2): 151–157. PMID: 24171242.
13. Khan S, Zaheer S, Gupta N D (2013). Oral psoriasis: A diagnostic dilemma. *Eur J Gen Dent* 2(1): 67, doi: 10.4103/2278-9626.106822.
14. de Trey L A, Morrison G A (2013). Buccal mucosa graft for laryngotracheal reconstruction in severe laryngeal stenosis. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 77(10): 1643–1646, doi: 10.1016/j.ijporl.2013.07.013.
15. Bree R de, Rinaldo A, Genden E M, et al. (2008). Modern reconstruction techniques for oral and pharyngeal defects after tumor resection. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 265(1): 1–9, doi: 10.1007/s00405-007-0413-y.
16. Chiapasco M, Colletti G, Romeo E, et al. (2008). Long-term results of mandibular reconstruction with autogenous bone grafts and oral implants after tumor resection. *Clin Oral Implants Res* 19(10): 1074–1080, doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01542.x.
17. Mungadi I A, Ugboko V I (2009). Oral mucosa grafts for urethral reconstruction. *Annals of African medicine* 8(4): 203–209, doi: 10.4103/1596-3519.59572.
18. Markiewicz M R, Margarone J E, Barbagli G, et al. (2007). Oral Mucosa Harvest: An Overview of Anatomic and Biologic Considerations. *EAU-EBU Update Series* 5(5): 179–187, doi: 10.1016/j.eeus.2007.05.002.
19. Moharamzadeh K, Brook I M, van Noort R, et al. (2007). Tissue-engineered oral mucosa: A review of the scientific literature. *Journal of dental research* 86(2): 115–124, doi: 10.1177/154405910708600203.
20. Stein R, Schröder A, Thüroff J W (2007). Die Verwendung von Mundschleimhaut in der Harnröhrenchirurgie. *Der Urologe. Ausg. A* 46(12): 1657–1663, doi: 10.1007/s00120-007-1587-z.

21. Squier C A, Brogden K A. (Eds.) (2011). *Human oral mucosa: Development, structure, and function*. Chichester, West Sussex, U.K: Wiley-Blackwell.
22. Liu J, Bian Z, Kuijpers-Jagtman A M, et al. (2010). Skin and oral mucosa equivalents: Construction and performance. *Orthodontics & craniofacial research* 13(1): 11–20, doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01475.x.
23. Osman N I, Hillary C, Bullock A J, et al. (2015). Tissue engineered buccal mucosa for urethroplasty: Progress and future directions. *Advanced drug delivery reviews* 82-83: 69–76, doi: 10.1016/j.addr.2014.10.006.
24. Squier C A, Kremer M J (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *JNCI Monographs* 2001(29): 7–15.
25. Marks J G, Miller J J, Lookingbill D P (2006). *Lookingbill and Marks' principles of dermatology* (4th edn). Edinburgh: Elsevier Saunders.
26. Heller M, Frerick-Ochs E V, Bauer H-K, et al. (2016). Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials* 77: 207–215, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.073.
27. Markiewicz M R, DeSantis J L, Margarone J E, et al. (2008). Morbidity associated with oral mucosa harvest for urological reconstruction: An overview. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 66(4): 739–744, doi: 10.1016/j.joms.2007.11.023.
28. Novak N, Haberstock J, Bieber T, et al. (2008). The immune privilege of the oral mucosa. *Trends in molecular medicine* 14(5): 191–198, doi: 10.1016/j.molmed.2008.03.001.
29. Rudney J D, Chen R (2006). The vital status of human buccal epithelial cells and the bacteria associated with them. *Archives of oral biology* 51(4): 291–298, doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.09.003.
30. Lu M, Zhou G, Liu W, et al. (2010). Remodeling of buccal mucosa by bladder microenvironment. *Urology* 75(6): 1514.e7-14, doi: 10.1016/j.urology.2009.12.060.
31. Almela T, Brook I M, Moharamzadeh K (2016). Development of three-dimensional tissue engineered bone-oral mucosal composite models. *Journal of materials science. Materials in medicine* 27(4): 65, doi: 10.1007/s10856-016-5676-7.
32. Moharamzadeh K, Brook I M, van Noort R, et al. (2008). Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. *Journal of materials science. Materials in medicine* 19(4): 1793–1801, doi: 10.1007/s10856-007-3321-1.
33. Dublin N, Stewart L H (2004). Oral complications after buccal mucosal graft harvest for urethroplasty. *BJU international* 94(6): 867–869, doi: 10.1111/j.1464-410X.2004.05048.x.
34. Lauer G, Schimming R (2001). Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: A clinical and immunohistologic study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 59(2): 169-75; discussion 175-7, doi: 10.1053/joms.2001.20489.
35. Corvin S, Feil G, Stenzl A (2004). Tissue Engineering der Harnröhre und des Harnleiters. *Der Urologe. Ausg. A* 43(10): 1213–1216, doi: 10.1007/s00120-004-0689-0.
36. Cuono C (1986). Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *The Lancet* 327(8490): 1123–1124, doi: 10.1016/S0140-6736(86)91838-6.
37. Madden M R, Finkelstein J L, Staiano-Coico L, et al. (1986). Grafting of cultured allogeneic epidermis on second- and third-degree burn wounds on 26 patients. *The Journal of trauma* 26(11): 955–962. PMID: 3537324.
38. Hefton J M, Madden M R, Finkelstein J L, et al. (1983). Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. *The Lancet* 2(8347): 428–430. PMID: 6135914.
39. Munster A M (1996). Cultured skin for massive burns. A prospective, controlled trial. *Annals of surgery* 224(3): 372–377. PMID: 8813265.
40. Ueda M (1995). Formation of epithelial sheets by serially cultivated human mucosal cells and their applications as a graft material. *Nagoya journal of medical science* 58(1-2): 13–28. PMID: 7659143.
41. Lauer G (1994). Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. Method and clinical application. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 22(1): 18–22. PMID: 8175992.
42. Williamson J S, Snelling C F T, Clugston P, et al. (1995). Cultured Epithelial Autograft: Three years of clinical experience with eighteen patients. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 39(2): 309–319, doi: 10.1097/00005373-199508000-00020.

43. Alvarez-Díaz C, Cuenca-Pardo J, Sosa-Serrano A, et al. (2000). Controlled clinical study of deep partial-thickness burns treated with frozen cultured human allogeneic epidermal sheets. *The Journal of burn care & rehabilitation* 21(4): 291–299, doi: 10.1067/mbc.2000.106393.
44. El-Kassaby A W, AbouShwareb T, Atala A (2008). Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures. *The Journal of urology* 179(4): 1432–1436, doi: 10.1016/j.juro.2007.11.101.
45. Chen F, Yoo J J, Atala A (1999). Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology* 54(3): 407–410, doi: 10.1016/S0090-4295(99)00179-X.
46. Villoldo G M, Loresi M, Giudice C, et al. (2013). Histologic changes after urethroplasty using small intestinal submucosa unseeded with cells in rabbits with injured urethra. *Urology* 81(6): 1380.e1-5, doi: 10.1016/j.urology.2013.02.023.
47. El-Assmy A, El-Hamid M A, Hafez A T (2004). Urethral replacement: A comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. *BJU international* 94(7): 1132–1135, doi: 10.1111/j.1464-410X.2004.05115.x.
48. Davis N F, Cunnane E M, O'Brien F J, et al. (2017). Tissue engineered extracellular matrices (ECMs) in urology: Evolution and future directions. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*: im Druck, doi: 10.1016/j.surge.2017.07.002.
49. Huang J-W, Xie M-K, Zhang Y, et al. (2014). Reconstruction of penile urethra with the 3-dimensional porous bladder acellular matrix in a rabbit model. *Urology* 84(6): 1499–1505, doi: 10.1016/j.urology.2014.07.044.
50. Li H, Xu Y, Xie H, et al. (2014). Epithelial-differentiated adipose-derived stem cells seeded bladder acellular matrix grafts for urethral reconstruction: an animal model. *Tissue engineering. Part A* 20(3-4): 774–784, doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0122.
51. Atala A (2008). Bioengineered tissues for urogenital repair in children. *Pediatric research* 63(5): 569–575, doi: 10.1203/PDR.0b013e3181660639.
52. Li C, Xu Y-M, Song L-J, et al. (2008). Urethral reconstruction using oral keratinocyte seeded bladder acellular matrix grafts. *The Journal of urology* 180(4): 1538–1542, doi: 10.1016/j.juro.2008.06.013.
53. El-Kassaby A W, Retik A B, Yoo J J, et al. (2003). Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *The Journal of urology* 169(1): 170-3; discussion 173, doi: 10.1097/O1.ju.0000040520.75572.54.
54. Boccafoschi F, Botta M, Fusaro L, et al. (2017). Decellularized biological matrices: An interesting approach for cardiovascular tissue repair and regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 11(5): 1648–1657, doi: 10.1002/term.2103.
55. Dall'Olmo L, Zanusso I, Di Liddo R, et al. (2014). Blood vessel-derived acellular matrix for vascular graft application. *BioMed research international* 2014(685426): 1–9, doi: 10.1155/2014/685426.
56. Lehr E J, Rayat G R, Chiu B, et al. (2011). Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 141(4): 1056–1062, doi: 10.1016/j.jtcvs.2010.02.060.
57. Quint C, Kondo Y, Manson R J, et al. (2011). Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(22): 9214–9219, doi: 10.1073/pnas.1019506108.
58. Ketchedjian A, Kreuger P, Lukoff H, et al. (2005). Ovine panel reactive antibody assay of HLA responsivity to allograft bioengineered vascular scaffolds. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 129(1): 159–166, doi: 10.1016/j.jtcvs.2004.06.017.
59. Gilbert T W, Freund J M, Badylak S F (2009). Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *The Journal of surgical research* 152(1): 135–139, doi: 10.1016/j.jss.2008.02.013.
60. Zheng M H, Chen J, Kirilak Y, et al. (2005). Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: Possible implications in human implantation. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 73(1): 61–67, doi: 10.1002/jbm.b.30170.
61. Zhang C, Murphy S V, Atala A (2014). Regenerative medicine in urology. *Seminars in pediatric surgery* 23(3): 106–111, doi: 10.1053/j.sempedsurg.2014.05.002.
62. Heller M, Bauer H-K, Goetze E J, et al. (2016). Applications of patient-specific 3D printing in medicine: Patientenspezifische Anwendungen von 3-D-Druck in der Medizin. *International journal of computerized dentistry : official publication of the International Society of Computerized Dentistry* 19(4): 323–339.
63. Heller M, Bauer H K, Goetze E, et al. (2016). Materials and scaffolds in medical 3D printing and bioprinting in the context of bone regeneration. *International journal of computerized dentistry* 19(4): 301–321.

64. Kim B M, Suzuki S, Nishimura Y, et al. (1999). Cellular artificial skin substitute produced by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes. *British Journal of Plastic Surgery* 52(7): 573–578, doi: 10.1054/bjps.1999.3162.
65. Monstrey S, Beele H, Kettler M, et al. (1999). Allogeneic cultured keratinocytes vs. cadaveric skin to cover wide-mesh autogenous split-thickness skin grafts. *Annals of Plastic Surgery* 43(3): 268–272. PMID: 10490178.
66. Cooper M L, Andree C, Hansbrough J F, et al. (1993). Direct Comparison of a Cultured Composite Skin Substitute Containing Human Keratinocytes and Fibroblasts to an Epidermal Sheet Graft Containing Human Keratinocytes on Athymic Mice. *Journal of Investigative Dermatology* 101(6): 811–819, doi: 10.1111/1523-1747.ep12371700.
67. Xue J-D, Gao J, Fu Q, et al. (2016). Seeding cell approach for tissue-engineered urethral reconstruction in animal study: A systematic review and meta-analysis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 241(13): 1416–1428, doi: 10.1177/1535370216640148.
68. Orabi H, AbouShwareb T, Zhang Y, et al. (2013). Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: A preclinical study. *European urology* 63(3): 531–538, doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.041.
69. Izumi K, Feinberg S E, Iida A, et al. (2003). Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: A preliminary report. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 32(2): 188–197, doi: 10.1054/ijom.2002.0365.
70. de Filippo R E, Yoo J J, Atala A (2002). Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *The Journal of urology* 168(4 Pt 2): 1789–92; discussion 1792–3, doi: 10.1097/01.ju.0000027662.69103.72.
71. Yoo J J, Meng J, Oberpenning F, et al. (1998). Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology* 51(2): 221–225. PMID: 9495701.
72. de Filippo R E, Bishop C E, Filho L F, et al. (2008). Tissue engineering a complete vaginal replacement from a small biopsy of autologous tissue. *Transplantation* 86(2): 208–214, doi: 10.1097/TP.0b013e31817f1686.
73. Dorin R P, Pohl H G, Filippo R E de, et al. (2008). Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: What is the maximum distance for normal tissue regeneration? *World journal of urology* 26(4): 323–326, doi: 10.1007/s00345-008-0316-6.
74. de Filippo R E, Yoo J J, Atala A (2003). Engineering of vaginal tissue in vivo. *Tissue engineering* 9(2): 301–306, doi: 10.1089/107632703764664765.
75. Ding L, Li X'a, Sun H, et al. (2014). Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. *Biomaterials* 35(18): 4888–4900, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.046.
76. de Filippo R E, Kornitzer B S, Yoo J J, et al. (2015). Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 9(3): 257–264, doi: 10.1002/term.1647.
77. Gu G-L, Xia S-J, Zhang J, et al. (2012). Tubularized urethral replacement using tissue-engineered peritoneum-like tissue in a rabbit model. *Urologia internationalis* 89(3): 358–364, doi: 10.1159/000339745.
78. Xie M, Xu Y, Song L, et al. (2014). Tissue-engineered buccal mucosa using silk fibroin matrices for urethral reconstruction in a canine model. *The Journal of surgical research* 188(1): 1–7, doi: 10.1016/j.jss.2013.11.1102.
79. Yoshizawa M, Koyama T, Kojima T, et al. (2012). Keratinocytes of tissue-engineered human oral mucosa promote re-epithelialization after intraoral grafting in athymic mice. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 70(5): 1199–1214, doi: 10.1016/j.joms.2011.03.057.
80. Atala A, Bauer S B, Soker S, et al. (2006). Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet (London, England)* 367(9518): 1241–1246, doi: 10.1016/S0140-6736(06)68438-9.
81. Raya-Rivera A?n M, Esquiliano D, Fierro-Pastrana R, et al. (2014). Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: A pilot cohort study. *The Lancet* 384(9940): 329–336, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60542-0.
82. Dobrowolski D, Orzechowska-Wylegala B, Wowra B, et al. (2015). Cultivated Oral Mucosa Epithelium in Ocular Surface Reconstruction in Aniridia Patients. *BioMed research international* 2015: 281870, doi: 10.1155/2015/281870.

83. Gonfiotti A, Jaus M O, Barale D, et al. (2014). The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet (London, England)* 383(9913): 238–244, doi: 10.1016/S0140-6736(13)62033-4.
84. Elliott M J, Coppi P de, Speggorin S, et al. (2012). Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: A 2-year follow-up study. *The Lancet* 380(9846): 994–1000, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60737-5.
85. Orzechowska-Wylegała B, Dobrowolski D, Puzzolo D, et al. (2017). Use of autologous epithelium transplantation on various scaffolds to cover tissue loss in oral cavity: Long-term observation. *Journal of applied biomaterials & functional materials* 15(1): e25–e30, doi: 10.5301/jabfm.5000312.
86. Sieira Gil R, Pagés C M, Díez E G, et al. (2015). Tissue-engineered oral mucosa grafts for intraoral lining reconstruction of the maxilla and mandible with a fibula flap. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 73(1): 195.e1-16, doi: 10.1016/j.joms.2014.09.001.
87. Llamas S, Recuero I, Romance A, et al. (2014). Tissue-engineered oral mucosa for mucosal reconstruction in a pediatric patient with hemifacial microsomia and ankyloglossia. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 51(2): 246–251, doi: 10.1597/12-245.
88. Ram-Liebig G, Engel O, Schwaiger B, et al. (2012). 621 Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty. Outcome of our first 10 patients. *European Urology Supplements* 11(1): e621-e621a, doi: 10.1016/S1569-9056(12)60618-6.
89. Ram-Liebig G, Barbagli G, Heidenreich A, et al. (2017). Results of Use of Tissue-Engineered Autologous Oral Mucosa Graft for Urethral Reconstruction: A Multicenter, Prospective, Observational Trial. *EBioMedicine* 23: 185–192, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.08.014.
90. Kinikoglu B, Damour O, Hasirci V (2015). Tissue engineering of oral mucosa: A shared concept with skin. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 18(1): 8–19, doi: 10.1007/s10047-014-0798-5.
91. Orabi H, Bouhout S, Morissette A, et al. (2013). Tissue engineering of urinary bladder and urethra: Advances from bench to patients. *TheScientificWorldJournal* 2013: 154564, doi: 10.1155/2013/154564.
92. Tra W M W, van Neck J W, Hovius S E R, et al. (2012). Characterization of a three-dimensional mucosal equivalent: Similarities and differences with native oral mucosa. *Cells, tissues, organs* 195(3): 185–196, doi: 10.1159/000324918.
93. Kinikoglu B, Rovere M R, Haftek M, et al. (2012). Influence of the mesenchymal cell source on oral epithelial development. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 6(3): 245–252, doi: 10.1002/term.426.
94. Colley H E, Hearnden V, Jones A V, et al. (2011). Development of tissue-engineered models of oral dysplasia and early invasive oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 105(10): 1582–1592, doi: 10.1038/bjc.2011.403.
95. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo M C, et al. (2007). Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1(5): 350–359, doi: 10.1002/term.38.
96. Buskermolen J K, Reijnders C M A, Spiekstra S W, et al. (2016). Development of a Full-Thickness Human Gingiva Equivalent Constructed from Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue engineering. Part C, Methods* 22(8): 781–791, doi: 10.1089/ten.TEC.2016.0066.
97. Luitaud C, Laflamme C, Semlali A, et al. (2007). Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 83(2): 554–561, doi: 10.1002/jbm.b.30828.
98. Bhargava S, Patterson J M, Inman R D, et al. (2008). Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty-clinical outcomes. *European urology* 53(6): 1263–1269, doi: 10.1016/j.eururo.2008.01.061.
99. Naderi H, Matin M M, Bahrami A R (2011). Review paper: Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *Journal of biomaterials applications* 26(4): 383–417, doi: 10.1177/0885328211408946.
100. Lovett M, Lee K, Edwards A, et al. (2009). Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 15(3): 353–370, doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0085.
101. Jain R K, Au P, Tam J, et al. (2005). Engineering vascularized tissue. *Nature biotechnology* 23(7): 821–823, doi: 10.1038/nbt0705-821.
102. Torres Filho I P, Leunig M, Yuan F, et al. (1994). Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(6): 2081–2085.

103. Radisic M, Malda J, Epping E, et al. (2006). Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnology and bioengineering* 93(2): 332–343, doi: 10.1002/bit.20722.
104. Rouwkema J, Rivron N C, van Blitterswijk C A (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in biotechnology* 26(8): 434–441, doi: 10.1016/j.tibtech.2008.04.009.
105. Ophof R, Maltha J C, Kuijpers-Jagtman A M, et al. (2008). Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate. *European journal of orthodontics* 30(1): 1–9, doi: 10.1093/ejo/cjm082.
106. Schmidt A, Brixius K, Bloch W (2007). Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circulation research* 101(2): 125–136.
107. Secomb T W, Alberding J P, Hsu R, et al. (2013). Angiogenesis: An adaptive dynamic biological patterning problem. *PLoS computational biology* 9(3): e1002983, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002983.
108. Chung A S, Ferrara N (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 27: 563–584, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154002.
109. Risau W, Flamme I (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 11: 73–91, doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
110. Jeltsch M, Leppänen V-M, Saharinen P, et al. (2013). Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(9), doi: 10.1101/cshperspect.a009183.
111. Bommas-Ebert U, Teubner P, Voß R, et al. (2011). *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie ; [mit Muskeltrainer]* (3rd edn). Stuttgart: Thieme.
112. Aumüller G, Aust G, Doll A, et al. (2010). *Anatomie* (2nd edn, Duale Reihe). Stuttgart: Thieme.
113. Zilles K, Tillmann B N (2010). *Anatomie* (Springer-Lehrbuch). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
114. Schwarzacher S P (2002). Das Endothel: Parakrine und endokrine Funktionen. *Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology* 9(4): 121–124.
115. Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* 6(4): 389–395, doi: 10.1038/74651.
116. Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626): 671–674, doi: 10.1038/386671a0.
117. Patel-Hett S, D'Amore P A (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International journal of developmental biology* 55(4-5): 353–363, doi: 10.1387/ijdb.103213sp.
118. Blanco R, Gerhardt H (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3(1): a006569, doi: 10.1101/cshperspect.a006569.
119. Ash J D, Overbeek P A (2000). Lens-specific VEGF-A expression induces angioblast migration and proliferation and stimulates angiogenic remodeling. *Developmental Biology* 223(2): 383–398, doi: 10.1006/dbio.2000.9755.
120. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573): 435–439, doi: 10.1038/380435a0.
121. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T P, et al. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376(6535): 62–66, doi: 10.1038/376062a0.
122. Lee S, Chen T T, Barber C L, et al. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 130(4): 691–703, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.054.
123. Logsdon E A, Finley S D, Popel A S, et al. (2014). A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *Journal of cellular and molecular medicine* 18(8): 1491–1508, doi: 10.1111/jcmm.12164.
124. Karamysheva A F (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry Moscow* 73(7): 751–762, doi: 10.1134/S0006297908070031.
125. Unger R E, Dohle E, Kirkpatrick C J (2015). Improving vascularization of engineered bone through the generation of pro-angiogenic effects in co-culture systems. *Advanced drug delivery reviews* 94: 116–125, doi: 10.1016/j.addr.2015.03.012.
126. Carmeliet P, Jain R K (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473(7347): 298–307, doi: 10.1038/nature10144.
127. Adair T H, Montani J-P (2010). Angiogenesis. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* 2(1): 1–84, doi: 10.4199/C00017ED1V01Y201009ISP010.
128. Koch S, Tugues S, Li X, et al. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* 437(2): 169–183, doi: 10.1042/BJ20110301.
129. Augustin H G, Koh G Y, Thurston G, et al. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(3): 165–177, doi: 10.1038/nrm2639.

130. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146(6): 873–887, doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039.
131. Domigan C K, Warren C M, Antanesian V, et al. (2015). Autocrine VEGF maintains endothelial survival through regulation of metabolism and autophagy. *Journal of cell science* 128(12): 2236–2248, doi: 10.1242/jcs.163774.
132. Kimura H, Esumi H (2003). Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta biochimica Polonica* 50(1): 49–59. PMID: 12673346.
133. Klagsbrun M, D'Amore P A (1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 7(3): 259–270. PMID: 8971481.
134. Kim W Y, Kaelin W G (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22(24): 4991–5004, doi: 10.1200/JCO.2004.05.061.
135. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science (New York, N.Y.)* 292(5516): 464–468, doi: 10.1126/science.1059817.
136. Arroyo A G, Iruela-Arispe M L (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research* 86(2): 226–235, doi: 10.1093/cvr/cvq049.
137. Nyberg P, Xie L, Kalluri R (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer research* 65(10): 3967–3979, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2427.
138. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17(10): 611–625, doi: 10.1038/nrm.2016.87.
139. Phng L-K, Gerhardt H (2009). Angiogenesis: A team effort coordinated by notch. *Developmental cell* 16(2): 196–208, doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.015.
140. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* 161(6): 1163–1177, doi: 10.1083/jcb.200302047.
141. Senger D R, Davis G E (2011). Angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(8), doi: 10.1101/cshperspect.a005090.
142. Ubezio B, Blanco R A, Geudens I, et al. (2016). Synchronization of endothelial Dll4-Notch dynamics switch blood vessels from branching to expansion. *eLife* 5, doi: 10.7554/eLife.12167.
143. Bentley K, Chakravartula S (2017). The temporal basis of angiogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 372(1720), doi: 10.1098/rstb.2015.0522.
144. Roca C, Adams R H (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes & development* 21(20): 2511–2524, doi: 10.1101/gad.1589207.
145. Liu Z-J, Shirakawa T, Li Y, et al. (2003). Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: Implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Molecular and cellular biology* 23(1): 14–25. PMID: 12482957.
146. Jakobsson L, Franco C A, Bentley K, et al. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology* 12(10): 943–953, doi: 10.1038/ncb2103.
147. Jain R K (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine* 9(6): 685–693, doi: 10.1038/nm0603-685.
148. Stratman A N, Schwindt A E, Malotte K M, et al. (2010). Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood* 116(22): 4720–4730, doi: 10.1182/blood-2010-05-286872.
149. Stratman A N, Malotte K M, Mahan R D, et al. (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114(24): 5091–5101, doi: 10.1182/blood-2009-05-222364.
150. Costa G, Harrington K I, Lovegrove H E, et al. (2016). Asymmetric division coordinates collective cell migration in angiogenesis. *Nature cell biology* 18(12): 1292–1301, doi: 10.1038/ncb3443.
151. Zeng G, Taylor S M, McColm J R, et al. (2007). Orientation of endothelial cell division is regulated by VEGF signaling during blood vessel formation. *Blood* 109(4): 1345–1352, doi: 10.1182/blood-2006-07-037952.
152. Rivron N C, Liu J, Rouwkema J, et al. (2008). Engineering vascularised tissues in vitro. *eCM* 15: 27–40, doi: 10.22203/eCM.v015a03.
153. Akar B, Jiang B, Somo S I, et al. (2015). Biomaterials with persistent growth factor gradients in vivo accelerate vascularized tissue formation. *Biomaterials* 72: 61–73, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.049.

154. Singh S, Wu B M, Dunn J C Y (2012). Delivery of VEGF using collagen-coated polycaprolactone scaffolds stimulates angiogenesis. *Journal of biomedical materials research. Part A* 100(3): 720–727, doi: 10.1002/jbm.a.34010.
155. Miyagi Y, Chiu L L Y, Cimini M, et al. (2011). Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair. *Biomaterials* 32(5): 1280–1290, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.007.
156. Phelps E A, Landázuri N, Thulé P M, et al. (2010). Bioartificial matrices for therapeutic vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8): 3323–3328, doi: 10.1073/pnas.0905447107.
157. Chiu L L Y, Radisic M (2010). Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials* 31(2): 226–241, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.039.
158. Nillesen S T M, Geutjes P J, Wismans R, et al. (2007). Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* 28(6): 1123–1131, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.029.
159. Utzinger U, Baggett B, Weiss J A, et al. (2015). Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenesis* 18(3): 219–232, doi: 10.1007/s10456-015-9461-x.
160. Naito Y, Shinoka T, Duncan D, et al. (2011). Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Advanced drug delivery reviews* 63(4-5): 312–323, doi: 10.1016/j.addr.2011.03.001.
161. Tremblay P-L, Hudon V, Berthod F, et al. (2005). Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5(5): 1002–1010, doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.00790.x.
162. Sun B, Jiang X-J, Zhang S, et al. (2015). Electrospun anisotropic architectures and porous structures for tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* 3(27): 5389–5410, doi: 10.1039/C5TB00472A.
163. Malinauskas M, Rekštytė S, Lukoševičius L, et al. (2014). 3D Microporous Scaffolds Manufactured via Combination of Fused Filament Fabrication and Direct Laser Writing Ablation. *Micromachines* 5(4): 839–858, doi: 10.3390/mi5040839.
164. Luo Y, Lode A, Gelinsky M (2013). Direct plotting of three-dimensional hollow fiber scaffolds based on concentrated alginate pastes for tissue engineering. *Advanced healthcare materials* 2(6): 777–783, doi: 10.1002/adhm.201200303.
165. Zhao L, Lee V K, Yoo S-S, et al. (2012). The integration of 3-D cell printing and mesoscopic fluorescence molecular tomography of vascular constructs within thick hydrogel scaffolds. *Biomaterials* 33(21): 5325–5332, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.004.
166. Rouwkema J, Khademhosseini A (2016). Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. *Trends in biotechnology* 34(9): 733–745, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.03.002.
167. Lee V K, Kim D Y, Ngo H, et al. (2014). Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology. *Biomaterials* 35(28): 8092–8102, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.083.
168. Nichol J W, Koshy S T, Bae H, et al. (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 31(21): 5536–5544, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.064.
169. Lee V K, Dai G (2017). Printing of Three-Dimensional Tissue Analogs for Regenerative Medicine. *Annals of biomedical engineering* 45(1): 115–131, doi: 10.1007/s10439-016-1613-7.
170. Laschke M W, Menger M D (2016). Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnology advances* 34(2): 112–121, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.004.
171. Baldwin J, Antille M, Bonda U, et al. (2014). In vitro pre-vascularisation of tissue-engineered constructs A co-culture perspective. *Vascular cell* 6: 13, doi: 10.1186/2045-824X-6-13.
172. Chen W, Thein-Han W, Weir M D, et al. (2014). Prevascularization of biofunctional calcium phosphate cement for dental and craniofacial repairs. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 30(5): 535–544, doi: 10.1016/j.dental.2014.02.007.
173. Hofmann A, Ritz U, Verrier S, et al. (2008). The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds. *Biomaterials* 29(31): 4217–4226, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.07.024.
174. Unger R E, Sartoris A, Peters K, et al. (2007). Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28(27): 3965–3976, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.032.
175. Nolan D J, Ginsberg M, Israely E, et al. (2013). Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Developmental cell* 26(2): 204–219, doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.017.

176. Melero-Martin J M, Obaldia M E de, Kang S-Y, et al. (2008). Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circulation research* 103(2): 194–202, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178590.
177. Chen X, Aledia A S, Ghajar C M, et al. (2009). Prevascularization of a fibrin-based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature. *Tissue engineering. Part A* 15(6): 1363–1371, doi: 10.1089/ten.tea.2008.0314.
178. Unger R E, Ghanaati S, Orth C, et al. (2010). The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* 31(27): 6959–6967, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.057.
179. Kunz-Schughart L A, Schroeder J A, Wondrak M, et al. (2006). Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *American journal of physiology. Cell physiology* 290(5): C1385-98, doi: 10.1152/ajpcell.00248.2005.
180. Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, et al. (2005). Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nature biotechnology* 23(7): 879–884, doi: 10.1038/nbt1109.
181. Baiguera S, Ribatti D (2013). Endothelialization approaches for viable engineered tissues. *Angiogenesis* 16(1): 1–14, doi: 10.1007/s10456-012-9307-8.
182. Nguyen L L, D'Amore P A (2001). Cellular interactions in vascular growth and differentiation. *International review of cytology* 204: 1–48. PMID: 11243594.
183. Pinney E, Liu K, Sheeman B, et al. (2000). Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenic activity. *Journal of cellular physiology* 183(1): 74–82, doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<74::AID-JCP9>3.0.CO;2-G.
184. Schnaper H W, Kleinman H K, Grant D S (1993). Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation. *Kidney International* 43(1): 20–25, doi: 10.1038/ki.1993.5.
185. Tian L, George S C (2011). Biomaterials to prevascularize engineered tissues. *Journal of cardiovascular translational research* 4(5): 685–698, doi: 10.1007/s12265-011-9301-3.
186. Burdick J A, Vunjak-Novakovic G (2009). Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue engineering. Part A* 15(2): 205–219, doi: 10.1089/ten.tea.2008.0131.
187. Ren L, Ma D, Liu B, et al. (2014). Preparation of three-dimensional vascularized MSC cell sheet constructs for tissue regeneration. *BioMed research international* 2014: 301279, doi: 10.1155/2014/301279.
188. Weinandy S, Laffar S, Unger R E, et al. (2014). Biofunctionalized microfiber-assisted formation of intrinsic three-dimensional capillary-like structures. *Tissue engineering. Part A* 20(13-14): 1858–1869, doi: 10.1089/ten.tea.2013.0330.
189. Lin C Q, Bissell M J (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7(9): 737–743. PMID: 8330681.
190. Peters K, Schmidt H, Unger R E, et al. (2002). Software-supported image quantification of angiogenesis in an in vitro culture system: application to studies of biocompatibility. *Biomaterials* 23(16): 3413–3419. PMID: 12099284.
191. Schulze A C (2016). *Diplomarbeit: Einsatz und Charakterisierung von endothelialen Progenitorzellen für die Prävascularisation einer in vitro-Schleimhaut.*
192. BØYUM A (1964). Separation of White Blood Cells. *Nature* 204(4960): 793–794, doi: 10.1038/204793a0.
193. Aasen T, Izpisua Belmonte J C (2010). Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nature protocols* 5(2): 371–382, doi: 10.1038/nprot.2009.241.
194. Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89(2): 271–277, doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6.
195. Igarashi T, Shimmura S, Yoshida S, et al. (2008). Isolation of oral epithelial progenitors using collagen IV. *Oral diseases* 14(5): 413–418, doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01390.x.
196. Izumi K, Tobita T, Feinberg S E (2007). Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *Journal of dental research* 86(4): 341–346, doi: 10.1177/154405910708600408.
197. Bonavia R, Inda M M, Vandenberg S, et al. (2012). EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF-κB, interleukin-8 pathway. *Oncogene* 31(36): 4054–4066, doi: 10.1038/onc.2011.563.

198. Ning Y, Manegold P C, Hong Y K, et al. (2011). Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *International journal of cancer* 128(9): 2038–2049, doi: 10.1002/ijc.25562.
199. Neufeld G, Kessler O (2006). Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 25(3): 373.
200. Montesano R, Vassalli J D, Baird A, et al. (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(19): 7297–7301. PMID: 2429303.
201. Spanholtz T A, Theodorou P, Holzbach T, et al. (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(1): 329–338, doi: 10.1016/j.jss.2010.03.033.
202. Kumar V V, Heller M, Götz H, et al. (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(5): 543–550, doi: 10.1111/clr.12832.
203. Rigamonti N, Kadioglu E, Keklikoglou I, et al. (2014). Role of angiopoietin-2 in adaptive tumor resistance to VEGF signaling blockade. *Cell reports* 8(3): 696–706, doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.059.
204. Holash J (1999). Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science (New York, N.Y.)* 284(5422): 1994–1998, doi: 10.1126/science.284.5422.1994.
205. Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, et al. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(41): 15988–15993, doi: 10.1073/pnas.0705062104.
206. Li L, Hartley R, Reiss B, et al. (2012). E-cadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(16): 2779–2789, doi: 10.1007/s00018-012-0951-3.
207. Brown M A, Wallace C S, Anamelechi C C, et al. (2007). The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. *Biomaterials* 28(27): 3928–3935, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.009.
208. Yamato M, Akiyama Y, Kobayashi J, et al. (2007). Temperature-responsive cell culture surfaces for regenerative medicine with cell sheet engineering. *Progress in Polymer Science* 32(8-9): 1123–1133, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.06.002.
209. Nakae J, Kido Y, Accili D (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine reviews* 22(6): 818–835, doi: 10.1210/edrv.22.6.0452.
210. Gey G O (1924). Observations on the effects of insulin introduced into the medium of tissue cultures. *JAMA* 82(20): 1609, doi: 10.1001/jama.1924.26520460003014d.
211. Heni M, Hennige A M, Peter A, et al. (2011). Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS one* 6(6): e21594, doi: 10.1371/journal.pone.0021594.
212. Stout R W, Bierman E L, Ross R (1975). Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells. *Circulation research* 36(2): 319–327, doi: 10.1161/01.RES.36.2.319.
213. van der Burg B, Rutteman G R, Blankenstein M A, et al. (1988). Mitogenic stimulation of human breast cancer cells in a growth factor-defined medium: synergistic action of insulin and estrogen. *Journal of cellular physiology* 134(1): 101–108, doi: 10.1002/jcp.1041340112.
214. Igarashi T, Shimmura S, Yoshida S, et al. (2008). Isolation of oral epithelial progenitors using collagen IV. *Oral diseases* 14(5): 413–418, doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01390.x.
215. Dobrowolski D, Orzechowska-Wylegala B, Wowra B, et al. (2015). Cultivated Oral Mucosa Epithelium in Ocular Surface Reconstruction in Aniridia Patients. *BioMed research international* 2015: 281870, doi: 10.1155/2015/281870.
216. Sieira Gil R, Pagés C M, Díez E G, et al. (2015). Tissue-engineered oral mucosa grafts for intraoral lining reconstruction of the maxilla and mandible with a fibula flap. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 73(1): 195.e1-16, doi: 10.1016/j.joms.2014.09.001.
217. Daniels J T, Kearney J N, Ingham E (1996). Human keratinocyte isolation and cell culture: A survey of current practices in the UK. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 22(1): 35–39, doi: 10.1016/0305-4179(95)00085-2.
218. Sunohara M, Kage H, Zhou B, et al. (2016). Mouse Alveolar Epithelial Type I Cell Isolation Using Magnetic Sorting 2016: A5930-A5930.

219. Sidney L E, Branch M J, Dunphy S E, et al. (2014). Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32(6): 1380–1389.
220. Müller A M, Hermanns M I, Skrzynski C, et al. (2002). Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Experimental and molecular pathology* 72(3): 221–229, doi: 10.1006/exmp.2002.2424.
221. Patel M V, Fahey J V, Rossoll R M, et al. (2013). Innate immunity in the vagina (part I): estradiol inhibits HBD2 and elafin secretion by human vaginal epithelial cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 69(5): 463–474, doi: 10.1111/aji.12078.
222. Rose II W A, McGowin C L, Spagnuolo R A, et al. (2012). Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures. *PLoS one* 7(3): e32728.
223. Foster D C, Piekarz K H, Murant T I, et al. (2007). Enhanced synthesis of proinflammatory cytokines by vulvar vestibular fibroblasts: Implications for vulvar vestibulitis. *American journal of obstetrics and gynecology* 196(4): 346.e1-8, doi: 10.1016/j.ajog.2006.12.038.
224. Invitti A L, Takano C C, Rozenchan P B, et al. (2017). Establishment and Characterization of Vaginal Tissue Primary Culture: Feasibility of Cell Therapy for Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome (MRKHS) Patient Treatment. *J Biomedical Sci* 6(3): 25.
225. Frerick-Ochs E (2012). *Masterarbeit: Entwicklung und Charakterisierung prävascularisierter Mundschleimhautäquivalente im Rahmen einer Trikultivierung mittels „Tissue Engineering“*.
226. Flesch D (2010). *Diplomarbeit: Molekulare Beurteilung der Biokompatibilität von Kollagen-Matrices zur Geweberekonstruktion*.
227. Sun X, Altalhi W, Nunes S S (2016). Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration. *Advanced drug delivery reviews* 96: 183–194, doi: 10.1016/j.addr.2015.06.001.
228. Young P P, Vaughan D E, Hatzopoulos A K (2007). Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Progress in cardiovascular diseases* 49(6): 421–429, doi: 10.1016/j.pcad.2007.02.004.
229. Tura O, Skinner E M, Barclay G R, et al. (2013). Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31(2): 338–348, doi: 10.1002/stem.1280.
230. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425(6960): 836–841, doi: 10.1038/nature02041.
231. Grinnell F (2003). Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in Cell Biology* 13(5): 264–269, doi: 10.1016/S0962-8924(03)00057-6.
232. Jiang H, Grinnell F (2005). Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Molecular biology of the cell* 16(11): 5070–5076, doi: 10.1091/mbc.E05-01-0007.
233. Jordan A, Duperray A, Gérard A, et al. (2010). Breakdown of cell-collagen networks through collagen remodeling. *Biorheology* 47(5-6): 277–295, doi: 10.3233/BIR-2010-0575.
234. Ravanti L, Heino J, López-Otín C, et al. (1999). Induction of Collagenase-3 (MMP-13) Expression in Human Skin Fibroblasts by Three-dimensional Collagen Is Mediated by p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of biological chemistry* 274(4): 2446–2455, doi: 10.1074/jbc.274.4.2446.
235. Haas T L, Davis S J, Madri J A (1998). Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 273(6): 3604–3610.
236. Kahn J, Mehraban F, Ingle G, et al. (2000). Gene Expression Profiling in an in Vitro Model of Angiogenesis. *The American journal of pathology* 156(6): 1887–1900, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65062-6.
237. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010). Integrins. *Cell and tissue research* 339(1): 269–280, doi: 10.1007/s00441-009-0834-6.
238. White D J, Puranen S, Johnson M S, et al. (2004). The collagen receptor subfamily of the integrins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(8): 1405–1410, doi: 10.1016/j.biocel.2003.08.016.
239. Legate K R, Wickström S A, Fässler R (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & development* 23(4): 397–418, doi: 10.1101/gad.1758709.
240. Chen Q, Kinch M S, Lin T H, et al. (1994). Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 269(43): 26602–26605.

241. Li G, Li Y-Y, Sun J-E, et al. (2016). ILK–PI3K/AKT pathway participates in cutaneous wound contraction by regulating fibroblast migration and differentiation to myofibroblast. *Laboratory Investigation* 96(7): 741–751, doi: 10.1038/labinvest.2016.48.
242. Clarke D N, Al Ahmad A, Lee B, et al. (2012). Perlecan Domain V induces VEGf secretion in brain endothelial cells through integrin  $\alpha 5\beta 1$  and ERK-dependent signaling pathways. *PLoS one* 7(9): e45257, doi: 10.1371/journal.pone.0045257.
243. Montenegro C F, Salla-Pontes C L, Ribeiro J U, et al. (2012). Blocking  $\alpha v\beta 3$  integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie* 94(8): 1812–1820, doi: 10.1016/j.biochi.2012.04.020.
244. Franco M, Roswall P, Cortez E, et al. (2011). Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood* 118(10): 2906–2917, doi: 10.1182/blood-2011-01-331694.
245. Scatena M, Almeida M, Chaisson M L, et al. (1998). NF- $\kappa$ B Mediates  $\alpha v\beta 3$  Integrin-induced Endothelial Cell Survival. *J Cell Biol* 141(4): 1083–1093, doi: 10.1083/jcb.141.4.1083.
246. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, et al. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of leukocyte biology* 72(5): 847–855.
247. Okamoto S-i, Mukaida N, Yasumoto K, et al. (1993). Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *Advances in experimental medicine and biology* 351: 87–98.
248. Xu J, Zutter M M, Santoro S A, et al. (1998). A Three-dimensional Collagen Lattice Activates NF- $\kappa$ B in Human Fibroblasts: Role in Integrin  $\alpha 2$  Gene Expression and Tissue Remodeling. *J Cell Biol* 140(3): 709–719, doi: 10.1083/jcb.140.3.709.
249. Li Z, Wang W, Xu X, et al. (2017). Integrin  $\beta 1$  activation by micro-scale curvature promotes pro-angiogenic secretion of human mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B* 5(35): 7415–7425, doi: 10.1039/C7TB01232B.
250. Garcia-Velasco J A, Arici A (1999). Interleukin-8 expression in endometrial stromal cells is regulated by integrin-dependent cell adhesion. *Molecular Human Reproduction* 5(12): 1135–1140, doi: 10.1093/molehr/5.12.1135.
251. Yang B, Rizzo V (2013). Shear stress activates eNOS at the endothelial apical surface through  $\beta 1$  containing integrins and caveolae. *Cellular and molecular bioengineering* 6(3): 346–354.
252. Dai J, Peng L, Fan K, et al. (2009). Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* 28(38): 3412–3422, doi: 10.1038/onc.2009.189.
253. Jee S-H, Chu C-Y, Chiu H-C, et al. (2004). Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *The Journal of investigative dermatology* 123(6): 1169–1175, doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23497.x.
254. Chen J, Green J, Yurdagul A, et al. (2015).  $\alpha v\beta 3$  Integrins Mediate Flow-Induced NF- $\kappa$ B Activation, Proinflammatory Gene Expression, and Early Atherogenic Inflammation. *The American journal of pathology* 185(9): 2575–2589, doi: 10.1016/j.ajpath.2015.05.013.
255. Liu Y, Cox S R, Morita T, et al. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. *Circulation research* 77(3): 638–643.
256. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, et al. (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71(3): 374–379. PMID: 7933988.
257. Tamm M, Bihl M, Eickelberg O, et al. (1998). Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor in primary human lung cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 19(4): 653–661, doi: 10.1165/ajrcmb.19.4.3058.
258. Calvani M, Rapisarda A, Uranchimeg B, et al. (2006). Hypoxic induction of an HIF-1 $\alpha$ -dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* 107(7): 2705–2712, doi: 10.1182/blood-2005-09-3541.
259. Mandriota S J, Pepper M S (1998). Regulation of Angiopoietin-2 mRNA Levels in Bovine Microvascular Endothelial Cells by Cytokines and Hypoxia. *Circulation research* 83(8): 852–859, doi: 10.1161/01.RES.83.8.852.
260. Volkmer E, Drosse I, Otto S, et al. (2008). Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue engineering. Part A* 14(8): 1331–1340, doi: 10.1089/ten.tea.2007.0231.
261. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, et al. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine* 15(6): 1239–1253, doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.

262. Erecińska M, Silver I A (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respiration Physiology* 128(3): 263–276, doi: 10.1016/S0034-5687(01)00306-1.
263. Lee C M, Genetos D C, You Z, et al. (2007). Hypoxia regulates PGE(2) release and EP1 receptor expression in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 212(1): 182–188, doi: 10.1002/jcp.21017.
264. Malda J, Rouwkema J, Martens D E, et al. (2004). Oxygen gradients in tissue-engineered PEGT/PBT cartilaginous constructs: Measurement and modeling. *Biotechnology and bioengineering* 86(1): 9–18, doi: 10.1002/bit.20038.
265. Kellner K, Liebsch G, Klimant I, et al. (2002). Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnology and bioengineering* 80(1): 73–83, doi: 10.1002/bit.10352.
266. Postlethwaite A E, Seyer J M, Kang A H (1978). Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(2): 871–875.
267. Grinnell F, Rocha L B, Lucu C, et al. (2006). Nested collagen matrices: A new model to study migration of human fibroblast populations in three dimensions. *Experimental cell research* 312(1): 86–94, doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.001.
268. Velazquez O C, Snyder R, Liu Z-J, et al. (2002). Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(10): 1316–1318, doi: 10.1096/fj.01-1011fje.
269. Lee T-H, Seng S, Li H, et al. (2006). Integrin regulation by vascular endothelial growth factor in human brain microvascular endothelial cells: Role of alpha6beta1 integrin in angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 281(52): 40450–40460, doi: 10.1074/jbc.M607525200.
270. Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D, et al. (2001). Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 97(8): 2323–2332, doi: 10.1182/blood.V97.8.2323.
271. Davis G E, Camarillo C W (1996). An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Experimental cell research* 224(1): 39–51, doi: 10.1006/excr.1996.0109.
272. Montesano R, Orci L, Vassalli P (1983). In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *The Journal of cell biology* 97(5): 1648–1652.
273. Newman A C, Nakatsu M N, Chou W, et al. (2011). The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Molecular biology of the cell* 22(20): 3791–3800, doi: 10.1091/mbc.E11-05-0393.
274. Bayless K J, Salazar R, Davis G E (2000). RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *The American journal of pathology* 156(5): 1673–1683. PMID: 10793078.
275. Drake C J, Cheresch D A, Little C D (1995). An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *Journal of cell science* 108 (Pt 7): 2655–2661. PMID: 7593306.
276. Taubenberger A V, Woodruff M A, Bai H, et al. (2010). The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation. *Biomaterials* 31(10): 2827–2835, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.051.
277. Madaghiele M, Calò E, Salvatore L, et al. (2016). Assessment of collagen crosslinking and denaturation for the design of regenerative scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A* 104(1): 186–194, doi: 10.1002/jbm.a.35554.
278. Davis G E (1992). Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: Avβ3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochemical and biophysical research communications* 182(3): 1025–1031, doi: 10.1016/0006-291X(92)91834-D.
279. Ames J J, Contois L, Caron J M, et al. (2016). Identification of an Endogenously Generated Cryptic Collagen Epitope (XL313) That May Selectively Regulate Angiogenesis by an Integrin Yes-associated Protein (YAP) Mechano-transduction Pathway. *The Journal of biological chemistry* 291(6): 2731–2750, doi: 10.1074/jbc.M115.669614.
280. Hangai M, Kitaya N, Xu J, et al. (2002). Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *The American journal of pathology* 161(4): 1429–1437, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64418-5.

281. Cretu A, Roth J M, Caunt M, et al. (2007). Disruption of endothelial cell interactions with the novel HU177 cryptic collagen epitope inhibits angiogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(10): 3068–3078, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2342.
282. Colorado P C, Torre A, Kamphaus G, et al. (2000). Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer research* 60(9): 2520–2526. PMID: 10811134.
283. Marneros A G, Olsen B R (2001). The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 20(5-6): 337–345. PMID: 11566268.
284. Schor A M, Schor S L (2010). Angiogenesis and tumour progression: Migration-stimulating factor as a novel target for clinical intervention. *Eye (London, England)* 24(3): 450–458, doi: 10.1038/eye.2009.314.
285. Mazur A, Holthoff E, Vadali S, et al. (2016). Cleavage of Type I Collagen by Fibroblast Activation Protein- $\alpha$  Enhances Class A Scavenger Receptor Mediated Macrophage Adhesion. *PLoS one* 11(3): e0150287, doi: 10.1371/journal.pone.0150287.
286. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature medicine* 9(11): 1370–1376, doi: 10.1038/nm948.
287. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399(6736): 601–605, doi: 10.1038/21224.
288. Abhinand C S, Raju R, Soumya S J, et al. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling* 10(4): 347–354, doi: 10.1007/s12079-016-0352-8.
289. Cross M J, Claesson-Welsh L (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in pharmacological sciences* 22(4): 201–207, doi: 10.1016/S0165-6147(00)01676-X.
290. Strieter R M, Kunkel S L, Elner V M, et al. (1992). Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *The American journal of pathology* 141(6): 1279–1284. PMID: 1281615.
291. Koch A E, Polverini P J, Kunkel S L, et al. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258(5089): 1798–1801. PMID: 1281554.
292. Sun X-T (2005). Differential gene expression during capillary morphogenesis in a microcarrier-based three-dimensional in vitro model of angiogenesis with focus on chemokines and chemokine receptors. *WJG* 11(15): 2283, doi: 10.3748/wjg.v11.i15.2283.
293. Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri J A, et al. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 100(12): 3131–3139, doi: 10.1172/JCI119868.
294. Babaei S (2002). Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovascular Research* 55(1): 190–200, doi: 10.1016/S0008-6363(02)00287-0.
295. Staton C A, Valluru M, Hoh L, et al. (2010). Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 receptor expression in human dermal wound repair and scarring. *The British journal of dermatology* 163(5): 920–927, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09940.x.
296. Bell S E, Mavila A, Salazar R, et al. (2001). Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: Regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *Journal of cell science* 114(Pt 15): 2755–2773. PMID: 11683410.
297. Saito M, Hamasaki M, Shibuya M (2003). Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF. *Cancer Science* 94(9): 782–790, doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01519.x.
298. Hendriks J, Riesle J, van Blitterswijk C A (2007). Co-culture in cartilage tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1(3): 170–178, doi: 10.1002/term.19.
299. Li H, Daculsi R, Grellier M, et al. (2011). The role of vascular actors in two dimensional dialogue of human bone marrow stromal cell and endothelial cell for inducing self-assembled network. *PLoS one* 6(2): e16767, doi: 10.1371/journal.pone.0016767.
300. Santos M I, Unger R E, Sousa R A, et al. (2009). Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials* 30(26): 4407–4415, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.004.
301. DU H, Shi H, Chen D, et al. (2015). Cross-talk between endothelial and tumor cells via basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor signaling promotes lung cancer growth and angiogenesis. *Oncology letters* 9(3): 1089–1094, doi: 10.3892/ol.2015.2881.

302. Stahl A, Wenger A, Weber H, et al. (2004). Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochemical and biophysical research communications* 322(2): 684–692, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.175.
303. Kolbe M, Xiang Z, Dohle E, et al. (2011). Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Tissue engineering. Part A* 17(17-18): 2199–2212, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0474.
304. Martin D, Galisteo R, Gutkind J S (2009). CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *The Journal of biological chemistry* 284(10): 6038–6042, doi: 10.1074/jbc.C800207200.
305. Seghezzi G, Patel S, Ren C J, et al. (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. *J Cell Biol* 141(7): 1659–1673.
306. Stavri G T, Zachary I C, Baskerville P A, et al. (1995). Basic Fibroblast Growth Factor Upregulates the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells: Synergistic Interaction With Hypoxia. *Circulation* 92(1): 11–14, doi: 10.1161/01.CIR.92.1.11.
307. Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, et al. (2011). Enhancement of basic fibroblast growth factor-stimulated VEGF synthesis by Wnt3a in osteoblasts. *Int J Mol Med* 27(6): 859–864, doi: 10.3892/ijmm.2011.644.
308. Felcht M, Luck R, Schering A, et al. (2012). Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *The Journal of clinical investigation* 122(6): 1991–2005, doi: 10.1172/JCI58832.
309. Fujii T, Kuwano H (2010). Regulation of the expression balance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 by Shh and FGF-2. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 46(6): 487–491, doi: 10.1007/s11626-009-9270-x.
310. Kostyk S K, Kourembanas S, Wheeler E L, et al. (1995). Basic fibroblast growth factor increases nitric oxide synthase production in bovine endothelial cells. *The American journal of physiology* 269(5 Pt 2): H1583-9. PMID: 7503252.
311. Kroll J, Waltenberger J (1998). VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochemical and biophysical research communications* 252(3): 743–746.
312. Sieveking D P, Buckle A, Celermajer D S, et al. (2008). Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: Insights from a novel human angiogenesis assay. *Journal of the American College of Cardiology* 51(6): 660–668, doi: 10.1016/j.jacc.2007.09.059.
313. Villaschi S, Nicosia R F (1994). Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model. Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71(2): 291–299. PMID: 7521446.
314. Stamati K, Priestley J V, Mudera V, et al. (2014). Laminin promotes vascular network formation in 3D in vitro collagen scaffolds by regulating VEGF uptake. *Experimental cell research* 327(1): 68–77, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.05.012.
315. Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, et al. (2013). Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nature cell biology* 15(3): 249–260, doi: 10.1038/ncb2679.
316. Liu L, Gao J, Yuan Y, et al. (2013). Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell biology international* 37(6): 551–560, doi: 10.1002/cbin.10097.
317. Berthod F, Germain L, Tremblay N, et al. (2006). Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *Journal of cellular physiology* 207(2): 491–498, doi: 10.1002/jcp.20584.
318. Sorrell J M, Baber M A, Caplan A I (2007). A self-assembled fibroblast-endothelial cell co-culture system that supports in vitro vasculogenesis by both human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells. *Cells, tissues, organs* 186(3): 157–168, doi: 10.1159/000106670.
319. Kenagy R D, Hart C E, Stetler-Stevenson W G, et al. (1997). Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation* 96(10): 3555–3560.
320. Berthod F, Symes J, Tremblay N, et al. (2012). Spontaneous fibroblast-derived pericyte recruitment in a human tissue-engineered angiogenesis model in vitro. *Journal of cellular physiology* 227(5): 2130–2137, doi: 10.1002/jcp.22943.

321. Su S-C, Mendoza E A, Kwak H-I, et al. (2008). Molecular profile of endothelial invasion of three-dimensional collagen matrices: Insights into angiogenic sprout induction in wound healing. *American journal of physiology. Cell physiology* 295(5): C1215-29, doi: 10.1152/ajpcell.00336.2008.
322. Kim I, Moon S O, Kim S H, et al. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 276(10): 7614–7620, doi: 10.1074/jbc.M009705200.
323. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, et al. (1996). Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *The Journal of Immunology* 156(7): 2558–2565.
324. Zittermann S I, Issekutz A C (2006). Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation. *Journal of leukocyte biology* 80(2): 247–257, doi: 10.1189/jlb.1205718.
325. PANG G, COUCH L, BATEY R, et al. (1994). GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ . *Clin Exp Immunol* 96(3): 437–443, doi: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06048.x.
326. Spencer C, Abend S, McHugh K J, et al. (2017). Identification of a synergistic interaction between endothelial cells and retinal pigment epithelium. *Journal of cellular and molecular medicine* 21(10): 2542–2552, doi: 10.1111/jcmm.13175.
327. Kuboki K, Jiang Z Y, Takahara N, et al. (2000). Regulation of Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells and In Vivo: A Specific Vascular Action of Insulin. *Circulation* 101(6): 676–681, doi: 10.1161/01.CIR.101.6.676.
328. Shen C, Lie P, Miao T, et al. (2015). Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Molecular medicine reports* 12(1): 20–30, doi: 10.3892/mmr.2015.3409.
329. Presland R B, Dale B A (2000). Epithelial Structural Proteins of the Skin and Oral Cavity: Function in Health and Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11(4): 383–408, doi: 10.1177/10454411000110040101.
330. Watt F M (1983). Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 81(1 Suppl): 100s-3s. PMID: 6345687.
331. Paz A C, Soleas J, Poon J C H, et al. (2014). Challenges and opportunities for tissue-engineering polarized epithelium. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 20(1): 56–72, doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0144.
332. Vrana N E, Lavalle P, Dokmeci M R, et al. (2013). Engineering functional epithelium for regenerative medicine and in vitro organ models: A review. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 19(6): 529–543, doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0603.
333. Viñuela-Prieto J M, Sánchez-Quevedo M C, Alfonso-Rodríguez C A, et al. (2015). Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. *Journal of periodontal research* 50(5): 658–665, doi: 10.1111/jre.12247.
334. El Ghalbzouri A, Ponc M (2004). Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 12(3): 359–367, doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.012306.x.
335. Smola H, Thiekötter G, Baur M, et al. (1994). Organotypic and epidermal-dermal co-cultures of normal human keratinocytes and dermal cells: Regulation of transforming growth factor  $\alpha$ ,  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 mRNA levels. *Toxicology in Vitro* 8(4): 641–650, doi: 10.1016/0887-2333(94)90034-5.
336. Smola H, Stark H J, Thiekötter G, et al. (1998). Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Experimental cell research* 239(2): 399–410, doi: 10.1006/excr.1997.3910.
337. Izumi K, Takacs G, Terashi H, et al. (1999). Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 57(5): 571–577, doi: 10.1016/S0278-2391(99)90077-0.
338. Boxman I, Löwik C, Aarden L, et al. (1993). Modulation of IL-6 Production of IL-1 Activity by Keratinocyte-Fibroblast Interaction. *Journal of Investigative Dermatology* 101(3): 316–324, doi: 10.1111/1523-1747.ep12365474.
339. McAvoy J W, Chamberlain C G (1989). Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development (Cambridge, England)* 107(2): 221–228.

340. Florin L, Maas-Szabowski N, Werner S, et al. (2005). Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *Journal of cell science* 118(Pt 9): 1981–1989, doi: 10.1242/jcs.02303.
341. Stark H J, Baur M, Breitzkreutz D, et al. (1999). Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 112(5): 681–691, doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00573.x.
342. Fusenig N E (1994). Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation in vitro. *The keratinocyte handbook*: 71–94.
343. Nisticò P, Bissell M J, Radisky D C (2012). Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(2), doi: 10.1101/cshperspect.a011908.
344. Zhang Z, Dong Z, Lauxen I S, et al. (2014). Endothelial cell-secreted EGF induces epithelial to mesenchymal transition and endows head and neck cancer cells with stem-like phenotype. *Cancer research* 74(10): 2869–2881, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2032.
345. Rice A J, Cortes E, Lachowski D, et al. (2017). Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 6(7): e352, doi: 10.1038/oncsis.2017.54.
346. Przybylo J A, Radisky D C (2007). Matrix metalloproteinase-induced epithelial–mesenchymal transition: Tumor progression at Snail's pace. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(6): 1082–1088.
347. Ma D H, Tsai R J, Chu W K, et al. (1999). Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 40(8): 1822–1828. PMID: 10393055.
348. Khurram S A, Bingle L, McCabe B M, et al. (2014). The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 regulate oral cancer cell behaviour. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 43(9): 667–674, doi: 10.1111/jop.12191.
349. Partridge M, Kiguwa S, Luqmani Y, et al. (1996). Expression of bFGF, KGF and FGF receptors on normal oral mucosa and SCC. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 32(2): 76–82, doi: 10.1016/0964-1955(95)00056-9.
350. Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, et al. (2003). Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 303(3): 962–967, doi: 10.1016/S0006-291X(03)00446-7.
351. Kanellis J, Fraser S, Katerelos M, et al. (2000). Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 278(6): F905–F915, doi: 10.1152/ajprenal.2000.278.6.F905.
352. Arima S, Nishiyama K, Ko T, et al. (2011). Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development (Cambridge, England)* 138(21): 4763–4776, doi: 10.1242/dev.068023.
353. Graupera M, Potente M (2013). Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. *Experimental cell research* 319(9): 1348–1355, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.02.021.
354. Gerber H P, McMurtrey A, Kowalski J, et al. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry* 273(46): 30336–30343. PMID: 9804796.
355. Karali E, Bellou S, Stellas D, et al. (2014). VEGF Signals through ATF6 and PERK to promote endothelial cell survival and angiogenesis in the absence of ER stress. *Molecular cell* 54(4): 559–572, doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.022.
356. Ruan G-X, Kazlauskas A (2012). Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *The EMBO journal* 31(7): 1692–1703, doi: 10.1038/emboj.2012.21.
357. Carmeliet P, Lampugnani M G, Moons L, et al. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98(2): 147–157. PMID: 10428027.
358. Roberts O L, Holmes K, Muller J, et al. (2010). ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. *Journal of cell science* 123(19): 3413, doi: 10.1242/jcs.080663.

359. Rössig L, Jadidi A S, Urbich C, et al. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular and cellular biology* 21(16): 5644–5657, doi: 10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001.
360. Wang S, Amato K R, Song W, et al. (2015). Regulation of endothelial cell proliferation and vascular assembly through distinct mTORC2 signaling pathways. *Molecular and cellular biology* 35(7): 1299–1313, doi: 10.1128/MCB.00306-14.
361. Viñals F, Chambard J C, Pouyssegur J (1999). p70 S6 Kinase-mediated Protein Synthesis Is a Critical Step for Vascular Endothelial Cell Proliferation. *The Journal of biological chemistry* 274(38): 26776–26782, doi: 10.1074/jbc.274.38.26776.
362. Chung J, Grammer T C, Lemon K P, et al. (1994). PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370(6484): 71–75, doi: 10.1038/370071a0.
363. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M (1999). VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18(13): 2221–2230, doi: 10.1038/sj.onc.1202527.
364. Wong C, Jin Z-G (2005). Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* 280(39): 33262–33269, doi: 10.1074/jbc.M503198200.
365. Wang S, Li X, Parra M, et al. (2008). Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(22): 7738–7743, doi: 10.1073/pnas.0802857105.
366. Zhao X, Guan J-L (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced drug delivery reviews* 63(8): 610–615, doi: 10.1016/j.addr.2010.11.001.
367. Eliceiri B P, Puente X S, Hood J D, et al. (2002). Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *The Journal of cell biology* 157(1): 149–160, doi: 10.1083/jcb.200109079.
368. Cary L A, Han D C, Polte T R, et al. (1998). Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *The Journal of cell biology* 140(1): 211–221. PMID: 9425168.
369. Romer L H, McLean N, Turner C E, et al. (1994). Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Molecular biology of the cell* 5(3): 349–361. PMID: 8049526.
370. Chou M T, Wang J, Fujita D J (2002). Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells. *BMC Biochem* 3(1): 32, doi: 10.1186/1471-2091-3-32.
371. Holmqvist K, Cross M J, Rolny C, et al. (2004). The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *The Journal of biological chemistry* 279(21): 22267–22275, doi: 10.1074/jbc.M312729200.
372. Holmqvist K, Cross M, Riley D, et al. (2003). The Shb adaptor protein causes Src-dependent cell spreading and activation of focal adhesion kinase in murine brain endothelial cells. *Cellular signalling* 15(2): 171–179. PMID: 12464388.
373. Koch S, Claesson-Welsh L (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(7): a006502, doi: 10.1101/cshperspect.a006502.
374. Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, et al. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *International journal of cell biology* 2012: 310616, doi: 10.1155/2012/310616.
375. Qi J H, Claesson-Welsh L (2001). VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. *Experimental cell research* 263(1): 173–182, doi: 10.1006/excr.2000.5102.
376. Graupera M, Guillermet-Guibert J, Foukas L C, et al. (2008). Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* 453(7195): 662–666, doi: 10.1038/nature06892.
377. Ju L, Zhou Z, Jiang B, et al. (2017). Autocrine VEGF and IL-8 Promote Migration via Src/Nav2/Rac1/PAK1 Signaling in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 41(4): 1346–1359, doi: 10.1159/000465389.
378. Kaur S, Leszczynska K, Abraham S, et al. (2011). RhoJ/TCL regulates endothelial motility and tube formation and modulates actomyosin contractility and focal adhesion numbers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31(3): 657–664, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.216341.

379. Master Z, Jones N, Tran J, et al. (2001). Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *The EMBO journal* 20(21): 5919–5928, doi: 10.1093/emboj/20.21.5919.
380. Bauer H-K (2014). *Diplomarbeit: Wirkung von therapeutischen Tyrosinkinase-Inhibitoren auf das Tumorendothel.*
381. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H (2006). Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nature protocols* 1(4): 2012–2018, doi: 10.1038/nprot.2006.323.
382. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell M B, et al. (2003). Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *The Journal of biological chemistry* 278(10): 8508–8515, doi: 10.1074/jbc.M208231200.
383. Murphy P M, Baggiolini M, Charo I F, et al. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 52(1): 145–176. PMID: 10699158.
384. Waugh D J J, Wilson C (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(21): 6735–6741, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843.
385. Li A, Varney M L, Valasek J, et al. (2005). Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* 8(1): 63–71, doi: 10.1007/s10456-005-5208-4.
386. Schraufstatter I U, Chung J, Burger M (2001). IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 280(6): L1094-103. PMID: 11350788.
387. Luppi F, Longo A M, Boer W I de, et al. (2007). Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 56(1): 25–33, doi: 10.1016/j.lungcan.2006.11.014.
388. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Mestier L de, et al. (2014). MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* 141(2): 160–171, doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.10.001.
389. Lai Y, Shen Y, Liu X-H, et al. (2011). Interleukin-8 Induces the Endothelial Cell Migration through the Activation of Phosphoinositide 3-Kinase-Rac1/RhoA Pathway. *Int J Biol Sci* 7(6): 782–791, doi: 10.7150/ijbs.7.782.
390. Schraufstatter I U, Trieu K, Zhao M, et al. (2003). IL-8-Mediated Cell Migration in Endothelial Cells Depends on Cathepsin B Activity and Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of Immunology* 171(12): 6714–6722, doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6714.
391. Petreaca M L, Yao M, Liu Y, et al. (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(12): 5014–5023, doi: 10.1091/mbc.E07-01-0004.
392. Li A, Dubey S, Varney M L, et al. (2003). IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *The Journal of Immunology* 170(6): 3369–3376, doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3369.
393. Endler A, Chen L, Li Q, et al. (2013). Int6/eIF3e silenced HIF2 $\alpha$  stabilization enhances migration and tube formation of HUVECs via IL-6 and IL-8 signaling. *Cytokine* 62(1): 115–122, doi: 10.1016/j.cyto.2013.01.021.
394. Granato A M, Nanni O, Falcini F, et al. (2004). Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: Useful as diagnostic tools? *Breast cancer research : BCR* 6(1): R38-45, doi: 10.1186/bcr745.
395. Tong B, Lu D, Wei Z, et al. (2013). Gleditsioside B, a triterpene saponin isolated from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis* Lam., abrogates bFGF-induced endothelial cell migration through preventing the activation of MMP-2 and FAK via inhibiting ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *Vascular pharmacology* 58(1): 118–126, doi: 10.1016/j.vph.2012.09.006.
396. Beenken A, Mohammadi M (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 8(3): 235–253, doi: 10.1038/nrd2792.
397. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, et al. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16(2): 233–247, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.007.
398. Guo S, Yu L, Cheng Y, et al. (2012). PDGFR $\beta$  triggered by bFGF promotes the proliferation and migration of endothelial progenitor cells via p-ERK signalling. *Cell biology international* 36(10): 945–950, doi: 10.1042/CBI20110657.

399. Tanaka K, Abe M, Sato Y (1999). Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Japanese journal of cancer research : Gann* 90(6): 647–654. PMID: 10429657.
400. Maffucci T, Raimondi C, Abu-Hayyeh S, et al. (2009). A phosphoinositide 3-kinase/phospholipase Cgamma1 pathway regulates fibroblast growth factor-induced capillary tube formation. *PLoS one* 4(12): e8285, doi: 10.1371/journal.pone.0008285.
401. Jeong A, Lee H-J, Jeong S-J, et al. (2010). Compound K Inhibits Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Angiogenesis via Regulation of p38 Mitogen Activated Protein Kinase and AKT in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biol Pharm Bull* 33(6): 945–950, doi: 10.1248/bpb.33.945.
402. Matsumoto T, Turesson I, Book M, et al. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *The Journal of cell biology* 156(1): 149–160, doi: 10.1083/jcb.200103096.
403. Halaban R, Kwon B S, Ghosh S, et al. (1988). bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene research* 3(2): 177–186.
404. Hu M, Hu Y, He J, et al. (2016). Prognostic Value of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) in Lung Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS one* 11(1): e0147374, doi: 10.1371/journal.pone.0147374.
405. Crickard K, Gross J L, Crickard U, et al. (1994). Basic fibroblast growth factor and receptor expression in human ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 55(2): 277–284, doi: 10.1006/gyno.1994.1290.
406. Shin Y, Jeon J S, Han S, et al. (2011). In vitro 3D collective sprouting angiogenesis under orchestrated ANG-1 and VEGF gradients. *Lab on a chip* 11(13): 2175–2181, doi: 10.1039/c1lc20039a.
407. Chen R R, Silva E A, Yuen W W, et al. (2007). Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation. *Pharmaceutical research* 24(2): 258–264, doi: 10.1007/s11095-006-9173-4.
408. Wenger A, Stahl A, Weber H, et al. (2004). Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue engineering* 10(9-10): 1536–1547, doi: 10.1089/ten.2004.10.1536.
409. Kirkpatrick C J, Fuchs S, Unger R E (2011). Co-culture systems for vascularization--learning from nature. *Advanced drug delivery reviews* 63(4-5): 291–299, doi: 10.1016/j.addr.2011.01.009.
410. Suzuma K, Takagi H, Otani A, et al. (1998). Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 39(6): 1028–1035. PMID: 9579483.
411. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, et al. (2005). Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 16(3): 369–378, doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01108.x.
412. Bach T L, Barsigian C, Chalupowicz D G, et al. (1998). VE-Cadherin Mediates Endothelial Cell Capillary Tube Formation in Fibrin and Collagen Gels. *Experimental cell research* 238(2): 324–334, doi: 10.1006/excr.1997.3844.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	EPC	<i>Endothelial progenitor cells</i>
°C	Grad Celcius	ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
µg	Mikrogramm	et al.	et alia, und andere
µl	Mikroliter	EtOH	Ethanol
µm	Mikrometer	EZM	Extrazelluläre Matrix
abs.	absolut	FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Adipo	Adiponectin	FAK	Fokale Adhäsionskinase
AKT	AKT Kinase	FAK	focal adhesion kinase
Ang	Angiopoietin	FCS	Fetales Kälberserum
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>	FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>	FIH1	<i>Factor inhibiting HIF 1</i>
b-NGF	<i>beta-nerve growth factor</i>	FRS2	<i>FGFR substrate 2</i>
BrdU	5-Brom-2' desoxyuridin	G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin	GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
bzw.	beziehungsweise	Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
ca.	circa	h	Stunde
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid Dihydrat	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Calcein-AM	Calcein- Acetoxymethylester	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
CAM	Chorioallantoismembran	HCl	Salzsäure
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	HDAC	Histondeacetylase
CLS	<i>Capillary-like Structures</i>	HDMEC	<i>Human microvascular endothelial cells</i>
cm	Zentimeter	HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
CXC	Cystein-Aminosäure X-Cystein	HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
CXCL8	CXC-Motiv-Ligand 8	HIF PH2	HIF Prolyl-Hydroxylase 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
Dll4	<i>Delta like ligand 4</i>	i.p.	intraperitoneal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecule</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	IFN	Interferon
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
DPBS	<i>Dulbeccos's Phosphat Buffered Saline</i>	IHC	Immunhistochemie
EC	Endothelzellen	IL	Interleukin
ECFC	<i>Endothelial Colony-forming cells</i>	IP10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	KCl	Kaliumchlorid
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>		
ELISA	<i>Enzym-linked immunosorbent assay</i>		
ELR	Glu-Leu-Arg-Aminosäure-Motiv		
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition		
eNOS	endotheliale NO Synthase		

I	Liter		triphosphat
LSAB+	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin	PKB	Proteinkinase B
MACS	Magnetic activated cell sorting	PKC	Proteinkinase C
MALT	mucosa associated lymphoid tissue	PKD	Proteinkinase D
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	PLC	Phospholipase C
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase	PIGF	Placenta growth factor
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	PMBC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein-1	R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß, Determinationskoeffizient
MEK	MAP-ERK-Kinase	Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
min	Minute	Ras	Rat sarcoma
MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1	rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter	RT	Raumtemperatur
mm	Millimeter	RTK	Rezeptortyrosinkinase
MMP	Matrixmetalloproteasen	SCF	Stem Cell Factor
mTORC	mechanistic target of rapamycin complex	SD	Standard deviation, Standardabweichung
MTT	3,(4,5-Dimethyl-thiazol-2 yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid	SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
NaCl	Natriumchlorid	SH2	src-homology-2
Na-Heparin	Natrium-Heparin	SHB	SH2 domain-containing adaptor protein B
NaOH	Natronlauge	SMA	smooth muscle actin
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells	SOS	sons of sevenless
ng	Nanogramm	SRC	sarcoma
NGF	nerve growth factor	STAT	signal transducers and activators of transcription
nm	Nanometer	TARC	Translational Animal Research Center
NO	Stickstoffmonoxid	TGF	Transforming Growth Factor
OD	Optische Dichte	TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
ODD	Oxygen-dependent degradation	TNF	Tumornekrosefaktor
p.a.	pro analysi, zur Analyse	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
P/S	Penicillin/Streptomycin	Tyr	Tyrosin
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	u.a.	unter anderem
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	ün	über Nacht
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor subunit B	VCAM	vascular cell adhesion molecule 1
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor	VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
PKD	Phosphoinositide-dependent kinase	VEGF	vascular endothelial growth factor
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyd	VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
pg	Pikogramm	vHDMC	HDMC aus Vulvahaut
PH	Pleckstrin-Homologie	VHL	Von Hippel-Lindau
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	vWF	von Willebrand Faktor
PIGF-1	Placental-growth factor-1	α	alpha
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat	β	beta
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidyl-inositol-(3,4,5)-		

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Aufbau nativer humaner Mundschleimhaut.....	7
Abbildung 2 - Schematische Anatomie von Blutgefäßen .....	15
Abbildung 3 - Differenzierungsschritte während der embryonalen Vaskulogenese .....	16
Abbildung 4 - Vereinfachte Darstellung des Dll4-Notch/VEGF-VEGFR-Feedback-Loop zur Determination des Tip- bzw. Stalk-Zell-Phänotyps .....	20
Abbildung 5 - Mundschleimhaut-Probe mit visuell gut differenzierbaren Geweben.....	41
Abbildung 6 - Markierung der Bio-Gide®-Membranen für die Besiedlung als Schleimhaut-Äquivalent zur Identifikation der Seiten .....	46
Abbildung 7 - Exemplarische Darstellung enzymatisch behandelter Mundschleimhaut-Proben.....	64
Abbildung 8 - Exemplarische Darstellung einer Mundschleimhaut-Probe, die dem rein mechanischen Isolationsprotokoll (5) unterzogen wurde .....	65
Abbildung 9 - Exemplarische Darstellung von Mundschleimhaut-Proben, die dem rein mechanischen Isolationsprotokoll (5) unterzogen und in optimiertem FAD-Medium II kultiviert wurden.....	66
Abbildung 10 - Immunhistochemische Analyse verschiedener epithelialer Marker zur Charakterisierung der isolierten Zellen .....	67
Abbildung 11 - Immunhistochemische Analyse fibroblastärer Marker zur Charakterisierung der isolierten Zellen.....	68
Abbildung 12 - Exemplarische Darstellung der Isolation und Charakterisierung von aus Mundschleimhaut isolierten Fibroblasten.....	68
Abbildung 13 - Immunhistochemische Analyse fibroblastärer, epithelialer und endothelialer Marker zur Charakterisierung der isolierten Zellen .....	69
Abbildung 14 - Charakteristische Wuchsform von Endothelzellen in Monokultur.....	70
Abbildung 15 - Immunhistochemische Analyse verschiedener zellulärer Marker, um die aus Präputium isolierten Zellen zu charakterisieren.....	71
Abbildung 16 - Immunhistochemische Analyse verschiedener zellulärer Marker, um die aus peripherem Blut isolierten Zellen zu charakterisieren.....	72
Abbildung 17 - Immunhistochemische Analyse verschiedener zellulärer Marker, um die aus peripherem Blut isolierten Zellen zu charakterisieren.....	73
Abbildung 18 - Exemplarische Darstellung der Prävaskularisierung in Schleimhaut-Äquivalenten, die in unterschiedlichen Reihenfolgen mit Zellen besiedelt wurden .....	75
Abbildung 19 - Exemplarische Darstellung einer Epithelschicht auf trikultivierten Schleimhaut-Äquivalenten.....	76
Abbildung 20 - Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse epithelialer Marker eines in Trikultur zuerst mit Epithelzellen, anschließend mit HDMEC besiedelten Schleimhaut-Äquivalents .....	77
Abbildung 21 - Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse epithelialer Marker eines in Trikultur zuerst mit HDMEC, anschließend mit Epithelzellen besiedelten Schleimhaut-Äquivalents .....	78
Abbildung 22 - Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse der endothelialen Marker CD31 und vWF sowie Tenascin als indirekten Fibroblasten-Nachweis eines in Trikultur zuerst mit Epithelzellen, anschließend mit HDMEC besiedelten Schleimhaut-Äquivalents.....	79
Abbildung 23 - Exemplarische Darstellung der Bildung gefäßähnlicher Strukturen in trikultivierten Schleimhaut-Äquivalenten.....	80

Abbildung 24 - Bio-Gide®-Membran, die mittels Kapillarkräfte durch Reinziehen der Zellsuspension trocken besiedelt wurde .....	81
Abbildung 25 - Bio-Gide®-Membranen, die mittels Kapillarkräfte durch Reinziehen der HDMEC-Zellsuspension trocken besiedelt wurden .....	82
Abbildung 26 - Bio-Gide®-Membran, die mittels Zentrifugation der HDMEC-Zellsuspension besiedelt wurde	83
Abbildung 27 - Bio-Gide®-Membranen, die mit magnetisch markierten Endothelzellen durch Inkubation auf einem Magneten besiedelt wurde .....	83
Abbildung 28 - Bio-Gide®-Membran, die durch Injizieren mit Endothelzellen besiedelt wurde, nach 4 h Kultivierung .....	84
Abbildung 29 - Bio-Gide®-Membranen, die durch Injizieren mit Endothelzellen besiedelt wurden nach 21-tägiger Kultivierung .....	85
Abbildung 30 - Vitalität und Proliferation von HDMEC unter Kultivierung in verschiedenen Medien .....	86
Abbildung 31 - Vitalität und Proliferation von Epithelzellen unter Kultivierung in verschiedenen Medien .....	87
Abbildung 32 - Exemplarische Darstellung von in verschiedenen Medien kultivierten Schleimhaut-Äquivalenten.....	88
Abbildung 33 - Immunhistochemische Färbung von Zytokeratin 19 an Epithelzellen .....	89
Abbildung 34 - Kokultiviertes Schleimhaut-Äquivalent mit Endothelzellen und Fibroblasten aus Brusthaut.....	89
Abbildung 35 - Mit endothelialen Progenitorzellen in Ko- bzw. Trikultur besiedelte Schleimhaut-Äquivalente ...	90
Abbildung 36 - Veränderung der Sekretion verschiedener pro-angiogener Wachstumsfaktoren während der 21-tägigen Kokultivierung .....	91
Abbildung 37 - Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung .....	93
Abbildung 38 - Sekretion von VEGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung.....	94
Abbildung 39 - Sekretion von VEGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung .....	95
Abbildung 40- Sekretion von VEGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung .....	96
Abbildung 41 - Sekretion von VEGF durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt .....	97
Abbildung 42 - Sekretion von VEGF durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen ohne interzellulären Kontakt .....	97
Abbildung 43 - Sekretion von VEGF durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt .....	98
Abbildung 44 - Sekretion von VEGF durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt .....	99
Abbildung 45 - Sekretion von VEGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung .....	100
Abbildung 46 - Sekretion von VEGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung .....	101
Abbildung 47 - Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung .....	102

Abbildung 48 - Sekretion von IL-8 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung .....	103
Abbildung 49 - Sekretion von IL-8 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.....	104
Abbildung 50 - Sekretion von IL-8 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung .....	105
Abbildung 51 - Sekretion von IL-8 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung.....	106
Abbildung 52 - Sekretion von IL-8 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung .....	107
Abbildung 53 - Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.....	108
Abbildung 54 - Sekretion von bFGF in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung .....	109
Abbildung 55 - Sekretion von bFGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.....	110
Abbildung 56 - Sekretion von bFGF in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung .....	111
Abbildung 57 - Sekretion von bFGF durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen ohne interzellulären Kontakt.....	112
Abbildung 58 - Sekretion von bFGF durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt .....	113
Abbildung 59 - Sekretion von bFGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung .....	114
Abbildung 60 - Sekretion von bFGF in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung.....	115
Abbildung 61 - Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.....	116
Abbildung 62 - Sekretion von eNOS in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung .....	117
Abbildung 63 - Sekretion von eNOS in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung.....	118
Abbildung 64 - Sekretion von eNOS in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung .....	119
Abbildung 65- Sekretion von eNOS durch Fibroblasten in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen ohne interzellulären Kontakt.....	120
Abbildung 66 - Sekretion von eNOS durch HDMEC in Monokultur in Wells bzw. Kokulturen mit und ohne interzellulären Kontakt .....	121
Abbildung 67 - Sekretion von eNOS in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung .....	122
Abbildung 68 - Sekretion von eNOS in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung.....	123
Abbildung 69 - Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über die ersten 48 h der Kultivierung.....	124

Abbildung 70 - Sekretion von Ang-2 in Monokulturen von Fibroblasten bzw. HDMEC auf Bio-Gide® Membranen bzw. in Wells über 21 Tage Kultivierung .....	125
Abbildung 71 - Sekretion von Ang-2 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über die ersten 48 h der Kultivierung .....	126
Abbildung 72 - Sekretion von Ang-2 in Mono- sowie Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC auf Bio-Gide® Membranen über 21 Tage Kultivierung .....	127
Abbildung 77 - Sekretion von Ang-2 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über die ersten 48 h der Kultivierung .....	131
Abbildung 78 - Sekretion von Ang-2 in Kokulturen von Fibroblasten und HDMEC mit sowie ohne interzellulären Kontakt über 21 Tage Kultivierung .....	132
Abbildung 79 - Vitalität von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen über 24 h....	133
Abbildung 80 - Vitalität von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen IL-8-Konzentrationen über 24 h .....	134
Abbildung 81 - Vitalität von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen bFGF-Konzentrationen über 24 h....	134
Abbildung 82 - Proliferation von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen über 24 h.....	135
Abbildung 83 - Proliferation von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen IL-8-Konzentrationen über 24 h.....	136
Abbildung 84 - Proliferation von HDMEC unter Behandlung mit verschiedenen bFGF-Konzentrationen über 24 h.....	137
Abbildung 85 - Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung verschiedener VEGF-Konzentrationen über 16 h.....	138
Abbildung 86 - Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung verschiedener IL-8-Konzentrationen über 16 h.....	139
Abbildung 87 - Chemotaktische Migration von HDMEC in Richtung verschiedener bFGF-Konzentrationen über 16 h.....	140
Abbildung 88 - Auswirkungen von VEGF auf die angiogenen Parameter von HDMEC <i>in vitro</i> .....	142
Abbildung 89 - Auswirkungen von IL-8 auf die angiogenen Parameter von HDMEC <i>in vitro</i> .....	142
Abbildung 90 - Auswirkungen von bFGF auf die angiogenen Parameter von HDMEC <i>in vitro</i> .....	143
Abbildung 91- Analyse der Auswirkungen von VEGF und IL-8 auf die Bildung gefäßähnlicher Strukturen im Schleimhaut-Äquivalent .....	145
Abbildung 92 - Immunhistochemischer Nachweis von Tenascin im Maus-Präparat.....	146
Abbildung 93 - Immunhistochemische Färbung von CD31 mittels human-spezifischem CD31-Antikörper im Maus-Präparat .....	147
Abbildung 94 - Immunhistochemische Färbung von CD31 zum Nachweis gefäßähnlicher Strukturen tief in der Bio-Gide® Membran im Maus-Präparat .....	148
Abbildung 95 - Immunhistochemische Färbung von CD31 sowie HE-Färbung zwei paralleler Schnitte zur Analyse der Anastomose an das murine Blutgefäßsystem nach 5 Tagen .....	148
Abbildung 96 - Immunhistochemische Färbung von CD31 sowie HE-Färbung zwei paralleler Schnitte zur Analyse der Anastomose an das murine Blutgefäßsystem nach 10 Tagen.....	149
Abbildung 97 - Immunhistochemische Färbung von CD31 sowie HE-Färbung zwei paralleler Schnitte zur Analyse der Anastomose an das murine Blutgefäßsystem nach 10 Tagen.....	150

Abbildung 98- Immunhistochemische Analyse zur Analyse der Epithelialisierung der Schleimhaut-Äquivalente nach 5 Tagen auf der CAM.....152

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Auflistung der eingesetzten primären Antikörper.....32

Tabelle 2 - Auflistung der eingesetzten sekundären Antikörper.....33

Tabelle 3 - Zellkulturflaschen und -platten mit entsprechendem Medium, PBS-Wasch- und Trypsin -Volumen .....44

Tabelle 4 - Zellzahl der verschiedenen eingesetzten Zelltypen für Besiedlung auf Bio-Gide®-Membranen.....47

Tabelle 5 - Einbettprogramm des Tissue-Tek VIP Einbettautomaten.....49

Tabelle 6 - Besiedlungsansätze zur Überstandsentnahme.....53

Tabelle 7 - Wachstumsfaktoren und Zytokine, die mittels des Human Cytokine ELISA analysiert wurden .....54

Tabelle 8 - Variationen in der Konzentration der Medienzusätze im FAD-Medium und ihre Auswirkungen auf das Auswuchsverhalten von Epithelzellen aus Mundschleimhaut-Biopsien .....66

Tabelle 9 - Analyse der Zytokin-Sekretion im Schleimhaut-Äquivalent. ....167

### 6.4 Werte der Abbildungen

Werte der Abbildung 30

HDMEC						
		1	2	3	Mittelwert	SD
VITALITÄT	100% HDMEC-Medium	100	100,00000	100,00000	100	
	75% HDMEC, 25% CnT-Prime	90,0439239	107,64422	106,93474	101,540961	8,13479126
	50% HDMEC, 50% CnT-Prime	86,8228404	103,38929	109,44372	99,8852816	9,56153955
	25% HDMEC, 75% CnT-Prime	82,8696925	95,64952	101,76048	93,4265645	7,87068971
	100% CnT-Prime	81,9912152	90,50522	71,98939	81,4952732	7,56718776
	75% HDMEC, 25% FAD-Medium	82,4304539	115,60750	114,11871	104,052223	15,3009763
	50% HDMEC, 50% FAD-Medium	78,0380673	125,79594	107,53280	103,788937	19,6759761
	25% HDMEC, 75% FAD-Medium	70,4245974	118,47175	110,86829	99,9215463	21,0872097
	100% FAD-Medium	76,7203514	104,98337	100,96078	94,2215019	12,4836693
	75% CnT-Prime, 25% FAD-Medium	46,4128843	117,57068	99,54498	87,8428491	30,2055504
	50% CnT-Prime, 50% FAD-Medium	43,3382138	108,62094	100,39898	84,1193779	29,0313353
	25% CnT-Prime, 75% FAD-Medium	43,045388	120,66625	95,53623	86,4159555	32,3381517
PROLIFERATION		1	2	3	Mittelwert	SD
	100% HDMEC-Medium	100	100	100	100	
	75% HDMEC, 25% CnT-Prime	95,0495959	127,29832	147,083343	123,143753	21,4448602
	50% HDMEC, 50% CnT-Prime	80,0055107	174,497842	177,697818	144,067057	45,3171875
	25% HDMEC, 75% CnT-Prime	69,140338	114,106488	188,585672	123,944166	49,2570259
	100% CnT-Prime	24,6693608	90,0784798	141,184497	85,3107793	47,6864236
	75% HDMEC, 25% FAD-Medium	97,1436444	141,737006	201,081146	146,653932	42,5745087
	50% HDMEC, 50% FAD-Medium	93,9107274	183,928182	147,89941	141,912773	36,9924803
	25% HDMEC, 75% FAD-Medium	79,0962528	147,08004	136,096676	120,757656	29,7983553
	100% FAD-Medium	98,264144	96,8562998	39,6465436	78,2556625	27,3068191
	75% CnT-Prime, 25% FAD-Medium	39,5113887	109,647545	107,164217	85,4410503	32,4929951
	50% CnT-Prime, 50% FAD-Medium	28,8023512	139,914372	137,778866	102,165196	51,8826906
25% CnT-Prime, 75% FAD-Medium	25,2847171	150,910909	155,712769	110,636132	60,3843932	

Werte der Abbildung 31

Epithelzellen						
		1	2	3	Mittelwert	SD
VITALITÄT	100% HDMEC-Medium	83,3349337	78,67033	84,35706	82,1207733	2,47526135
	75% HDMEC, 25% CnT-Prime	82,4654241	83,45930	90,09467	85,3397969	3,38659662
	50% HDMEC, 50% CnT-Prime	95,4646771	79,23692	87,87982	87,5271411	6,62964437
	25% HDMEC, 75% CnT-Prime	89,444555	78,90483	89,19599	85,8484554	4,91093585
	100% CnT-Prime	131,199075	99,57663	96,25241	109,009371	15,7490702
	75% HDMEC, 25% FAD-Medium	100,610733	80,44503	94,93047	91,9954103	8,49018399
	50% HDMEC, 50% FAD-Medium	95,2589529	84,40227	99,07713	92,9127839	6,21644265
	25% HDMEC, 75% FAD-Medium	97,2868237	89,04230	99,74257	95,3572325	4,57649538
	100% FAD-Medium	100	100,00000	100,00000	100	0
	75% CnT-Prime, 25% FAD-Medium	106,39555	96,89057	86,18828	96,4914679	8,25440822
	50% CnT-Prime, 50% FAD-Medium	110,256702	79,77327	86,78091	92,2702948	13,0361005
	25% CnT-Prime, 75% FAD-Medium	118,56178	80,20119	93,53230	97,4317573	15,9015308
PROLIFERATION		1	2	3	Mittelwert	SD
	100% HDMEC-Medium	57,0325901	93,0389314	78,1725479	76,0813565	14,7737146
	75% HDMEC, 25% CnT-Prime	91,9382504	109,403477	79,6292947	93,6570075	12,2158663
	50% HDMEC, 50% CnT-Prime	78,4734134	117,672719	85,3247038	93,8236121	17,094248
	25% HDMEC, 75% CnT-Prime	165,866209	108,653197	118,443342	130,987583	24,984671
	100% CnT-Prime	210,977702	128,168258	156,445757	165,197239	34,3685158
	75% HDMEC, 25% FAD-Medium	54,4596913	96,9222227	89,2578727	80,2132622	18,4773804
	50% HDMEC, 50% FAD-Medium	93,9108062	104,288879	82,0586376	93,419441	9,08210666
	25% HDMEC, 75% FAD-Medium	44,8542024	99,5412345	80,2360953	74,8771774	22,6451815
	100% FAD-Medium	100	100	100	100	0
	75% CnT-Prime, 25% FAD-Medium	101,02916	100,347676	130,206283	110,527706	13,9176362
	50% CnT-Prime, 50% FAD-Medium	113,29331	81,788632	144,282704	113,121549	25,5133872
25% CnT-Prime, 75% FAD-Medium	131,475129	100,844156	160,816865	131,045383	24,4856417	

Werte der Abbildung 36

Cytokine	I 3d	I 21d	I [%]	II 3d	II 21d	II [%]	III 3d	III 21d	III [%]	Mittelwert	SD	SEM	T-Test
<b>Adipo</b>	5,42412	8,7984	162,2088	16,0125	3,1787	19,8514	5,6945	5,6525	99,2624	93,7742	58,2466	33,6287	0,4565
<b>b-NGF</b>	0,102024	0,11349	111,2385	0,1029	0,20475	198,9796	0,14105	0,1414	100,2481	136,8221	44,1804	25,5076	0,2739
<b>EGF</b>	0,155142	0,096408	62,1418	0,12565	0,4032	320,8914	0,16835	0,1071	63,6175	148,8835	121,6294	70,2228	0,6315
<b>Eotaxin-3</b>	0,113022	0,170118	150,5176	0,2555	0,97685	382,3288	0,2737	0,3355	121,8670	218,2378	116,6179	67,3294	0,3287
<b>FGFb</b>	0,177606	0,12051	67,8524	0,18235	0,20055	109,9808	0,1771	0,6447	364,0316	180,6216	130,8259	75,5324	0,4303
<b>G-CSF</b>	0,14859	0,206388	138,8976	0,1218	0,3731	306,3218	0,09345	0,08505	91,0112	178,7436	92,3054	53,2926	0,3037
<b>GM-CSF</b>	0,17316	0,103194	59,5946	0,15225	0,54215	356,0920	0,1225	0,1722	140,5714	185,4193	125,1297	72,2437	0,4195
<b>IFNγ</b>	0,142272	0,117	82,2368	0,10535	0,78365	743,8538	0,1015	0,1694	166,8966	330,9957	293,9735	169,7257	0,3251
<b>IGF-1</b>	0,123786	0,255294	206,2382	0,1946	0,27615	141,9065	0,19635	0,3486	177,5401	175,2283	26,3141	15,1925	0,0302
<b>IL-10</b>	0,46332	0,481572	103,9394	0,8498	0,3906	45,9638	0,55965	0,7112	127,0794	92,3275	34,1181	19,6981	0,5559
<b>IL-12</b>	0,192816	0,179712	93,2039	0,3073	0,4431	144,1913	0,3325	1,13995	342,8421	193,4124	107,6935	62,1769	0,3447
<b>IL-13</b>	0,116532	0,076518	65,6627	0,1841	0,2604	141,4449	0,2247	0,2128	94,7040	100,6039	31,2180	18,0237	0,9043
<b>IL-17a</b>	0,080262	0,076284	95,0437	0,12705	1,16655	918,1818	0,2261	0,73815	326,4706	446,5654	346,6085	200,1145	0,1823
<b>IL-1a</b>	0,20709	0,084942	41,0169	0,6293	0,57995	92,1580	0,2681	0,1617	60,3133	64,4961	21,0867	12,1744	0,6711
<b>IL-2</b>	0,208962	0,401076	191,9373	0,3626	0,40705	112,2587	0,27895	4,4905	1609,7867	637,9942	687,9305	397,1769	0,3378
<b>IL-4</b>	0,128466	0,193284	150,4554	0,20545	0,7483	364,2249	0,31675	0,6867	216,7956	243,8253	89,3394	51,5801	0,1512
<b>IL-6</b>	0,12519	0,146016	116,6355	0,1155	0,2954	255,7576	0,12215	0,0994	81,3754	151,2561	75,2827	43,4645	0,3729
<b>IL-8</b>	0,251082	3,53574	1408,2013	0,3773	1,3468	356,9573	0,4242	2,3002	542,2442	769,1343	458,1759	264,5280	0,0325
<b>IP-10</b>	0,120744	0,102024	84,4961	0,07595	0,5446	717,0507	0,14945	0,2289	153,1616	318,2361	283,3943	163,6178	0,2562
<b>Leptin</b>	0,156078	0,190944	122,3388	0,29015	0,1386	47,7684	0,09835	1,1781	1197,8648	455,9907	525,4668	303,3784	0,4021
<b>MCP-1</b>	0,309348	0,413712	133,7368	0,20615	0,79695	386,5874	0,3892	0,79835	205,1259	241,8167	106,4363	61,4510	0,0565
<b>MIP-1a</b>	0,1287	0,227916	177,0909	0,1309	0,27195	207,7540	0,3031	0,60795	200,5774	195,1408	13,0951	7,5605	0,2442
<b>PAI-1</b>	0,12285	0,139932	113,9048	0,17955	0,33005	183,8207	0,3962	0,44835	113,1625	136,9627	33,1350	19,1305	0,5821
<b>PDGF-BB</b>	0,102258	0,098046	95,8810	0,14	0,3486	249,0000	0,27825	0,259	93,0818	145,9876	72,8497	42,0598	0,5338
<b>PIGF-1</b>	0,15093	0,272142	180,3101	0,1897	0,34265	180,6273	0,476	0,4858	102,0588	154,3321	36,9630	21,3406	0,4752
<b>Rantes</b>	0,207558	0,16731	80,6088	0,1519	2,156	1419,3548	0,50925	0,7574	148,7285	549,5641	615,6634	355,4534	0,2865
<b>Resistin</b>	0,101088	0,153036	151,3889	0,1554	0,3248	209,0090	0,32025	0,3185	99,4536	153,2838	44,7459	25,8341	0,4457
<b>SCF</b>	0,150462	0,137124	91,1353	0,3458	0,41965	121,3563	0,29785	0,6118	205,4054	139,2990	48,3451	27,9120	0,4517
<b>TGF-β</b>	1,174212	1,55493	132,4233	2,5095	1,0402	41,4505	1,17425	1,58165	134,6945	102,8561	43,4302	25,0744	0,6600
<b>TNFa</b>	0,49374	0,37089	75,1185	0,76615	1,3195	172,2248	0,588	0,6489	110,3571	119,2335	40,1373	23,1733	0,6055
<b>VEGF</b>	0,079092	0,182052	230,1775	0,13195	0,48125	364,7215	0,2814	1,2803	454,9751	349,9580	92,3651	53,3270	0,2204

Werte der Abbildung 37, Abbildung 40, Abbildung 41, Abbildung 42, Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 45 und Abbildung 46

VEGF ELISA [pg/ml]	Kokultur Membran	Monokultur Fibroblasten (Membran)	Monokultur Fibroblasten (Well)	Monokultur HDMEC (Membran)	Monokultur HDMEC (Well)	Kokultur im Insert ohne Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur im Insert mit Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert mit Kontakt Fibroblasten	
MITTELWERT	1h	70,2042502	-5,270750572	-105,396884	-232,3287233	-213,6002394	-174,5037726	-211,9633731	190,9446422	-92,09510794
	2h	302,222506	806,828017	505,5254171	-24,64937308	285,4422476	7,75289897	-150,4744547	4,37280338	143,9820399
	4h	527,960969	1097,727627	289,593827	216,925227	-7,059197828	45,55279636	455,2952823	148,9085138	320,7450825
	6h	817,167056	2073,268805	747,17399	437,1281127	332,0250663	368,5760023	818,4035599	410,1308078	627,8738096
	8h	1119,10385	2180,480062	1000,640749	730,1030417	398,9358694	652,4539931	948,8408288	656,532015	751,9294706
	12h	970,230099	2165,309217	1021,746573	795,3972109	678,6301543	676,689678	1010,007525	869,0575684	809,8168427
	24h	1112,93357	2971,782793	1281,898364	854,4362924	707,5715407	895,4176707	892,0823989	880,2042847	853,2461691
	48h	1746,94551	2653,198405	1425,105939	937,8263183	754,8597258	916,3250173	1133,090189	915,0892403	978,5733076
	3d	675,683611	509,9438202	210,4490298	44,91391231	72,36130979	24,32033016	18,11332761		
	7d	577,766336	552,2500629	308,6277056	77,48873816	74,74603951	60,09513564	246,7435705		
	11d	827,761344	626,381093	575,5932715	257,3167118	85,22184723	83,72847113	833,6438395		
	15d	1048,38374	956,3269409	738,6312365	117,5022916	78,75612889	114,2601525	1252,261726		
	19d	1441,13484	1257,659797	840,6470925	111,7505831	81,87019015	257,6347351	432,6145635		
	21d	1182,69768	834,4192728	488,6410893	95,21476995	61,39204944	453,1711322	377,3530532		
SD	1h	1075,55254	846,0350575	716,400838	637,5173286	491,241322	549,2647904	570,1411649	1005,926849	632,1747099
	2h	999,924751	1249,455799	1355,062557	657,452942	1093,284651	706,7919873	401,582553	551,1486689	637,7093539
	4h	419,310428	210,7355672	643,8813976	645,7449954	533,6346566	392,4427415	623,9748746	558,9016074	609,5869499
	6h	521,598089	433,9871875	410,9180524	904,7806888	664,8128262	698,5792631	511,0828176	713,3993099	910,3365059
	8h	997,191051	918,791387	883,7678552	1481,260649	898,4374671	1310,611985	797,6839723	1140,32813	1142,071953
	12h	1751,39493	1169,010018	1233,742468	1526,937255	1304,684381	1368,867333	1507,151241	1634,260365	1494,90286
	24h	1763,18615	2119,644793	1219,008939	1721,333367	1374,407613	1850,960369	1468,437504	1715,952861	1586,196087
	48h	2117,24135	1865,126215	1596,047261	2000,960113	1702,066618	1930,727876	1900,756152	1903,596139	1619,300905
	3d	776,109938	571,7913772	121,1991138	51,91234815	29,55305475	60,79059564	135,337004		
	7d	587,912101	514,5117494	104,7435436	163,6255312	24,08506188	41,39799038	151,4802643		
	11d	720,517177	421,0746477	349,6744257	388,9101815	27,76257515	62,55449487	817,5941322		
	15d	1034,25383	841,5858144	414,8239051	220,9617121	32,80015654	75,11900947	1185,869811		
	19d	1184,73315	615,8713573	678,9062618	176,4884775	27,66968987	210,8411918	343,9931906		
	21d	1298,72689	594,5936129	426,8027438	92,22651623	34,74774853	333,8083029	356,5820722		
SEM	1h	620,97055	488,4585682	413,6142167	368,0708013	283,6183095	317,1181746	329,171155	580,7721372	364,986239
	2h	577,306824	721,3736421	782,3457321	379,580633	631,2081874	408,0665441	231,8537951	318,2058324	368,1816672
	4h	242,088989	121,6682364	371,7450982	372,8210469	308,0941127	226,5769224	360,2520618	322,6819935	351,9451896
	6h	301,144797	250,5626195	237,2436481	522,3753742	383,8298642	403,3249256	295,0738023	411,8812836	525,5830267
	8h	575,728522	530,4644546	510,2436091	855,2062342	158,7131135	756,6821821	460,5430561	658,3687526	659,3755492
	12h	1011,16834	674,9282486	712,3015458	881,5776354	753,2598786	790,3159231	870,1541747	943,5406618	863,0825688
	24h	1017,976	1223,777492	703,7951392	993,8122826	793,5146056	1068,652467	847,8027884	990,7058465	915,7907379
	48h	1222,38987	1076,831122	921,4783159	1155,25486	982,68862	1114,706259	1097,402076	1099,041743	934,9038133
	3d	293,341984	216,1168266	54,20189148	19,62102331	11,17000477	30,39529782	67,66850201		
	7d	222,209888	194,4671622	46,84273673	61,84463769	9,103297722	20,69899519	75,74013217		
	11d	272,329895	159,1512573	156,3791572	146,9942318	10,49326709	31,27724744	408,7970661		
	15d	390,911203	318,0895388	185,5148901	83,51567708	12,39729388	37,55950473	592,9349053		
	19d	447,787039	232,777493	303,6161103	66,7063744	10,45815975	105,4205959	171,9965953		
	21d	490,872624	224,7352615	190,8719896	34,85834661	13,13341446	166,9041514	178,2910361		

Werte der Abbildung 47, Abbildung 48, Abbildung 49, Abbildung 50, Abbildung 51 und Abbildung 52

IL-8 ELISA [pg/ml]	Kokultur Membran	Monokultur Fibroblasten (Membran)	Monokultur Fibroblasten (Well)	Monokultur HDMEC (Membran)	Monokultur HDMEC (Well)	Kokultur im Insert ohne Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur im Insert mit Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert mit Kontakt Fibroblasten	
MITTELWERT	1h	705,333	610,449	197,610	15,085	7,249	-21,163	125,325	19,245	126,817
	2h	1523,918	1021,479	458,597	3,286	32,387	35,212	531,170	37,206	295,303
	4h	1829,160	1401,684	1352,093	162,746	23,969	46,185	1144,167	83,798	921,504
	6h	2118,514	1585,395	1384,879	431,124	26,632	131,365	1213,774	197,168	1248,421
	8h	2483,954	1526,992	1603,281	723,076	127,180	246,302	571,200	322,551	1201,961
	12h	2525,715	2003,133	1838,060	1255,348	499,643	726,082	1931,730	620,549	1478,697
	24h	3034,747	2382,360	2145,124	1257,480	905,666	1048,060	1760,006	978,255	1557,286
	48h	3182,236	1922,680	2199,983	1909,668	1053,780	1525,869	2321,058	1850,916	2430,682
	3d	756,623	708,070	432,439	62,423	142,846	253,005	462,305		
	7d	966,482	755,973	637,061	115,270	225,275	280,977	280,722		
	11d	1114,496	1119,006	551,848	280,745	294,837	1162,229	428,691		
	15d	962,512	1073,859	627,508	270,823	509,911	771,888	802,626		
19d	1013,599	1313,129	872,755	193,004	558,150	841,941	1019,096			
21d	1103,019	1398,886	860,426	420,431	842,350	625,923	853,116			
SD	1h	655,125	434,999	316,074	61,293	77,465	52,300	177,966	54,964	180,003
	2h	1520,368	787,796	626,794	45,699	65,777	64,027	668,707	72,190	229,758
	4h	1323,627	684,846	1532,889	155,581	63,065	68,419	1284,707	20,049	793,248
	6h	1817,090	694,871	1271,219	412,081	79,851	119,829	1277,481	68,311	711,812
	8h	1776,580	819,911	1662,531	607,137	135,116	235,293	406,244	75,194	523,083
	12h	1831,381	1328,203	1819,592	1188,213	551,417	828,377	1931,205	429,099	789,850
	24h	1739,630	968,243	1967,018	1000,613	937,218	998,278	1799,371	173,682	854,742
	48h	1311,149	837,632	2092,756	1852,089	965,721	1387,616	1836,424	930,847	1522,313
	3d	1068,376	1038,524	816,553	144,695	99,777	43,894	742,565		
	7d	1039,470	990,322	1238,618	137,185	184,243	251,274	297,131		
	11d	1057,364	1079,209	1165,783	459,389	296,976	955,774	355,487		
	15d	1137,380	1232,092	1131,589	186,911	464,747	650,095	536,716		
19d	1223,642	1194,297	1044,745	251,769	690,884	992,752	1057,112			
21d	1213,683	1279,277	1146,528	568,453	1216,497	688,929	1260,048			
SEM	1h	378,236	251,147	182,485	35,387	44,724	30,195	102,749	31,734	103,925
	2h	877,785	454,834	361,880	26,384	37,977	36,966	386,078	41,679	132,651
	4h	764,196	395,396	885,014	89,825	36,410	39,502	741,726	11,575	457,982
	6h	1049,098	401,184	733,939	237,915	46,102	69,183	737,554	39,439	410,965
	8h	1025,709	473,376	959,863	350,531	78,009	135,846	234,545	43,413	302,002
	12h	1057,348	766,838	1050,542	686,015	318,361	478,264	1114,982	247,740	456,020
	24h	1004,376	559,015	1135,658	577,704	541,103	576,356	1038,868	100,275	493,485
	48h	756,992	483,607	1208,253	1069,304	557,559	801,141	1060,260	537,425	878,908
	3d	436,163	423,976	365,174	64,710	44,622	25,342	371,282		
	7d	424,362	404,297	553,927	61,351	82,396	125,637	148,565		
	11d	431,667	440,585	521,354	205,445	132,812	477,887	177,743		
	15d	464,334	503,000	506,062	83,589	207,841	325,048	268,358		
19d	499,550	487,570	467,224	112,595	308,973	496,376	528,556			
21d	495,484	522,263	512,743	254,220	544,034	344,465	630,024			

Werte der Abbildung 53, Abbildung 54, Abbildung 55, Abbildung 56, Abbildung 57, Abbildung 58, Abbildung 59 und Abbildung 60

bFGF ELISA [pg/ml]	Kokultur Membran	Monokultur Fibroblasten (Membran)	Monokultur Fibroblasten (Well)	Monokultur HDMEC (Membran)	Monokultur HDMEC (Well)	Kokultur im Insert ohne Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur im Insert mit Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert mit Kontakt Fibroblasten	
MITTELWERT	1h	375,888	272,060	213,632	229,630	333,002	425,461	236,638	327,771	131,298
	2h	640,232	419,824	272,163	406,071	311,847	462,361	428,287	363,287	310,939
	4h	485,006	491,153	302,572	503,212	356,990	538,225	363,720	413,513	325,722
	6h	1249,285	774,499	366,029	630,353	340,997	468,368	320,095	521,133	454,884
	8h	1335,238	1204,891	464,258	786,856	394,986	537,872	459,957	413,766	555,547
	12h	607,901	404,837	357,225	450,638	474,788	768,940	422,896	515,104	569,975
	24h	495,884	546,088	365,785	389,088	334,496	397,357	290,982	391,183	500,004
	48h	1087,399	136,222	169,974	343,880	457,075	339,196	238,675	393,252	391,513
	3d	91,262	130,767	118,617	120,646	98,239	703,931	735,306		
	7d	100,275	96,581	121,698	142,408	92,654	210,754	670,814		
	11d	96,799	104,391	222,390	100,332	57,035	140,289	621,598		
	15d	98,803	172,558	161,719	80,217	47,290	183,974	375,743		
19d	93,226	176,814	110,235	65,216	72,100	143,561	454,964			
21d	91,787	155,222	149,812	74,212	76,950	206,954	410,438			
SD	1h	371,660	102,923	281,132	196,425	199,405	433,817	68,559	165,653	135,555
	2h	360,030	216,402	93,368	399,421	31,150	148,130	111,953	128,384	142,134
	4h	153,631	165,752	88,092	343,035	82,208	78,920	119,615	108,202	84,125
	6h	491,206	620,395	170,034	479,386	49,935	200,264	198,977	123,400	122,671
	8h	923,971	608,265	79,399	394,953	104,681	72,413	20,627	53,792	194,084
	12h	176,625	165,217	57,804	160,579	93,015	312,193	57,632	83,312	169,596
	24h	76,323	217,144	177,519	117,971	102,426	148,249	67,159	181,415	146,968
	48h	1655,469	18,086	135,244	120,350	110,597	150,716	44,041	194,909	32,895
	3d	43,889	44,548	53,846	76,212	88,265	1190,564	879,193		
	7d	33,753	89,729	74,314	102,722	29,963	312,048	818,854		
	11d	39,467	71,096	138,833	70,228	20,708	134,091	619,694		
	15d	65,479	128,931	61,256	72,868	29,086	285,407	440,282		
19d	44,167	13,425	46,409	66,635	65,558	148,151	258,080			
21d	47,947	72,550	53,858	90,677	9,381	239,834	384,498			
SEM	1h	214,578	59,423	162,312	113,406	115,126	250,464	39,583	95,640	78,263
	2h	207,863	124,939	53,906	230,606	17,985	85,523	64,636	74,123	82,061
	4h	88,699	95,697	50,860	198,051	47,463	45,564	69,060	62,471	48,570
	6h	283,598	358,185	98,169	276,774	28,830	115,623	114,880	71,245	70,824
	8h	533,455	351,182	45,841	228,026	60,437	41,808	11,909	31,057	112,054
	12h	101,974	95,388	33,373	92,710	53,702	180,245	33,274	48,100	97,916
	24h	44,065	125,368	102,491	68,110	59,136	85,592	38,774	104,740	84,852
	48h	955,785	10,442	78,083	69,484	63,853	87,016	25,427	112,530	18,992
	3d	17,918	19,923	26,923	31,113	44,132	595,282	439,597		
	7d	13,780	40,128	37,157	41,936	14,981	156,024	409,427		
	11d	16,112	31,795	69,416	28,671	10,354	67,046	309,847		
	15d	26,732	57,660	30,628	29,748	14,543	142,704	220,141		
19d	18,031	6,004	23,205	27,203	32,779	74,075	129,040			
21d	19,574	32,445	26,929	37,019	4,691	119,917	192,249			

Werte der Abbildung 61, Abbildung 62, Abbildung 63, Abbildung 64, Abbildung 65, Abbildung 66, Abbildung 67 und Abbildung 68

eNOS ELISA [pg/ml]		Kokultur Membran	Monokultur Fibroblasten (Membran)	Monokultur Fibroblasten (Well)	Monokultur HDMEC (Membran)	Monokultur HDMEC (Well)	Kokultur im Insert ohne Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur im Insert mit Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert mit Kontakt Fibroblasten
MITTELWERT	1h	56,762	81,946	56,513	103,228	88,071	28,475	18,592	65,836	-54,475
	2h	50,064	83,319	86,713	117,253	113,218	178,333	66,860	53,275	3,802
	4h	42,777	68,334	60,365	133,000	81,762	59,826	69,809	32,135	9,119
	6h	91,574	109,252	77,815	125,290	87,676	81,859	35,499	92,805	55,477
	8h	121,700	68,261	47,480	146,735	59,099	83,522	52,082	61,010	51,856
	12h	112,085	70,592	74,031	167,125	75,254	94,160	54,788	53,048	46,672
	24h	161,980	117,759	86,082	141,707	94,792	98,623	82,757	62,217	44,229
	48h	145,181	56,674	47,866	106,644	70,487	120,180	104,364	62,544	28,541
	3d	33,582	55,993	97,426	101,257	58,857	63,532	67,031		
	7d	72,280	77,943	128,122	89,769	78,576	108,732	60,540		
	11d	100,402	105,503	176,160	109,460	85,241	132,773	89,352		
	15d	112,341	104,594	183,726	112,579	48,676	120,931	105,686		
19d	114,787	106,079	171,091	85,742	81,153	99,072	100,901			
21d	84,261	106,637	141,718	87,642	59,506	141,121	98,336			
SD	1h	9,676	81,540	58,824	74,038	45,118	41,267	25,699	36,858	106,575
	2h	19,311	62,405	105,296	84,190	101,855	213,980	22,482	25,144	31,739
	4h	16,095	9,953	7,182	34,910	35,950	4,562	38,988	9,884	11,549
	6h	5,276	66,347	1,050	25,009	21,573	48,549	29,588	42,659	27,572
	8h	83,959	18,055	28,533	92,873	19,084	20,553	24,762	4,006	9,708
	12h	55,704	43,404	28,382	164,628	40,259	61,838	0,867	9,130	17,372
	24h	153,427	117,849	74,425	156,492	85,570	98,304	67,834	52,228	38,516
	48h	175,178	68,027	54,667	145,493	81,075	161,457	106,298	74,586	21,586
	3d	26,067	53,833	127,286	116,780	47,373	11,071	15,155		
	7d	34,856	59,942	117,230	54,917	56,715	65,572	32,227		
	11d	50,978	59,020	154,721	77,311	48,587	10,514	36,863		
	15d	44,430	37,583	256,000	53,616	59,189	34,837	27,368		
19d	45,741	42,878	204,650	38,386	44,901	75,871	45,250			
21d	47,755	51,547	92,984	48,100	34,267	114,020	45,534			
SEM	1h	5,587	47,077	33,962	42,746	26,049	23,826	14,838	21,280	61,531
	2h	11,149	36,029	60,793	48,607	58,806	123,542	12,980	14,517	18,324
	4h	9,292	5,746	4,147	20,155	20,756	2,634	22,510	5,706	6,668
	6h	3,046	38,305	0,606	14,439	12,455	28,030	17,082	24,629	15,919
	8h	48,474	10,424	16,474	53,620	11,018	11,866	14,296	2,313	5,605
	12h	32,161	25,059	16,386	95,048	23,244	35,702	0,501	5,271	10,030
	24h	88,581	68,040	42,970	90,351	49,404	56,756	39,164	30,154	22,237
	48h	101,139	39,276	31,562	84,000	46,809	93,217	61,371	43,062	12,463
	3d	11,658	24,075	56,924	52,226	23,686	6,392	8,750		
	7d	15,588	26,807	52,427	24,560	28,358	37,858	18,607		
	11d	22,798	26,394	69,193	34,575	24,294	6,070	21,283		
	15d	19,870	16,808	114,487	23,978	29,595	20,113	15,801		
19d	20,456	19,176	91,522	17,167	22,451	43,804	26,125			
21d	21,357	23,052	41,584	21,511	17,134	65,830	26,289			

Werte der Abbildung 69, Abbildung 70, Abbildung 71, Abbildung 72, Abbildung 73, Abbildung 74, Abbildung 75, Abbildung 76, Abbildung 77 und Abbildung 78

Ang-2 ELISA [pg/ml]	Kokultur Membran	Monokultur Fibroblasten (Membran)	Monokultur Fibroblasten (Well)	Monokultur HDMEC (Membran)	Monokultur HDMEC (Well)	Kokultur im Insert ohne Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert ohne Kontakt Fibroblasten	Kokultur im Insert mit Kontakt HDMEC	Kokultur im Insert mit Kontakt Fibroblasten	
Mittelwert	1h	11030,27806	-1049,908773	-493,069373	10662,62119	2054,186198	1775,21035	302,6245004	1702,609879	24,04280835
	2h	12665,48881	-435,6587839	-166,1517257	12497,17929	2276,075855	2237,358297	667,3610835	1997,5048	419,5492442
	4h	13974,70636	44,38736853	35,87015019	14185,17033	2356,507876	2240,11393	870,4503682	2089,422928	603,3187022
	6h	14885,38989	472,2535453	150,4739544	15532,88123	2266,524533	2001,629244	946,5411284	1988,174264	663,0187846
	8h	15733,10063	961,8423478	284,0825255	16880,99346	2276,939018	2010,044964	1038,964781	1952,639255	770,8120179
	12h	16308,60277	1491,550879	431,8374298	18517,24176	2257,140902	2052,16405	1114,28913	1988,681347	844,4856104
	24h	17492,28649	1912,136768	516,7179375	19915,73011	2249,31808	1965,879243	1041,46769	1984,337216	898,8826503
	48h	19880,84048	2296,232026	553,7258482	21288,66329	2198,18935	1965,765992	993,1449323	2035,809176	812,7206737
	3d	1731,748934	53,70216276	-43,12289783	7315,477441	3889,287852	6145,514638	1105,558022		
	7d	3200,886298	13,84690581	-40,5011005	12214,28521	5564,497271	6983,134896	3477,401315		
	11d	4587,033511	-106,8756709	-71,23795578	12914,8243	2224,356012	15559,95762	7814,347289		
	15d	6118,17258	67,07520729	-46,16602491	14050,39003	5779,340622	10987,0601	12329,40983		
19d	2766,63648	37,37729192	-75,21418575	16649,52382	2275,02187	8609,666143	23207,39192			
21d	4783,546893	-84,96561629	-88,74559357	17252,47485	5146,409984	10245,13443	3374,70825			
SD	1h	7566,649442	2544,465111	1426,336284	7338,797493	929,8312144	2207,644345	1608,2236	1179,693566	1722,373297
	2h	7448,620243	1924,094032	845,3768435	6845,177437	614,5232221	45,74829645	851,4258104	487,5333117	802,1704846
	4h	5218,016315	1720,291646	458,4153838	7627,651074	633,4615922	1166,9208	316,0469208	677,3635913	256,2059111
	6h	4643,00022	1967,135881	534,9736754	6773,028809	735,1543382	168,4005772	371,2524805	568,9608361	437,1837493
	8h	3918,922712	2123,276279	596,2257315	8109,504217	693,3768758	247,3548802	354,9264584	416,8264538	309,1451555
	12h	5547,91003	1682,420046	339,8895236	8529,766954	789,1995752	491,6359277	515,3740982	364,2085935	257,4157803
	24h	11423,94979	1549,261573	175,6436443	5562,330547	1100,155245	223,9981314	639,4345061	611,2114326	425,1680228
	48h	12586,10982	1509,121357	298,7005229	9380,404596	1693,007782	2554,187522	779,3591631	1373,166726	313,3205076
	3d	2549,996443	33,54792964	1131,746114	7085,005888	3087,282345	3882,935077	488,7603733		
	7d	3854,962086	119,01888	228,617119	11105,99381	3620,121862	3350,007815	2003,939064		
	11d	6599,515353	264,4835898	158,9219319	11840,17327	2469,182295	12303,05945	8265,122527		
	15d	5400,565329	163,9085151	109,2412164	12745,59713	4627,367304	15846,0009	12051,47951		
19d	2145,444994	167,1428312	197,459994	15170,32975	2413,713051	8151,237015	39947,00792			
21d	3217,1979	212,5761793	186,8692463	11967,55828	5091,537467	9503,984204	823,7614655			
SEM	1h	6368,334009	-606,1651127	-284,6737352	6156,067213	1185,984954	1024,918173	174,7203367	983,0022721	13,88112187
	2h	7312,423375	-251,5277162	-95,92774357	7215,249828	1314,093007	1291,739415	385,3011012	1153,259934	242,226869
	4h	8068,300476	25,62705917	20,70964087	8189,811911	1360,530457	1293,33038	502,5547544	1206,32889	348,3262151
	6h	8594,083861	272,6557115	86,87617806	8967,913159	1308,578549	1155,641183	546,4857753	1147,872947	382,7940738
	8h	9083,509882	555,3199384	164,0151226	9746,246116	1314,591355	1160,500001	599,846596	1127,3568	445,028526
	12h	9415,776201	861,1473014	249,3214564	10690,93452	1303,160907	1184,817467	643,3351294	1148,165711	487,5639945
	24h	10099,17631	1103,972678	298,3272403	11498,35214	1298,644399	1135,00091	601,2916514	1145,657626	518,9701401
	48h	11478,2086	1325,730179	319,6937675	12291,01548	1269,125213	1134,935525	573,392494	1175,374976	469,2244997
	3d	999,8257133	31,00495812	-24,89701667	4223,59287	2245,481388	3548,114531	638,2942215		
	7d	1848,032566	7,994514799	-23,38332128	7051,920853	3212,663998	4031,714812	2007,678585		
	11d	2648,325033	-61,70469735	-41,12925294	7456,377287	1284,232543	8983,54572	4511,615511		
	15d	3532,328586	38,72588899	-26,65396691	8111,996466	3336,703864	6343,382105	7118,388086		
19d	1597,318316	21,57978955	-43,42493039	9612,607059	1313,484489	4970,793065	13398,79397			
21d	2761,782086	-49,05492144	-51,23729234	9960,721002	2971,281189	5915,031122	1948,388717			

Werte der Abbildung 79, Abbildung 80 und Abbildung 81

Vitalitäts-assay		1	2	3	4	Mittelwert	SD	T-TEST
	Kontrolle	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000
VEGF	1 ng/ml	136,140	106,110	90,598	118,953	112,950	16,735	0,229
	5 ng/ml	120,113	108,988	178,846	131,145	134,773	26,624	0,064
	10 ng/ml	126,698	104,993	103,846	130,605	116,536	12,201	0,057
	25 ng/ml	127,604	133,492	155,769	136,134	138,250	10,576	0,001
	50 ng/ml	120,559	124,843	160,256	131,093	134,188	15,510	0,009
	100 ng/ml	123,048	159,483	Ausreißer	128,377	136,969	16,068	0,012
IL-8	0,1 ng/ml	112,791	154,061	138,462	119,949	131,316	16,131	0,015
	1 ng/ml	132,335	156,139	182,906	97,928	142,327	31,259	0,057
	5 ng/ml	120,786	95,947	88,889	113,187	104,702	12,820	0,549
	10 ng/ml	118,606	97,005	142,735	111,747	117,523	16,516	0,116
	25 ng/ml	118,608	89,626	Ausreißer	117,856	108,697	13,488	0,325
	50 ng/ml	118,295	97,607	Ausreißer	129,364	115,089	13,162	0,110
	100 ng/ml	110,900	109,757	Ausreißer	137,360	119,339	12,751	0,050
	250 ng/ml	115,875	138,246	107,692	128,952	122,691	11,753	0,016
	500 ng/ml	114,247	132,789	Ausreißer	136,708	127,915	9,796	0,005
	750 ng/ml	126,767	141,069	77,778	102,144	111,939	24,142	0,425
1000 ng/ml	120,918	95,302	66,667	100,839	95,931	19,399	0,729	
bFGF	1 µg/ml	127,795	108,604		150,558	128,986	17,148	0,036
	2 µg/ml	105,990	90,851		173,006	123,282	35,699	0,321
	3 µg/ml	122,042	88,746		135,859	115,549	19,774	0,241
	4 µg/ml	105,706	81,033		114,424	100,388	14,141	0,965
	5 µg/ml	118,632	86,967		121,493	109,031	15,645	0,374

Werte der Abbildung 82, Abbildung 83 und Abbildung 84

Proliferationsassay		1	2	3	4	Mittelwert	Standard-abweichun- g	T-TEST
	Kontrolle	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	
VEGF	1 ng/ml	155,486	68,196	102,911	141,681	117,068	34,171	0,420
	5 ng/ml	152,398	158,528	179,754	164,990	163,918	10,170	0,000
	10 ng/ml	119,353	181,743	192,263	183,603	169,240	29,075	0,006
	25 ng/ml	170,688	192,942	128,326	201,409	173,341	28,308	0,004
	50 ng/ml	173,105	182,554	250,397	129,537	183,898	43,288	0,015
	100 ng/ml	154,786	207,318	195,145	141,733	174,746	27,228	0,003
IL-8	0,1 ng/ml	140,662	152,888	128,023	131,291	138,216	9,658	0,000
	1 ng/ml	99,061	170,156	270,355	116,732	164,076	66,710	0,147
	5 ng/ml	87,380	86,904	170,569	160,351	126,301	39,325	0,291
	10 ng/ml	117,566	157,510	109,869	152,266	134,303	20,847	0,029
	25 ng/ml	121,487	194,017	102,484	252,132	167,530	59,603	0,097
	50 ng/ml	162,224	139,893	138,008	135,206	143,833	10,748	0,000
	100 ng/ml	173,657	172,126	146,815	141,390	158,497	14,531	0,000
	250 ng/ml	170,865	103,152	227,338	161,839	165,798	44,026	0,041
	500 ng/ml	186,074	140,859	122,274	257,813	176,755	52,235	0,044
750 ng/ml	158,385	133,574	128,869	185,471	151,575	22,555	0,007	
1000 ng/ml	182,041	132,582	125,793	130,376	142,698	22,846	0,018	
bFGF	1 µg/ml	139,233	182,266	111,576	177,330	152,601	28,954	0,020
	2 µg/ml	141,399	218,421	115,369	171,472	161,665	38,313	0,032
	3 µg/ml	135,129	223,305	139,532	175,110	168,269	35,355	0,016
	4 µg/ml	168,408	156,909	150,533	Ausreißer	158,616	7,397	0,000
	5 µg/ml	Ausreißer	119,241	98,091	95,473	104,268	10,641	0,528

Werte der Abbildung 85

	Kontrolle	VEGF				
		5 ng/ml	10 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml
5	14	16	34	51	65	
5	24	23	36	50	71	
12	57	54	61	81	138	
2	46	130	59	52	80	
2	21	25	52	70		
0	1	1	23	15		
0	1	0	3	3		
0	4	4	5	14		
0	1	128	105	213	224	
0	20	142	241	208	258	
3	41	99	189	141	160	
42	27	118	127	110	90	
1	0	128	105	213	224	
20	0	142	241	208	258	
41	3	99	189	141	160	
27	42	118	127	110	90	
28	59	142	152	851	7	
115	154	89	367	10	15	
91	179	551	749	11	175	
10						
<b>Median</b>	5	21	99	105	81	138
<b>Minimalwert</b>	0	0	0	3	3	7
<b>1. Quartil</b>	0,75	2	24	44	32,5	75,5
<b>Medianwert</b>	5	21	99	105	81	138
<b>3. Quartil</b>	27,25	44	129	189	174,5	199,5
<b>Maximalwert</b>	115	179	551	749	851	258

Werte der Abbildung 86

	Kontrolle	IL-8								
		5 ng/ml	10 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	750 ng/ml	1000 ng/ml
1	0	1	0	0	30	7	32	69	20	
1	0	1	5	473	495	116	378	397	266	
0	1	22	39	336	297	203	2	92	489	
0	0	0	0	0	23	21	606	395	24	
	2377	2675	2611	2961		2968	2418	855		
0	1844	3417	3528	3798	3355	4967	4492	784		
325	1866	3177	1640	1634	1728	3803	3044			
0		3608		1491						
28	457				1182	1457	892	1067	790	
115	1647				391	707	762	785	386	
91	562				4	569	335	1295	97	
10	912				36	6810	1805	6703	908	
0	8	515	2659	2346	3714	471	2177	3656	3051	
204	474	1559	2	1843	2797	1017	2185	3556	3575	
1	163	0	1688	1972	3070	905	3168	3835	3206	
						186	3221	1783	3887	
<b>Median</b>	1	465,5	515	839,5	1634	495	707	1805	961	639,5
<b>Minimalwert</b>	0	0	0	0	0	4	7	2	69	20
<b>1. Quartil</b>	0	2,75	1	2,75	404,5	36	194,5	492	493,75	223,75
<b>Medianwert</b>	1	465,5	515	839,5	1634	495	707	1805	961	639,5
<b>3. Quartil</b>	75,25	1463,25	2926	2380,25	2159	2797	2212,5	2731	3112,75	3089,75
<b>Maximalwert</b>	325	2377	3608	3528	3798	3714	6810	4492	6703	3887

Werte der Abbildung 87

	bFGF					
	Kontrolle	1 µg/ml	2 µg/ml	3 µg/ml	4 µg/ml	5 µg/ml
	0	24	127	106	246	301
	35	0		269	260	377
	0	0	171	146	215	364
	0	5		131	295	278
	433	1139	1419	1304	1047	425
	382	1120	1395	894	785	261
	588	1492	1129	903	785	454
	314	1133	1447	1212	1149	694
	422	902	226	2156	1242	1157
	242	609	528	1298	1429	1169
	562	792	1379	1633	1135	679
	612	976	561	650	824	1236
<b>Median</b>	348	847	845	898,5	804,5	439,5
<b>Minimalwert</b>	0	0	127	106	215	261
<b>1. Quartil</b>	26,25	19,25	301,5	238,25	286,25	348,25
<b>Medianwert</b>	348	847	845	898,5	804,5	439,5
<b>3. Quartil</b>	465,25	1123,25	1391	1299,5	1138,5	809,75
<b>Maximalwert</b>	612	1492	1447	2156	1429	1236

Werte der Abbildung 88, Abbildung 89 und Abbildung 90

Dichte der Tubes		1	2	3	4	5	6	7	MITTELWERT	SD	Standardfehler
	Kontrolle	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
VEGF	1 ng/ml	75,989	119,400	143,302	1301,449				410,035	594,929	297,464
	5 ng/ml	124,011	129,300	111,942	1097,585				365,709	487,971	243,985
	10 ng/ml	89,266	124,000	85,047	1000,966				324,820	451,102	225,551
	25 ng/ml	94,068	141,600	128,349	800,000				291,004	339,921	169,961
	50 ng/ml	112,429	182,400	77,674	1430,918				450,855	654,825	327,412
	100 ng/ml	110,452	132,800	72,066	581,643				224,240	239,585	119,792
IL-8	1 ng/ml				861,836	77,316	69,712	100,559	336,288	389,874	194,937
	25 ng/ml				828,986	85,942	48,558	73,464	321,162	380,150	190,075
	50 ng/ml				902,415	100,000	81,731	159,218	361,382	395,767	197,884
	100 ng/ml				943,961	108,626	76,923	82,961	376,504	427,450	213,725
	250 ng/ml				1091,787	150,160	50,481	288,268	430,809	474,533	237,266
	500 ng/ml				226,087	81,789	85,817	107,542	131,231	68,131	34,065
bFGF	1 µg/ml		128,400	98,442	871,014	164,217	78,365	163,128	268,088	305,868	124,870
	2 µg/ml		102,600	93,043	682,126	184,984	85,096	100,838	229,570	235,048	95,958
	3 µg/ml		120,400	76,428	1017,391	169,010	49,038	65,642	286,453	378,615	154,569
	4 µg/ml		93,900	86,604	757,488	182,428	108,173	105,587	245,719	264,410	107,945
	5 µg/ml		83,600	75,389	1182,609	209,265	117,788	169,832	333,730	432,298	176,485

Gesamtlänge der Tubes		1	2	3	4	5	6	7	MITTELWERT	SD	Standardfehler
	Kontrolle	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
VEGF	1 ng/ml	70,914	118,472	104,956	552,484				211,707	228,064	114,032
	5 ng/ml	128,381	124,836	90,285	583,094				231,649	234,926	117,463
	10 ng/ml	78,630	124,708	68,019	567,032				209,597	239,557	119,779
	25 ng/ml	92,278	142,485	83,784	510,388				207,234	203,756	101,878
	50 ng/ml	107,039	126,768	59,510	595,826				222,286	250,621	125,311
	100 ng/ml	104,411	135,685	53,164	397,975				172,809	153,917	76,958
IL-8	1 ng/ml				564,970	69,681	65,178	87,579	196,852	245,603	122,801
	25 ng/ml				567,212	82,796	47,946	65,538	190,873	251,296	125,648
	50 ng/ml				535,623	98,516	79,871	109,304	205,829	220,199	110,099
	100 ng/ml				548,225	96,908	86,217	78,150	202,375	230,695	115,347
	250 ng/ml				558,346	123,016	56,942	195,477	233,445	223,868	111,934
	500 ng/ml				245,992	70,435	84,597	97,806	124,707	81,625	40,812
bFGF	1 µg/ml		126,710	70,156	507,899	149,923	82,928	154,008	181,937	163,342	66,684
	2 µg/ml		113,921	66,028	401,958	169,876	78,428	84,299	152,418	127,777	52,165
	3 µg/ml		125,792	61,856	544,633	151,145	56,310	62,107	166,974	189,138	77,215
	4 µg/ml		113,261	59,579	405,356	160,468	110,510	76,210	154,231	127,858	52,198
	5 µg/ml		96,770	56,043	519,302	167,286	115,580	144,315	183,216	169,081	69,027

Verzweigungspunkte		1	2	3	4	5	6	7	MITTELWERT	SD	Standardfehler
	Kontrolle	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
VEGF	1 ng/ml	53,636	122,901	177,391	1538,095				473,006	711,863	355,932
	5 ng/ml	156,818	116,412	131,594	1771,429				544,063	818,413	409,207
	10 ng/ml	75,000	127,099	97,391	1833,333				533,206	867,014	433,507
	25 ng/ml	83,636	158,015	128,116	1557,143				481,728	717,594	358,797
	50 ng/ml	98,182	151,145	70,725	1876,190				549,060	885,383	442,691
	100 ng/ml	85,455	142,748	65,507	1223,810				379,380	563,904	281,952
IL-8	1 ng/ml				1800,000	58,929	28,302	85,185	493,104	871,574	435,787
	25 ng/ml				1866,667	57,143	15,094	51,852	497,689	912,843	456,422
	50 ng/ml				1666,667	91,071	45,283	137,037	485,015	788,658	394,329
	100 ng/ml				1833,333	97,321	50,943	96,296	519,474	876,173	438,087
	250 ng/ml				1752,381	136,607	22,642	246,296	539,481	813,739	406,870
	500 ng/ml				592,857	56,250	48,113	98,148	198,842	263,590	131,795
bFGF	1 µg/ml		133,969	81,739	1707,143	179,464	47,170	224,074	395,593	645,700	263,606
	2 µg/ml		109,160	80,580	1100,000	215,179	32,075	72,222	268,203	412,155	168,262
	3 µg/ml		130,534	76,522	1607,143	186,607	28,302	57,407	347,753	619,537	252,925
	4 µg/ml		101,336	72,174	1123,810	200,893	67,925	68,519	272,443	420,177	171,536
	5 µg/ml		83,588	78,841	1380,952	225,000	69,811	187,037	337,538	515,193	210,327



## 6.5 Publikationen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in Fachzeitschriften oder als Kongressbeiträge publiziert.

### 6.5.1 Publikationen

- Heller, M., Frerick-Ochs, E. V., **Bauer, H-K**, Schiegnitz, E., Flesch, D., Brieger, J., Stein, R., Al-Nawas, B., Brochhausen, C., Thüroff, J. W., Unger, R. E. & Brenner, W.: Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials*, 77, 207-215, 201

### 6.5.2 Kongressbeiträge

- **Bauer H.-K.**, Heller M., Frerick-Ochs E.V., Flesch D., Brieger J., Unger R.E., Al-Nawas B., Hasenburg A., Brenner W.: Prävascularisierung von Kollagenmatrices zur Generierung einer in vitro-Schleimhaut für die Wundabdeckung nach Tumorexzision. 8. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, 2016, Düsseldorf 10.-11.11.2016.
- **Bauer H.-K.**, Schulze A. C., Heller M., Frerick-Ochs E.V., Flesch D., Unger R.E., Brenner W.: Successful in vitro pre-vascularization of collagen scaffolds - a promising approach to overcome necrosis of artificial tissues in vivo. 23rd Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR16) 20.-22.10.2016 Parma.
- **Bauer H.-K.**, Heller M., Frerick-Ochs E.V., Flesch D., Pfeifer C., Brieger J., Stein R., Al-Nawas B., Brochhausen C., Thüroff J.W., Unger R.E., Brenner W.: Prävascularisierung von Kollagenmatrices zur Generierung einer in vitro-Schleimhaut. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 12.-14.11.2015 Freiburg. *BioNanoMaterials* 16: 227-238, 2015
- **Bauer H.-K.**, Brenner W.: Establishment of an in vitro generated pre-vascularized oral mucosa equivalent via growth factor gradients. TransMed Science Day 10. & 11. 09.2015 Mainz.
- **Bauer H.-K.**, Heller M., Frerick-Ochs E.V., Flesch D., Brieger J., Stein R., Al-Nawas B., Brochhausen C., Thüroff J.W., Unger R.E., Brenner W.: Pro-vascularization of a tissue-engineered buccal mucosa equivalent. 6. Symposium Urologische Forschung der DGU, 13.-15.11.2014, Homburg/Saar. *Der Urologe* 54: 128, 2015 Lebenslauf

In der Online-Version entfernt

In der Online-Version entfernt



In der Online-Version entfernt



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit weder komplett noch in Teilen als eine andere staatliche oder wissenschaftliche Prüfung und auch nicht bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum

---

Heide-Katharina Helene Bauer

Die vorliegende Dissertation wurde von Juli 2014 bis Dezember 2017 in der Urologischen Klinik und Poliklinik (bis Juni 2016) sowie der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit (ab Juni 2016) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Walburgis Brenner angefertigt.