

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Medizinischen
Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Klüter

Auswirkungen von hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix
von Endothelzellen auf die Charakteristika von Fett-Stroma Zellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von Hans-Heiner Kremer
aus Mainz

2017

Für meine Eltern

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergji Goerd
Referentin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Karen Bieback

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 5 |
| 1 ZUSAMMENFASSUNG | 7 |
| 2 EINLEITUNG | 9 |
| 2.1 Diabetes | 9 |
| 2.1.1 Diabetes Mellitus und seine Folgen | 9 |
| 2.1.2 Grundlagen der diabetischen Retinopathie..... | 9 |
| 2.1.3 Pathophysiologische Mechanismen der diabetischen Retinopathie .. | 10 |
| 2.1.4 Schlüsselfunktion von Perizyten in der Angioarchitektur der Retina .. | 12 |
| 2.1.5 Therapie der diabetischen Retinopathie | 13 |
| 2.2 Extrazelluläre Matrix (EZM) | 14 |
| 2.2.1 Aufbau und Funktion der EZM | 14 |
| 2.2.2 EZM-Veränderungen im Zuge der diabetischen Retinopathie | 15 |
| 2.2.3 Die EZM als „Target“ der Diabetestherapie | 16 |
| 2.3 Perizyten | 17 |
| 2.3.1 Geschichte, Morphologie und Lokalisation von Perizyten..... | 17 |
| 2.3.2 Gewinnung und Funktion von Perizyten | 18 |
| 2.3.3 Charakterisierung von Perizyten..... | 19 |
| 2.4 Mesenchymal-stromale Zellen..... | 21 |
| 2.4.1 Geschichte, Morphologie und Lokalisation von MSCs..... | 21 |
| 2.4.2 Gewinnung und Funktion von MSCs | 22 |
| 2.4.3 Charakterisierung von MSCs | 24 |
| 2.4.4 Therapeutischer Einsatz von MSCs beziehungsweise ASCs | 25 |
| 2.5 Zielsetzung | 28 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3 | MATERIAL UND METHODEN..... | 30 |
| 3.1 | Material..... | 30 |
| 3.1.1 | Zellen..... | 30 |
| 3.1.2 | Medien..... | 30 |
| 3.1.3 | Chemikalien..... | 32 |
| 3.1.4 | Lösungen..... | 33 |
| 3.1.5 | Farbstoffe | 34 |
| 3.1.6 | Antikörper | 34 |
| 3.1.7 | KITs | 35 |
| 3.1.8 | Verbrauchsmaterial..... | 36 |
| 3.1.9 | Devices..... | 36 |
| 3.1.10 | Software | 37 |
| 3.2 | Methoden | 38 |
| 3.2.1 | Allgemeine Zellkultur | 38 |
| 3.2.2 | Matrixgewinnung und Zellkultur auf EZM..... | 45 |
| 3.2.3 | Matrixcharakterisierung | 52 |
| 3.2.4 | Charakterisierung der Zelllinien | 56 |
| 3.2.5 | Auswirkungen von EZM auf die Charakteristika von ASC | 62 |
| 3.2.6 | Auswertung und Statistik | 62 |
| 4 | ERGEBNISSE | 66 |
| 4.1 | Optimierung eines Protokolls zur Isolation extrazellulärer Matrix | 66 |
| 4.1.1 | Nachweis der wachstumsfördernden Effekte von EZM auf die Proliferation von ASC | 66 |
| 4.1.2 | Osmolaritätskontrolle mit Mannitol..... | 68 |
| 4.1.3 | Optimierung des Dezellularisierungs-Verfahrens | 70 |
| 4.1.4 | Konfluenz-Kontrolle mittels CellTracker™ Red CMPTX | 72 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.1.5 | Einfluss fluktuierender Glukosebedingungen auf HUVEC | 76 |
| 4.1.6 | Einfluss der Medienzusammensetzung auf HUVEC und ihre EZM ... | 77 |
| 4.2 | Einfluss hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix von Endothelzellen auf die Charakteristika von ASC und HRP | 79 |
| 4.2.1 | Proliferation und Apoptose-Verhalten von ASC | 79 |
| 4.2.2 | Proliferation und Apoptose-Verhalten von HRMVPC | 81 |
| 4.2.3 | Proliferation und Apoptose-Verhalten von Bmi-Perizyten | 84 |
| 4.3 | Einfluss von hyperglykämisch modifizierter EZM auf die Adhäsion von ASC und HRP | 86 |
| 4.4 | EZM-Charakterisierung | 92 |
| 4.4.1 | Phasenkontrastmikroskopie und Brilliant Blau Färbung | 92 |
| 4.4.2 | Immunfluoreszenz-Färbung spezifischer Matrixproteine | 93 |
| 4.4.3 | Quantitativer Nachweis von Matrixproteinen mittels ELISAs | 95 |
| 4.5 | Charakterisierung der Zellpopulationen: ASC und HRP/Perizyten | 98 |
| 4.5.1 | Immunfluoreszenz-Färbungen zum Nachweis spezifischer RGS5-Markerproteine | 98 |
| 4.5.2 | Osteogene und adipogene Induktion zur Bestimmung des Differenzierungspotentials von ASC und HRP/Perizyten | 105 |
| 4.5.3 | Veränderungen der Genexpression von ASC durch ihre Kultur auf EZM | 109 |
| 5 | DISKUSSION | 113 |
| 5.1 | Optimierung der Versuchsbedingungen | 113 |
| 5.2 | Veränderungen der EZM durch Hyperglykämie und mögliche Folgen auf die Proliferation von ASC und HRP | 120 |
| 5.3 | Vergleichbarkeit ASC und Perizyten | 123 |
| 5.4 | Ausblick | 126 |
| 6 | TABELLARISCHER ANHANG | 129 |
| 7 | LEBENS LAUF | 131 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| 8 DANKSAGUNG..... | 132 |
| 9 LITERATURVERZEICHNIS..... | 134 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|--------|-------|---|
| 7-AAD | | 7-Aminoactinomycin |
| AIM | Engl. | Adipogenic induction medium |
| AMM | Engl. | Adipogenic maintenance medium |
| ANOVA | Engl. | Analysis of variance |
| ASC | Engl. | Adipose-derived mesenchymal stromal and stem cell |
| BM | Engl. | Bone marrow |
| Bmi-PC | Engl. | Immortalised human retinal pericytes |
| BSA | Engl. | Bovine Serum Albumin |
| CD | Engl. | Cluster of Differentiation |
| CTR | Engl. | CellTracker™ Red |
| DA | | Differenzierungsassay |
| DRP | | Diabetische Retinopathie |
| ECM | Engl. | Extracellular matrix |
| EZ | | Endothelzellen |
| EZM | | Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Engl. | Ethylen-diamine-tetra-acetic acid |
| FAK | Engl. | Focal adhesion kinase |
| FACS | Engl. | Fluorescence activated cell sorting |
| FBS | Engl. | Fetal Bovine Serum |
| FGF | Engl. | Fibroblast growth factor |
| G2% | | Gelatine 2% |
| GAPDH | Engl. | Glycerinadehyd-3-phosphat Dehydrogenase |
| GMP | Engl. | Good manufacturing practice |
| GvHD | Engl. | Gravt-versus-host disease |
| HCMEC | Engl. | Human colonic microvascular endothelial cells |
| Hep2G | Engl. | Liver hepatocellular cells |
| HUVEC | Engl. | Human umbilical vein endothelial cells |
| HRMVPC | Engl. | Human retinal microvascular pericytes |
| HRP | Engl. | Human retinal pericytes |
| LA-MSC | Engl. | Lipo-Aspirat derived mesenchymal stromal cell |
| MFI | | Mittlere Fluoreszenz Intensität |
| MSC | | Mesenchymal-stromale Zelle |
| MW | | Mittelwert |
| NV | | NucView™ 488 |
| NVU | Engl. | Neuro vascular unit |
| OIM | Engl. | Osteogenic induction medium |

| | | |
|-------|-------|--|
| PAVK | | Periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| Pax | | Paxillin |
| PFA | | Paraformaldehyd |
| PKC | | Proteinkinase C |
| PZ-PC | Engl. | Placenta pericytes |
| ROS | Engl. | Reactive oxygen species |
| RT | | Raumtemperatur |
| SD | Engl. | Standart Deviation |
| UCB | Engl. | Umbilical cord blood |
| VEGF | Engl. | Vaskular endothelial growth factor |
| vSMC | Engl. | Vascular smooth muscle cell |
| ZNS | | Zentrales Nervensystem |

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die diabetische Retinopathie (DRP) ist die häufigste mit Diabetes assoziierte Komplikation und Nummer eins der Erblindungsursachen in der westlichen Welt. Als Folge des deregulierten Glukosemetabolismus kommt es bereits in frühen Stadien der DRP zu einer Verdickung der extrazellulären Matrix (EZM) und damit einhergehend einem Absterben von Perizyten. Ursächlich für diesen, auch als „*Pericyte drop out*“, bezeichneten Prozess scheint eine qualitative und quantitative Veränderung der EZM zu sein, die zu einer gestörten Kommunikation zwischen Endothel und Perizyten führt. Es kommt zum Verlust der regulierenden und modulierenden Einflüsse von Perizyten auf das vaskuläre Endothel in deren Folge die Permeabilität der Gefäße zunimmt und gleichzeitig eine reaktive, deregulierte Neovaskularisation einsetzt. Diese Effekte addieren sich und führen zum charakteristischen Bild der DRP mit insuffizienten Gefäßen die auf Dauer zur Ausbildung eines Makulaödems führen.

Dem Untergang beziehungsweise Funktionsverlust der Perizyten spricht man eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung und Progredienz der DRP zu. Ein Wiederherstellen der Perizytenfunktion, so hofft man, könnte die im Verlauf der DRP auftretenden Komplikationen lindern und ihre Progression vermindern.

Mesenchymal-stromale Zellen (MSC) haben zahlreiche morphologische und funktionelle Gemeinsamkeiten mit Perizyten. Hinzu kommt, dass ihre Differenzierungskapazitäten und ihr immunmodulatorisches Potential bereits erfolgreich im Zuge zelltherapeutischer Interventionen gegen andere Erkrankungen eingesetzt wurden. Dies macht sie zu möglichen Substituenten gegen den Perizytenuntergang im Verlauf der DRP.

Vorrangehende Untersuchungen konnten nachweisen, dass *human retinal pericytes* (HRP) die auf hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix kultiviert wurden, in ihrer Adhäsion gehemmt werden und schneller in Apoptose eintreten. Wir stellten die Hypothese auf, dass MSC in ihrem Adhäsions-, Wachstums- und Differenzierungsverhalten durch chronisch erhöhte Glukosewerte weniger stark beeinflusst werden. Als Vertreter der MSC wählten wir, aus Fettgewebe isolierte *adipose derived stem/stromal cells* (ASC). Deren Einsatz hat in aktuellen Studien mit Anwendungsschwerpunkt im perivaskulären Bereich deutliche Vorteile im Vergleich zu MSC, die aus anderen Geweben isoliert wurden, gezeigt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die

Einflüsse von hyperglykämisch modifizierter EZM von Endothelzellen auf das Wachstumsverhalten von ASCs und HRP zu untersuchen und zu vergleichen. Dafür haben wir Endothelzellen in Medien mit verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert und durch Dezellularisierung die, von ihnen gebildete EZM isoliert. Anschließend haben wir auf den verschiedenen modifizierten Matrices ASC und HRP ausgesät und mittels „*Live cell imaging*“ das Proliferationsverhalten der Zellen in Echtzeit dokumentiert und analysiert. Dabei konnten wir nachweisen, dass HRP ein vermindertes Wachstum auf hyperglykämisch modifizierter EZM aufweisen. ASC proliferierten im Vergleich dazu weitgehend unbeeinflusst von den erhöhten Glukosekonzentrationen.

Um die morphologischen und funktionellen Gemeinsamkeiten von ASC und HRP besser zu verstehen, führten wir vergleichende FACS-Analysen, Differenzierungsassays und Immunfluoreszenzverfahren durch. Dabei konnten wir zeigen, dass ASC und HRP sowohl in ihrer Oberflächenexpression als auch in ihrer Differenzierungskapazität zahlreiche Gemeinsamkeiten aufweisen.

Als Ursache für das unterschiedliche Verhalten von HRP und ASC auf hyperglykämisch-modifizierter EZM postulierten wir zunächst Glukose-bedingte Veränderungen der Zusammensetzung der EZM. Deshalb wurden Laminin, Kollagen IV und Fibronectin mittels Immunfluoreszenz und ELISA nachgewiesen, zeigten jedoch keine quantitativen Unterschiede.

Mit Aussicht auf weiterführende Projekte untersuchten wir im letzten Schritt dieser Arbeit die Veränderungen der Expressionsprofile von ASC, nachdem sie auf EZM kultiviert wurden. Interessanterweise konnten wir dabei feststellen, dass sich die Oberflächenexpression der ASC, durch ihre Kultur auf EZM, in Richtung eines Perizyten-assoziierten Profils verändert.

Zusammenfassend können wir mit dieser Arbeit zeigen, dass ASC eine höhere Resistenz gegenüber hyperglykämisch modifizierter EZM aufweisen als HRP. Des Weiteren scheint es eine Übereinstimmung wichtiger morphologischer Charakteristika zu geben, sowie Anzeichen dafür, dass ASC, milieubedingt in Perizyten-ähnliche Zellen ausreifen können. Aufgrund dessen möchten wir den Einsatz von ASC gegen Erkrankungen die mit einem Perizytenverlust einhergehen, speziell mit Hinsicht auf die DRP, als vielversprechende Therapieoption einstufen.

2 EINLEITUNG

2.1 Diabetes

2.1.1 Diabetes Mellitus und seine Folgen

Diabetes Mellitus ist mittlerweile eine Volkskrankheit, die in den letzten Jahren, speziell in den Industrienationen und Schwellenländern, massive Ausmaße angenommen hat und deren Prävalenz stetig ansteigt. Die Tatsache, dass sich die Zahl der weltweiten Diabetespatienten von 382 Millionen im Jahre 2013 auf 592 Millionen im Jahre 2035 erhöhen wird, gibt einen Eindruck von der Dimension der Erkrankung (1). Diabetes Typ II macht mit 90% den größten Anteil der Diabetespatienten aus. Bei dieser Form des Diabetes kommt es zu einer stetig zunehmenden Insulinresistenz bei gleichzeitiger Pankreasinsuffizienz, die zu einem chronischen Insulinmangel und folglich einer ausbleibenden Regulation der Blutglukosespiegel führt. Im Gegensatz dazu kommt es bei Diabetes Typ I durch Autoimmunreaktionen zu einem Untergang der β -Zellen des Pankreas mit anschließendem Insulinmangel (2). Die beim Diabetes chronisch erhöhten Glukosespiegel bewirken eine Vielzahl von metabolischen, hormonellen und physiologischen Veränderungen im Körper, die zu zahlreichen Sekundärkomplikationen führen (3). Diese bedingen vielfältige Pathologien und werden in mikro- und makrovaskuläre Komplikationen unterteilt. Während in späteren Stadien die makrovaskulären Manifestationen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle vaskuläre Verschlusskrankheit (PAVK) imponieren, stellen sich die ersten Komplikationen meistens im mikrovaskulären Bereich ein, wobei die diabetische Retinopathie, die diabetische Nephropathie sowie die diabetische Neuropathie als prominenteste Vertreter genannt werden müssen (4).

2.1.2 Grundlagen der diabetischen Retinopathie

Die diabetische Retinopathie (DRP) stellt die häufigste mit Diabetes einhergehende Erkrankung dar und ist Nummer eins der Erblindungsursachen im mittleren Erwachsenenalter in der westlichen Welt (5, 6). Von allen Diabetespatienten leiden nach 20 Erkrankungsjahren nahezu alle Typ I Diabetiker und 80% der Typ II Diabetiker an

einer Form der DRP (7). Mit geschätzten 191 Millionen Betroffenen im Jahre 2030 sind die Auswirkungen der DRP hinsichtlich medizinischer, sozialer und ökonomischer Faktoren immens. Dies spiegelt sich unter anderem darin wieder, dass sich die Behandlungskosten für einen Diabetiker mit DRP auf das doppelte eines Diabetikers ohne DRP belaufen (8). Die DRP wird in zwei Formen beziehungsweise Phasen unterteilt, die fließend ineinander übergehen. Bei der frühen Form handelt es sich um die nicht-proliferative DRP, die sich durch Mikroaneurysmen und Hämorrhagien charakterisiert und zu einem zunehmenden Gefäßuntergang führt. Histologisch findet man azelluläre, akkumulierte Kapillaren mit verdickter Basalmembran. Im fortgeschrittenen Stadium, der sogenannten proliferativen DRP, kommt es zu exzessiven Neovaskularisationen mit abnormalen, instabilen Gefäßen, die im Verlauf zu Einblutungen und Netzhautablösungen führen können und meist in einem Makulaödem enden (9-11).

2.1.3 Pathophysiologische Mechanismen der diabetischen Retinopathie

Die genauen Abläufe beim Diabetes Mellitus und damit auch der DRP, sind komplex und nicht vollständig geklärt (12). Fest steht, dass sich die Auswirkungen der Krankheit über verschiedene Pathomechanismen manifestieren. Der Ursprung dieser scheint dabei häufig in den sogenannten „reaktiven Sauerstoffspezies“ (ROS) zu liegen, die durch chronisch erhöhte Glukosespiegel vermehrt in den Mitochondrien gebildet werden. Diese Superoxide inhibieren das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) der Glykolyse, was zu einem Überschuss an Metaboliten des Glukoseabbaus führt (13). Daraus hervorgehend konnte man bislang vier unabhängige Mechanismen ausmachen die an der Entstehung von vaskulären Schäden beteiligt sind (14):

- 1) Aktivierung des Proteinkinase-C-Wegs (PKC)
- 2) Bildung von „advanced glycation endproducts“ (AGEs)
- 3) Aktivierung des Polyolwegs
- 4) Aktivierung des Hexosaminwegs

Pathophysiologie des Diabetes

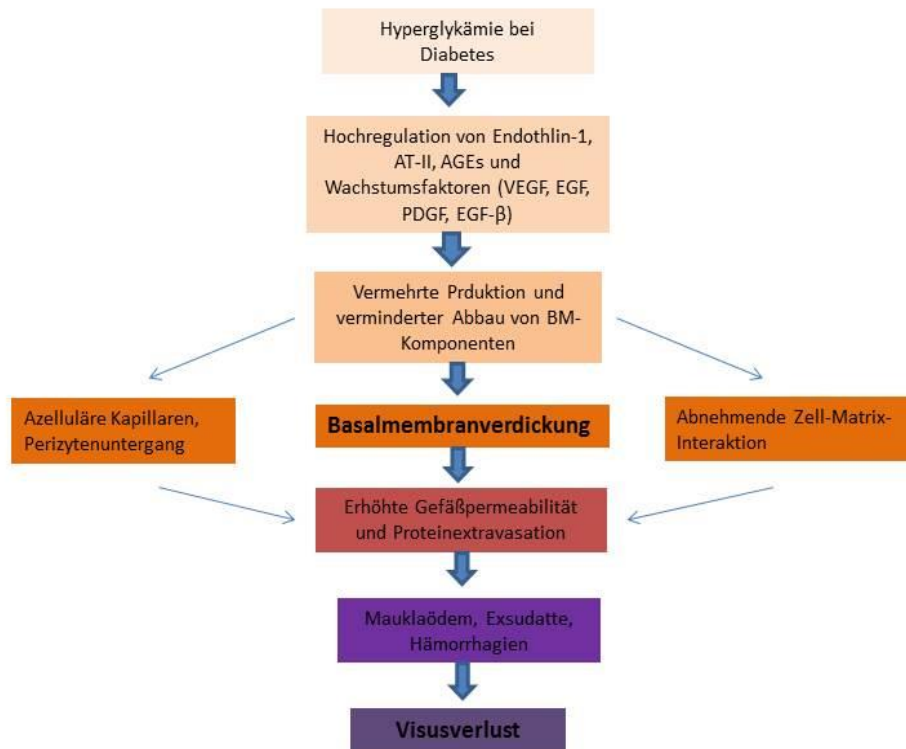


Abbildung 1: Pathomechanismen der DRP nach Roy 2015 (15)

Die genauen biochemischen und pathophysiologischen Prozesse dieser diabetesbedingten Veränderungen sind ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Man weiß aber, dass sie unter anderem zu oxidativem Stress, einem veränderten Blutfluss, gestörter Zellinteraktion, proinflammatorischer Genexpression und der Erhöhung von vaskulärem endotheliale Wachstumfaktor (VEGF) führen. VEGF, ein Wachstumfaktor bewirkt wiederum eine erhöhte Gefäßpermeabilität, einen gesteigerten Blutfluss, eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten und vor allem die Bildung von Neovaskularisationen mit den oben umschriebenen Folgen (13, 16).

Dank intensiver Forschung in den letzten Jahren konnte man einige Signalwege besser verstehen, die wesentlich an der Progression der DRP beteiligt sind. Dabei hat sich gezeigt, dass viele der diabetesbedingten Veränderungen von Signalwegen und an Rezeptoren mit einer vermehrten Produktion beziehungsweise veränderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) einhergehen (17). Die EZM bildet die nach abluminal liegende Basalmembran der Endothelzellen und wird überwiegend durch diese selbst sezerniert. In diese aus EZM bestehende Basalmembran

eingebettet liegen sogenannte Perizyten welche die Endothelzellen mit ihren Fortsätzen umschließen und mit ihnen interagieren. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde schon sehr früh eine Assoziation zwischen der Verdickung dieser Basalmembran und dem PZ-Untergang im Zuge der DRP festgestellt (18-20) (siehe auch Kapitel 2.2). In den letzten Jahren konnte man nachweisen, dass diese EZM Veränderungen zu einer gestörten Zell-Zell-Interaktionen zwischen Perizyten und dem Endothel führen (21, 22). Im Folgenden werden die wichtigsten Zielstrukturen aufgeführt, die man in diesem Zusammenhang ausmachen konnte. Zu ihnen gehören PDGF-B, TGF- β , Ang-1, Ang-2, Notch und Gap junctions (23). PDGF-B zum Beispiel wird von EZ sezerniert und ist unter anderem für die Rekrutierung von PZ während der Angiogenese verantwortlich. Mäuse, bei denen entweder PDGF-B oder deren Rezeptor, PDGFR- β auf den PZ, genetisch inaktiviert wurden, zeigten nahezu identische Phänotypen und waren schon im Embryonalstadium aufgrund von vaskulären Dysfunktionen nicht lebensfähig (24). Dauerhaft erhöhte Glukosespiegel, führen zu einer eingeschränkten Funktionsweise dieses PDGF-B vermittelten Signalweges was zur Apoptose der PZ führt (25), die wiederum eine überschießende Endothelzellproliferation zur Folge hat (26). Enge et. al. konnte feststellen, dass es dadurch zu einem Verlust von über 50% des sogenannten „Perizytencoverings“ um die Endothelzellen kommen kann. Dadurch gehen die gefäßregulierenden und modulierenden Einflüsse der PZ auf das Endothel zunehmend verloren, was letztendlich zum Funktionsverlust und unkontrollierten Wachstum der Endothelzellen führt (27, 28). Dieses unkontrollierte Wachstum scheint nicht nur zu Beginn der DRP sondern auch beim Übergang der nicht-proliferativen in die proliferative DRP eine Rolle zu spielen (11, 29). Die Forschung der letzten Jahre hat des Weiteren ergeben, dass inflammatorische Prozesse eine ausschlaggebende Rolle spielen (30). Das Zusammenspiel all dieser Prozesse führt zu einem kontinuierlicher Untergang von PZ, dem sogenannte Perizyten „drop-out“ (28, 31).

2.1.4 Schlüsselfunktion von Perizyten in der Angioarchitektur der Retina

Im zentralen Nervensystem (ZNS) und damit auch in der Retina, ist die sogenannte neurovaskuläre Unit (NVU), die kleinste funktionelle Einheit, die die Schnittstelle zwischen vaskulären und neuronalen Strukturen bildet. Sie ist für die physiologische und biochemische Aufrechterhaltung der Blut-Hirn- (BBB) und Blut-Retina-Schranke (BRB) verantwortlich. In dieser Rolle nimmt sie Einfluss auf Transportprozesse, die

Toxinelimination und den kapillären Blutfluss (32). Zusammengesetzt aus gefäßbildenden und neuronalen Anteilen vereinen sich in der NVU Perizyten (PZ), Neuronen, Makro- und Mikrogliazellen, Endothelzellen (EZ) und vascular smooth muscle cells (vSMC) zu einer hochkomplexen Struktur (5, 33). PZ scheinen in der Angioarchitektur der NVU eine Schlüsselfunktion einzunehmen. Ihre gestörte Funktion hat massive Auswirkungen auf die Zellkommunikation und ist neben Diabetes mit zahlreichen weiteren, meist neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung zu bringen (23, 34). Im Verlauf der DRP kommt es zum Zusammenbruch und Funktionsverlust der NVU die zu einer progredienten Insuffizienz der BRB führt (21, 22).

2.1.5 Therapie der diabetischen Retinopathie

Klinische Folgen der DRP sind die beschriebenen Ausbildungen von Mikroaneurysmen, Gefäßanomalien und Kapillarverschlüssen und in späteren Stadien Neovaskularisationen, die auf Dauer in ein Makulaödem übergehen (35). Trotz jahrelanger intensiver Forschung beschränkte sich die Therapie der DRP, mangels Alternativen, auf eine gute Einstellung von Blutzucker, Blutdruck und Fettwerten. In fortgeschrittenen Stadien mit Makulaödem ist die Lasertherapie das Mittel der Wahl, wobei auch diese meist nur als schadensbegrenzend anzusehen ist (36). In den letzten Jahren zeigten vielversprechende Ergebnisse, dass die intravitreale Injektion von Anti-VEGF-Antikörpern und Steroiden zu einer Abnahme der Neovaskularisationen führte. Jedoch sprechen diese Verfahren nicht bei allen Patienten gleichermaßen an (37). Deshalb ist es von höchstem Interesse neue „*Targets*“ für die Therapie der DRP zu finden. PZ mit ihrer Lage zwischen den vaskulären und neuronalen Komponenten des ZNS und ihrem entscheidenden Einfluss auf die Gefäßhomöostase haben dadurch in den letzten Jahren eine zunehmende Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Ein therapeutischer Weg zur Verhinderung des „*Perizyten drop-out*“ oder gar Zellersatztherapien, könnten die Progredienz der DRP entscheidend beeinflussen (38) (2.4.4).

2.2 Extrazelluläre Matrix (EZM)

2.2.1 Aufbau und Funktion der EZM

Die extrazelluläre Matrix ist ein Netzwerk aus Proteinen und Proteoglykanen, die ein Mikroklima für die zelluläre Entwicklung, Homöostase und Regeneration bereitstellt (39). Die mechanischen Eigenschaften und die biochemische Komposition der Matrixkomponenten nehmen dabei entscheidenden Einfluss auf Zelladhäsion und Wachstumsverhalten (40). Im Gefäßsystem bilden sie ein Gerüst, das an zahlreichen strukturellen sowie biochemischen Prozessen beteiligt ist und über Proteine Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden nimmt (41). Sie spielt unter anderem bei der Zellmigration, der interzellulären Kommunikation sowie der Wundheilung eine entscheidende Rolle (41-43). Wichtige Bestandteile der EZM sind Fibronectin, Kollagen Typ IV, Laminin sowie Heparansulfatproteoglykane. Ihre komplexe Zusammensetzung ist entscheidend für die Integrität und Funktionalität der Matrix und wird durch äußere Reize beeinflusst (15). Über spezifische Liganden der EZM die mit transmembranären Integrinen der Zelle in Bindung gehen, kommt es zur Zell-Matrix Interaktion. Diese sogenannten fokalen Kontakte können als Brücke zwischen Intra- und Extrazellulärraum angesehen werden und ermöglichen eine wechselseitige Integration und Kommunikation von Umwelteinflüssen (44).

2.2.2 EZM-Veränderungen im Zuge der diabetischen Retinopathie

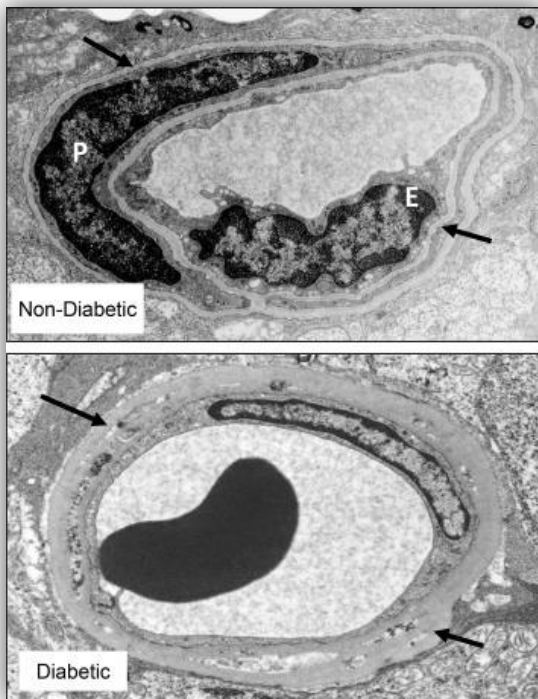


Abbildung 2: Diabetes bedingte Basalmembranverdickung:

In der oberen Abbildung ist ein Kapillarquerschnitt eines gesunden Menschen dargestellt. Mit E markiert sieht man die Endothelzelle, die das Gefäßlumen bildet und nach abluminal von einer Basalmembran (Pfeile) umgeben ist in der eingebettet ein Perizyt liegt. Im zweiten Bild ist ebenfalls eine Kapillare angeschnitten, in dem Fall eines Diabetikers. Die Pfeile deuten auf die deutliche Verdickung der Basalmembran hin. Aus Stitt 2015 (4)

Wie schon erwähnt bestehen retinale Kapillaren aus Endothelzellen die nach abluminal, abhängig vom Gewebe und Gefäßsegment, unterschiedlich stark von Perizytenfortsätzen umschlungen werden (2.3.1.). Die Zellkörper der Perizyten liegen dabei eingebettet in die EZM, die überwiegend von den Endothelzellen und in Teilen von den Perizyten selbst sezerniert wird, und über die die Zellen miteinander in Kontakt stehen (38) (45). Im Zuge der DRP kommt es zu einer signifikanten, histologisch sichtbaren Verdickung der Basalmembran die als Markenzeichen der DRP angesehen werden kann (46). Mittlerweile weiß man, dass diese Verbreiterung der Basalmembran durch eine exzessive Akkumulation von extrazellulärer Matrix (EZM) verursacht wird (47). Neben

dieser quantitativen Akkumulation von EZM, kommt es ebenfalls zu einer qualitativen Veränderung der EZM durch eine Änderung der Zusammensetzung des Matrixproteinkomplexes. Dabei reagieren die verschiedenen Komponenten der EZM unterschiedlich auf den hyperglykämischen Stress. So steigt die Expression von Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV an, während die Expression der heterogenen Gruppe der Heparansulfatproteoglykane vermindert wird. Des Weiteren kommt es zu einer verminderten Expression von „Gap junction“ Proteinen mit konsekutiver Reduktion der Zell-Zell-Kommunikation. Auf der anderen Seite wird die Expression von Integrinen erhöht (15). Ein weiterer Faktor der Matrixakkumulation ist neben dem unkontrollierten Matrixaufbau ein gestörter Abbau von Matrixkomponenten. Durch hohe Glukosewerte kommt es anscheinend zu einem gestörten Abbau von EZM –

Bestandteilen durch Matrix-Metalloproteinasen (48). Die Summe dieser Effekte führt zur zunehmenden Verdickung der Basalmembran. Paradoxe Weise kommt es dadurch zu einer steigenden Gefäßpermeabilität sowie einem unkontrollierten Ausprießen von Neovaskularisationen welche auf Dauer zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke führen (2.1.3) (49). Das klinische Bild imponiert mit den in Kapitel (2.1.2) beschriebenen Beeinträchtigungen die mit einem zunehmenden Visusverlust einhergehen.

2.2.3 Die EZM als „Target“ der Diabetestherapie

Aufgrund der beschränkten Möglichkeiten in der Therapie von diabetesassoziierten mikrovaskulären Komplikationen (2.1.5) speziell bei der DRP, hat man auf der Suche nach „*Target Strukturen*“ neben Perizyten auch zunehmend die EZM ins Auge gefasst. Die Forschung war dabei darauf konzentriert, einzelne Schritte dieser multifaktoriellen Genese zu entschlüsseln und dabei gegebenenfalls therapeutische Zielstrukturen auszumachen. Man konnte man zum Beispiel feststellen, dass die bereits erwähnten AGEs vermehrt in der EZM akkumulieren und eine Ursache für deren veränderte Zusammensetzung ausmachen. Hinzu kommt, dass sie über Proteinveränderungen unter anderem zu einer vermehrten Quervernetzung der Matrixmoleküle führen und somit deren Elastizität vermindern (50). Des Weiteren gelang es genregulatorische Signalwege auszumachen, über deren Modulation positiv auf die Basalmembranveränderungen eingewirkt werden konnte und somit die Progression der DRP zumindest eingeschränkt wurde (51). Ein Beispiel dafür ist die intravitreale Injektionen von kombinierten Antisense-Oligonukleotiden, welche der Verdickung der Basalmembran entgegenwirken und somit den Perizytenuntergang sowie die Gefäßleckage signifikant verringern konnten (52). Neben dem therapeutischen Effekt, beweisen diese Experimente, dass eine Verdickung der Basalmembran, und der mit ihr einhergehende Perizytenuntergang pathophysiologisch hochrelevant für die Entstehung der DRP sind.

2.3 Perizyten

2.3.1 Geschichte, Morphologie und Lokalisation von Perizyten

Der deutsche Anatom Karl Wilhelm Zimmermann führte 1923 den Begriff Perizyt (PZ) ein, mit dem er einen Zelltyp umschrieb, der in den Kapillaren und postkapillären Venolen einer Vielzahl von Geweben nachweisbar war, kontraktile Eigenschaften inne hatte und über charakteristische, die Gefäße der Mikrozirkulation umschließende Fortsätze verfügte (53). Erstbeschreibungen dieser Zellen gehen auf die Jahre 1871 beziehungsweise 1873 zurück, in denen Eberth und Rouget sie bereits erwähnt hatten (54).

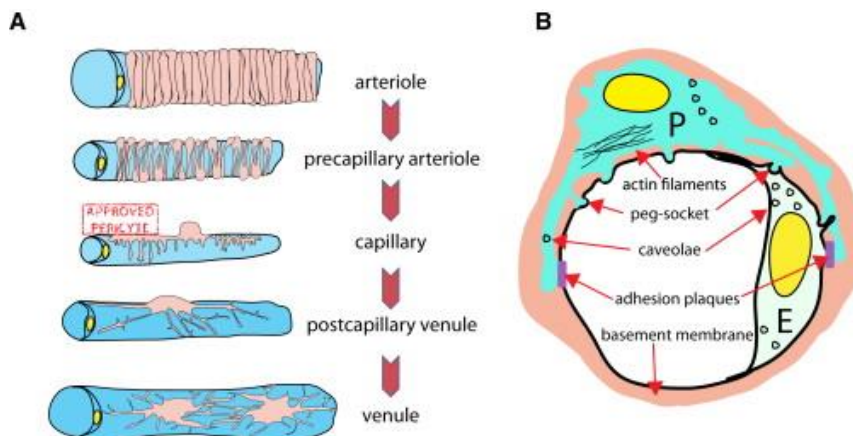


Abbildung 3: Anatomie der Perizyten: Armulik 2011 (55)

Die Abbildungen des Abschnitts A zeigen schemenhaft die unterschiedliche Dichte und Verteilung der Perizyten, abhängig vom jeweiligen Gefäßabschnitt. Abbildung B zeigt in einem Gefäßquerschnitt die spezifische Lokalisation der Perizyten. Sie umschlingen das Endothel mit ihren weit verzweigten Ausläufern und kommunizieren über verschiedene Zell-Zell Kontakte mit diesem.

Im Vergleich zu anderen Zellen des Mikrogefäßsystems, liegen PZ direkt in der Basalmembran von Kapillaren eingebettet, die sie gemeinsam mit den Endothelzellen sezernieren und über die sie mit dem Endothel in Kontakt stehen (16). Sie bilden vom Zellkörper ausgehende, parallel zu den Gefäßen verlaufende, lange, zytoplasmatische Fortsätze, die sich wiederum auf zweigen und mit den Endothelzellen (EZ) interdigitierende Kontakte bilden (54). An diesen sogenannten „pocket-and-socket“ Kontakten ist die Basalmembran unterbrochen und die Zellen stehen über „gap junctions“, „tight junctions“ sowie „adherens junctions“ miteinander in Verbindung (56, 57). Man vermutet, dass an diesen Punkten, neben der Signalübertragung auch eine mögliche Übertragung kontraktiler Kräfte von PZ auf die EZ stattfindet (16, 20, 58).

Die Anzahl von PZ sowie der prozentuale Anteil, mit dem sie die Endothelzellen „ummanteln“ variiert sowohl nach Spezies, Funktion des Gewebes sowie der Lokalisation in deren Mikrogefäßsystem. Beim Menschen liegt das „Covering“ der Endothelzellen durch Perizytenfortsätze zwischen ca. 10% und 50% Prozent, wobei noch keine einheitlichen Daten von allen Geweben vorliegen (59). Fest steht, dass sie einem gewissen Muster folgen und nicht zufällig verteilt sind. So finden sich vermehrt PZ an Kapillaraufzweigungen, umgekehrt liegt im Bereichen des Gas und Stoffaustausches nahezu kein „Perizytencovering“ vor (23, 33). Am höchsten ist die Perizyten-dichte in neuronalen Geweben, speziell der Retina. Ebenso verhält es sich mit dem Verhältnis von PZ zu EZ, mit 1:100 im Skelettmuskel zu 1:1 in der Retina (34, 60, 61). Die Lokalisation und die phänotypischen Ähnlichkeiten zu glatten Muskelzellen, führten früh zu der Annahme, dass PZ Äquivalente der glatten Muskelzellen in der Mikrozirkulation darstellen. Der Nachweis von „ α -smooth muscle actin“ (α -SMA) und der „cGMP dependent kinase“ (cGK), die in vergleichbaren Konzentrationen wie in glatten Muskelzellen (vSMC) vorkommen und beide an kontraktile Prozesse beteiligt sind, stützt diese Annahme (62).

2.3.2 Gewinnung und Funktion von Perizyten

Ihrem Vorkommen entsprechend gewinnt man PZ meist aus Mikrogefäßfragmenten. Dabei bedient man sich der enzymatischen Verdauung dieser mit anschließender Immunoselektion, oder versucht die Zellen direkt aus den isolierten Mikrogefäßfragmenten auswachsen zu lassen (63). Mittlerweile wurden durch diese Methoden PZ unter anderem aus Haut, Retina, Pankreas, Fett, Skelettmuskel, Plazenta und fetalem Gewebe gewonnen, wobei die Verfahren teilweise stark variieren und sich aufgrund eines fehlenden spezifischen Markers die Charakterisierung der Zellen sehr uneinheitlich darstellt (61). Ende der 80er Jahre konnte man experimentell nachweisen, dass PZ *in vitro* Kollagenetze kontrahieren und positiv auf vasoaktive Substanzen wie Serotonin und Histamin reagieren. Dabei verhielten sie sich, abhängig von Konzentration und Botenstoff, sowohl dilatierend als auch konstriktorisch (64, 65). Eine Studie bei Mäusen konnte eine Ischämie-bedingte PZ-Kontraktion nachweisen (66). Trotzdem steht ein klarer *in vivo* Nachweis für die genaue Funktionsweise und tatsächliche Leistung der perizytären Kontraktion beim Menschen nach wie vor aus. Ihre hohe Konzentration in hochdifferenzierten Geweben deutet auf die zentrale Funktion die PZ im Zuge der Angioarchitektur innehaben hin. So verwundert es nicht,

dass sie im ZNS als elementarer Bestandteil der „NVU“ entscheidend an der Gefäß-homöostase beteiligt sind. Neben direkten Zell-Zellkontakten stimulieren PZ das Endothel ebenfalls über parakrine Stimulation und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (2.1.3 + 2.1.4) (67). Die Tatsache, dass eine gestörte Perizyten Funktion mit diversen pathologischen Prozessen einhergeht, ist in zahlreichen Versuchen nachgewiesen. In Anbetracht ihrer Lokalisation und Funktion verwundert es nicht, dass es sich dabei oft um Gefäßerkrankungen handelt. Mit der diabetischen Retinopathie, der arteriellen Hypertonie sowie zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen seien nur einige prominente Vertreter genannt (28, 55, 68, 69). Auch bei einigen Tumorerkrankungen scheinen PZ aufgrund Ihrer angiogenen Eigenschaften eine Rolle zu spielen (28, 70-73).

2.3.3 Charakterisierung von Perizyten

Die Schwierigkeiten einer einheitlichen funktionellen Einordnung von Perizyten spiegeln sich auch in ihrer Charakterisierung wieder, die durch ihre morphologische sowie molekulare Heterogenität erschwert ist. Zum Beispiel exprimieren die PZ aus den Bereichen der prä-, und postkapillaren Gefäßabschnitte reichlich α -SMA, eines der aktuell gängigen Markerproteine für PZ, während dies in den mittelkapillären Bereichen kaum oder nur rudimentär nachweisbar ist (74). Weitere Schwierigkeiten bestehen darin, dass die Phänotypen je nach Spezies, Gefäßsegment, Organsystem, pathologischen Prozessen sowie dem Entwicklungsstadium der Zellen, teils stark variieren (75). Diese Problematik findet sich ebenfalls bei der Herkunftsbestimmung der PZ wieder. Eine mittlerweile als gesichert geltende Erklärung dafür ist, dass PZ aus verschiedenen Progenitoren hervorgehen (61). Im zentralen Nervensystems zum Beispiel scheinen sie sowohl mesodermalen als auch neuroektodermalen Ursprungs, je nach Lokalisation entlang des zerebrovaskulären Stammbaums zu sein, während sie in der Peripherie rein mesodermalen Ursprungs sind (76, 77). Des Weiteren wurden auch bei ausgewachsenen Menschen, ähnlich den endothelialen Vorläuferzellen, zirkulierende PZ-Vorläufer nachgewiesen. Diese stammen dem Knochenmark ab, sind demnach mesodermalen Ursprungs und wandern zum Beispiel unter ischämischen Bedingungen in die betroffenen Gewebe ein. Sie finden sich aber auch in Tumoren wieder, wo sie ebenfalls zu PZ ausdifferenzieren (76, 77). Durch ihre Beteiligung an Prozessen wie dem Gefäßremodeling und der Gefäßneubildung spricht

man den PZ mittlerweile eine Schlüsselfunktion bei der Gefäßhomöostase zu (78). Abbildung 4 (55) zeigt eine Auflistung der aktuell etabliertesten Marker für murine Perizyten. Aufgrund der erwähnten Schwierigkeiten einer einheitlichen Zuordnung werden sie meist in Kombination genutzt und mit morphologischen sowie anatomischen Kriterien ergänzt.

Tabelle 1: Humane murine Perizytenmarker: Nach Armulik 2011 (55)

| Marker | Gewebe die diesen Marker exprimieren | Referenz |
|---------|--|----------------------------|
| PDGFR-β | MSCs, glatte Muskelzellen, Progenitoren im ZNS, Myofibroblasten | Winkler, 2010 |
| NG2 | Muskel, Knochen, Fettzellen, Progenitoren von Neuronen und Oligodendrozyten, vSMCs | Huang, 2010 |
| CD13 | vSMC, entzündetes oder tumoröses Endothel, | Kunz, 1994 |
| α-SMA | Glatte Muskelzellen, Myofibroblasten, Myoepithel | Nehls und Drenckhahn, 1993 |
| Desmin | Skelettmuskel, Herzmuskel, glatte Muskulatur | Nehls, 1992 |

Um einer einheitlichen Charakterisierung von PZ näher zu kommen, haben Crisan und Kollegen, mittels Färbungen und FACS-Sortierung, PZ auf mehrere Markerkombinationen getestet. Daraus ging hervor, dass nahezu alle mikroskopisch nachgewiesenen perivaskulären Zellen die Marker CD146, NG2, ALP sowie PDGFR-β exprimierten sowie für α-SMA in den prä-, und postkapillären Bereichen positiv waren. Gleichzeitig waren die Zellen alle negativ für „klassische“ endotheliale Marker wie CD34, vWF, CD31 und CD144 und den hämatopoetischen Marker CD45 (61). Interessant ist, dass es in Differenzierungsversuchen gelang, PZ in die für MSC obligatorischen, mesodermalen Linien (osteogen, chondrogen, adipogen) mit vergleichbarem Potential auszudifferenzieren (2.4.3) (79).

Aufgrund der Gemeinsamkeiten zwischen MSCs und Perizyten, hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials, der Oberflächenexpression sowie morphologischen Kriterien stellt sich zunehmend die Frage, in wie weit die beiden Populationen je nach Entwicklungsstadium als verwandt angesehen werden können. Ob es sich dabei um auseinander hervorgehende oder stark artverwandte Zellgattungen handelt, ist bis dato unklar und wird im Verlauf dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielen (61, 80). In jedem Fall scheint es auch funktionelle Überschneidungen zwischen den beiden Zelllinien zu geben. Dies ist hochinteressant da der zelltherapeutische Einsatz von MSCs bereits für zahlreiche Erkrankungen etabliert ist (2.4.4). Aufgrund dessen wurden MSCs in den letzten Jahren als Therapieoption für Erkrankungen die mit einem Perizytenuntergang einhergehen, speziell der DRP, in Betracht gezogen. Zahlreiche experimentelle Studien konnten dabei tatsächlich einen positiven Effekt von MSCs auf die Progredienz von Erkrankungen zeigen, die mit einem Perizytenuntergang assoziiert sind (2.4.4).

2.4 Mesenchymal-stromale Zellen

2.4.1 Geschichte, Morphologie und Lokalisation von MSCs

Mesenchymal-stromale Zellen, oder auch mesenchymale Stammzellen genannt, sind adulte Zellen, die sich zunächst durch ihre stromalen und multipotenten Differenzierungseigenschaften ausgezeichnet haben, so dass man ihnen Stammzellfähigkeiten zugeordnet hat. Stammzellen sind undifferenzierte Vorläuferzellen, mit der Fähigkeit, zur Proliferation, Selbsterneuerung und Produktion differenzierter, funktioneller Nachfolger (81). Im Morulastadium, kurz nach der Befruchtung sind die Stammzellen noch omnipotent, was bedeutet, dass sie in alle Zelltypen des entstehenden Organismus differenzieren können ebenso wie in die extraembryonalen Gewebe. Gleichzeitig verfügen sie über uneingeschränkte Selbsterneuerungskapazitäten. Im Laufe des Wachstums und der Differenzierung eines Organismus, über die Blastozyste, die drei Keimblätter und letztendlich die einzelnen Organsysteme reduziert sich dieses Potential. Nichts desto trotz verbleiben bis ins hohe Alter Zellen in nahezu allen Geweben des Körpers, die, wenn auch eingeschränkt, über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Gewebe verfügen. Man bezeichnet sie als adulte Stammzellen und unterteilt sie je nach ihrem Herkunftsgewebe und ihrem Differenzierungspotential in hämatopoetische, neuronale, gastrointestinale, epidermale,

hepatische und mesenchymale Stammzellen. Weil für letzteren Zelltyp jedoch die Fähigkeit zur klonalen Selbsterneuerung umstritten ist, hat sich mittlerweile der Begriff mesenchymal-stromale Zelle etabliert, die Abkürzung MSC ist jedoch geblieben (4, 82). MSC wurden bereits in den 70er Jahren in der Umgebung hämatopoetischer Stammzellen, den bis heute am besten verstandenen adulten Stammzellen, beschrieben. Friedenstein stellte fest, dass einzelne Ableger dieser fibroblastoid und adhärent wachsenden Zellen, Kolonien ausbilden und über osteogenes Potential verfügten. Schon während der Anfänge der MSC-Forschung sah man eine enge Assoziation zu der sogenannten hämatopoetischen Stammzellnische (83-85). Heute weiß man, dass MSCs sowohl bei der Hämatopoese eine entscheidende regulatorische Rolle einnehmen (86, 87).

2.4.2 Gewinnung und Funktion von MSCs

Die wichtigsten Quellen für MSCs sind das Knochenmark, das Fettgewebe und die perinatalen Gewebe wie Nabelschnur, Nabelschnurblut und Plazenta (88-90). MSC sind vor allem als kultur-adaptierte Zellen charakterisiert, wobei wenig über ihre Funktion und Lokalisation *in vivo* bekannt ist. Aufgrund ihres Vorkommens in nahezu allen (vaskularisierten) Geweben, wurde eine perivaskuläre Lokalisation vermutet und mittlerweile auch bestätigt. Diese Daten, ebenso wie die in Kapitel 2.3.3 erwähnten Charakterisierungen von Crisan et al. legen die Frage nahe, ob alle MSC Perizyten sind oder alle Perizyten MSC (61, 80, 91, 92). Bis heute ist eine eindeutige Antwort ausstehend. Nach heutigem Stand scheint es jedoch so zu sein, dass MSC Vorläufer der Perizyten ausmachen und über ein größeres Potential verfügen (93).

MSC sind aufgrund ihrer einheitlichen Gewinnungsverfahren, ihren *in vitro* Modifikations- und Expansionsmöglichkeiten, sowie ihrem variablen Differenzierungspotential in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend in den Fokus zelltherapeutischer Anwendung gerückt. Neben ihrem regenerativen und trophischen Potential konnte man ihnen diverse immunmodulatorische Fähigkeiten nachweisen (94). Hinzu kommt, dass MSCs durch Ihre geringe Immunogenität sowohl für autologe als auch allogene Transplantationen attraktiv sind (95). Aufgrund dieses vielversprechenden Potentials wird seit einiger Zeit an sogenannten GMP (Good Manufacturing Practice) Standards gearbeitet, welche den sicheren, therapeutischen Einsatz der Zellen garantieren sollen. Das Differenzierungspotential der MSCs, vor allem in nicht-mesenchymale Linien, bleibt jedoch nach wie vor ein umstrittenes Thema. So ergaben Versuche

MSCs in Hepatozyten oder Kardiomyozyten zu differenzieren hinsichtlich der Expressionsprofile vielversprechende Ergebnisse, funktionell ließen sich diese aber nur eingeschränkt nachweisen, geschweige denn reproduzieren (96-98). Selbst bei der Therapie von Knorpel, Knochen und Muskelschäden durch direkte Zellapplikation geht man mittlerweile davon aus, dass die positiven Effekte eher durch die trophischen, progenerativen Eigenschaften der MSCs bedingt sind und nicht allein durch die direkte Ausdifferenzierung der applizierten Zellen. Anders verhält es sich mit den immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Eigenschaften der MSCs, die in den letzten Jahren bereits in zahlreichen klinischen Studien untersucht wurden und vielversprechende Ergebnisse lieferten (9). Die komplexen Mechanismen und Signalwege mit denen MSCs das angeborene sowie das adaptive Immunsystem beeinflussen sind dabei noch lange nicht hinreichend verstanden, einiges lässt sich aber bereits festhalten. MSCs wirken immunsuppressiv indem sie die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Cytokine/lösliche Faktoren sowie direkte Zell Kontakte einschränken und modulieren. Des Weiteren wird die T-Zell Aktivierung indirekt beeinflusst indem die Umwandlung von Monozyten in dendritische Zellen verringert wird, und die Polarisation von Makrophagen zu pro-inflammatorischen Phänotypen verringert wird (86, 99, 100). Der Einfluss von MSCs auf B-Zellen ist weniger gut verstanden, Erste Studien zeigen, dass es auch hier zu einer Immunsuppression durch verminderte Antikörperproduktion der B-Zellen kommt (101).

Fest steht außerdem, dass MSCs zu Verletzungs- und Entzündungsherden wandern was als „*homing*“ bezeichnet wird. Dort angekommen werden sie von Entzündungsmediatoren aktiviert bzw. lizenziert und beteiligen sich daraufhin an der Pathogenelimination und der Organisation der Immunantwort (102-104). Bei letzterem Punkt scheinen MSCs abhängig von „*Toll-Like Receptor*“ (TLR) Signalen, entweder proinflammatorisch oder immunsuppressiv polarisiert zu werden (105, 106). Die oben genannten Vorgänge bewirken aktivierte MSCs durch die Ausschüttung zahlreicher löslicher Faktoren, die sie entweder selber produzieren oder deren Produktion durch Stimulation benachbarter Zellen induziert wird. Einige der bis dato wichtigsten Vertreter dieser Cytokine sind *IDO* (*Indoleamin 2,3-Dioxygenase*), *PGE-2* (*Prostaglandin E-2*), *TSG-6* (*TNF- α Stimulated Gene/Protein 6*) und *NO* (*Nitric Oxide*) (100, 107).

2.4.3 Charakterisierung von MSCs

In den 1990er Jahren begann das Interesse an MSCs exponentiell zu wachsen, nachdem nachgewiesen wurde, dass auch nach wiederholter Zellteilung die Fähigkeit zur Differenzierung in alle mesenchymalen Linien (osteogen, chondrogen, adipogen) erhalten blieb (108). Trotz starker Übereinstimmungen der basalen Charakteristika, unterscheiden sich MSC je nach Herkunftsgewebe (*Lipoaspirat* (LA), Knochenmark (BM), Nabelschnurblut (UCB)) jedoch teils deutlich, sowohl in ihren Differenzierungsmöglichkeiten und Funktionen als auch in ihrem Expressionsmuster (89, 109). Diese Heterogenität der Ausgangspopulationen, bedingt durch verschiedene Ursprungsgewebe und Gewinnungsmethoden sowie unterschiedliche Expansionsverfahren machen eine einheitliche Charakterisierung der MSCs schwierig, sodass es bis heute keinen einheitlichen Marker gibt, um sie vor allem prospektiv zu identifizieren (95, 110). Aus diesen Gründen hat die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) folgende Minimalkriterien für Kultur-expandierte MSCs definiert (111):

- Sie sollten unter Standardkulturbedingungen plastik-adhärent wachsen
- Sie sollten in vitro osteogen, chondrogen und adipogen Differenzieren
- Sie sollten CD 105, CD90 und CD 73 exprimieren und müssen für CD 45, CD 34, CD 14 (CD11b), CD79 α (CD19) und HLA-DR Oberflächenmoleküle negativ sein

Die intensive Forschung und detailliertere Charakterisierung der MSCs in den letzten Jahren, unter anderem im Zuge der Entwicklung der bereits erwähnten GMP-Standards, hat jedoch dazu geführt, die heterogene Familie der MSCs zunehmend in separaten Untergruppen zu betrachten. Ihrer Variabilität hinsichtlich Herkunft, Charakteristik und Funktion gerecht werdend, ermöglichen die so entstandenen spezifischeren Definitionskriterien eine bessere Einteilung der Zellen und erleichtern ihre therapeutische Zuordnung je nach Krankheitsbild. Als Resultat davon, hat sich für MSC die aus Fettgewebe gewonnen werden und bisweilen als LA (*lipoaspirat-derived*)-MSC bezeichnet wurden, mittlerweile der Begriff ASC durchgesetzt, der aus Fettgewebe gewonnene stromale Zellen und Stammzellen umschreibt. Für sie besteht bereits eine an die allgemeinen MSC-Grundlagen adaptierte Charakterisierung die Tabelle 2 zu entnehmen ist (112).

Tabelle 2: Unterschied der Marker-Expression von MSC und ASC: Nach Bourin 2013 (112)

Vor allem die positive Expression von CD36 und häufig negative Expression von CD106 ermöglicht eine Abgrenzung zu den klassischen (BM)-MSC-Markern.

| Oberflächenmarker | MSC | ASC |
|-------------------|-----|-----|
| CD 34 | - | -/+ |
| CD 45 | - | - |
| CD 13 | ++ | ++ |
| CD 73 | ++ | ++ |
| CD 90 | ++ | ++ |
| CD 105 | ++ | ++ |
| CD 36 | - | + |
| CD 106 | + | -/+ |

2.4.4 Therapeutischer Einsatz von MSCs beziehungsweise ASCs

Die umschriebenen, vielfältigen Eigenschaften mesodermal-stromaler Zellen macht man sich mittlerweile bei zahlreichen Erkrankungen, mit häufig immunologischem Ursprung zu Nutze. Ein Beispiel dafür ist die therapieresistente „*Graft versus Host Disease*“ bei der MSCs vielversprechende Resonanz bewirken konnten. Auch bei anderen chronischen Erkrankungen wie der systemischen Sklerose und dem Morbus Crohn kommen sie vermehrt zum Einsatz (113-116). In Folge dessen hat sich auch die Bezeichnung der MSCs als „*Injury drugstore*“ hervorgehoben, da MSCs bei Verletzungen zahlreiche anti-inflammatorische, Mediatoren sezernieren die unter anderem Apoptose vermindern, Narbenbildung minimieren und Mitosen der betroffenen Gewebe anregen und damit grundlegend zur Regeneration geschädigter Gewebe beitragen (117, 118). Eine weitere sehr entscheidende Funktion bei diesen regenera-

tiven Prozessen ist die Beteiligung der MSCs an der Angiogenese. Vor allem bei der Invagination neuer Gefäße in die extrazelluläre Matrix scheinen MSCs, herkunftsbabhängig über wechselnde *Pathways*, eine entscheidende Rolle bei der dafür notwendigen Proteolyse zu spielen (13, 119, 120).

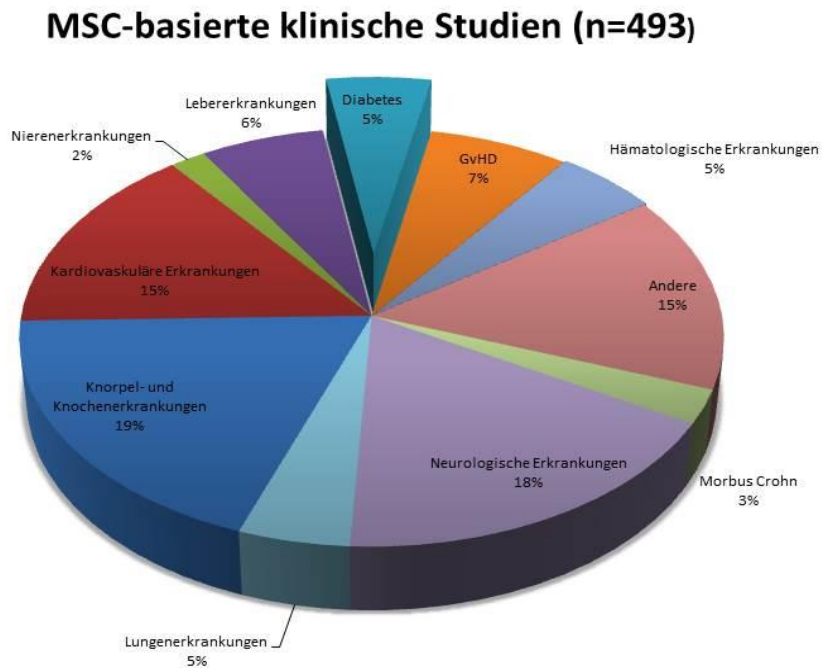


Abbildung 4: MSC basierte klinische Studien bis Juni 2015 (clinicaltrials.gov).

Man kann erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt der Schwerpunkt des MSC-Einsatzes vor allem auf ihrem regenerativen Potential (kardiovaskulär, Knorpel, Knochen, neurologische Erkrankungen (vor allem Multiple Sklerose und Rückenmarksverletzungen)) liegt. Aufgrund der zunehmenden Erkenntnis über die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSC ist ihr Einsatz in Gebieten wie der GvHD, der Hämatologie und gegen Diabetes und seine Folgen in den letzten Jahren rapide angestiegen.

Ein weiteres Feld bei dem der Einsatz von MSCs hoffnungsvolle Aussichten bietet, ist die Behandlung des Diabetes. In Tierversuchen konnte in mehreren Experimenten bereits nachgewiesen werden, dass durch MSC Applikation, die beschädigten β -Zellen wieder regeneriert werden können und als Folge dessen eine verbesserte Insulinproduktion resultiert. In einzelnen Versuchen gelang es sogar, dass MSCs in den β -Zellen des Pankreas ähnliche Zellen differenzierten und unter anderem Glukagon sowie Insulin eigenständig produzierten. Neben der Senkung des Blutglukosespiegels konnten MSCs darüber hinaus, durch ihre immunmodulatorischen und pro-

regenerativen Fähigkeiten, entscheidenden Einfluss auf zahlreiche Diabeteskomplikationen nehmen (31, 121-124). Speziell in Bezug auf die DRP zeigen aktuelle Versuche hoffnungsvolle Ergebnisse. So konnte die intravitreale Injektion von MSCs retinale Schäden durch oxidativen Stress bei Mäusen verringern (125) und die Gefäßschäden reduzieren (126, 127).

Interessant ist, dass diese Versuche bei der Verwendung von ASCs bessere Ergebnisse erbrachten als mit BM-MSCs. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ASCs eine Subpopulation vaskulärer Vorläuferzellen enthalten (was auch ihre abweichenden Oberflächenprofile erklären würde). Gegebenenfalls können diese Vorläufer nach Injektion in die Retina zu Perizyten differenzieren und deren gefäßstabilisierenden Eigenschaften ersetzen (128). Aufgrund dieser Ergebnisse, haben wir uns nach einigen Vorversuchen dazu entschieden, unsere Experimente einheitlich mit ASCs durchzuführen. Trotz der großen Hoffnungen, die auf den MSC/ASC ruhen, wirft ihre Handhabung und Anwendung auch zahlreiche Probleme und Fragen auf. Wissenschaftlich gesehen muss man festhalten, dass die meisten Erkenntnisse, die über MSC/ASC bestehen, aus *in vitro* Versuchen stammen. Da aber sowohl der perivaskuläre Bereich als auch die Stammzellnischen, in denen man MSC/ASC *in vivo* vermutet, hochkomplexe Mikromilieus darstellen, ist die Übertragung der bisherigen Ergebnisse von der „*Bench*“ auf den Organismus nur bedingt möglich. Hinzu kommt dass die Variabilität der MSCs, die sich einerseits aus ihrer heterogenen Population an sich, und andererseits von Kulturmedium, Wachstumsbedingungen und Herkunftsgewebe, sowie zahlreichen anderen Faktoren abhängen, ein standardisiertes „Produkt“ für den medizinischen Gebrauch schwierig gewinnbar machen (88, 95). Als „Stammzelle“ oder zumindest der Teilung und Differenzierung befähigte Zelle, bergen MSC/ASC auch das Risiko einer malignen Transformation. So konnten Miura und Kollegen nachweisen, dass es in fortgeschrittenen Passagen von BM-MSCs der Maus zunehmend zu spontanen malignen Transformationen kam, die sich in zahlreichen Organen in Form von Fibrosarkomen manifestierten (129). Für die Zukunft entscheidende Schwerpunkte in der Anwendung von MSC/ASC werden ihre einheitliche Kultivierung, die ideale Applikationsform (systemisch/lokal) und damit verbunden ihr gezieltes „*homing*“ zu den gewünschten Zielstrukturen im Organismus sein. Neben der Optimierung und Ausweitung der GMP-Standards muss das Ziel der nächsten Jahre ein noch besseres Verständnis der einzelnen MSC/ASC bedingten Abläufe „*in vivo*“ sein, um das ideale Gleichgewicht zwischen therapeutischem Potential und

eventuellen Nebenwirkungen für den experimentellen Einsatz der Zellen zu finden. Als Voraussetzung dafür erschien es uns sinnvoll neben einer detaillierten Charakterisierung der Zellen durch ihre Aussaat auf EZM, ein Modell zu schaffen, welches in vivo Veränderungen im Zuge der DRP möglichst gut simuliert. Durch den zusätzlichen Vergleich der ASC mit verschiedenen Perizyten, erhofften wir uns Aufschluss über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Populationen.

2.5 Zielsetzung

Dieser Arbeit liegt die Hypothese zu Grunde, dass ASC bei Erkrankungen, die mit einem Perizytenverlust einhergehen, wie z.B. der diabetischen Retinopathie, eine mögliche Option im Rahmen zellbasierter Therapien darstellen. Der „*Perizyten Drop-Out*“ ist schon lange mit der DRP assoziiert und stellt, zusammen mit der EZM-Verdickung ihre erste morphologische Veränderung da. Ursache dafür scheinen qualitative und quantitative Veränderungen der EZM zu sein, in deren Folge die Kommunikation von Perizyten und Endothel zunehmend abnimmt. Diese Empfindlichkeit gegenüber hoher Glukose hat die kooperierende Arbeitsgruppe um E. Beltramo im Paper *“Thiamine and benfotiamine prevent apoptosis induced by high glucose-conditioned extracellular matrix in human retinal pericytes”* bereits belegt (35). Unser Ziel war es, das Verhalten von ASC gegenüber hohen Glukosewerten zu untersuchen und mit dem der retinalen Perizyten zu vergleichen. Wir postulieren, dass sich ASC deutlich von retinalen Perizyten unterscheiden und im Vergleich zu diesen resistenter in Bezug auf Adhäsion, Proliferation und Apoptose, gegenüber hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix sind. Unterstützt wurden diese Überlegungen durch Modellversuche der letzten Jahre, in denen bereits erfolgreich ASCs gegen die Progression der DRP eingesetzt wurden (2.4.4). In dieser Arbeit wurde daher EZM von Endothelzellen, die in normaler und hoher Glukose kultiviert worden waren, generiert und anschließend die Adhäsion und Proliferation von ASC im Vergleich zu HRPs auf diesen verschieden modifizierten Matrizes untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf dem direkten Vergleich der beiden Zellpopulationen, ASC und HRP. Anschließend sollten mögliche EZM-Veränderungen in Folge der Hyperglykämie charakterisiert werden. Mittels ELISAs und Immunfluoreszenzfärbungen untersuchten wir die EZM sowie Zelllysate und Supernatant auf Veränderungen der Proteinzusammensetzung.

Des Weiteren wollten wir untersuchen, ob sich funktionelle und morphologische Unterschiede den Zelllinien selbst zuweisen lassen. Dazu verglichen wir die beiden Zellpopulationen (ASC und HRP) hinsichtlich ihrer Oberflächenprofile, ihres Differenzierungsverhaltens, dem Vorkommen spezifischer Markerproteine sowie ihren Adhäsionseigenschaften. Wir charakterisierten die Oberflächenexpression der Zellen mittels FACS-Analysen, induzierten adipogene und osteogene Differenzierung, versuchten perizytenspezifische RGS5-Proteine in ASCs und HRPs durch Immunfluoreszenzfärbungen nachzuweisen und untersuchten die Zelladhäsion der beiden Populationen. Um der hohen Diversität von Perizyten (2.3.3), je nach Kulturbedingungen und vor allem der Herkunft gerecht zu werden, isolierten wir zusätzlich selber Perizyten anderer Gewebe (Plazenta, Fett) und verglichen diese mit den HRPs. Mit Aussicht auf weiterführende Experimente wollten wir im letzten Schritt dieser Arbeit Veränderungen der ASC durch ihre Kultur auf (modifizierter) EZM nachweisen. Nachdem eine aktuelle Publikation "*Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro*" die Differenzierung von MSCs in Richtung „Perizyten ähnlicher Zellen“ durch Co-Kultur mit endothelialen Vorläuferzellen beschrieben hatte, fragten wir uns ob sich ähnliche Effekte auch durch unsere von Endothelzellen sezernierte EZM, in ASC induzieren ließen (130). Anstatt der in der Publikation verwendeten Methode der Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR, nutzten wir die Charakterisierung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie, um die ASC auf eventuelle Veränderungen zu untersuchen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Zellen

| Bezeichnung | Kürzel | Hersteller | Herkunftsland |
|---|--------|---------------------------|----------------------|
| Bone marrow derived mesenchymal-stromal cells | BM-MSC | Arbeitsgruppenbestände | Mannheim DE |
| Liver hepatocellular carcinoma cells | HEpG2 | Arbeitsgruppenbestände | Mannheim DE |
| Human retinal microvascular Pericytes | HRMVPC | PELOBiotech | Planegg DE |
| Humane retinale immortalisierte Perizyten | Bmi-PZ | Arbeitsgruppe E. Beltramo | Universität Turin IT |
| Human umbilical vein endothelial cells | HUVEC | Arbeitsgruppenbestände | Mannheim DE |
| Lipoaspirat derived mesenchymal-stromal cells | LA-MSC | Eigene Isolation | Mannheim DE |
| Plazentäre Perizyten | PZ-PC | Eigene Isolation | Mannheim DE |

3.1.2 Medien

| Bezeichnung | Inhalt | Kürzel | Hersteller | Herkunftsland |
|-----------------------------------|--|-------------|--------------------------------|--|
| Adipogenic Differentiation Medium | Zellkultur Kit | ADM | Promo Cell | High Point USA |
| Adipogenic Induction Medium | Zellkultur Kit | AIM | LONZA | WalkersvilleUSA |
| Adipogenic Maintance Medium | Zellkultur Kit | AMM | LONZA | WalkersvilleUSA |
| Bmi-Perizyten Medium DMEM-FCS 20% | <ul style="list-style-type: none"> Dulbecco's Modified Eagle's Medium 20% Fetal Calf Serum L-Glutamin(4 mM) Penicilin/Streptom | DMEM-20%FCS | LONZA GIBCO PAA SIGMA | WalkersvilleUSA Paisley UK Cambridge UK St. Louis USA |

| | | | | | |
|---|---|----------|------------------------------------|---|--|
| | ycin | | | | |
| Dako Fluorescent Mounting Medium | Zellkultur Kit | | SIGMA | St. Louis USA | |
| Differentiation Basal Medium-Osteogenic | Zellkultur Kit | OIM | LONZA | WalkersvilleUSA | |
| DMEM-AB 10% | <ul style="list-style-type: none"> Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10% Human AB Serum L-Glutamin(4 mM) Penicillin/Streptomycin | DMEM-AB | LONZA GIBCO PAA SIGMA | Verviers B Paisley UK Cambrige UK St. Louis USA | |
| DMEM-FCS 10% | <ul style="list-style-type: none"> Dulbecco's Modified Eagle's Medium 10% Fetal Calf Serum L-Glutamin(4 mM) Penicillin/Streptomycin | DMEM-FCS | LONZA GIBCO PAA SIGMA | Verviers/B Paisley UK Cambridge UK St. Louis USA | |
| Endothelial cell basal Medium-2 | Zellkultur Kit | EBM-2 | LONZA | WalkersvilleUSA | |
| EGM-2 NG (1mg/dl Glucose) | Zellkultur Kit | EGM2 | LONZA | WalkersvilleUSA | |
| EGM-2 HG (4,5mg/dl Glucose) | Zellkultur Kit | EGM2 | LONZA | WalkersvilleUSA | |
| EGM-2 MA (1mg/dl Glucose + 3,5 mg/dl Mannitol) | Zellkultur Kit | EGM2 | LONZA | WalkersvilleUSA | |
| ¼ EGM-II Medium NG (1mg/dl Glucose) | <ul style="list-style-type: none"> ¼ EGM-II ¾ EBM-II | ¼ Medium | LONZA LONZA | WalkersvilleUSA Walkersville/USA | |
| ¼ EGM-II Medium HG (4,5 mg/dl Glucose) | <ul style="list-style-type: none"> ¼ EGM-II ¾ EBM-II | ¼ Medium | LONZA LONZA | Walkersville USA WalkersvilleUSA | |
| M199 + GlutaMAXX | <ul style="list-style-type: none"> 20%FBS Penicillin /Streptomycin | | GIBCO SIGMA | Paisley UK St. Louis USA | |
| Osteogenic Differentiation Media | Zellkultur Kit | ODM | Promo Cell | High Point USA | |
| Pericyte Growth Medium | Zellkultur Kit | PGM | PELOBiotech | Planegg DE | |

3.1.3 Chemikalien

| Bezeichnung | Kürzel | Hersteller | Herkunftsland |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------|
| Aqua destillata | | Eigene Produktion | |
| Ammoniumsolution 25% | | Merck | Darmstadt DE |
| Ammonium solution 33% | NH ₄ OH | Roth | Karlsruhe DE |
| Aqua destillata | | Merck Millipore | Darmstadt DE |
| β-Mercaptoethanol 99% | | SIGMA | St. Louis USA |
| Basic fibroblast growth factor | BFGF | SIGMA | St. Louis USA |
| BSA (Albuminfraktion-V) | | AppliChem | Darmstadt DE |
| CASY-TON | | OMNI Life Science | Bremen DE |
| Cell Wash Buffer (FACS) | | BD | Franklin Lakes USA |
| Collagenase I | | Serva | Heidelberg DE |
| 4,6-Diamidino-2-phenylindole | DAPI | SIGMA | St. Louis USA |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | PBS | SIGMA | St. Louis USA |
| EDTA | EDTA | Roth | Karlsruhe DE |
| Ethanol | | Merck | Darmstadt DE |
| Essentielle Aminosäuren | | PAA | Cambridge UK |
| FcR Blocking Reagent | | Miltenyi | Bergisch Gladbach DE |
| Fetal Bovine Serum | FBS/FCS | GIBCO | Paisley UK |
| Ficoll | | GE Healthcare | Uppsala SWE |
| Fluorescent Mounting Medium | | DAKO | Leipzig DE |
| Flüssigstickstoff | N ₂ | Air Liquide | Ludwigshafen DE |
| Formalin | | Roth | Karlsruhe DE |
| Glucose (G) | | SIGMA | St. Louis USA |
| Glutamin (L) | | Sigma | St. Louis USA |
| Gelantine | | Sigma | St. Louis USA |
| Isopropanol 60% | | Roth | Karlsruhe DE |
| Kollagenase I | | SIGMA | St. Louis USA |
| Mannitol | | SIGMA | St. Louis |

| | | | |
|--|-----|-------------|---------------------|
| | | | USA |
| Natriumthiosulfat | | SIGMA | St. Louis USA |
| Osteoimage Staining Reagent | | LONZA | Walkersville USA |
| Osteoimage Staining Reagent Dilution Buffer | | LONZA | Walkersville USA |
| Paraformaldehyd 35% | PFA | Roth | Karlsruhe DE |
| Penizillin-Streptomycin | | SIGMA | St. Louis USA |
| Pyrogalol | | Merck | Darmstadt DE |
| Speed coating solution | | PELOBiotech | Planegg DE |
| Silbernitrat | | Merck | Darmstadt DE |
| Staurosporin | | Biomol | Hamburg DE |
| Triton-X-100 | | SIGMA | St. Louis USA |
| Trypsin EDTA | | PAA | Cambridge UK |
| Tween-20 | | Serva | Heidelberg DE |

3.1.4 Lösungen

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|---|
| Abstopplösung Zellkultur 10% FBS | <ul style="list-style-type: none"> • 45ml PBS • 5 ml FBS |
| Ammoniumsolution 250 µMol | <ul style="list-style-type: none"> • 24,15ml Aqua destillata • 0,85ml NH₄OH 25% |
| Blockpuffer für IF (PBS + 2% BSA) | <ul style="list-style-type: none"> • 100 ml PBS • 2 g BSA |
| FACS Buffer | <ul style="list-style-type: none"> • 0,4% BSA • 0,03% NaN₃ (Natriumazid) • 1000 ml PBS w/o Mg Ca pH 7,4 |
| Osteoimage Wash Buffer | <ul style="list-style-type: none"> • 9 ml Aqua destillata • 1 ml Wash Buffer |
| Osteoimage Staining Reagent | <ul style="list-style-type: none"> • 990 µl Staining Reagent Dilution Buffer • 10 µl Osteoimage Staining Reagent |
| PBS + 0,1% Tween | <ul style="list-style-type: none"> • 99,9 ml PBS • 0,1 ml Tween |
| Paraformaldehyde 4% | <ul style="list-style-type: none"> • 84ml PBS • 16ml Paraformaldehyde 25% |
| Paraformaldehyde 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 60ml PBS |

| | |
|------------------------|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> 40 ml Paraformaldehyde 25% |
| 1% Pyrogalol | <ul style="list-style-type: none"> 1ml Pyrogalol 99ml PBS |
| 0,5% TritonX100 | <ul style="list-style-type: none"> 99,5 ml PBS 0,5 ml Triton X100 |

3.1.5 Farbstoffe

| Bezeichnung | Hersteller | Herkunftsland |
|--|-------------------|----------------------|
| 7-AAD (7-Aminoactinomycin) | BD BioScience | San Jose USA |
| AdipoRed™ Assay | LONZA | Walkersville USA |
| Brilliant Blau | SIGMA | St. Louis USA |
| CellTracker™ Red CMPTX | Life technologies | Eugene USA |
| CellTracker™ Green CMFDA | Life technologies | Eugene USA |
| DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) | ThermoFisher | Schwerte DE |
| Harris hematoxillin | Sigma | St. Louis USA |
| Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate | Invitrogen | Eugen USA |
| NucView™ 488 | BioTrend | Köln DE |
| Oelrot | SIGMA | St. Louis USA |
| OsteoImage™ Mineralization Assay | LONZA | Walkersville USA |

3.1.6 Antikörper

| Bezeichnung | Hersteller | Herkunftsland |
|--|--------------------------|----------------------|
| Donkey-Anti-Goat | Dianova | Hamburg DE |
| Goat-Anti-RGS5 (N14) | Santa Cruz Biotechnology | Heidelberg DE |
| Goat-Anti-Mouse | ThermoFisher | Schwerte DE |
| Goat-Anti-Rabbit | Abcam | Cambridge UK |
| Mouse-Anti-pFAK | Santa Cruz Biotechnology | Heidelberg DE |
| Mouse-Anti-pPax | Santa Cruz Biotechnology | Heidelberg DE |
| Mouse-Anti-RGS5 (B-4) | Santa Cruz Biotechnology | Heidelberg DE |
| Rabbit-Anti-Collagen Type IV antibody | Rockland | Limerick USA |
| Rabbit-Anti-Laminin antibody | Abcam | Cambridge |

| | | | |
|---|-------|--------------------------|------------------|
| | | | UK |
| Rabbit-Anti-Fibronectin antibody | anti- | SIGMA | St. Louis USA |
| Rabbit-Anti-FAK | | Abcam | Cambridge UK |
| Rabbit-Anti-Pax | | Santa Cruz Biotechnology | Heidelberg DE |

3.1.7 KITs

| Bezeichnung | Funktion | Hersteller | Herkunftsland |
|--|--|--------------|---------------|
| CytoGlow™ ELISA KIT Cell-Based ELISA for Fibronectin 1 | <ul style="list-style-type: none"> • TBS • Fixing Soution (4% Formaldehyde) • Wash Buffer • Quenching Buffer • Blocking Buffer • Anti-Fibronectin AB • HRP conjugated Anti-rabbit/mouse IgG • Ready to use substrate • Stop solution • Crystal violet solution • SDS solution | AssayBiotech | Sunnyvale/USA |
| CytoGlow™ ELISA KIT Cell-Based ELISA for Kollagen Type IV | <ul style="list-style-type: none"> • TBS • Fixing Soution (4% Formaldehyde) • Wash Buffer • Quenching Buffer • Blocking Buffer • Anti-Collagen IV AB • HRP conjugated Anti-rabbit/mouse IgG • Ready to use substrate • Stop solution • Crystal violet solution • SDS solution | AssayBiotech | Sunnyvale/USA |
| Human COLLAGEN IV ELISA KIT | Enzyme linked ELISA for Kollagen IV | Elabscience | WuHan/China |
| Human Fibronectin ELISA KIT | Enzyme linked ELISA for Fibronectin | Elabscience | WuHan/China |
| Human Laminin ELISA KIT | Enzyme linked ELISA for Laminin | Elabscience | WuHan/China |

3.1.8 Verbrauchsmaterial

| Bezeichnung | Hersteller | Herkunftsland |
|--|-------------------|-----------------------|
| Cell Imaging Slide 8 Chambers | Eppendorf | Hamburg DE |
| Einmalhandschuhe | Hartmann | Heidenheim DE |
| Cell Strainer 100 µm | Falcon | Durham USA |
| Cell Strainer 40 µm | Falcon | Durham USA |
| Tube 15 ml | CELLSTAR | Frickenhausen DE |
| Tube 15 ml | Fisher Scientific | Schwerte DE |
| Tube 50 ml | CELLSTAR | Frickenhausen DE |
| Tube 50 ml | Fisher Scientific | Schwerte DE |
| NUNC EasYFlask 25-175 cm ² | Thermo SCIENTIFIC | Roskilde DNK |
| Eppendorf Research Pipettenspitzen 5µl-1000µl | Eppendorf | Hamburg DE |
| Primaria Cell Culture Dish | Corning | Durham USA |
| Pursept A X _{press} | Schülke | Norderstaedt DE |
| Surgical Disposable Scalpel | Braun | Tuttlingen DE |
| Zellkulturplatte 6-96 Well | SIGMA | St. Louis USA |
| Zellkulturplatte 6-96 Well | BD-Falcon | Franklin Lakes USA |
| Zellkulturplatte 6-96 Well | Thermo Scientific | Roskilde DNK |
| Zellkulturplatte 6-96 Well | Eppendorf | Hamburg DE |
| Zellschaber | Braun | Tuttlingen DE |

3.1.9 Devices

| Bezeichnung | Hersteller | Herkunftsland |
|------------------------------------|--------------------|----------------------|
| Absauger Vacusafe comfort | Integra Bioscience | Zizers CH |
| Blutzuckermessgerät | Roche | Mannheim DE |
| Casy Cell Counter | Roche | Mannheim DE |
| Eisschrank | Kirsch | Offenburg DE |
| Eppendorf Research Pipette 5µl | Eppendorf | Hamburg DE |
| Eppendorf Research Pipette 10µl | Eppendorf | Hamburg DE |
| Eppendorf Research | Eppendorf | Hamburg |

| | | |
|--|-----------------------|---------------------|
| Pipette 20µl | | DE |
| Eppendorf Research Pipette 100µl | Eppendorf | Hamburg DE |
| Eppendorf Research Pipette 1000µl | Eppendorf | Hamburg DE |
| Flow Cytometer FACS Canto II | BD | Heidelberg DE |
| HandyStep Dispenser | Brandt | Wertheim DE |
| IncuCyte ZOOM® | Essen Bioscience | Hertfordshire UK |
| Kühlschrank | Liebherr | Kirchdorf DE |
| Microplate reader INFINITE M200 | TECAN Group | Männedorf CH |
| Mikroskop Axiovert 40 C | Carl Zeiss Microscopy | Göttingen DE |
| Mikroskop Axiovert 100 | Carl Zeiss Microscopy | Göttingen DE |
| Wasserbad | Memmert | Schwabach DE |
| Rotationsschüttler | Edmund Bühler | Hechingen DE |
| Rotina 420 R Zentrifuge | Hettich | Tuttlingen DE |
| TECAN | Tecan Group Ltd. | Männedorf SZ |
| Ultraschall-Homogenisator | BANDELIN | Berlin DE |
| Vortexer: IKA Lab Dancer | SIGMA Aldrich | St. Louis USA |

3.1.10 Software

| Bezeichnung | Hersteller | Herkunftsland |
|---------------------------------|-------------------|--------------------------|
| BD FACS Diva Version 8 | Beckton Dickinson | San Jose USA |
| IncuCyte™ Basic Software | ESSEN BioScience | Welwyn Garden City UK |
| Flow Jo 10 | FLOWJO, LLC | Ashland USA |
| Microsoft Office | Microsoft | Readmond USA |
| Microsoft Excel | Microsoft | Readmond USA |
| SigmaPlot | Systat Software | Erkrath DE |
| TECAN Infinite M200 | Tecan Group Ltd. | Männedorf SZ |

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Zellkultur

Für alle selbst angelegten Zellkulturen, die primäres humanes Ausgangsmaterial nutzten, lagen Ethikvoten der Ethikkommission II der medizinischen Fakultät Mannheim vor.

Aktenzeichen:

- 2010-262N-MA
- 2009-210N-MA
- 2006-192N-MA /49/05

Eine Aufklärung und Einholung des Einverständnisses (*Informed consent*) der Spender/Patienten erfolgte in der entnehmenden Klinik. Humane retinale Perizyten wurden entweder im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt, oder kommerziell erworben.

3.2.1.1 HUVECs

Gewinnung und Kultur

Wir nutzten für unsere Experimente Endothelzellen, die in etablierten Verfahren der Arbeitsgruppe aus Nabelschnüren gewonnen wurden (131). Kurz zusammengefasst, wurden aus der Umbilikalvene der Nabelschnur, direkt nach der Geburt, mittels Kollagenase I die zellulären Bestandteile herausgelöst und in Zellkultur gebracht. Um eine möglichst große Einheitlichkeit sicherzustellen verwendeten wir für unsere Experimente ausschließlich Zellpools von 3-4 verschiedenen Spendern.

Für die Versuche wurden Zellen je nach Bedarf aus den Arbeitsgruppenbeständen aufgetaut. Dafür wurden die Zellen aus den Stickstoffbehältern, direkt nach der Entnahme in ein Wasserbad mit 37°C überführt. Sobald kein Eiskern mehr im Vial zu sehen war, wurden die Zellen in vorgewärmtes PBS + 10%FBS überführt und anschließend für 5 Minuten bei 420g zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in die Zellkulturflasche (T25 oder T75) überführt. Darin wurden sie bei 37°C Temperatur und 5% CO₂ Gehalt für 4-7 Tage in EGM-II Medium kultiviert bis eine mindestens 90%ige Konfluenz erreicht war. In dieser Zeit fanden

alle zwei Tage Medienwechsel statt. Im Anschluss wurden die Zellen gesplittet und zur erneuten Expansion oder für Versuche weiterverwendet. Dafür wurden die Zellkulturflaschen einmal mit PBS gespült und anschließend für circa 3-5 Minuten mit Trypsin/EDTA benetzt (1ml-T25, 2ml-T75). Nachdem das Ablösen der Zellen im Lichtmikroskop überprüft wurde, wurden die Zellen mit 3-5 ml PBS + 10%FBS aufgenommen um das Trypsin abzustoppen und in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde die Zellzahl mittels *Casy Cell Counter* oder Neubauer-Kammer bestimmt bevor die gelösten Zellen bei 420g für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Medium aufgenommen und soweit verdünnt bis die gewünschte Zellkonzentration zur weiteren Expansion oder für Experimente erreicht war.

Zunächst wurden alle HUVECs in *EGM-II Single Quots*, dem Standardmedium für HUVECs, welches mit zahlreichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren versetzt ist, kultiviert. Diese Experimente zeigten jedoch wider Erwarten, dass sich keine toxischen Effekte auf das HUVEC-Wachstum durch hohe Glukosespiegel feststellen ließen. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass vor allem VEGF einen protektiven Effekt auf die HUVEC-Kulturen ausübt. Aus diesem Grund verwendeten wir für die späteren Matrixversuche sogenanntes $\frac{1}{4}$ Medium. $\frac{1}{4}$ Medium besteht aus einem Teil EGM-II (Wachstumsmedium + Supplemente) und drei Teilen EBM-II Medium (=Basalmedium ohne Zusätze) und hat somit eine deutlich geringere Konzentration von Serum und allen weiteren Wachstumsfaktoren, ohne jedoch signifikant die Eigenschaften der HUVECs zu verändern. Die HUVEC-Kultur in $\frac{1}{4}$ Medium führt jedoch zu einer leicht verringerten Proliferation, weshalb es für die Matrixversuche nötig war, die Zellzahl bei Aussaat auf 15×10^3 HUVECs/cm² in je 0,5 ml Medium zu verdoppeln. Alle anderen Faktoren der Kultur entsprachen denen von EGM-II Single Quots (siehe oben).

Kultivierung unter verschiedenen Glukosebedingungen

Das Endothelmedium wurde je nach Experiment mit Glukose oder Mannitol versetzt, um die verschiedenen Zuckerkonzentrationen herzustellen. Als Standardmedium (SM) legten wir 1,0 mg/dl bzw. 5,6 mmol/L Glukose fest. Diese Glukosekonzentration ist im Basalmedium enthalten. Für das hohe Glukose Medium (HG) legten wir Konzentrationen von 4,50 mg/dl bzw. 25,0 mmol/L Glukose fest, für das Mannitol-Medium (MA) entsprechend 19,4 mmol/L Mannitol + 5,6 mmol/L Glukose. Um das diabetische Milieu im Körper zu simulieren, welches sich durch tageszeitliche

Schwankungen der Glukosekonzentrationen auszeichnet, führten wir zusätzlich Versuche unter fluktuierenden Glukosebedingungen durch. Dafür wurden die Zellen in NG-Medium kultiviert das zweimal täglich für 3 Stunden durch HG-Medium ersetzt wurde. Da die Zellen während des Wachstums selber Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren die gegebenenfalls Einfluss auf ihr Wachstumsverhalten haben, sammelten wir sowohl das NG als auch das HG Medium nach den regelmäßigen Medienwechseln zur Wiederverwendung. Komplette Medienwechsel fanden alle zwei Tage wie bei den anderen Glukosebedingungen statt. Die Glukosekonzentrationen kontrollierten wir regelmäßig mittels eines Blutzuckermessgeräts.

3.2.1.2 ASCs

Wir nutzten für unsere Versuche aus Lipoaspirat (LA) und Knochenmark (BM) gewonnene mesenchymal-stromale Zellen (MSCs). Diese wurden nach in der Gruppe etabliertem Verfahren (90) aus Fettgewebe beziehungsweise Knochenmark gewonnen. Da wir aus in Kapitel 2.4.4 ausführlich beschriebenen Gründen, nach einigen Vorversuchen, alle unsere Experimente mit LA-MSC/ASC durchführten wird an dieser Stelle vertieft auf deren Gewinnung und Expansion eingegangen.

Gewinnung und Kultur von ASC

ASC wurden entweder aus Lipoaspirat oder aus Resektat-Material generiert. Dieses Bauchfettgewebe erhielten wir von der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mannheim, von aufgeklärten und ausgewählten Spenderinnen. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in PBS-Lösung aufbewahrt, bei 4°C gelagert und innerhalb von 24 Stunden verarbeitet. Vor der Verarbeitung wurde das Gewebe mehrfach mit PBS gespült. Daraufhin wurde ein ca. 3cm×3cm×1cm großes Stück Fettgewebe, mittels Schere und Skalpell zerkleinert bis eine homogene Masse entstand. Dieses Zellgemisch, oder gewaschenes Lipoaspirat, wurde mit 20 ml DMEM + 1U/ml Kollagenase I vermengt und für 30-45 Minuten auf einem Rotationsschüttler mit 100 Mot/min bei 37°C inkubiert. Nach diesem „Verdauungsprozess“ wurde das Gemisch mit 20ml DMEM-AB Medium versetzt um die Kollagenase I zu verdünnen. Das Gemisch wurde durch 100µm große Siebe filtriert und bei 420g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 ml DMEM-AB aufgenommen. Eine Zellzahlbestimmung wurde mittels *CasyCellCounter* durchgeführt und die Zellen in Konzentrationen von 1.5×10^6 – 2.5×10^6 in T75 Zellkulturflaschen mit 10ml DMEM-AB bei

37°C und 5% CO₂ Gehalt ausgesät. Die Passage wurde mit P0 bezeichnet. Am folgenden Tag fand der erste Mediumwechsel statt, bei dem die nicht-adhärennten Zellen und restliche Erythrozyten mit PBS abgewaschen wurden.

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren bereits nach diesem Verfahren isoliert, gepoolt und standen im Rahmen der Arbeitsgruppenbestände zur Verfügung. Für die Experimente wurden, wenn nicht anders erwähnt, gepoolte Zellen von 3-5 Spendern, der Passagen 2 bis 5 verwendet. Die Zellen wurden in DMEM-AB bei 37°C Temperatur und 5% CO₂ Gehalt für fünf bis acht Tage kultiviert. Medienwechsel fanden alle 2-3 Tage statt. Bei einer Konfluenz von 70% bis 90% wurden die Zellen gesplittet und zu Versuchszwecken verwendet beziehungsweise in T25 oder T75 Flaschen erneut zur Kultivierung ausgesät.

Gewinnung und Kultur von BM-MSCs

Die verwendeten BM-MSC waren bereits isoliert, *gepoolt* und kryokonserviert und konnten nach Bedarf aus den Arbeitsgruppenbeständen verwendet werden. Die Isolation erfolgte dabei nach etablierten Protokollen der Gruppe (110, 131). BM-MSCs werden aus humanem Knochenmark für Forschungszwecke gewonnen. Vereinfacht dargestellt bringt man das Knochenmarkspirat in Lösung mit PBS/EDTA und schichtet es auf Ficoll, sodass zwei Phasen entstehen. Durch Dichtegradientenzentrifugation entstehen drei Phasen. Die oberste enthält das Plasma, in der mittleren, der Interphase finden sich die mononukleären Zellen mit den BM-MSCs und in der unteren der Ficollüberstand und das Erythrozytenpellet. Die Interphase wird isoliert und nach mehreren Spülvorgängen in Zellkulturflaschen überführt und kultiviert. Durch regelmäßige Medienwechsel werden nicht-adhärennte Zellen mit dem Überstand verworfen was sich gut zur weiteren Selektion der Zellen eignet. Die Kulturbedingungen entsprechen vom Medium abgesehen (DMEM-10%FBS für BM-MSCs) denen von LA-MSC/ASC.

3.2.1.3 Perizyten

Kultur von humanen retinalen Perizyten (HRMVPC)

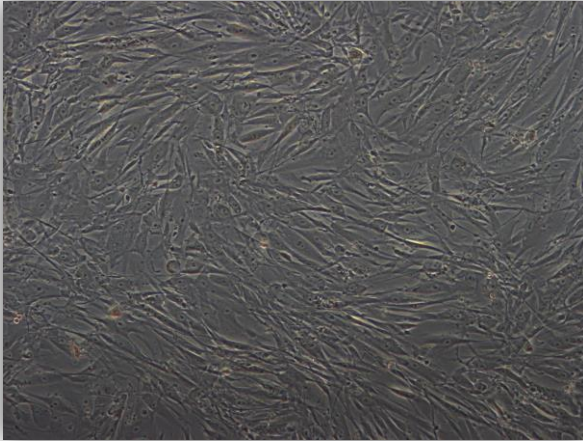


Abbildung 5: Humane retinale Perizyten (HRMVPC)

Wir bezogen humane retinale Perizyten (HRMVPC) kommerziell von der Firma PELO Biotech und kultivierten diese nach Protokoll in Pericyte Growth Medium. Dafür wurden 40.000 Zellen/ cm² in je 1 ml PGM in T25 Zellkulturflaschen kultiviert. Die T25er Zellkulturflaschen wurden für 5 Minuten mit 2 ml „Speed coating solution“ inkubiert die vor der Aussaat der Zellen abgesaugt wurde.

Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, die Wachstumsbedingungen betragen 37°C Temperatur und 5% CO₂ Gehalt. Die Zellen wurden 5-10 Tage kultiviert und bei einer Konfluenz die 100% betragen sollte 1:1 gesplittet oder in versuchsabhängig variierenden Konzentrationen weiterverwendet. Aufgrund der Schwierigkeiten beim Zählen von HRMVPC, gingen wir im Verlaufe der Versuche teilweise dazu über, speziell die HRMVPC im Verhältnis zu ihrer Kultivierungsoberfläche zu splitten und neu auszusähen was teilweise bessere Ergebnisse als die etablierten Zählmethoden (*Casy CellCounter*, Neubauer-Kammer) erbrachte. Wir nutzten die Zellen bis zu Passage sechs für unsere Versuche.

Kultur von immortalisierten humanen retinalen Perizyten (Bmi-HRP)

Von Frau Professor Beltramo der Universität Turin konnten wir immortalisierte humane retinale Perizyten (Bmi-HRP) erhalten. Bei diesen Zellen handelt es sich um humane retinale Perizyten, deren Membranen mit Hilfe der Elektroporation kurzzeitig durchlässig gemacht wurden um das Bmi-1 Onkogen in die Zelle einzuschleusen, welches die Telomeraseaktivität induziert. Mittels dieses Verfahrens ist es möglich die Anzahl der möglichen Zellzyklen deutlich zu erhöhen. Die funktionellen sowie phänotypischen Eigenschaften der Zellen bleiben dabei bis in hohe Passagen unverändert (35). Die T25er Zellkulturflaschen wurden vor der Aussaat der Zellen, flächendeckend mit *Speed Coating Solution* oder Gelatine1% für 5 Minuten „gecoated“.

Im Anschluss daran wurde ein *Aliquot* der Zellen direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, bis nur noch ein minimaler Eiskern sichtbar war. Die aufgetauten Zellen wurden in 10ml DMEM 20%FBS aufgenommen und anschließend für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml DMEM 20%FBS resuspendiert und in die *vorgecoatete* Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden für 5-10 Tage kultiviert, Medienwechsel fanden alle 2 Tage mit DMEM-20%FBS statt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 100% konnten die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet werden. Aufgrund der eingeschränkten Zählbarkeit der Perizyten wurden die Zellen im Volumenverhältnis 1:2 oder 1:3 ausgesät. Die Zellen kultivierten wir in DMEM 20%FBS und in den laufenden Experimenten mit DMEM 10%FBS um einheitliche Bedingungen mit den ASCs sicherzustellen.

Gewinnung und Kultur von plazentären Perizyten

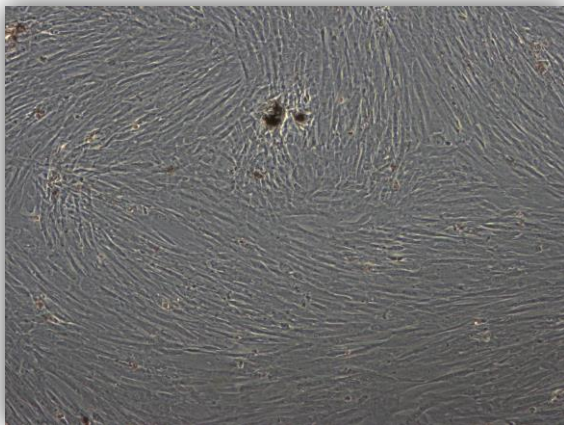


Abbildung 6: Plazentäre Perizyten

Um den variierenden Eigenschaften und Funktionen der Perizyten, je nach Herkunftsorgan gerecht zu werden, testeten wir verschiedene Protokolle um Primärzellen zu isolieren. Von unserem Kooperationspartner, dem Fachbereich Gynäkologie des Universitätsklinikums Mannheim erhielten wir dafür Plazenten von, in der Klinik, aufgeklärten und ausgewählten Spenderinnen. Es wurde

ausschließlich Gewebe verwendet, dass max. 48h nach Gewinnung mittels Geburtsvorgang oder Kaiserschnitt, isoliert wurde und bis zur Verarbeitung permanent bei 4°C gekühlt war. Zur Isolierung der Zellen wurde ein circa 3cm×3cm×1cm großes Gewebestück, aus dem Bereich der Nabelschnurinsertion entnommen, mit PBS gewaschen, von den Häuten befreit und zerkleinert. Mittels Kollagenase I wurde das Gewebe bei 37°C für 2h auf einem Rotationsschüttler an verdaut und daraufhin erst durch Siebe mit 100µm und dann 40 µm Maschengröße filtriert (63). Die 40µm Siebe wurden im Anschluss „reverse“ mit Medium M199+ GlutaMAXX gespült, um die Mikrogefäßfragmente aus den Maschen der Siebe in Lösung zu bringen. 10ml des

M199+ GlutaMAXX-Medium welches die gelösten Gefäßfragmente enthielt, wurde in Primärkulturzellschalen mit 10cm² Grundfläche für 7 Tage kultiviert. Danach führten wir alle 2-3 Tage Medienwechsel durch bis nach circa 3 Wochen ein konfluenter (100%) Perizytenlayer herangewachsen war. Wir splitteten die Zellen mit Trypsin/EDTA und bezeichneten sie mit der Passage P1. Nach der ersten Passage überführten wir einige „Aliquots“ in DMEM-AB sowie DMEM-FCS Medium. Da die plazentären Perizyten keine signifikanten Wachstumsveränderungen auf diese unterschiedlichen Medien zeigten, nutzten wir, für unsere auswertungsrelevanten Experimente Zellen, die in DMEM-AB kultiviert wurden da dies dem Medium unserer ASC-Kontrollen entsprach.

Gewinnung von fettgewebs-Perizyten

Des Weiteren wanden wir unterschiedliche Methoden der Perizyten-Isolation aus Fettgewebe an, wobei sich zeigte, dass es teilweise nur marginale Abweichungen zu Protokollen der ASC-Gewinnung gibt. Von unserem Kooperationspartner, dem Fachbereich Gynäkologie des Universitätsklinikums Mannheim erhielten wir Bauchfettgewebe von, vor Ort, aufgeklärten und ausgewählten Spenderinnen. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in PBS-Lösung aufbewahrt, durchgehend bei 4°C gelagert und innerhalb von 24 Stunden verarbeitet. Vor der Verarbeitung wurde das Gewebe mehrfach mit PBS gespült. Es wurde ein 3cmx3cmx1cm großes Gewebestück, mittels Schere und Skalpell zerkleinert bis sich eine homogene Masse bildete die auf zwei 50ml *Falcontubes* verteilt wurde. Im Anschluss daran wurde das zerkleinerte Fettgewebe mit 20 ml DMEM + Kollagenase 1 vermengt und 30-45 Minuten auf einem Rotationsschüttler mit 100 Mot/min bei 37°C an verdaut. Zum Verdünnen der Kollagenase wurde die Suspension mit 20ml DMEM-(10%)FCS vermischt. Das Gemisch erst durch ein Sieb mit 100µm Maschen und danach mit 40µm Maschen filtriert. Um die Mikrogefäßfragmente aus denen die Perizyten letztendlich auswachsen zu gewinnen, wurden die 40µm Siebe „reverse“ mit 10 ml DMEM-(10%)FCS in einer Petrischale (d=100mm) gespült. Diese wurde 7 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ möglichst ohne Erschütterung oder Manipulation kultiviert. Im Anschluss an die ersten 7 Tage, wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Am Tag zehn nach Kulturbeginn wurden die Zellen zusätzlich zweimal mit PBS gespült. Nach circa 14-21 Tagen hatten die Zellen eine Konfluenz von 100% erreicht und wurden mittels

Trypsin/EDTA im Verhältnis 1:2 gesplittet oder zu Versuchszwecken weiterverwendet (63).

In einem weiteren Verfahren wurde das zerkleinerte Fettgewebe direkt in eine Zellkulturschale gegeben die zuvor mit Kollagen beschichtet worden war, mit dem Ziel dass Perizyten direkt auswachsen sollten. Nach 8 Stunden die der Zelladhäsion dienen sollten, wurden zu dem Gewebegemisch 10ml DMEM-FCS mit 0,1 mMolar β -Mercaptoethanol, 1% essentiellen Aminosäuren sowie 5ng/ml „basic fibroblast growth factor“ hinzugefügt. Am Tag acht bis zwölf nach Aussaat der Zellen wurden sowohl die löslichen als auch leicht adhärennten Komponenten in eine unbeschichtete Zellkulturflasche überführt (79). Da dieses Protokoll in unseren Versuchen an diesem Schritt mehrfach erfolglos blieb, wird der weitere Ablauf nicht detailliert besprochen.

3.2.2 Matrixgewinnung und Zellkultur auf EZM

Ziel dieser Arbeit war es als erstes ein Protokoll zu erarbeiten, mit dem man eine qualitativ und quantitativ einheitliche extrazelluläre Matrix humaner Endothelzellen reproduzieren kann. Wir nutzten hierfür Zellkulturplatten der Firmen BD, Cellstar; Eppendorf und ThermoScientific, mit 6 bis 96 Wells pro Platte. In diesen kultivierten wir „*human umbilical vein endothelial cells*“ (HUVECs) die während ihres Wachstums extrazelluläre Matrix sezernieren (132). Alle ausgesäten Zellen befanden sich dabei in den Passagen 2-5. Für die Matrixproduktion wählten wir eine konstante Aussaatkonzentration von $7,5 \times 10^3$ HUVECs/cm² in je 0,5 ml Medium. Die HUVECs wurden bis zum Erreichen der Konfluenz für circa 5 Tage unter den jeweiligen Glukosebedingungen (NG/MA/HG/FKT), kultiviert und mittels Lyseverfahren abgelöst. Zurück blieb die von ihnen sezernierte extrazelluläre Matrix. Diese wurde für maximal zwei Stunden im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert. Während dessen wurden, ASCs beziehungsweise Perizyten gesplittet und in einer Konzentration von 5×10^3 Zellen/cm² in je 0,5 ml Medium auf der Matrix ausgesät. Diese Zellzahl wurde festgelegt, da sie einen Kompromiss zwischen der Aussaatdichte von LAMSCs (200/cm²) und derer von Perizyten (40.000/cm²) darstellt und sich für unsere Versuchsziele nach Erprobung aller Kombinationen von 200-40.000 Zellen/cm² als am sinnvollsten erwies.

Auch bei den Nährmedien variierten wir, um eventuelle Auswirkungen auf die Zellkulturen festzustellen. Experimentelle Variationen werden im Ergebnisteil entsprechend aufgeführt. Die ASCs und/oder Perizyten wurden über mindestens 48 Stunden auf

der Matrix kultiviert und ihre Proliferation mit Hilfe des *IncuCyte ZOOM®* dokumentiert. Dieses Gerät ermöglicht via „*Live Cell Imaging*“ eine kontinuierliche Beobachtung, Messung und Auswertung des Proliferationsverhaltens von Zellen und bietet die Möglichkeit mittels Immunfluoreszenzverfahren apoptotische Vorgänge zu detektieren. Aufgrund dessen konnte der Verlauf der Konfluenz-Entwicklung und damit des Zellwachstums innerhalb eines *Wells* kontinuierlich dokumentiert werden. Aus Gründen der Einheitlichkeit entschlossen wir uns für alle Experimente die in die Auswertung mit eingingen ASCs zu verwenden und deren Medium auf DMEM-(10%)AB festzulegen. Die Perizyten ließen sich nur eingeschränkt auf andere Medien umstellen da sie teilweise sehr sensibel auf wechselnde Bedingungen reagieren. Soweit nicht anders erwähnt wurden sie in ihrem entsprechenden Standardmedium (3.2.1.3) ausgesät.

3.2.2.1 Matrixgewinnung

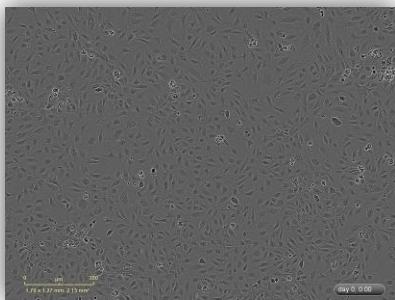


Abbildung 7: Konfluente HUVEC vor der Dezellularisierung

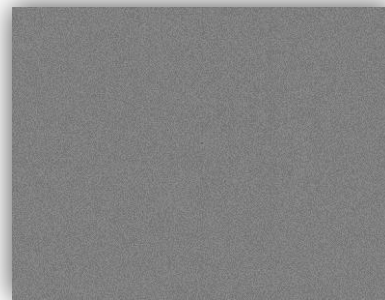


Abbildung 8: Extrazelluläre Matrix nach Dezellularisierung der HUVEC mit Ammoniumhydroxid

Nach 3-5 Tagen in Kultur (= konfluenter Monolayer), wurden die HUVECs mittels Ammoniumhydroxide dezellularisiert, um die von ihnen sezernierte extrazelluläre Matrix zu gewinnen. Die Wells wurden zuvor mit 0,5 ml *PBS/cm²* gespült. Anschließend wurden 0,5ml/cm² 0,25 mol/l *Ammoniumsolution (NH₄OH)* auf die Endothelzellschicht pipettiert. Alternativ testeten wir eine 0,05 molare *Ammoniumsolution* mit 0,05% *Triton X 100*. Nach 5 minütiger Inkubationszeit wurde das Lysat aus Ammoniumsolution und Zelldetritus vorsichtig, ab pipettiert wobei es darauf ankam, immer einen gewissen Flüssigkeitsfilm auf der Matrix zu belassen um diese vor den Scher-

kräften des Absaugens zu schützen. Anschließend wurden die *Wells* vier Mal hintereinander vorsichtig, händisch mit 0,5ml/cm² PBS gespült.

3.2.2.2 Aussaat von ASCs und Perizyten auf der extrazellulären Matrix „Live Cell Imaging“ mittels IncuCyte ZOOM®

Das *IncuCyte ZOOM®* ist ein „*Live Cell Imaging*“ und Analysesystem mit dem man kinetische Messungen an lebenden Zellen durchführen kann. Dies ermöglicht es zelluläre Vorgänge zu visualisieren und zu quantifizieren. Durch die Kombination von Fluoreszenz- und Phasenkontrastbildgebung, sowie zugehöriger *IncuCyte™ Basic Software* ermöglicht das Gerät, biologische Prozesse auf zellulärer Ebene in Echtzeit direkt im Inkubator zu erfassen und gleichzeitig zu analysieren. Neben der Berechnung der Konfluenz, bei der der prozentuale Anteil an mikroskopisch sichtbarer Zellausbreitung detektiert wird, gibt es auch die Möglichkeit, einzelne Ereignisse pro Bild aufzuzeichnen. Dies war besonders für unsere Apoptose-Versuche, bei denen es um die Quantifizierung einzelner „Events“ ging, sehr hilfreich. Außerdem bildet der *IncuCyte ZOOM®* die Möglichkeit, seine Analysemaske je nach Versuchsziel individuell zu programmieren. Je nach Ziel des Experimentes kann man über die Einstellung von gewünschter Granularität, Intensität, Pixelgröße und/oder fluoreszierende Farbstoffe ideale Messbedingungen für die unterschiedlichen Anforderungen kreieren. Dies machten wir uns zur Nutze und definierten eine Maske, die das Auswachsen der Proliferierenden ASCs und Perizyten bestmöglich erfasste, ohne dabei die hypointensere extrazelluläre Matrix oder stark hyperintensen Zellschrott zu messen. Dabei musste ein Kompromiss eingegangen werden da teilweise eine klare Abgrenzung zwischen den feinen Zellausläufern und der Matrix nicht möglich war. Zur Qualitätssicherung färbten wir in einigen Versuchen die ASCs mit *CellTracker™ Red CMPTX*, einem fluoreszierenden Zytoplasmafarbstoff der auch nach mehrfacher Zellteilung eine klare Abgrenzung der zellulären Bestandteile im Vergleich zur Matrix ermöglicht und vom *IncuCyte* detektiert werden kann. Durch die parallelen Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Aufnahmen des gleichen Experiments, konnten wir nachweisen, dass es durch unsere Analysemaske zu keinen signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Konfluenzen kam. Die Auswertung einzelner Ereignisse pro Aufnahme machten wir uns beim fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von apoptotischen Vorgängen mit Hilfe des Caspase-3-Farbstoffes *NucView™ 488* zu nutze.

ASCs und Perizyten

Unmittelbar nach der Aufbereitung der extrazellulären Matrix, wurden die ASCs und Perizyten gesplittet und mit einer Konzentration von 5×10^3 Zellen/cm² falls zählbar, oder im Falle der Perizyten 1:3 verdünnt im Verhältnis zur Kulturoberfläche, in je 0,5 ml ihres entsprechenden Mediums auf der Matrix ausgesät. Im Anschluss daran wurden die Zellkulturplatten für mindestens 48 Stunden im *IncuCyte ZOOM®* kultiviert. Mittels *Live Cell Imaging* untersuchten wir dabei ihr Proliferations- sowie Apoptoseverhalten.

3.2.2.3 Cytoplasmafärbung mit CellTracker™ Red

Im Verlauf der Arbeit mussten wir feststellen, dass das Lyseverfahren immer ein Kompromiss zwischen einer guten Zellablösung und gleichzeitig einer noch gut erhaltenen Matrixlayer darstellte. Aufgrund dessen, dass eine intakte, möglichst gut erhaltene Matrix für unsere Versuche entscheidend war, mussten wir teilweise auf der EZM zurückbleibenden Zelldetritus in Kauf nehmen. Trotz Anpassung der Analysemaske des *IncuCyte ZOOM®*, wurde deshalb auch immer zu einigen Teilen Zelldetritus als Konfluenz gemessen. Um diese Messfehler zu quantifizieren und eine mögliche Relevanz für die Endergebnisse einzuschätzen, färbten wir in mehreren Experimenten die ASCs und Perizyten mit *CellTracker™ Red CMPTX (CTR)*. Um ASC/HRPs exakt vom HUVEC Zell Detritus zu unterscheiden, wurden für einige Versuche die Zellen mit *CellTracker™ Red CMPTX* gefärbt. In diesen Fällen erfolgte eine vergleichende Analyse der Phasenkontrast-Daten und der Fluoreszenz-Daten. Die Zellen wurden hierfür nach Splitt und Zentrifugation einmal in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Dann wurden sie in erwärmtem *DMEM* ohne Zusätze mit $0,5 \mu\text{l}$ *CellTracker™ Red CMPTX*/1ml Medium aufgenommen und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine erneute Zentrifugation und Aufnahme des Pellet in Standardmedium sowie erneuter Inkubation für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Nach einmaligem Spülen mit PBS konnten die Zellen in ihrem Standardmedium, in dem Fall *DMEM-(10%)AB* aufgenommen, gezählt und daraufhin nach oben beschriebenem Prozedere auf der Matrix ausgesät werden. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die etlichen Waschschrte einen großen Zellverlust bedingen.

3.2.2.4 Apotosenachweis mittels NucView™ 488

NucView™ 488 (NV) ist ein zellmembran-permeables, fluoreszierendes Substrat, das infolge von Kaspase-3 Aktivität ein Fluoreszenzsignal erzeugt, ohne dabei die Funktionsweise oder Wachstumseigenschaften der Zellen zu beeinflussen. Somit detektiert es apoptotische Vorgänge in Echtzeit. Wir nutzten dieses Verfahren um festzustellen, ob ASCs und Perizyten, die auf hyperglykämisch-modifizierter Matrix kultiviert wurden, Unterschiede hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens aufweisen. Als erstes titrierten wir *NucView™ 488* indem wir mittels Staurosporin in ASCs Apoptose induzierten. Neben einer Kontrolle ohne *NucView™ 488* und einer ohne Staurosporin testeten wir *NucView™ 488* Konzentrationen von 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,31 und 0,15µM /1ml Medium.

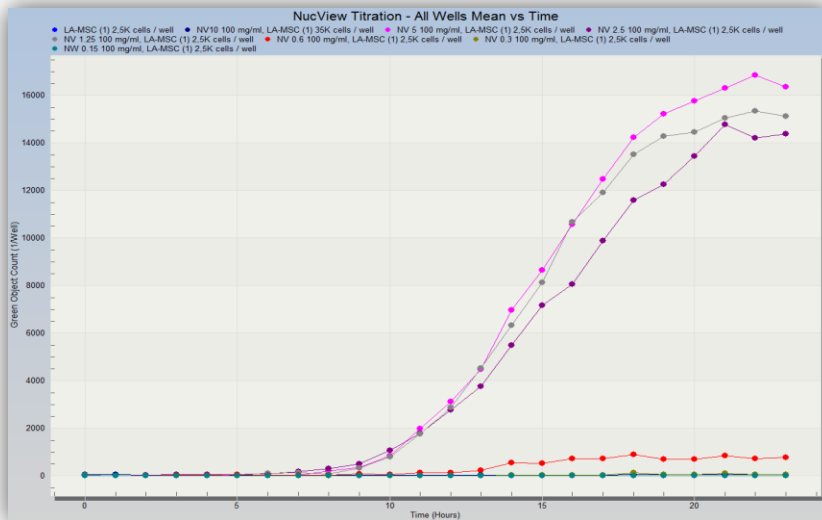


Abbildung 9: *NucView™ 488* Titration. Während bis zu einer Konzentration von 0,6 μM /ml Medium nahezu keine apoptotischen Events zu sehen sind, finden sich ab 1,25 μM /1ml Medium (braun), 2,5 (blau) sowie 5 μM /1ml Medium (rosa) deutliche, einheitliche Signale.

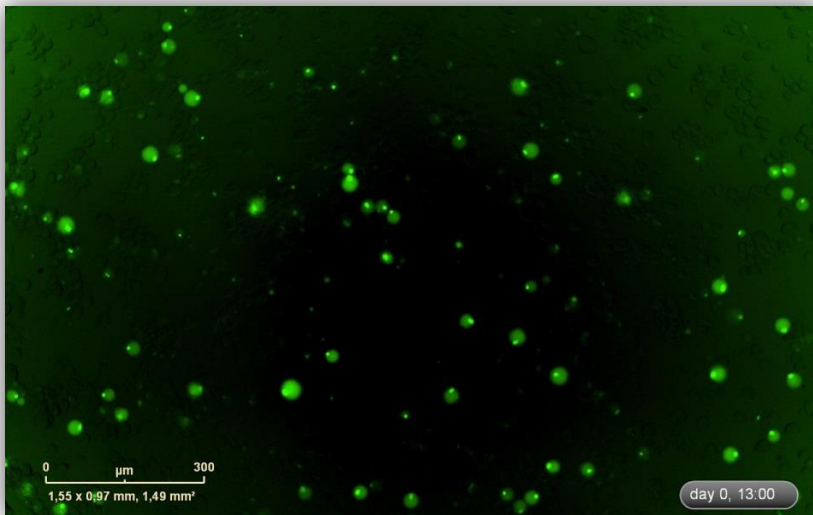


Abbildung 10: Visualisierung von apoptotischen Prozessen mittels *NucView™ 488*. In diesem Fall fand die Messung 13 Stunden nach Versuchsbeginn statt wobei das Medium eine 1,25 μM /1ml Medium Konzentration *NucView™ 488* beinhaltetete.

Die apoptotischen Ereignisse wurden durch den *IncuCyte ZOOM®* fluoreszenzmikroskopisch detektiert und dokumentiert. Ab einer Konzentration von 1,25 μM / 1ml Medium *NucView™ 488* waren alle Zelluntergänge, wie bei 5 und 2,5 μM / 1ml Medium, dargestellt sodass wir uns für diese Konzentration bei den folgenden Versuchen mit ASC und/oder Perizyten entschieden. Dem zufolge versetzten wir je 1ml Medium, der ASCs beziehungsweise Perizyten, in dem die Zellen auf der EZM kultiviert wurden mit 1,25 μM *NucView™ 488*.

3.2.2.5 Adhäsion: „Live cell Imaging“ und FAK-PAX-Immunfluoreszenz

Die *Fokal adhesion kinase* (FAK) und *Paxillin* (Pax) sind Strukturproteine die wesentlich am Prozess der Zelladhäsion und -bewegung beteiligt sind. FAK stellt dabei eine intrazytoplasmatische Tyrosinkinase da, Pax ein ihr assoziiertes Protein. Bei kultivierten Zellen finden sich FAK und Pax im Bereich von sogenannten „focal adhesions“ wieder. Durch den Kontakt der Zelle mit extrazellulärer Matrix kommt es Integrin-vermittelt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der FAK gefolgt von einer zunehmenden Pax Rekrutierung und Phosphorylierung (133-135). Aufgrund dieser Eigenschaften macht es die Fixierung und fluoreszenzmikroskopische Färbung von FAK und Pax, beziehungsweise pFAK (phosphoryliertes FAK) und pPax (phosphoryliertes Pax), möglich den Zustand der Zelladhäsion zum Zeitpunkt X bildlich darzustellen. Wir kultivierten HUVECs unter den verschiedenen Bedingungen und isolierten ihre EZM wie in (3.2.1.1 + 3.2.2.1) ausführlich beschrieben. Im Anschluss daran säten wir ASCs und Perizyten entsprechend den Standardkonzentrationen (3.2.2.2) auf der Matrix aus.

Da unser Interesse dem Adhäsionsverhalten von HRP und ASCs in der Frühphase ihres Auswachsens lag, wählten wir als Analysezeitpunkte 10, 20 und 30 Minuten nach Aussaat. Gleichzeitig dokumentierten wir die Adhäsion der Zellen mittels des *IncuCyte ZOOM®* vom Zeitpunkt ihrer Aussaat über 30 Minuten indem wir alle 5 Minuten Messungen der sich absetzenden und ausbreitenden Zellen durchführten. Zum jeweiligen Zeitpunkt saugten wir den Überstand vorsichtig ab und fixierten die Zellen in 4% PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem waschen mit PBS wurden die Zellen für 3 Minuten mit 0,5% TritonX-100 behandelt um ihre Membranen für die Antikörper durchlässig zu machen. Anschließend wurde dreimal mit PBS + 0,1% Tween gespült. Als nächstes wurden die Zellen mit 2% BSA in PBS über 2 Stunden bei Raumtemperatur beziehungsweise bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:50) in 1% BSA erneut über Nacht bei 4°C oder für 1-4 Stunden bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells dreimal gewaschen indem sie jeweils für 5 Minuten mit PBS + 1% BSA auf einen Rotationsschüttler verbracht wurden, im Anschluss daran wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben (grün: 1:1000/ rot: 1:500) und für mindestens 1,5 Stunden bei Raumtemperatur, unter Lichtschutz auf den Zellen belassen. Als nächstes wurde erneut dreimal wie oben beschrieben mit PBS + 1% BSA gewaschen und anschließend eine Färbung der Zellkerne durchgeführt indem DAPI (1:1000) in PBS

verdünnt für zwei Minuten auf die Zellen gegeben wurde. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff der selektiv an Doppelstrang-DNA bindet und somit Zellkerne färbt. Nach einem letzten Waschgang mit Aqua dest. wurden die Zellen mit Dako Fluorescent Mounting Medium und einem Deckglas versehen oder mit PBS 0,5% BSA überschichtet und konnten anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

3.2.3 Matrixcharakterisierung

3.2.3.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die qualitative und quantitative Beurteilung der extrazellulären Matrix, erfolgte zu Beginn der Versuche phasenkontrastmikroskopisch mittels Axiovert 100 oder dem *IncuCyte ZOOM®* direkt nach der Lyse. Da uns daran gelegen war, eine bessere Matrixbeurteilung vorzunehmen, färbten wir in einem ersten Schritt die Matrix mit 0,5ml/cm² Coomassie-Brillant-Blau Lösung, einem Farbstoff zur Proteinfärbung. Nach 5 Minuten Einwirkungszeit, bei Raumtemperatur auf der Matrix wurde der Farbstoff vorsichtig ab pipettiert und die Zellen 3-4 Mal mit 0,5ml/cm² PBS gespült. Im Anschluss daran wurden die Wells phasenkontrastmikroskopisch auf die Qualität sowie die Einheitlichkeit der Matrix überprüft. Da sich die Coomassie-Brillant-Blau Färbung, beziehungsweise die damit verbundenen vermehrten Spülvorgänge offensichtlich stark auf die Matrixqualität auswirkten, fixierten wir einige Wells nach der Lyse und dreimaligem Spülen für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA) und wiederholten den oben beschriebenen Prozess.

3.2.3.2 Immunfluoreszenz der Matrixproteine

Nachdem wir erfolgreich die Proteine in der Matrix nachgewiesen hatten, war uns daran gelegen, einzelne Matrixkomponenten zu detektieren. Dafür bedienten wir uns der Immunfluoreszenz (IF), einem biochemischen Analyseverfahren welches auf dem Mechanismus der Antigen-Antikörperreaktion basiert. Dabei wird ein, spezifisch an die zu untersuchende Zielstruktur (meist ein Protein) bindender Antikörper auf die Probe gegeben. Man unterscheidet generell die direkte von der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der spezifische Antikörper direkt mit einem Fluorchrom gekoppelt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird erst ein spezifischer aber noch ungefärbter Antikörper auf die Probe verbracht. In einem zweiten

Schritt wird ein zweiter, mit einem Fluorchrom markierter Antikörper, der an das FC-Segment des ersten Antikörpers bindet auf die Probe verbracht. Da Antikörper in der Regel in Tieren produziert werden (in unserem Fall Kaninchen) und die fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper für alle in einer Spezies produzierten primären Antikörper verwendet werden können (anti-Kaninchen), erspart dieses Verfahren, für jede antigene Struktur einen eigenen direkt mit Fluorchrom markierten Antikörper herzustellen. Es kommt zusätzlich zu einem Verstärkungseffekt da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden. In einer Kontrolle (die nur den zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper enthält) wird überprüft, ob der fluoreszenzmarkierte Antikörper auch unspezifisch an andere Strukturen bindet. Beiden Verfahren ist gemein, dass im Anschluss an die Färbung unter einem Fluoreszenzmikroskop der Nachweis der gewünschten Zielstruktur mittels des fluoreszenzmarkierten Antikörpers erfolgt.

Zum Nachweis der Matrixproteine Kollagen IV, Laminin und Fibronectin kultivierten wir HUVECs unter den verschiedenen Glukosebedingungen und isolierten anschließend deren EZM (3.2.1.1 + 3.2.2.1). Im Anschluss an die Dezellularisierung, wurden die Wells wie üblich dreifach mit PBS gespült und anschließend für 30 min mit 4%igem PFA fixiert. Nach zweimaligem Waschen, mit PBS wurde die Matrix mit 2%igem BSA in PBS, für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Anschließend wurde der erste Antikörper in seiner entsprechenden Verdünnung in PBS mit 1% BSA über Nacht bei 4°C zugegeben. Nach drei maligem Waschen (PBS+ 1% BSA für je fünf Minuten auf einem Rotationsschüttler), wurde der zweite, fluoreszenzmarkierte Antikörper auf die Matrix verbracht und mindestens 1,5 Stunden darauf inkubiert. Nach wiederholtem Waschen folgte eine Färbung für zwei Minuten mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole), einem Fluoreszenzfarbstoff der selektiv Doppelstrang-DNA bindet um eventuelle Zell(kern)-Rückstände zu identifizieren. Nach einem weiteren Spülvorgang mit Aqua dest. wurden die Zellen mit PBS+ 1% BSA benetzt und mikroskopisch ausgewertet.

3.2.3.3 ELISA

Neben dem qualitativen Nachweis der extrazellulären Matrixmoleküle, versuchten wir diese auch quantitativ mittels ELISA zu bestimmen. ELISA steht allgemein für „*Enzyme linked immunosorbent Assay*“ und ist ein antikörperbasiertes biochemisches Nachweisverfahren. Bei einem ELISA werden Antikörper, die mit einem Enzym kon-

jugiert sind, an einen Analyten gebunden, der auf einem soliden Träger, meist einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert ist. Anschließend werden die Proben gewaschen um alle ungebundenen Antikörper auszuspülen. Im nächsten Schritt wird ein farbloses chromogenes Substrat aufgebracht, welches, katalysiert durch die Enzymreaktion, in ein gefärbtes Derivat umgesetzt wird. Durch die Farbveränderung kann die Anwesenheit eines Analyten qualitativ nachgewiesen werden. In einem quantitativen Assay-, kann zusätzlich anhand des Grades der kolorimetrischen Veränderung die mit verschiedenen konzentrierten, bekannten Standards verglichen wird, auch eine Aussage über die Menge eines Analyten in einer Probe getroffen werden. Wir verwendeten zum einen das klassische, auch als Sandwich-ELISA bezeichnete Verfahren. Dieses Verfahren ist besonders gut geeignet um in Lösung befindliche Stoffe einer Probe nachzuweisen. Wir nutzten diese ELISAs um die Verteilung der Matrixkomponenten Fibronectin, Laminin und Kollagen IV zwischen den einzelnen Zuständen (Supernatant, Matrix, Zellysat) zu Vergleichen. Zum anderen nutzten wir sogenannte „Cell based ELISAs“ .Dabei wird der ELISA direkt auf dem Zellmonolayer beziehungsweise der dezellularisierten Matrix durchgeführt. Um die gewonnenen Messwerte einer Zellzahl zuordnen zu können, wurden HUVECs in absteigender Konzentration (40.000 bis 5.000 Zellen) auf der ELISA-Platte ausgesät. Anschließend konjugierten wir diese sowohl mit dem matrixspezifischen-Antikörper als auch mit Anti-GAPDH als Kontrolle und nutzten deren Messwerte als Kontrollen.

Cell-based ELISA: Durchführung (Entsprechend den Herstellerangaben)

- I. Wells mit Zellen bzw. Matrix zweimal mit *200µl TBS* gespült
- II. 20 Minuten mit je *100 µl Fixing Solution* fixiert
- III. Dreimal hintereinander mit je *200µl Wash Buffer* gespült
- IV. Inkubation mit *100µl Quenching-Buffer* für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- V. Als nächstes wurden die Wells erneut dreimal hintereinander für je 5 Minuten mit Wash Buffer gespült und dabei auf einen Rotationsschüttler verbracht
- VI. Es wurden *200µl Blocking Buffer* in die Wells gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert
- VII. Waschen (siehe oben)
- VIII. Inkubation mit je *50µl* des entsprechenden Primärantikörpers (*Anti-KollagenIV, Anti-Fibronectin, Anti-GAPDH*) bei *4 °C* über Nacht
- IX. Waschen (siehe oben)

- X. Inkubation mit je 50µl des entsprechenden Sekundärantikörpers für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur
- XI. Waschen (siehe oben)
- XII. Zugabe von je 50µl *Ready to use Substrat* und Inkubation im Dunkeln für 30 Minuten
- XIII. Zugabe von 50µl *Stop Solution* und Messung im Microplate reader TECAN bei 450 nm

Sandwich ELISA: Gewinnung der Proben (Supernatant, Matrix, Zellen)

- I. Beim Supernatant handelt es sich um den Medienüberstand der HUVEC-Kulturen den wir nach zwei Tagen auf den Zellen abnehmen und bei 4°C und 1.000g für 20 Minuten zentrifugieren und im Anschluss bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung einlagern.
- II. Die gesamte Matrix einer 6 Well-Platte wurde wie in (3.2.2.1) beschrieben gewonnen, mit einem Zellschaber abgelöst und in je 2ml *PBS* aufgenommen. Danach wurde auch sie bei 4°C sowie 1.000g für 20 Minuten zentrifugiert und im Anschluss bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingelagert.
- III. Alle Zellen einer 6 Well-Platte wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in 2 ml *PBS* aufgenommen. Im Anschluss daran wurden Sie drei Mal in Flüssigstickstoff schockgefroren und zwei Mal für 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt um die Zellkerne zu zertrümmern. Danach wurden sie ebenfalls bei 4°C sowie 1.000g für 20 Minuten zentrifugiert und im Anschluss bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung einlagert.

Sandwich ELISA: Durchführung (Entsprechend den Herstellerangaben)

- I. Je 100µl einer Probe pro Well bei RT auf vorbeschichtete ELISA-Platte pipettiert und bei 37°C für 90 Minuten inkubiert
- II. Flüssigkeit entfernt und je Well 100µl *Biotinylated Detection AB* hinzugegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert
- III. Drei Mal mit *Wash Buffer* gespült
- IV. 100µl *HRP Konjugate* in jedes Well pipettiert und Platte erneut bei 37°C für 30 Minuten inkubiert
- V. Flüssigkeit abgenommen und Platte fünf Mal hintereinander mit *Wash Buffer* gewaschen
- VI. 90 µl *Substrate Reagent* auf die Platten gegeben und für 15 Minuten inkubiert
- VII. 50 µl *Stop Solution* hinzugefügt und im Microplate reader TECAN bei 450 nm gemessen

3.2.4 Charakterisierung der Zelllinien

3.2.4.1 Durchflusszytometrie

Nachdem wir unterschiedliches Wachstums- und Apoptoseverhalten von ASC und HRP auf hyperglykämisch modifizierter EZM festgestellt hatten, waren wir daran interessiert in wie weit HRP und ASC hinsichtlich ihrer Charakteristika Gemeinsamkeiten oder auch Unterschiede teilen. Um dies näher zu untersuchen wählten wir die Durchflusszytometrie.

Bei der Durchflusszytometrie (FACS) bedient man sich der physikalischen sowie molekularen Eigenschaften der Zellen um ihre Größe und Morphologie zu analysieren und eine quantitative Bestimmung von intra- und extrazellulären Antigenen durchzuführen. Durch die Kopplung fluoreszierender Moleküle an Antikörper, können antigene Strukturen spezifisch gebunden und dadurch detektierbar gemacht werden. Für die Färbung von DNA werden Antikörperunabhängig interkalierende Farbstoffe verwendet. Dafür werden die Zellen erst in Suspension gebracht, gefärbt und im Anschluss daran durch eine Kapillare in das Durchflusszytometer gesaugt. Dies ermöglicht es, dass die Zellen einzeln, in Reihe die Flusszelle passieren, wobei sie durch einen fokussierten Laser angeregt werden. Dabei wird sowohl die Lichtstreuung als auch das emittierte Licht der Fluorochrome über Detektoren registriert und über einen Computer analysiert. Die Menge des gestreuten Lichtes gibt dabei Aufschluss über Volumen, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität einer Zelle. Über das Vorwärtsstreulicht (*Forward scatter*) wird dabei das Volumen der Zelle ermittelt, das Seitwärtsstreulicht (*Sideward scatter*) ist Abhängig von Granularität, Größe des Zellkerns und Anzahl der Vesikel innerhalb einer Zelle. Durch diese Methode kann man bereits ohne Färbungen eine Einteilung der Zellen vornehmen. Um eine spezifischere Charakterisierung von Zellen vorzunehmen bedient man sich der bereits erwähnten Färbung mittels fluoreszierender Antikörper oder Farbstoffe. Die Intensität der detektierten Strahlung richtet sich nach Menge des gebundenen Farbstoffes was es ermöglicht, quantitative Aussagen über die markierten Strukturen zu treffen. Auf diese Art und Weise kann zum Beispiel die Menge an DNA oder an exprimierten immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (u.a. *CD-Marker*) festgestellt werden. Je nach Anzahl verschiedenfarbiger Laser und Filter eines Gerätes, kann man diese auch in Kombination einsetzen. Dies ermöglicht es auch komplexere Oberflächenprofile einer Zellpopulation zu erstellen. Für zahlreiche Zelltypen, gibt es mittlerweile

etablierte Profile solcher Oberflächenstrukturen aus „CDs“. Diese festgelegten Profile sind charakteristisch für eine Zellgattung und deren entsprechende Phänotypen was man sich zu Nutzen macht um Zellpopulationen voneinander abzugrenzen. Im Zuge dessen, haben sich bestimmte „Pannels“ etabliert, die meist eine Kombination aus spezifischen Markern verschiedener Populationen bilden. Dabei gibt es für die meisten Zellgattungen, wie zum Beispiel die MSCs beziehungsweise ASCs festgelegte Kriterien/Marker(112). Wir kombinierten das in der Gruppe etablierte MSC-Panel und ergänzten es im Laufe der Arbeit zunehmend mit einigen den Perizyten assoziierten Markern. Unser *MSC-Pannel* beinhaltet die Marker CD 45, CD 90, CD73, CD 106, CD 44, CD73, CD31, CD105, CD34, HLA-ABC sowie HLA-DR. Für die Perizyten nutzten wir die ihnen assoziierten Marker CD29, CD146, CD90, CD140a, CD 140b und NG2. In späteren Versuchen färbten wir ein zusätzliches Panel mit *α -smooth muscle actin*.

Prozedere

2×10^5 bis 1×10^6 Zellen wurden, entweder direkt nach dem Auftauen oder nach dem Splitten, in *FACS-Buffer* aufgenommen. Dies entsprach einer Zellzahl von circa 1×10^5 Zellen pro Ansatz (100 μ l). Als nächstes wurden 10 μ l *FcR Blocking Reagent* in jedes Tube gegeben und auf dem *Vortexer* und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Je nach Farbstoffstärke wurden im Anschluss 1-20 μ l Antikörper (siehe Tabelle) in die Röhrchen gegeben und für 20 Minuten bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden jedem Tube 2ml *Cell Wash Buffer* hinzugefügt und die Röhrchen für vier Minuten bei 420g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Waschvorgang wiederholt. Nach dem zweiten Waschgang wurden die gefärbten Zellen in je 100 μ l *FACS-Buffer* aufgenommen und die ungefärbten zusätzlich mit *7-AAD*, einem Farbstoff der lebende und tote Zellen voneinander differenzieren kann, versetzt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnten die Zellen mit dem *CANTO II* gemessen und werden.

Perizyten und MSC Oberflächenprofile

Tabelle 3: Färbepanel für ASC und Perizyten

| Pannel | Antikörper | Klon | Hersteller |
|--------|--|----------------------------------|--|
| 0 | ungefärbt | | |
| 1 | CD 29-AlexaFluor 488 CD73-PE CXD90-APC CD44-APC eFluor780 | TS2/16 AD2 5E10 IM7 rat | BioLegend BD BD eBioscience |
| 2 | CD31-FITC CD34-APC CD146-PE CD45-PE-Cy7 | WM 59 581 TEA1/34 HI30 | BD BD Beckmann coulter BD |
| 2 | NG2-AF 488 CD140a-PE CD140b-APC CD105-APC Cy7 | 9.2.27 16A1 18A2 SN6 | eBioscience BioLegend BioLegend eBioscience |
| 5 | CD 106-FITC HLA-ABC-APC HLA-DR-APC Cy7 | VCAM-1 REA230 SN6 | BD Miltenyi BioLegend |

3.2.4.2 Differenzierungsassays

Differenzierungsassays (DA) bilden eine Methode um die phänotypische Ausprägung von Zellpopulationen nachzuweisen und geben Aufschluss über das verbliebene Differenzierungspotential einer Zellpopulation. Ähnlich wie bei der Durchflusszytometrie gibt es für ASCs klare Definitionen hinsichtlich ihrer Differenzierungskapazitäten. Einige Studien beschreiben, dass Perizyten die gleichen oder sogar bessere Differenzierungskapazitäten wie MSC/ ASC aufweisen (79). Deshalb testeten wir alle in unseren Versuchen verwendeten ASCs und Perizyten auf ihr adipogenes und osteogenes Potential.

3.2.4.3 Qualitative Differenzierungsassays

Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden 1.75×10^4 Zellen/cm², nach dem Splitt, in je 200µl Medium in eine *Chamber-Slide Kammer* oder in je 100µl Medium ins Well einer

96WP überführt. Je zwei Wells fungierten als Kontrolle und wurden dafür in DMEM-FCS kultiviert. In den zwei anderen Wells wurde die Adipogenese bei postkonfluenter Dichte mittels Adipogenic Induction Medium (AIM) induziert. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium durch Adipogenic Maintenance Medium (AMM) ersetzt. Im weiteren Verlauf wurden Medienwechsel mit AIM oder AMM jeweils im Wechsel alle 3-4 Tage durchgeführt. Nach 21 Tagen wurden die Kammern mittels histochemischer Ölrot-Färbung gefärbt und eine Auswertung sowie Dokumentation der Ergebnisse mittels Phasenkontrastmikroskopie durchgeführt.

Ölrot Färbung

Alle Medienüberstände wurden abgesaugt und die Zellen für 30-60 Minuten mit 10% Formalin fixiert. Nach Spülung mit Aqua dest. folgte die Inkubation mit 60% Isopropanol für 2-5 Minuten. Zur Färbung der Fettvakuolen wurden die Zellen für 5 Minuten mit Ölrotlösung inkubiert und im Anschluss daran mehrfach mit Leitungswasser gespült um Farbreste zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit Harris Hematoxilin für 1-5 Minuten benetzt, erneut mit Leitungswasser gespült und mikroskopisch beurteilt.

Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden 0.875×10^4 Zellen/cm², nach dem Splitt, in je 200µl Medium in eine Chamber-Slide Kammer oder in je 100µl Medium ins Well einer 96WP überführt. Je zwei Wells fungierten als Kontrolle, in je zwei weiteren Wells wurde die Osteogenese bei postkonfluenter Dichte mittels Osteogenic Induction Medium (OIM) induziert. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium der induzierten Slides durch OIM, und das der Kontrollen durch DMEM-FCS ersetzt. Im weiteren Verlauf wurden Medienwechsel alle 3-4 Tage durchgeführt. Nach 21 Tagen wurden die Kammern mittels histochemischer van Kossa Färbung gefärbt und eine Auswertung sowie Dokumentation der Ergebnisse mit Hilfe von Phasenkontrastmikroskopie durchgeführt.

Van Kossa Färbung

Alle Medienüberstände wurden abgesaugt und die Zellen für 15 Minuten mit 10% Fomalin fixiert. Nach zwei Spülvorgängen mit Aqua dest. folgte die 15-30 minütige Inkubation mit Silbernitrat um Kalziumapatitkristalle sichtbar zu machen. Nach zwei

weiteren Spülvorgängen mit Aqua dest. erfolgte die Inkubation mit 1% Pyrogallolösung für 2-5 Minuten in Dunkelheit und nach zwei Spülvorgängen mit Aqua dest. die Fixierung mit 5% Natriumthiosulfat. Nach erneutem Spülen konnten die Zellen mikroskopisch beurteilt werden.

3.2.4.4 Quantitative Differenzierungsassays

Hoechst-Färbung

Für die Hoechst-Färbung wurden die osteogen induzierten Zellen als erstes mit 100µl 10%igem Formalin/96Well für 30 Minuten fixiert. Das anschließende Prozedere war für die osteogene (ODA) und adipogene (ADA) Differenzierung einheitlich. Die Wells wurden zweimal mit 100µl PBS gewaschen und erneut mit PBS benetzt. Zur Blank-Kontrolle wurden drei freie Wells mit 100µl PBS befüllt. Hoechst-Farbstoff wurde 1:100 in PBS verdünnt und 3µl in jedes Well, auch die Kontrollen, gegeben und 30-60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die 96 Well-Platte im TECAN gemessen wobei das Hoechst-Protokoll verwendet wurde.

AdipoRed™ Assay

Nach der Hoechst-Färbung wurden die mit ADA induzierten Wells zweimal mit 200µl PBS gewaschen und mit 200µl PBS befüllt wobei auch drei leere Wells als Kontrolle mit PBS versetzt wurden. Anschließend wurden je 5µl AdipoRed™ in alle Wells pipettiert und für 15 Minuten inkubiert und im TECAN mit der AdipoRed-Maske gemessen und ausgewertet.

Osteogene Differenzierung

Nach der Hoechst-Färbung wurden die osteogen induzierten Wells mit 200µl Washbuffer, bestehend aus 1:10 mit Aqua dest. verdünntem PBS+ 0,05% Tween, gewaschen. Anschließend wurden die Wells mit 100µl, 1:100 in PBS verdünntem Staining Reagent befüllt und für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Als nächstes wurde die Wells erneut dreimal mit Washbuffer gespült und anschließend im TECAN mit der OsteoImage-Maske gemessen und weiter ausgewertet.

3.2.4.5 Immunfluoreszenz spezifischer RGS5- Markerproteine

RGS-Proteine (Regulator of G-Protein Signaling) nehmen modulierenden Einfluss auf G-Protein gekoppelte Signalkaskaden. Mittlerweile sind über 30 verschiedene RGS-Proteine bei Säugern bekannt (136). Eine besonders wichtige Bedeutung nehmen G-Protein gesteuerte Prozesse bei der Homöostase des Herz-Kreislaufsystems, genauer gesagt der Regulation des Gefäßtonus ein. Deshalb verwundert es nicht, dass dort auch besonders viele RGS-Proteine zu finden sind, besonders RGS5 welches stark in vSMC exprimiert wird und unter anderem Einfluss auf die Blutdruckregulation nimmt (137). RGS5 wird neben vSMC auch von anderen Zellen perivaskulären Ursprungs exprimiert und gilt seit kurzem als Marker für neuronale Perizyten (138). Da diese die retinalen Perizyten miteinschließen, erschien uns RGS5 für unsere HRM-VPC und Bmi-PC sinnvoll. Gleichzeitig wollten wir im Zuge der Charakterisierung ASCs auf das eventuelle Vorkommen von RGS5-Proteinen untersuchen. Wir verwendeten zwei Antikörper Klone RGS5-B4 und RGS5-N14, die sich an der Bindungsstelle am RGS-Protein unterscheiden. Als Kontrolle verwendeten wir die Tumorzelllinie Hep2G die ebenfalls RGS5 exprimiert (139). Für den Proteinnachweis säten wir 1.75×10^4 Zellen/cm², direkt nach dem Splitt, in je 100µl ihres entsprechenden Mediums in 96WP aus. Nach 1-2 Tagen spülten wir die Wells zweifach mit PBS und fixierten sie mit 4% PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wuschen wir die Zellen erneut mit PBS, behandelten sie für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5% TritonX100 und spülten sie erneut zweimal mit PBS. Als nächstes wurden die Zellen mit 2% BSA in PBS für 15 Minuten geblockt und im Anschluss mit dem Primärantikörper (RGS5B4/N14, jeweils 1: 50 mit PBS + 0,1% BSA verdünnt) für mindestens 2 Stunden, bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Dann wurden die Wells mit 0,1%BSA in PBS zweimal gespült und mit dem Sekundärantikörper für mindestens 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde einmal mit 0,1% BSA in PBS gespült und einmal mit Aqua dest., bevor die Zellkerne mit DAPI (Verdünnung 1:1000) in PBS für 3 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt wurden. Nach einem letzten Spülgang mit Aqua dest. wurden die Zellen mit 0,1% BSA in PBS benetzt und konnten fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

3.2.5 Auswirkungen von EZM auf die Charakteristika von ASC

Nachdem eine aktuelle Publikation "*Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro*" die Differenzierung von MSCs in Richtung „Perizyten ähnlicher Zellen“ durch Co-Kultur mit endothelialen Vorläuferzellen beschrieben hatte, fragten wir uns ob sich ähnliche Effekte auch durch unsere von Endothelzellen sezernierte Matrix, in ASC induzieren ließen (130). Da Grundlage dieser Arbeit die Idee ist, langfristig MSC/ASC gegen Erkrankungen die mit einem Perizytenuntergang einhergehen einzusetzen, waren diese Ergebnisse hoch interessant für uns. In der Folge fragten wir uns, ob es gegebenenfalls bereits durch die von reifen Endothelzellen produzierte EZM zu Veränderungen im Expressionsmuster von ASC kommen würde. Anstatt der im obigen Paper verwendeten Methode der Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR, nutzten wir die Charakterisierung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie um die ASC auf eventuelle Veränderungen zu untersuchen. Dafür splitteten wir ASC der Passage P4/2 und analysierten ihr Expressionsprofil im FACS. Anschließend säten wir 5×10^3 Zellen/cm² des gleichen Splittes auf EZM, die unter hohen und normalen Glukosebedingungen produziert wurde (3.2.1.1+ 3.2.2.1) aus und kultivierten einen weiteren Teil der ASC unter Standardbedingungen in Zellkulturflaschen weiter. Die ASC wurden für 4 Tage bei 37°C Temperatur und 5% CO₂ kultiviert. Medienwechsel wurden alle 2 Tage durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst, in FACS-Buffer aufgenommen und erneut durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.6 Auswertung und Statistik

3.2.6.1 Auswertung IncuCyte ZOOM®

Konfluenz

Die Auswertung erfolgte mit der dem *IncuCyte ZOOM®* zugehörigen Software, IncuCyte 2015, Microsoft Excel und SigmaPlot für ausgewählte statistische Analysen. Um statistische Robustheit zu erreichen, analysierten wir in der Regel 54 technische Replikate, 6 Wells mit je 9 Messloci/Well pro experimenteller Bedingung. Von allen phasenkontrastmikroskopischen Einzelbildern des *IncuCyte ZOOM®* wurden dafür die Konfluenz-Daten mittels der von uns designten Analyse-Maske ausgewertet. Diese „Rohdaten“ wurden von uns in Microsoft Excel exportiert und dort auf Messgenau-

igkeit überprüft. Bei stark abweichenden Zahlenwerten, wurden die Bilder der einzelnen Konfluenzmessungen im *IncuCyte ZOOM®* mit ihren entsprechenden Zahlenwerten in der Excel Tabelle verglichen. Wie schon erwähnt kam es teilweise durch Detritus oder inkomplette Ablösung der HUVECs während des Dezellularisierungsprozesses zu Verunreinigungen der Matrix, also falsch hohen Konfluenzwerten in der Auswertung. Wenn die Verunreinigungen ein akzeptables Maß überstiegen entnahmen wir die entsprechenden Einzelmessungen der Auswertung und dokumentierten dies in den Excel Daten. Wenn die Verunreinigungen mehr als 30% aller Einzelmessungen eines Experimentes betrafen, wurde das ganze Experiment aus der Endauswertung ausgeschlossen. Mittels Zelltracking (3.2.2.3) konnten wir belegen, dass es trotz geringer Messabweichungen durch Matrixverunreinigungen zu keinen ausschlaggebenden Veränderungen der kam. Im Anschluss an die Sichtung der Rohdaten und der Herausnahme der stark verunreinigten Wells, erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes (MW) sowie der dazugehörigen Standardabweichung (SD) aller Messungen einer Zellart und Kulturbedingung zu den einzelnen Zeitpunkten. Aus MW und SD der technischen Replikate der Einzelversuche, wurden wiederum MW und SD der biologischen Replikate gebildet. Ihre Anzahl ist mit n= unter den jeweiligen Abbildungen vermerkt. Um die Daten auf signifikante Unterschiede zu überprüfen, übertrugen wir die Mittelwerte in *Sigma Plot* und führten je nach Experiment einen gepaarten oder ungepaarten T-Test (2 Proben) beziehungsweise ANOVA-Analysen (mehr als 2 Proben) durch.

Cell Tracker

Auch bei den Versuchen mit *CellTracker™ Red CMPTX* analysierten wir die Konfluenz der proliferierenden Zellen. Hier analysierten wir die fluoreszenzmikroskopisch detektierten Daten, der zuvor mit *CellTracker™ Red CMPTX* angefärbten Zellen.

Apoptosefarbstoff *NucView™ 488*

Mittels des Apoptosefarbstoffes *NucView™ 488* wollten wir ASC und Perizyten auf das Auftreten von apoptotischen Events untersuchen. In diesen Versuchen analysierten wir nicht die Konfluenz sondern die sogenannten „Object counts per well“. Anhand dieser Daten konnten wir genaue Aussage darüber treffen, wie viele Zelltode pro Zell-Art und Kulturbedingung pro Zeiteinheit (meist Stunde) auftraten.

3.2.6.2 Auswertung Durchflusszytometrie

Nach der Messung der Zellen im Durchflusszytometer *FACS Canto II* wurden die Daten aus *BD FACS Diva Version 8* als fcs Datei exportiert und in *Flow Jo 10* analysiert. Durch das Festlegen der Gates wurden die Mediane der Fluoreszenzintensitäten (Mean fluorescence intensity, MFI) aller Marker definiert. Nach Subtraktion der Autofluoreszenz, ergab sich der für die Auswertung korrigierte MFI-Wert als Maß für die Antigenexpressionsstärke.

3.2.6.3 Auswertung ELISAS/ TECAN

Bei der Auswertung der ELISAs nutzten wir den TECAN um die Absorption der unterschiedlichen Proben zu messen und anhand dessen auf die Konzentrationen der entsprechenden Proteine in den verschiedenen Proben schließen zu können.

Mikroplattenreader werden dazu verwendet chemische, biologische oder physikalische „Events“ in Mikrotiterplatten zu messen. Der *TECAN Infinite[®] M200* ist ein multifunktionales Mikroplattenlesegerät basierend auf einem integrierten *Quad4 Monochromator[™]*. Damit kann er eine Vielzahl an verschiedenen Detektionsmethoden leisten, wie zum Beispiel Absorptionsmessungen, Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzpolarisation, und weitere. Die Sandwich-ELISAs zur Analyse von Supernatant, Matrixlysat und Zelllysat maßen wir nach Durchführung des entsprechenden Protokolls (3.2.3.3) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die zellbasierten-ELISAs wurden anschließend nach Färbung mit Chrystal violett bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Die Daten der TECAN-Messungen wurden in Excel exportiert, aus den Einzelwerten der technischen Replikate die Mittelwerte gebildet um die Ergebnisse graphisch darzustellen. Bei den zellbasierten-ELISAs hatten wir zusätzlich Standards mit verschiedenen Zellzahlen sowohl mit dem spezifischen Antikörper (Kollagen IV, Fibronectin) als auch GAPDH gefärbt und als Kontrolle verwendet.

3.2.6.4 Auswertung Differenzierungsassays

Die qualitativen Differenzierungsassays, wurden je nach Differenzierung (adipogen: Ölrot / osteogen: von Kossa) gefärbt und phasenkontrastmikroskopisch dokumentiert und anschließend beurteilt. Die quantitativen Differenzierungsassays wurden als erstes mit Hoechst gefärbt, anschließend im TECAN eingelesen und mit einer Emissions-Wellenlänge von 450nm gemessen. Im Anschluss erfolgten die spezifischen

Färbungen (adipogen: *AdipoRed*TM Assay / osteogen: *OsteoImage*TM Mineralization Assay) und die Platten wurden erneut im TECAN diesmal mit den entsprechenden Protokollen gemessen: adipogen = Emissions-Wellenlänge 572nm oder osteogen = Emissions-Wellenlänge 520nm. Für die Auswertung wurden alle Replikate gesichtet und in Einzelfällen, bei starker Abweichung von den anderen Proben, einzelne Werte der Auswertung entnommen. Alle Messdaten des TECAN wurden in Excel kopiert. Dort wurde der „Blank“ also der Null Wert, von allen Hoechst-Messungen abgezogen. Die Messwerte der osteogenen und adipogenen Messungen werden durch den bereinigten Hoechstwert geteilt, die Mittelwerte der technischen Replikate gebildet, sowie ihre Standardabweichung erzeugt und graphisch dargestellt.

4 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse von hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix von Endothelzellen auf das Wachstumsverhalten von ASCs und HRP zu untersuchen. Um dies zu erreichen haben wir Endothelzellen in Medien mit verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert und durch Dezellularisierung die vom Endothel sezernierte EZM isoliert. Anschließend haben wir auf dieser sogenannten EZM, ASC und HRP ausgesät und ihre Wachstumskinetik quantifiziert.

4.1 Optimierung eines Protokolls zur Isolation extrazellulärer Matrix

4.1.1 Nachweis der wachstumsfördernden Effekte von EZM auf die Proliferation von ASC

Um die Auswirkungen von hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix (EZM) zu untersuchen, war es als erstes nötig, HUVEC unter normalen (NG) und hohen Glukosekonzentrationen (HG) zu kultivieren. Des Weiteren erprobten wir mit Mannitol versetztes Medium (MA) als osmotische Kontrolle. Dazu wurden HUVEC in Standardmedium (SM), Mannitol-Medium (MA) oder hohe Glukose Medium (HG) kultiviert und anschließend ihre EZM isoliert. Als Kontrolle für die EZM erprobten wir Zellkulturplastik, das nicht oder mit 2% Gelatine (G2%) beschichtet war. Anschließend wurden ASC bzw. HRP auf der isolierten EZM ausgesät und ihre Proliferation mittels „*Live Cell Imaging*“ quantifiziert. Abbildung 11 zeigt dabei die Rohdaten des IncuCyte, Abbildung 12 die Daten nach der Re-Evaluation und Excel-Auswertung.

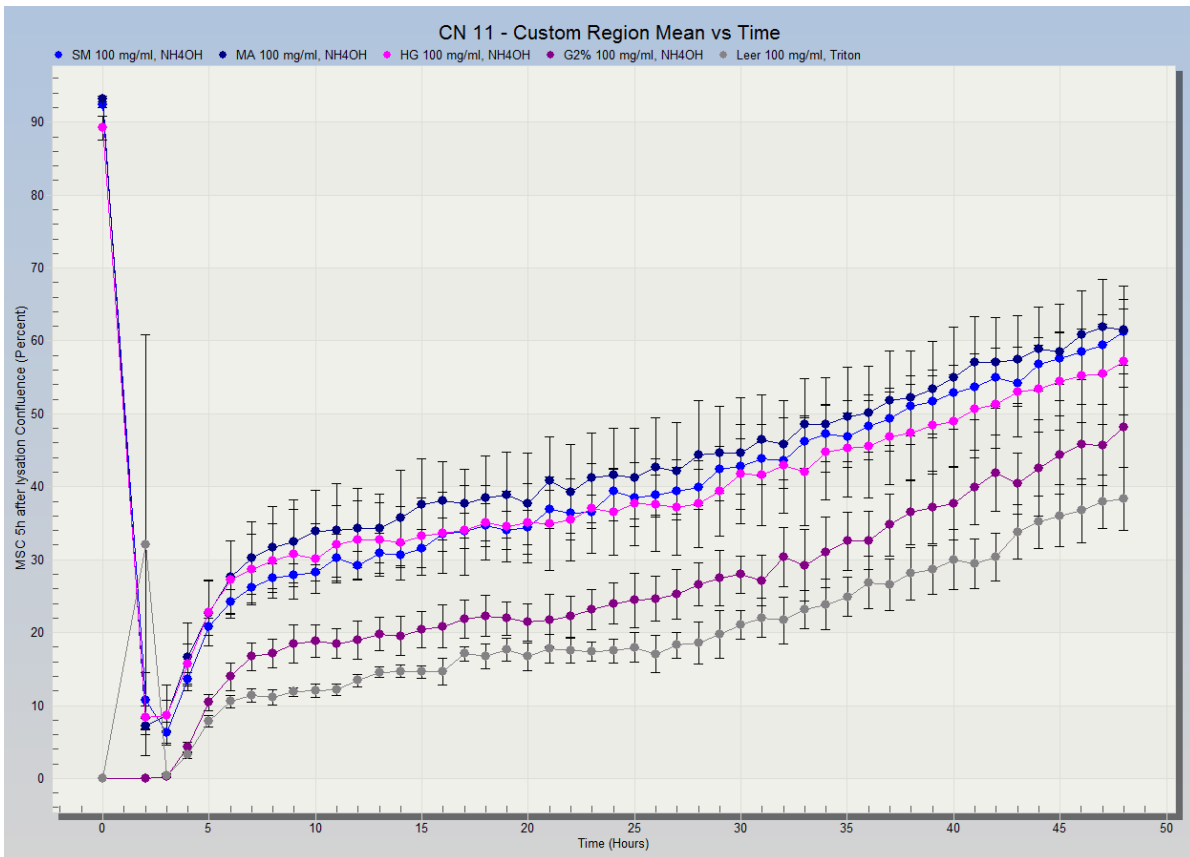


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt eine typische Konfluenz-Verlaufskurve des INCUCYTE Zoom. Aufgeführt ist der Verlauf (Time) gegenüber der Konfluenz in %. Zeitpunkt 0 zeigt die konfluenten HUVEC mit einer Konfluenz von über 90%, danach kommt es durch die Dezellularisierung zu einer Abnahme der Konfluenz auf 0-10%. Nach Aussaat der Zellen (3h) ist die wachsende Konfluenz der Zellen zu beobachten. (ASC-HG (hohe Glukose), G2% (Gelatine 2%), ASC-NG (normale Glukose), ASC-MA (Mannitol), Keine Beschichtung, Je 12 Einzelmessungen)

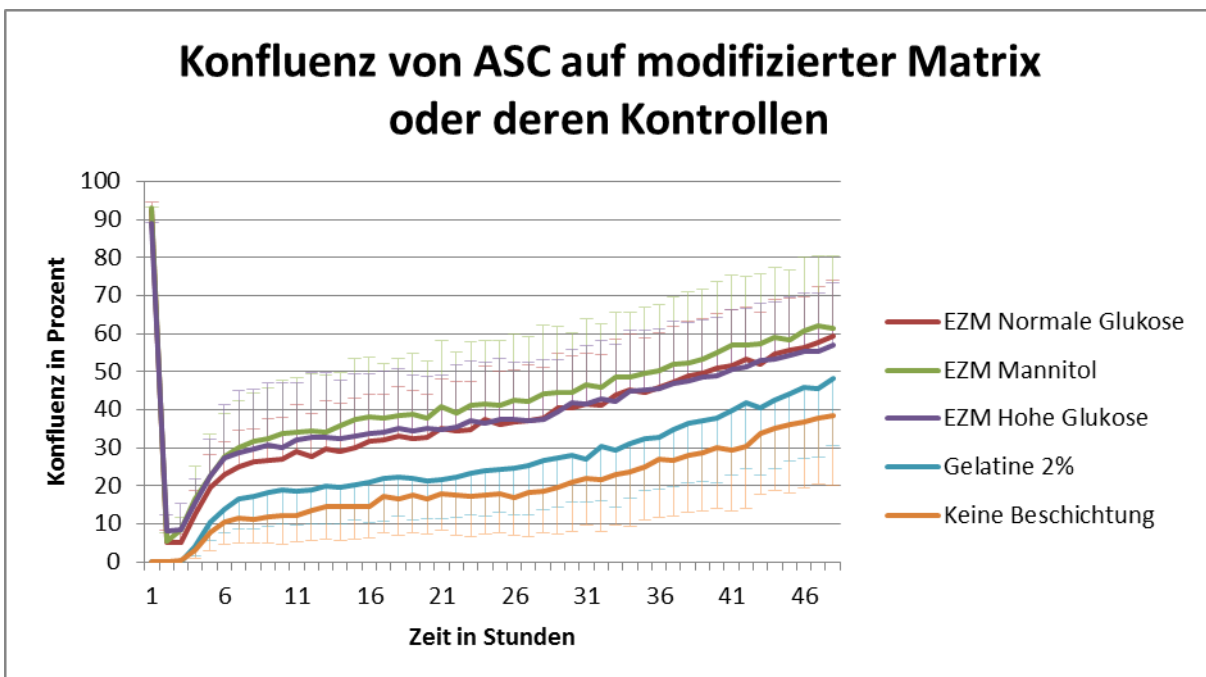


Abbildung 12: Daten aus Abbildung 11, nach Bereinigung und Auswertung in Excel

Die Daten deuten an, dass ASC unabhängig von den Kulturbedingungen der HUVEC vergleichbar gut auf der EZM wachsen. Im Vergleich zu 2% Gelatine *coating* hat die EZM einen deutlich positiven Einfluss auf die Zellproliferation. Gelatine 2% wiederum wirkt sich deutlich besser als gar keine Beschichtung auf das Wachstum der ASC aus. Nach diesen Erkenntnissen entschieden wir uns für G2% als Kontrolle für die EZM.

4.1.2 Osmolaritätskontrolle mit Mannitol

Um auszuschließen, dass eventuelle Effekte von hoher Glukose allein auf der durch Glukose gesteigerten Mediumosmolarität basieren, verwendeten wir Mannitol als Kontrolle. Mannitol ist ein Einfachzucker mit gleicher Osmolarität wie Glukose der von menschlichen Endothelzellen jedoch nicht verstoffwechselt werden kann und somit während des gesamten Kultivierungszeitraumes eine erhöhte Osmolarität des Mediums bedingt. Wir konnten zeigen, dass sowohl Glukose als auch Mannitol keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum der HUVECs zeigen (NG = 5g/l Glukose, HG = 25g/l Glukose, Mannitol = 5g/l Glukose + 20g/l Mannitol). Im Gegenteil konnten wir bei der Aussaat von ASCs auf durch Mannitol oder hohe Glukose modifizierte Matrix feststellen, dass sich hohe Glukose in den meisten Versuchen sogar leicht förderlich auf das Wachstum der ASC auswirkte, während sich Mannitol meist äquivalent zu normaler Glukose verhielt. Damit konnten wir einen rein osmotisch bedingten Effekt auf das Zellwachstum und die Matrixbeschaffenheit ausschließen. Für alle weiteren Versuche legten wir nach dieser Erkenntnis SM als Kontrollmedium fest und verzichteten auf die weitere Verwendung von Mannitol-Medium.

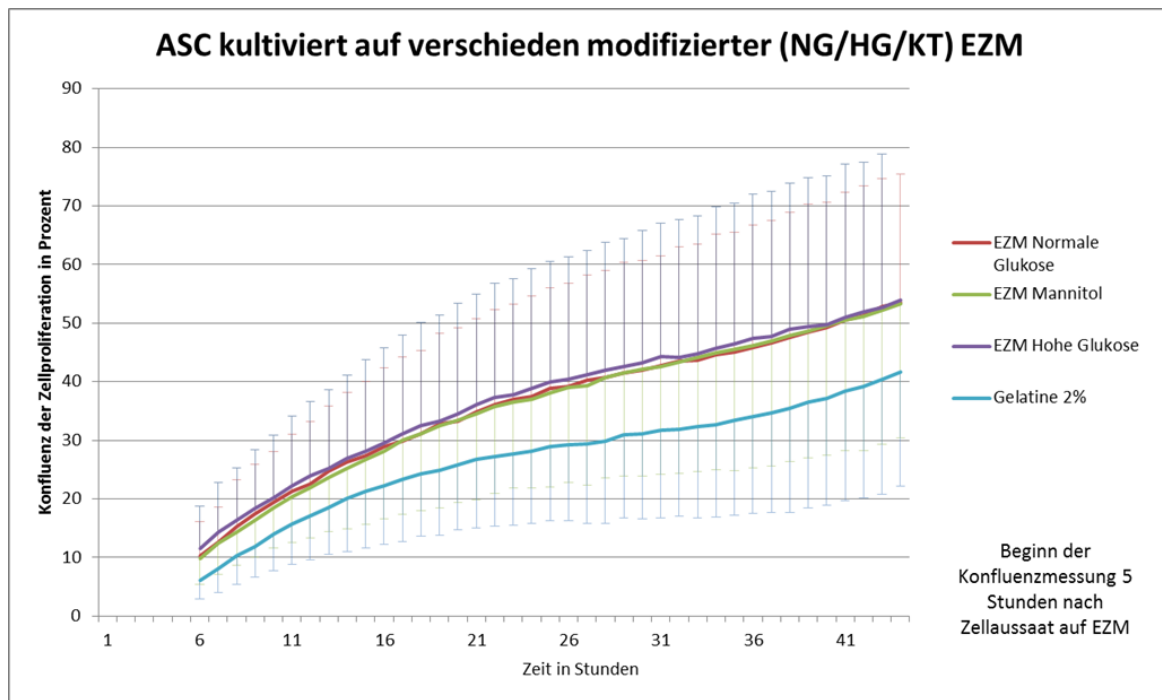


Abbildung 13: Konfluenz von ASC in Abhängigkeit ihrer Wachstumsgrundlage. Während sich die Gelatine2%-Kontrolle klar abgrenzt, ist zwischen NG/HG/MA modifizierter EZM kein wesentlicher Effekt auf das Wachstum der ASC festzustellen. (n = 4 biologische Replikate, mit je 24 technischen Replikaten)

Aufgrund der, gerade zu Beginn der Versuche relativ hohen Standardabweichung und um die feinen Unterschiede, wie zum Beispiel in Abbildung 13 zwischen NG-, HG- und MA-Matrix besser dazustellen, entschieden wir uns dazu unsere Daten auf die extrazelluläre Matrix von Standardmedium (NG = 5g/l Glukose) zu normalisieren. Dafür verwendeten wir die Mittelwerte aller technischen Replikate zum Zeitpunkt X, und bildeten daraus den Quotient mit dem zeitlich entsprechenden Mittelwert der Kontrollbedingungen. Wenn mehrere biologische Replikate in eine Abbildung einfließen, bildeten wir den Mittelwert aller normalisierten Einzelexperimente und berechneten die Standardabweichung der zusammengeführten Daten.

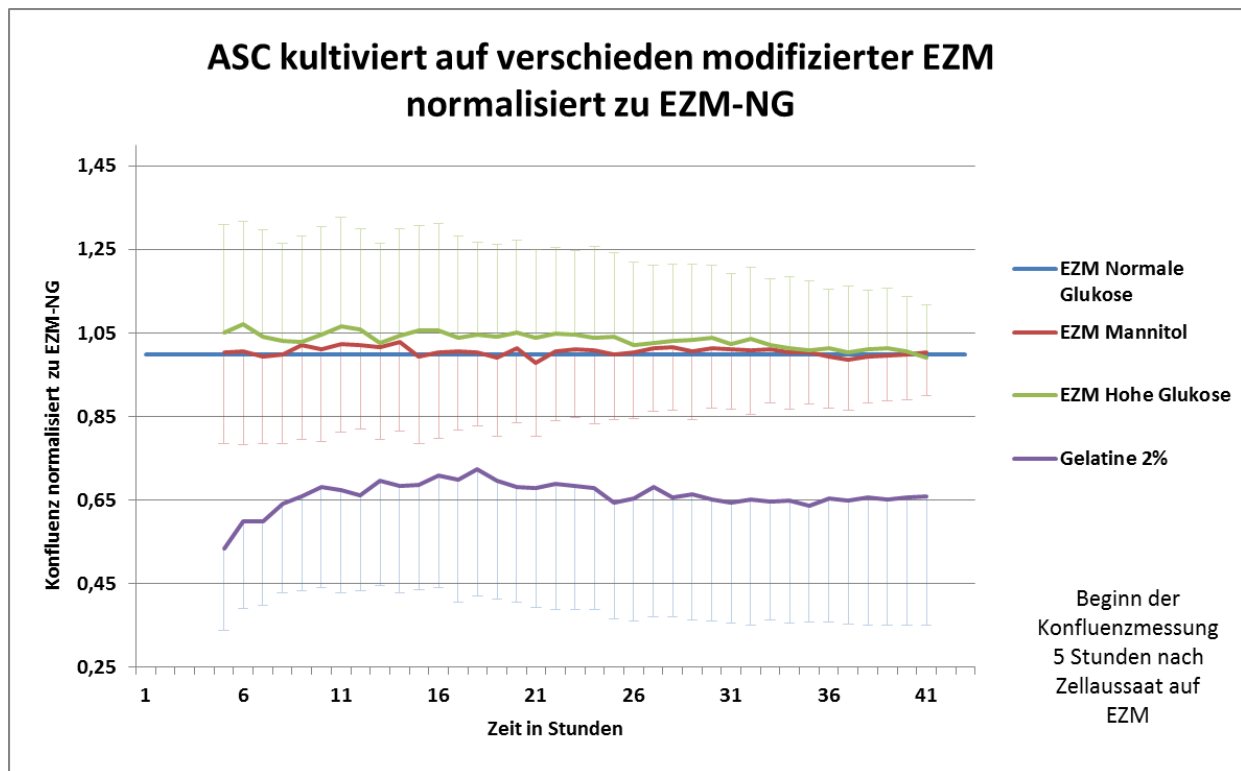


Abbildung 14: Daten aus Abbildung 13 nach Normalisierung auf Standardmedium normale Glukose.

Abbildung 14 zeigt die verbesserte Darstellung der unter MA und HG kultivierten Zellen sowie der Kontrolle G2%.

4.1.3 Optimierung des Dezellularisierungs-Verfahrens

Für die Gewinnung von extrazellulärer Matrix, bestehen zahlreiche Protokolle (35, 140). Wir führten unsere ersten Experimente mit 0,2 mol/l Ammoniumsolution (AS) durch. Im weiteren Verlauf legten wir eine Konzentration von 0,25 mol/l AS fest und erlangten dadurch wie in Abbildung 15 zu sehen ist eine relativ einheitliche EZM. Zell-Detritus wurde jedoch teilweise als Konfluenz detektiert. Da wir die Rohdaten dieser Analyse für unsere Proliferationsanalysen nutzten, suchten wir nach Alternativen, um diese „Falschmessungen“ zu reduzieren.

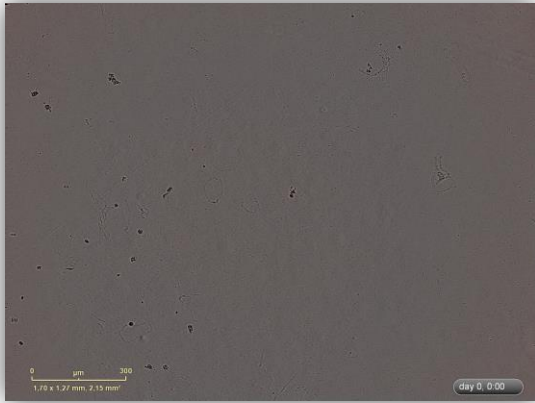


Abbildung 15: Extrazelluläre Matrix nach Dezellularisierung mit 0,25 molarer Ammoniumsulfatlösung

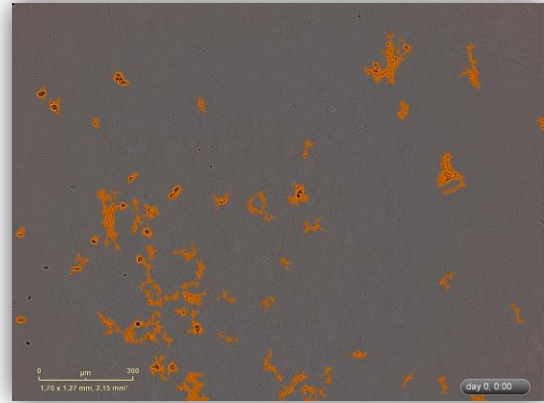


Abbildung 16: Matrix nach Dezellularisierung mit 0,25 molarer Ammoniumsulfatlösung. Orange markiert sind Zellüberreste, die vom IncuCyte ZOOM® als Konfluenz erkannt werden und zu falsch-hohen Konfluenzdaten nach Aussaat der Zellen führen.

Deshalb erprobten wir ein alternatives Dezellularisierungs-Verfahren mit einer Mischung aus 0,2 mol/l AS und 0,05% Triton X100, in der Hoffnung den Detritus zu reduzieren. Wie in Abbildung 17 und vor allem Abbildung 18 (mit Analyse-Maske), gut erkennbar ist, gelang es uns dadurch tatsächlich, den vom *IncuCyte ZOOM®* als Konfluenz erkannten Zelldetritus deutlich zu verringern.



Abbildung 17: Matrix nach Dezellularisierung mit 0,2 molarer Ammoniumsulfatlösung versetzt mit 0,05% TritonX100.

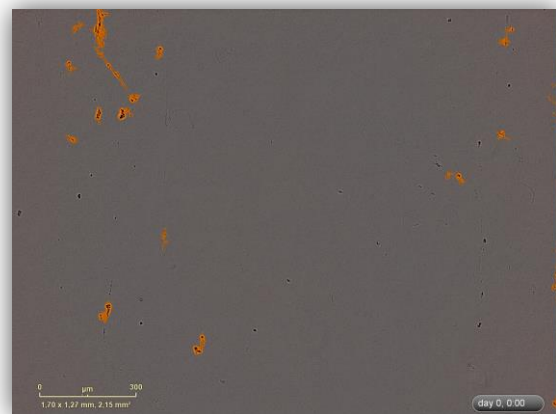


Abbildung 18: Matrix nach Dezellularisierung mit 0,2 molarer Ammoniumsulfatlösung versetzt mit 0,05% TritonX100. Orange markiert sind Zellreste, die von der Maske des *IncuCyte ZOOM®* als Konfluenz erkannt wird.

Bei der Kultur von ASC auf den verschiedenen dezellularisierten Matrices, mussten wir jedoch feststellen, dass es unter *TritonX100* (wahrscheinlich durch dessen amphipatische Eigenschaften) zu einer verlangsamten Adhäsion und daraus resultierend einer deutlich reduzierten Zellproliferation kam.

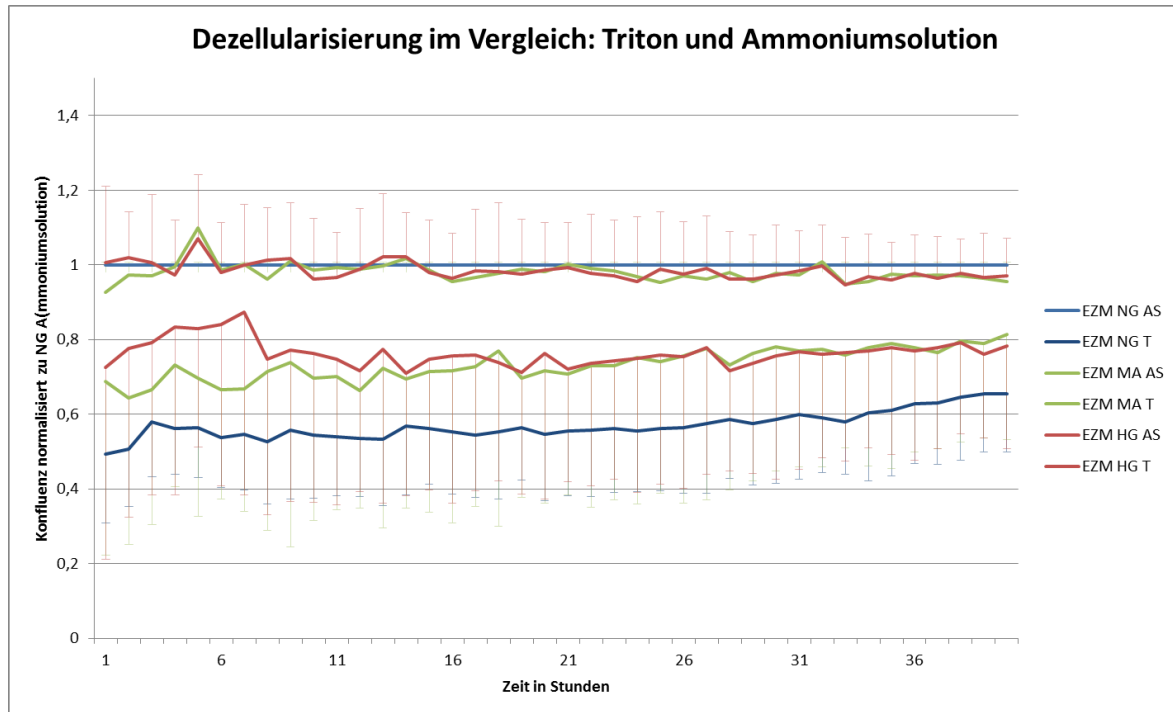


Abbildung 19: Alle ASC, die auf von Triton (T) versus Ammoniumsolution (AS) dezellularisierter EZM kultiviert wurden weisen eine reduzierte Proliferation auf.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, kommt es bei allen ASC, die auf durch TritonX100 gewonnener EZM kultiviert wurden, zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Zellproliferation. Als Folge dessen entschlossen wir uns, für alle weiteren Experimente einheitlich eine 0,25 molare Ammoniumsolution zur Matrixgewinnung zu verwenden und das dadurch leicht erhöhte Vorkommen von Zelldetritus auf der EZM mittels nachfolgend beschriebener Methoden zu optimieren.

4.1.4 Konfluenz-Kontrolle mittels CellTracker™ Red CMPTX

Aufgrund der Entscheidung gegen eine Dezellularisierung mit TritonX100 mussten wir ein gewisses Maß an Zelldetritus in Kauf nehmen. Gleichzeitig stellten wir uns die Frage, wie verfälschend der vom IncuCyte ZOOM® detektierte Zelldetritus bei einer Dezellularisierung mit 0,25 molarer Ammoniumsolution auf unsere ermittelten Endergebnisse ist. Um dies zu überprüfen, entschlossen wir uns dazu, in einigen

Experimenten ASCs und HRPs mit CellTracker™ Red CMPTX, einem Zytoplasmafarbstoff, anzufärben.

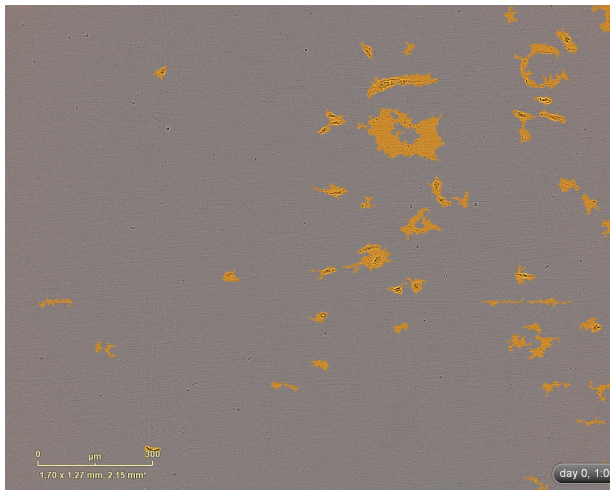


Abbildung 20: Als Konfluenz gemessener Zelldetritus auf frisch dezellularisierter EZM, noch ohne ASC.

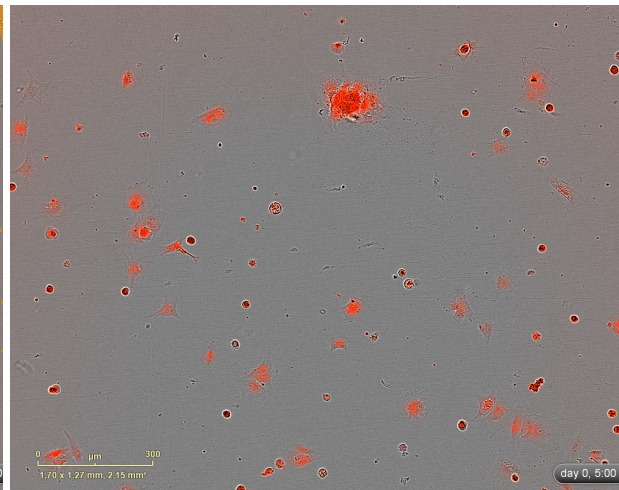


Abbildung 21: Mit CellTracker™ Red CMPTX gefärbte ASC kurz nach der Aussaat auf EZM. Selektive Auswertung der Fluoreszenzsignale des CellTracker-gefärbten Zytoplasma der ASC. Hintergrundsignale können somit auf nahezu 0 reduziert werden.

Mit Hilfe dieses Zwischenschrittes konnten wir eine nahezu 100% ASC spezifische Konfluenz der Proliferation fluoreszenzmikroskopisch messen und sie mit den vorher verwendeten phasenkontrastmikroskopischen Messungen (Zellen + Detritus) vergleichen. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, führten die Messungen mit CellTracker™ Red CMPTX in der Tat zu saubereren Messungen (Konfluenz 7%) im Vergleich zu der phasenkontrastmikroskopisch gemessenen „Standardkonfluenz“ wie in Abbildung 22 (Konfluenz 14%).

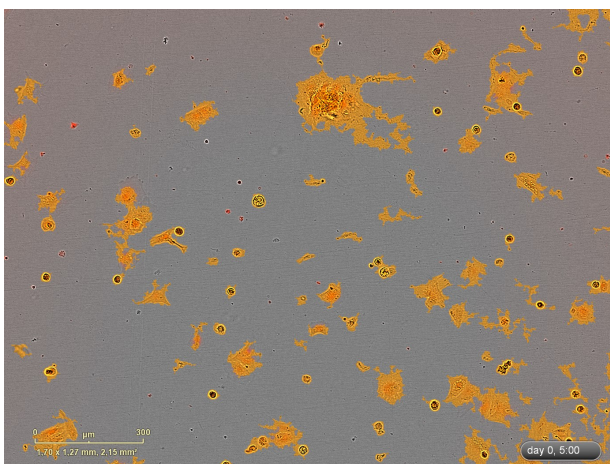


Abbildung 22: Konfluenz von ASC (und Detritus) durch die „Standard“-Maske des IncuCyte ZOOM®.

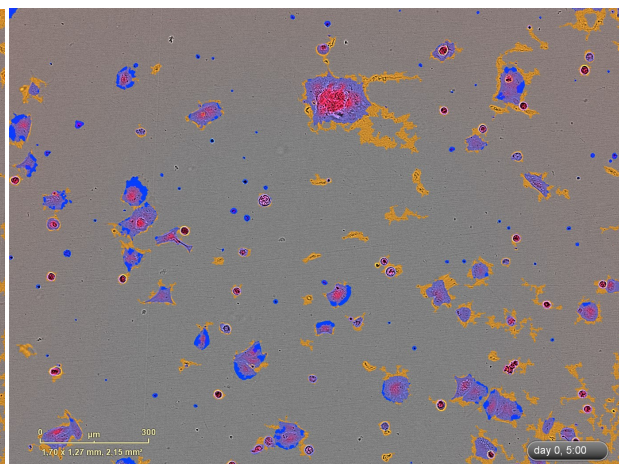


Abbildung 23: Gleiche Aufnahme wie in Abbildung 22, wobei in diesem Bild allein das CellTracker™ Red CMPTX gefärbte Zytoplasma ausgewertet wurde (blau markiert) im Vergleich zum falsch-positiven Signal (orange).

Im Verlauf der Versuche zeigte sich, dass die Messungen mit *CellTracker™ Red CMPTX*, wie in Abbildung 24 und Abbildung 25 zu sehen ist, eine gute Sensitivität und sauberere Daten erbrachten. Diese mikroskopisch saubereren Bilder, spiegelten sich auch in einer präziseren Analyse der Daten wieder (siehe Abbildung 25) da durch diese Methode eine fälschliche Detektion von Zelldetritus nahezu ausgeschlossen werden konnte.

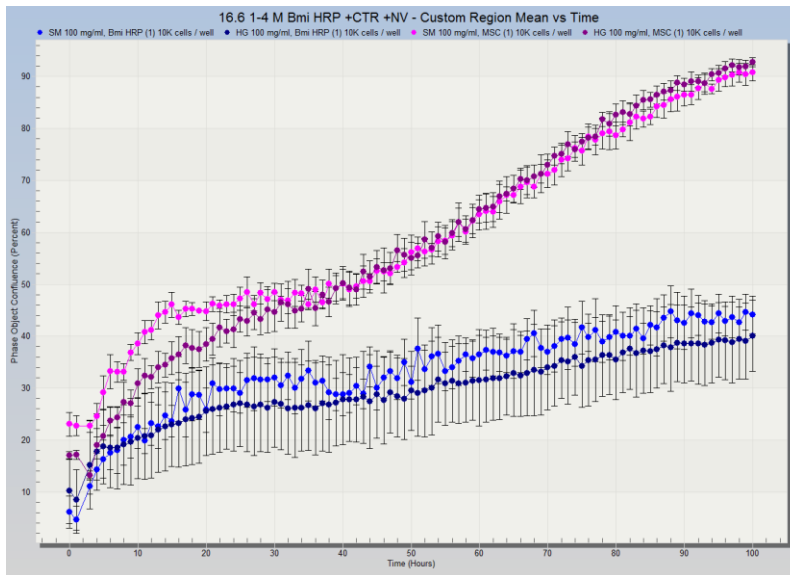


Abbildung 24: Auswertung der Konfluenz anhand des Phasenkontrast-signalen von ASC SM und HG sowie Bmi-Perizyten SM und HG .

ASC-NG
 ASC-HG
 Bmi-HRP-NG
 Bmi-HRP-HG

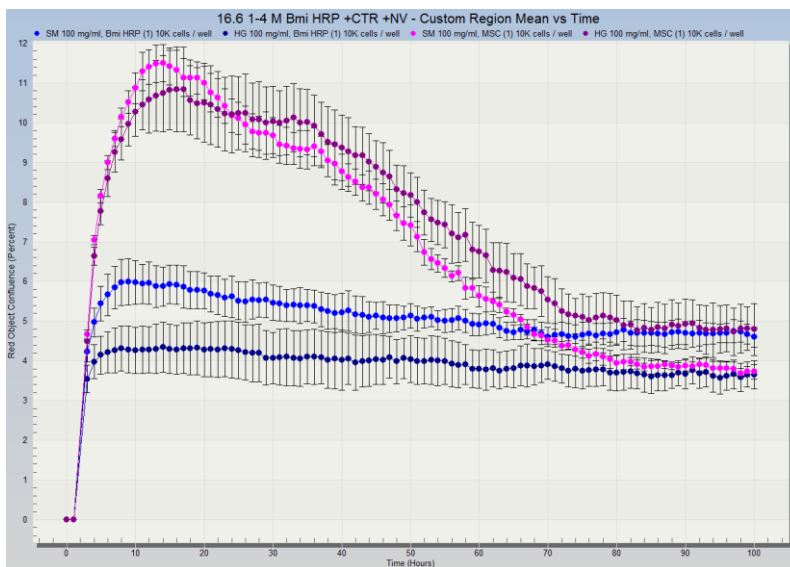


Abbildung 25: Auswertung der Konfluenz anhand des durch *CellTracker™ Red CMPTX* gefärbten und mittels Fluoreszenz angeregten Zytoplasmas von ASC SM und HG sowie Bmi-Perizyten SM und HG.

ASC-NG
 ASC-HG
 Bmi-HRP-NG
 Bmi-HRP-HG

Man erkennt in Abbildung 25, dass die Konfluenzverläufe einheitlicher und gleichmäßiger verlaufen. Im Wesentlichen bleiben die Verhältnisse der verschiedenen Zellen und Zustände jedoch unverändert von der Messmethode. Wie in Abbildung 25 ebenfalls erkennbar ist, kam es bei den mittels *CellTracker™ Red CMPTX* analysierten Konfluenzen schnell zu einer Abnahme im Vergleich zu dem in Abbildung 24 gezeigten Konfluenz-Verlauf des gleichen Experimentes der durch die

„Standardmaske“ des *IncuCyte ZOOM* analysiert wurde. Wir gehen davon aus, dass dies auf eine sinkende Fluoreszenzaktivität des Farbstoffes durch die vielen Messungen und eine gleichzeitig zunehmende „Verdünnung“ des Farbstoffes als Folge der Zellproliferation zurückzuführen ist. Bei der Betrachtung der einzelnen Bilder/ Messungen im *IncuCyte ZOOM®* mussten wir feststellen, dass die teilweise sehr feinen Zellausläufer im Verlaufe der Adhäsion und bei zunehmender Proliferation immer schlechter von der CTR-Analyse-Maske detektiert wurden.

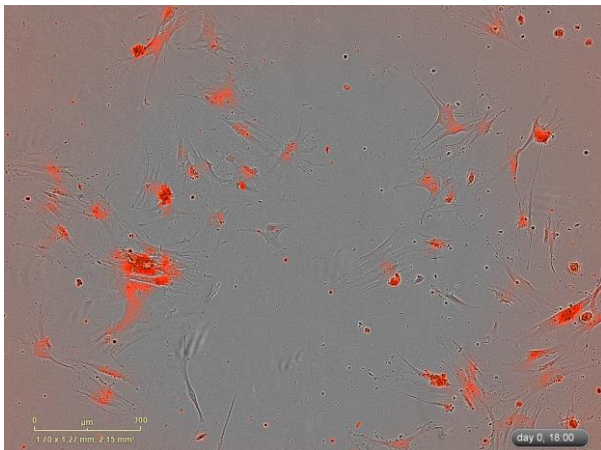


Abbildung 26: *CellTracker™ Red CMPTX* gefärbte, rot fluoreszierende Zellen, in dem Fall Bmi-Perizyten 18 Stunden nach ihrer Aussaat auf EZM

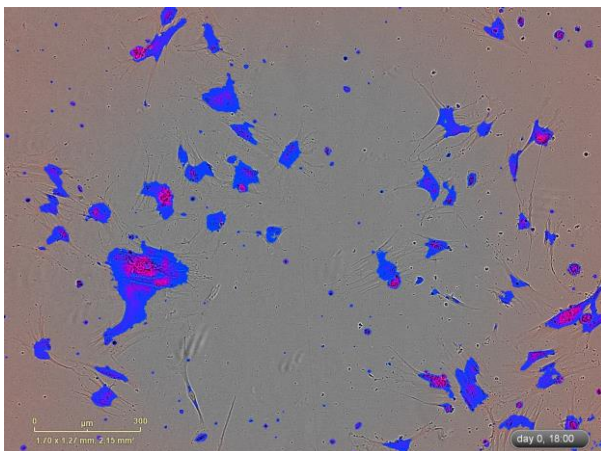


Abbildung 27: Gleiches Bild zum gleichen Zeitpunkt wie in Abbildung 26. Die Konfuzierung der *CellTracker™ Red CMPTX* gefärbten Zellen wurde mit der CTR spezifischen Analyse-Maske ausgewertet. Bei näherem Hinsehen erkennt man, dass zahlreiche feine Zellausläufer nicht mehr detektiert werden.

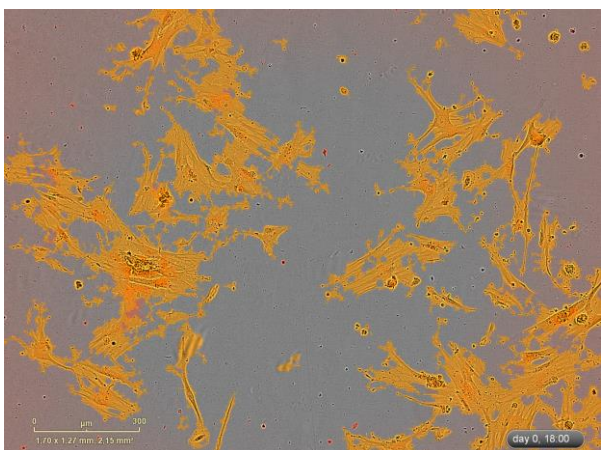


Abbildung 28: Gleiches Bild zum gleichen Zeitpunkt wie in Abbildung 26 und Abbildung 27. In dem Fall wurde die Konfuzierung mit unserer „Standard“-Maske analysiert.

Man sieht deutlich, dass in Abbildung 28 im Vergleich zu Abbildung 27 die feinen Zellausläufer nahezu alle von der Auswertung miterfasst werden. Zwar kommt es auch zu einem kleinen Anteil an Detritus-Messungen, zusammengefasst ist das Ergebnis jedoch deutlich näher an der tatsächlichen Konfluenz, als das mittels CTR-Analyse gemessene. Aufgrund dieser Tatsachen relativierte sich der Vorteil von *CellTracker™ Red CMPTX* im zeitlichen Verlauf der Experimente. Des Weiteren führte der aufwendige Färbeprozess, mit zahlreichen Spülvorgängen, speziell bei den empfindlichen HRP, zu hohen Zellverlusten. Direkte Vergleichsmessungen mit und ohne CTR legten nahe, dass die gefärbten Zellen eine Einbuße der Proliferation erfahren. Deswegen entschieden wir uns, nach etlichen Vergleichsmessungen ohne signifikante Verbesserung der Daten, *CellTracker™ Red CMPTX* nicht weiter zu verwenden.

4.1.5 Einfluss fluktuierender Glukosebedingungen auf HUVEC

Uns interessierte welchen Einfluss neben den konstant erhöhten Glukosespiegeln, fluktuierende Glukosespiegel (EZM-FKT) entsprechend dem diabetischen Milieu im Körper auf die HUVEC und die von ihnen sezernierte EZM haben. Dazu kultivierten wir die HUVEC in NG-Medium und versetzten sie zwei Mal am Tag für drei Stunden mit HG-Medium.

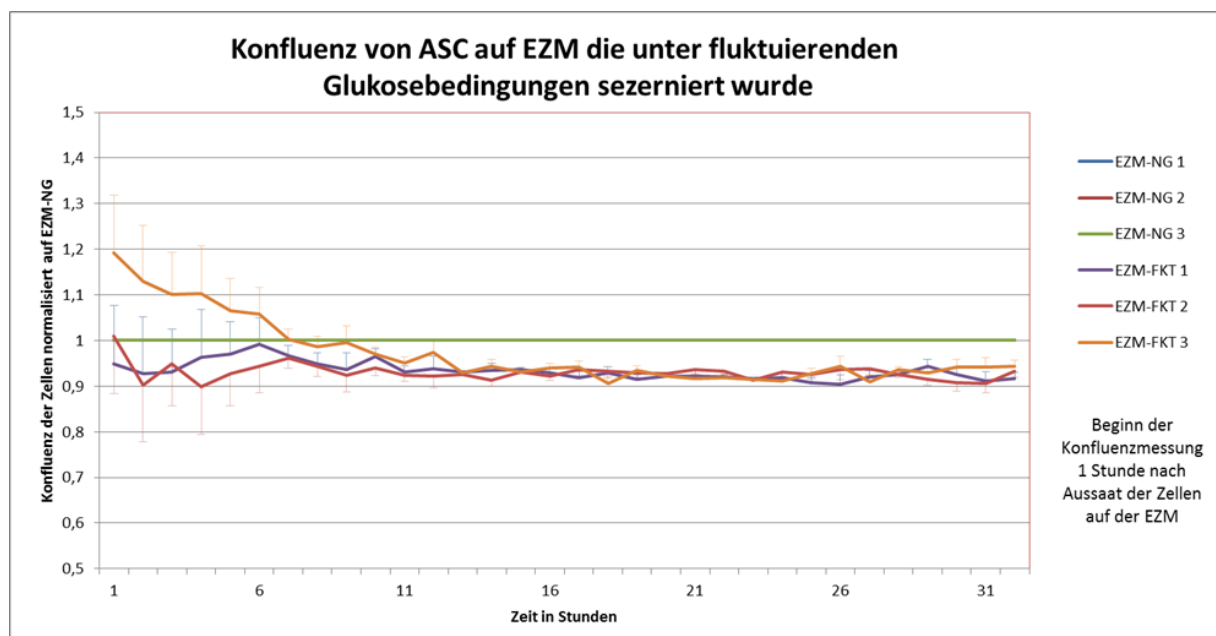


Abbildung 29: ASC Proliferation unter fluktuierenden Glukosekonditionen. Die drei biologischen Replikate sind individuell, normalisiert auf die jeweilige NG-Kontrolle dargestellt.

In ersten Versuchen zeigten ASC ein vermindertes Wachstumsverhalten auf EZM, generiert unter fluktuierenden Glukosespiegel, wie in Abbildung 29 in allen drei biologischen Replikaten zu sehen ist.

4.1.6 Einfluss der Medienzusammensetzung auf HUVEC und ihre EZM

Alle bisher durchgeführten Experimente belegten, dass hyperglykämisch-modifizierte EZM von HUVECs keinen nachteiligen Effekt auf das Wachstum von ASC ausübt. Einige Experimente legten sogar nahe, dass sich die Proliferation der ASC leicht verbessert. Es stellte sich die Frage, ob die Daten eine Eigenschaft der ASC widerspiegeln, oder vielmehr die experimentellen Bedingungen noch nicht stringent genug eine Modifikation bedingen. Im Rahmen eines anderen Projektes konnten wir feststellen, dass die im HUVEC-Medium enthaltenen Zytokine einen protektiven Effekt auf HUVEC haben, und diese vor Glukoseschäden schützen. Für FGF-2/bFGF ist diese bereits in der Literatur beschrieben (141).

Daher war unser Ziel, die eventuell protektive Wirkung dieser Zusätze zu verringern. Dazu führten wir Versuche durch, in denen wir einen Teil EGM-II mit drei Teilen EBM-II, dem Basalmedium ohne weitere Zusätze „verdünnten“. Das so entstandene Medium bezeichneten wir als $\frac{1}{4}$ Medium, bildeten durch Glukosezusatz ebenso wie bei EGM-II daraus NG und HG Medium und kultivierten damit Teile unserer HUVEC.

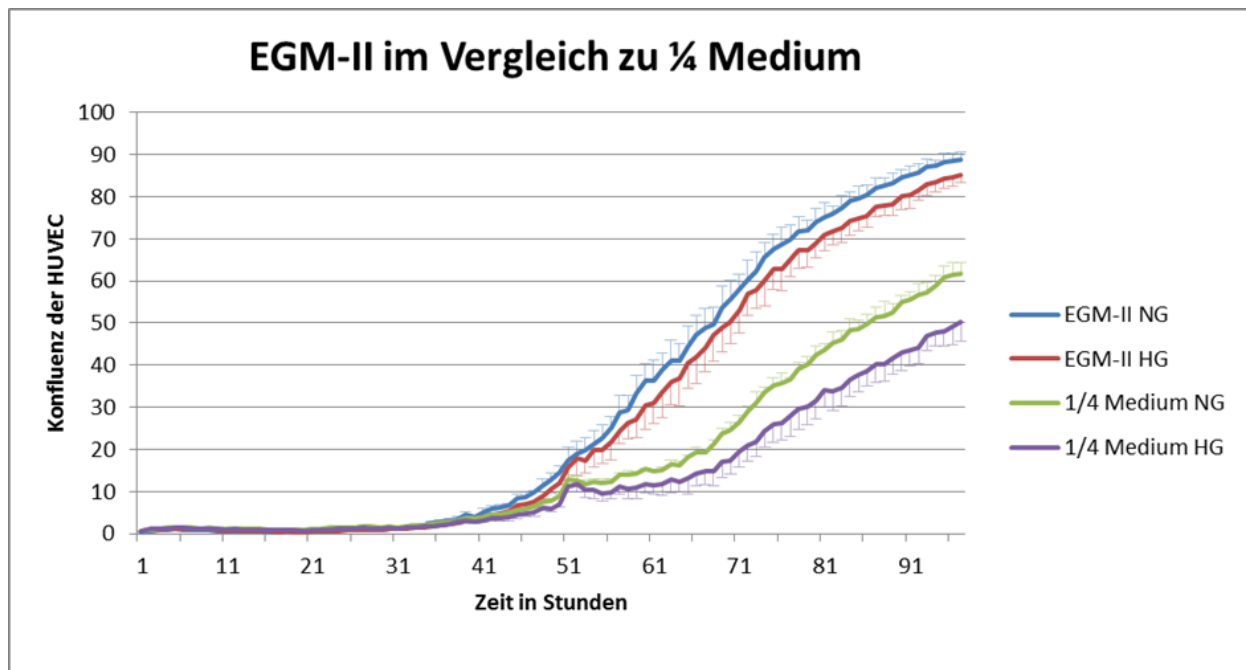


Abbildung 30: Einfluss von Endothelmedien (Voll- und sog. $\frac{1}{4}$ Medium) auf HUVEC-Proliferation (n=3). Während bei Vollmedium der Effekt erhöhter Glukosekonzentrationen gering ist, erscheint er bei dem wachstumsfaktor-reduzierten Medium verstärkt. Insgesamt reduziert das $\frac{1}{4}$ Medium die Proliferation der HUVECs.

Dabei konnten wir feststellen, dass das Wachstum der Endothelzellen in $\frac{1}{4}$ Medium im Vergleich zu EGM II reduziert war. Interessant war dabei, dass die proliferationsmindernden Einflüsse von hoher Glukose unter $\frac{1}{4}$ Medium deutlicher auftraten als unter EGM-II, wie in Abbildung 30 zu sehen ist. Da die Grundidee dieser Arbeit auf der Annahme basierte, dass hyperglykämisch modifizierte EZM einen wachstums-mindernden Effekt auf Zellen ausübt und wir davon ausgingen, dass die verstärkten Auswirkungen hoher Glukose auf die in $\frac{1}{4}$ Medium kultivierten HUVEC sich auch in deren EZM stärker widerspiegeln würden, entschieden wir uns $\frac{1}{4}$ Medium für alle folgenden HUVEC Kulturen zu verwenden. Durch die unter $\frac{1}{4}$ Medium leicht reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen, mussten wir die Aussaatdichte anpassen, da wir an dem zeitlichen Rahmen der Experimente nichts verändern wollten.

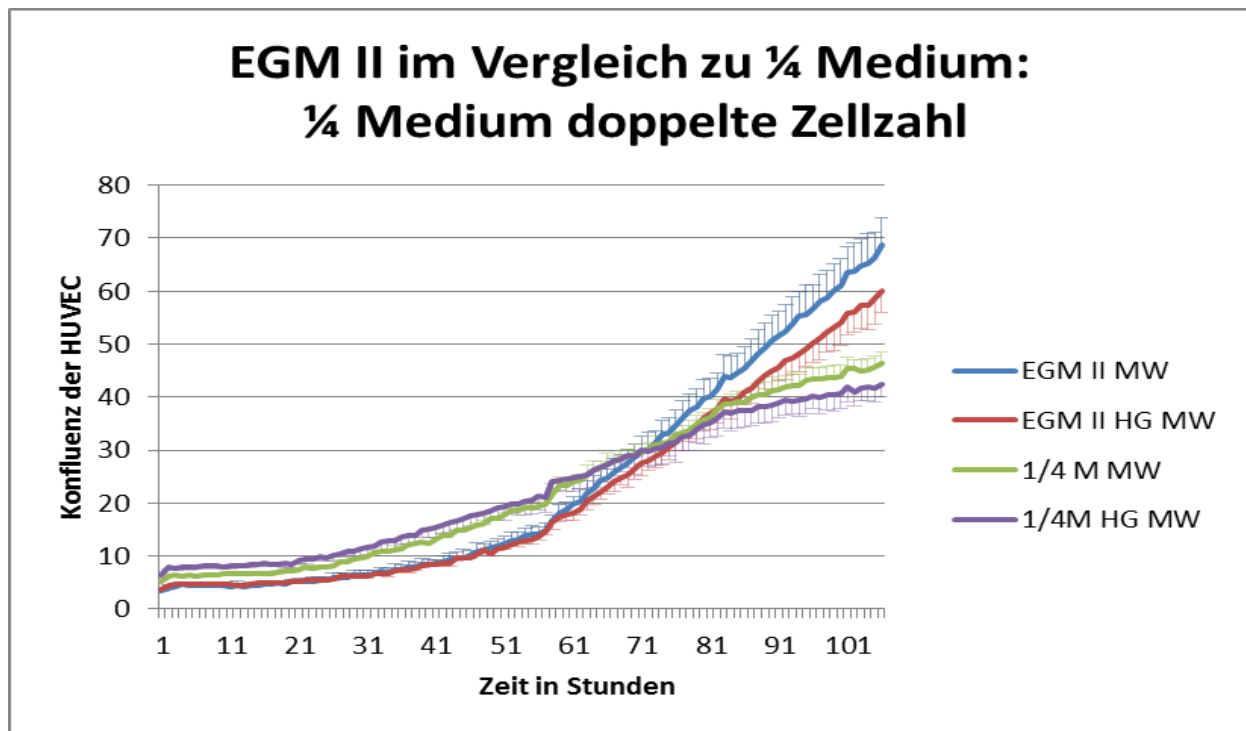


Abbildung 31: Konfluenz der HUVEC unter EGM II und ¼ Medium, jeweils in NG oder HG-Medium. ¼ Medium doppelte Zellzahl (n=3).

Da wir für die Matrixgewinnung einheitliche Zelllayer benötigten, verdoppelten wir die Zellzahl der unter ¼ Medium kultivierten Zellen, um ihr abgeschwächtes Wachstum zu kompensieren (siehe Abbildung 31). Nach Anpassung der Zellzahl zeigte sich kein Effekt der HG-Kondition mehr (Vergleich Abbildung 30).

4.2 Einfluss hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix von Endothelzellen auf die Charakteristika von ASC und HRP

4.2.1 Proliferation und Apoptose-Verhalten von ASC

Die im Rahmen der zuvor erwähnten Optimierungsexperimente gezeigten Daten belegen, dass ASC keine verminderte Proliferation, sondern eher eine gesteigerte Proliferation (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33) auf hyperglykämisch modifizierter HUVEC-EZM aufweisen. Um unsere Hypothese zu bestätigen, dass ASC geeignete Kandidaten sind, HRP im Falle einer DRP zu ersetzen, verglichen wir nun ASC direkt mit HRP. Wir werteten mittels „*Live Cell Imaging*“ zwei Parameter aus: 1. Die Konfluenz als Maß für die proliferative Kapazität der Zellen und 2. Apoptose, mittels eines fluoreszierenden Caspase-3 Substrates.

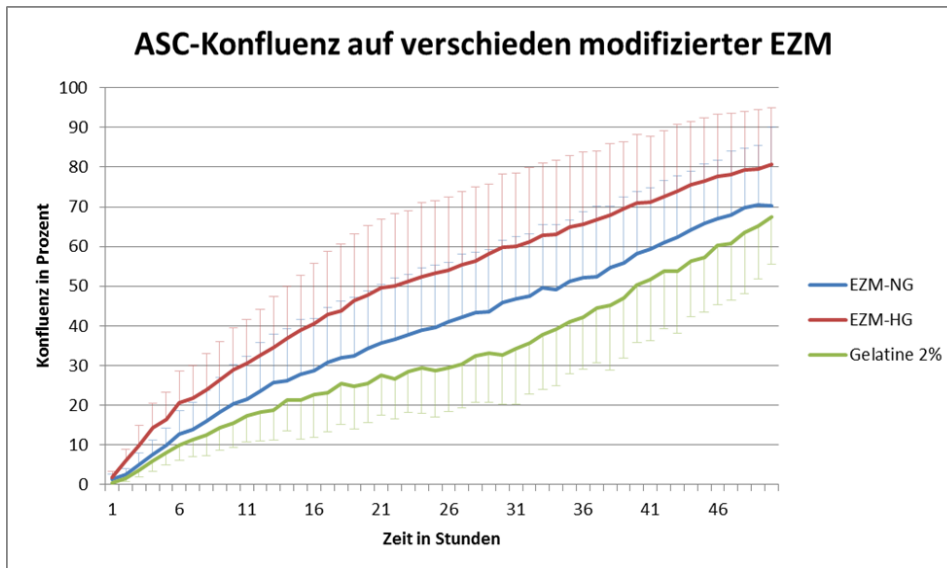


Abbildung 32: Konfluenz von ASC auf NG/HG-EZM oder Gelatine 2%. Man erkennt deutlich, dass ASC die auf HG-EZM kultiviert wurden die höchste Proliferation zeigen. Ein ausgewähltes Experiment (SD aus 24 technischen Replikaten kalkuliert)

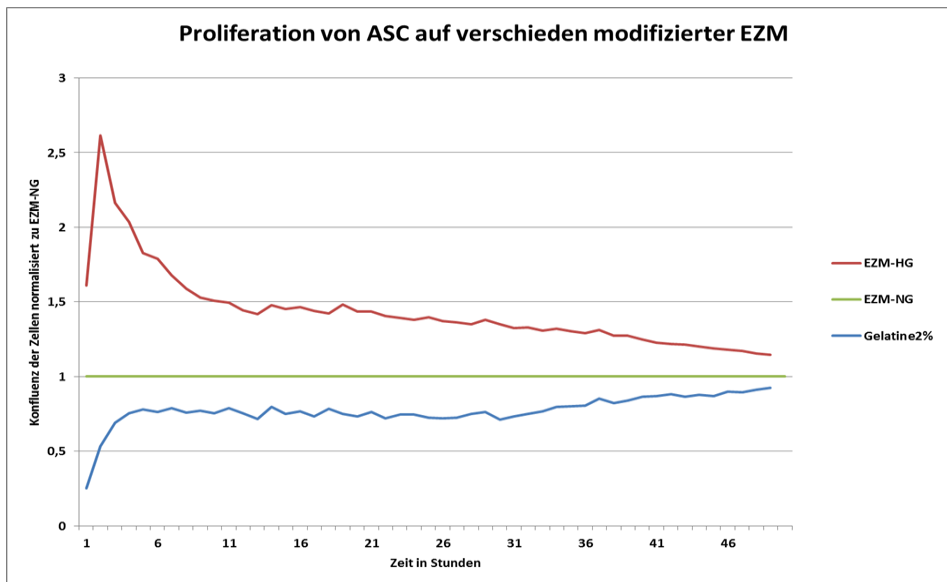


Abbildung 33: Daten von Abbildung 32 auf NG-EZM normalisiert

Apoptose

Auch in diesem Fall konnten wir, wie in Abbildung 34 zu sehen ist, keinen deutlichen Effekt der verschiedenen Modifikationen (NG/HG) der EZM auf die Apoptose der ASC ausmachen.

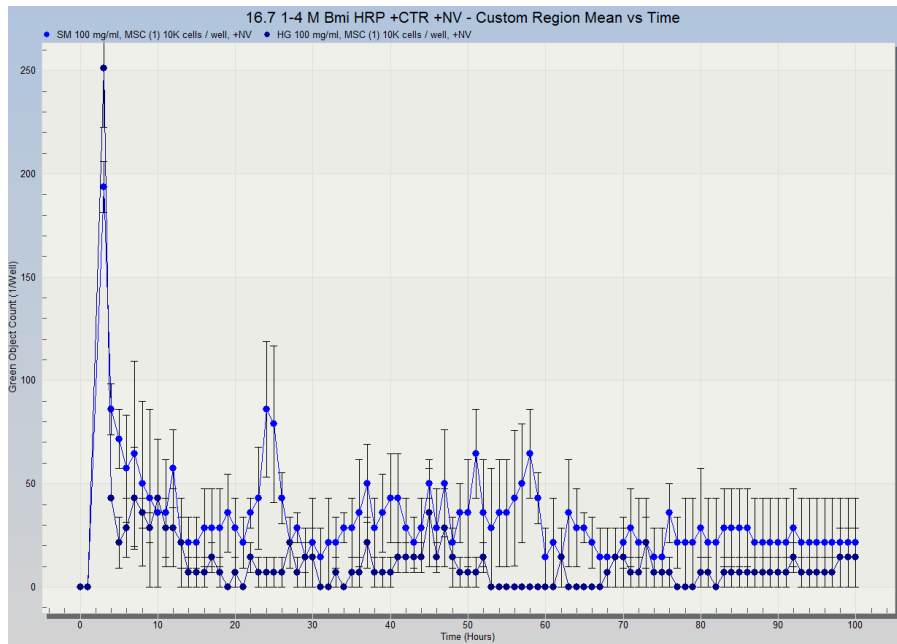


Abbildung 34: Apoptotische Events von ASC. Apoptose Raten sind insgesamt sehr gering mit unter 100counts/Well. Die Modifikation der EZM hat nahezu keinen Effekt auf die Anzahl der apoptotischen Ereignisse.

MSC-NG
MSC-HG

4.2.2 Proliferation und Apoptose-Verhalten von HRMVPC

Nachdem wir zeigen konnten, dass hyperglykämisch modifizierte Matrix von HUVECs keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von auf ihr kultivierten ASCs ausübte, war unser nächstes Ziel, diese Ergebnisse mit den HRP zu vergleichen. Wir nutzten dazu als erstes kommerziell erworbene primäre humane retinale mikrovaskuläre Perizyten (HRMVPC). Wie zuvor von Beltramo et al. publiziert, ergaben auch unsere Ergebnisse signifikant verringerte Proliferationsraten auf hyperglykämisch modifizierter EZM. Um Einflüsse des Versuchsaufbaus oder der Matrixgewinnung als Ursache für diese Unterschiede auszuschließen und ASC und HRP direkt, innerhalb des gleichen Experimentes zu vergleichen, säten wir die Zellen in unseren Versuchen parallel auf einer Platte mit den verschiedenen Kultur- beziehungsweise EZM-Bedingungen aus.

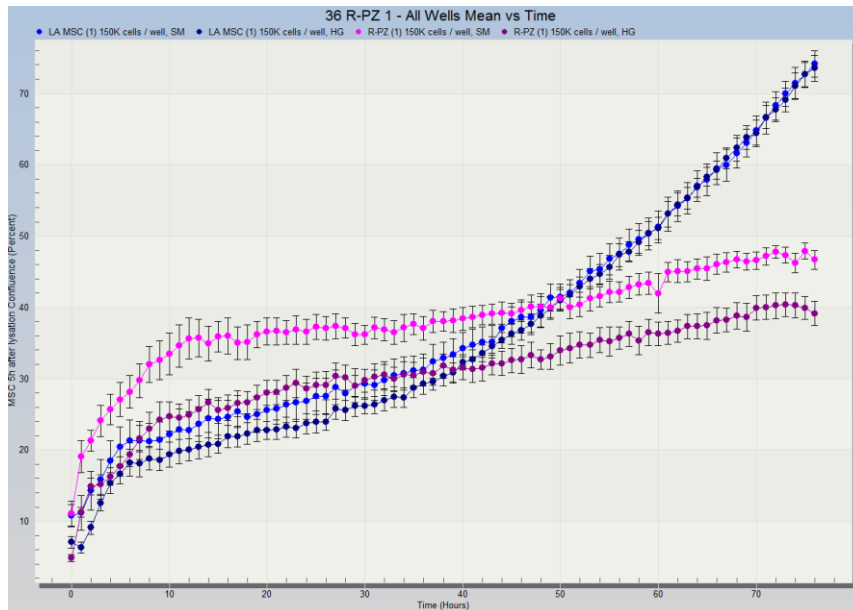


Abbildung 35: Proliferation von ASC und HRMVPC. Rohdaten eines Vergleichsexperimentes. Während die ASC scheinbar unbeeinflusst durch die Art der EZM-Modifikation proliferieren, zeigt sich bei den HRP eine deutlich reduzierte Proliferation auf HG-EZM kultivierten Zellen.

HRMVPC-NG
 HRMVPC-HG
 MSC-NG
 MSC-HG

In Abbildung 35 lässt sich erkennen, dass die ASC auf hyperglykämisch modifizierter EZM genauso proliferieren wie auf normoglykämisch sezernierter EZM. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei den HRMVPC jedoch deutliche Unterschiede je nach Modifikation der EZM (Abbildung 36: $p \leq 0,05$: 7-20 Stunden nach Aussaat).

HRP konnten nach Trypsinisierung nicht ähnlich leicht wie ASC in eine Einzelzellsuspension gebracht werden. Dies erschwerte die Zellzahlbestimmung bei der Aussaat. Hinzu kam eine deutlich reduzierte Proliferationskapazität der HRP gegenüber ASC. Nur durch die Normalisierung auf die NG-Kontrolle war es uns möglich, zum einen ASC und HRP vergleichend in einer Graphik aufzuführen und zum anderen einzelne Versuche zu mitteln. Aufgrund der zentralen Bedeutung dieser Experimente für diese Arbeit, gingen in unsere Auswertung fünf biologische Replikate mit jeweils 24-36 technischen Replikaten ein, basierend auf je zwei ASC-Pools sowie zwei HRMVPC-Zellisolaten.

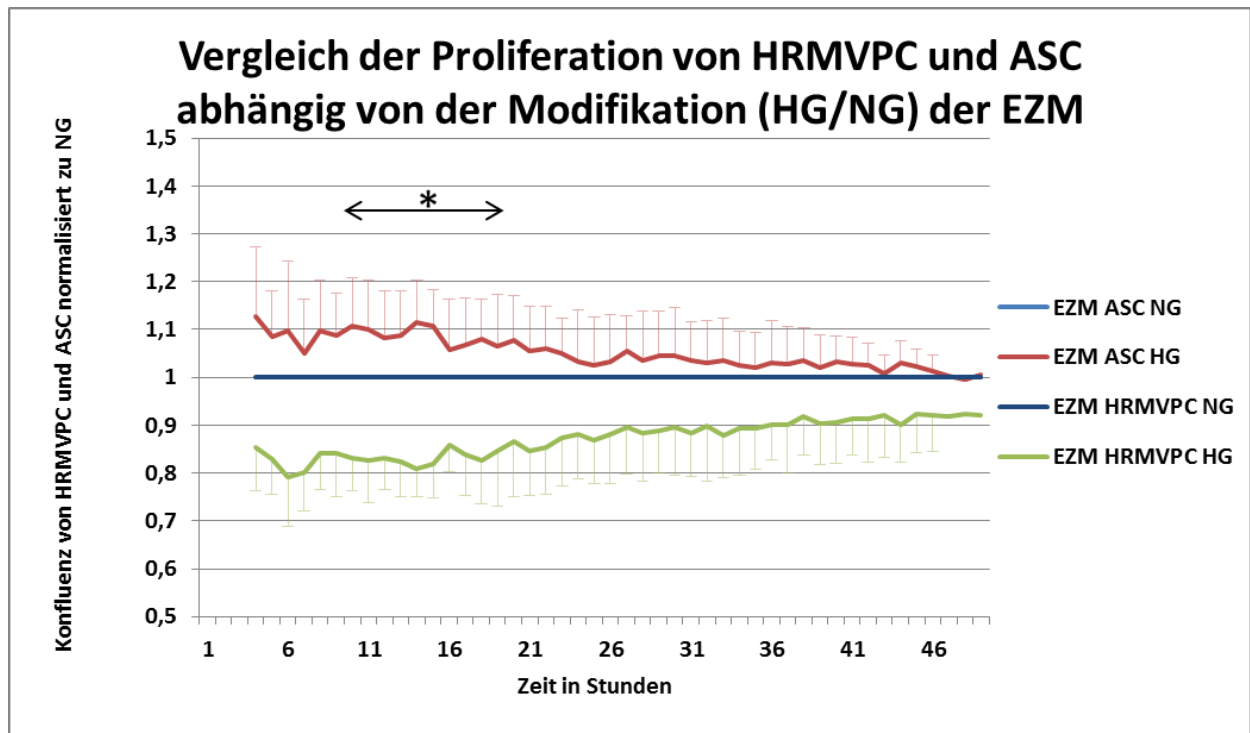


Abbildung 36: Proliferation von ASC und HRMVPC (n=5, je 2 ASC Pools und 2 HRMVPC-Isolate $p \leq 0,05$)

Apoptose

Auch hinsichtlich des Apoptose Verhaltens konnten wir bei HRMVPC im Vergleich zu ASC Unterschiede je nach Matrixmodifikation feststellen. Als Gegenkontrolle versetzten wir einige Wells mit dem Zellgift Staurosporin und konnten damit bis zu 20fach höhere (6000 Object Counts/Well) Apoptoseraten induzieren, was belegt, dass die Matrixmodifikation keine signifikante Apoptoseneigung in ASC oder in HRP induziert. Details siehe Material und Methoden 3.2.2.4.

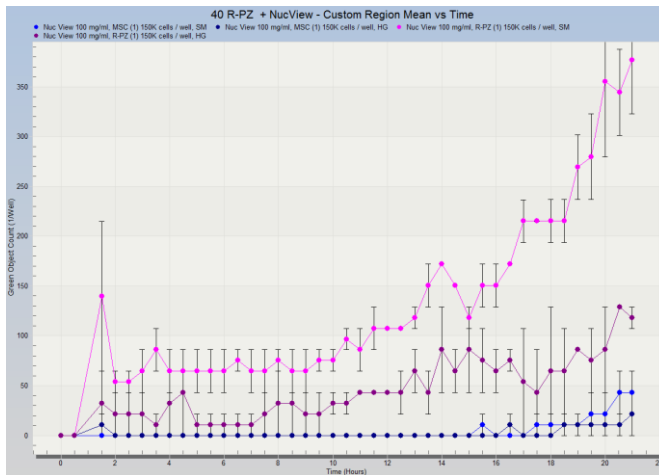


Abbildung 37: Apoptotische Events von ASC und HRMVPC. HRMVPC zeigen generell eine leicht höhere Apoptoserate als ASC. Jedoch ist die Rate –wider Erwarten- bei NG höher als bei HG. Vergleich dazu Beltramo et al. (35).

HRMVPC-NG
 HRMVPC-HG
 MSC-NG
 MSC-HG

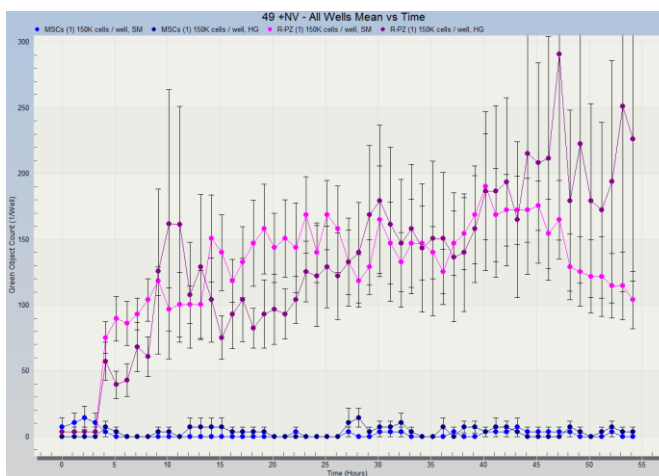


Abbildung 38: Apoptotische Events von ASC und HRMVPC. Man erkennt deutlichen einen Unterschied zwischen den HRMVPC und den ASC. In diesem Experiment zeigt sich, entsprechend unseren Erwartungen, dass die auf EZM-HG kultivierten HRMVPC eine höhere Apoptoserate als ihre auf EZM-NG kultivierten Kontrollen aufweisen. Auch für diesen Versuch muss jedoch eine allgemein sehr geringe Apoptoserate festgestellt werden (Maximal 350 Events/Well).

HRMVPC-NG
 HRMVPC-HG
 MSC-NG
 MSC-HG

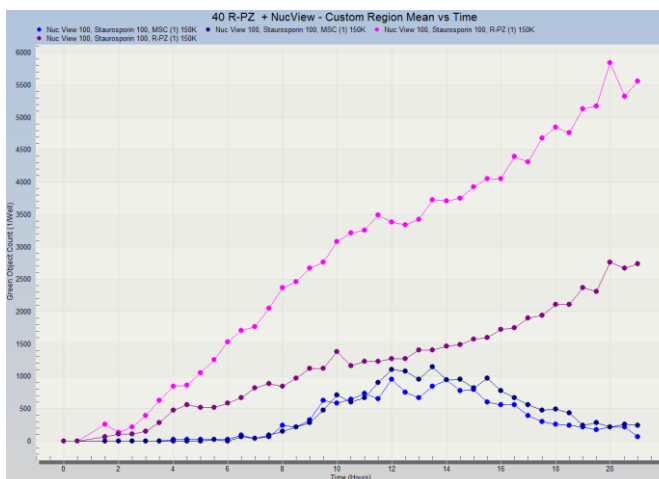


Abbildung 39: Apoptotische Events von ASC und HRMVPC nach Zugabe des Zellgiftes Stauroporin. Es zeigt deutlich höhere Apoptoseraten bei auf EZM-NG kultivierten HRMVPC. Generell werden durch die Zugabe von Stauroporin bis zu 20-fach höhere Apoptoseraten erreicht.

HRMVPC-NG
 HRMVPC-HG
 MSC-NG
 MSC-HG

4.2.3 Proliferation und Apoptose-Verhalten von Bmi-Perizyten

Durch die Kooperation mit E. Beltramo erhielten wir immortalisierte humane retinale Perizyten (Bmi-PC) (siehe 3.2.1.3 und (35)). Identische Experimente wie zuvor aufgeführt, bestätigten unsere Ergebnisse, dass HRP (Bmi-HRP und HRMVPC) eine signifikant verringerte Proliferation auf hyperglykämisch modifizierter HUVEC-EZM aufweisen, während ASC unbeeinflusst bleiben, bzw sogar bevorzugt proliferieren.

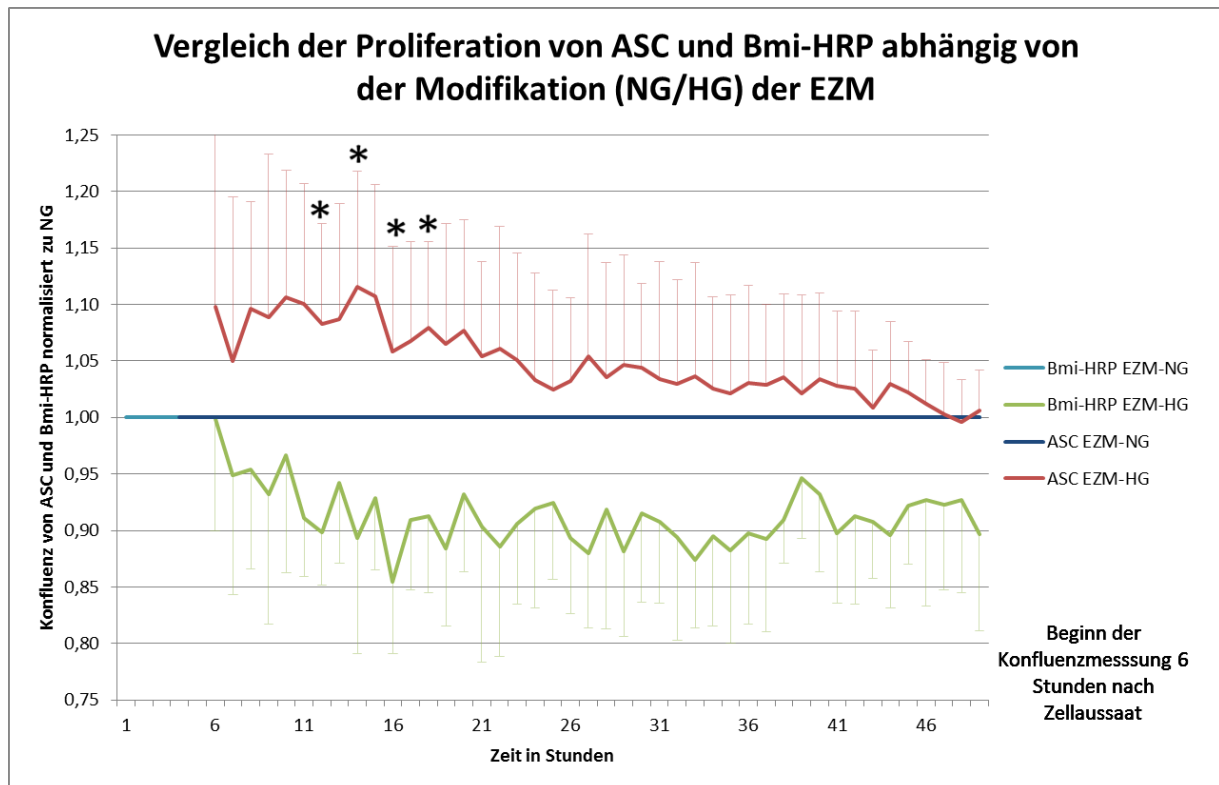


Abbildung 40: Proliferation von ASC und Bmi-HRP. (n=3) (* = $p \leq 0,05$)

Apoptose

Im Allgemeinen zeigten die Bmi-PZ ein deutlich reduzierteres Apoptoseverhalten als die HRMVPC was eventuell auf ihre, durch die Immortalisierung erhöhte Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen zurückzuführen ist. Bei dem herausstechenden Peak in den ersten 5 Stunden handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Zellen die im Zuge des Splittings nicht adhärirt sind und in Folge dessen in Apoptose eintreten.

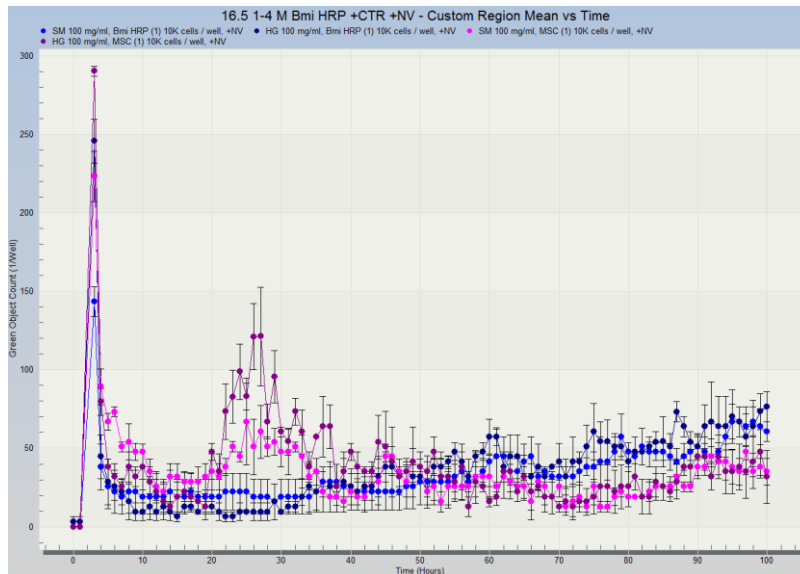


Abbildung 41: Apoptoseraten von Bmi-HRP und ASC. Es ergeben sich keine bedeutsamen Apoptoseraten in Abhängigkeit der EZM-Modifikation.

4.3 Einfluss von hyperglykämisch modifizierter EZM auf die Adhäsion von ASC und HRP

Um eine eventuell verringerte Adhäsion als mögliche Ursache einer reduzierten Proliferation von ASC/Perizyten zu untersuchen, säten wir ASC und HRMVPC auf verschieden modifizierter EZM aus und fixierten die Zellen 10, 20 und 30 Minuten nach Aussaat. Im Anschluss färbten wir die Strukturproteine FAK und Pax sowie deren aktivierte/phosphorylierte Korrelate (pFAK und pPax) und stellten sie mittels Fluoreszenzmikroskopie dar (siehe 3.2.2.5). Für FAK und pFAK ergaben sich keine Färbungen. Dies können wir zum jetzigen Zeitpunkt nur auf ein Nicht-Funktionieren beider Antikörper zurückführen, da in vorangegangenen Versuchen die Färbungen einwandfrei funktioniert hatten (142). Für Pax und pPax konnten wir einheitliche Färbungen sowohl für ASC als auch HRMVPC erhalten und mittels fluoreszenzmikroskopie deren Auftreten im Zuge der Adhäsion darstellen. Anhand der Zellkerngröße lässt sich der rasche Adhäsionsprozess innerhalb von 10-20 Minuten nachvollziehen. Ebenso lässt sich anhand der cytoplasmatischen Pax-Expression die zunehmende Zellausbreitung verfolgen. Die Adhäsionsfläche ist nach 10 Minuten sehr klein und nach 20 Minuten bereits deutlich ausgeprägt und scheint nach 30 Minuten nicht deutlich weiter zu zunehmen. Dabei lässt sich gut erkennen, wie die aktive-phosphorylierte Form pPax (rot) im Zuge der Adhäsion abnimmt, während die unphosphorylierte Form von Pax (grün) konstant bleibt. Basierend darauf lässt sich vermuten, dass die Adhäsion der ASC sowie HRMVPC, die auf EZM-HG ausgesät wurden, im Vergleich zu EZM-NG verzögert abläuft. Bei den HRMVPC konnten wir

allgemein feststellen, dass die Adhäsion früher und schneller abläuft im Vergleich zu den ASC. Außerdem zeigte sich, dass HRMVPC meist kumulieren und in Aggregaten auswachsen während ASC in der Regel einzeln proliferieren.

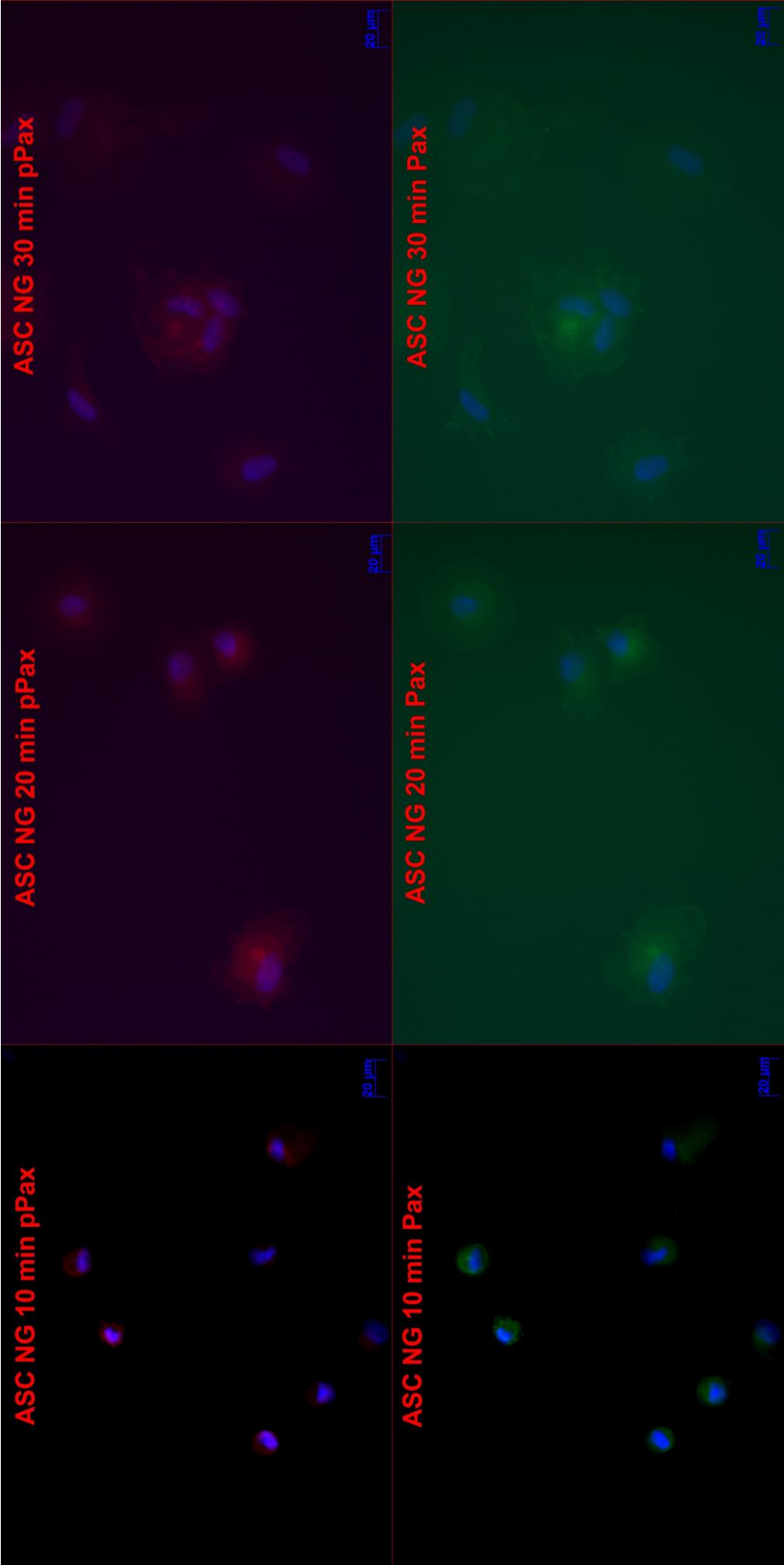


Abbildung 42: Nachweis von pPax (rot) und Paxillin (grün) in ASC jeweils 10, 20 und 30 Minuten nach Aussaat der Zellen auf NG-EZM

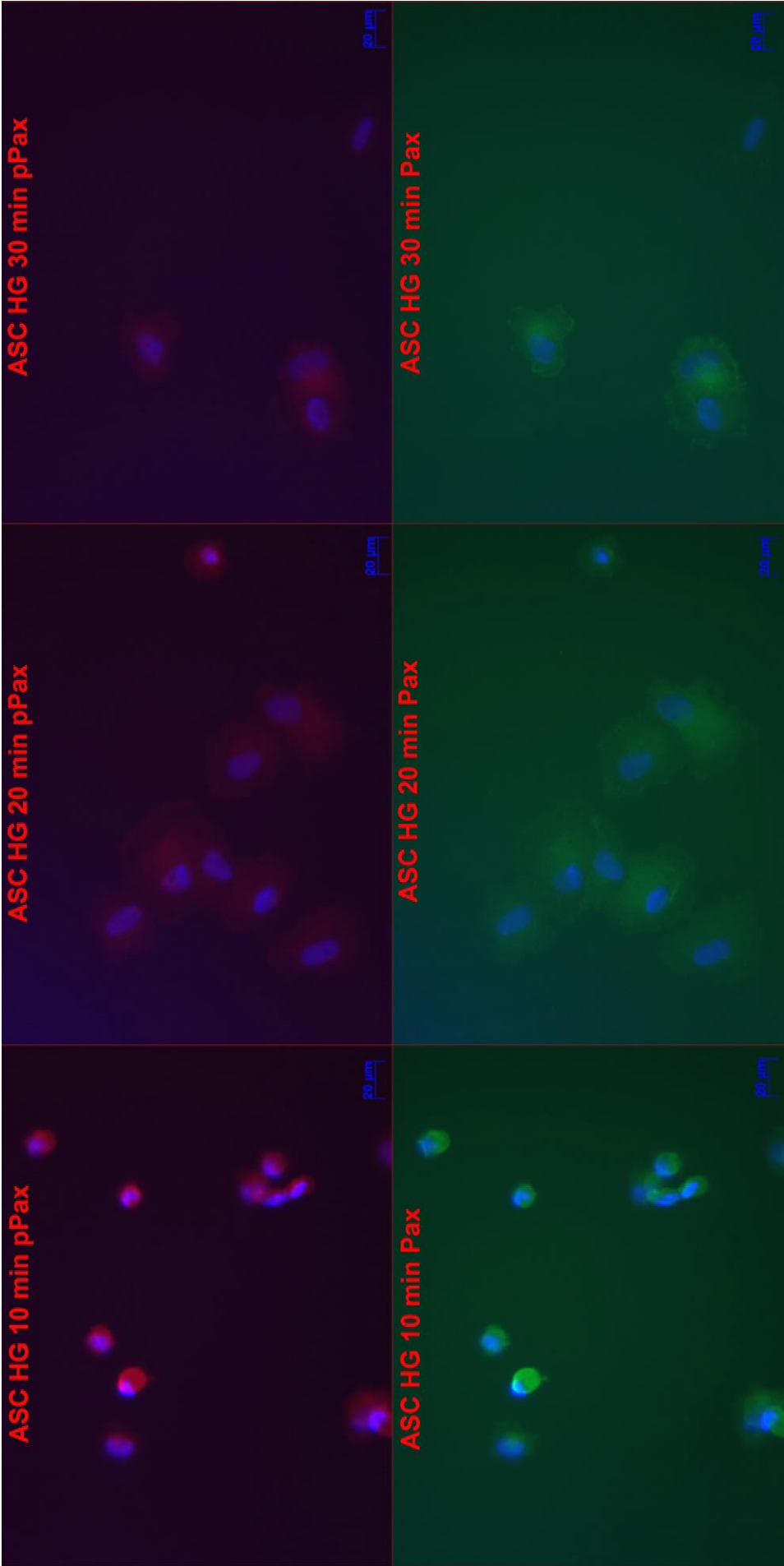


Abbildung 43: Nachweis von pPax (rot) und Paxillin (grün) in ASC jeweils 10, 20 und 30 Minuten nach Aussaat der Zellen auf HG-EZM

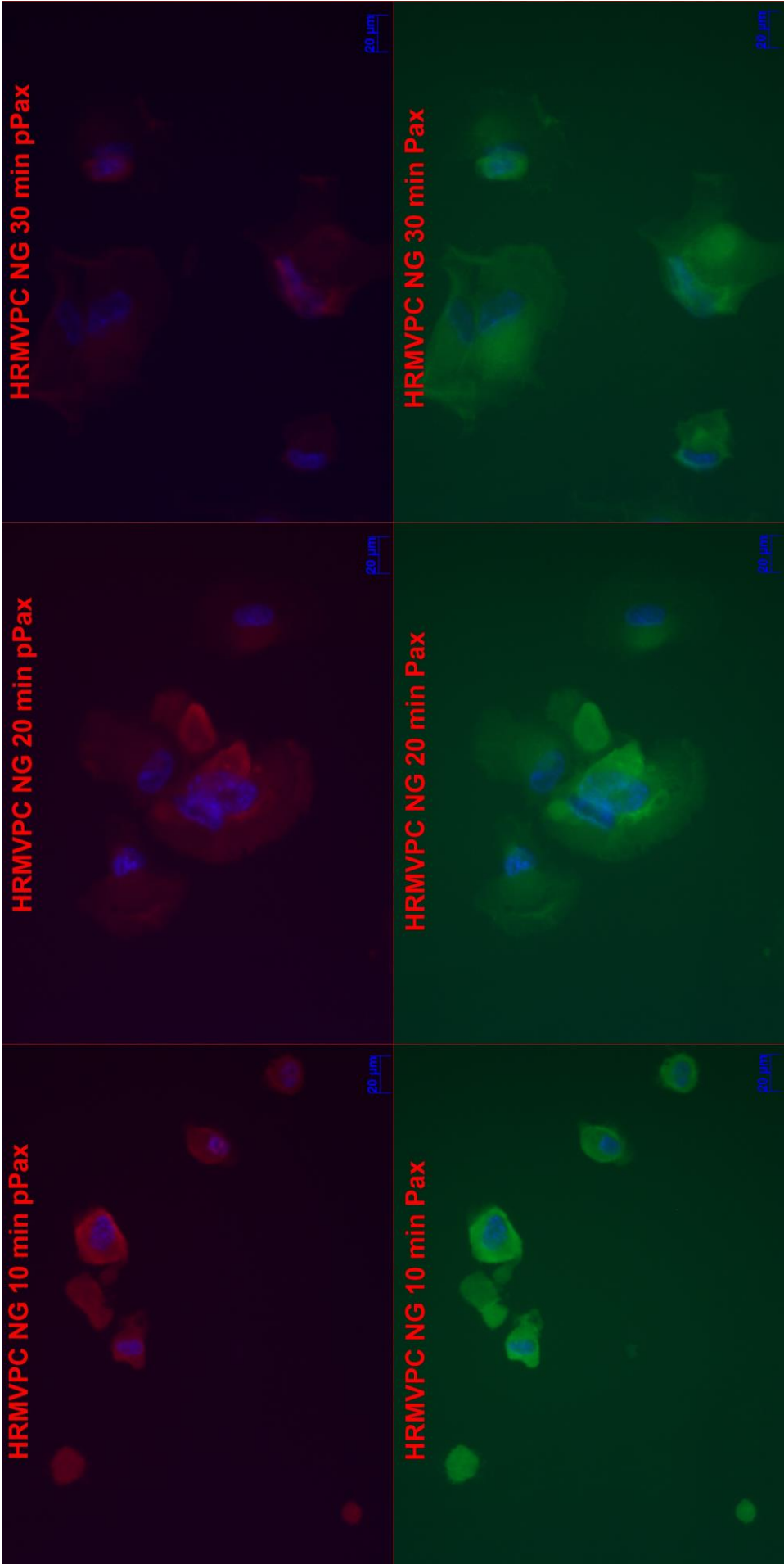


Abbildung 44: Nachweis von pPax (rot) und Paxillin (grün) in HRMVPC jeweils 10, 20 und 30 Minuten nach Aussaat der Zellen auf NG-EZM

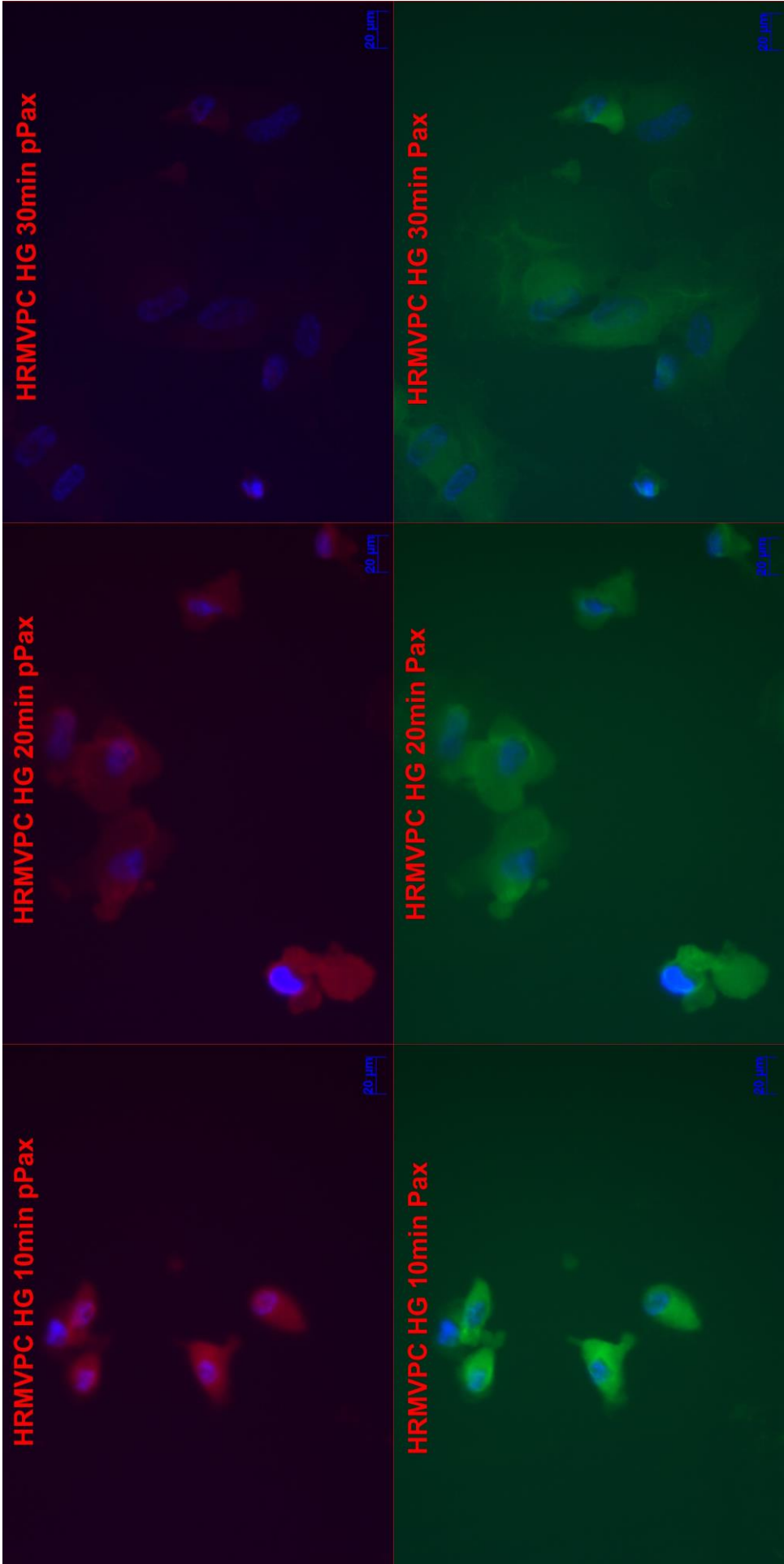


Abbildung 45: Nachweis von pPax (rot) und Paxillin (grün) in HRMVPC jeweils 10, 20 und 30 Minuten nach Aussaat der Zellen auf HG-EZM

4.4 EZM-Charakterisierung

Basierend auf dem Nachweis, dass vor allem humane retinale Perizyten signifikante Wachstumseinschränkungen durch hyperglykämisch modifizierte EZM erfahren und eine leicht erhöhte Apoptoserate aufweisen, stellten wir die Hypothese auf, dass der hyperglykämische Stress während der Kultur der HUVEC über eine Veränderung der sezernierten Matrixmoleküle Einfluss auf das Zellwachstum nimmt (35). Deshalb war unser nächstes Ziel die Zusammensetzung der EZM und ihre Veränderung durch hyperglykämischen Stress näher zu untersuchen.

4.4.1 Phasenkontrastmikroskopie und Brilliant Blau Färbung

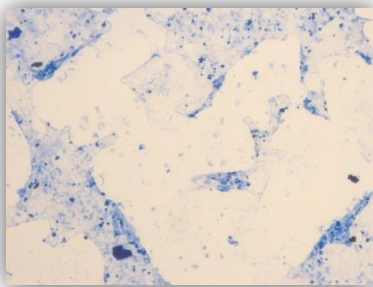


Abbildung 46: EZM nach Dezellularisierung angefärbt mit Coomassie Brilliant Blau

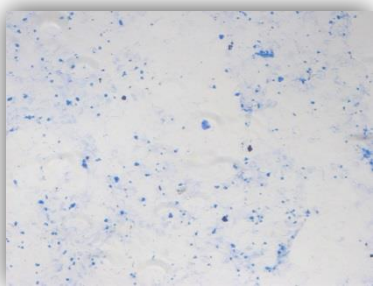


Abbildung 47: EZM nach Dezellularisierung fixiert mit 4% PFA und angefärbt mit Coomassie Brilliant Blau

Zuerst wollten wir eine Methode entwickeln, die phasenkontrastmikroskopisch kaum sichtbare Matrix besser darzustellen. Damit wollten wir einerseits unser Dezellularisierungs-Verfahren auf Effizienz, aber auch eventuelle Auswirkungen auf die Matrixqualität testen und andererseits einen besseren Eindruck über die EZM Struktur erhalten. Deshalb färbten wir die EZM direkt nach der Dezellularisierung mit Coomassie-Brilliant Blau, einem Proteinfarbstoff. Wie in Abbildung 46 zu sehen, konnten wir so die Beschaffenheit der EZM darstellen und Proteinstrukturen erkennbar machen. Die Abbildung zeigt jedoch ebenfalls, dass es durch die zahlreichen Waschgänge, die der Färbungsprozess mit sich bringt, zu einer starken Beschädigung der Matrix kommt. Deshalb fixierten wir die Matrix vor Beginn des Färbeprozesses, also direkt nach der

Dezellularisation und drei Waschgängen, mit *PBS mit 4% PFA*. Wie Abbildung 47 zeigt, konnten wir dadurch eine deutlich einheitlichere EZM anfärben wobei wir

feststellen mussten, dass das Verfahren zum Nachweis eventueller Glukose-Effekte zu unspezifisch scheint.

4.4.2 Immunfluoreszenz-Färbung spezifischer Matrixproteine

Nachdem wir tatsächlich Effekte der hyperglykämisch modifizierten extrazellulären Matrix in Form von Proliferationseinschränkungen der HRP nachgewiesen hatten, wollten wir biochemische Korrelate dieser Veränderungen in Form von Matrixveränderungen nachweisen. Dazu war ein deutlich sensitiveres Verfahren als die reine Proteinfärbung mittels Commassie-Brilliant-Blau notwendig. Deshalb entschieden wir uns dafür, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Matrix im Zustand vor und nach der Dezellularisierung durchzuführen.

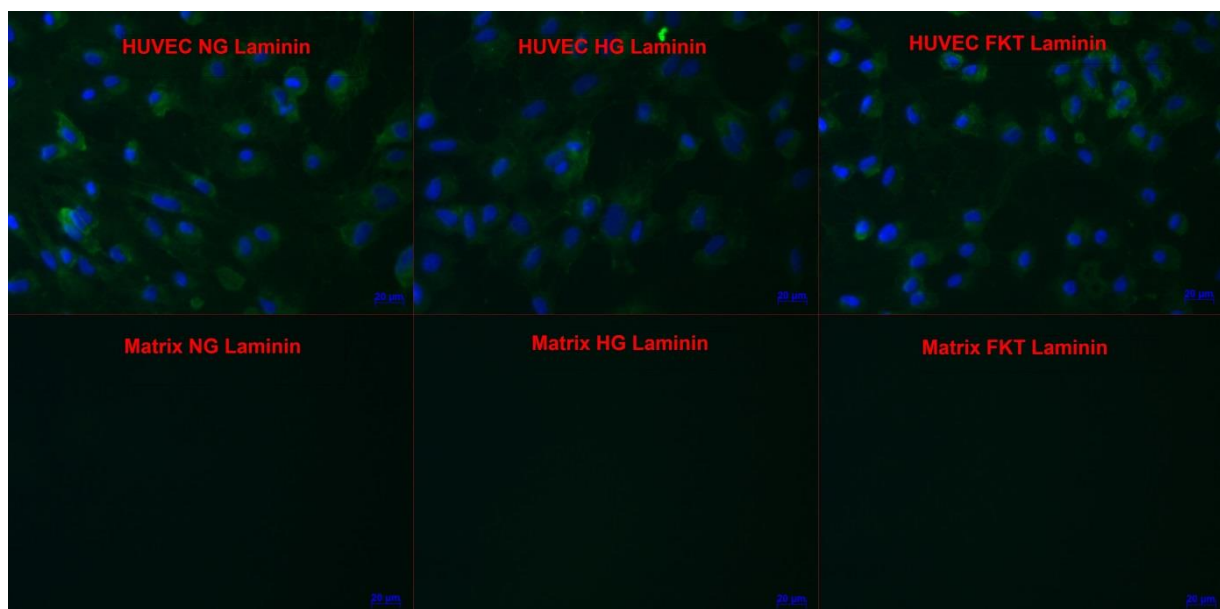


Abbildung 48: Immunfluoreszenzfärbung von Laminin (grün) vor (obere Bildreihe) und nach (untere Bildreihe) Dezellularisierung durch Ammoniumsulfatlösung. In der oberen Bildreihe sind die Zellkerne der HUVEC mittels DAPI-Färbung zu sehen. Ihre Abwesenheit nach der Dezellularisierung, bestätigt die Isolierung einer reinen extrazellulären Matrix. Laminin lässt sich jedoch nicht mehr nachweisen.

Wir wählten dafür Primärantikörper für Laminin, Fibronectin und Kollagen IV, welche neben der heterogenen Familie der Proteoglykane, die wichtigsten Vertreter der Matrixproteine ausmachen. Deren Vorkommen wollten wir in den HUVEC vor der Dezellularisierung sowie der EZM nach Dezellularisierung nachweisen. Gleichzeitig interessierten wir uns dafür, in wie weit die Modifikation der Matrix einen Einfluss auf die EZM hat, weshalb wir die Versuche mit normoglykämisch (NG), hyperglykämisch (HG) und fluktuierend-hyperglykämisch (FKT) modifizierter EZM durchführten. Unse-

re Versuche zeigten, dass alle drei Matrixproteine vor der Dezellularisation gut unter allen Modifikationen (NG/HG/FKT) nachweisbar waren. Wir mussten jedoch für Laminin (Abbildung 48) die Abwesenheit jeglicher Strukturen nach Durchführung der Dezellularisierung feststellen.

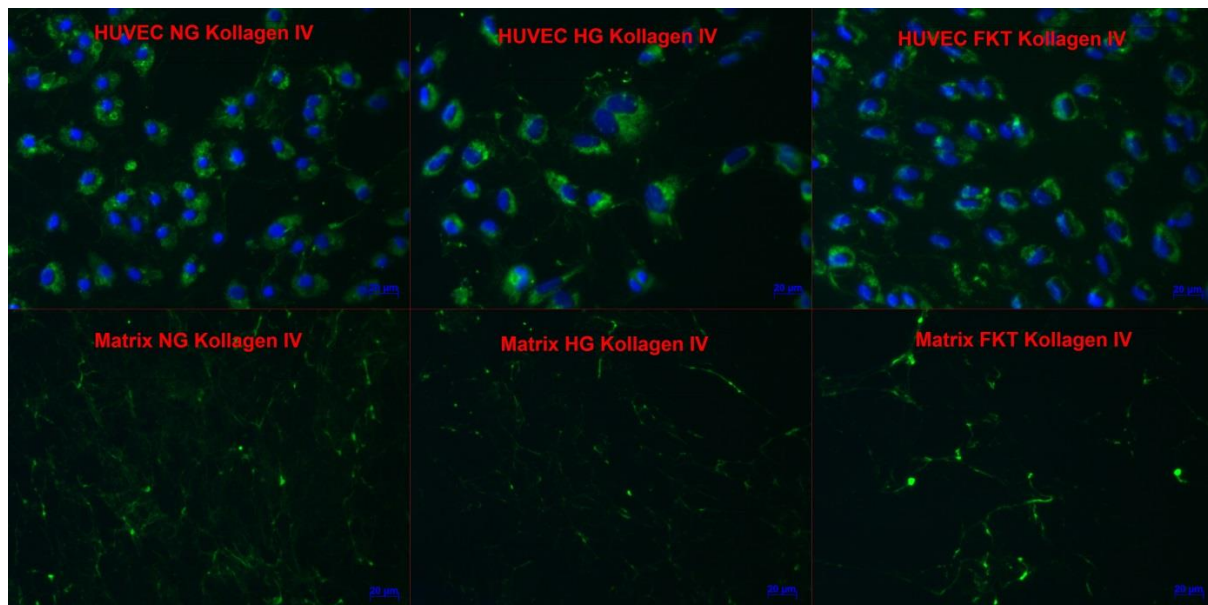


Abbildung 49: Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen IV (grün) vor (obere Bildreihe) und nach (untere Bildreihe) Dezellularisierung durch Ammoniumsolution. In der oberen Bildreihe sind die Zellkerne der HUVEC mittels DAPI-Färbung sichtbar.

Für die Matrixproteine Kollagen IV und Fibronectin (Abbildung 49 und Abbildung 50) konnten wir zeigen, dass ihre Konzentration und Beschaffenheit durch die Dezellularisierung nur gering beeinflusst wurden. Dabei zeigte sich, dass das Vorkommen der beiden Matrixmoleküle wenn überhaupt nur gering durch die hohen Glukosewerte beeinflusst wurde. Für die Matrizes die unter fluktuierend-hoher Glukose synthetisiert worden waren, ließ sich eine verminderte Qualität und beeinträchtigte Oberflächenbeschaffenheit zeigen, wobei die häufigen Medienwechsel als mögliche Ursache beachtet werden müssen.

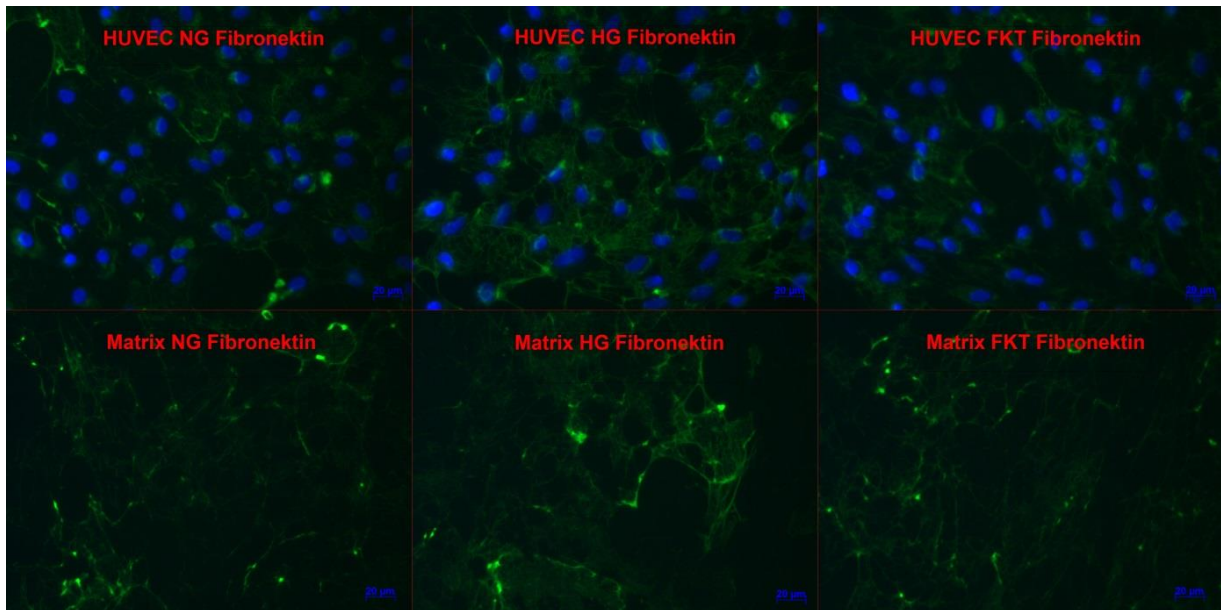


Abbildung 50: Immunfluoreszenzfärbung von Fibronektin (grün) vor (obere Bildreihe) und nach (untere Bildreihe) Dezellularisierung durch Ammoniumsolution. In der oberen Bildreihe sind die Zellkerne der HUVEC mittels DAPI-Färbung sichtbar.

4.4.3 Quantitativer Nachweis von Matrixproteinen mittels ELISAs

Nachdem wir mittels Fluoreszenz-Mikroskopie feststellen konnten, dass es in der Folge der Dezellularisierung je nach Matrixprotein (Fibronektin, Kollagen IV, Laminin) zu unterschiedlichen Konzentrationen in der EZM zu kommen scheint, wollten diese Veränderungen quantifizieren. Deshalb entschieden wir uns als nächstes Verfahren verschiedene ELISAs durchzuführen.

Zell-basierte ELISAs

Als erstes wählten wir dafür sogenannte Zell-basierte ELISAs, bei denen die Zellen in einer Mikrotiterplatte kultiviert und anschließend untersucht werden (siehe 3.2.3.3). HUVEC wurden unter identischen Bedingungen, wie für die EZM-Generierung verwendet, kultiviert. Wir verglichen die Expression vor und nach Dezellularisierung. Um zu untersuchen, ob das Maß der EZM-Proteinveränderungen abhängig von der Stärke der Lösungsreagenz (Ammoniumsolution) ist, generierten wir die Matrix mit verschiedenen Konzentrationen (0,25 und 0,5 mol/l).

Dabei stellten wir fest, dass es, vergleichbar mit unseren Experimenten bei der Immunfluoreszenzfärbung, zu deutlichen Unterschieden zwischen unlysierten Zellen und dezellularisierter EZM kommt, die Konzentration des Lösungsmittels jedoch kaum einen Einfluss auf die Proteinkonzentrationen zu haben scheint (siehe Abbildung 51 und Abbildung 52). Die in Abbildung 51 unter FKT-Modifikation deutlich erniedrigten Werte für Kollagen VI in unlysierten Zellen sind wahrscheinlich auf eine

verstärkte Ablösung der Zellen durch die häufigen Medienwechsel bedingt und müssen unter diesem Gesichtspunkt kritisch betrachtet werden.

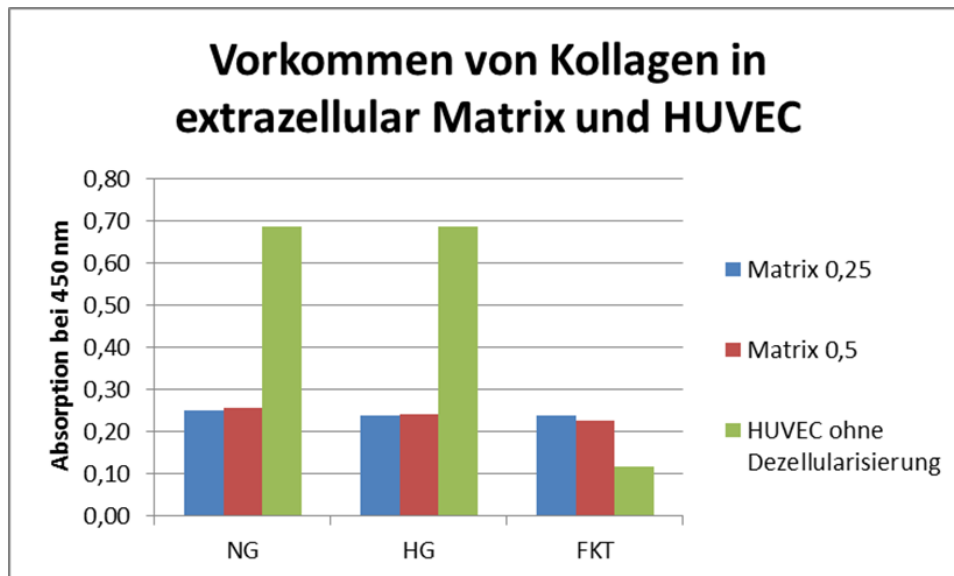


Abbildung 51: Expression von Kollagen IV, bestimmt mittels zellbasiertem ELISA. Verglichen wurde die NG, HG, FKT-generierte EZM mit 0,25 und 0,5 mol/l Ammoniumsolution-Lyse und die Expression in nicht-lysierten HUVEC-Zellen

Für die in Abbildung 52 dargestellten Nachweise von Fibronectin ist zu berücksichtigen, dass die Werte für die nicht dezellularisierten HUVECs die Detektionsgrenze des ELISA-Kits überschritten und nicht mehr quantitativ auszuwerten sind. Festhalten können wir aber auch, dass für diese Versuche die Konzentration des Lösungsmittels kaum einen Einfluss auf die Matrixproteinkonzentrationen zu haben scheint.

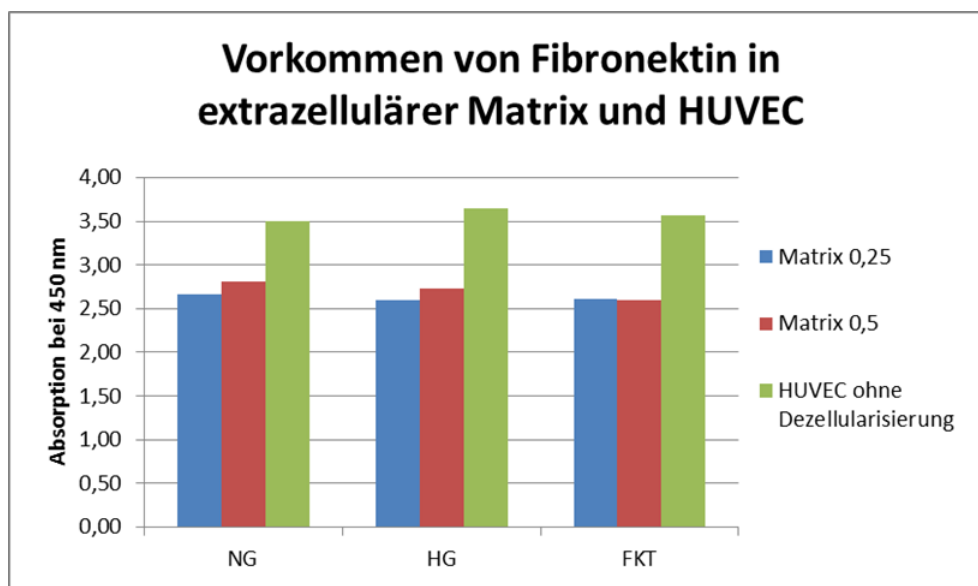


Abbildung 52: Untersuchung von extrazellulärer Matrix (gewonnen mit 0,25 oder 0,5 mol/l Ammoniumsolution) und HUVEC auf das Vorkommen von Fibronectin, abhängig von den Kulturbedingungen (NG, HG, FKT)

Sandwich-ELISAs

In einem weiteren Schritt führten wir sogenannte Sandwich-ELISAs durch, bei denen die Mikrotiterplatte mit dem Primärantikörper beschichtet ist. Dieses Verfahren eignet sich im Gegensatz zu den zell-basierten ELISAs dazu, gelöste Proteine in einer Suspension nachzuweisen. Diese gewannen wir aus dem Zellkultur-Überstand (Supernatant), sowie der in PBS gelösten EZM und den in PBS gelösten und anschließend Ultraschall-zertrümmerten HUVEC als sogenanntes Lysat.

Es bestätigte sich die Beobachtung, dass Laminin durch die Dezellularisierung vollständig abgelöst wird. Die relativ niedrigen Werte für Laminin im Supernatant der unter Fluktuation modifizierten Zellen führen wir auch in diesem Fall auf die häufigeren Medienwechsel zurück, die zu einem gewissen Grad das Auswaschen des Laminins bedingt haben könnten. Die höchsten Konzentrationen von Laminin in den lysierten HUVEC spiegeln die Ergebnisse unsere Immunfluoreszenz Ergebnisse wieder. Was die unterschiedlichen Modifikationsarten (NG/HG/FKT) im Allgemeinen betrifft, konnten wir keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede bei den untersuchten Proteinen Laminin (Abbildung 53) und Fibronectin (Daten nicht aufgeführt) feststellen. Fibronectin ließ sich dabei nur im Überstand nachweisen. Möglicherweise ist die in der Matrix und im Zelllysat enthaltene Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs, oder die Proteine liegen in anderer, durch den Antikörper nicht detektierbarer Konformation vor.

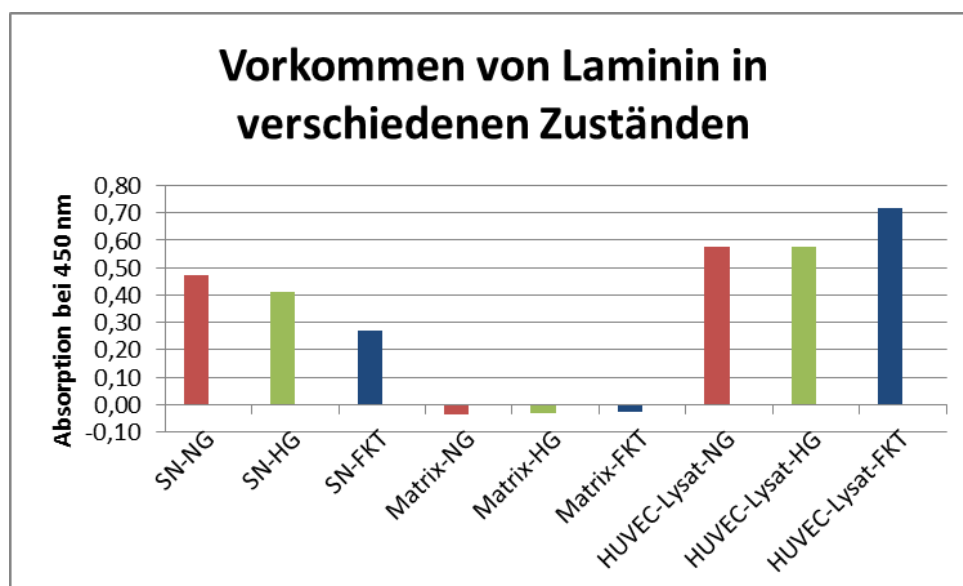


Abbildung 53: Untersuchung von Supernatant, extrazellulärer Matrix und Zelllysat auf das Vorkommen von Laminin mittels Sandwich-ELISA

4.5 Charakterisierung der Zellpopulationen: ASC und HRP/Perizyten

4.5.1 Immunfluoreszenz-Färbungen zum Nachweis spezifischer RGS5-Markerproteine

Um die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Perizyten besser zu charakterisieren und mit den ASC zu vergleichen, testeten wir unsere Zellen auf das Vorkommen von RGS5, einem G-Protein-Rezeptor der mittlerweile als Perizytenmarker etabliert ist (139). Wir verwendeten zwei unterschiedliche Klone, N14 und B4, die sich durch ihre Bindungsstelle am Protein unterscheiden.

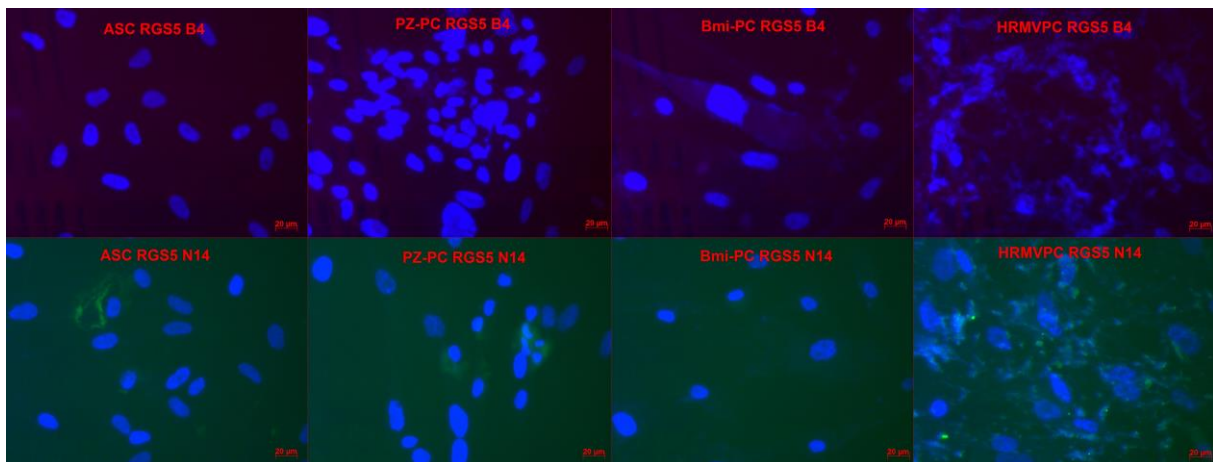


Abbildung 54: Nachweis der RGS5-Klone B4 (rot, obere Reihe) und N14 (grün, untere Reihe) in ASC, plazentären Perizyten, Bmi-Perizyten und HRMVPC

Wie in der oberen Bildreihe von Abbildung 54 zu sehen ist, konnten wir für den Klon B4 keinerlei Nachweis einer Expression feststellen. Auch für B14 in der unteren Bildreihe von Abbildung 54 konnten nur minimale, eher unspezifisch imponierende Strukturen mit der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Um den Antikörper zu verifizieren, wiederholten wir die Färbung mit der Tumorzelllinie HepG2 die als positiv Kontrolle für RGS5 aufgeführt wird (*Origene: Anti-RGS5 TRUEMAB Antibody Clone OT11E3*). Auch in diesen Versuchen (Daten nicht aufgeführt) konnten wir keine Strukturen anfärben, weshalb wir in diesem Experiment von einem fehlerhaften Antikörper ausgehen müssen und an dieser Stelle keine Schlüsse über das Vorkommen von RGS5 in Perizyten und ASC treffen können.

4.5.1.1 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Oberflächenexpression von ASC und HRP/Perizyten

Nachdem wir signifikante Unterschiede hinsichtlich des Proliferationsverhaltens von ASC und HRP auf hyperglykämisch modifizierter EZM nachgewiesen hatten, stellten

wir uns die Frage ob und wenn ja, in welcher Form sich diese Unterschiede auch in der Charakterisierung der verschiedenen Zellpopulationen widerspiegeln würden. Dafür analysierten wir alle für die Matrixversuche verwendeten Zellen mittels Durchflusszytometrie. Abbildung 55 und Abbildung 56 zeigen eine Übersicht aller von uns analysierten Zellen. Zusammen mit Abbildung 57 stellen sie das in unserer Gruppe etablierte Panel für MSC / Perizyten dar. Da wir dieses im Verlauf der Arbeit angepasst und mit einigen Markern ergänzt haben, sind nicht alle Zellen mit der identischen Marker Kombination gemessen. Wenn keine Messwerte vorliegen ist dies in den Einzelabbildungen der Marker (siehe unten) dementsprechend mit NA (nicht analysiert) markiert.

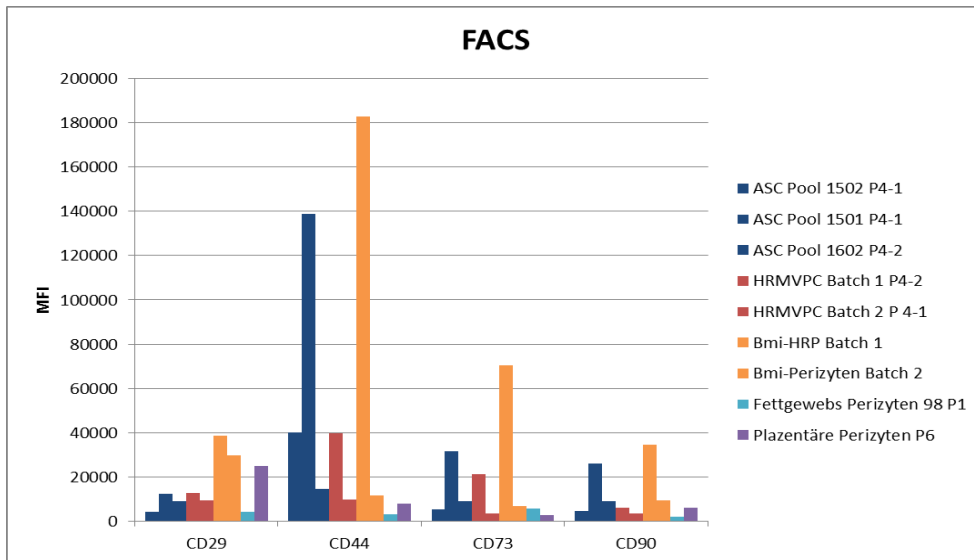


Abbildung 55: FACS-Analyse nach etabliertem MSC-Perizyten Panel. Marker mit hohen MFI-Werten

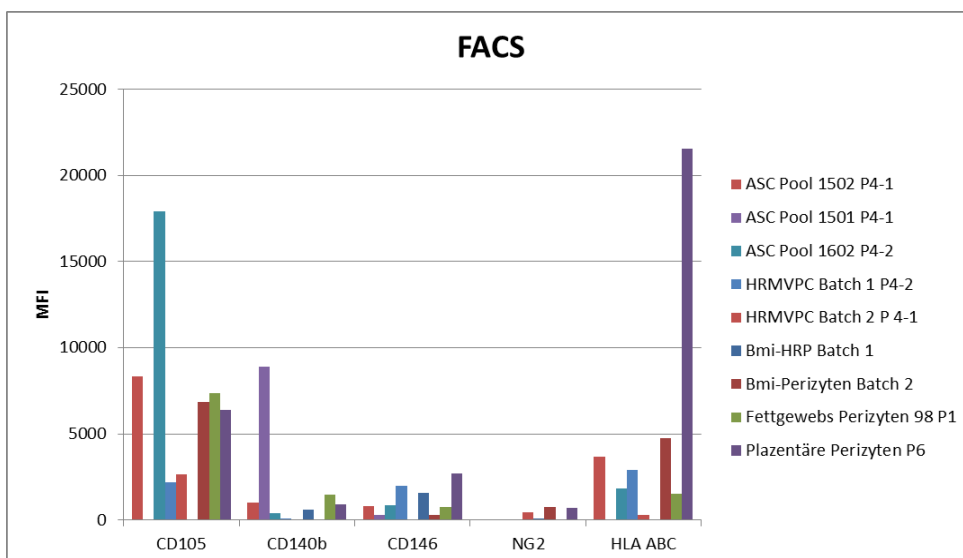


Abbildung 56: FACS-Analyse nach etabliertem MSC-Perizyten Panel. Marker mit mittleren MFI-Werten

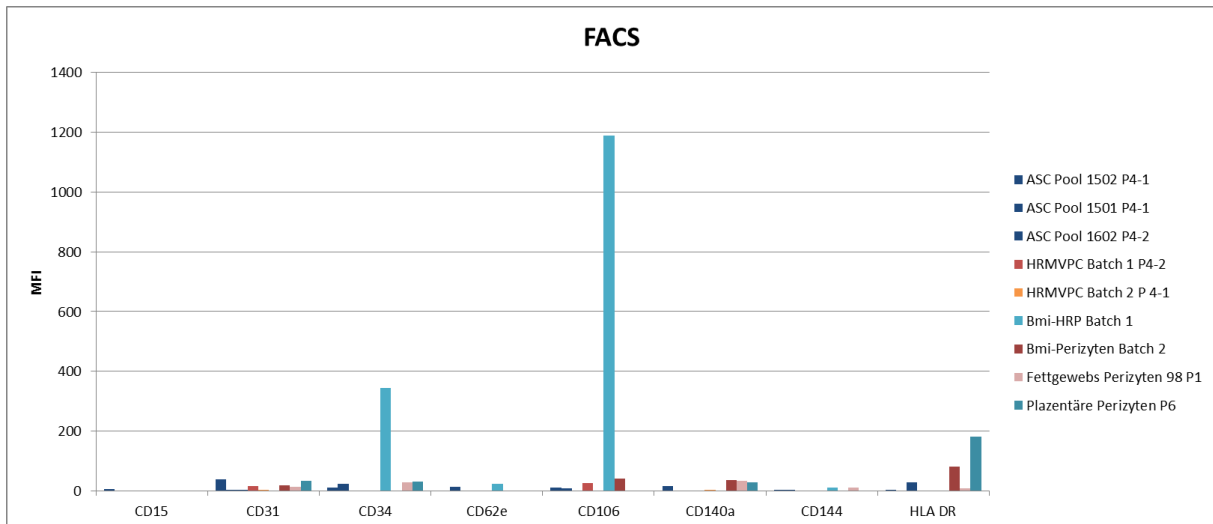


Abbildung 57: FACS-Analyse nach etabliertem MSC-Perizyten Panel. Marker mit niedrigen MFI-Werten

Im Folgenden werden als Perizytenmarker etablierte oder durch signifikante Unterschiede hervorgetretene Marker im Einzelnen dargestellt und besprochen. Die Daten zeigen eine starke Heterogenität der Expressionsintensitäten innerhalb der Gruppen. Die erlaubt Tendenzen zwischen Perizyten und ASC bezüglich ihrer Expressionsprofile auszumachen. Es müssen jedoch mehr individuelle Isolate analysiert werden, da die Unterschiede von Batch zu Batch sehr groß waren und ein Mitteln über mehr Präparate zu erfordern scheinen.

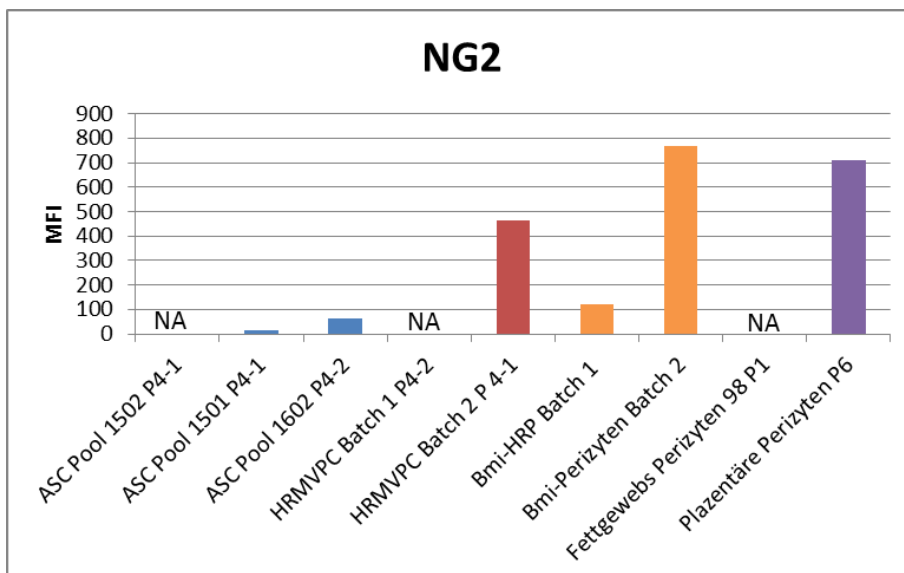


Abbildung 58: Oberflächenexpression von NG2 auf ASC und Perizyten verschiedener Herkunft. NG2 gilt als etablierter Perizytenmarker und zeigt entsprechend stärkere Expression auf Perizyten als auf ASC.

NG2 ist einer der etabliertesten Perizytenmarker und zeigt entsprechend stärkere Expression auf Perizyten (55). Im Vergleich zu den folgenden Perizyten-Markern ist er der Einzige der in den ASC nahezu gar nicht exprimiert wurde.

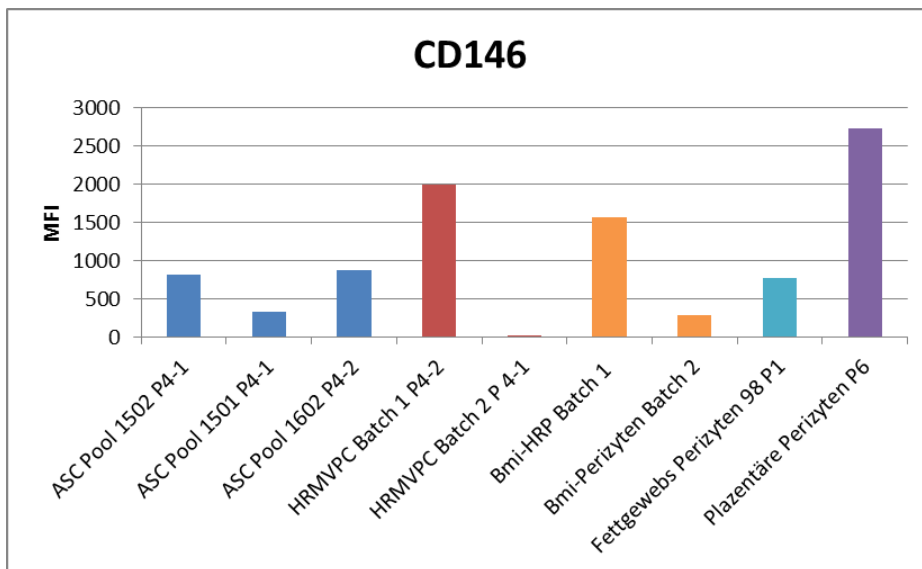


Abbildung 59: Oberflächenexpression von CD146 auf ASC und Perizyten verschiedener Herkunft.

Auch CD146 ist ein bekannter Perizyten/perivaskulärer Marker. Auch wenn er tendenziell eine höhere Expression bei den meisten Perizyten zeigt, wird er doch ebenfalls von allen drei ASC-Pools exprimiert. Gleichzeitig weisen speziell die retinalen Perizyten deutliche Unterschiede, je nach Zellbatch, auf. Interessant ist, dass die stärkste Expression, für die aus der stark durchbluteten Plazenta gewonnenen Perizyten nachzuweisen ist. Gleichzeitig zeigen die aus dem schwach durchbluteten Fettgewebe isolierten Perizyten eine schwache Expression von CD146.

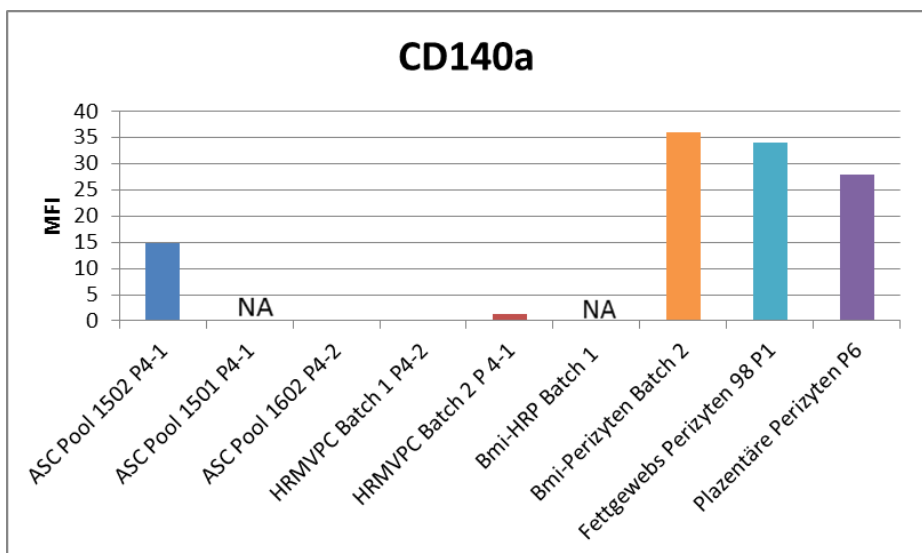


Abbildung 60: Oberflächenexpression von CD140a auf ASC und Perizyten verschiedener Herkunft.

Auch CD140 α gilt als etablierter Perizytenmarker. Interessant ist, dass nahezu keine Expression bei beiden HRMVPC-Isolaten und einem Bmi-HRP Batch nachzuweisen war, während einer der 3 ASC-Pool CD140 α schwach exprimiert.

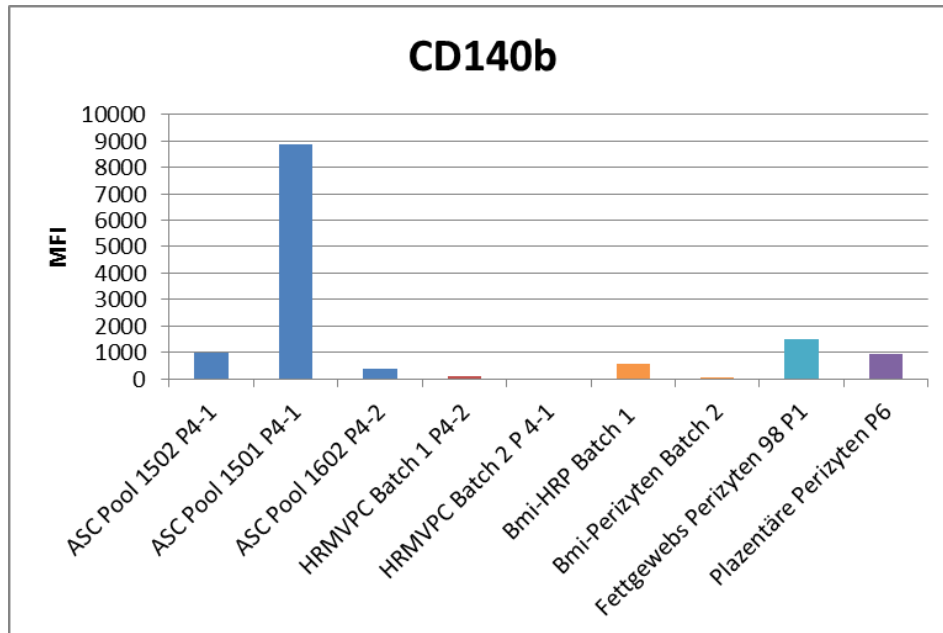


Abbildung 61:
Oberflächenexpression von CD 140 β , auch als PDGFR β bezeichnet

CD 140 β , auch als PDGFR β bezeichnet, gilt in der Literatur neben NG2 und α SMA als einer der wichtigsten Perizytenmarker (55). Unsere Daten können diese Aussage jedoch nicht unterstützen. Im Gegenteil kommt es sogar bei einem ASC-Pool zur höchsten Expression und gleichzeitig zu nahezu keiner bei den HRMVPC. Aus diesen Experimenten müssen wir das Fazit ziehen, dass die als typische Marker-Proteine beschriebenen Antigene nicht robust in der Lage sind, ASC von Perizyten zu unterscheiden.

Auch die Analyse der klassischen MSC-Marker CD 90, CD 105 und CD 73 bestätigte eine heterogene Oberflächenexpression bei der die einzelnen Batches einen größeren Einfluss auf die Expressionsstärke hatten als die Zugehörigkeit zu einer Population.

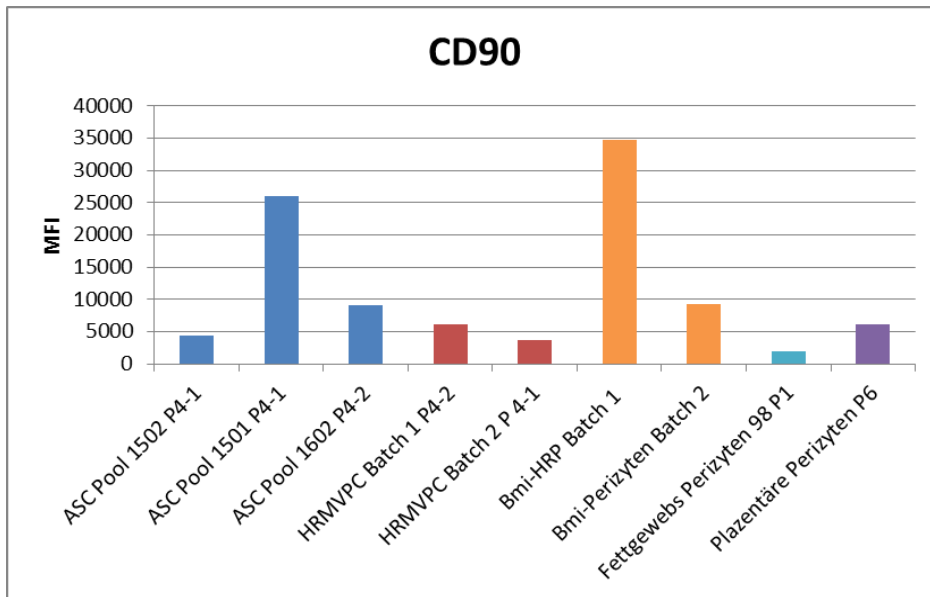


Abbildung 62: Oberflächenexpression von CD 90 auf ASC und Perizyten

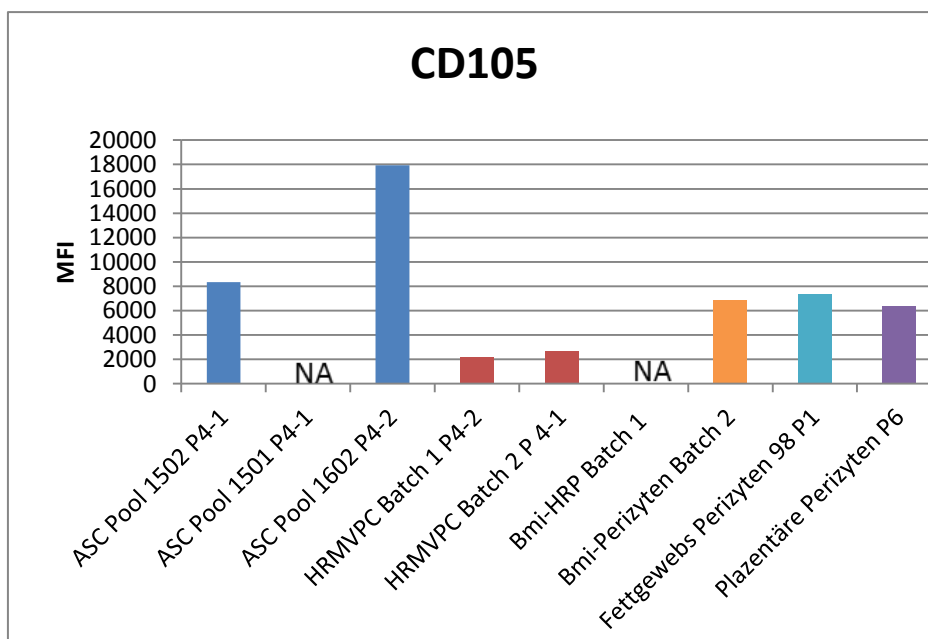


Abbildung 63: Oberflächenexpression von CD 105 auf ASC und Perizyten

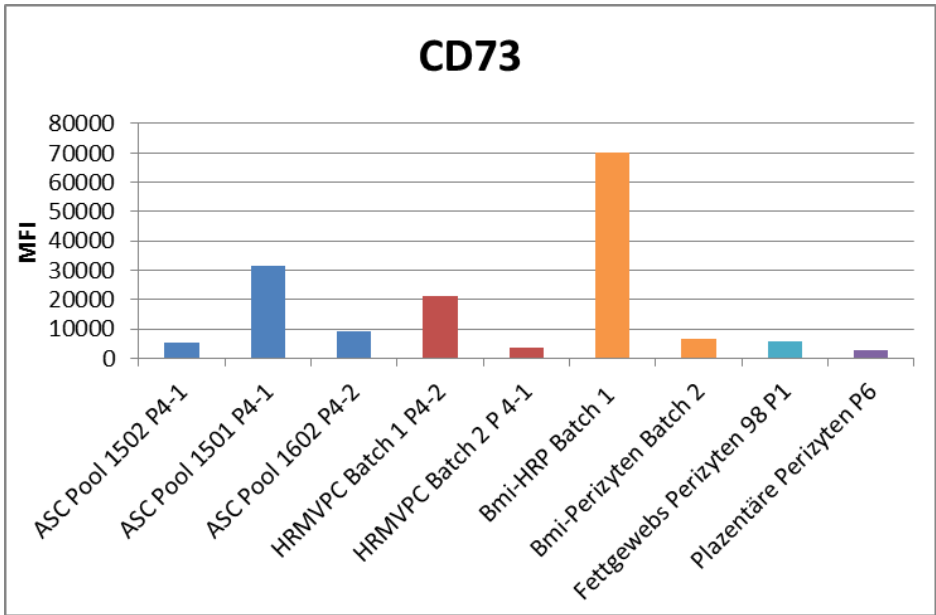


Abbildung 64: Oberflächenexpression von CD 73 auf ASC und Perizyten

HLA-ABC ist ein unspezifischer Marker der abgesehen von plazentären Perizyten schwach aber ebenfalls heterogen von ASC und Perizyten exprimiert wurde.

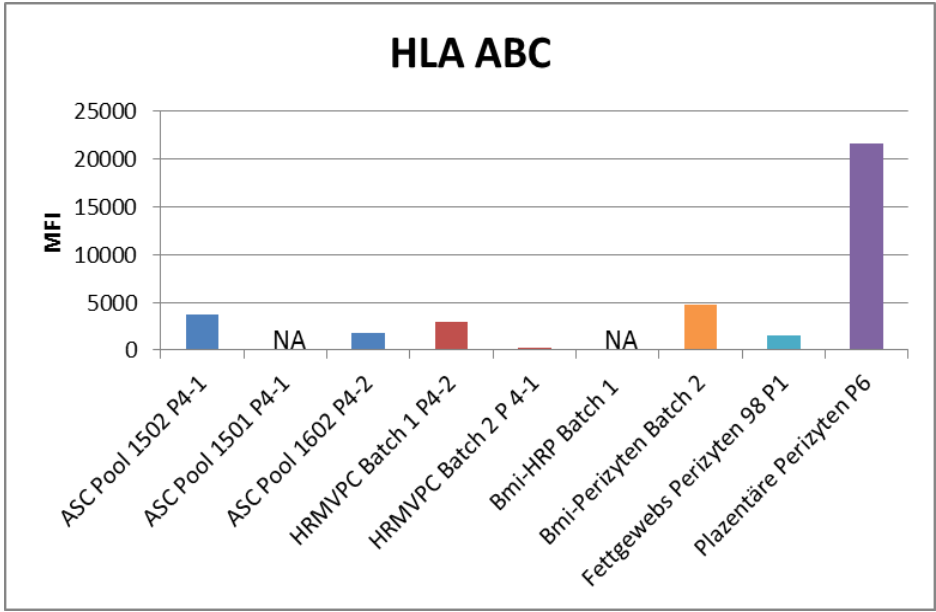


Abbildung 65: Oberflächenexpression von HLA-ABC auf ASC und Perizyten

4.5.2 Osteogene und adipogene Induktion zur Bestimmung des Differenzierungspotentials von ASC und HRP/Perizyten

4.5.2.1 Qualitative Assays

Nachdem wir mittels Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression von ASC und Perizyten verglichen hatten, wollten wir auch das Differenzierungspotential der verschiedenen Zelllinien vergleichen. Dazu induzierten wir osteogene und adipogene Differenzierung durch dementsprechende Nährmedien und untersuchten anschließend mikroskopisch das Differenzierungsverhalten der Zellen. Als erstes führten wir unsere Versuche mit einem ASC-Pool und aus Plazenta und Fettgewebe selbst gewonnenen Perizyten durch.

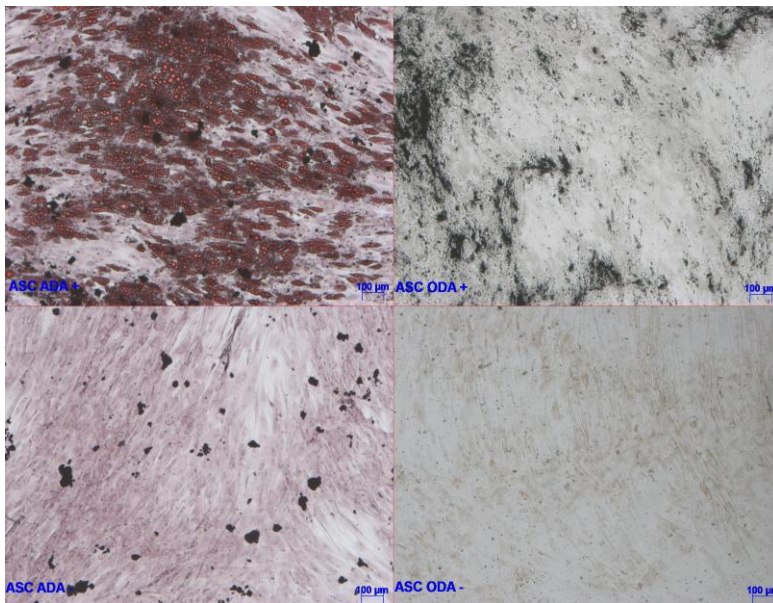


Abbildung 66: Osteogene und adipogene Differenzierung von ASC. Obere Reihe = induziert, untere Reihe = nicht induzierte Kontrollen. Man erkennt eine starke adipogene sowie eine mäßige osteogene Differenzierung.

Wie erwartet, zeigte sich bei den osteogenen und adipogenen induzierten ASC ein klares Differenzierungspotential, wobei speziell die adipogene Differenzierung stark ausgeprägt war.

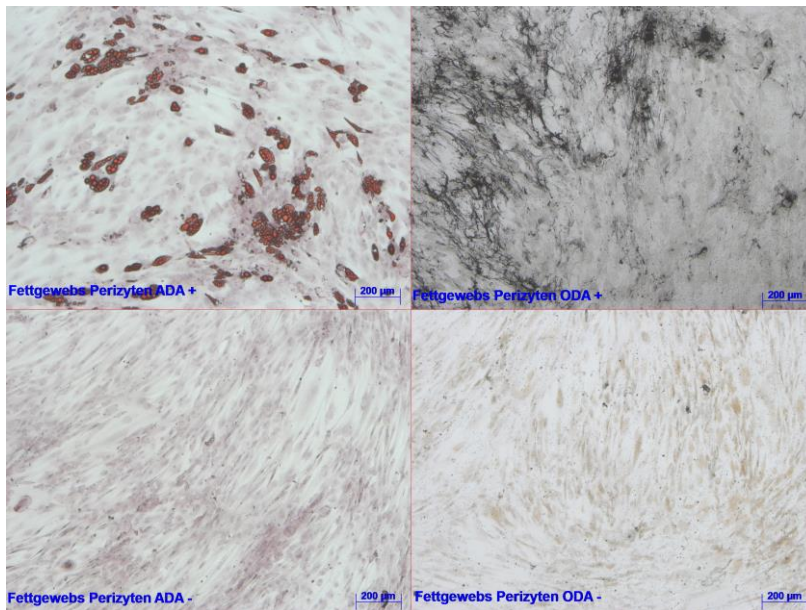


Abbildung 67: Osteogene und adipogene Differenzierung von Fettgewebs-Perizyten. Man erkennt eine mäßige adipogene sowie osteogene Differenzierung.

Wir konnten für die aus Fettgewebe isolierten Perizyten eine mäßige Differenzierungskapazität in adipogene Zellen sowie osteogene Zellen nachweisen.

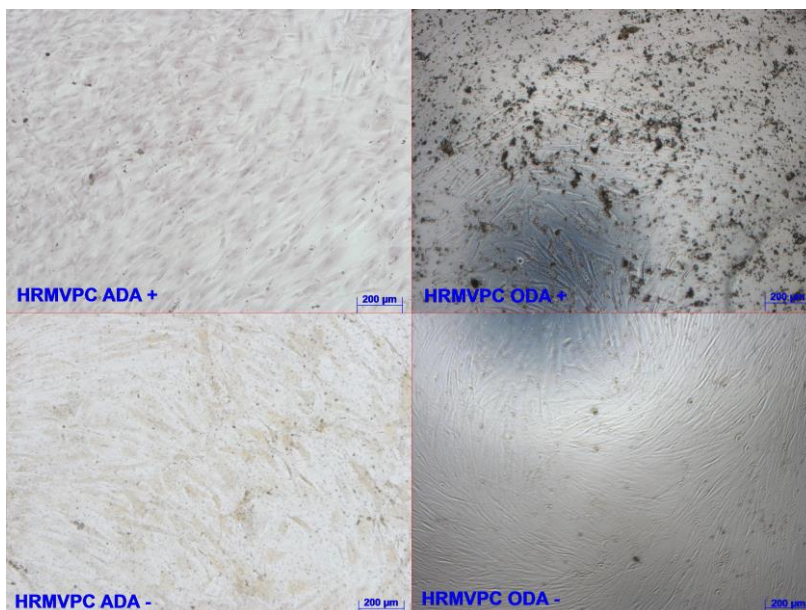


Abbildung 68: Osteogene und adipogene Differenzierung von HRMVPC. Man erkennt nahezu kaum eine adipogene Differenzierung, interessanterweise jedoch eine schwache osteogene Differenzierung die vergleichbar mit der von ASC ist.

Für die HRMVPC stellten wir nahezu keine adipogene Differenzierung fest, jedoch zeigte sich eine gute osteogene Differenzierung die vergleichbar zu der osteogenen Differenzierung der ASC erschien.

4.5.2.2 Quantitative Assays

Nachdem wir diese Unterschiede zwischen ASC und Perizyten, sowie innerhalb der Perizytenpopulation abhängig vom Herkunftsgewebe, qualitativ feststellen konnten, war unser nächstes Ziel diese auch quantitativ darzustellen um ASC und Perizyten sowie die Perizyten untereinander, besser miteinander vergleichen zu können. Wir kultivierten ASC und verschiedenen Perizyten erneut und induzierten adipogene und osteogene Differenzierung. Anschließend analysierten wir diese nach entsprechender Färbung mittels des TECAN und konnten damit quantitative Daten generieren, die einen Vergleich der Zellen untereinander ermöglichten.

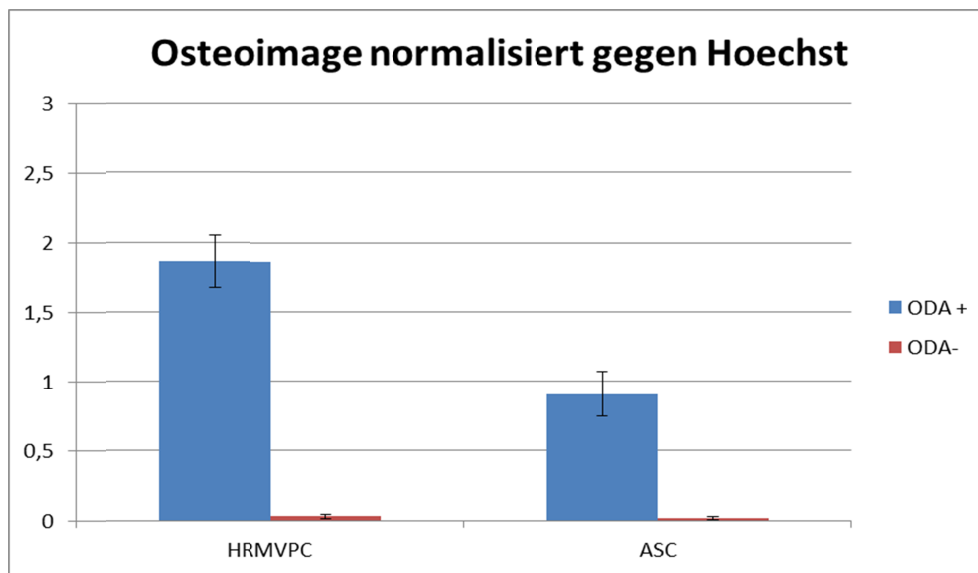


Abbildung 69: Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung von ASC und HRMVPC. (n = 3)

Unsere Vermutungen, dass HRMVPC sogar stärker osteogen differenzieren als ASC, ließen sich durch diese Versuche bestätigen.

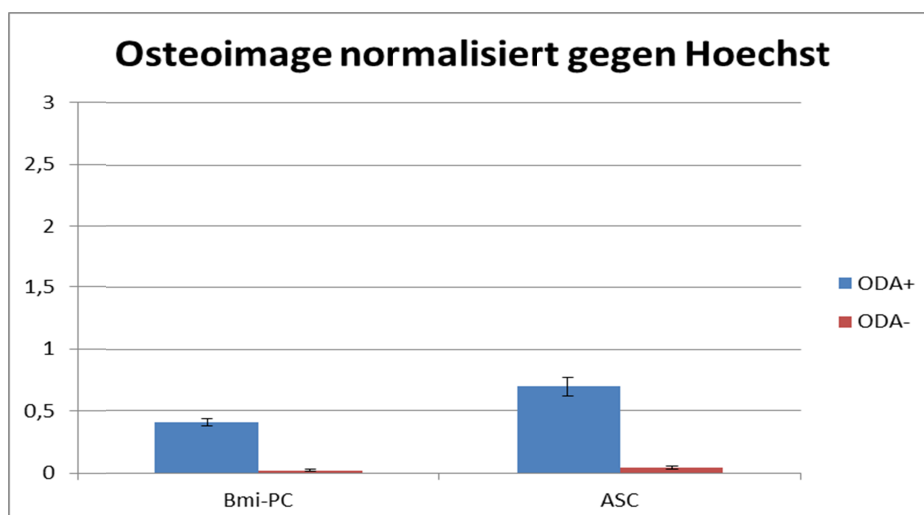


Abbildung 70: Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung von ASC und Bmi-PC. (n = 3)

Die Bmi-Perizyten zeigten eine niedrigere osteogene Differenzierung als ASC, was gegebenenfalls darauf zurückzuführen ist, dass durch ihre deutlich erhöhte Passage-rate das Potential zur Differenzierung in andere Zelllinien verloren geht. Die Tatsache, dass die ASC aus zwei verschiedenen Pools, in allen drei Experimenten (PZ-, Bmi-, HRMV-Perizyten) den nahezu gleichen Grad an osteogener Differenzierung aufweisen zeigt, dass die Versuche eine gute Reproduzierbarkeit gewährleisten.

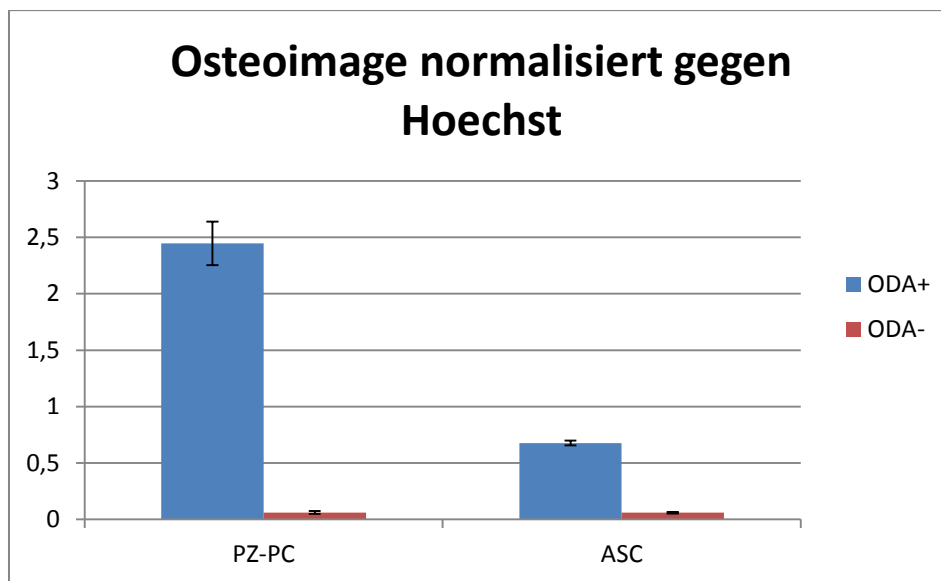


Abbildung 71: Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung von ASC und placentären Perizyten. (n = 3)

Zusätzlich testeten wir auch die von uns isolierten placentären Perizyten auf ihr osteogenes Differenzierungspotential. Interessanterweise konnten wir auch für diese Perizyten ein den ASC deutlich überlegenes Differenzierungspotential in osteogene Zelllinien nachweisen.

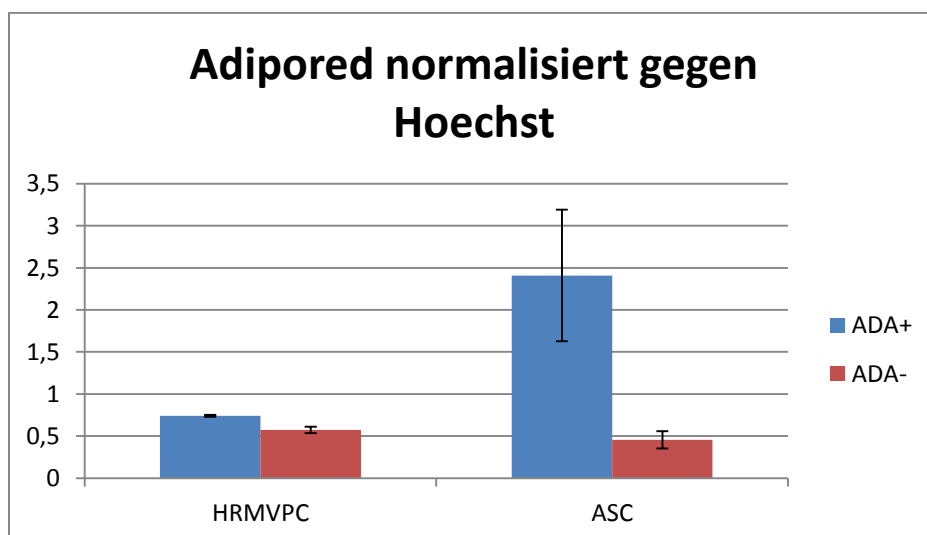


Abbildung 72: Quantitative Analyse der adipogenen Differenzierung von ASC und HRMVPC. ADA+ steht dabei für die mit adipogenen Wachstumsfaktoren kultivierten Zellen. Die ADA- Kontrollen wurden mit DMEM-FCS (10%) kultiviert. (n = 3)

Für die HRMVPC konnten wir im Vergleich zu ihrer nicht induzierten Kontrolle nahezu keine adipogene Differenzierung aufweisen, während die ASC ein sehr hohes Potential zeigten. Diese Feststellungen bestätigten die Ergebnisse unserer qualitativen Differenzierungsassays.

4.5.3 Veränderungen der Genexpression von ASC durch ihre Kultur auf EZM

In unserem letzten Versuch war uns daran gelegen, eventuelle Veränderungen in der Oberflächenexpression der ASC durch ihre Kultur auf EZM zu untersuchen. Auch wenn es im Verlaufe dieser Arbeit nicht gelang, einen eindeutigen Mechanismus auszumachen, der zu einem veränderten Wachstum von ASC/HRP auf hyperglykämisch modifizierter EZM führt, konnten wir klar feststellen, dass die hyperglykämisch modifizierte EZM auf HRP, nicht jedoch ASC, einen signifikanten, wachstumsmindernden Effekt aufweist. Es stellte sich uns die Frage, ob es zu anderweitigen Veränderungen wie zum Beispiel ihres Expressionsmusters kommt würde, die sich nicht anhand der Proliferation und Apoptoserate nachweisen lassen. Unterstützt wurden diese Überlegungen von einer Publikation, die bei der Co-Kultur von MSC mit, den HUVEC eng verwandten, endothelialen Vorläuferzellen eine Verschiebung des mittels PCR nachgewiesenen Expressionsprofils hin zu Perizyten ähnlichen Zellen gezeigt hatte (130). Anstelle von PCR zur Messung von Veränderungen der Genexpression wählten wir die Durchflusszytometrie (FACS), um Veränderungen der Proteinexpression nachzuweisen. Ergänzend zu den zuvor erwähnten Markern, färbten wir die Zellen mit *alpha-smooth muscle actin* in seiner Bedeutung als Perizytenmarker.

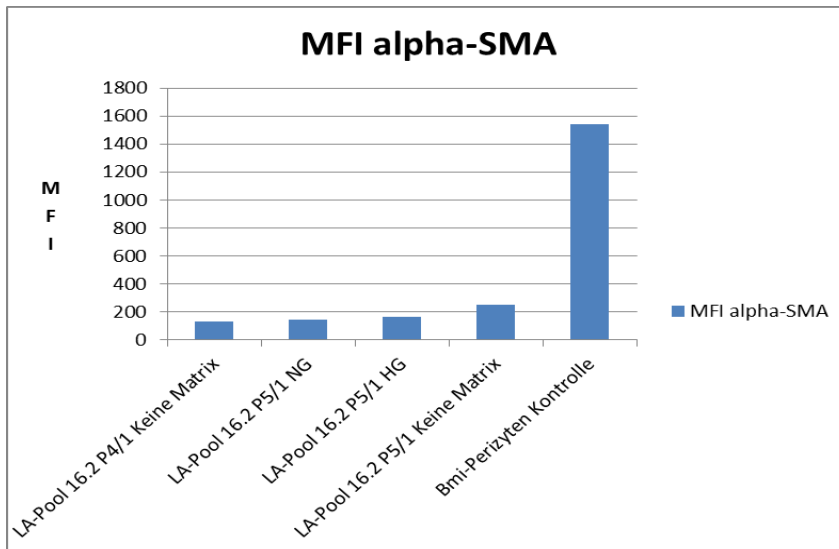


Abbildung 73: Expression von alpha-smooth muscle actin von ASC vor (p4) und nach (p5) Kultivierung auf NG und HG EZM sowie nach normaler Kultur ohne Matrix-Coating. Als Kontrolle dienten Bmi-HRP.

Es wurden erste explorative Experimente durchgeführt, um beurteilen zu können, ob der EZM-Kontakt Veränderungen in der Marker Expression vermittelt. Hierfür wurde die Proteinexpression der Zellen vor (Passage 4) und nach der Kultur auf Plastik oder NG/HG-modifizierter EZM (Passage 5) bestimmt. Für alpha-SMA konnten wir keine deutlichen Veränderungen beobachten. Die zur Kontrolle ebenfalls analysierten Bmi-Perizyten zeigten eine starke Expression und bestätigten alpha-SMA als Perizytenmarker sowie die adäquate Wirkung unserer Färbung.

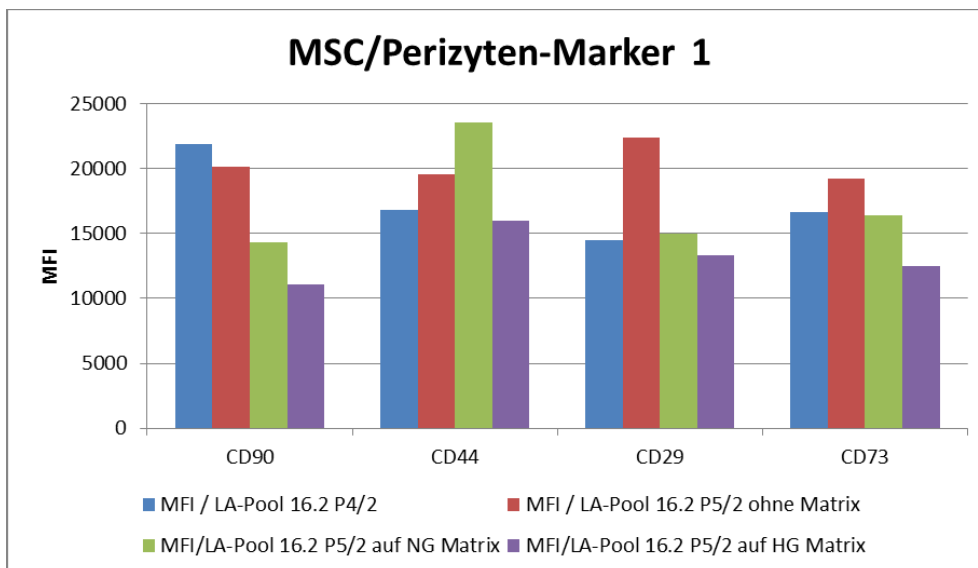


Abbildung 74: FACS-Analyse der ASC, kultiviert unter den verschiedenen Bedingungen. (n = 1)

Es ließ sich eine leicht reduzierte Expression von CD90 in den auf EZM kultivierten ASC feststellen. Alle anderen Marker zeigten unspezifische Veränderungen.

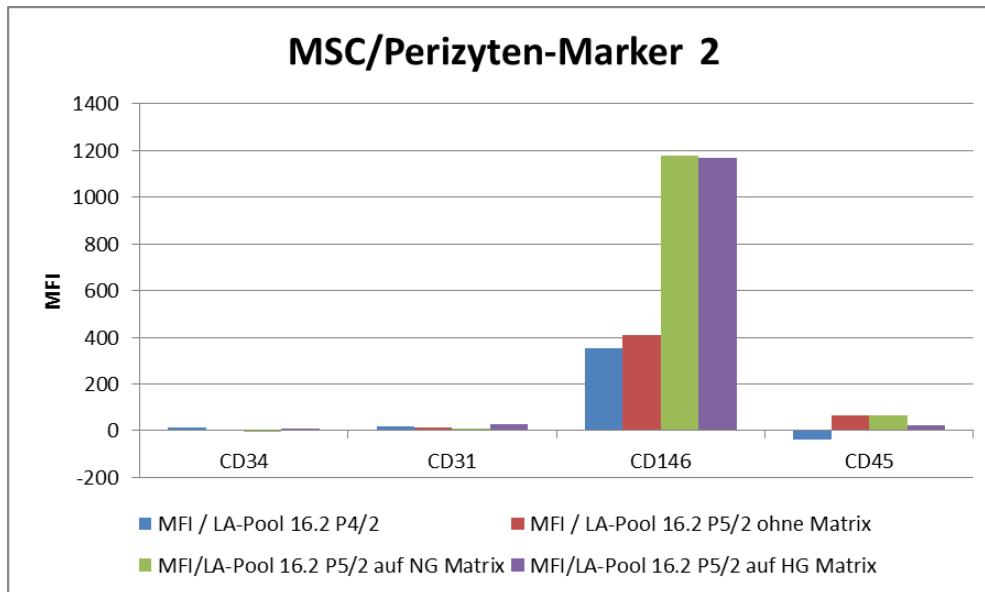


Abbildung 75: FACS-Analyse der ASC, kultiviert unter den verschiedenen Bedingungen (n = 1)

CD146 wies eine deutliche Zunahme der MFI-Werte auf, die spezifisch bei den auf EZM kultivierten ASC vorkam. Dies ist sehr interessant, weil CD146 zu einem der etabliertesten Perizytenmarker und seine verstärkte Expression auf eine Umwandlung der ASC in „Perizyten ähnliche“ Zellen hinweisen könnte.

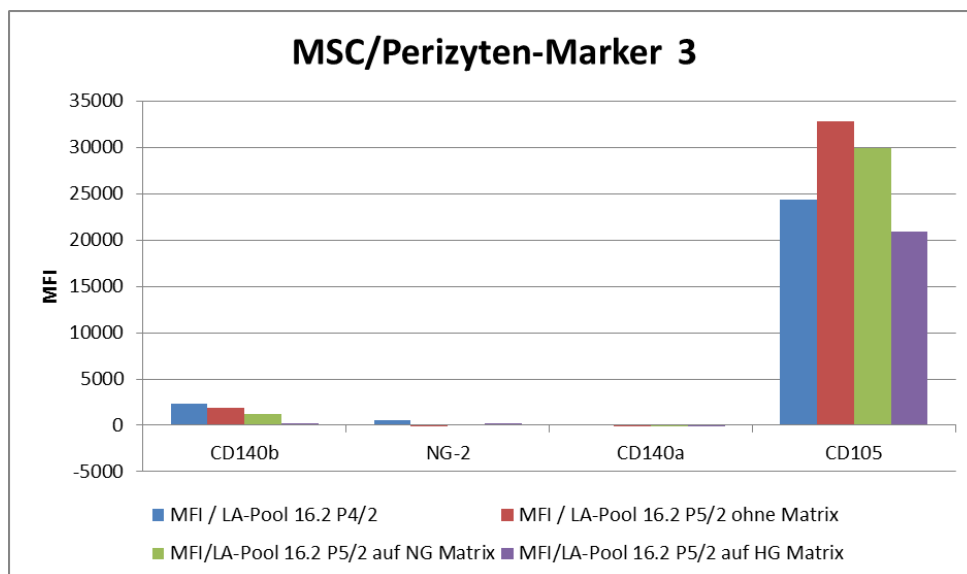


Abbildung 76: FACS-Analyse der ASC, kultiviert unter den verschiedenen Bedingungen (n = 1)

Für NG-2 und CD140 α , zwei weitere wichtige Perizytenmarker, konnten wir aufgrund der geringen Expression keine eindeutigen Aussagen treffen. Auch CD140b (PDGFR- β), ebenfalls ein wichtiger Perizytenmarker, wies eine sehr geringe Expression auf, die durch Kultur auf EZM eher rückläufig scheint.

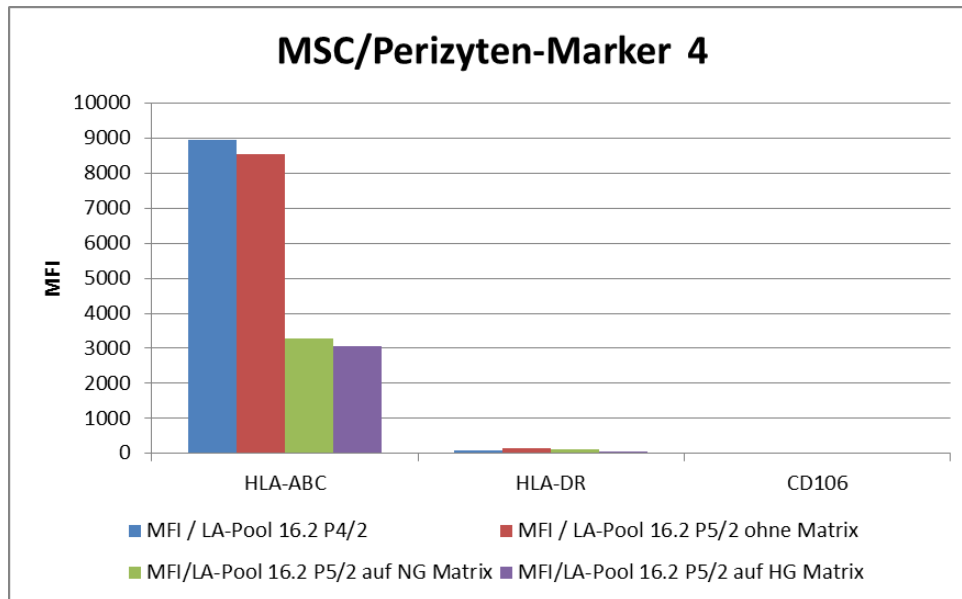


Abbildung 77:
FACS-Analyse der
ASC, kultiviert unter
den verschiedenen
Bedingungen (n
= 1)

HLA-ABC (HLA Klasse I), zeigte interessanterweise eine deutliche herab-Regulation bei den auf EZM kultivierten Zellen. Die Unterschiede in der Expression je nach Matrix-Modifikation (NG/HG) waren bei den beiden auffälligen Markern so gering, dass keine eindeutigen Aussagen über den Einfluss von hyperglykämischer Modifikation der EZM zu treffen sind. Nichtsdestotrotz ist die Feststellung, dass ASC durch Kultur auf EZM anscheinend ihr Expressionsprofil in eine Perizyten-ähnliche Richtung adaptieren hochinteressant und wirft spannende Fragen auf.

5 DISKUSSION

Zentrales Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von *Adipose derived stem/stromal cells* (ASC) und *human retinal pericytes* (HRP) auf hyperglykämisch modifizierter und unter normalen Glukosebedingungen sezernierter extrazellulärer Matrix (EZM) von Endothelzellen (HUVEC) zu vergleichen. Damit wollten wir die Möglichkeit eruieren, ASC gegen Erkrankungen, die mit einem Perizytenuntergang einhergehen, therapeutisch zu verwenden. Des Weiteren sollte die Rolle der EZM im Zuge diabetischer Komplikationen genauer untersucht werden und die umstrittenen verwandtschaftlichen Verhältnisse von ASC und HRP näher untersucht werden. Mit Aussicht auf anschließende Projekte führten wir zum Ende unserer Arbeit Vorversuche durch, die sich der Adaptation von ASC an das „Perizyten spezifische Milieu“ EZM widmeten.

5.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese lautet, dass ASC erfolgreich dem pericyte-drop-out und damit einhergehenden Komplikationen bei der diabetischen Retinopathie entgegenwirken können, indem sie:

- Sich nach Transplantation in die Gefäßarchitektur der Retina integrieren und Perizytenfunktionen übernehmen und somit die deregulierte Angiogenese stabilisieren (143)
- Durch Sekretion trophischer Faktoren, gestörte biochemische und metabolische Prozesse im Verlaufe der DRP normalisieren und so zur Gefäßstabilisierung beitragen (144)
- Durch Modulation der lokalen und systemischen Immunantwort weitere adverse Gewebsveränderungen reduzieren (113)
- Durch angiogene und antiapoptotische Faktoren sowohl der kapillären als auch der neuronalen Degeneration entgegenwirken (145)
- Neben der parakrinen Sekretion auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte positiven Einfluss auf das retinale Endothel nehmen (146)

Im Zuge dieser Überlegungen, haben tierexperimentelle Studien bereits zeigen können, dass sich transplantierte ASC in räumlicher Nähe zu Endothelzellen einnisten und offenbar Perizytenfunktionen übernehmen, die zum therapeutischen Erfolg beitragen (128). Weitere Experimente konnten belegen, dass ASC neuroregenerative

Effekte vermitteln (147). Obwohl ein direkter Beleg für die immunmodulatorische Wirkung der ASC gegen die DRP noch aussteht, legen Daten aus anderen Erkrankungsentitäten nahe, dass dies einen weiteren Wirkmechanismus der ASC ausmacht (86, 88). Weiterhin belegen aktuelle Publikationen, dass sich MSC, insbesondere ASC, resistent gegenüber Hyperglykämie verhalten (148) während Perizyten gegenüber diesen Einflüssen sensibel zu sein scheinen (149, 150).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Teilaspekt der Glukose-beeinflussten Interaktion von Endothelzellen und Perizyten/ASC herausgegriffen. Es ist vielfach beschrieben, dass Hyperglykämie zu Veränderungen in der EZM führt (49, 151, 152). Dies wurde von Beltramo et al. als ursächlich für eine verminderte Adhäsion sowie eine gesteigerte Apoptoserate von Perizyten die auf hyperglykämisch modifizierter EZM kultiviert wurden postuliert (35). Wir wollten nun nachvollziehen, ob sich ASC in diesem Versuchsaufbau wieder als resistent gegenüber Hyperglykämie-induzierten Modifikationen erweisen. Dies würde die Aussicht auf ihren therapeutischen Erfolg in einem diabetischen Milieu bestärken.

Als Methoden wurden im Paper von Beltramo et al. für die Proliferation und die Adhäsion Zellzahlbestimmungen mittels einer Bürker-Kammer durchgeführt. Für den Nachweis apoptotischer Prozesse wurden von der Beltramo Gruppe Immunoassays (ELISAs) verwendet. Wir entschieden uns dafür, die Proliferation mit Hilfe des *IncuCyte ZOOM®* zu ermitteln. Dieses Gerät ermöglicht es, mittels „*Live Cell Imaging*“ in Echtzeit, die Adhäsion und vor allem Proliferation der Zellen zu beobachten und gleichzeitig zu messen. Neben quantitativen Daten lassen sich dadurch auch Aussagen über die qualitativen und morphologischen Veränderungen während der Proliferation treffen. Gleichzeitig hatte dieser Versuchsaufbau den Vorteil, dass wir die Adhäsion sowie die Proliferation getrennt betrachten konnten und dabei zu jedem Zeitpunkt zusätzlich Aussagen über die morphologischen Zustände der Zellen treffen konnten. Ergänzend untersuchten wir die Adhäsion, indem wir die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat fixierten und mittels Immunfluoreszenz ihre Ausbreitung analysierten. Für die Ermittlung der Apoptoserate nutzten wir ebenfalls den *IncuCyte ZOOM®* indem wir die Zellen vor ihrer Aussaat, mit *NucView™ 488* versetzten (35). Dies ist ein Immunfluoreszenzfarbstoff, der durch Kontakt mit Caspase-3 in Fluoreszenz eintritt und somit einzelne apoptotische Events über die Zeit sichtbar macht, ohne dabei Einfluss auf das Zellwachstum zu nehmen.

Unsere Experimente zeigten abweichende Ergebnisse im Vergleich zu der Arbeit von E. Beltramo. Dies könnte daran liegen, dass die einfache Zellzahlbestimmung wie von Beltramo et al durchgeführt, keine Differenzierung zwischen Adhäsion und Proliferation erlaubt. Zwar scheint auch in unseren Versuchen die Adhäsion für HRP geringfügig verzögert wenn die Zellen auf hyperglykämisch modifizierter EZM (HG-EZM) kultiviert werden, diese Versuche spiegeln sich jedoch nicht in einer erhöhten Apoptoserate wieder. Da dies bei einem Nicht-Anwachsen der Zellen mit darauffolgendem Zelltod der Fall wäre, gehen wir davon aus, dass die EZM-Modifikationen zwar die Adhäsion erschweren, die überwiegende Anzahl der HRP jedoch trotzdem adhärert. Dies bestätigen auch unsere Konfluenzmessungen die eine weitgehend identische Zelldichte in den ersten Stunden nach Aussaat der Zellen belegen. Bezüglich der Apoptoserate von HRP im Vergleich zu ASC ließ sich eine, von der Modifikation der EZM unabhängige, bei HRP erhöhter Zelltod feststellen. Dies bestätigt die Erfahrung, dass HRP im Allgemeinen empfindlicher als ASC auf äußere Umwelteinflüsse reagieren. Auch unterscheiden sich unsere Daten hinsichtlich der Proliferation deutlich von denen der AG Beltramo. Diese bestimmte nach 7 Tagen Kultur der HRP auf HG- oder NG-EZM, die Zellzahl und konnte dabei keine Beeinträchtigung der Proliferation von HRP auf HG-EZM feststellen. Unsere Experimente zeigten hingegen eine signifikante ($p \leq 0,05$) Proliferationsreduktion von HRP die auf HG-EZM kultiviert wurden von Beginn der Versuche an mit den signifikantesten Werten 7-20 Stunden nach Zellaussaat. ASC zeigten im Vergleich dazu keinerlei Wachstumsbeeinträchtigungen durch Kultur auf HG-EZM.

Methodisch stellten sich uns mit dem IncuCyte Schwierigkeiten, bei der Optimierung der zellspezifischen Analysemasken. Da wir einerseits mit maximaler Präzision die feinen Ausläufer der ASC und vor allem HRP erkennen und aufzeichnen wollten, andererseits aber möglichst wenig EZM oder HUVEC Detritus, die nach der Dezellularisierung auf der Matrix verblieben, fälschlicherweise miterfassen wollten, programmierten wir für HUVEC sowie ASC/HRP eine den jeweiligen Charakteristika und Eigenheiten spezifische Analysemaske. Außerdem führten wir unsere Versuche mit einer hohen Anzahl biologischer Replikate mit wiederum einer hohen Anzahl technischer Replikate (12-54 Einzelmessungen) durch, um somit eine möglichst hohe Validität der Endergebnisse zu erreichen. Des Weiteren verwendeten wir verschiedene ASC Pools aus je 4-5 unterschiedlichen Spendern und zwei unterschiedliche HRM-VPC-Isolate sowie die immortalisierte Bmi-HRP-Linie. Um eine möglichst hohe Ver-

suchseinheitlichkeit zu erlangen, kultivierten wir die ASC und Perizyten, parallel auf den gleichen Zellkulturplatten. Auch die vorangehenden EZM-Modifikationen (NG, HG, FKT) führten wir auf einer gemeinsamen Platte durch um maximal ähnliche Kultur- und Versuchsbedingungen zu erzielen. Da die Wahl des Zellkulturmediums entscheidend die Funktionsweise der Zellen beeinflussen kann (153), versuchten wir zunächst, alle Experimente in identischen Medien durchzuführen. HRMVPC zeigten jedoch in allen anderen Medien außer *Pericyte growth medium* (PGM) ein stark beeinträchtigt Wachstumsverhalten, weshalb sie für alle Versuche in PGM kultiviert werden mussten. Die weniger empfindlichen Bmi-Perizyten kultivierten wir in DMEM-FCS welches sich gegenüber DMEM-AB Medium, wie wir es für die ASC Kultur verwendeten, nur in der Herkunft des Serums (AB: Humanserum, FCS: Fetal Calf Serum) unterscheidet. AB-Serum wählten wir für die Kultur der ASC, um ein Präparat zu analysieren, dass für klinische Anwendungen geeignet ist (98, 154-156). Zwischen den primären HRMVPC und den immortalisierten Bmi-Perizyten gab es offensichtliche Unterschiede in der Passagierbarkeit. Während die HRMVPC in der Regel bereits nach 2-3 Passagen ein verlangsamtes Wachstum zeigten, war dies bei den Bmi-Perizyten, je nach Zellbatch, bis hin zu Passage 7-8 oft unbeeinträchtigt. Leider konnten wir keine genaue Aussage zu den vorangehenden Passagen der Bmi-HRP erhalten, es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Immortalisierung bereits einige Passagen in Anspruch genommen hat und die uns zu Verfügung gestellten Zellen schon einige Passagen hinter sich hatten. Auch die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenzfärbung und Ausdifferenzierung belegte Unterschiede zwischen HRMVPC und den Bmi-HRPs. Interessanterweise zeigten die Bmi-Perizyten dabei in der Regel eine stärkere Expression von perizytenspezifischen Markern in der durchflusszytometrischen Analyse, gleichzeitig erwies sich ihr Differenzierungspotential im Vergleich zu HRMVPC als reduziert. Beide HRP-Zelllinien unterscheiden sich deutlich von den ASC bezüglich ihrer idealen Zellaussaat-Dichte. Während ASC eine Standard-Aussaatdichte von 200 Zellen/cm² haben, liegt die der HRPs bei bis zu 40.000 Zellen/cm². Da der experimentelle Aufbau für unsere Versuche einheitliche Zellzahlen verlangte, entschieden wir uns dafür, 5000 Zellen (HRP/ASC) /cm² in je 0,5 ml Medium auf der EZM auszusähen. Um eventuelle Auswirkungen auf die Proliferation durch zu hohe (ASC) oder zu geringe (HRP) Zellaussaat-Dichten zu überprüfen, testeten wir die Proliferation von ASC und HRP in allen Konzentrationen (200-40.000

Zellen/cm²). Dabei konnten wir keine wesentlichen Auswirkungen der angepassten Aussaatdichte auf die Proliferationsrate entdecken. Damit kann man davon ausgehen, dass unsere Resultate als äußerst robust anzusehen sind und sich die Limitationen auf ein Minimum belaufen.

Ausgangs- und Kernpunkt unserer Versuche war die hyperglykämische Modifikation der EZM die von den HUVEC-Zellen sezerniert wurde. Auch wenn HUVEC in vivo den weitaus größten Anteil der EZM sezernieren, muss man dabei kritisch betrachten, dass es mittlerweile Anzeichen dafür gibt, dass der von den Perizyten selbst sezernierte Anteil an der EZM, einen entscheidenden Einfluss auf deren Zusammensetzung hat. Für die neuronale, und somit auch retinale EZM, konnten Shimizu und Kollegen nachweisen, dass die durch „Advanced glycation end products“ (AGEs) ausgelöste, gesteigerte Sekretion von Fibronectin und Kollagen IV mit konsekutiver Basalmembran-Verdickung, überwiegend von den neuronalen Perizyten und nicht etwa dem Endothel ausgeht (157). Für nachfolgende Studien könnten daher Ko-Kulturen aus HUVEC und HRP beziehungsweise ASC eine sinnvolle Ergänzung unserer Experimente darstellen. Des Weiteren sollten in folgenden Versuchen auch die möglichen Unterschiede von mikrovaskulärem Endothel im Vergleich zu den von uns verwendeten HUVECs berücksichtigt werden. Auch wenn in der großen Mehrheit der Experimente, die sich mit der Isolation oder Sekretion von EZM beschäftigt haben, HUVEC oder Endothelzellen anderer Säuger verwendet wurden, gibt es Anzeichen dafür, dass sich das mikrovaskuläre, im Besonderen, das retinale mikrovaskuläre Endothel in seinen Eigenschaften von diesen unterscheidet. Thorin postulierte in diesem Zusammenhang, dass sich Endothelzellen des Menschen je nach Ursprung ihres Gefäßbettes sowie des Gefäßdurchmesser in ihren Charakteristika (Phänotyp, Zellgröße, Oberflächenexpression, Sekretion) teils deutlich unterscheiden (158, 159). Aird et al. fügt diesen Aussagen die Bemerkung hinzu, dass es keine einzelne Erkrankung gibt, die alle Gefäße betrifft und weist damit auf die spezifischen Endothelzelltypen als Angriffspunkte je nach Krankheitsentität hin (160). Speziell für die DRP wurden diese Daten von Browning konkretisiert. Er konnte nachweisen, dass HUVEC ein deutlich abweichendes Oberflächenexpressionsprofil im Vergleich zu mikrovaskulärem Endothel aufweisen. Entsprechend ihrer Gewinnung aus Nabelschnüren wiesen sie eine erhöhte Expression von Genen auf, die an der embryologischen Entwicklung beteiligt sind. Im Vergleich dazu zeigte das mikrovaskuläre Endothel aus Primärzellen von Retina, Iris und Choroidea deutlich abweichende Expressionsprofile

mit vermehrter Expression von Genen der Signaltransduktion und Immunantwort (161). Gerade in Anbetracht dessen, dass der Immunantwort eine bedeutende Beteiligung an den pathologischen Prozessen im Zuge der DRP zugeschrieben wird, legen diese Versuche ein abweichendes Verhalten von mikrovaskulärem Endothel des Auges im Vergleich zu HUVECs nahe. Ähnliche Versuche zeigen sogar, dass die Genexpression von mikrovaskulären Endothelien desselben Spenders abhängig von den einzelnen Gefäßabschnitten des Auges (Retina und Iris) variiert (162, 163). Weitere Studien zeigten, dass es auch bei der Reaktion auf Hypoxie Unterschiede zwischen HUVEC und humanem mikrovaskulärem Endothel gibt. Während HUVEC mit einer signifikanten Hochregulation von VEGFR-1 reagierten, war dies bei mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC) nicht beziehungsweise nur deutlich schwächer der Fall (164). Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob eine von mikrovaskulärem Primärendothel sezernierte EZM vergleichbare Veränderungen auf hyperglykämische Bedingungen aufweisen würde, wie die von uns verwendeten HUVEC. Um dieser Variablen nachzukommen, müssten die Hyperglykämie bedingten EZM-Veränderungen einheitlich charakterisiert werden und anschließend vergleichende Versuche mit HUVEC und mikrovaskulären Endothelien der Retina durchgeführt werden.

Wir konzentrierten uns in dieser Arbeit auf die Modifikation der HUVEC-EZM durch die Variation verschiedener Mediumglukosespiegel (NG/HG/FKT). Nachfolgende Untersuchungen sollten zusätzlich verifizieren, ob die weiterführende Kultur der ASC/HRP in diesen Medien (NG/HG/FKT) additive Effekte zeigt. Zumindest bei den ASC würden wir basierend auf eigenen Erfahrungen und publizierten Daten (148) davon ausgehen, dass die HG-Bedingungen keinen nachteiligen Effekt auf die Integrität von ASC haben. Für die direkte Glukotoxizität auf Endothelzellen sprechen hingegen publizierte Daten (165). So beschrieben kooperierende Arbeitsgruppen negative Effekte von hoher Glukose auf das Wachstum von HUVEC. Daten meiner Kollegin Elvers-Hornung zeigten jedoch nur geringe Einbuße der Charakteristika von HUVECs nach Kultur in hoher Glukose. Daraufhin stellte sich uns die Frage, in weit die verschiedenen Zusätze von EGM-II, dem von uns verwendeten Standardmedium für Endothelzellkultur, protektiven Einfluss auf die Zellen ausübt. Wir konnten feststellen, dass vor allem Zytokine in dem von uns verwendeten HUVEC-Medium einen protektiven Effekt ausmachen, der ebenfalls bereits durch Publikationen belegt ist (141). Da die Firma die genaue Zusammensetzung von EGM-II und seinen Zusätzen

nicht preisgibt, entschieden wir uns dazu, EGM-II zu „verdünnen“ um so die Potenz seiner Zusätze zu reduzieren. Um ein wachstumsfaktor-reduziertes Medium zu generieren, mischten wir deshalb einen Teil EGM-II und drei Teile EBM (EBM ist das Basalmedium für Endothelzellen ohne Zusätze von wachstumsfördernden Faktoren und Zytokinen). Wir konnten feststellen, dass es durch die Verwendung des somit gewonnenen $\frac{1}{4}$ Medium zu einem deutlich verlangsamten Wachstum der HUVEC kommt, und im Vergleich zu EGM-II ein hoher Glukose bedingter Wachstumsunterschied sichtbar wird (4.1.6). Nach kompensatorischer Anpassung der Zellzahl zeigte sich erneut eine Wachstumsminderung unter HG-Bedingungen, wobei diese im Vergleich zu den vorangehenden Versuchen geringer war. Damit können wir keine abschließende Aussage zur möglichen protektiven Auswirkungen von EGM-II Zusätzen in Bezug auf die hyperglykämischen Effekte der Zellproliferation und damit auch der EZM-Modifikation treffen. Dass die diversen Supplemente je nach Konzentration jedoch einen Einfluss auf die Wachstumseigenschaften der Zellen haben, ist unserer Ansicht nach sehr wahrscheinlich.

Das enorme Interesse an einem zell-therapeutischen Ersatz für Perizyten steht außer Frage. Die Ursache, dass dafür zunehmend „adipose-derived stem/stroma cells“ (ASC), wie auch wir sie verwendet haben, in Betracht gezogen werden hat mehrere Gründe. Zum einen ist durch die relativ minimalinvasive Gewinnung aus Resektat oder Aspirat eine nahezu unerschöpfliche Quelle für ASC garantiert (166). Des Weiteren zeigten speziell ASC, in Ko-Kultur mit Endothelzellen, positive Einflüsse auf die Angiogenese, verbesserten ischämische Bedingungen durch Förderung der Reperfusion, schützten vor Myokardinfarkten und wirkten sich neuroprotektiv aus (96, 117, 127, 167). Hinzu kommt, dass im Zuge der zunehmenden Charakterisierung von ASC und Perizyten entscheidende Übereinstimmungen zwischen den beiden Zellpopulationen sowohl in morphologischer wie auch funktioneller Hinsicht nachgewiesen wurden. Es zeigte sich, dass ASC in Ko-Kultur mit Endothelzellen, ebenso wie Perizyten, die Bildung und Stabilisierung vaskulärer Netzwerke fördern (168). Diese Erkenntnisse in vitro, führten zu einem experimentellen Einsatz von ASCs in vivo, speziell mit dem Ziel, diabetische Komplikationen zu reduzieren. In Tierversuchen ließ sich dabei zeigen, dass ASC nach ihrer intravitrealen Injektion zu den retinalen Mikrogefäßen migrieren und sich in deren System integrieren. Beeindruckend ist, dass sich die ASC dabei in Morphologie und Oberflächenexpression den Perizyten anpassen, gleichzeitig aber, die ihnen eigenen, protektiven und anti-

inflammatorischen Funktionen sowie eine robuste Physis beibehalten (128). Eine Erklärung dafür konnten Hajmoussa und Kollegen liefern, die zeigten, dass hohe Glukosespiegel bei Perizyten zu einer intrazellulären Erhöhung von sogenannten „reactive oxygen species“ (ROS) sowie mitochondrialer Dysfunktion führen, was deren Apoptoserate deutlich erhöhte. Zwar ließen sich diese Prozesse auch in ASC nachweisen, im Vergleich zu Perizyten war deren Proliferationsfähigkeit dadurch aber nicht eingeschränkt und auch die Fähigkeit „Perizyten-ähnliche“ Funktionen, wie die Ausbildung von vaskulären Netzwerken, zu übernehmen beziehungsweise zu fördern, blieb weiterhin erhalten (148). Wie es scheint, basiert diese erhöhte Resistenz gegenüber hoher Glukose darauf, dass ASC bei einer hohen extrazellulären Glukosebelastung ihre Glukose- und Sauerstoffaufnahme und damit ihre Glykolyserate reduzieren können. Hinzu kommt eine generell erhöhte Resistenz gegen äußere Umwelteinflüsse. Zusammengefasst machen diese Ergebnisse den Einsatz von ASC gegen einen Perizytenuntergang im Zuge der DRP hochrelevant.

Bezüglich der Proliferationskapazität auf hyperglykämisch modifizierter HUVEC-EZM belegen unsere Experimente einen deutlichen Unterschied zwischen ASC und HRP (sowohl HRMVPC als auch Bmi HRP). Unsere Arbeiten lassen dabei noch die Frage offen, welche Modifikationen der EZM den hemmenden Einfluss auf das Wachstum der HRP ausüben, von denen die ASC nicht tangiert werden.

5.2 Veränderungen der EZM durch Hyperglykämie und mögliche Folgen auf die Proliferation von ASC und HRP

Wie schon beschrieben, sind der Funktionsverlust von Perizyten sowie die Verdickung der Basalmembran die erste Anzeichen der DRP (26, 169). Die Verdickung der Basalmembran beruht dabei einerseits auf einem verminderten Abbau von EZM-Komponenten durch deregulierte Matrix-Metalloproteinasen (170, 171) und zum anderen auf einer überschießenden Expression der EZM-Moleküle Laminin, Kollagen und Fibronectin (15, 49, 51). Deshalb wollten wir als erstes überprüfen, ob es auch in unseren Experimenten zu beschriebenen Veränderungen der EZM-Komponenten kommt. Dafür haben wir die EZM-Proteine in unseren Matrices mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und ELISAs nachgewiesen. Unsere Ergebnisse zeigten dabei keine exzessive Akkumulation von EZM-Proteinen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Veränderungen einer chronischen Glukosebelastung bedürfen und sich demnach in unserem Versuchszeitraum von 3-5Tagen unter HG-Belastung noch nicht

wiederspiegeln. Des Weiteren müssen wir davon ausgehen, dass unser Dezellularisierungs-Reagenz, Ammoniumsolution (AS) neben den Zellen auch Teile der EZM ablöst. Dazu passt, dass der *in vivo* Nachweis von EZM-Verdickungen mit immunhistochemischen Methoden oder durch elektronenmikroskopische Untersuchungen erbracht wurde. Der *in vitro* Nachweis mit Western-Blot Verfahren, mRNA-Analysen oder Elektronenmikroskopie. Jedoch kam bei keiner der Publikationen, vor dem Proteinnachweis, ein Dezellularisierungsverfahren, wie wir es anwendeten, zum Einsatz (52, 172, 173).

Da wir, bei den HRP, trotzdem eine signifikante Wachstumsreduktion feststellen konnten, fragten wir uns, welche anderen qualitativen Veränderungen der EZM ursächlich für die negativen Effekte sein könnten. Neben veränderten Proteinkonzentrationen innerhalb der EZM rückten dabei zunehmend direkte, durch erhöhte Glukosespiegel ausgelöste Modifikationen der EZM-Moleküle in den Fokus unserer Überlegungen. Mittlerweile gehen wir davon aus, dass wahrscheinlich die Glykation von Proteinen und Lipiden durch sogenannte AGEs die größte Auswirkung auf unsere Ergebnisse hat. AGEs entstehen durch die Glykoxidation von intra- und extrazellulären Proteinen oder Fetten mit reaktiven Zuckermolekülen. Dabei kommt es zu einer nicht-enzymatischen Kondensation eines Zucker-Aldehyds oder Ketons mit einer freien Aminogruppe die sich zu einer, noch reversiblen, Schiff-Base vereinigen (174). Durch Umgruppierung, Anlagerung und Quervernetzung entstehen daraus die stabilen Amadori-Produkte, welche nach Übergang in ihre irreversible Form als AGEs bezeichnet werden. Das Vorkommen von AGEs ist proportional zur der Höhe der Blutglukosespiegel und schon lange mit Diabetes und seinen Komplikationen assoziiert (50, 175). Bei Diabetikern sind die Konzentrationen von AGEs um das 2-6-fache erhöht mit der Folge, dass zunehmend Proteine denaturieren und/oder strukturelle Veränderungen durchlaufen (176, 177). In diesem Zusammenhang konnte man zeigen, dass Kollagen I eine höhere Quervernetzung eingeht, was die Elastizität der EZM reduziert. Laminin und Kollagen Typ IV dagegen weisen reduzierte Bindungsaffinitäten durch die Akkumulation von AGEs auf, was wiederum deren Ausbildung von Netzwerken und die Gewährleistung der funktionellen Integrität der EZM massiv beeinflusst (152). Gleichzeitig konnte man durch Inhibition von AGEs, zum Beispiel mittels Aminoguanidin, der Entstehung von diabetischen Komplikationen wie der Ausbildung von Mikroaneurysmen und dem Untergang von Perizyten signifikant entgegenwirken (178). Zusätzlich konnte man zeigen, dass die Akkumulation von AGEs

durch Diabetes, eine verstärkte Expression von deren Rezeptor (R-AGE) auf Endothel und glatten Muskelzellen induziert (179, 180). Durch die Bindung von AGEs an diesen Rezeptor, kommt es zu zahlreichen intrazellulären Signalkaskaden die unter anderem zur Freisetzung pro-inflammatorischer Moleküle und freien Sauerstoffradikalen (ROS) führen (174, 181, 182). Wir stellten uns die Frage, ob diese Effekte bereits nach 4-5 tägiger Kultur wie in unseren Experimenten, zum Tragen kommen würden. Laut Daten von Kalfa und Kollegen ist dies eindeutig der Fall. Sie wiesen nach, dass bereits nach 3 Tagen durch nichtenzymatische Glykosylierung zumindest Amadori-ähnliche Proteinveränderungen an hyperglykämisch modifizierter EZM nachzuweisen sind (183). Gleichzeitig belegen Versuche bei denen bovine retinale Perizyten auf, mit AGEs-modifiziertem, Fibronectin kultiviert wurden eine signifikante Wachstumsbeeinträchtigung der Zellen (184). Diese Daten stützen unsere Ergebnisse, die signifikante HG-Effekte für humane retinale Perizyten nach bereits 7-20 Stunden belegen. Interessant ist dabei, dass sich diese Effekte nicht bei den ASC zeigten. Erste Studien die die Auswirkungen von AGEs auf ASC untersuchen, zeigen zwar, dass auch ASC gegenüber erhöhten AGE Spiegel mit einer vermehrten Apoptose sowie einer Reduktion ihrer Proliferation und ihres angiogenen Potentials reagieren (185, 186). Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass sie weniger sensibel als HRP reagieren. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch Versuche, bei denen mit AGEs modifiziertes Albumin in Ratten injiziert wurde und man feststellte, dass es sich speziell in den Mikrogefäßen der Retina und dort vor allem in Perizyten und glatten Muskelzellen ablagerte (187). Weiterführende Versuche sollten sich daher auf den Vergleich von ASC und HRP bezüglich ihrer Sensibilität und pathologischen Reaktionen auf AGEs konzentrieren. Da sich die bereits bekannten EZM-Veränderungen die durch AGEs ausgelöst werden sowohl auf die Proliferation der Zellen, als auch die Adhäsion auswirken, ist es an dieser Stelle schwierig ihre Auswirkungen auf Proliferation und Adhäsion getrennt zu betrachten. Wahrscheinlich ist, dass beide Prozesse durch AGEs beziehungsweise ihre Folgen beeinträchtigt werden. Noch detailliertere Analysen müssen Folgen um die Auswirkungen auf Proliferation und Adhäsion noch genauer zu verifizieren. Unsere Ergebnisse legen in jedem Fall bezüglich beider Prozesse eine deutlich robustere Konstitution von ASC im Vergleich zu HRP dar.

5.3 Vergleichbarkeit ASC und Perizyten

Die Idee, MSC/ASC gegen das Absterben von Perizyten einzusetzen, entwickelte sich aus der wachsenden Erkenntnis, dass es zwischen den beiden Zellpopulationen in wesentlichen Punkten wie Funktion, Morphologie Oberflächenexpression sowie Differenzierungskapazität zahlreiche Übereinstimmungen gibt. Deswegen lag unser Interesse auch darin, ASC und HRP hinsichtlich ihrer Funktionen und Charakteristika zu vergleichen. Dazu führten wir FACS-Analysen, Differenzierungsassays und Immunfluoreszenzverfahren durch und verglichen die verschiedenen Zelllinien miteinander. Des Weiteren untersuchten wir, im Hinblick auf weiterführende Projekte, Veränderungen der Expressionsprofile von ASC durch ihre Kultur auf EZM.

Die hohe Heterogenität von MSC und Perizyten innerhalb ihrer eigenen Zellpopulationen macht deren Charakterisierung schwierig (siehe 2.3.3 und 2.4.3.). So mahnt Horwitz im Namen der „International Society of Cellular Therapy“, dass mit dem Akronym MSC sowohl mesenchymale Stammzellen als auch mesenchymal-stromale Zellen bezeichnet werden, deren Funktionen und Charakteristika jedoch entscheidende Unterschiede aufweisen und deshalb differenziert voneinander betrachtet werden müssen (82). Gleichzeitig kommt vor allem für die Perizyten hinzu, dass neben einem sehr variablen Markerprofil auch ihre Isolation bis heute nach keinem einheitlichen Verfahren erfolgt, was eine weitere unsichere Variable in ihrer einheitlichen Charakterisierung darstellt. Es gibt zahlreiche Publikationen zur Charakterisierung von MSC und Perizyten und eine lebhaft diskutierte Verwandtschaftliches Verhältnis (55, 80, 188). Deshalb verwundert es nicht, dass sich ein Vergleich von MSC und Perizyten in unserem Fall mit limitierter Anzahl an Untersuchungsproben als kompliziert gestaltete (61, 80). Hinzu kommt, dass MSC/ASC und Perizyten, je nach Gewinnungsprozess und Analyseverfahren (FACS, Immunfluoreszenz, Differenzierungsassays) sowie Passage, Ursprungsgewebe (Fett, Knochenmark, Plazenta, Retina) und Herkunftsorganismus (human, bovine, mouse) enorme Unterschiede bezüglich ihrer Charakteristika aufweisen. So konnten die Gruppe um E. Beltramo zum Beispiel nachweisen, dass bovine retinale Perizyten (BRP) schneller mit gesteigerten Apoptoseraten auf hohe Glukosekonzentrationen reagieren als humane retinale Perizyten (HRP). Umgekehrt regenerierten sich die BRP in normalen Glukosemilieus deutlich schneller im Vergleich zu HRP (189). Die Unterschiede innerhalb einer Zellgattung übersteigen dabei oftmals jene zwischen Perizyten und MSC/ASC an sich. Dies hat sich vielfach in unseren Ergebnissen widerspiegelt. So konnten wir

bei der osteogenen Differenzierung feststellen, dass HRMVPC ein deutlich höheres Potential für diese aufweisen als ASC, bei der adipogenen Differenzierung hingegen hatten ASC das klar höhere Potential. Auch wenn die Ergebnisse unserer Immunfluoreszenzfärbungen kritisch bewertet werden müssen, da die Färbungen nur schwach erfolgt sind, deuten auch sie darauf hin, dass HRMVPC, plazentäre Perizyten sowie ASC eine leichte RGS5-Expression aufweisen, während dies bei den Bmi-Perizyten nicht der Fall ist. Ähnliche Feststellungen ließen sich auch bei der Durchflusszytometrie machen. Dabei konnten wir zeigen, dass die Stärke der Marker-Expression zum Beispiel bei NG2, CD146 und CD73 genauso oder sogar mehr vom einzelnen Zellbatch (HRMVPC 1,2 /Bmi-PZ 1,2) abhängt als von der Zugehörigkeit ASC-Pool 1502,1502,1602 zu einer Population an sich. So schwierig diese Ergebnisse für eine klare Definition und Einteilung der Zellpopulationen sind, so sehr zeigen sie gleichzeitig wie groß die morphologischen sowie genetischen Übereinstimmungen zwischen Perizyten und ASC sind (190). Dabei muss immer berücksichtigt werden, dass wir aus humanem Fett gewonnene MSC mit Perizyten aus humanen Retinae verglichen. Sowohl was die Spezialisierung als auch die Funktion der beiden Linien angeht, besteht ein großer Unterschied hinsichtlich der Anforderungen an die Zellen. In Vorversuchen, in denen wir Perizyten ebenfalls aus Fettgewebe isolierten, zeigten sich morphologisch und funktionell noch deutlich größere Gemeinsamkeiten zu den ASC. Die Versuche mit Plazenta-Perizyten, zeigen ebenfalls eine höhere Korrelation zu ASC. Demnach sind ASC und Perizyten aus der gleichen Gewebsquelle vermutlich ähnlicher als Perizyten aus unterschiedlichen Geweben. Eng mit der Charakterisierung verbunden ist auch die umstrittene Frage wo sich die Nische von MSC und Perizyten im Organismus befindet. Es verwundert nicht, dass auch in dieser Hinsicht sowohl für Perizyten, als auch MSC/ASC immer wieder der perivaskuläre Bereich diskutiert wird. Nachdem man lange Zeit davon ausging, dass Perizyten ausschließlich aus mesenchymalen Vorläufern hervorgehen (191, 192) konnte man mittlerweile zumindest für Perizyten des Gehirns einen mesodermalen sowie neuroektodermalen Ursprung belegen (11). Gleichzeitig deuten weitere Quellen darauf hin, dass gerade im erwachsenen Organismus anscheinend auch das Knochenmark einen Pool für Perizyten-Vorläufer darstellt die, gegebenenfalls auch verletzungsabhängig, in die Blutbahn abgegeben werden und dort zirkulieren (76). Aufgrund dieser Kontroverse ist ein wissenschaftlicher Diskurs darüber ausgebrochen in wie weit Perizyten ins Gewebe migrierte MSC darstellen oder MSC gelöste, ins Blutsystem ausgewanderte

Perizyten (61, 188, 193). So behauptet eine Gruppe um Crisan und Kabara, in Perizyten eine heterogene Gruppe mesenchymaler und neuronaler Vorläufer der MSC entdeckt und damit auch das Rätsel um deren *in vivo* Nische geklärt zu haben (61, 194). Auch Pèault beschrieb die Perizyten als heterogenen Pool perivaskulärer Zellen aus denen anscheinend die MSC hervorgehen (195). Caplan diskutierte diesen Standpunkt in dem viel zitierten Review „All MSC are Pericytes!“ mit dem Ergebnis das MSC wohl eine Subpopulation von Perizyten darstellen (80). Dem widersprechen Blocki und Kollegen die den Standpunkt einnehmen, dass Perizyten eine Subpopulation von MSC bilden. Dabei berufen sie sich auf Versuche, in denen erlesene MSC perizytäre Funktionen wie die Unterstützung endothelialer Netzwerke übernehmen konnten, während dies anderen MSC nicht möglich war (188). Ebenfalls zeigten sie, dass die von Crisan etablierte, bis dato häufig zur Gewinnung von Perizyten genutzte Charakterisierung über die Expression von CD164+/CD34- keinen signifikanten Einfluss auf die tatsächliche perizytäre Funktion der Zellen hatte (61). Mit dem Fokus auf ASC publizierte Traktuev et al. eine ebenso spannende wie differenzierte Arbeit. Er konnte mittels Immunfluoreszenz nachweisen, dass CD 34+ Zellen in Fettgewebe eine perizytäre Lokalisation einnehmen. Gleichzeitig zeigten Versuche mit dieser aus Fettgewebe isolierten CD 34+ /CD 31-/CD 144- Population von ASCs, dass diese zu über 90% sowohl mesenchymale, perizytäre und smooth muscle Marker exprimierten und bei Ko-Kultur mit mikrovaskulären Endothelzellen die „tube formation“ förderten und abluminale Positionen einnahmen. Vor dem Hintergrund unserer FACS-Ergebnisse müssen auch wir feststellen, dass die Oberflächen-Charakterisierung sowohl für ASC/MSK als auch Perizyten wenn überhaupt nur als orientierend angesehen werden kann. So waren CD73 und CD105 als etablierte MSC-Marker auf Perizyten fast gleichermaßen exprimiert wie auf ASC. Umgekehrt verhielt es sich mit den „Perizyten-Markern“ CD 140 α und CD146, die zwar eine gewisse Tendenz zu Perizyten zeigten, jedoch auch deutlich von ASC exprimiert wurden. CD140 β dagegen, der auch als Perizytenmarker geführt wird, war in unseren Ergebnissen am stärksten auf einem ASC-Pool exprimiert. Der einzige eindeutig den Perizyten zuzuordnende Marker, den ASC kaum exprimierten, war in unseren Versuchen NG2.

Unabhängig von der bis heute nicht abschließend geklärten Frage, in welchem genauen Verhältnis Perizyten und MSC/ASC zueinander stehen, lässt sich festhalten, dass sie zahlreiche grundlegende Gemeinsamkeiten aufweisen. Aufgrund dessen

wurde in letzter Zeit zunehmend versucht MSC/ASC in Tierversuchen als therapeutische Option gegen mikrovaskuläre Komplikationen mit einem beteiligten Perizytenuntergang einzusetzen. Mendel konnte dabei zeigen, dass ASC nach Injektion ins Auge in das Gefäßsystem der Retina migrieren und sich dort in vaskuläre Strukturen integrieren. Dabei nahmen sie Perizyten-spezifische abluminale Positionen ein und umschlossen ebenso wie Perizyten die Kapillargefäße. Das Resultat war ein positiver Einfluss auf die Entzündungsaktivität, eine Reduktion der unkontrollierten Neovaskularisation sowie ein verminderter Untergang von Kapillaren (128). Im Verlauf dieser Arbeit sind mit steigender Tendenz weitere Publikationen erschienen die den ASC, speziell bei der Behandlung der DRP vielversprechende Kapazitäten zusprechen (126, 128, 130, 166). Um ihren Einsatz so effizient wie möglich zu gestalten gilt es in der Zukunft sowohl die einzelnen Pathomechanismen der DRP genauer zu entschlüsseln, als auch die ihnen entgegenwirkenden, protektiven Möglichkeiten der ASC besser zu verstehen.

5.4 Ausblick

Wir konnten in dieser Arbeit die Hypothese bestätigen, dass humane retinale Perizyten ein signifikant reduziertes Wachstum bei Kultur auf hyperglykämisch modifizierter EZM aufweisen. Gleichzeitig blieben ASC von diesen Effekten weitgehend unbeeinflusst. Damit empfiehlt sich ihr Einsatz gegen Erkrankungen, die mit einem Perizytenuntergang einhergehen. Die Tatsache, dass sich diabetische Komplikationen, als erstes in Form von Retina-, Nieren- und Nervenschäden äußern, welche alle mikrovaskuläre, hochspezialisierte Gewebe darstellen, legt die Annahme nahe, dass Perizyten mit zunehmender Spezialisierung empfindlicher gegen äußere Umwelteinflüsse reagieren. Daher wäre es interessant, in zukünftigen Experimenten Perizyten und ASC aus den gleichen Geweben zu isolieren und sowohl ihre Charakteristika als auch ihre Reaktionen auf hyperglykämisch modifizierte EZM zu vergleichen. Dabei sollte der Fokus auf Fettgewebe, das als Quelle von ASC von besonderem Interesse ist, liegen. Voraussetzung dafür ist eine umfassendere, detailliertere Charakterisierung von Perizyten sowie die Etablierung einheitlicher Isolationsprotokolle, wie sie für MSC/ASC bereits bestehen. Zusätzlich sollte ihre Charakterisierung mit funktionellen und anatomischen Aspekten ergänzt werden. Vor dem Hintergrund der Experimente von E. Blocki sollte man jedoch auch die ASC und ihre bisherige Charakterisierung erneut kritisch betrachten. Wenn sich herausstellt, dass nur Teile innerhalb einer Po-

pulation das Potential haben, Perizyten-ähnliche Funktionen zu übernehmen, sollte auch bei den ASC über eine Ergänzung durch funktionelle Aspekte nachgedacht werden, speziell wenn sie zur therapeutischen Anwendung kommen sollen. Unsere Ergebnisse zeigten in allen Verfahren der Charakterisierung (Differenzierung, Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie) eindeutige Gemeinsamkeiten zwischen ASC und Perizyten. Gleichzeitig mussten auch wir Schwierigkeiten dabei feststellen, diese Charakteristika den einzelnen Zellpopulationen (ASC, Perizyten), Zelllinien (HRP, HRMVPC,) und Ursprungsorganen (Fett, Retina, Plazenta) eindeutig zuweisen.

Ausgehend von unserem Versuchsaufbau konzentrierte sich diese Arbeit darauf, Modifikationen der EZM und deren Auswirkungen auf ASC und HRP auszumachen. Die von uns festgestellte Proliferationsreduktion von HRP auf hyperglykämisch modifizierter EZM, führen wir am ehesten auf EZM-Veränderungen zurück, die durch AGEs ausgelöst wurden. Um diese Vermutung zu validieren, wäre es nötig, die Bildung von AGEs und deren Einfluss auf die EZM qualitativ und quantitativ nachzuweisen und deren Effekt auf Perizyten und ASC genauer zu untersuchen. Folgende Experimente könnten helfen, diesen ausstehenden Mechanismus nachzuweisen:

- Auswirkungen von AGE-modifiziertem Fibronectin im Vergleich zu unbehandeltem Fibronectin auf die Proliferation von ASC und Perizyten (196)
- Auswirkungen von AGEs auf die Adhäsion von ASC und Perizyten
- Veränderungen der Glykokalix durch hyperglykämische Modifikation und deren Auswirkungen auf die Proliferation von ASC und Perizyten (197, 198)
- Veränderung der Sekretion und Zusammensetzung von Heparansulfat-Proteoglykanen und deren Auswirkungen auf die Proliferation von ASC und Perizyten (199, 200)

Hinsichtlich des therapeutischen Einsatzes von MSC/ASC weiß man mittlerweile, dass die positiven Effekte auf die Angiogenese und Gefäßstabilität, neben ihrem Differenzierungspotential vor allem durch die Sekretion pro-angiogener Faktoren herbeigeführt werden (201). Dabei handelt es sich um die Faktoren VEGF, HGF, bFGF, ILGF-1, TGF- β , PDGF, Angiopoietin, Interleukin-6 und das monozytenchemotaktische Protein-1, die alle wachstumsfördernde Einflüsse auf Endothelzellen ausüben (202). Umgekehrt nimmt das Endothel, rückkoppelnd Einfluss auf MSC, indem es zum Beispiel über die Expression oder Inhibition von Notch-Molekülen deren

Genregulation beeinflusst. Diese positiven Effekte sind mittlerweile in zahlreichen Studien an Tier und Mensch getestet und bestätigt worden (203).

Einige Studien weisen jedoch auch darauf hin, dass MSC nicht immer nur pro-angiogene Effekte haben. So zeigten Experimente, dass MSC Tumore durch eine Reduktion der Angiogenese verkleinern konnten (204). Ähnliche Versuche mit Ratten ergaben, dass es einen Zusammenhang zwischen der MSC-Konzentration und ihren demnach sowohl pro- als auch anti-angiogenen Effekte gibt (205). Andere Versuche, die die Regeneration von verletzten Corneae untersuchten, zeigten, dass MSC zu einer Reduktion der Inflammation, aber auch der Angiogenese, beitragen (206). Was bezüglich der Tumortherapie noch eine therapeutisch erwünschte Eigenschaft wäre, ist bezüglich der Cornearegeneration nachteilig. Zunehmend belegen die Daten, dass MSC extrem plastisch sind und sich an das vorherrschende Milieu anpassen können und derart adaptiert, regelnd eingreifen. Die Hoffnung besteht, muss jedoch noch experimentell belegt werden, dass MSC bei der Therapie der DRP, in frühen Stadien, dem Zellverlust entgegen wirken und in späten Stadien die überschießende Endothelproliferation drosseln.

Einen weiteren hochinteressanten Aspekt zeigten unsere letzten Versuche, die darauf hinweisen, dass ASC wenn sie auf EZM kultiviert werden, unabhängig von deren Modifikation, in Richtung Perizyten-ähnlicher Expressionsprofile differenzieren. Ähnliche Beobachtungen postulierte Loibl et al. nachdem er bei BM-MSCs in Co-Kultur mit endothelialen Vorläuferzellen eine gesteigerte Expression der Perizytenmarker bei den MSCs beobachtet hatte (130). In Anbetracht der Ambivalenz, die die Durchflusszytometrie in unseren Versuchen zeigte, wäre es von großem Interesse zu untersuchen, ob sich diese Veränderungen auch in anderen, valideren Aspekten wie der Funktion oder Perizyten-spezifischen Marker Proteinen in der Immunfluoreszenz widerspiegeln. Wenn dem so ist würde dies die Bedeutung der EZM in ein neues Licht rücken und die spannende Frage aufwerfen, durch welche Mechanismen die EZM von Endothelzellen in MSC/ASC perizytäres Potential initiieren kann. Wenn sich im Zuge dieser Experimente tatsächlich nachweisen ließe, dass ASC/MSCs und Perizyten das Potential haben, zumindest teilweise, ineinander überzugehen sollte man anstatt der umstrittenen Frage, ob Perizyten und ASC/MSCs in einem verwandtschaftlichen Verhältnis zueinander stehen, besser die Frage stellen, auf welche Art und Weise sie dies tun.

6 TABELLARISCHER ANHANG

Veröffentlichungen

Abstracts

- **49 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI) & Deutsche Gesellschaft für Immungenetik e. V. (DGI)**

Titel: Human Adipose Stromal Cells in contrast to human retinal pericytes resist the detrimental effects of hyperglycaemic modified extracellular matrix

Autoren: Kremer H., Elvers-Hornung S., Klüter H., Hammes H.-P., Bieback K.

September 2016: Nürnberg (siehe Anhang)

- **4 Jahrestagung des GermanStemCellNetwork (GSCN)**

Titel: Human Adipose Stromal Cells resist the detrimental effects of hyperglycaemic modified extracellular matrix in contrast to human retinal pericytes

Autoren: Kremer H, Elvers-Hornung S, Beltramo E, Steeb L, Hammes HP, Bieback K

September 2016: Hannover

- **25 Jahrestagung der International Society for Cellular Therapy (ISCT)**

Titel: Human Adipose Stromal Cells resist the detrimental effects of hyperglycaemic modified extracellular matrix in contrast to human retinal pericytes

Autoren: Heiner Kremer, Susanne Elvers-Hornung, Agnese Fiori, Elena Beltramo, Marco Harmsen, Hans-Peter Hammes, Karen Bieback

Mai 2017: London

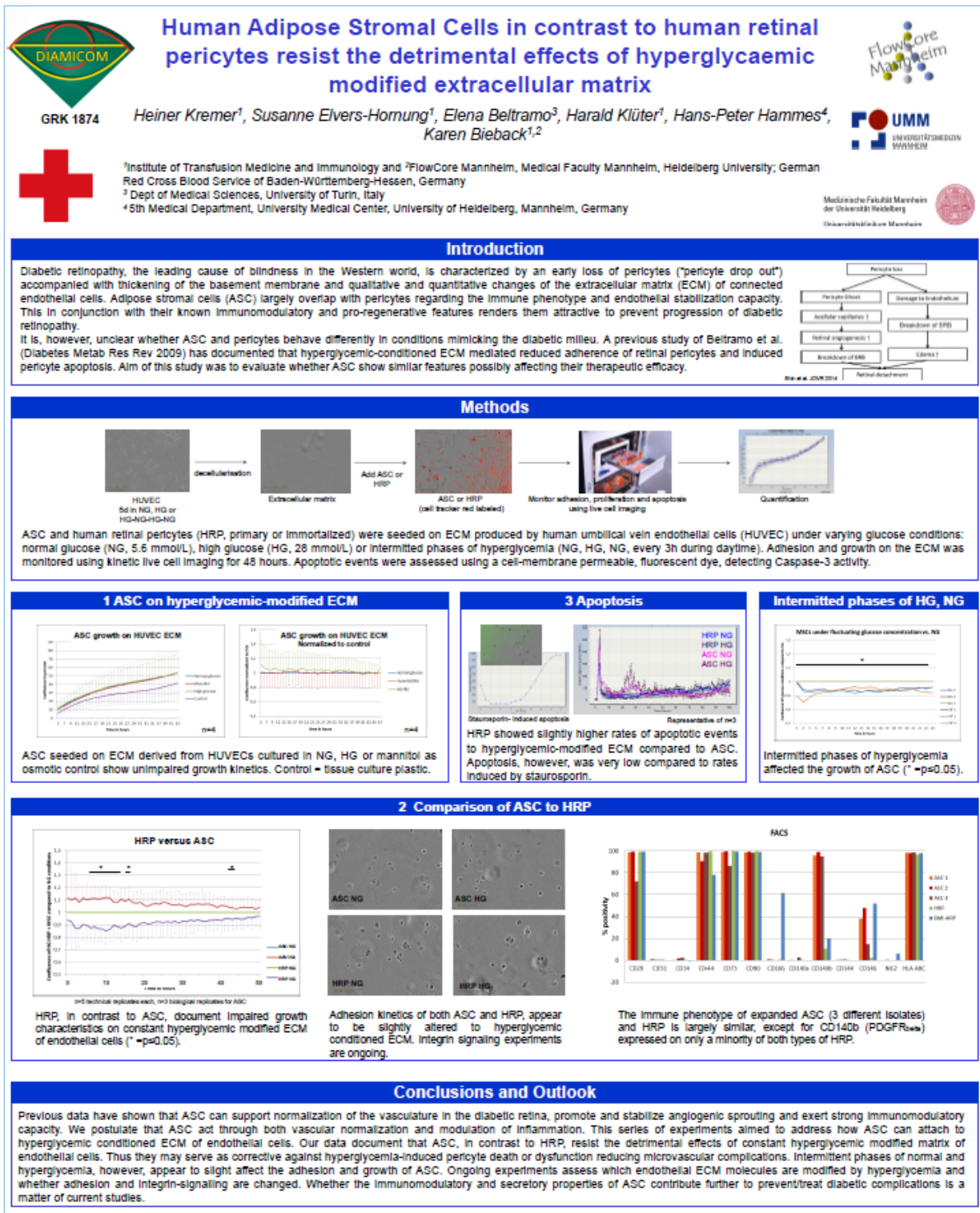


Abbildung 78: Poster Präsentation: 49 Jahrestagung der DGTI, Nürnberg im September 2016

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Kremer, Hans-Heiner
Geburtsdatum: 26/03/1987
Geburtsort: Mainz
Familienstand: Ledig
Vater: Kremer, Friedrich
Mutter: Abel-Kremer, Sybille

SCHULISCHER WERDEGANG

Evangelisches Schulzentrum Leipzig 1997-2005
Abitur 02.06.2005

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

01.10.2009 Beginn des Studiums der Humanmedizin
An der Universität Heidelberg, Fakultät Mannheim
14.03.2012 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M1)
13.10.2016 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M2)

8 DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich Frau Professor Dr. rer. nat. Karen Bieback danken. Zum einen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, zum anderen für die herzliche und freundschaftliche Aufnahme in ihre großartige Arbeitsgruppe. Mit einem Vorschuss an Vertrauen und der Bereitstellung aller personellen und materiellen Mittel hat sie mir die denkbar besten Voraussetzungen für selbstständiges, wissenschaftliches Arbeiten geboten. Ihre Tür stand dabei für Rat und tatkräftige Unterstützung jederzeit offen. Des Weiteren will ich, neben der ganzen Arbeitsgruppe, speziell Susanne Elvers-Hornung und Stefanie Uhlig für deren Mithilfe und schier grenzenlose Geduld danken. Ohne die, teils aufopferungsvolle, Unterstützung von euch beiden wäre die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen!

Dass ich überhaupt die Chance hatte dieses Studium zu bestreiten und diese Arbeit mit voller Konzentration zu Ende zu bringen verdanke ich meinen Eltern. Es war die Sicherheit eines zu Hause, die es mir ermöglicht hat meine eigenen Wege frei zu bestreiten. Meiner Mutter danke ich dabei im Besonderen für den Zusammenhalt der Familie, die aufmerksame, teils auch kritische Begleitung in den wilden Jahren und die unzähligen Care-Pakete. Meinem Vater kann ich kaum genug danken; Für sein unerschütterliches Vertrauen zu allen Zeiten; Seinen nicht zu irritierenden Optimismus und den Satz: „*Wo ein Wille ist, war schon immer ein Weg*“. Auch meinem Bruder Malte danke ich sehr für seine fachliche, professionelle Hilfe während dieser Arbeit. Vor allem aber für unsere Freundschaft und die, immer garantierte, brüderliche Loyalität.

Da mit dieser Arbeit auch die Zeit in Mannheim ihrem Ende zugeht, möchte ich mich an dieser Stelle auch bei all meinen Kommilitonen bedanken die mich durch die letzten Jahre begleitet haben. Dank ihnen waren selbst die endlosen Tage in der Bibliothek, zumindest teilweise... eine wahre Freude. Ihr werdet als das Wichtigste von dieser Zeit in Erinnerung bleiben und ich bin froh und dankbar für die Freundschaften die ich aus Mannheim mitnehme. Im Besonderen danke ich dabei Tillmann Rusch; Für die herrlichen, ausgelassenen Momente, ebenso wie die stillen gemeinsamen Stunden; Für eine besondere Freundschaft.

Da sich mit dem Studium auch die Lehrjahre insgesamt ihrem Ende zuneigen, möchte ich mich an dieser Stelle auch bei zwei Menschen bedanken die mich bereits zu Schulzeiten geprägt haben. Meinem Biologielehrer Sven Brumme danke ich für die Erkenntnis, dass ein strenger Lehrer nicht automatisch ein schlechter Lehrer ist, sich lernen manchmal sogar lohnt und Disziplin und Geselligkeit keinen Widerspruch darstellen müssen. Im Besonderen möchte ich mich bei Katrin Fischer bedanken, die während der Entstehung dieser Arbeit viel zu früh gestorben ist. Sie hat uns mit ihrer Theatergruppe ein Paralleluniversum innerhalb der Schule geschaffen in dem wir uns frei entfalten konnten und Wunder geschehen durften. Diesem Kreise habe ich meine guten Freunde Fabian Jung und Jonas Petzold zu verdanken. Obwohl sich unsere Lebenswege in den letzten Jahren in verschiedene Richtungen entwickelt haben, seid ihr mir nach wie vor wichtige Bezugspunkte und treue Begleiter.

Schließen möchte ich diese Arbeit mit einem Zitat aus Lessings „Nathan der Weise“ das mich während dieser Arbeit immer wieder begleitet und nicht selten persönlich ereilt hat: *„Der Forscher fand nicht selten mehr, als er zu finden wünschte“*. Bei der Lösung des Rätsels in welchem Verhältnis Perizyten und mesenchymal-stromale Zellen zueinander stehen, ebenso wie dem langen Weg bis zum klinischen Einsatz von Stammzellen gegen die diabetische Retinopathie, werden nun andere mit dieser Tatsache zu ringen haben. Ich werde ihre Erkenntnisse hochgespannt verfolgen.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):137-49.
2. Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, O'Brien T. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Frontiers in endocrinology.* 2014;5:86.
3. Krolewski AS, Warram JH, Freire MB. Epidemiology of late diabetic complications. A basis for the development and evaluation of preventive programs. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996;25(2):217-42.
4. Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2015.
5. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(13):1227-39.
6. Zheng Y, He M, Congdon N. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol.* 2012;60(5):428-31.
7. Wohlfart P, Lin J, Dietrich N, Kannt A, Elvert R, Herling AW, et al. Expression patterning reveals retinal inflammation as a minor factor in experimental retinopathy of ZDF rats. *Acta Diabetol.* 2014;51(4):553-8.
8. Heintz E, Wirehn AB, Peebo BB, Rosenqvist U, Levin LA. Prevalence and healthcare costs of diabetic retinopathy: a population-based register study in Sweden. *Diabetologia.* 2010;53(10):2147-54.
9. Scholl S, Augustin A, Loewenstein A, Rizzo S, Kupperman B. General pathophysiology of macular edema. *Eur J Ophthalmol.* 2011;21 Suppl 6:S10-9.
10. Hammes HP. [Diabetic retinopathy and maculopathy]. *Internist (Berl).* 2011;52(5):518-32.
11. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci.* 2011;14(11):1398-405.
12. Abcouwer SF, Gardner TW. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2014;1311:174-90.

13. Jousseaume AM, Fauser S, Krohne TU, Lemmen KD, Lang GE, Kirchhof B. [Diabetic retinopathy. Pathophysiology and therapy of hypoxia-induced inflammation]. *Ophthalmologe*. 2003;100(5):363-70.
14. Hammes HP. Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J Diabetes Complications*. 2003;17(2 Suppl):16-9.
15. Roy S, Bae E, Amin S, Kim D. Extracellular matrix, gap junctions, and retinal vascular homeostasis in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2015;133:58-68.
16. Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(5):348-68.
17. Miller CG, Budoff G, Prenner JL, Schwarzbauer JE. Fibronectin in retinal disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016.
18. Ashton N. Vascular changes in diabetes with particular reference to the retinal vessels; preliminary report. *Br J Ophthalmol*. 1949;33(7):407-20.
19. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1961;66:366-78.
20. Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes*. 2002;51(7):2241-8.
21. Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(7):735-55.
22. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(5):701-6.
23. Hill J, Rom S, Ramirez SH, Persidsky Y. Emerging roles of pericytes in the regulation of the neurovascular unit in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014;9(5):591-605.
24. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277(5323):242-5.
25. Geraldès P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nature medicine*. 2009;15(11):1298-306.
26. Hammes HP, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2002;51(10):3107-12.
27. Garner A. Histopathology of diabetic retinopathy in man. *Eye (Lond)*. 1993;7 (Pt 2):250-3.

28. Beltramo E, Porta M. Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem*. 2013;20(26):3218-25.
29. Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, et al. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J*. 2002;21(16):4307-16.
30. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30(5):343-58.
31. Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2883-90.
32. Winkler EA, Sagare AP, Zlokovic BV. The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease? *Brain Pathol*. 2014;24(4):371-86.
33. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010;468(7323):557-61.
34. Sengillo JD, Winkler EA, Walker CT, Sullivan JS, Johnson M, Zlokovic BV. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2013;23(3):303-10.
35. Beltramo E, Nizheradze K, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent apoptosis induced by high glucose-conditioned extracellular matrix in human retinal pericytes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25(7):647-56.
36. Evans JR, Michelessi M, Virgili G. Laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(11):CD011234.
37. Wiesinger K, Reinelt P, Ennemoser A, Edelmayr M, Schonherr U. [What can anti-VEGF therapy achieve in clinical routine? : Effectiveness of anti-VEGF therapy in patients with macular diseases in clinical routine on 1492 eyes in Austria]. *Ophthalmologe*. 2016.
38. Arboleda-Velasquez JF, Valdez CN, Marko CK, D'Amore PA. From pathobiology to the targeting of pericytes for the treatment of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2015;15(2):573.
39. Goh KL, Yang JT, Hynes RO. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development*. 1997;124(21):4309-19.
40. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89.
41. Boudreau NJ, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J*. 1999;339 (Pt 3):481-8.
42. Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol*. 2005;24(6):389-99.

43. Valero C, Javierre E, Garcia-Aznar JM, Menzel A, Gomez-Benito MJ. Challenges in the Modeling of Wound Healing Mechanisms in Soft Biological Tissues. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(7):1654-65.
44. Romer LH, Birukov KG, Garcia JG. Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circulation research.* 2006;98(5):606-16.
45. Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E. Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2010;35(12):1045-56.
46. Cherian S, Roy S, Pinheiro A, Roy S. Tight glycemic control regulates fibronectin expression and basement membrane thickening in retinal and glomerular capillaries of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(2):943-9.
47. Tarallo S, Beltramo E, Berrone E, Dentelli P, Porta M. Effects of high glucose and thiamine on the balance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in vascular cells. *Acta Diabetol.* 2010;47(2):105-11.
48. Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(6):721-48.
49. Chronopoulos A, Trudeau K, Roy S, Huang H, Vinore SA, Roy S. High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: implications for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2011;36(8):747-53.
50. Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11(9):1205-23.
51. Roy S, Sato T. Role of vascular basement membrane components in diabetic microangiopathy. *Drug News Perspect.* 2000;13(2):91-8.
52. Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li AF, Sato T, Roy S. Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes-induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes.* 2006;55(1):86-92.
53. Zimmermann KW. Der feinere Bau der Blutcapillaren. *Anatomische Entwicklungsgeschichte.* 1922.
54. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular research.* 1996;32(4):687-98.
55. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011;21(2):193-215.
56. Cuevas P, Gutierrez-Diaz JA, Reimers D, Dujovny M, Diaz FG, Ausman JI. Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat Embryol (Berl).* 1984;170(2):155-9.

57. Gerhardt H, Wolburg H, Redies C. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn.* 2000;218(3):472-9.
58. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol.* 1991;6(2):269-86.
59. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res.* 2006;312(5):623-9.
60. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993;7(11):1031-8.
61. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-13.
62. Joyce NC, DeCamilli P, Boyles J. Pericytes, like vascular smooth muscle cells, are immunocytochemically positive for cyclic GMP-dependent protein kinase. *Microvascular research.* 1984;28(2):206-19.
63. Maier CL, Shepherd BR, Yi T, Pober JS. Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes. *Microcirculation.* 2010;17(5):367-80.
64. Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D. Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J Muscle Res Cell Motil.* 1988;9(2):184-94.
65. Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D. Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol.* 1987;104(3):483-90.
66. Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, Can A, Topalkara K, Dalkara T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature medicine.* 2009;15(9):1031-7.
67. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 1994;8(16):1888-96.
68. Chibber R, Molinatti PA, Rosatto N, Lambourne B, Kohner EM. Toxic action of advanced glycation end products on cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells: relevance to diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 1997;40(2):156-64.
69. Armulik A, Mae M, Betsholtz C. Pericytes and the blood-brain barrier: recent advances and implications for the delivery of CNS therapy. *Ther Deliv.* 2011;2(4):419-22.
70. Gerhardt H, Semb H. Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? *J Mol Med (Berl).* 2008;86(2):135-44.

71. Herman IM, Jacobson S. In situ analysis of microvascular pericytes in hypertensive rat brains. *Tissue Cell*. 1988;20(1):1-12.
72. Diaz-Flores L, Jr., Madrid JF, Gutierrez R, Varela H, Valladares F, Diaz-Flores L. Cell contribution of vasa-vasorum to early arterial intimal thickening formation. *Histol Histopathol*. 2007;22(12):1379-86.
73. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circulation research*. 2005;96(9):930-8.
74. Herman IM. Controlling the expression of smooth muscle contractile protein isoforms: a role for the extracellular matrix? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9(1):3-4.
75. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research*. 2005;97(6):512-23.
76. Lamagna C, Bergers G. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(4):677-81.
77. Piquer-Gil M, Garcia-Verdugo JM, Zipancic I, Sanchez MJ, Alvarez-Dolado M. Cell fusion contributes to pericyte formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(3):480-5.
78. Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(1):1-11.
79. Pierantozzi E, Badin M, Vezzani B, Curina C, Randazzo D, Petraglia F, et al. Human pericytes isolated from adipose tissue have better differentiation abilities than their mesenchymal stem cell counterparts. *Cell Tissue Res*. 2015.
80. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):229-30.
81. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110(4):1001-20.
82. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
83. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40.
84. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47.
85. Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem*. 2012;113(9):2806-12.

86. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, Pasini A, Krampera M. Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(3):194-204.
87. Gardner TW, Abcouwer SF, Barber AJ, Jackson GR. An integrated approach to diabetic retinopathy research. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(2):230-5.
88. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*. 2010;2(4):81-92.
89. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
90. Bieback K, Schallmoser K, Kluter H, Strunk D. Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(4):286-94.
91. Klein BE, Klein R, Moss SE. Self-rated health and diabetes of long duration. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 1998;21(2):236-40.
92. Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*. 2004;110(15):2226-32.
93. Guimaraes-Camboa N, Cattaneo P, Sun Y, Moore-Morris T, Gu Y, Dalton ND, et al. Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):345-59 e5.
94. Caplan AI. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int*. 2015;2015:628767.
95. Bieback K, Wuchter P, Besser D, Franke W, Becker M, Ott M, et al. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(7):773-82.
96. Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther*. 2011;22(1):3-17.
97. Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*. 2009;58(4):570-81.
98. Bieback K, Hecker A, Schlechter T, Hofmann I, Brousos N, Redmer T, et al. Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy*. 2012;14(5):570-83.
99. Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther*. 2012;20(1):187-95.

100. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(1):19-26.
101. Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(4):1196-202.
102. Sullivan C, Barry F, Ritter T, O'Flatharta C, Howard L, Shaw G, et al. Allogeneic murine mesenchymal stem cells: migration to inflamed joints in vivo and amelioration of collagen induced arthritis when transduced to express CTLA4Ig. *Stem cells and development.* 2013;22(24):3203-13.
103. Wu J, Sun Z, Sun HS, Wu J, Weisel RD, Keating A, et al. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplant.* 2008;16(10):993-1005.
104. Eseonu OI, De Bari C. Homing of mesenchymal stem cells: mechanistic or stochastic? Implications for targeted delivery in arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(2):210-8.
105. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS one.* 2010;5(4):e10088.
106. Zeuner M, Bieback K, Widera D. Controversial Role of Toll-like Receptor 4 in Adult Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 2015;11(4):621-34.
107. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008;2(2):141-50.
108. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
109. Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol.* 2015;6:560.
110. Bieback K, Kern S, Kocaomer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng.* 2008;18(1 Suppl):S71-6.
111. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
112. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the

International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-8.

113. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5):509-25.

114. Sanchez-Guijo F, Caballero-Velazquez T, Lopez-Villar O, Redondo A, Parody R, Martinez C, et al. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(10):1580-5.

115. Larghero J, Farge D, Braccini A, Lecourt S, Scherberich A, Fois E, et al. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008;67(4):443-9.

116. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Pascual I, De-La-Quintana P, Trebol J, et al. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *International Journal of Colorectal Disease*. 2009;24(1):27-30.

117. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):11-5.

118. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-84.

119. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*. 2005;438(7070):960-6.

120. Hammes HP. [Diabetic retinopathy. Internal medical aspects of an ophthalmologic topic]. *Ophthalmologie*. 2004;101(12):1159-64.

121. Xie QP, Huang H, Xu B, Dong X, Gao SL, Zhang B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Differentiation*. 2009;77(5):483-91.

122. Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*. 2009;52(7):1391-9.

123. Dong QY, Chen L, Gao GQ, Wang L, Song J, Chen B, et al. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Invest Med*. 2008;31(6):E328-37.

124. Ito T, Itakura S, Todorov I, Rawson J, Asari S, Shintaku J, et al. Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation*. 2010;89(12):1438-45.

125. Ezquer M, Urzua CA, Montecino S, Leal K, Conget P, Ezquer F. Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:42.
126. Rajashekhar G, Ramadan A, Abburi C, Callaghan B, Traktuev DO, Evans-Molina C, et al. Regenerative therapeutic potential of adipose stromal cells in early stage diabetic retinopathy. *PloS one.* 2014;9(1):e84671.
127. Cronk SM, Kelly-Goss MR, Ray HC, Mendel TA, Hoehn KL, Bruce AC, et al. Adipose-derived stem cells from diabetic mice show impaired vascular stabilization in a murine model of diabetic retinopathy. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(5):459-67.
128. Mendel TA, Clabough EB, Kao DS, Demidova-Rice TN, Durham JT, Zotter BC, et al. Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy. *PloS one.* 2013;8(5):e65691.
129. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells.* 2006;24(4):1095-103.
130. Loibl M, Binder A, Herrmann M, Duttenhoefer F, Richards RG, Nerlich M, et al. Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro. *BioMed research international.* 2014;2014:395781.
131. Bieback K, Vinci M, Elvers-Hornung S, Bartol A, Gloe T, Czabanka M, et al. Recruitment of human cord blood-derived endothelial colony-forming cells to sites of tumor angiogenesis. *Cytotherapy.* 2013;15(6):726-39.
132. Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular research.* 2007;74(2-3):172-83.
133. Blackstone BN, Li R, Ackerman WEt, Ghadiali SN, Powell HM, Kniss DA. Myoferlin depletion elevates focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation and enhances cell-matrix adhesion in breast cancer cells. *American journal of physiology Cell physiology.* 2015;308(8):C642-9.
134. Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* 1995;377(6549):539-44.
135. Zhao X, Guan JL. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced drug delivery reviews.* 2011;63(8):610-5.
136. Willars GB. Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling. *Semin Cell Dev Biol.* 2006;17(3):363-76.
137. Manzur M, Ganss R. Regulator of G protein signaling 5: a new player in vascular remodeling. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19(1):26-30.

138. Nisancioglu MH, Mahoney WM, Jr., Kimmel DD, Schwartz SM, Betsholtz C, Genove G. Generation and characterization of rgs5 mutant mice. *Mol Cell Biol.* 2008;28(7):2324-31.
139. Shen J, Shrestha S, Yen YH, Scott MA, Soo C, Ting K, et al. The pericyte antigen RGS5 in perivascular soft tissue tumors. *Human pathology.* 2016;47(1):121-31.
140. Poornejad N, Schaumann LB, Buckmiller EM, Momtahan N, Gassman JR, Ma HH, et al. The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix. *J Biomater Appl.* 2016;31(4):521-33.
141. Han J, Mandal AK, Hiebert LM. Endothelial cell injury by high glucose and heparanase is prevented by insulin, heparin and basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Diabetol.* 2005;4:12.
142. Dreher L, Elvers-Hornung S, Brinkmann I, Huck V, Henschler R, Gloe T, et al. Cultivation in human serum reduces adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell adhesion to laminin and endothelium and reduces capillary entrapment. *Stem cells and development.* 2013;22(5):791-803.
143. Yang Z, Li K, Yan X, Dong F, Zhao C. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010;248(10):1415-22.
144. Takahashi M, Suzuki E, Kumano S, Oba S, Sato T, Nishimatsu H, et al. Angiopoietin-1 mediates adipose tissue-derived stem cell-induced inhibition of neointimal formation in rat femoral artery. *Circ J.* 2013;77(6):1574-84.
145. Rehmann H, Bos JL. Signal transduction: thumbs up for inactivation. *Nature.* 2004;429(6988):138-9.
146. Rajashekhar G, Traktuev DO, Roell WC, Johnstone BH, Merfeld-Clauss S, Van Natta B, et al. IFATS collection: Adipose stromal cell differentiation is reduced by endothelial cell contact and paracrine communication: role of canonical Wnt signaling. *Stem Cells.* 2008;26(10):2674-81.
147. Giacoppo S, Bramanti P, Mazzon E. The transplantation of mesenchymal stem cells derived from unconventional sources: an innovative approach to multiple sclerosis therapy. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis.* 2017.
148. Hajmoussa G, Elorza AA, Nies VJ, Jensen EL, Nagy RA, Harmsen MC. Hyperglycemia Induces Bioenergetic Changes in Adipose-Derived Stromal Cells While Their Pericytic Function Is Retained. *Stem cells and development.* 2016;25(19):1444-53.
149. Patrick P, Price TO, Diogo AL, Sheibani N, Banks WA, Shah GN. Topiramate Protects Pericytes from Glucotoxicity: Role for Mitochondrial CA VA in Cerebrovascular Disease in Diabetes. *Journal of endocrinology and diabetes.* 2015;2(2).

150. Gurel Z, Zaro BW, Pratt MR, Sheibani N. Identification of O-GlcNAc modification targets in mouse retinal pericytes: implication of p53 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *PLoS one*. 2014;9(5):e95561.
151. Marini G, Rinaldi Jde C, Damasceno DC, Felisbino SL, Rudge MV. [Changes in the extracellular matrix due to diabetes and their impact on urinary continence]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2014;36(7):328-33.
152. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995;46:223-34.
153. Huber B, Volz AC, Kluger PJ. How do culture media influence in vitro perivascular cell behavior? *Cell biology international*. 2015;39(12):1395-407.
154. Bieback K, Ha VA, Hecker A, Grassl M, Kinzebach S, Solz H, et al. Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(11):3467-84.
155. Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*. 2009;27(9):2331-41.
156. Kocaomer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25(5):1270-8.
157. Shimizu F, Sano Y, Haruki H, Kanda T. Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF-beta and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia*. 2011;54(6):1517-26.
158. Thorin E, Shreeve SM. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol Ther*. 1998;78(3):155-66.
159. Galley HF, Blaylock MG, Dubbels AM, Webster NR. Variability in E-selectin expression, mRNA levels and sE-selectin release between endothelial cell lines and primary endothelial cells. *Cell biology international*. 2000;24(2):91-9.
160. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-77.
161. Browning AC, Halligan EP, Stewart EA, Swan DC, Dove R, Samaranyake GJ, et al. Comparative gene expression profiling of human umbilical vein endothelial cells and ocular vascular endothelial cells. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(1):128-32.
162. Silverman MD, Babra B, Pan Y, Planck SR, Rosenbaum JT. Differential E-selectin expression by iris versus retina microvascular endothelial cells cultured from the same individuals. *Microvascular research*. 2005;70(1-2):32-42.

163. Brylla E, Tscheudschilsuren G, Santos AN, Nieber K, Spanel-Borowski K, Aust G. Differences between retinal and choroidal microvascular endothelial cells (MVECs) under normal and hypoxic conditions. *Exp Eye Res.* 2003;77(5):527-35.
164. Jayasinghe C, Simiantonaki N, Michel-Schmidt R, Kirkpatrick CJ. Hypoxia-induced reduction of sVEGFR-2 levels in human colonic microvascular endothelial cells in vitro: Comparative study with HUVEC. *Int J Mol Med.* 2009;23(1):49-55.
165. Kuricova K, Pacal L, Soupal J, Prazny M, Kankova K. Effect of glucose variability on pathways associated with glucotoxicity in diabetes: Evaluation of a novel in vitro experimental approach. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016;114:1-8.
166. Rajashekhar G. Mesenchymal stem cells: new players in retinopathy therapy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:59.
167. Psaltis PJ, Carbone A, Nelson AJ, Lau DH, Jantzen T, Manavis J, et al. Reparative effects of allogeneic mesenchymal precursor cells delivered transendocardially in experimental nonischemic cardiomyopathy. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010;3(9):974-83.
168. Merfeld-Clauss S, Gollahalli N, March KL, Traktuev DO. Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(9):2953-66.
169. Kowluru RA. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetol.* 2001;38(4):179-85.
170. Hayden MR, Sowers JR, Tyagi SC. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovasc Diabetol.* 2005;4:9.
171. Tsioufis C, Bafakis I, Kasiakogias A, Stefanadis C. The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(10):1159-65.
172. Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S, Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin Invest.* 1988;82(2):735-8.
173. Abari E, Kociok N, Hartmann U, Semkova I, Paulsson M, Lo A, et al. Alterations in basement membrane immunoreactivity of the diabetic retina in three diabetic mouse models. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251(3):763-75.
174. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pha.* 2014;18(1):1-14.
175. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114(6):597-605.
176. Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent

increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18714-9.

177. Milne R, Brownstein S. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Amino Acids.* 2013;44(6):1397-407.

178. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(24):11555-8.

179. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992;267(21):14998-5004.

180. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001;108(7):949-55.

181. Schmidt AM, Stern DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(9):368-75.

182. Kowluru RA, Kennedy A. Therapeutic potential of anti-oxidants and diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001;10(9):1665-76.

183. Kalfa TA, Gerritsen ME, Carlson EC, Binstock AJ, Tsilibary EC. Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(12):2358-67.

184. McDonald DM, Coleman G, Bhatwadekar A, Gardiner TA, Stitt AW. Advanced glycation of the Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide motif modulates retinal microvascular endothelial cell dysfunction. *Mol Vis.* 2009;15:1509-20.

185. He ZQ, Ji RZ, Wang X, Liang C, Wu ZG. [Effect of advanced glycation end products on the function and angiogenesis of adipose tissue-derived stem cells and the protective effect of danhong injection: an experimental study]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2014;34(7):839-45.

186. Wang Z, Li H, Zhang D, Liu X, Zhao F, Pang X, et al. Effect of advanced glycosylation end products on apoptosis in human adipose tissue-derived stem cells in vitro. *Cell Biosci.* 2015;5:3.

187. Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol.* 2003;75(1):95-108.

188. Blocki A, Wang Y, Koch M, Peh P, Beyer S, Law P, et al. Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem cells and development.* 2013;22(17):2347-55.

189. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25(6):566-76.
190. da Silva Meirelles L, Maistro Malta T, de Deus Wagatsuma VM, Palma PV, Araujo AG, Ribeiro Malmegrim KC, et al. Cultured human adipose tissue pericytes and mesenchymal stromal cells display a very similar gene expression profile. *Stem cells and development.* 2015.
191. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):15-23.
192. Drake CJ, Hungerford JE, Little CD. Morphogenesis of the first blood vessels. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1998;857:155-79.
193. Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science.* 2011;333(6039):238-42.
194. Kabara M, Kawabe J, Matsuki M, Hira Y, Minoshima A, Shimamura K, et al. Immortalized multipotent pericytes derived from the vasa vasorum in the injured vasculature. A cellular tool for studies of vascular remodeling and regeneration. *Lab Invest.* 2014;94(12):1340-54.
195. Peault B. Are mural cells guardians of stemness?: From pluri- to multipotency via vascular pericytes. *Circulation.* 2012;125(1):12-3.
196. Bhatwadekar AD, Glenn JV, Li G, Curtis TM, Gardiner TA, Stitt AW. Advanced glycation of fibronectin impairs vascular repair by endothelial progenitor cells: implications for vasodegeneration in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(3):1232-41.
197. Lopez-Quintero SV, Cancel LM, Pierides A, Antonetti D, Spray DC, Tarbell JM. High glucose attenuates shear-induced changes in endothelial hydraulic conductivity by degrading the glycocalyx. *PloS one.* 2013;8(11):e78954.
198. Nieuwdorp M, van Haefen TW, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, et al. Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes.* 2006;55(2):480-6.
199. Reine TM, Kusche-Gullberg M, Feta A, Jenssen T, Kolset SO. Heparan sulfate expression is affected by inflammatory stimuli in primary human endothelial cells. *Glycoconj J.* 2012;29(1):67-76.
200. Han J, Hiebert LM. Alteration of endothelial proteoglycan and heparanase gene expression by high glucose, insulin and heparin. *Vascul Pharmacol.* 2013;59(3-4):112-8.
201. Nassiri SM, Rahbarghazi R. Interactions of mesenchymal stem cells with endothelial cells. *Stem cells and development.* 2014;23(4):319-32.

202. Marfy-Smith SJ, Clarkin CE. Are Mesenchymal Stem Cells So Bloody Great After All? *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(1):3-6.
203. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004;109(12):1543-9.
204. Ho IA, Toh HC, Ng WH, Teo YL, Guo CM, Hui KM, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem Cells.* 2013;31(1):146-55.
205. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood.* 2009;113(18):4197-205.
206. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells.* 2008;26(4):1047-55.