Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Medizinische Fakultät Mannheim

Dissertations-Kurzfassung

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

Autor: Hans Heiner Kremer

Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie

Doktormutter: Prof. Dr. K. Bieback

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. Mesenchymalstromale Zellen (MSC) haben zahlreiche morphologische und funktionelle Gemeinsamkeiten mit Perizyten. Hinzu kommt, dass ihre Differenzierungskapazitäten und ihr immunmodulatorisches Potential bereits erfolgreich im Zuge zellthera-peutischer 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 Differenzie- rungsverhalten durch chronisch erhöhte Glukosewerte weniger stark beeinflusst werden. Als Vertreter der MSC wählten wir, aus Fettgewebe isolierte a*dipose derived stem/stromal cells* (ASC). Deren Einsatz hat in aktuellen Studien mit Anwendungs- schwerpunkt im perivaskulären Bereich deutliche Vorteile im Vergleich zu MSC, die aus anderen Geweben isoliert wurden, gezeigt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Zusammenfassung8 Einflüsse von hyperglykämisch modifizierter EZM von Endothelzellen auf das Wachstumsverhalten von ASCs und HRPs 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 verschieden modifizierten Matrizes 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, Differenzierungs- assays 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 hyperglykämischmodifizierter EZM postulierten wir zunächst Glukosebedingte Veränderungen der Zusammensetzung der EZM. Deshalb wurden Laminin, Kollagen IV und Fibronektin 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 Perizytenassoziierten 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 Perizytenähnliche 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.