Das Sekretom humaner adipogener mesenchymaler Stammzellen führt zur
Stimulation der Lymphangiogenese *in vitro*
Plastisch- und Handchirurgische Klinik

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr.med.
vorgelegt von
Nima Ahmadzadeh
aus Berlin

Als Dissertation genehmigt
von der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2020

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. med. Markus Neurath

Gutachter/in: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Raymund E. Horch

Prof. Dr. rer. nat. Michael Stürzl

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	1
2. Einleitung	2
3. Das Lymphödem	2
4. Therapie des Lymphödems	3
5. Aufgaben des Lymphgefäßsystems	4
6. Aufbau des Lymphgefäßsystems	5
7. Embryonale Lymphgefäßentwicklung	7
8. Lymphangiogene Wachstumsfaktoren	10
9. Mesenchymale Stammzellen	14
10. Vergleich von BM-MSC und ADSC	15
11. Mesenchymale Stammzellen in der Lymphangiogenese	15
12. Literaturverzeichnis	18
13. Originalpublikation	24

1. Abstract

Lymphedema is a chronic progressive disease ultimately resulting in severe, disfiguring swelling and permanent changes of the affected tissues. Presently, there is no causal treatment approach of lymphedema. Therefore, most therapies are purely symptomatic. However, the recent use of stem cell-based therapies has offered new prospects for alternative treatment options. The present study was performed to investigate the effects of human adipose-derived stem cells (ADSCs) on human dermal lymphatic endothelial cells (HDLECs) in terms of basic *in vitro* lymphangiogenic assays (WST-8 assay, scratch assay, Boyden chamber assay, invasion assay, sprouting assay, tube formation assay).

The influence of ADSC-conditioned medium (ADSC-CM) on HDLECs was compared to recombinant VEGF-C, bFGF and HGF. Further ADSC-CM was characterized by protein microarray and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Although key-lymphangiogenic growth factors - like VEGF-C - could only be detected in low concentrations within the conditioned medium (CM), HDLECs were potently stimulated to proliferate, migrate and to form tube like structures by ADSC-CM. Despite concentrations more than hundredfold higher than those found in the conditioned medium, stimulation with recombinant VEGF-C, bFGF and HGF was still weaker compared to ADSC-CM. These results highlight the effectiveness of growth factors secreted by ADSC to stimulate HDLEC, potentially providing a promising new therapeutic approach for the treatment of lymphedema.

2. Einleitung

Die Erforschung der Blutgefäßbildung (Angiogenese) hat in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Relevanz gewonnen. Intensive Anstrengungen weltweit führten zur Identifizierung und zum detaillierten Verständnis vieler an der Angiogenese beteiligter molekularer Mechanismen. Im Gegensatz dazu sind die regulierenden Prozesse der Lymphangiogenese weitaus weniger verstanden. Der heutige Forschungsstand deutet darauf hin, dass die Lymphangiogenese eine entscheidende Rolle bei pathologischen Entzündungs-, Wundheilungs- und Metastasierungsprozessen im menschlichen Organismus spielt. Dementsprechend könnte das Verständnis über die Funktions- und Regulierungswege des Lymphgefäßsystems zu neuartigen Therapiemöglichkeiten führen bzw. effektivere Ansätze bei den zuvor genannten Pathologien ermöglichen¹. In diesem Zusammenhang könnten in naher Zukunft innovative Therapien für das Lymphödem entwickelt werden, für das es nach aktuellem Stand der Forschung keinen kurativen Behandlungsansatz gibt.

3. Das Lymphödem

Beim Lymphödem liegt eine Störung des Lymphabflusses vor. Diese ist in einer Entwicklungsstörung oder mechanischen Insuffizienz der lymphatischen Abflussbahnen begründet und führt zu einer abnormalen Ansammlung der Lymphflüssigkeit im interstitiellen Gewebe. Diese proteinreiche interstitielle Flüssigkeit kann eine anhaltende Entzündungsreaktion hervorrufen, die schließlich zu einer Fibrose, einer beeinträchtigten Immunantwort und zu einer Fettgewebshypertrophie führt^{1,2}. Die Schwellungen der betroffenen Extremitäten und die daraus resultierenden Verhärtungen enden meist in einer eingeschränkten Mobilität, Funktionsstörungen sowie schwerer körperlicher Entstellung und sind für die Betroffenen mit einer erheblichen psychischen und physischen Morbidität vergesellschaftet³.

Das Lymphödem wird, abhängig von der Ätiologie, in eine primäre (kongenital) und in eine sekundäre (erworben) Form unterteilt. Während das primäre Lymphödem die Folge genetischer Schäden ist, wird das sekundäre Lymphödem hauptsächlich durch Traumata, Operationen, Parasiteninfektionen und Strahlentherapie verursacht. Letzteres kommt mit

über 99% der Fälle weltweit deutlich häufiger vor⁴. Interessanterweise ist die sekundäre Form des Lymphödems in Entwicklungsländern häufig eine Folge von parasitären Infektionen durch Filarien, während es in Industrienationen häufiger nach einer Krebserkrankung auftritt⁵. Prinzipiell sind Störungen des Lymphgefäßsystems bzw. Lymphödeme nach der Behandlung einer Vielzahl von verschiedenen Karzinomen, wie bspw. Mammakarzinomen, Melanomen, Lymphomen und Prostata- sowie gynäkologischen Karzinomen, beschrieben⁶⁻⁹.

4. Therapie des Lymphödems

Das chronische Lymphödem ist ein fortschreitender und medizinisch irreversiblerer Zustand, für den es nach dem aktuellen Stand der Forschung keinen kurativen Behandlungsansatz gibt. Sobald die Diagnose des Lymphödems gestellt worden ist, ist die Intervention der Wahl eine zeitaufwändige konservative Therapie. Dieses Therapieverfahren, auch bekannt als Komplexe Physikalische Entstauungstherapie (KPE), umfasst u. a. die manuelle Lymphdrainage, Hautpflege, physikalische Therapie sowie Kompressionsbehandlungen^{2,10}. Obwohl viele Patienten von dieser Therapie profitieren, stellt dieser Ansatz für die Patienten eine große Belastung dar und erfordert zeitgleich ein lebenslanges Engagement und eine hohe Patienten Compliance.

Sollte die konventionelle Behandlung nicht ausreichen, um die Symptome eines Lymphödems zu lindern, dienen chirurgische Ansätze bei ausgewählten Patienten als die Methode der Wahl. Zunächst kamen resezierende Verfahren zum Einsatz, bei denen erkranktes Gewebe bei Lymphödemem teilweise oder ganz entfernt wird. Das Ausmaß der Resektion kann dabei von einfachen Exzisionen von pathologisch verändertem Gewebe bis hin zum radikalen Debulking (vollständige Entfernung der Haut und des Unterhautfettgewebes einschließlich der darunterliegenden Faszie) reichen. Aufgrund der ausgesprochenen Invasivität und Morbidität der betroffenen Areale sollten resezierende Verfahren aktuell nur als Methode der letzten Wahl eingesetzt werden. Modernere Formen der Resektionsverfahren umfassen dabei die verschiedenen Techniken der Liposuktion und Lipo-Lymphosuktion.

Neue Hoffnungen einer symptomatischen Behandlung des Lymphödems bieten mikrochirurgische Verfahren wie ein vaskulärer Lymphknotentransfer (*Vascularized Lymph*

Node Transfer; VLNT) und lymphatisch-venösen Bypässe (*lymphaticovenous anastomosis*; LVA), die die Lymphabstromwege wiederherstellen und dadurch dauerhaft Einlagerungen reduzieren¹¹. Trotz der ansehnlichen Erfolgsraten mikrochirurgischer Eingriffe bergen diese Verfahren jedoch weiterhin Probleme wie dem Risiko der Spenderstellenmorbidity sowie die Notwendigkeit einer postoperativen Anwendung konservativer Verfahren (KPE), um einen klinischen Langzeiterfolg zu erhalten. Deshalb sollte primär für jeden Patienten eine sorgfältige Abwägung von Nutzen und Risiko einer operativen Intervention getroffen werden^{2,11,12}.

In den letzten Jahren konzentrieren sich Forschungsgruppen in experimentellen Studien zunehmend auf innovative Behandlungsansätze wie z.B. den der Injektion verschiedener Wachstumsfaktoren¹³⁻²⁰ oder den Einsatz mesenchymaler Stammzellen. Zukünftig wäre so auch eine Kombination dieser innovativen Behandlungskonzepte mit chirurgischen Verfahren denkbar.

5. Aufgaben des Lymphgefäßsystems

Das Lymphgefäßsystem erfüllt eine Reihe von physiologischen Funktionen innerhalb des Organismus. Eine der wichtigsten Aufgaben in diesem Zusammenhang besteht in der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase des Organismus. Dies erfolgt durch Drainage und Rückführung der interstitiellen Gewebeflüssigkeit zurück in das Blutkreislaufsystem. Um die verschiedenen Gewebe mit Sauerstoff, Nährstoffen und Hormonen zu versorgen sowie den Abtransport von Kohlendioxid und anderen Stoffwechselabfallprodukten zu gewährleisten, strömen täglich große Flüssigkeitsmengen aus dem Blutkreislaufsystem in das umliegende Gewebe (Interstitium). Dabei ist der Blutdruck für den kontinuierlichen Ausstrom der Plasmakomponenten aus dem Kapillarbett verantwortlich^{1,21,22}. Täglich treten so bis zu 20 Liter Flüssigkeit von den Blutgefäßen in das Gewebe über. Dabei wird der größte Teil (90%), bedingt durch den ansteigenden kolloidosmotischen Druck, bereits im Bereich der Mikrozirkulation wieder ins Blut aufgenommen. Die restlichen 10% gelangen über das Lymphgefäßsystem in den venösen Blutkreislauf und verhindern auf diese Weise eine permanente Flüssigkeitsansammlung und einen steigenden Druck im interstitiellen Gewebe²³.

Bevor die Lymphflüssigkeit dem Blutkreislauf zurückgeführt wird, passiert diese zunächst noch die Lymphknoten, die als eine Kette von Filterstationen in das Lymphgefäßsystem eingebaut sind. Hier werden schädigende Mikroorganismen, Schadstoffe (Toxine) sowie Tumorzellen abgefangen. Nach dem Kontakt zwischen körpereigenen Immunzellen und pathogenen Antigenen kann so eine Immunantwort ausgelöst werden^{1,3}. Eine weitere wesentliche Aufgabe des Lymphgefäßsystems umfasst die Resorption sowie den Transport von Lipiden aus dem Verdauungssystem in Form von Chylomikronen. Diese Lipoproteinpartikel werden von den Enterozyten produziert und dienen dem Transport von Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterin vom Darm bis zur Leber²⁴.

6. Aufbau des Lymphgefäßsystems

Die initialen Lymphgefäße werden als Lymphkapillaren bezeichnet, welche blind beginnen und hauptsächlich für die Aufnahme von Flüssigkeit, Makromolekülen und extravasierten Zellen zuständig sind^{25,26}. Sie bilden ein dichtes Netzwerk in den meisten Geweben und Organen des menschlichen Körpers²³. Lediglich das zentrale Nervensystem (Gehirn und Knochenmark), die Retina und avaskuläre Gewebe wie Epidermis, Haare, Nägel, Knorpel und Kornea verfügen nicht über Lymphkapillaren²⁶. Morphologisch sind die Lymphkapillaren von einer einzigen, nicht fenestrierten Schicht dachziegelartiger überlappender Lymphendothelzellen (LEC) ausgekleidet und haben, im Gegensatz zu den Blutgefäßen, weder eine klassische Basallamina noch sind sie von glatten Muskelzellen bzw. von Perizyten bedeckt^{25,27}. Ihr Lumen ist zudem weiter (bis zu 70 µm) und unregelmäßiger als das der Blutkapillaren²⁸. Diese Eigenschaften machen die initialen Lymphgefäße hoch permeabel für große Makromoleküle, Pathogene und migrierende Zellen²⁹. Eine entscheidende Bedeutung für den unidirektionalen Lymphtransport scheint die markante eichenblattförmige Struktur der Endothelzellen einzunehmen. Diskontinuierliche Haftkontakte, die als sogenannte *button-like junctions* beschrieben werden, verbinden die Lymphendothelzellen stellenweise untereinander. Dazwischenliegende Lücken ermöglichen den ungestörten Eintritt von Flüssigkeit, Proteinen, leblosen Partikeln und Zellen in das Lumen²³. Die lose überlappenden Ränder der Endothelzellen fungieren dabei als Klappen mit Ventilfunktion (Einlassventile; primäre lymphatische Klappen) und ermöglichen den unidirektionalen Abfluss der interstitiellen Flüssigkeit entlang des

Druckgradienten^{30,31}. Dabei wird die interstitielle Flüssigkeit sowie die in ihr gelösten Stoffe erst mit dem Eintritt in die Lymphkapillaren als Lymphe bezeichnet.

Die Lymphkapillaren sind durch Mikrofibrillen („Ankerfilamente“) aus Fibrillin an dem umliegenden Bindegewebe befestigt. Bei Ödemen mit konsekutiv steigendem Gewebedruck führt das Ankerfilamentsystem zu Zugkräften auf den Endothelzellverband, wodurch das Kapillarlumen erweitert und die überlappenden Zellübergänge geöffnet werden^{23,27,31,32}.

Diese einzigartigen strukturellen Eigenschaften, die an die ändernden physikalischen Bedingungen im Gewebe gekoppelt sind, erlauben somit die Bildung von Lymphflüssigkeit, sobald der interstitielle Druck größer ist als der Druck in den Lymphkapillaren. Dadurch öffnen sich die primären lymphatischen Ventile und erlauben einen Übertritt der Flüssigkeit in die initialen Lymphgefäße³³.

Nach der Aufnahme der Lymphe durch die Kapillaren, erfolgt der Transport in lymphatische Gefäße mit zunehmender Größe (bis zu 150 µm), den Präkollektoren (*Vasa lymphatica praecollectoria*). Diese Abschnitte des Lymphgefäßsystems besitzen bereits Klappen und üben eine ableitende Funktion aus²⁸. Wesentlich ist jedoch, dass diese Gefäße unterschiedlich aufgebaute Wandabschnitte aufweisen. Der Verlauf der Präkollektoren ist dabei geprägt von Abschnitten, die dem strukturellen Aufbau der Lymphkapillaren identisch sind. Darüber hinaus enthalten diese aber auch Abschnitte, die den Kollektoren gleichen und damit vereinzelt eine glatte Muskulatur aufweisen. Aufgrund dieser Beschaffenheit wird angenommen, dass Präkollektoren sowohl bei der Flüssigkeits- und Proteinabsorption als auch beim Transport der Lymphflüssigkeit mitwirken^{26,34}. Mehrere Präkollektoren konfluieren im weiteren Verlauf in die Kollektoren (*Vasa lymphatica collectoria*; Sammelgefäße Durchmesser ca. 100–600 µm), die histomorphologisch aufgrund des dreischichtigen Gefäßaufbaus – bestehend aus *Adventitia*, *Media* und *Intima* – und der intraluminalen Klappen kleinen Venen gleichen. Die Lymphkollektoren setzen sich aus einer Reihe von funktionellen Einheiten, den sogenannten „*Lymphangionen*“, zusammen, die durch die Taschenklappen begrenzt werden. Diese Klappen verhindern dabei einen retrograden Fluss der Lymphe³⁵. Eine kontinuierliche Basalmembran und durchgehende reiverschlussartige Zellkontakte, auch *zipperlike junction* genannt, dichten das Lymphgefäßsystem ab und verhindern das Auslaufen der Lymphe während des Transports^{31,35}. Im Gegensatz zum Blutgefäßsystem besitzt das Lymphgefäßsystem keine zentrale Pumpe. Um genügend Energie für den Transport der Lymphe zurück in den venösen Blutkreislauf bereitzustellen, nutzt das Lymphgefäßsystem intrinsische und extrinsische

Pumpkräfte. Auf der einen Seite wird der Lymphfluss durch zyklische Kompression und Expansion der Lymphgefäße unterstützt. Dies wird durch umgebende passive Gewebekräfte (extrinsisch) hervorgerufen, wie z. B. Kontraktionen der Skelettmuskulatur, gastrointestinale Peristaltik, arterielle Pulswellen und die Pumpwirkung des Thorax beim Atmen. Diese Kräfte erzeugen passive hydrostatische Gradienten im lymphatischen Netzwerk, die die Lymphe auch ohne Einfluss der intrinsischen Lymphpumpen wirksam antreiben. Auf der anderen Seite erfolgt der aktive, propulsive Lymphabfluss durch die koordinierten phasischen Kontraktionen der Lymphgefäßmuskulatur (*Lymphangione*)^{33,36}. Nach Passage der Kollektoren wird die Lymphflüssigkeit über die sogenannten afferenten Lymphgefäße den Lymphknoten zugeführt. Nach Passage der regionären Lymphknoten erfolgt der weitere Transport der Lymphflüssigkeit über efferente Lymphgefäße zu weiteren Lymphknoten oder direkt zu den Lymphstämmen (*Trunci lymphatici*)³⁷. Letztere zeigen eine ähnliche Wandbeschaffenheit wie große Venen (*Adventitia, Media und Intima*). Die Lymphstämme vereinigen sich schließlich zu den beiden Hauptlymphgängen, die die Lymphe über den linken bzw. rechten Venenwinkel in das Venensystem drainieren. Dabei führt der *Ductus thoracicus* die Lymphe aus der gesamten unteren sowie der linken oberen Körperregion, während die gesamte Lymphflüssigkeit der oberen rechten Körperhälfte, des Halses und des Kopfes über den *Ductus lymphaticus dexter* drainiert wird^{1,33,38}. Auf diese Weise werden dem Blutkreislauf täglich bis zu zwei Liter Lymphflüssigkeit wieder zugeführt²³.

7. Embryonale Lymphgefäßentwicklung

Die Entwicklung der Lymphgefäße beginnt bei Mäusen kurz nach Etablierung eines funktionellen Blutgefäßsystems. Erste Anzeichen, die auf eine beginnende lymphoendotheliale Differenzierung hindeuten, sind bei Mäusen am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung (E8,5) feststellbar³⁹⁻⁴¹. In dieser Phase exprimieren sämtliche Endothelzellen der vorderen Kardinalvene den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor-3 (VEGFR-3) sowie den Hyaluronrezeptor LYVE-1 (*lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor 1*)²². Die genaue Funktion bzw. regulatorische Relevanz von LYVE-1 während der Lymphgefäßentwicklung ist noch nicht umfassend

verstanden, zumal in verschiedenen Studien bei LYVE-1^{-/-}-Mäusen eine normale Entwicklung mit funktionierendem Lymphgefäßsystem gezeigt werden konnte⁴².

Der entscheidende Schritt bei der Ausbildung des lymphatischen Gefäßsystems umfasst die polarisierte, d.h. einseitige Expression des Transkriptionsfaktors Prox1(*prospero-related homeobox1*) durch VEGFR3⁺/LYVE-1⁺-Endothelzellen der vorderen Kardinalvene am Tag 9,5 der murinen Embryonalentwicklung (6-7 Embryonalwoche beim Menschen)^{41,43}. Prox1 ist im Gegensatz zu LYVE-1 für die Entwicklung des lymphatischen Gefäßsystems unentbehrlich. Dieser steuert als Masterregulator die Ausprägung aller bedeutenden Genprodukte der Lymphendothelzellen^{44,45}. Unter anderem ist Prox1 für die verstärkte Expression des VEGFR-3-Gens verantwortlich, das für die Entwicklung des lymphatischen Gefäßsystems eine erhebliche Relevanz hat^{46,47}. In Abwesenheit von Prox1 (Prox1^{-/-}-Mäuse) bildet sich während der Embryonalentwicklung bei Mäusen kein funktionierendes Lymphgefäßsystem aus, was bereits pränatal zum Absterben der Tiere führt. Interessanterweise ist die Expression von Prox1 nicht nur für die Entwicklung, sondern auch für die Aufrechterhaltung des Lymphgefäßsystems unerlässlich, wie Studien mit verschiedenen Knockout-Mäusen eindrucksvoll beweisen^{48,49}. In späteren embryonalen Entwicklungsphasen führt hier eine Ausschaltung des Prox1-Gens dazu, dass LECs ihre spezifische lymphatische Identität verlieren und sich zu ihrem basalen Differenzierungszustand, dem Blutendothel, dedifferenzieren. Statt typische lymphatische Marker wie VEGFR-3 oder LYVE-1 zu exprimieren, zeigen die Zellen einen blutgefäßspezifischen Phänotyp^{47,50}. Demgegenüber führt eine gezielte Erhöhung der Prox1 Genexpression in Blutendothelzellen sowohl *in vitro*⁴⁵ als auch *in vivo*⁵¹ dazu, dass diese einen lymphatischen Phänotypen annehmen⁴⁶.

Die Regulation der Prox1 Expression wird dabei wahrscheinlich durch zwei Kofaktoren (Sox18 (*sex determining region Y, SRY-box 18*) und COUP-TFII (*Hühner-Ovalbumin-Upstream-Promotor-Transkriptionsfaktor II*)) gesteuert.

Nach erfolgreicher Zellspezifizierung (ca. am E10,5 bei Mäusen) knospen die lymphatischen Vorläuferzellen aus den primitiven Venen in das umliegende Gewebe aus, um die primären Lymphsäcke (sechs Säcke bei Menschen und acht Säcke bei Mäusen) zu etablieren. Auf diese Weise bildet sich durch Proliferation, Aussprossung und Migration der Endothelzellen das primitive lymphatische Gefäßsystems^{25,41}. In dieser Phase exprimieren die lymphatischen Vorläuferzellen zunehmend lymphatische Marker wie Podoplanin und Neuropilin-2 und steigern zudem die Genexpression von Prox1 und VEGFR-3^{52,53}.

Das Auskeimen der lymphatischen Vorläuferzellen aus den embryonalen Venen hängt dabei entscheidend von VEGF-C ab, das vermutlich durch die Erzeugung eines Konzentrationsgradienten diese Prozesse steuert. Interessanterweise zeigen Beobachtungen aus Studien mit VEGF-C^{-/-}-Mäuseembryonen eine fehlerhafte Aussprossung der lymphatischen Vorläuferzellen und damit einhergehende, schwerste Defekte des Lymphgefäßsystems, die ungefähr am E15,5 zum Tod aller Mäuse führen⁵⁴. Allerdings sind die VEGF-C erzeugenden Quellen und das Verständnis über die räumliche Verteilung der Gradienten noch nicht vollständig aufgeklärt⁵⁵. VEGF-C entfaltet seine Wirkung primär durch die Bindung und Aktivierung der VEGFR3-Rezeptortyrosinkinase, die spezifisch sowohl in Blutgefäßendothelzellen als auch in lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird⁵⁶. So ist es nicht verwunderlich, dass eine gezielte Inaktivierung des VEGFR3-kodierenden-Gens in der frühen embryonalen Phase – angesichts resultierender Herz-Kreislauf-Defekte und dem damit verbundenen Tod der Tiere – eine direkte Beurteilung der Rolle von VEGFR3 im Rahmen der lymphatischen Entwicklung verhindert. In späteren Entwicklungsphasen wird die Expression des VEGFR3 im Blutgefäßsystem herunterreguliert. Dies hat zur Folge, dass dieses am E12,5 nur noch auf das Lymphendothel beschränkt ist⁵⁷.

Weitere bekannte lymphangiogene Wachstumsfaktoren sind in den Ablauf der Lymphangiogenese involviert und regulieren entscheidende Prozesse bei der Ausbildung des primitiven lymphatischen Gefäßplexus. Dazu gehören *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor 2* (FGF2) und FGF-3, *platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB) und *insulin-like growth factor-1 und -2*⁵⁸⁻⁶³.

Der nächste Schritt im Prozess der Lymphgefäßentwicklung umfasst die koordinierte Trennung des rudimentären Lymphgefäßsystems vom Blutkreislauf. Mit Ausnahme von zwei Kontaktstellen im Bereich der Venenwinkel, an denen die Lymphflüssigkeit in das venöse Blutsystem zurückgeführt wird, wird das Lymphgefäßsystem bei Mäusen zwischen dem E12,5 und E14,5 vollständig vom Blutgefäßsystem abgelöst^{41,64-66}.

Die Reifung, der letzte Schritt der embryonalen Lymphgefäßentwicklung, beginnt am E14,5 und dauert bis zur frühen postnatalen Periode an. Während dieser Zeit entwickelt sich aus den sehr einfach strukturierten Lymphsäcken ein hierarchisches und funktionierendes Netzwerk aus initialen Lymphkapillaren, Präkollektoren und Kollektoren. Die Lymphgefäße durchlaufen einen Umbau- und Reifungsprozess, der wiederum die Proliferation und das Aussprossen der Endothelzellen umfasst⁴¹. Zukünftige lymphatische Sammelgefäße

(Kollektoren) müssen u. a. Klappen ausbilden und glatte Muskelzellen rekrutieren⁵⁵. Darüber hinaus reduzieren die meisten LECs im Verlauf der Lymphgefäßentwicklung die Expression der lymphatischen Kapillarmarker wie PROX1, VEGFR-3 und LYVE1^{41,67}. Es gibt zahlreiche weitere Signalmoleküle, die die späteren Stadien der Lymphangiogenese regulieren. Auf eine ausführliche Beschreibung dieser komplexen Vorgänge wird an dieser Stelle bewusst verzichtet, da es den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde.

8. Lymphangiogene Faktoren

Die Lymphangiogenese wird durch eine Reihe verschiedener Faktoren und Marker streng reguliert und charakterisiert. In den letzten Jahren wurden diesbezüglich weitere wichtige Erkenntnisse gewonnen, die das Verständnis der Lymphangiogenese sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Situationen deutlich erweitert haben. Als die ersten identifizierten und damit auch als sehr umfassend untersuchten prolymphangiogenen Faktoren gelten VEGF-C und VEGF-D⁶⁸. Letztere sind fester Bestandteil der Familie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), die eine zentrale Rolle beim Wachstum und der Entwicklung der Blut- (Angiogenese) und Lymphgefäße (Lymphangiogenese) einnimmt. Die VEGF-Familie besteht bei Säugetieren aus fünf strukturell verwandten Mitgliedern: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und dem eng mit ihnen verwandten Plazenta-Wachstumsfaktor (*placental growth factor* (PIGF)). Diese Faktoren beeinflussen das Wachstum und die Funktion der Endothelzellen über die entsprechenden transmembranösen VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), die zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehören sowie über deren Korezeptoren Neuropilin-1 (NRP1) und -2 (NRP2).

Die beiden prolymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D vermitteln ihre Wirkungen nahezu ausschließlich über die Bindung ihrer spezifischen Tyrosin-Kinasen-Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3, die auf Blut- und Lymphendothelzellen exprimiert werden. Entsprechend können VEGF-C und VEGF-D sowohl angiogen als auch lymphangiogen wirken^{69,70}. Beide Faktoren werden als Vorläufermoleküle (Präpropeptid) synthetisiert, um danach schrittweise über isoforme Zwischenstufen und durch die proteolytische Abspaltung der Propeptide ihre ausgereiften Strukturen zu erreichen. Mit zunehmendem Reifegrad der Moleküle erhöht sich die Bindungsaffinität gegenüber dem

VEGFR-3 Rezeptor. Wohingegen nur die vollständig prozessierten Formen in der Lage sind VEGFR-2 zu aktivieren^{70,71}.

Die unverarbeiteten oder nur partiell verarbeiteten Formen von VEGF-C und VEGF-D zeigen lediglich eine geringe Affinität für ihre Rezeptoren, das den Stellenwert der Prozessierung im Kontext der Rezeptorbindung hervorhebt⁷². Wie schon zuvor erwähnt, wird VEGFR-3 Rezeptor in der frühen Embryonalentwicklung von Blut- und Lymphendothelzellen exprimiert, während bei fortschreitender embryonaler Reifung die Expression in Blutendothelzellen herunterreguliert und ausschließlich auf Lymphendothelzellen beschränkt wird. Nichtsdestotrotz sind VEGF-C und VEGF-D in der Lage, sowohl angiogene als auch lymphangiogene Effekte auszuüben, da VEGFR-2 weiterhin von beiden Zelltypen exprimiert wird⁷³. Die Funktion beider Wachstumsfaktoren wurde in zahlreichen Tiermodellen erforscht. Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, ist die VEGF-C/VEGFR-3- Signalisierungskaskade für die Aussprossung und Reifung lymphatischer Vorläuferzellen unerlässlich und damit ein wichtiger Bestandteil der embryonalen Lymphgefäßentwicklung⁵⁴. So spielt sie eine essentielle Rolle bei der Proliferation, der Migration sowie dem Überleben der LEC⁷⁴. Bei Mäusen sowie Zebrafischen (Zebrafärbling), bei denen VEGF-C inaktiviert wurde, kam es zwar zur Differenzierung der LEC in den primitiven embryonalen Venen, jedoch misslang die anschließende Aussprossung sowie die Ausbildung der primären Lymphsäcke^{75,76}. Während eine homozygote Deletion von VEGF-C zu einer vollständigen Absenz eines lymphatischen Gefäßsystems bei Mäuseembryonen führte, zeigten VEGF-C heterozygote Mäuse eine schwere lymphatische Hypoplasie^{1,54}.

Anders sieht es bei dem lymphangiogenen Faktor VEGF-D aus, der keinen Einfluss auf die embryonale Lymphgefäßentwicklung zu haben scheint. Zwar ist VEGF-D ein potenter Stimulator der Lymphangiogenese, dennoch zeigten VEGF-D-defiziente Mäuse weder Anzeichen einer abnormalen Lymphgefäßentwicklung, noch gab es Hinweise auf pathologische Ödeme in der Haut oder den Organen der Versuchstiere. So bleibt der Einfluss von VEGF-D im Prozess der embryonalen Lymphgefäßentwicklung weiterhin ungeklärt^{27,77}.

Die Bindung des VEGFR-3-Rezeptors durch die zuvor erwähnten Liganden VEGF-C und VEGF-D induziert eine Aktivierung und somit eine Dimerisierung der Rezeptoren. Anschließend erfolgt die Autophosphorylierung von Tyrosinresten der zytosolischen Domäne der Rezeptoren. Die neu gebildeten Phosphotyrosinreste dienen dann als

Andockstelle („Docking-Sites“) für nachgeschaltete Signaltransduktionsmoleküle, die anschließende zelluläre Reaktionen koordinativ regulieren. Diese spezifische Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung führt schließlich zur Phosphorylierung der Serin-Kinasen AKT und ERK, die für die Proliferation, die Migration und das Überleben der LEC verantwortlich sind. Generell bildet VEGFR-3 nicht nur Homodimere, sondern ist zudem im Stande Heterodimere mit dem strukturell verwandten Rezeptor VEGFR-2 zu bilden²⁵. Insbesondere wurde festgestellt, dass die VEGFR-3/VEGFR-2-Komplexierung für die AKT-Aktivierung entscheidend ist, wohingegen die ERK-Aktivierung primär durch das VEGFR-3 Homodimer gesteuert wird⁷⁸.

VEGF-C und VEGF-D stellten für einen großen Zeitraum die einzigen bekannten Lymphangiogenesefaktoren dar. Inzwischen findet sich jedoch eine Vielzahl weiterer Faktoren, die einen bedeutenden Einfluss auf die Lymphangiogenese zeigen. Der Wachstumsfaktor VEGF-A, ein weiteres Mitglied der VEGF-Familie, kann auch die Lymphangiogenese stimulieren. Dies widerspricht der früheren Annahme, er fördere lediglich die Angiogenese. Durch Aktivierung der entsprechenden Rezeptortyrosinkinase VEGFR2, die durch LECs exprimiert wird, ist VEGF-A in der Lage, die Proliferation und Migration von Lymphendothelzellen *in vitro* zu induzieren. Anders als VEGF-C oder VEGF-D wirkt VEGF-A über die Stimulation des VEGFR2-Rezeptors, was in Antikörperversuchen bestätigt werden konnte. Die durch VEGF-A induzierte Proliferation konnte, genau wie die Migration der LECs, in Gegenwart von VEGFR2 blockierenden Antikörpern signifikant gehemmt werden. Demgegenüber hatte der Einsatz von VEGFR3 blockierenden Antikörpern keinen limitierenden Effekt auf das Proliferations- oder Migrationsverhalten der Lymphendothelzellen⁷⁹.

Mit dem *hepatocyte growth factor* (HGF; auch bekannt als *scatter factor*) wurde ein weiterer potenter lymphangiogener Faktor identifiziert. Dieser fördert die Proliferation, Migration und die Bildung röhrenförmiger Strukturen von LEC – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* – durch Aktivierung seines spezifischen Rezeptors HGF-R (HGF receptor, auch bekannt als MET/c-met)⁶¹. Damit übereinstimmend führte die künstliche Überexpression von HGF in transgenen Mäusen sowie die subkutane Injektion zu einer erhöhten Anzahl und Vergrößerung der Lymphgefäße. In spezifischen Studien konnte der proliferative Einfluss von HGF auf LEC mit einem blockierenden HGF-R-Antikörper aufgehoben werden, allerdings nicht durch Einsatz von hemmenden VEGFR3-Antikörpern. Diese Tatsache führt

zu der Annahme, dass sich der prolymphangiogene Effekt von HGF unabhängig vom VEGFR-3 Signalweg entwickelt²⁷.

Darüber hinaus verfügt auch *fibroblast Growth Factor 2* (FGF2, auch basic FGF) über einen bedeutenden Einfluss auf die Lymphangiogenese. Die stimulierende Wirkung von FGF2 kann dabei direkt über den entsprechenden Rezeptor ausgelöst werden. Durch Aktivierung des FGFR-1 vermittelten Signalwegs fördert FGF-2 die Proliferation, Migration und die Bildung röhrenförmiger Strukturen der LEC⁸⁰.

Weiterhin stimulieren die beiden Wachstumsfaktoren IGF-1 und IGF-2 die Lymphangiogenese *in vitro* und *in vivo*. Man nimmt an, dass diese beiden Faktoren über die Aktivierung ihrer spezifischen Rezeptoren (IGFR) einen direkten Einfluss auf die Ausbildung von neuen Lymphgefäßen haben, obgleich indirekte Effekte nach aktuellem Wissensstand über andere Wachstumsfaktor- oder Rezeptorsysteme nicht vollständig ausgeschlossen werden können⁵⁹.

Auch das Angiopoetin/Tie-System spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der Lymphgefäße. Die Angiopoetin-Familie umfasst vier Liganden (Ang-1, Ang-2 und Ang-3/4) und zwei entsprechende Tyrosinkinaserzeptoren (Tie1 und Tie2). Ang-1 wie auch Ang-2 können als Tie-2-Rezeptor-Agonisten während der lymphatischen Gefäßentwicklung wirken und haben eine entscheidende Funktion beim Umbau der Lymphgefäße sowie der Klappenmorphogenese⁸¹. Ang-3 und Ang-4 sind homolog, wobei Ang-3 bei der Maus und Ang-4 beim Menschen nachgewiesen wurden. Obgleich man annimmt, dass auch Ang-4 einen Einfluss auf das lymphatische Gefäßsystem hat, gibt es zum aktuellen Zeitpunkt noch keine genauen Erkenntnisse über die Rolle, die dieser Ligand einnimmt⁸².

Die Lymphangiogenese ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, der durch eine Reihe verschiedener Wachstumsfaktoren, Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen und intrazellulärer Signalwege geprägt wird, die u. a. zu Proliferation, Migration und zur Aussprossung der Lymphgefäße führen. Die Identifizierung der beschriebenen lymphangiogenen Faktoren und deren Rezeptoren ermöglichte ein grundlegendes Verständnis für einige, an der Lymphangiogenese beteiligten Mechanismen. Trotz zahlreicher Parallelen zwischen Blut- und Lymphgefäßsystemen gibt es eine große Vielzahl einzigartiger Prozesse, die ausschließlich die Entwicklung und die Reifung des Lymphgefäßsystems koordinieren.

Da die Forschung in Bezug auf die Lymphangiogenese im Vergleich zur Angiogenese noch relativ weit am Anfang steht, gilt es in den nächsten Jahren, die molekularen Grundlagen

weiter aufzuklären, um neue, effektivere Therapien für den Einsatz bei Lymphödemen zu entwickeln.

9. Mesenchymale Stammzellen

Vor kurzem stellten sich mesenchymale Stammzellen (MSCs) aufgrund ihrer bemerkenswerten Eigenschaften als vielversprechender Therapieansatz für die Lymphödemtherapie heraus⁸³. Als humane mesenchymale Stammzellen werden nicht hämatopoetische, multipotente Vorläuferzellen mit der Fähigkeit zur Differenzierung in osteogene, chondrogene und adipogene Zelllinien bezeichnet. Zunächst wurden diese Zellen primär aus dem Knochenmark isoliert. Inzwischen können mesenchymale Stammzellen allerdings aus fast allen Geweben gewonnen werden: Periost⁸⁴, Knorpel⁸⁵, Sehngewebe⁸⁶, Fettgewebe^{87,88}, Muskulatur⁸⁹, Lungengewebe⁹⁰, Nabelschnur⁹¹, Zahnmark⁹², Synovialhaut⁹³, Haut⁹⁴ etc.. Von der „International Society for Cellular Therapy (ISCT)“ wurden im Jahre 2006 Mindestkriterien für mesenchymale Stammzellen festgelegt, die eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien gewährleisten sollten. Diese Zellen sollten (a) in der Kultur plastik-adhären sein, (b) ein bestimmtes Expressionsmuster für Oberflächenantigene zeigen (positive Expression für Cluster of Differentiation (CD) 73, CD90, CD105 und fehlend für CD45, CD34, CD14, CD11), und (c) *in vitro* ein Differenzierungspotential in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten aufweisen⁹⁵.

10. Vergleich von BM-MSC und ADSC

Aufgrund des Umstandes, dass die Gewinnung von BM-MSC aus Knochenmark vergleichsweise gering und zudem die Prozedur der Gewinnung schmerzhaft und mit einem hohen Infektionsrisiko verbunden ist, verlagerte sich der Fokus in den vergangenen Jahren auf ADSC. Im Vergleich zu BM-MSC zeigen sich ADSC dahingehend vielversprechender, da sie sich in großer Menge mühelos mit minimalinvasiven Methoden isolieren lassen. Aufgrund dieses Vorteils kann durch eine einfache Fettabsaugung im Vergleich zu einer

Knochenmarkspunktion aus der gleichen Menge Gewebe eine 500-fach höhere Zahl an MSC gewonnen werden⁹⁶⁻⁹⁹.

Zu weiteren Vorteilen der ADSC gegenüber BM-MSC gehören eine höhere proliferative Kapazität, eine stärkere genetische und morphologische Stabilität sowie die Fähigkeit, ihr Differenzierungspotential in einer Langzeitkultur beizubehalten¹⁰⁰⁻¹⁰². Generell werden ADSCs als positiv für CD13, CD29, CD44, CD49d, CD73, CD90 und CD105 und als negativ für hämatopoetische Zelllinienmarker wie CD14, CD31, CD45 und CD14439-41 beschrieben¹⁰³⁻¹⁰⁵.

11. Mesenchymale Stammzellen in der Lymphangiogenese

Erste Studien an Lymphödemen wurden zunächst anhand mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSC) durchgeführt und zeigten interessante Ergebnisse. So konnte eine dieser Studien nach der Implantation von BM-MSC in einem Lymphödem-Modell der Maus im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, eine signifikante Reduktion der Schwellung feststellen. Ferner wurde beobachtet, dass MSCs *in vivo* und *in vitro* einen lymphatischen Phänotyp exprimieren, sobald diese lymphinduktiven Medien ausgesetzt werden¹⁰⁶. Eine weitere Studie ergab, dass eine autologe BM-MSC-Transplantation sich bei der Behandlung von Brustkrebs assoziiertem Lymphödemen im Vergleich zur KPE effektiv zeigte¹⁰⁷.

Mittlerweile gibt es aber auch zahlreiche Studien mit Hilfe von ADSC, die sich vielversprechend bei der Induktion der Lymphangiogenese und des Tissue Engineerings zeigen. So berichtete eine mexikanische Arbeitsgruppe, dass bei Patienten mit einem Lymphödem nach Mastektomie und axilliärer Lymphadenektomie die Behandlung durch eine ADSC-Injektion ebenso wirksam war wie eine konventionelle Entstauungsbehandlung. Interessanterweise zeigte sich im Vergleich beider Gruppen, dass jene Patienten, die eine ADSC-Injektion erhielten, einen kontinuierlichen Erfolg aufwiesen. Die Vergleichsgruppe hingegen musste zur Aufrechterhaltung des Erfolges einer dauerhaften Entstauungsbehandlung unterzogen werden¹⁰⁸. Kürzlich zeigten *Shimizu und Kollegen*, dass die lokale Implantation von autologen ADSC die Lymphangiogenese in einer Lymphödemregion bei Mäusen effektiv beschleunigt. Hierbei ließ sich eine erhöhte lokale Gewebekonzentration von VEGF-C- und HGF-mRNA nachweisen, wobei sich auch die

Plasmakonzentrationen von VEGF-C im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht zeigten¹⁰⁹.

Entgegen früherer Annahmen, das Zelldifferenzierungspotentials sei der ausschlaggebende Vorteil von ADSCs, geht man heute davon aus, dass ihre vorteilhafte Wirkung weitgehend in ihrer Fähigkeit liegt, zahlreiche Wachstumsfaktoren, Zytokine und anderen parakrine Faktoren in ihre Umgebung zu sezernieren¹⁰⁹. In der Tat berichteten *Takeda und Kollegen* kürzlich, dass kultivierte ADSCs die Lymphangiogenese *in vitro* durch multiple sekretorische Faktoren stark induzieren konnte¹¹⁰. Nachdem derzeitigen Stand der Forschung kann eine Vielzahl potentieller lymphangiogener Faktoren wie VEGF-A VEGF-C, VEGF-D, FGF-2, HGF, Ang -1 und IGF im konditionierten Medium von ADSCs nachgewiesen werden¹¹¹⁻¹¹³. Weiterhin zeigten verschiedene Forschungsgruppen, dass weniger als ein Prozent der systemisch verabreichten MSC länger als eine Woche nach der Injektion überlebten. Diese Tatsache könnte zusätzlich die Theorie stützen, dass die regenerativen Wirkungen von ADSC hauptsächlich durch parakrine Mechanismen vermittelt werden^{114,115}.

Aktuelle Forschungsgruppen versuchen Wege zu finden, um die Lymphangiogenese in pathologischen Vorgängen wie bei Lymphödemen mit ADSCs effektiver zu gestalten. In diesem Zusammenhang implantierten *Yan und Kollegen* unter Verwendung von Matrigel-Plugs, VEGF-C-vorbehandelte ADSCs in Mäuse und beobachteten eine erhöhte lymphangiogene Reaktion, während die Blockierung der TGF- β 1-Funktion diese Reaktion potenzierte¹¹⁶. In ähnlicher Weise konnte eine weitere Forschungsgruppe bei gleichzeitiger Verabreichung von ADSC und einem Hydrogel mit kontrollierter Freisetzung von VEGF-C die Schwellung in Hinterbeinen bei Mäusen im Lymphödemmodell signifikant reduzieren¹¹⁷. Darüber hinaus nutzten mehrere Studien Hypoxie als Hilfsmittel, um das regenerative Potenzial von ADSC weiter zu verbessern, da hypoxische Zustände zu Veränderungen der Genexpression führen¹¹⁸.

Fortschritte in unserem Verständnis, sowohl bei der zugrundeliegenden Pathophysiologie des Lymphödems als auch der Lymphangiogenese, haben in den letzten Jahren zu neuen effektiveren Behandlungsansätzen geführt. Ein fundierteres Verständnis der komplexen Mechanismen wird zu weiteren gezielten therapeutischen Optionen führen, um das Leiden der Patienten zukünftig zu lindern.

12. Literaturverzeichnis

1. Tammela, T. & Alitalo, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **140**, 460-476 (2010).
2. Cormier, J.N., Rourke, L., Crosby, M., Chang, D. & Armer, J. The surgical treatment of lymphedema: a systematic review of the contemporary literature (2004-2010). *Ann Surg Oncol* **19**, 642-651 (2012).
3. Swartz, M.A. & Lund, A.W. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nat Rev Cancer* **12**, 210-219 (2012).
4. Qi, S. & Pan, J. Cell-based therapy for therapeutic lymphangiogenesis. *Stem Cells Dev* **24**, 271-283 (2015).

5. Schulze, H., Nacke, M., Gutenbrunner, C. & Hadamitzky, C. Worldwide assessment of healthcare personnel dealing with lymphoedema. *Health Econ Rev* **8**, 10 (2018).
6. Bakar, Y. & Tugral, A. Lower Extremity Lymphedema Management after Gynecologic Cancer Surgery: A Review of Current Management Strategies. *Ann Vasc Surg* **44**, 442-450 (2017).
7. Gatt, M., Willis, S. & Leuschner, S. A meta-analysis of the effectiveness and safety of kinesiology taping in the management of cancer-related lymphoedema. *Eur J Cancer Care (Engl)* **26**(2017).
8. Friedman, J.F., *et al.* Risk factors associated with lymphedema after lymph node dissection in melanoma patients. *Am J Surg* **210**, 1178-1184; discussion 1184 (2015).
9. Merchant, S.J. & Chen, S.L. Prevention and management of lymphedema after breast cancer treatment. *Breast J* **21**, 276-284 (2015).
10. Triacca, V., *et al.* First Successful Experimental Implantation of a Drainage Device to Reduce Lymphoedema in a Rat Lymphoedema Model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2018).
11. Gk, L., Dp, P. & A, B. Surgical Treatment Modalities for Lymphedema. *Journal of Aesthetic & Reconstructive Surgery* **2**(2016).
12. Granzow, J.W., Soderberg, J.M., Kaji, A.H. & Dauphine, C. An effective system of surgical treatment of lymphedema. *Ann Surg Oncol* **21**, 1189-1194 (2014).
13. Rissanen, T.T., *et al.* VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* **92**, 1098-1106 (2003).
14. Szuba, A., *et al.* Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* **16**, 1985-1987 (2002).
15. Yoon, Y.S., *et al.* VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. *The Journal of clinical investigation* **111**, 717-725 (2003).
16. Enholm, B., *et al.* Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-C induces lymphangiogenesis in the skin. *Circulation research* **88**, 623-629 (2001).
17. Saaristo, A., *et al.* Vascular endothelial growth factor-C gene therapy restores lymphatic flow across incision wounds. *FASEB J* **18**, 1707-1709 (2004).
18. Liu, Y., *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) gene transfer in rat model of secondary lymphedema. *Vascul Pharmacol* **49**, 44-50 (2008).
19. Onishi, T., *et al.* Topical bFGF Improves Secondary Lymphedema through Lymphangiogenesis in a Rat Tail Model. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **2**, e196 (2014).
20. Saito, Y., *et al.* Transfection of human hepatocyte growth factor gene ameliorates secondary lymphedema via promotion of lymphangiogenesis. *Circulation* **114**, 1177-1184 (2006).
21. Alitalo, K., Tammela, T. & Petrova, T.V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* **438**, 946-953 (2005).
22. Brown, H.M. & Russell, D.L. Blood and lymphatic vasculature in the ovary: development, function and disease. *Hum Reprod Update* **20**, 29-39 (2014).
23. Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*, (Thieme, Stuttgart, 2019).

24. Choi, I., Lee, S. & Hong, Y.K. The new era of the lymphatic system: no longer secondary to the blood vascular system. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006445 (2012).
25. Butler, M.G., Isogai, S. & Weinstein, B.M. Lymphatic development. *Birth Defects Res C Embryo Today* **87**, 222-231 (2009).
26. Maby-El Hajjami, H. & Petrova, T.V. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* **130**, 1063-1078 (2008).
27. Cueni, L.N. & Detmar, M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* **126**, 2167-2177 (2006).
28. M.Földi, E.F., S. Kubik. *Lehrbuch der Lymphologie*, (Urban & Fischer, München, 2010).
29. Oliver, G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* **4**, 35-45 (2004).
30. Miller, M.J., McDole, J.R. & Newberry, R.D. Microanatomy of the intestinal lymphatic system. *Ann N Y Acad Sci* **1207 Suppl 1**, E21-28 (2010).
31. Baluk, P., *et al.* Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med* **204**, 2349-2362 (2007).
32. Liersch, R. & Detmar, M. Lymphangiogenesis in development and disease. *Thromb Haemost* **98**, 304-310 (2007).
33. Zawieja, D.C. Contractile physiology of lymphatics. *Lymphat Res Biol* **7**, 87-96 (2009).
34. Sacchi, G., Weber, E., Agliano, M., Raffaelli, N. & Comparini, L. The structure of superficial lymphatics in the human thigh: precollectors. *Anat Rec* **247**, 53-62 (1997).
35. Schulte-Merker, S., Sabine, A. & Petrova, T.V. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol* **193**, 607-618 (2011).
36. Gashev, A.A. Physiologic aspects of lymphatic contractile function: current perspectives. *Ann N Y Acad Sci* **979**, 178-187; discussion 188-196 (2002).
37. Swartz, M.A. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev* **50**, 3-20 (2001).
38. Planas-Paz, L. & Lammert, E. Mechanical forces in lymphatic vascular development and disease. *Cell Mol Life Sci* **70**, 4341-4354 (2013).
39. Jeltsch, M., Tammela, T., Alitalo, K. & Wilting, J. Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* **314**, 69-84 (2003).
40. Kesler, C.T., Liao, S., Munn, L.L. & Padera, T.P. Lymphatic vessels in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **5**, 111-124 (2013).
41. Albrecht, I. & Christofori, G. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int J Dev Biol* **55**, 483-494 (2011).
42. Gale, N.W., *et al.* Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol Cell Biol* **27**, 595-604 (2007).
43. Detmar, M. & Hirakawa, S. The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J Exp Med* **196**, 713-718 (2002).
44. Hong, Y.K., *et al.* Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet* **36**, 683-685 (2004).
45. Hong, Y.K., *et al.* Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* **225**, 351-357 (2002).
46. Petrova, T.V., *et al.* Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* **21**, 4593-4599 (2002).

47. Wigle, J.T., *et al.* An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* **21**, 1505-1513 (2002).
48. Wigle, J.T. & Oliver, G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* **98**, 769-778 (1999).
49. Johnson, N.C., *et al.* Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. *Genes Dev* **22**, 3282-3291 (2008).
50. Yu, P., Tung, J.K. & Simons, M. Lymphatic fate specification: an ERK-controlled transcriptional program. *Microvasc Res* **96**, 10-15 (2014).
51. Kim, H., *et al.* Embryonic vascular endothelial cells are malleable to reprogramming via Prox1 to a lymphatic gene signature. *BMC Dev Biol* **10**, 72 (2010).
52. Chen, H., Griffin, C., Xia, L. & Srinivasan, R.S. Molecular and cellular mechanisms of lymphatic vascular maturation. *Microvasc Res* **96**, 16-22 (2014).
53. Hagerling, R., *et al.* A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. *EMBO J* **32**, 629-644 (2013).
54. Karkkainen, M.J., *et al.* Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**, 74-80 (2004).
55. Bautch, V.L. & Caron, K.M. Blood and lymphatic vessel formation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a008268 (2015).
56. Joukov, V., *et al.* A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **15**, 1751 (1996).
57. Villefranc, J.A., *et al.* A truncation allele in vascular endothelial growth factor c reveals distinct modes of signaling during lymphatic and vascular development. *Development* **140**, 1497-1506 (2013).
58. Auguste, P., Javerzat, S. & Bikfalvi, A. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* **314**, 157-166 (2003).
59. Bjorndahl, M., *et al.* Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15593-15598 (2005).
60. Cao, R., *et al.* PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* **6**, 333-345 (2004).
61. Kajiya, K., Hirakawa, S., Ma, B., Drinnenberg, I. & Detmar, M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J* **24**, 2885-2895 (2005).
62. Kubo, H., *et al.* Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8868-8873 (2002).
63. Shin, J.W., *et al.* Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for FGF signaling in lymphangiogenesis. *Mol Biol Cell* **17**, 576-584 (2006).
64. Uhrin, P., *et al.* Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood* **115**, 3997-4005 (2010).
65. Bertozzi, C.C., *et al.* Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* **116**, 661-670 (2010).
66. Finney, B.A., *et al.* CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood* **119**, 1747-1756 (2012).
67. Yang, Y. & Oliver, G. Development of the mammalian lymphatic vasculature. *J Clin Invest* **124**, 888-897 (2014).

68. Christiansen, A. & Detmar, M. Lymphangiogenesis and cancer. *Genes Cancer* **2**, 1146-1158 (2011).
69. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem* **153**, 13-19 (2013).
70. Joukov, V., *et al.* Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* **16**, 3898-3911 (1997).
71. Stacker, S.A., *et al.* Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* **274**, 32127-32136 (1999).
72. Stacker, S.A., Baldwin, M.E. & Achen, M.G. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* **16**, 922-934 (2002).
73. Achen, M.G., McColl, B.K. & Stacker, S.A. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* **7**, 121-127 (2005).
74. Makinen, T., *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* **20**, 4762-4773 (2001).
75. Yaniv, K., *et al.* Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* **12**, 711-716 (2006).
76. Kuchler, A.M., *et al.* Development of the zebrafish lymphatic system requires VEGFC signaling. *Curr Biol* **16**, 1244-1248 (2006).
77. Pichol-Thievend, C., Hogan, B.M. & Francois, M. Lymphatic vascular specification and its modulation during embryonic development. *Microvasc Res* **96**, 3-9 (2014).
78. Deng, Y., Zhang, X. & Simons, M. Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 421-429 (2015).
79. Hirakawa, S., *et al.* VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* **201**, 1089-1099 (2005).
80. Chang, L.K., *et al.* Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11658-11663 (2004).
81. Eklund, L., Kangas, J. & Saharinen, P. Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. *Clin Sci (Lond)* **131**, 87-103 (2017).
82. Kesler, C.T., *et al.* Angiopoietin-4 increases permeability of blood vessels and promotes lymphatic dilation. *FASEB J* **29**, 3668-3677 (2015).
83. Beerens, M., *et al.* Multipotent Adult Progenitor Cells Support Lymphatic Regeneration at Multiple Anatomical Levels during Wound Healing and Lymphedema. *Sci Rep* **8**, 3852 (2018).
84. Nakahara, H., *et al.* Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* **11**, 181-188 (1990).
85. Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T. & Lotz, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* **50**, 1522-1532 (2004).
86. Salingcarnboriboon, R., *et al.* Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* **287**, 289-300 (2003).
87. Zuk, P.A., *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279-4295 (2002).

88. De Ugarte, D.A., *et al.* Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* **174**, 101-109 (2003).
89. Jankowski, R.J., Deasy, B.M. & Huard, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* **9**, 642-647 (2002).
90. Noort, W.A., *et al.* Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* **30**, 870-878 (2002).
91. Kermani, A.J., Fathi, F. & Mowla, S.J. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation Res* **11**, 379-386 (2008).
92. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625-13630 (2000).
93. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. & Luyten, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* **44**, 1928-1942 (2001).
94. Toma, J.G., *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3**, 778-784 (2001).
95. Dominici, M., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
96. Baer, P.C. & Geiger, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* **2012**, 812693 (2012).
97. Mehrabani, D., Mehrabani, G., Zare, S. & Manafi, A. Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) and Aesthetic Surgery: A Mini Review. *World J Plast Surg* **2**, 65-70 (2013).
98. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O. & Michalek, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* **21**, 2724-2752 (2012).
99. Caruana, G., *et al.* Role of adipose-derived stem cells in chronic cutaneous wound healing. *Ann Ital Chir* **86**, 1-4 (2015).
100. 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* **24**, 1294-1301 (2006).
101. Ravid, O., *et al.* Relative genomic stability of adipose tissue derived mesenchymal stem cells: analysis of ploidy, H19 long non-coding RNA and p53 activity. *Stem Cell Res Ther* **5**, 139 (2014).
102. Izadpanah, R., *et al.* Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* **99**, 1285-1297 (2006).
103. Mitchell, J.B., *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **24**, 376-385 (2006).
104. Yoshimura, K., *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* **208**, 64-76 (2006).
105. Katz, A.J., Tholpady, A., Tholpady, S.S., Shang, H. & Ogle, R.C. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* **23**, 412-423 (2005).

106. Conrad, C., *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. *Circulation* **119**, 281-289 (2009).
107. Hou, C., Wu, X. & Jin, X. Autologous bone marrow stromal cells transplantation for the treatment of secondary arm lymphedema: a prospective controlled study in patients with breast cancer related lymphedema. *Jpn J Clin Oncol* **38**, 670-674 (2008).
108. Maldonado, G.E.M., *et al.* Autologous stem cells for the treatment of post-mastectomy lymphedema: a pilot study. *Cytotherapy* **13**, 1249-1255 (2011).
109. Shimizu, Y., Shibata, R., Shintani, S., Ishii, M. & Murohara, T. Therapeutic lymphangiogenesis with implantation of adipose-derived regenerative cells. *Journal of the American Heart Association* **1**, e000877 (2012).
110. Takeda, K., Sowa, Y., Nishino, K., Itoh, K. & Fushiki, S. Adipose-derived stem cells promote proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells in vitro by secreting lymphangiogenic factors. *Annals of plastic surgery* **74**, 728-736 (2015).
111. Wang, M., Crisostomo, P.R., Herring, C., Meldrum, K.K. & Meldrum, D.R. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R880-884 (2006).
112. Schaffler, A. & Buchler, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* **25**, 818-827 (2007).
113. Hsiao, S.T., *et al.* Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev* **21**, 2189-2203 (2012).
114. Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. & Perez-Fernandez, R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* **18**(2017).
115. Parekkadan, B. & Milwid, J.M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* **12**, 87-117 (2010).
116. Yan, A., *et al.* Adipose-derived stem cells promote lymphangiogenesis in response to VEGF-C stimulation or TGF-beta 1 inhibition. *Future Oncol* **7**, 1457-1473 (2011).
117. Hwang, J.H., *et al.* Therapeutic lymphangiogenesis using stem cell and VEGF-C hydrogel. *Biomaterials* **32**, 4415-4423 (2011).
118. Kalinina, N., *et al.* Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther* **6**, 221 (2015).

13. Originalpublikation

Nima Ahmadzadeh, Jan W.Robering, AnnikaKengelbach-Weigand, MajidaAl-Abboodi, Justus P.BeierRaymund, E.Horch, Anja M.Boos:
 Human adipose-derived stem cells support lymphangiogenesis *in vitro* by secretion of lymphangiogenic factors.
Experimental Cell Research Volume 388, Issue 2, 15 March 2020, 111816
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111816>