

Isolierung, Charakterisierung und Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen  
aus der Plazenta.

[Etablierung eines Modells zur plazentaren Angiogenese.]

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jessica Eckhardt  
aus New York, U.S.A.

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Gf. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Gutachter: Prof. Dr. M. Zygmunt

Gutachterin: PD Dr. M. Just

Tag der Disputation: 20.02.2007

für meine Großeltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Das Blutgefäßsystem und seine Entstehung</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Plazenta</b>	<b>8</b>
1.2.1 Gefäßneubildung in der Plazenta	8
1.2.2 Die reife Plazenta	9
1.2.3 Aufbau der Plazentazotten	10
1.2.4 Funktion der Plazenta	13
<b>1.3 Endothelzellen</b>	<b>15</b>
1.3.1 Endothelzellmarker	18
<b>2 Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Untersuchungsmaterial</b>	<b>21</b>
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.3 Reagenzien für die Zellisolierung/Zellkultur	22
3.1.4 Reagenzien für die magnetische Aufreinigung	22
3.1.5 Reagenzien für die Durchflußzytometrie	23
3.1.6 Sonstige Reagenzien	24
<b>3.2 Untersuchungsmethoden</b>	<b>25</b>
3.2.1 Isolierung von humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen (HPMVEC)	25
3.2.2 Aufreinigung der Mischkultur mit CD 105 MicroBeads	27
3.2.2.1 Prinzip der magnetischen Zellseparation	27
3.2.2.2 Durchführung	29
3.2.3 Zellkultur	30

3.2.3.1	Kultivierung der HPMVEC	30
3.2.3.2	Einfrieren, Lagerung und Auftauen placentarer Zellen	30
3.2.3.3	Zellzahlbestimmung	30
3.2.4	Charakterisierung der Endothelzellen mittels Durchflußzytometrie	31
3.2.4.1	Prinzip der Durchflußzytometrie	31
3.2.4.2	Durchführung	33
3.2.4.3	Verwendete Antikörper	35
3.2.4.4	Messung und Auswertung	38
3.2.5	Funktionelle Charakterisierung der HPMVEC	39
3.2.5.1	Hintergrund	39
3.2.5.2	Durchführung	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolierung der HPMVEC</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Aufreinigung der Zellen mit CD 105 MicroBeads</b>	<b>42</b>
<b>4.3</b>	<b>FACS Analyse der Mischkultur</b>	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>FACS Analyse der aufgereinigten Zellen</b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b>Inkorporation von Dil-Ac-LDL</b>	<b>49</b>
4.5.1	Färbung	49
4.5.2	FACS Analyse	50
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Methoden zur Isolierung von placentaren Endothelzellen</b>	<b>52</b>
<b>5.2</b>	<b>Neue Methode zur Isolierung von HPMVEC mit CD 105 MicroBeads</b>	<b>55</b>
5.2.1	Verwendung von CD 105 (Endoglin)/ kritische Betrachtung der Methode	56

<b>5.3 Ausblick</b>	<b>58</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>7 Summary</b>	<b>61</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>10 Erklärung</b>	<b>78</b>
<b>11 Danksagungen</b>	<b>79</b>
<b>12 Lebenslauf</b>	<b>80</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Blutgefäßsystem und seine Entstehung

Ein reich verzweigtes Netzwerk von Blutgefäßen gewährleistet im menschlichen Organismus die optimale Versorgung jeder Zelle mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Form des Gefäßsystems resultiert aus der Balance zwischen Faktoren, die die Blutbahnbildung begünstigen und jenen, die sie verhindern (Bergers und Benjamin, 2003). Auf der einen Seite muß jedes Gewebe ausreichend versorgt werden, auf der anderen Seite geht eine übermäßige Blutbahnbildung mit pathologischen Zuständen wie Tumorwachstum, Metastasierung, diabetischer Retinopathie, rheumatoider Arthritis und Kollateralenbildung bei okklusiven Gefäßerkrankungen einher (Hanahan *et al.*, 1996). Entsprechend erfolgt die Neovaskularisation im gesunden adulten Organismus nach dem Aufbau des Gefäßsystems in der Embryogenese nur im Rahmen der Wundheilung (Brown *et al.*, 1992) und im Reproduktionstrakt unter anderem während des Aufbaus der Plazenta während der Schwangerschaft (Reynolds *et al.*, 1992; Gordon *et al.*, 1995; Augustin, 2005).

Die Bildung neuer Blutgefäße erfolgt im Rahmen der Vaskulogenese und Angiogenese. Während der Vaskulogenese bilden Endothelvorläuferzellen (Angioblasten), die durch Differenzierung aus dem Mesoderm entstanden sind, im Embryo ein erstes primitives Gefäßnetz aus. Hierbei läßt sich die Induktion der Angioblasten von der Bildung der primordialen Gefäße unterscheiden (Flamme *et al.*, 1997; Risau *et al.*, 1997; Zygmunt, 2006). Der Ausbau in ein komplexes Gefäßsystem erfolgt im Rahmen der Angiogenese, die durch eine Vielzahl an Faktoren vermittelt wird, welche entweder von den Gefäßzellen selbst oder von akzessorischen Zellen produziert werden.

Angiogenesefaktoren induzieren zunächst eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und die Auflösung der Basalmembran bereits existierender Blutgefäße mit anschließender Proliferation und Migration von Endothelzellen zu den Orten der Gefäßneubildung. Dort kommt es dann zur Formation röhrenförmiger Strukturen, die nach Assoziation von glatten Muskelzellen bzw. Perizyten im Zusammenspiel mit Angiogenesefaktoren zu intakten Blutgefäßen maturieren.

## 1.2 Plazenta

### 1.2.1 Gefäßneubildung in der Plazenta

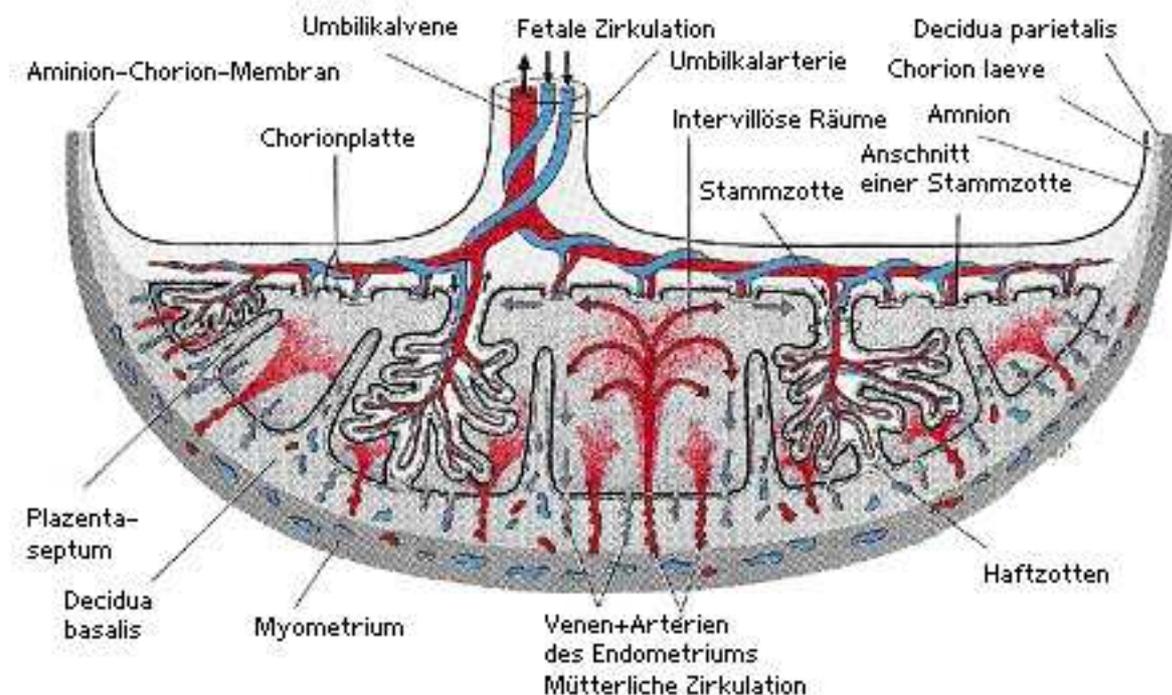
Die Entwicklung des Gefäßsystems der Plazenta gewährleistet einen adäquaten Gasaustausch sowie den Transport von Nährstoffen zwischen Mutter und Fetus und ist somit für eine normale embryonale Entwicklung und das fetale Wachstum von entscheidender Bedeutung. Eine schlecht entwickelte placentare Vaskulatur ist häufig mit Frühaborten (Meegdes *et al.*, 1988), Restriktion des fetalen Wachstums (Teasdale *et al.*, 1984; Hitschold *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1995; Krebs *et al.*, 1996), hohem Risiko von intrauterinem Fruchttod, hoher perinataler Mortalität und Morbidität (Khong *et al.*, 1986) sowie, belegt durch epidemiologische Studien, einer hohen Inzidenz von Hypertonie, Diabetes, Schlaganfall und anderen kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter assoziiert (Barker, 1990).

Die Entwicklung der placentaren Vaskulatur beginnt am 21. Tag nach der Konzeption (Demir *et al.*, 1989; Asan *et al.*, 1999). Im Stadium der Primärzotten, während der Implantation, bestehen diese aus einem massiven zytotrophostatischen Kern, der lediglich von einer Schicht von Synzytiotrophoblasten umgeben ist. Durch Einsprossung mesenchymalen Mesoderms differenzieren sie zu Sekundärzotten. Der Prozeß der Vaskulogenese in der Plazenta kann zum ersten Mal im Stadium der Tertiärzotten beobachtet werden. Hier findet man erstmals runde, in Schnüren angeordnete Zellen, die sogenannten Hämangioblasten. Am 28. Tag *post conceptionem* können bereits Lumina in den neu entstandenen Gefäßen differenziert und ab dem 32. Tag die ersten Erythrozyten in den Gefäßen festgestellt werden. Auch die Kapillarentstehung im Rahmen der Angiogenese wird ca. ab dem 32.Tag *post conceptionem* beobachtet, wobei die Vaskulogenese bis zur 10. bis 12. Schwangerschaftswoche anhält (Zygmunt, 2006). In der 6. Schwangerschaftswoche findet die Reifung der Gefäße statt. Sie werden durch eine komplette Schicht von Perizyten sowie eine Basalmembran bedeckt. Ab der 12. Schwangerschaftswoche bilden die Kapillaren Sinusoide aus und wachsen dicht in die Trophoblastschicht hinein. Die Entstehung neuer Gefäße wird in der ersten Hälfte der Schwangerschaft weitgehend abgeschlossen (Zygmunt, 2001; Zygmunt *et al.*, 2003).

## 1.2.2 Die reife Plazenta

Die Plazenta hat zur Zeit der Geburt einen Durchmesser von etwa 15-20 cm und ein Gewicht von 500-600 g (Zygmunt, 2006). Sie besteht aus mütterlichen und fetalen Anteilen und ist wie folgt aufgebaut: Die Nabelschnur mit ihren zwei Arteriae umbilicales, die um die zentrale Vena umbilicales gelegen sind, inseriert an der Chorionplatte, wobei die Gefäße zum Plazentarand hin verlaufen und letztlich zu den Zottenbäumen an der Unterseite der Chorionplatte gelangen. Die Basalplatte bildet die basale Begrenzung des intervillösen Raumes und geht aus der Durchmischungszone von invasivem Trophoblasten und persistierendem Endometrium hervor.

Am Plazentarand verschmelzen Chorion- und Basalplatte zum Chorion laeve, welches vor allem aus degenerativen Geweben besteht. Innen liegt dem Chorion laeve das Amnion an, welches das Fruchtwasser und den Fetus umschließt. Unter der Geburt erfolgt die Lösung der Plazenta entlang einer präformierten Degenerationszone, welche quer durch das Durchmischungsgebiet von mütterlichen und placentaren Geweben verläuft. Die Lösungsfläche ist gekennzeichnet durch die mütterlichen Kotyledonen, wobei etwa ein bis vier Zottenbäume auf einen Kotyledon entfallen.



**Abb.1.1:** Schematische Darstellung der reifen Plazenta (aus Moore & Persaud, 1996; „Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen“)

### 1.2.3 Aufbau der Plazentazotten

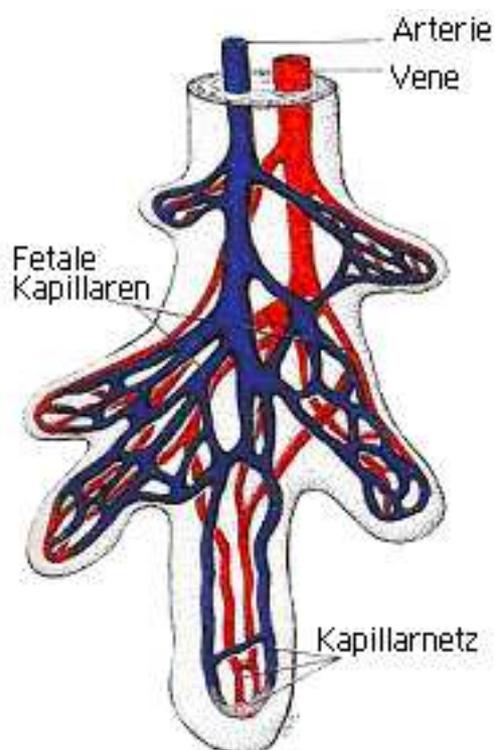
Im Inneren der Zottenbäume, von denen die Plazenta 40-60 zum Zeitpunkt der Geburt enthält, verlaufen fetale Gefäße, während sie von außen von mütterlichem Blut umspült werden. Für die mechanische Stabilität der Zottenbäume sowie für ihr Längenwachstum und die Durchblutungsregulation sind die Zottenstämme und größeren Äste verantwortlich, während die Terminalzotten Ort der Transport-, Synthese- und endokrinen Leistungen sind. Die Zotten sind von außen nach innen wie folgt aufgebaut: Die Zotten werden an ihrer Oberfläche von einer Lage aus Synzytiotrophoblasten umgeben. Diese umhüllen die Zotten und werden im intervillösen Raum von mütterlichem Blut umspült. Der Synzytiotrophoblast stellt die Abgrenzung zwischen maternalem und fetalem Kreislauf dar. Dadurch wird sowohl ein unkontrollierter parazellulärer Stoffaustausch durch ein Fehlen von lateralen Interzellularspalten verhindert, als auch aktiv in maternofetale wie fetomaternale Transportprozesse eingegriffen.

Es folgt eine Schicht aus Zytotrophoblastenzellen (Langhans-Zellen), die im ersten Trimenon die Zotten fast vollständig umschließen. Im Verlaufe der Gravidität fusionieren die Zellen mit dem Synzytium. Die Hauptaufgabe der Zytotrophoblasten ist es, zu Wachstum und Regeneration des Synzytiotrophoblasten beizutragen, sowie Somatostatin zu synthetisieren, welches die Hormonproduktion des Synzytiotrophoblasten reguliert.

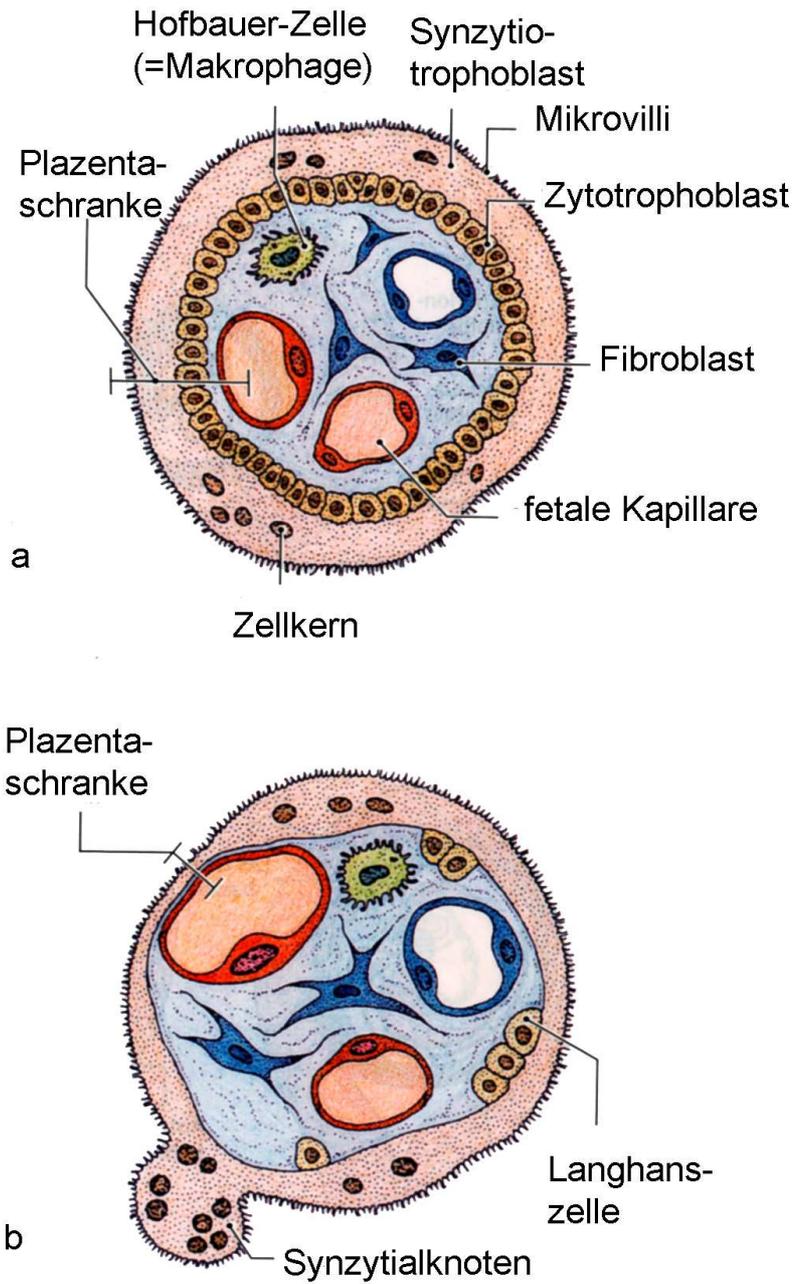
Die Basalmembran der Trophoblastenzellschicht trennt diese vom Zottengewebe. Das Zottengewebe besteht aus Fibroblasten, die mit der Produktion von Kollagenfasern zur mechanischen Stabilität beitragen. Hofbauer-Zellen (Makrophagen) sezernieren Faktoren, die das Wachstum und die Differenzierung der Plazentazotten beeinflussen. Die Zellen vermitteln vor allem den Proteintransport zwischen Mutter und Fetus, da nur Immunglobuline die Grenze zwischen beiden Organismen ungehindert überschreiten können.

Eine fetale Kapillar- Basalmembran bildet die Abgrenzung zwischen Zottengewebe und fetalen Blutgefäßen. Die fetalen Blutgefäße, vor allem die Kapillaren der Terminalzotten, sind am transplazentaren Austausch beteiligt. Um den Widerstand des extrakorporalen Gefäßbettes zu reduzieren, sind sie zu weitlumigen Sinusoiden dilatiert.

Diese sechsschichtige Plazentabariere besteht ab der 5. Woche *post conceptionem* und verändert sich in dieser Zeit vorwiegend quantitativ.



**Abb.1.2:** Schematische Darstellung des Kapillarnetzes und des fetalen Blutes in einer Chorionzotte (aus Moore & Persaud, 1996; „Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen“)



**Abb.1.3:** Querschnitt durch die Zotte. (a) junge Zotte bis zum 4. Monat; (b) Zotte im 4. Monat. (aus Ulfing, 2005; „Kurzlehrbuch Embryologie“)

#### 1.2.4 Funktion der Plazenta

Die Hauptaufgabe der Plazenta ist die Gewährleistung des Transportes von Nährstoffen und Abfallprodukten zwischen Mutter und Fetus. Die Erfüllung dieser Aufgabe wird erst durch die räumliche Nähe des maternalen und fetalen Gefäßsystemes in der Plazenta ermöglicht, wobei es jedoch nicht zu einer Durchmischung von fetalem und maternalem Blut kommt. Entlang der synzytiokapillären Membran, die das maternale und fetale Blut trennt, findet der Stoffaustausch statt. Dabei überwinden Gase wie Sauerstoff und Kohlendioxid die Plazentabariere durch Diffusion, die entlang von Konzentrations- bzw. Druckgradienten stattfindet. Das Hauptenergiesubstrat für die Plazenta und den Fetus, die Glukose, wird durch erleichterte Diffusion, d.h. mit Hilfe von Trägermolekülen über die Plazenta transportiert (Zygmunt, 2006). Ein aktiver, energieabhängiger Transport wird etwa zur Übertragung von Aminosäuren und zur Anreicherung von lipidlöslichen Vitaminen gegen ein Konzentrationsgefälle genutzt. Höhermolekulare Substanzen, wie z.B. Immunglobuline (IgG) und Glykoproteine, werden mittels Pinozytose durch die Zellmembran des Zytotrophoblasten von der maternalen auf die fetale Seite transportiert.

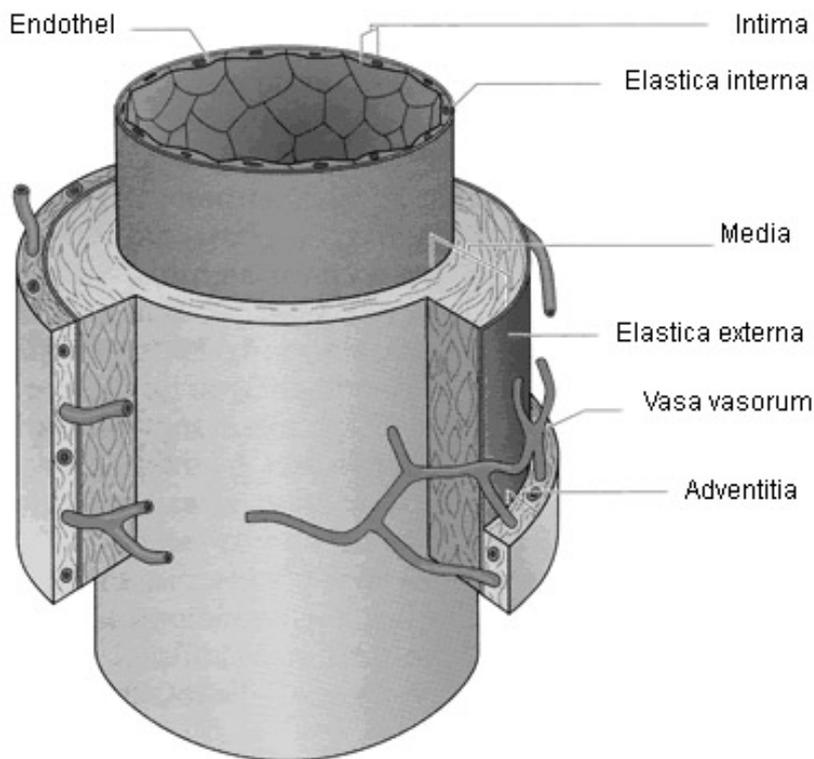
Neben ihrer Funktion als Austauschorgan erfüllt die Plazenta auch endokrine Aufgaben. Schon während der Einnistung produziert der Trophoblast Peptidhormone, die in Struktur und Funktion Hormonen des Hypophysenvorderlappens ähneln. Dazu gehört unter anderem das humane Choriongonadotropin (hCG), welches in der Frühschwangerschaft verstärkt gebildet wird und, nachgewiesen im Urin der Mutter, beim Schwangerschaftstest bestimmt wird. Das humane Plazentalaktogen (hPL), welches in seiner Struktur weitgehend dem hypophysären Wachstumshormon gleicht, dient der Erhaltung des Schwangerschaftsgelbkörpers. Seine Spiegel im mütterlichen Blut und Harn steigen bis Schwangerschaftsende kontinuierlich und gelten als Indikator der Plazentafunktion. Daneben bewirkt hPL eine starke Lipolyse im mütterlichen Organismus. Es kommt zum Anstieg freier Fettsäuren, die der Mutter als Energiequelle dienen, damit freie Glucose dem Fetus zur Verfügung steht.

Weiterhin werden unter Verwendung maternaler Vorstufen (wie z.B. Cholesterin) Steroidhormone wie Progesteron und Östrogene gebildet. Plazentare Östrogene unterstützen das Wachstum und die Synthese kontraktiler Proteine im Myometrium. Außerdem stimulieren sie die Prostaglandinsynthese und tragen zur Zervixreifung bei.

Vor allem Östriol wird diagnostisch zur Überwachung der fetoplazentaren Einheit bei Verdacht auf eine Plazentainsuffizienz genutzt. Plazentares Progesteron hingegen unterstützt das Endometrium, indem es günstige Nidationsverhältnisse schafft und dem Erhalt der Schwangerschaft dient. Es hemmt die Kontraktilität der glatten uterinen Muskulatur und somit die Wehen („Progesteronblock“). Desweiteren fördert Progesteron die Mammo- und Laktogenese und wird zur Beurteilung des fetalen Zustandes in der Frühschwangerschaft herangezogen (Zygmunt, 2006).

### 1.3 Endothelzellen

Das Endothel stellt die räumliche Abtrennung des Intravasal- zum Extravasalraum dar. Ein Monolayer von Endothelzellen kleidet die Lumina aller Blutgefäße aus und bildet die Kapillaren der Endstrombahn. Die einzelnen Endothelzellen bilden gemeinsam mit der Basallamina die Tunica intima. Daran schließt sich nach außen hin die Tunica media an, gefolgt von der Lamina elastica interna und externa. Vom umliegenden Gewebe wird das Blutgefäß von der Adventitia abgegrenzt.



**Abb. 1.4:** Aufbau der Gefäßwand

Das Endothel bildet somit eine Permeabilitätsgrenze und kontrolliert den Transport sowohl flüssiger als auch makromolekularer Komponenten. Diese dienen der Funktion und Ernährung der eigenen Zellen und des umliegenden Gewebes. Der Transport von Flüssigkeiten vom Blutstrom über die Zellen in das umliegende Gewebe erfolgt über eine Reihe von Mechanismen und ist stark organspezifisch. In einigen Kapillaren des Körpers ist das Endothel fenestriert, was eine schnelle Passage von großen Molekülen (z.B. in endokrinen Drüsen) oder großen Mengen an Flüssigkeit (in der Niere) möglich

macht. Im Gegensatz dazu sind die Endothelzellen in Teilen des Gehirns nahezu impermeabel und bilden auf diese Weise die Blut-Hirnschranke.

Durch die regulierte Expression von Oberflächenmolekülen wie Endotheliale Leukozytenadhäsionsprotein (E-Selektin), Granulum-Membranprotein 140 (GMP 140), Induzierbarem Zelladhäsionsmolekül (I-CAM) und Vaskulärem Zelladhäsionsmolekül (V-CAM) regulieren Endothelzellen die heterogene Adhäsion von Neutrophilen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Die folgende Extravasation der Abwehrzellen in das umliegende Gewebe stellt einen wichtigen Schritt des Immunsystems im Rahmen von Entzündungsreaktionen dar. Darüber hinaus beeinflusst das Endothel die Koagulationsfähigkeit des Blutes, beginnend mit der induzierten Adhäsion von Blutplättchen an die Endothelzellen. Das Endothel wirkt aktivierend auf die Blutgerinnung und inhibierend auf die Fibrinolyse durch die Synthese des Gerinnungsfaktors V und des von-Willebrand-Faktors (vWF), Bindung und Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IXa und XII, sowie Sekretion der Inhibitoren der Plasminogenaktivatoren (PAI I und II). Im Gegensatz dazu besitzt das Endothel auch antithrombotische Eigenschaften durch die Synthese von Heparanproteoglykan zur Inaktivierung von Thrombin, die Bindung und Inaktivierung von Thrombin durch Thrombomodulin und die Sekretion der Protease Nexin. Außerdem können Endothelzellen Plasminogenaktivatoren synthetisieren und die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten durch Bildung von Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und 13-Hydroxylinolensäure (13-HODE) und Stickstoffmonoxid (NO) hemmen.

Endothelzellen können veränderte Strömungs- und Druckverhältnisse erfassen (Urbich *et al.*, 2000) und diese Information an Nachbarzellen weiterleiten. Der gleichförmige Blutstrom ist unter anderem notwendig, um die Apoptose der Endothelzellen zu verhindern und gewährleistet dadurch funktionstüchtige Blutgefäße. In Folge kann auch der Kontraktionszustand der Muskelzellen der Media reguliert werden und entweder zu deren Relaxation oder Konstriktion führen. Physiologisch wichtige Vasodilatoren sind NO und PGI<sub>2</sub>. Angiotensin II und Endothelin gehören zu den physiologischen Vasokonstriktoren.

Zur Aufrechterhaltung des *status quo* des Endothels und des gesamten Blutbahnsystemes ist ebenfalls die Angiogenese von entscheidender Bedeutung. Dieser komplexe Prozeß scheint auf den Bereich der postkapillären und kleinen terminalen

Venolen, die ein abgeflachtes Endothel, eine Basalmembran, Perizyten und wenige glatte Muskelzellen aufweisen, beschränkt zu sein. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgänge ist in vorherigen Kapiteln bereits erfolgt.

Obwohl Endothelzellen in verschiedenen Organen ähnliche Aufgaben erfüllen und morphologische Charakteristika aufweisen, konnten doch wichtige organspezifische Modifikationen in der Endothelzelldifferenzierung beobachtet werden. Sie reflektieren die morphologische und funktionelle Heterogenität unterschiedlicher Organe und Gefäße. Nach neueren Untersuchungen ist diese Heterogenität durch Unterschiede in den Interaktionen zwischen den Endothelzellen und der spezifischen Gewebsumgebung determiniert (Garlanda und Dejana, 1997). Zu den wichtigsten determinierenden Faktoren der Gefäßentwicklung gehören Komponenten der extrazellulären Matrix, proteolytische Enzyme und ihre Inhibitoren, Zytogene und ihre Rezeptoren, sowie Wachstumsfaktoren. Bezogen auf die fetomaternalen Einheit, welche reich an Wachstumsfaktoren ist, konnte in unserer Arbeitsgruppe die Modifikation von Endothelzellen durch angiogene Eigenschaften verschiedener Stoffe nachgewiesen werden. So konnte hCG als angiogener Faktor, welcher die Kapillaraussprossung von uterinen Endothelzellen fördert, ausgemacht werden (Zygmunt *et al.*, 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, daß insulin-like growth factor-II (IGF-II) die Migration von Endothelzellen fördert (Herr *et al.*, 2003). Eine synergistische Wirkung auf die Kapillaraussprossung von Endothelzellen zusammen mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) konnte Alpha-Fetoprotein (AFP) nachgewiesen werden (Liang *et al.*, 2004).

Neben den oben beschriebenen Funktionen, die die Endothelzellen im menschlichen Organismus physiologischerweise erfüllen, spielen sie auch eine Rolle bei der Pathogenese von Gefäßerkrankungen. Als Beispiel ist vor allem die am meist beforschte Form der arteriellen Erkrankungen die Arteriosklerose, bei der es letztendlich zur Verhärtung und Verengung der Gefäße mit weitreichenden Folgen, wie Herzinfarkt oder Schlaganfall kommen kann, zu nennen. Ein weiterer degenerativer Zustand arterieller Gefäße ist das Aneurysma. Hier ist die Gefäßwand durch Krankheit oder genetische Disposition geschwächt und rupturgefährdet.

### 1.3.1 Endothelzellmarker

Endothelzellen exprimieren spezifische Marker, welche sehr hilfreich bei der Identifizierung dieser Zellen *in vivo* und in Kultur sein können. In vielen Fällen wurden diese Moleküle durch monoklonale Antikörper, die sich gegen Endothelzellen richten, entdeckt (Garlanda und Dejana, 1997). Folgende Tabelle soll einen Überblick über einige wichtige identifizierte Endothelzellmarker geben.

Marker	Zelltyp	Referenz
CD 31/PECAM-1	Endothelzellen, Thrombozyten, Megakaryozyten, B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile	DeLisser <i>et.al.</i> , 1994
Angiotensin-converting-enzyme	Endothelzellen, epitheliale Zellen, Makrophagen, T-Lymphozyten	Belloni und Tressler, 1990
Aufnahme von acetyliertem LDL (Type I scavenger receptor)	Endothelzellen, Makrophagen, glatte Muskelzellen, glatte Muskelzellen, Perizyten, Fibroblasten	Voyta <i>et.al.</i> , 1984
Ulex europaeus I agglutinin	Endothelzellen, Erythrozyten	Jackson <i>et.al.</i> , 1990
CD 144/Vaskuläres Endotheliales Cadherin	Endothelzellen, Trophoblasten, Sinusmakrophagen	Lampugnani <i>et.al.</i> , 1992
CD 34	Endothelzellen, hämatopoetische Vorläuferzellen	Krause <i>et.al.</i> , 1996
CD 102/ICAM-2	Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten	Springer, 1990
CD 105/Endoglin	Endothelzellen, Makrophagen, B Lymphozyten, Synzytiotrophoblasten	Gougos und Letarte, 1988
Thrombomodulin	Endothelzellen, glatte Muskelzellen	Esmon, 1995

**Tab. 1.1:** Einige der wichtigsten Endothelzellmarker

Andere Moleküle werden nach Aktivierung durch inflammatorische Zytokine oder Wachstumsfaktoren exprimiert. Dazu gehören zum Beispiel die Rezeptoren von VEGF Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR-1) und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2), deren Expression durch Angiogenese stimuliert wird. Marker, welche spezifisch auf Endothelzellen verschiedener Organe exprimiert werden, sind bisher kaum bekannt, vor allem, weil sich die Isolierung von

mikrovaskulären Endothelzellen aus bestimmten Regionen als sehr schwierig erweist (Garlanda und Dejana, 1997).

## 2 ZIEL DER ARBEIT

*In vitro* Studien über die Funktion von humanen Endothelzellen stützen sich bis heute vor allem auf makrovaskuläre Zellen aus der Nabelschnurvene. Es hat sich jedoch in den letzten Jahren gezeigt, daß nicht nur Endothelzellen verschiedener Organe unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Gerritsen, 1987; Del Vecchio *et al.*, 1992), sondern auch, daß die Eigenschaften makrovaskulärer Endothelzellen sich von denen mikrovaskulärer Endothelzellen signifikant unterscheiden (Ugele und Lange, 2001). So sind nur letztere an der Gefäßneubildung beteiligt.

Die Neovaskularisierung in der Plazenta als fetalem Organ findet sowohl im Rahmen der Vaskulogenese als auch der Angiogenese statt. Die Arbeit an plazentaren Endothelzellen kann somit zum Verständnis der grundlegenden Regulation der Neovaskularisierung beitragen, um neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung vaskulärer Störungen während der Schwangerschaft zu erschließen. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, ein *in vitro* Modell basierend auf plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen zu etablieren. Die veröffentlichten Protokolle zur Isolation und Kultivierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen zeigten deutliche Limitationen auf (Davison *et al.*, 1980, 1983; Kern *et al.*, 1983; Marks *et al.*, 1985; Jackson *et al.*, 1990; Drake und Loke, 1991; Hewett *et al.*, 1993; Hewett und Murray, 1993).

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Etablierung einer reproduzierbaren Methode zur Isolierung und Kultivierung von humanen plazentaren endothelialen mikrovaskulären Endothelzellen (HPMVEC), ergänzt durch deren Charakterisierung anhand von Morphologie, Expression von Oberflächenmolekülen und Funktion.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Untersuchungsmaterial

##### 3.1.1 Geräte

Absaugsystem: VacuSafe	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Brutschrank für Zellkulturen Heraeus 6000	Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer: BD FACSCalibur™	BD, Heidelberg
Magnetische Zellsortierung: VarioMACS™ Separator	Milteny, Bergisch Gladbach
Mikropipetten	Eppendorf, Köln
Mikroskop: MS-5, Lichtquelle: KL 1500 LCD	Leica, Wetzlar
Pipettierhilfe: Eppendorf Easypet 4420	Eppendorf, Köln
Sterile Werkbank: GELAIRE Flow Laboratories Modell Nr.BS 3-4-6	Gruppo Flow, Opera, Italien
Vortexer: Minishaker MS 1	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge: Labofuge GL, Heraeus Sepatech	Heraeus, Hanau

##### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	BD, Heidelberg
Falconröhrchen Cellstar	Greiner, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Köln
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Köln
Röhrchen	Greiner, Wiesbaden
Skalpell, Einmalskalpell	Feather/PFM, Köln
6/12 - Well-Multischalen	Greiner, Wiesbaden
Zellsieb	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 3.1.3 Reagenzien für die Zellisolierung/ Zellkultur

Collagenase Typ I A (digestion activity: 441 units/mg solid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO Cell Culture Freezing Medium	GIBCO BRL, Karlsruhe
Dulbecco`s Minimum Essential Medium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
EBM 2 Endothelial Basal Medium	Cambrex, Apen
fetales Kälberserum (Fetales Bovines Serum, USDA, hitzeinaktiviert, SO215)	Biochrom KG Seromed, Berlin
HBSS (Hanks`gepufferte Salzlösung ohne Kalzium, Magnesium)	GIBCO BRL, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM Solution in 0,85% NaCl	Cambrex, Apen
Penicillin-Streptomycin (10000 units/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	GIBCO BRL, Karlsruhe
Phosphat Buffered Saline, pH 7,4 (PBS)	GIBCO BRL, Karlsruhe
Trypanblau	Flow Laboratories, Irvine, Schottland
Trypsin EDTA Solution 0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA •4 NA	GIBCO BRL, Karlsruhe

### 3.1.4 Reagenzien für die magnetische Aufreinigung

CD 105 Micro Beads Kit	Milteny, Bergisch Gladbach
Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FcR Blocking Reagent	Milteny, Bergisch Gladbach
MACs Column LS-/MS-Säule	Milteny, Bergisch Gladbach

### 3.1.5 Reagenzien für die Durchflußzytometrie

<b>Antikörper für extrazelluläre Färbung</b>				
<b>Epitop</b>	<b>Markierung</b>	<b>Klon/Klonnr.</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Firma</b>
CD 9	FITC	Klon: M-L13	mouse IgG1, κ	BD, Heidelberg
CD 31	FITC	Klon: WM59	mouse IgG1, κ	BD, Heidelberg
CD 105	unmarkiert	Klonnr.: SN6	mouse IgG1	Serotec, Oxford, England
CD 140b	PE	Klon: 28D4	mouse IgG2a, κ	BD, Heidelberg
CD 144	unmarkiert	Klon: 55-7H1	mouse IgG1, κ	BD, Heidelberg
E-Cadherin	PE	Klon: 180224	mouse IgG <sub>2B</sub>	R&D, Wiesbaden
VEGFR- 2	unmarkiert	Klonnr.: KDR/EIC	mouse IgG 1	abcam, Cambridge, England
<b>Antikörper für intrazelluläre Färbung</b>				
Vimentin	PE		mouse IgG 1	Santa Cruz,
Cytokeratin- 7	unmarkiert	Klonnr.: RCK 105	mouse IgG 1	abcam, Cambridge, England
vWF	unmarkiert	Klon: 2F2-A9	mouse IgG1, κ	BD, Heidelberg
<b>Isotypkontrolle</b>				
<b>Isotyp</b>				
mouse IgG <sub>2a</sub>	FITC			BD, Heidelberg
mouse IgG <sub>1</sub>	PE			BD, Heidelberg
mouse IgG <sub>1</sub>	unmarkiert			BD, Heidelberg
mouse IgG <sub>1</sub>	PE			R&D, Wiesbaden
mouse IgG <sub>1</sub>	unmarkiert			abcam, Cambridge, England

### 3.1.6 sonstige Reagenzien:

Albumin from bovine serum, minimum 98% electrophoresis (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cell Wash (optimiertes PBS zur Zellpräparation)	BD, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm	BD, Heidelberg
Dil-Ac-LDL	Biomedical Technologies Inc., Massachusetts, USA
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Perm/Wash Puffer	BD, Heidelberg

## 3.2 Untersuchungsmethoden

### 3.2.1 Isolierung von humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen (HPMVEC)

Zunächst wurden etwa 5 Kotyledonen von der Plazenta mit Hilfe eines Skalpell (Einmal-Skalpell, Feather/PFM, Köln) abgetrennt. Die Plazenta stammte jeweils von primärer *Sectio caesarea* am Geburtstermin, bzw. von termingerechter Spontangeburt.

Anschließend wurden die Plazentazotten mit dem Skalpell zerkleinert und das Gewebe entlang der sichtbaren Gefäße abpräpariert. So konnten die makrovaskulären Gefäße verworfen und das die mikrovaskulären Gefäße enthaltende Gewebe weiterverarbeitet werden. Um das Blut aus dem Gewebe zu waschen, wurden die zerkleinerten Zotten mit Phosphat Buffered Saline pH 7,4 (PBS, GIBCO BRL, Karlsruhe), ergänzt durch 200 U/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, GIBCO BRL) gespült. Dieser Schritt wurde einige Male wiederholt, um das Gewebe möglichst vollständig von Blut zu befreien.

Nach der Präparation wurde das gewaschene Gewebe in eine Gewebekulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt und in einer Lösung bestehend aus Hanks`gepufferter Salzlösung (HBSS) ohne Kalzium, Magnesium (GIBCO, BRL) ergänzt durch 200 U/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin (200 mM Solution, Cambrex, Apen) sowie 2 mg/ml Kollagenase (Kollagenase Typ I A, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für 2 Std. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Um die Durchmischung des gesamten Gewebes mit der Kollagenaselösung und somit einen guten Verdau zu gewährleisten, wurde die Gewebekulturflasche während der Inkubationszeit alle 15 min. kräftig geschüttelt.

Anschließend wurde das verdaute Gewebe auf etwa 6 Falconröhrchen (Falcon Cellstar, Greiner, Wiesbaden) verteilt und mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt. Alle 6 Röhrchen wurden bei 500 rpm und 4°C für 3 min. zentrifugiert. Die Überstände, in denen sich die Einzelzellsuspension befanden, wurden abpipetiert und auf Eis gelagert. Die 6 Röhrchen mit dem verbleibenden Gewebe wurden erneut mit HBSS aufgefüllt und bei 500 rpm und 4°C für 3 min. zentrifugiert, um die restlichen Einzelzellen zu gewinnen.

Dieser Zentrifugationsschritt wurde insgesamt 5x durchgeführt. Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde direkt nach der Gewinnung bei 1500 rpm und 4°C für 7 min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Gewebepellet in HBSS resuspendiert. Die Zentrifugation des ersten Überstandes erfolgte umgehend, um eventuell verbleibende Kollagenase auszuwaschen und so Zellschäden durch zu starken Verdau zu vermeiden.

Die übrigen gesammelten Überstände wurden gemeinsam mit dem Gewebepellet des ersten Überstandes bei 1500 rpm und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Im Folgenden wurden alle Zentrifugationsüberstände abgesaugt und die Gewebepellets mit einer Trypsin/EDTA- Lösung ((0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA (GIBCO BRL)) resuspendiert, vereinigt und ca. 20 min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Trypsinisierung mit gleicher Menge an serumhaltigem Medium beendet.

Anschließend wurde die Suspension über ein Zellsieb (Sigma-Aldrich) filtriert und das Filtrat bei 1500 rpm und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Das verbliebene Pellet wurde in Endothelial Basal Medium (EBM-2, Cambrex) resuspendiert, auf zwei Kulturflaschen (T 150) verteilt und kultiviert.

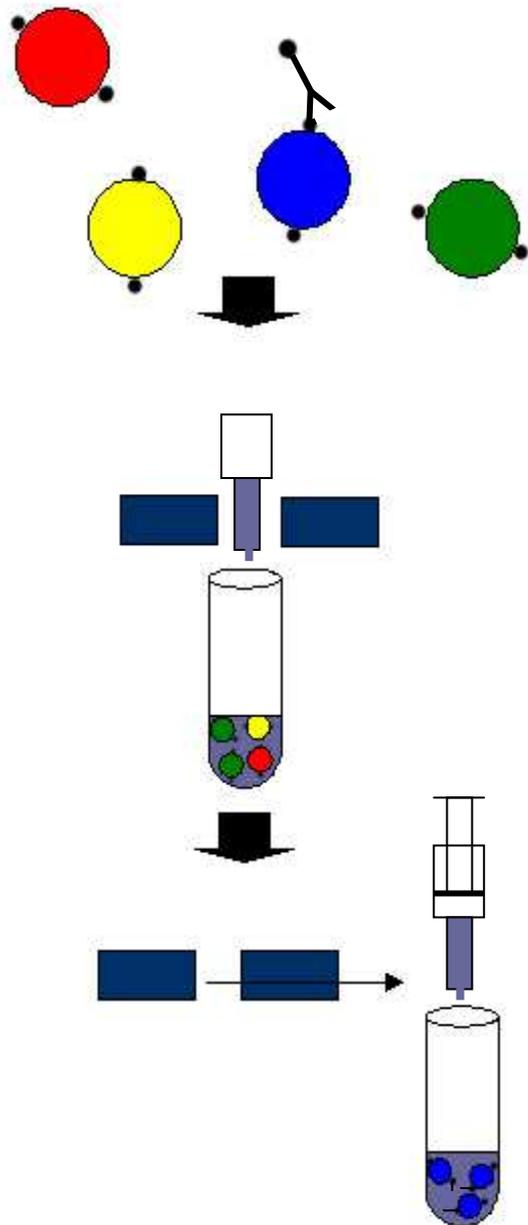
Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen sorgfältig mit PBS gespült, um Erythrozyten zu entfernen, und neues Medium hinzugefügt. 3 Tage nach der Isolierung wurde das Medium täglich, später jeden 2. Tag gewechselt. Die isolierten Zellen stellten eine Mischkultur dar, die neben mikrovaskulären Endothelzellen auch mesenchymale Zellen wie glatte Muskelzellen oder Perizyten enthielt.

Ein Teil der so gewonnenen Mischkultur wurde zur Aufreinigung und weiteren Isolierung plazentarer mikrovaskulärer Endothelzellen verwendet, wobei der andere Teil dieser Mischkultur mittels Durchflußzytometrie charakterisiert werden konnte (siehe Kap. 3.2.4).

## **3.2.2 Aufreinigung der Mischkultur mit CD 105 MicroBeads**

### **3.2.2.1 Prinzip der magnetischen Zellseparation**

Mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (engl.: magnetic cell sorting, MACS®) können Zellen aus komplexen Zellgemischen mit hoher Reinheit für weitere Untersuchungen isoliert werden. Bei diesem System werden mit superparamagnetischen Mikropartikeln (ca. 50 nm Durchmesser) konjugierte Antikörper (MACS MicroBeads) verwendet. Die gewünschten Zellen werden durch spezifische Antikörperbindung mit den MicroBeads markiert und auf eine spezielle Trennsäule gegeben, die mit Stahlwolle oder Stahlkugeln gefüllt ist. Die Trennsäule befindet sich zwischen den Magnetpolen eines Hochleistungsmagneten. Zwischen den Fäden der Stahlwolle entsteht ein Hochgradienten-Magnetfeld, so daß die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Das MACS-System kann zur Anreicherung (positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) von Zellpopulationen verwendet werden.



Zunächst werden die Zielzellen mit Antikörpern markiert, an die superparamagnetische Mikropartikel gebunden sind.

Anschließend erfolgt die magnetische Separation. Die Zellsuspension durchläuft eine mit Stahlwolle gefüllte Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die nicht markierten Zellen durchlaufen die Säule.

Die markierten Zellen werden im Hochgradientenfeld zurückgehalten und können anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden.

**Abb3.1:** Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation

### 3.2.2.2 Durchführung

Die magnetische Isolierung der plazentaren Endothelzellen erfolgte, wenn die Mischkultur etwa 80%ige Konfluenz erreicht hatte. Dies war nach einer Kultivierungsdauer von etwa 8-10 Tagen der Fall.

**Kopplung der Zellen an die MicroBeads:** Zunächst wurden die Zellen mit Trypsin von der Gewebekulturflasche gelöst. Die Trypsinisierung wurde nach etwa 5 min. mit serumhaltigem Medium beendet. Hieran schloß sich eine Zentrifugation an (5 min. bei 1500 rpm). Das entstandene Zellpellet wurde in EBM-2 resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl in der Neubauerkammer bestimmt. Die Zellen wurden nun erneut abzentrifugiert und das Pellet in 80 µl MACS Puffer/ $10^7$  Zellen aufgenommen (MACS Puffer: PBS ergänzt durch 0,5% Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) und 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Sigma-Aldrich). Spätere unspezifische Bindungen der Antikörper sollten durch die Inkubation mit 25 µl FcR Blocking Reagenz/ $10^7$  Zellen (FcR Blocking Reagent, Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) für 30 min. auf Eis verhindert werden. Anschließend wurden 80 µl CD105 Beads/  $10^7$  Zellen (CD 105 MicroBeads, Milteny) für weitere 15 min. hinzugegeben.

**Zellsortierung im Magnetfeld:** Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen 5 min. bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml MACS Puffer aufgenommen. Zur Zellsortierung wurde jeweils eine Säule ausgewählt deren Kapazität der Gesamtzahl der zu separierenden Zellen entsprach (MACS Column LS-Säule/MS-Säule, Milteny Biotec). Diese wurde in das Magnetfeld gespannt und entsprechend vor und nach dem Durchlaufen der Zellsuspension mit MACS Puffer gespült. Die negative Fraktion wurde aufgefangen, während die positive Fraktion außerhalb des Magnetfeldes eluiert wurde. Die so gewonnene positive Zellfraktion wurde 5 min. bei 1500 rpm abzentrifugiert, resuspendiert und kultiviert (siehe Kapitel 2.2.3). Um eine möglichst reine Zellkultur zu erhalten, war es nötig, die magnetische Aufreinigung nach ein- bis zweiwöchiger Kultivierung mindestens einmal zu wiederholen.

### **3.2.3 Zellkultur**

#### **3.2.3.1 Kultivierung humaner plazentarer mikrovaskulärer Endothelzellen**

Die Zellkultur der HPMVEC wurde nach Standardmethoden geführt (Lindl, 2000). Die Zellen wurden nach ihrer Gewinnung in belüfteten T75 bzw. T150 Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre in EBM-2 mit 20% fetalem Kälberserum (FKS, Biochrom KG Seromed, Berlin) kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte bis zum Erreichen von Konfluenz alle 2 Tage. Zum Passagieren wurden konfluente Monolayer nach Entfernung des Mediums mit 10 ml PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflaschen erfolgte durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (5 Minuten). Anschließend wurden die Zellen in EBM-2 aufgenommen und 10 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

#### **3.2.3.2 Einfrieren, Lagerung und Auftauen plazentarer Zellen**

Die plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen wurden zum Einfrieren, wie oben beschrieben, in Einzelzellsuspensionen überführt und bei 1000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer Mischung aus 70% EBM-2, 20% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth, Karlsruhe) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Reaktionsgefäße (Eppendorf, Köln) verteilt. Zum schrittweisen Einfrieren verblieben die Zellen zunächst 24 Std. bei -20 °C, um anschließend bei -70 °C gelagert zu werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut und unverzüglich in spezifischem Medium aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (1000 rpm, 10 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in insgesamt 20 ml Medium resuspendiert, um in einer T75 Flasche kultiviert zu werden.

#### **3.2.3.3 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer, Tiefe: 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 10 µl Trypanblau (Flow Laboratories, Irvine, Schottland) mit 10 µl der Zellsuspension vermischt und daraus 10µl in den Kapillarspalt

der Zählkammer transferiert. Die Zellzahl wurde in 4 großen Quadranten bestimmt und daraus die Gesamtzellzahl nach folgender Formel errechnet:

$$x = m \cdot v \cdot 10^4$$

x = Gesamtzellzahl in ml

m = Mittelwert der Zellzahl aus den 4 großen Quadranten der Zählkammer

v = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension (2)

### **3.2.4 Charakterisierung der Endothelzellen mittels Durchflußzytometrie**

#### **3.2.4.1 Prinzip der Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie oder FACS-Analyse (engl.: fluorescent activated cell sorting) ist eine Technologie, die zur Charakterisierung von gefärbten Einzelzellen/Partikeln (mit einer Größe von 0,2 – 150 µm) in Suspensionen genutzt wird. Hierbei ist eine simultane Analyse der relativen Zellgröße, der Granularität, sowie verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe möglich. Um dies zu gewährleisten, besteht ein Durchflußzytometer aus den 3 Hauptkomponenten Flüssigkeitssystem, Optik und Elektronik, welche folgendermaßen miteinander verknüpft sind:

Die zu untersuchende Zellsuspension wird in einer Trägerflüssigkeit mittels Überdruck in den Meßbereich eingebracht. Hier tritt sie in eine Meßküvette ein, die abhängig vom Gerätetyp von 1-2 bzw. 3-4 Lasern durchstrahlt wird, wobei die Zellen jeweils einzeln den Laserstrahl passieren. Hierbei streuen die Zellen das auftreffende Licht, wobei die daraufhin austretenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale der Zellen durch Spiegel- und Filtersysteme zu den Detektoren des elektronischen Systems geleitet werden. Die Fähigkeit eines Partikels, Licht zu streuen, hängt dabei von seinen physikalischen Parametern wie Größe, interne Komplexität, Zellform und Oberflächenbeschaffenheit ab.

Die Intensität der nun generierten elektronischen Signale ist proportional zu den auftreffenden optischen Signalen. Das elektronische System wandelt die Lichtsignale zunächst in elektronische und dann in digitale Signale um, die letztendlich im Computer gespeichert und bearbeitet werden können.

Zunächst wird das von den Zellen/Partikeln gestreute Licht in Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht unterteilt. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC, 2-10° zum einfallenden Licht) läuft proportional zur Zelloberfläche und erlaubt eine Aussage über die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC, 90° zum einfallenden Licht) hingegen gibt Auskunft über die relative Granularität oder interne Komplexität der Zelle.

Neben der Lichtstreuung mißt das Durchflußzytometer auch die spezifische Fluoreszenz und die entsprechende Fluoreszenzintensität. Zu diesem Zweck stehen Systeme aus Bandpaßfiltern und Photoröhren zur Verfügung, in der Regel für 530 nm (Fluoreszenzkanal FL 1), 585 nm (FL 2), 670 nm (FL 3) und 661 nm (FL 4). Dabei ist die Fluoreszenzintensität 1 (FL 1) proportional zur Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). FITC hat ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm. Die Fluoreszenzintensität 2 (FL 2) ist proportional zur Intensität der Anfärbung einer Zelle mit Phycoerythrin (PE), wobei in diesem Fall die Absorptionsmaxima bei 488 und 565 nm und das Emissionsmaximum bei 578 nm liegt.

Proportional zur Anfärbung einer Zelle mit Peridin Chlorophyll-a Protein (PerCP) verhält sich die Fluoreszenzintensität 3 (FL 3). Das Absorptionsmaximum liegt hier bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 695 nm. Schließlich wird noch die Fluoreszenzintensität 4 (FL 4) gemessen, die sich proportional zur Anfärbung einer Zelle mit Allophycocyanin (APC) verhält. APC wird bei 650 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum von 660 nm.

Zur Charakterisierung von Zellen im Durchflußzytometer setzt man Antikörper ein, die spezifische Oberflächenmoleküle erkennen und mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind. Die Anzahl der im Durchflußzytometer detektierten Fluoreszenzsignale ist dabei proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle, die durch Antikörper auf der Zelle/dem Partikel gebunden sind.

Extrazelluläre Färbungen detektieren Epitope auf der Zelloberfläche, während nach Permeabilisierung der Zellmembran andere Antikörper spezifische Bestandteile im Zellinneren erkennen. Diese Methode wird folglich als intrazelluläre Färbung bezeichnet.

Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen und zum Einstellen der Parameter am Durchflußzytometer dienen Isotypkontrollen. Hierbei kommen Antikörper des gleichen Ig-Isotyps zum Einsatz, die kein spezifisches Epitop erkennen und mit demselben Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind.

### **3.2.4.2 Durchführung**

Bei etwa 80%iger Konfluenz wurde die Mischkultur/Endothelzellen aus der Zellkulturflasche mit Trypsin abgelöst. Nach 5 min. wurde die Trypsinisierung mit serumhaltigem Kulturmedium abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen 2-3x mit PBS abzentrifugiert (1000 rpm, 7 min.), um die Zellen zu waschen, und somit eine Eigenfluoreszenz des im Endothelzellmedium enthaltenen Phenolrots zu vermeiden. Die Zellen wurden schließlich mit Hilfe der Neubauerkammer gezählt und in FACS Puffer ((FACS Puffer: 500 ml Cell Wash (BD, Heidelberg), 0,25 g Natriumazid (Merck, Darmstadt), 5 g BSA (Sigma-Aldrich)) aufgenommen. Es wurde so verdünnt, daß ein Verhältnis von 200 000 Zellen/100 µl Puffer für die extrazellulären Färbungen und 500 000 Zellen/100 µl Puffer für intrazelluläre Färbungen entstand.

### **Extrazelluläre Färbung**

Nachdem die Zellen wie oben angegeben auf FACS Röhrchen verteilt worden waren, wurde die vom Hersteller empfohlene Menge FcR-Blocking Reagent (Milteny Biotec) hinzugegeben. Der Inhalt der Röhrchen wurde durchmischt und 30 min. auf Eis inkubiert, um die Reaktion mit Fc-Rezeptoren und damit unspezifische Färbungen zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden die Antikörper hinzupipetiert. Nach einer Inkubationszeit von 45 min. auf Eis im Dunklen wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min mit 2 ml FACS Puffer pro Röhrchen). Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellpellets durchmischt. Bei nicht direkt fluoreszenzgekoppelten Antikörpern erfolgte nun eine sekundäre Markierung. Die Inkubation (meist wurde APC zur sekundären Markierung verwendet) erfolgte für 30 min. auf Eis im Dunkeln. Vor der Messung wurden die Zellen erneut mit FACS Puffer gespült und jedes Zellpellet anschließend in 500 µl FACS Puffer aufgenommen.

## **Intrazelluläre Färbung**

Die Zellen wurden mit FACS Puffer gewaschen und anschließend in Cytofix/Cytoperm (BD) aufgenommen ( $10^6$  Zellen/0,5 ml Cytofix/Cytoperm). Cytofix/Cytoperm wird zur gleichzeitigen Fixation und Permeabilisation von Zellen vor einer intrazellulären Färbung verwendet. Um die Zellmembranen zu permeabilisieren, so daß die verwendeten Antikörper die zu markierenden Strukturen im Zellinneren erreichen konnten, erfolgte eine Inkubation auf Eis (20 min.). Nun wurden die Röhrchen 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert, die Überstände abgeschüttet und die Zellpellets durchmischt. Im Folgenden wurden die Pellets in Perm/Wash Puffer (BD) aufgenommen (0,5 ml Perm/Wash Puffer/ $10^6$  Zellen) und für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Perm/Wash Puffer dient bei intrazellulären Färbungen dazu, Zellen zu permeabilisieren, den jeweiligen Antikörper zu verdünnen und als Zell-Wasch-Puffer. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die Zellpellets wurden dann in Perm/Wash Puffer aufgenommen, so daß die Endkonzentration in jedem Röhrchen 500 000 Zellen auf 100 µl Puffer betrug. Nun konnten die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern markiert werden (s.o.).

### 3.2.4.3 Verwendete Antikörper

<b>Antikörper für extrazelluläre Färbung</b>				
Epitop	Markierung	Färbe- Konzentration	µl/ Probe	Hersteller
CD 9	FITC	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen	5	BD
CD 31	FITC	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen	5	BD
CD 105	unmarkiert	3 µg/ml	5	Serotec
CD 140b	PE	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen	5	BD
CD 144	unmarkiert	5 µg/ml	5	BD
E-Cadherin	PE	0,5 µg/ml		Santa Cruz
VEGFR- 2	unmarkiert	10 µg/ml	1	abcam
<b>Antikörper für intrazelluläre Färbung</b>				
Vimentin	PE	1 µg/10 <sup>6</sup> Zellen	2,5	R&D
Cytokeratin- 7	unmarkiert	50µg/ml	5	abcam
vWF	unmarkiert	5 µg/ml	5	BD
<b>Isotypkontrolle</b>				
mouse IgG <sub>2a</sub>	FITC	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen	5	BD
mouse IgG <sub>1</sub>	PE	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen	5	BD
mouse IgG <sub>1</sub>	unmarkiert	5 µg/ml	5	BD
mouse IgG <sub>1</sub>	PE	4 µg/ml	5	R&D
mouse IgG <sub>1</sub>	unmarkiert	10 µg/ml	1	abcam

**Tab. 3.1:** FACS Antikörper

Beschreibung der Oberflächenmoleküle, gegen die die hier verwendeten Antikörper gerichtet sind.

## **Epitope endothelialer Zellen:**

### **Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1) Integrin (CD31):**

Es vermittelt die Adhäsion an PECAM-1. CD 31 spielt eine wichtige Rolle bei der Diapedese im Rahmen der Leukozyten-Emigration bei Entzündungsreaktionen, sowie bei der Angiogenese (DeLisser *et al.*, 1997). CD 31 zeigt eine breite Gewebeverteilung und wird von Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten und deren Vorläufern exprimiert. Besonders hohe Konzentrationen von CD 31 findet man auf allen durchgehenden Endothelien und an den Verbindungsstellen zwischen Endothelzellen *in vitro*. CD 31 ist ein sensitiver und spezifischer Marker für endotheliale Zellen.

### **Von Willebrand Faktor (vWF):**

vWF ist ein komplexes multimeres Glykoprotein. Unter physiologischen Bedingungen wird vWF vor allem von Endothelzellen, sowie von Megakaryozyten und Thrombozyten gebildet und fördert die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten in geschädigten Gefäßarealen. Zusätzlich bindet vWF an den Gerinnungsfaktor VIII und stabilisiert diesen.

Zur Charakterisierung von endothelialen Zellen wurde vWF schon vielfach eingesetzt (Anders *et al.*, 1987; Leach *et al.*, 1994; Kacemi *et al.*, 1996).

### **Vascular endothelial Cadherin (VE-cadherin/CD 144):**

CD 144 gehört in die Gruppe der Cadherine (Lampugnani *et al.*, 1992). Hierbei handelt es sich um Kalzium-bindende, transmembrane Adhäsionsmoleküle, die an der Zelladhäsion beteiligt sind. Sie interagieren vorzugsweise mit sich selber, um Zellen zu verbinden. Auf diese Weise tragen sie zum Sortieren und Trennen von heterogenen Zelltypen bei. Daneben spielen sie auch bei der embryonalen Morphogenese, der Erhaltung der Zellpolarität und bei der Signaltransduktion eine Rolle. CD 144 ist ein endothelzellspezifisches Cadherin, welches sich an interzellulären Verbindungen befindet.

### **Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) :**

VEGFR-2 gehört in die Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Nicht nur Endothelzellen, sondern auch Hämangioblasten und frühe hämatopoetische Stammzellen sind Träger des VEGFR-2 (Millauer *et al.*, 1993). Hier zeigte sich auch die

Wichtigkeit von VEGFR-2 bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Endothelzellen (Drake *et al.*, 2000). Seine Aktivierung spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei vielen biologischen Vorgängen wie der Embryonalentwicklung, der Wundheilung, der Zellproliferation, Migration und Differenzierung.

#### **CD 105:**

CD 105 ist eine regulatorische Komponente des Transformierung Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Komplexes, der sehr stark auf Endothelzellen, die sich in der Angiogenese befinden, exprimiert wird, z.B. auf Endothelzellen in heilenden Wunden, Tumoren und der Plazenta. Daneben exprimieren aktivierte Monozyten und Gewebsmakrophagen, stromale Zellen z.B. des Knochenmarks, sowie Synzytiotrophoblasten während der Schwangerschaft CD 105.

#### **Epitope stromaler Zellen:**

##### **Plattelet Derived Growth Factor-Receptor $\beta$ (PDGF-Receptor $\beta$ /CD 140 b):**

Platelet Derived Growth Factor (PDGF), spielt eine Rolle bei der Wundheilung und wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Gliazellen, Monozyten und Neutrophile. Die Interaktion mit den entsprechenden Zielzellen wird über die Aktivierung des alpha- oder des beta- ( $\beta$ ) Rezeptors gesteuert. Beim PDGF-Rezeptor  $\beta$  handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein, welches von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Gliazellen und Chondrozyten exprimiert wird. Die Aktivierung des PDGF-Rezeptors  $\beta$  führt in den Zielzellen zu vermehrtem Wachstum, zur Chemotaxis und Mobilisation von intrazellulärem Kalzium.

##### **Vimentin:**

Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten, welche der Plasmamembran als zytoskelettale Proteine strukturelle Integrität verleihen und die Zellen zu bestimmten Geweben organisieren. Man unterscheidet 6 unterschiedliche Typen von Intermediärfilamenten, wobei Vimentin zum Typ III gehört. Dieser wird von Leukozyten, vaskulären Endothelzellen, einigen epithelialen Zellen und vor allem von stromalen Zellen exprimiert. Es wird angenommen, daß Vimentin am intrazellulären Transport von Proteinen zwischen dem Nukleus und der Plasmamembran beteiligt ist. Antikörper

gegen Vimentin sind hilfreich bei der Untersuchung von Stammzellen, bzw. generell zum Darstellen des filamentösen Zytoskeletts.

### **Epitope trophoblastischer Zellen:**

#### **Cytokeratin 7:**

Cytokeratin 7 gehört in die Gruppe der neutral basischen Cytokeratine und wird vor allem in Drüsen- und Übergangsepithelien und den entsprechenden Tumoren gefunden. Außerdem hat sich Cytokeratin 7 als wichtiger Marker für Trophoblasten erwiesen (Manoussaka *et al.*, 2005; Maldonado-Estrada *et al.*, 2004). Es konnte außerdem für die Plazenta gezeigt werden, daß Cytokeratin 7 als einziger Keratin- Filament- Typ nicht auf plazentaren mesenchymalen Zellen, jedoch auf allen Trophoblasten-Subpopulationen exprimiert wird (Blaschitz *et al.*, 2000).

#### **CD 9:**

CD 9 reagiert mit einem transmembranären Protein, welches auf Thrombozyten, prä- B Zellen, Monozyten, Endothel und Epithel exprimiert wird.

#### **E-Cadherin:**

E-Cadherin ist ein Typ I Transmembranprotein der Cadherin Familie, welche aus Kalzium-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen besteht. Zu den Cadherinen, die von epithelialen Zellen exprimiert werden gehören E-Cadherin, N-Cadherin und P-Cadherin. Cadherine spielen eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion. Neuerem Wissen zufolge wirkt E-Cadherin nicht nur adhäsiv, sondern ist auch an Wachstumsentwicklung und Karzinogenese beteiligt (Chan, 2006).

### **3.2.4.4 Messung und Auswertung**

Zunächst wurde der Referenzbereich festgelegt, in dem die relativen Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden können. Mit Hilfe von Ansätzen ohne Antikörper, mit Isotypenkontrollen oder mit sekundären Antikörpern wurden die Parameter des Gerätes eingestellt.

Während der Messung der Versuchsansätze wurden 20 000 Zellen vom Gerät detektiert und die entsprechenden Daten gespeichert. Die Streulichtsignale wurden linear, die Fluoreszenzsignale logarithmisch dargestellt. Die Zellen eines Ansatzes unterscheiden sich in ihren Streulichteigenschaften, so daß in der Auftragung des FSC gegen den SSC Subpopulationen erkennbar sind, die gesondert analysiert werden können. Die ausgewählte Hauptpopulation wird für die Einstellung der Fluoreszenzdetektoren verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der CellQuest Pro Software (BD), indem die Zellen als Punktwolken („Dot Plots“) bzw. als Histogramme dargestellt wurden. Schließlich wurden die Daten mit Hilfe von Quadrantenstatistiken ausgewertet. Hierbei wurden jeweils zwei Fluoreszenzintensitäten gegeneinander dargestellt und das Diagramm in vier Bereiche unterteilt. So ergaben sich z.B. bei der Darstellung FL 1 (x- Achse) vs. FL 2 (y- Achse) folgende Zuordnungen:

UL	Oben links	nur FL 2 +
UR	Oben rechts	FL 1 + und FL 2 +
LL	Unten links	FL 1- und FL 2 –
LR	Unten rechts	nur FL 1 +

Die Statistik gibt jeweils an, wie viel Prozent der detektierten Zellen sich in welchem der Quadranten befinden. Auf diese Weise ist es möglich, über die Fluoreszenz einer Zellpopulation genaue Aussagen zur Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche bzw. im Zellinneren zu machen.

### **3.2.5 Funktionelle Charakterisierung der HPMVEC**

#### **3.2.5.1 Hintergrund**

Acetyliertes Low Density Lipoprotein, welches an 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate gekoppelt ist (Dil-Ac-LDL) fungiert als Marker für Endothelzellen und Makrophagen.

Nach der Markierung wird Acetyliertes "low density lipoprotein" (Ac-LDL) von Makrophagen und Endothelzellen durch den sogenannten "scavenger cell pathway" des LDL Metabolismus aufgenommen. Sobald ein Lipoprotein, welches Dil enthält, von einer Zelle aufgenommen wird, beginnen lysosomale Enzyme das Lipoproteinmolekül zu

spalten, und Dil (Fluoreszenzfarbstoff) wird in den lysosomalen Membranen angereichert. Der im Gegensatz zu anderen Zelllinien (z.B. stromalen Zellen wie Perizyten oder glatten Muskelzellen) gesteigerte Ac-LDL Metabolismus der Endothelzellen bietet in diesem Zusammenhang neben der Charakterisierung der Zellen mittels Oberflächenmarkern auch eine Möglichkeit, diese Zellen funktionell zu untersuchen.

### **3.2.5.2 Durchführung**

Endothelzellen und stromale Zellen (negative Kontrolle) wurden auf 12 well Platten (Greiner, Wiesbaden) ausgesät und bis zum Erreichen von Konfluenz kultiviert.

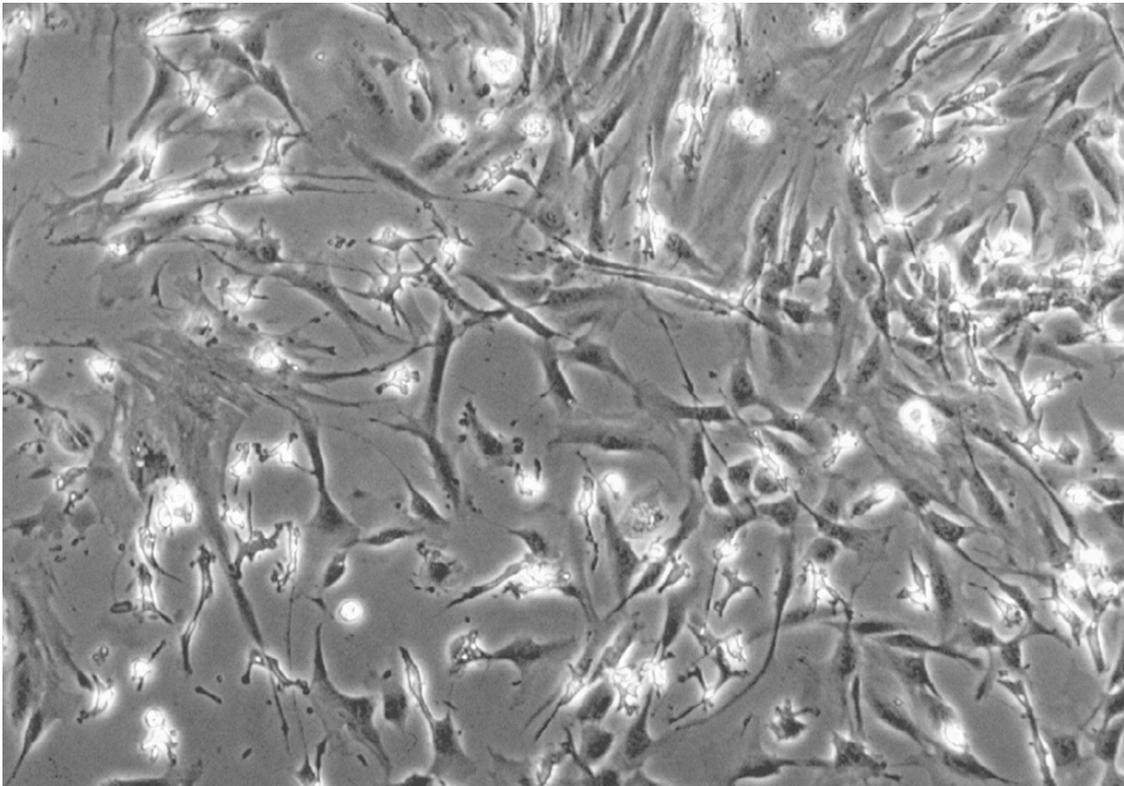
Zum Markieren der Zellen wurde Dil-Ac-LDL (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, Massachusetts, USA) bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml mit dem normalen Zellkulturmedium der jeweiligen Zellen verdünnt. In diesem Medium wurden die Zellen 4 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mehrere Male mit PBS gespült. Im folgenden wurden die markierten Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Standard Rhodamine Excitations/Emissions Filters detektiert.

Die Dil-markierten Endothelzellen wurden außerdem durchflußzytometrisch untersucht. Bei der Durchflußzytometrie wurde die 514 nm Linie eines Argon Lasers für die Messung der Exzitation benutzt. Als negative Kontrolle dienten nicht gefärbte Zellen bzw. gefärbte stromale Zellen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung der HPMVEC

Das Ergebnis der Zellisolierung war zunächst eine Mischkultur. In ihr waren zum einen die Endothelzellen zu sehen, welche sich in Nestern zusammenlagerten und ein kolbenförmiges Aussehen besaßen. Vor der Aufreinigung erkannte man außerdem mehrere Zelltypen, zum Beispiel langgestreckte, spindelförmige Zellen, die eine ähnliche Morphologie wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen zeigten. In der Gesamtkultur konnte man nur einen geringen Prozentsatz (5-10%) Zellen beobachten, die eine endothelzellen-ähnliche Morphologie aufwiesen.



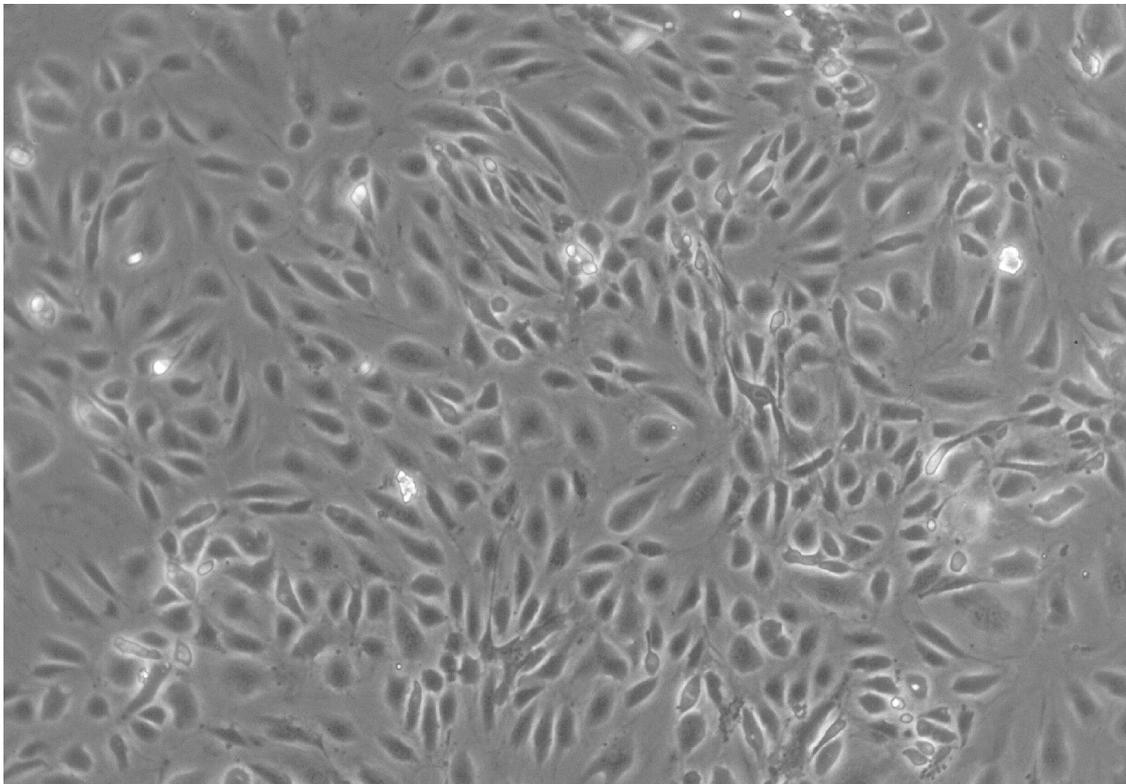
**Abb. 4.1:** Mischkultur: Sie enthält neben Endothelzellen z.B. Fibroblasten, Perizyten und glatte Muskelzellen. (Vergrößerung 100x)

## 4.2 Aufreinigung der Zellen mit CD 105 MicroBeads

Bei der Aufreinigung mit CD 105 MicroBeads konnten gezielt die Endothelzellen aus der Mischkultur isoliert und anschließend weiter kultiviert werden. Nach der Aufreinigung war die Kultur der positiven Fraktion homogen und die Zellen hatten ein kolbenförmiges Aussehen.

Außerdem ließ sich beobachten, daß die Zellen rosettenförmig angeordnet wuchsen.

CD 105 ist eine regulatorische Komponente des TGF- $\beta$  Komplexes, der sehr stark auf Endothelzellen, die sich in der Angiogenese befinden, exprimiert wird, z.B. auf Endothelzellen in heilenden Wunden, Tumoren und der Plazenta.



**Abb. 4.2:** Endothelzellen nach der Aufreinigung mit CD 105 Microbeads. Die Zellen sind homogen und ordnen sich rosettenförmig an. (Vergrößerung 100x)

Die negative Fraktion der Isolierung wurde ebenfalls kultiviert und zeigte sich im Gegensatz zu den Endothelzellen sehr schmal und langgestreckt. Diese Zellen haben morphologisch große Ähnlichkeit mit Muskelzellen oder Stromazellen.

### 4.3 FACS Analyse der Mischkultur

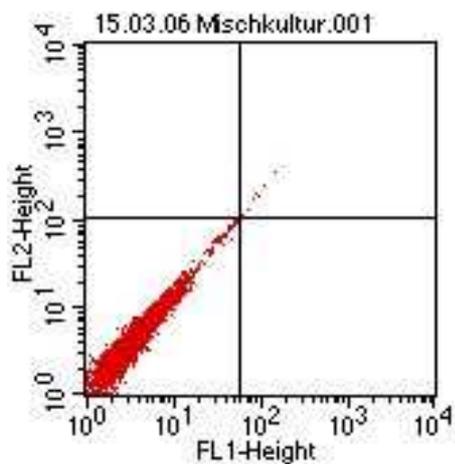
Die aus der Plazenta gewonnene Mischkultur enthielt viele unterschiedliche Zelltypen. Neben endothelialen Zellen fanden sich vor allem auch Trophoblasten und stromale Zellen. Die FACS Analyse verdeutlichte dies mit Hilfe folgender Marker:

**Endotheliale Marker:** CD 31, VEGFR- 2, vWF, CD 144

**Stromale Marker:** CD 140b, Vimentin

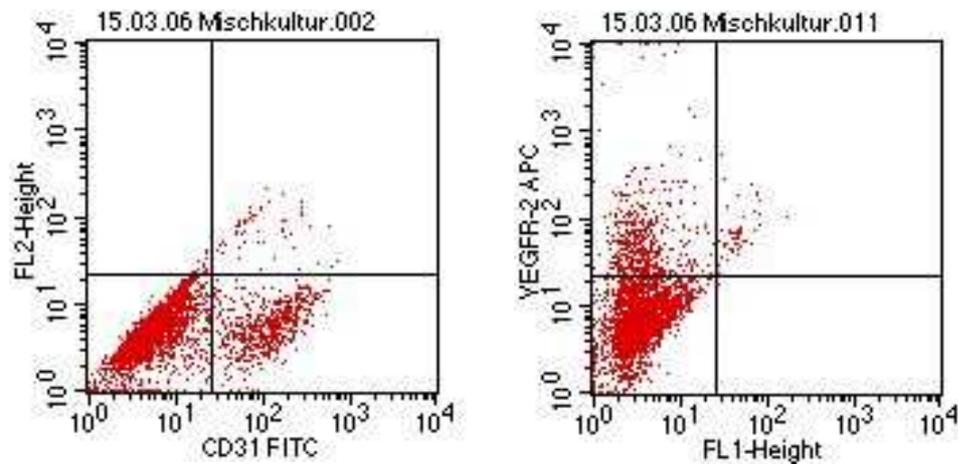
**Trophoblasten Marker:** Cytokeratin 7, E-Cadherin, CD 9

Aufgrund der Heterogenität der Zellpopulation, sowie der verschiedenen Zellgrößen zeigten diese Zellen eine starke Autofluoreszenz in der FACS Analyse, so daß hauptsächlich Einzelfärbungen durchgeführt wurden. Die nachfolgenden Abbildungen stellen repräsentative Beispiele von mehr als 5 Separationen dar.

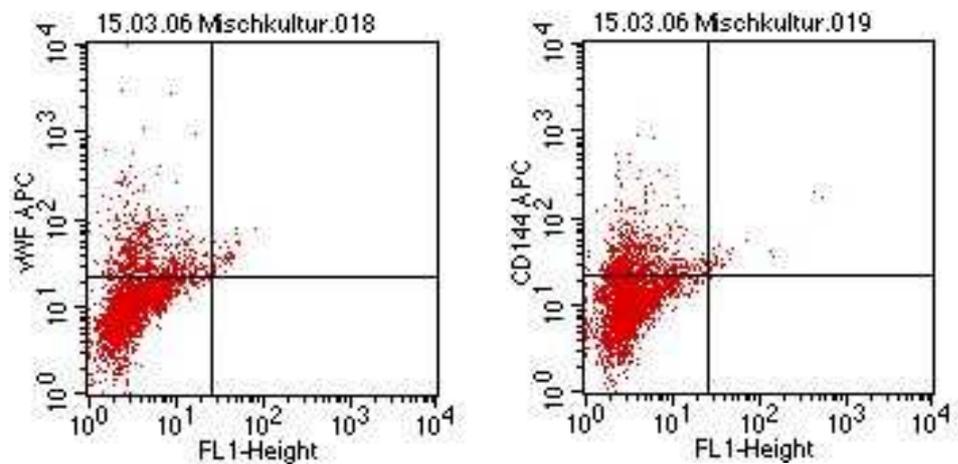


**Abb.4.3.1:** Diese Darstellung verdeutlicht die starke **Autofluoreszenz** der heterogenen Mischkultur.

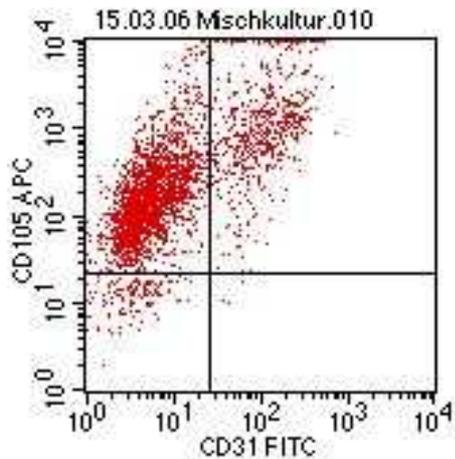
### Endotheliale Zellen:



**Abb. 4.3.2:** 20,41% der in der Mischkultur enthaltenen Zellen exprimierten das endothelspezifische **CD 31**. 17,62% der untersuchten Zellen exprimierten **VEGFR- 2**.

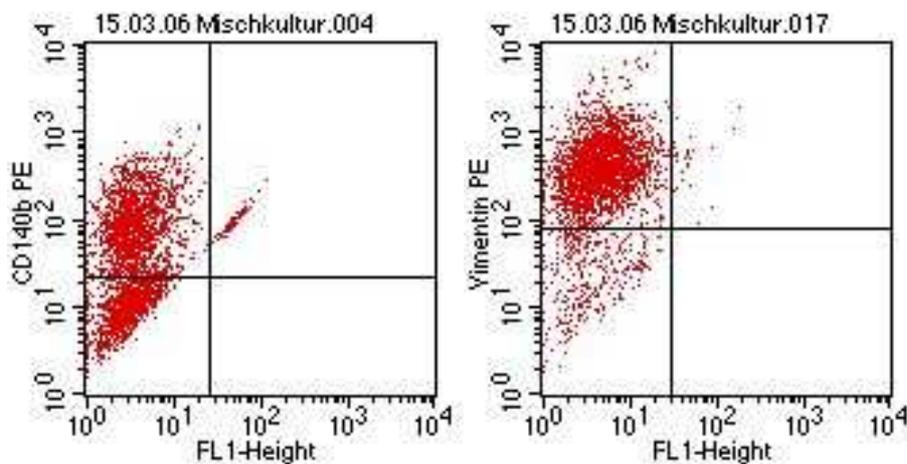


**Abb. 4.3.3:** 17,45% der in der Mischkultur enthaltenen Zellen exprimierten **vWF** und waren somit endothelialer Herkunft. In der vorliegenden Mischkultur zeigten sich 19,17% der Zellen positiv für endothelspezifisches **Cadherin**.



**Abb. 4.3.4:** 22,07% der Zellen in Mischkultur ließen sich mit Antikörpern gegen **CD31** und **CD 105** anfärben.

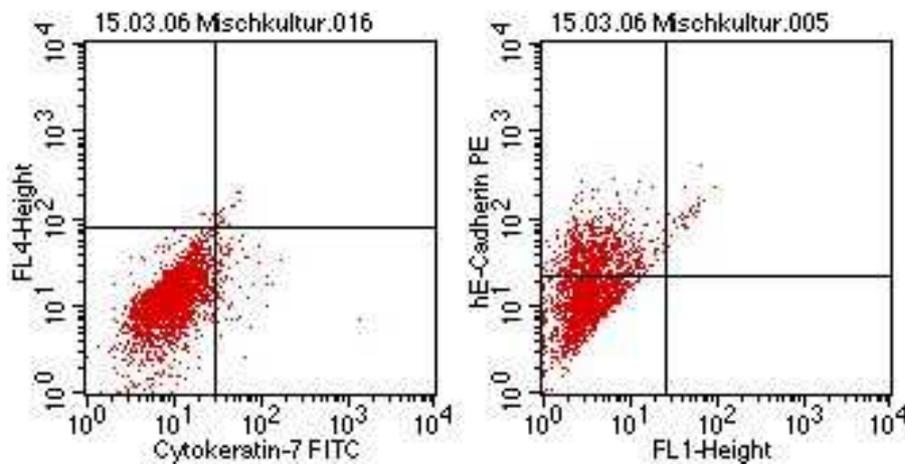
**Stromale Zellen:**



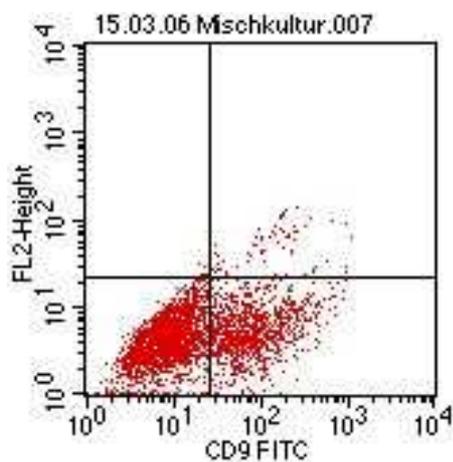
**Abb. 4.3.5:** Die Färbung mit **CD 140b** verdeutlicht die Anzahl stromaler Zellen der Mischkultur. Der Anteil beträgt 62,33%.

**Vimentin**, ein Intermediärfilament, welches von unterschiedlichen Zellen, vor allem jedoch von stromalen Zellen exprimiert wird, zeigte sich auf 88,26% der Zellen.

## Trophoblasten:



**Abb. 4.3.6:** 3,07% der Zellen exprimierten **Cytokeratin 7**. 33,48% der Zellen in der Mischkultur exprimierten **E- Cadherin**.

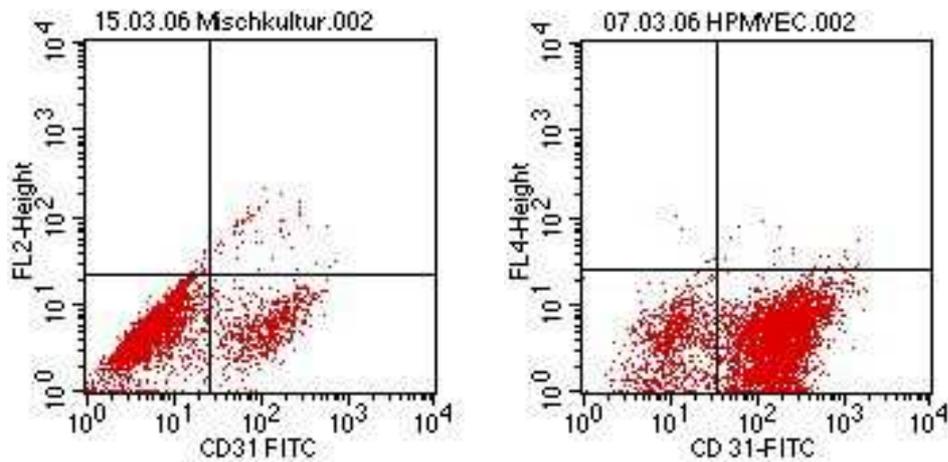


**Abb. 4.3.7:** 32,89% der Zellen exprimierten **CD 9**. CD 9 reagiert mit einem transmembranären Protein, welches auf Thrombozyten, prä- B Zellen, Monozyten, Endothel und Epithel exprimiert wird.

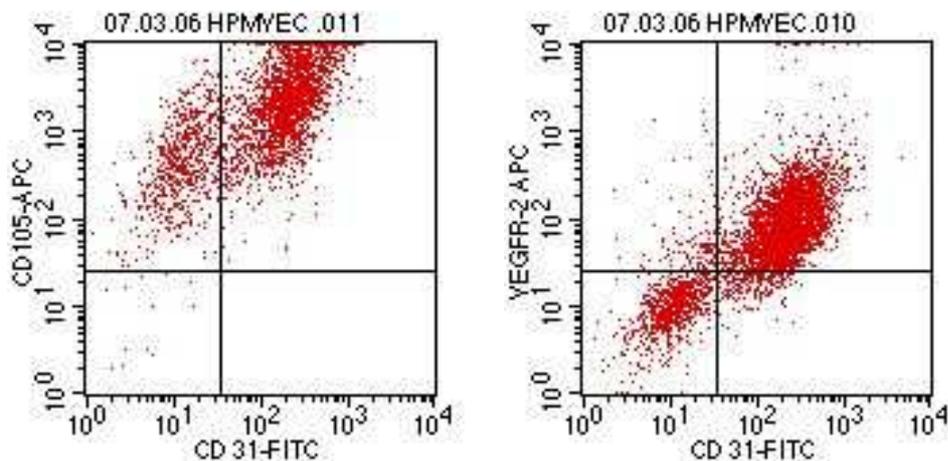
Die FACS- Analyse der Mischkultur verdeutlicht, daß diese viele unterschiedliche Zelltypen enthält. Anhand der endothelspezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, daß Endothelzellen nur zu einem geringen Prozentsatz enthalten waren, wohingegen der Hauptteil der gewonnenen Zellen stromaler und epithelialer Herkunft waren.

#### 4.4 FACS Analyse der aufgereinigten Zellen

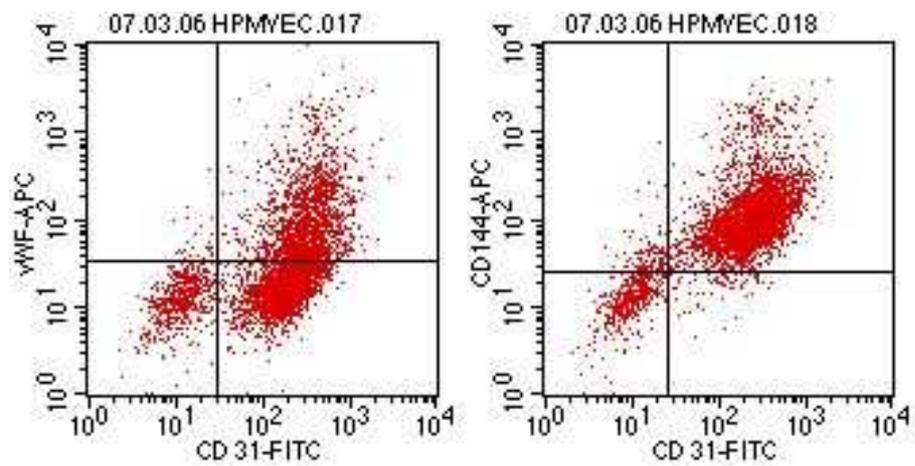
Nach der Aufreinigung der Mischkultur mit CD 105 MicroBeads wurden die Zellen erneut mittels FACS charakterisiert.



**Abb.4.4.1:** Diese Abbildungen demonstrieren die erreichte Reinheit der Endothelzellkultur. Waren in der Mischkultur nur 20,41% der Zellen **CD 31** positiv, so zeigten die aufgereinigten Zellen einen deutlich gestiegenen Anteil endothelialer Zellen mit 80,63 %.



**Abb. 4.4.2:** Da CD 105 nicht nur von Endothelzellen, sondern z.B. auch von Trophoblasten exprimiert wird, zeigt diese Abbildung mit Hilfe einer Doppelfärbung **CD 105/CD 31** (77,14% der Zellen exprimierten beide Oberflächenmoleküle), daß die isolierten Zellen endothelialer Herkunft sind. 76,47% der Zellen exprimierten die endothelspezifischen Epitope **CD31 und VEGFR-2**.



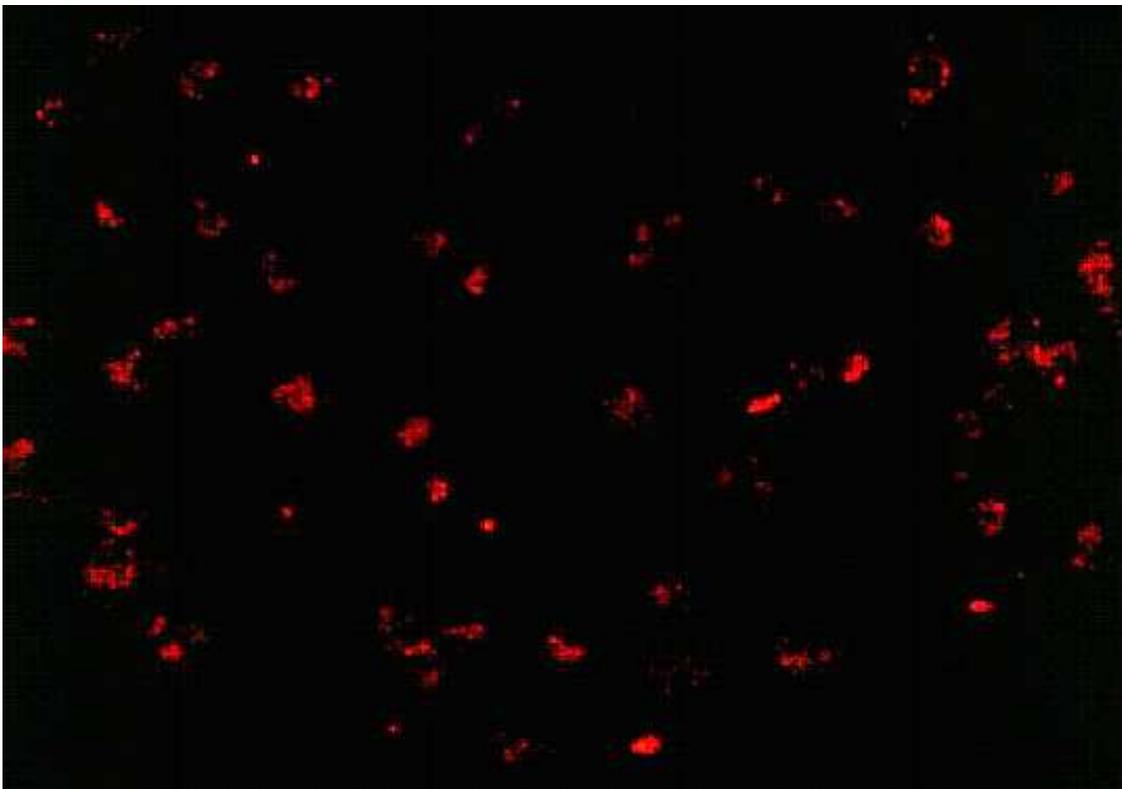
**Abb.4.4.3:** 34,67% der aufgereinigten Zellen ließen sich mit einer Doppelfärbung mit **CD31** und **vWF** anfärben. 86,44% der isolierten Zellen zeigten sich **CD 31** und **CD 144** positiv.

## 4.5 Inkorporation von Dil-Ac-LDL

### 4.5.1 Färbung

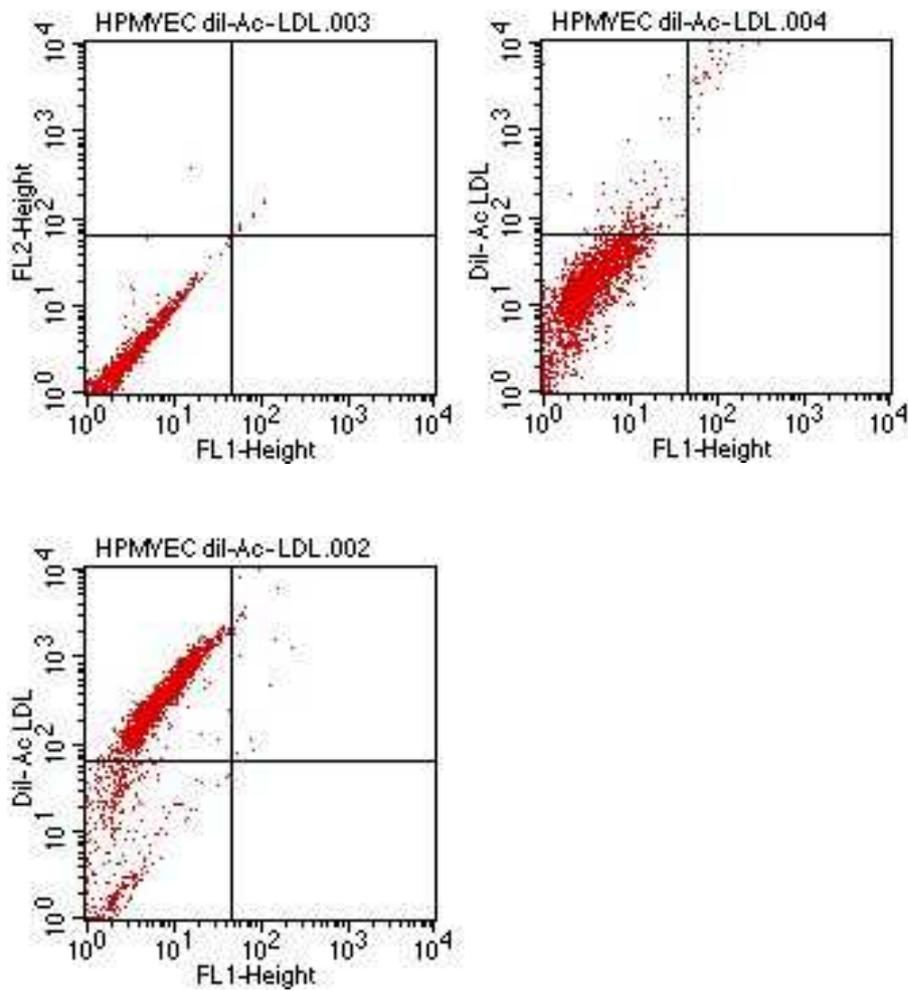
Dil-Ac-LDL wird vor allem von Makrophagen und Endothelzellen aufgenommen. So hat sich die Aufnahme von Dil-Ac-LDL zum Nachweis von Endothelzellen als hilfreiche Methode dargestellt.

Das in die lysosomalen Membranen der Endothelzellen aufgenommene Dil-Ac-LDL zeigt sich im Fluoreszenzlicht deutlich rot leuchtend.



**Abb.4.5.1:** Lysosomale Membranen der Endothelzellen haben Dil-Ac-LDL aufgenommen, welches im Fluoreszenzlicht deutlich leuchtet.

## 4.5.2 FACS-Analyse



**Abb. 4.5.2:** Diese Abbildungen zeigen die Inkorporation von Dil-Ac-LDL durch die Endothelzellen. Während in der Mischkultur etwa 20% der Zellen Dil-Ac-LDL aufnahmen, zeigten sich in der Kultur der aufgereinigten Zellen 90% der Zellen mit Dil-Ac-LDL angefärbt.

## 5 DISKUSSION

Alle Blutgefäße, von den größten Arterien und Venen bis hin zu den kleinsten postkapillären Venolen, sind mit Endothelzellen ausgekleidet. Die Funktionen dieser Zellen sind vielseitig und hängen von der Lokalisation und Größe des jeweiligen Blutgefäßes ab (Ruoslahti *et al.*, 2000). Endotheliale Zellen sind eine heterogene Zellpopulation. Dies bedeutet, daß sich die Endothelzellen z.B. in Struktur, Funktion, metabolischen Eigenschaften und in ihrer Reaktion auf Wachstumsfaktoren unterscheiden. Diese Heterogenität wird deutlich beim Vergleich von Endothelzellen verschiedener Organe. So ist z.B. durchgehendes Endothel charakteristisch für das Gehirn, die Retina und muskuläre Kapillaren, wohingegen fenestriertes Endothel in endokrinen Drüsen und der Niere gefunden wird.

Mit zunehmendem Wissen über das Endothel wurde deutlich, daß die Heterogenität des Endothels sich in Unterschieden der Zellen bei verschiedenen Spezies, bei verschiedenen Organen, aber auch in Unterschieden zwischen makrovaskulären und mikrovaskulären Endothelzellen des gleichen Organs zeigt (Kumar *et al.*, 1987; Jackson *et al.*, 1997; McDouall *et al.*, 1996). Diese Unterschiede lassen sich an phänotypischen Charakteristika (Bouis *et al.*, 2001), an Ultrastruktur und Funktion, sowie Expression von Antigenen und Proteinsynthese- und Sekretion festmachen (Petzelbauer *et al.*, 1993; Page *et al.*, 1992).

Endothelzellen tragen zu vielen wichtigen physiologischen Abläufen bei. So spielen sie eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation, der Blutgerinnung und Fibrinolyse, der Adhäsion und Transmigration von Entzündungszellen auf ihrem Weg aus dem Blutgefäß in das Zielgewebe und bei der Angiogenese (Bouis *et al.*, 2001). Dementsprechend können abweichende, fehlerhafte Endothelzellfunktionen zu diversen pathologischen Prozessen wie z.B. der Atherogenese (Pinkney *et al.*, 1997), Autoimmunerkrankungen und sogar zu embryonaler Letalität (Suri *et al.*, 1996) führen.

Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße, findet nicht in großen Gefäßen, sondern der Mikrovaskulatur statt. Auch in diesem Zusammenhang konnten schon Unterschiede in der Funktion von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen gezeigt werden. So zeigten z.B. Jackson *et al.* Unterschiede in der Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen auf, welche zu den initialen Schritten der Angiogenese gehört, indem sie die

Degradation der Basalmembran und somit die Migration der Endothelzellen durch das Stroma des Gewebes ermöglicht (Jackson *et al.*, 1997).

Ein Großteil des heutigen Wissens über die Funktion von Endothelzellen auch im Hinblick auf die Plazenta stammt jedoch von *in vitro* Experimenten mit human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Jaffe *et al.*, 1973). Diese sind leicht zu isolieren und kultivieren, während die Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen technisch aufwendig und zeitintensiv ist und durch kontaminierende Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen erschwert wird (McDouall *et al.*, 1996). Jedoch handelt es sich bei HUVEC um makrovaskuläre extraplazentare Endothelzellen, welche möglicherweise nicht die Eigenschaften von mikrovaskulären intraplazentaren Zellen repräsentieren (Kacemi *et al.*, 1996).

Unterschiedliche Eigenschaften von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen konnten auch hinsichtlich ihrer Reaktion auf Wachstumsfaktoren verdeutlicht werden. So führte hCG im *in vitro* Modell in uterinen mikrovaskulären Endothelzellen (UMVEC) dosisabhängig zu einer deutlichen angiogenen Antwort (Ausprossung von Kapillaren), wohingegen makrovaskuläre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene nicht auf die Stimulation mit hCG ansprachen (Zygmunt *et al.*, 2002).

Aufgrund der aufgezeigten Heterogenität der Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft, sowie der Unterschiede zwischen Endothelzellen mikro- und makrovaskulärer Herkunft ist jedoch für das nähere Verständnis von Vaskulogenese und Angiogenese in der Plazenta und somit auch für das Verständnis vieler schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen, die auf einer schlecht entwickelten fetomaternalen Vaskulatur beruhen, die Gewinnung der betroffenen Zellen, den HPMVEC, unerlässlich.

## **5.1 Methoden zur Isolierung von plazentaren Endothelzellen**

Die bisherigen Methoden zur Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen gestalteten sich schwierig und aufwendig in der Durchführung. Außerdem zeigten sich deutliche Limitationen bei der Langzeitkultivierung und der weiteren Charakterisierung der Zellen. Drake und Loke entwickelten eine Methode zur Isolierung von Endothelzellen aus Deziduagewebe des ersten Trimesters (Drake und Loke, 1991). Zur Aufreinigung der Zellen verwendeten sie QB End/40 beschichtete Dynabeads. QB End/40 ist ein

endothelspezifischer monoklonaler Antikörper, der mit dem Co-Faktor der Gerinnungskaskade, Thrombomodulin, reagiert.

Die Verwendung von Dynabeads bei der Isolierung mikrovaskulärer Endothelzellen verspricht zwar einen Fortschritt, was die Reinheit der so gewonnenen Zellkultur betrifft, allerdings erforderte diese Methode zunächst das Koppeln von QB End/40 monoklonalen Antikörpern mit Goat anti-mouse IgG-beschichteten Dynabeads. Dieses Vorgehen ist kompliziert und zeitaufwendig. Die so hergestellten Dynabeads können erst nach etwa 4-6 Wochen zur eigentlichen Zellisolation verwendet werden.

Ein weiteres Problem der Dynabeads ergibt sich aus ihrer Adhärenz an Zelloberflächen. Sie werden innerhalb der ersten 24 Std. der Zellkultur von den Zellen internalisiert. Um diesen Vorgang, der durchaus zu Veränderungen wie z.B. von Stoffwechselfvorgängen und des Proliferationsverhaltens der Zellen führen könnte, zu verhindern, müßten die Dynabeads so bald als möglich nach der Aufreinigung wieder von den Zellen gelöst werden.

Eine Möglichkeit dazu beschrieben Jackson *et al.* (Jackson *et al.*, 1990) am Beispiel der Isolierung von humanen synovialen Endothelzellen mit *Ulex-europaeus* I lectin beschichteten Dynabeads. Die Beads wurden mit Hilfe von Fucose, welche um die lectin-Bindungsstellen konkurriert, wieder gelöst. Eine solche Verfahrensweise erfordert jedoch weitere komplizierte Arbeitsschritte, die wiederum mit Fehlerquellen behaftet sind und zudem die frisch isolierten Endothelzellen strapazieren.

Ein weiteres Problem, welches bei der Verwendung der relativ großen und adhärennten Dynabeads auftritt, besteht darin, daß nach deren Verwendung zur Zellisolierung einige wichtige Zell-Charakterisierungen wie z.B. die FACS- Analyse nicht mehr möglich sind. Hierbei verhindert bereits die Größe der Beads (Dynabeads haben einen Durchmesser von 0,5-100  $\mu\text{m}$ , während MicroBeads eine Größe von 50 nm aufweisen) ein ungehindertes Passieren des Durchflußzytometers. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte bei Drake und Loke so lediglich durch Immunhistochemie.

Zwar stellt die von Drake und Loke vorgestellte Methode zur Isolierung und Aufreinigung von Endothelzellen eine praktikable Möglichkeit dar, die zur Gewinnung reiner Zellkulturen führt (> 95% Reinheit), jedoch bringt die Verwendung von Dynabeads zahlreiche Schwierigkeiten mit sich, die die vorherige Beschichtung der Beads, deren Interaktion mit den Endothelzellen, sowie deren Größe betrifft.

Leach *et al.* (Leach *et al.*, 1994) griffen die von Drake und Loke beschriebene Methode zur Isolierung von Endothelzellen aus Deziduagewebe auf und nutzten sie zur Gewinnung von humanen mikrovaskulären plazentaren Endothelzellen.

Die schon beschriebene Problematik bei der Verwendung von Dynabeads kommt auch hier zum Tragen. Die Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte bei Leach *et al.* mittels Beobachtung morphologischer Kriterien unter dem Phasenkontrastmikroskop bzw. Elektronenmikroskop, sowie immunhistochemischen Färbungen mit positiver Immunreaktion der Zellen mit von anti-vWF, Ulex-1 lectin und QB- End/40. Desweiteren erfolgte eine Charakterisierung der Zellen mittels der Aufnahme von Dil-Ac-LDL.

Die so gewonnen Endothelzellen wiesen anhand der gerade aufgezeigten Kriterien eine sehr hohe Homogenität auf, jedoch konnte eine Zellkultur mit hoher Reinheit nur über 5 Passagen aufrecht erhalten werden.

Kacemi *et al.* (Kacemi *et al.*, 1996) entwickelten ebenfalls eine Methode zur Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen aus der Plazenta, jedoch mit Hilfe von MicroBeads. Die magnetische Zellseparation erfolgte mit MicroBeads, die mit CD 105 bzw. Antithrombomodulin gekoppelt waren. Hierbei mußten die Beads zunächst mit einem Primärantikörper (sheep anti-mouse) beschichtet werden, bevor die Kopplung an die Sekundärantikörper (Endo1 bzw. Antithrombomodulin) stattfinden konnte. Dieses Vorgehen ist zum einen sehr zeitintensiv (2-3 Arbeitstage) und birgt zum anderen aufgrund der zahlreichen Arbeitsschritte viele Fehlerquellen. So können bereits beim Beschichten der Beads vor der eigentlichen Zellseparation Fehler unterlaufen.

Ein weiterer Nachteil der Methode von Kacemi *et al.* ist das Verbleiben der Beads auf den Zellen bis hin zur 8. Passage, wobei die Beads zunehmend von den Endothelzellen phagozytiert wurden. Was diese Stoffwechselforgänge in den Zellen auslösen und inwiefern sie weitere Untersuchungen beeinflussen, bleibt fraglich. Gleichzeitig ändern sich endothelzellspezifische Eigenschaften wie etwa die Aufnahme von Dil-Ac-LDL ebenfalls etwa ab der 8. Passage.

Bei der Isolierung der Zellen wurden bei Kacemi *et al.* unspezifische Bindungen der Antikörper nicht durch ein entsprechendes FcR Blocking Reagenz verhindert. Hier bleibt unklar, wie groß der Anteil der Zellen war, die im Hintergrund fälschlicherweise mitmarkiert wurden.

Schütz und Friedl (1996) isolierten humane plazentare mikrovaskuläre Endothelzellen mittels Perfusion des gesamten Organs. Hierbei wurde eine mit proteolytischen Enzymen versetzte Lösung über die Nabelschnurvene eingebracht und abgelöste Zellen wurden ausgespült. Die Perfusion der gesamten Plazenta ist schwierig durchzuführen, sowie teuer im Materialverbrauch. Daneben bleibt die endgültige Reinheit der so gewonnenen Zellkultur unklar, da anzunehmen ist, daß ein Teil der isolierten Zellen von der Nabelschnurvene, sowie von großen Gefäßen der Chorionplatte stammt (Ugele und Lange, 2001).

Das gleiche Problem wird auch bei Jinga *et al.* (Jinga *et al.*, 2000) deutlich. Die Isolierung plazentarer Endothelzellen erfolgte auch hier mittels enzymatischer Perfusion des gesamten Organs, was eine Kontamination mit makrovaskulären Zellen wahrscheinlich macht.

## **5.2 Neue Methode zur Isolierung von HPMVEC mit CD 105 MicroBeads**

Wie bereits erläutert, birgt die Verwendung von Dynabeads zur Zellseparation einige Schwierigkeiten, die sich durch die Nutzung von MicroBeads verhindern lassen. Zusätzlich macht die Zellseparation mittels Dynabeads eine sofortige Charakterisierung der isolierten Zellen mittels FACS- Analyse unmöglich, da sich die Beads aufgrund ihrer Größe nicht für die Durchflußzytometrie eignen. Die Durchflußzytometrie bietet jedoch eine hervorragende Möglichkeit, die isolierten Zellen ab der ersten Passage auf die Expression verschiedenster Oberflächenmoleküle hin zu untersuchen. Nach der von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Methode zur Aufreinigung der Endothelzellen mit MicroBeads ist dies aufgrund der geringen Größe der Beads möglich. Es lassen sich so die Oberflächeneigenschaften der zu untersuchenden Zellen von Beginn an und im Verlauf darstellen. Zwar verwendeten Kacemi *et al.* ebenfalls CD 105 MicroBeads, diese mußten jedoch zunächst eigenständig in aufwendigen Arbeitsschritten beschichtet werden. Bei unseren Experimenten wurden direkt gekoppelte MicroBeads verwendet, die als kommerzielles Produkt strengen Qualitätskontrollen unterliegen und sehr viel sicherer und einfacher in der Handhabung sind.

Bei allen beschriebenen Methoden bestanden Schwierigkeiten bei der Langzeitkultivierung der isolierten Zellen. So konnte etwa bei Leach *et al.* eine

homogene Zellkultur nur über 5 Passagen, bei Schütz und Friedl über 8 Passagen aufrecht erhalten werden.

Im Gegensatz dazu können die von uns mit CD 105 aufgereinigten Zellen über 12-15 Passagen mit hoher Reinheit und konstanter Expression der endothelzellspezifischen Oberflächenantigene kultiviert werden.

### **5.2.1 Verwendung von CD 105 (Endoglin)/ kritische Betrachtung der Methode**

CD 105 ist ein 180 kDa homodimeres Membranprotein, welches als Rezeptor für Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) und Transforming Growth Factor  $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3) dient (Zhang *et al.*, 2002). TGF-  $\beta$  ist ein pleiotropes Zytokin, welches verschiedene zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Migration reguliert (Fonsatti *et al.*, 2003). Desweiteren spielen die Signalwege des TGF-  $\beta$  Komplexes eine zentrale Rolle bei der Angiogenese (Lebrin *et al.*, 2005). CD 105 wird vor allem von Zellen innerhalb des vaskulären Systems exprimiert, insbesondere von Endothelzellen (Blanco *et al.*, 2005; Fonsatti *et al.*, 2003). Eine Steigerung der CD 105- Expression findet man in proliferierenden Endothelzellen, welche sich in der Angiogenese befinden, so z.B. auf Endothelzellen in heilenden Wunden (Guo *et al.*, 2004) und der Plazenta. Eine Überexpression von CD 105 findet sich außerdem bei verschiedenen Tumorendothelien, so z.B. in Kolon-, Brust-, Gehirn-, Lungen-, Prostata-, und Zervixkarzinomen (Duff *et al.*, 2003; Burrows *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 1996; Bodey *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1999).

Andere Zelltypen wie z.B. vaskuläre glatte Muskelzellen (Adam *et al.*, 1998), Fibroblasten (St.-Jacques *et al.*, 1994) und Makrophagen (Lastres *et al.*, 1992) exprimieren CD 105 in weitaus geringeren Mengen. Synzytiotrophoblasten, sowie extravillöse Zytrophoblasten der menschlichen Plazenta enthalten ebenfalls ein hohes Maß an CD 105 (Gougos *et al.*, 1992; St-Jacques *et al.*, 1994; Dagdeviren *et al.*, 1998). Außerdem findet sich CD 105 in aktivierten Monozyten, Gewebemakrophagen und erythroiden Vorläuferzellen des fetalen und erwachsenen Knochenmarks (Gougos und Letarte, 1988; Bühring *et al.*, 1991; Lastres *et al.*, 1992; Robledo *et al.*, 1996).

Bei der Isolierung der mikrovaskulären Endothelzellen aus der Plazenta entschied sich unsere Arbeitsgruppe aus unterschiedlichen Gründen für die Verwendung von CD 105 MicroBeads. Vor allem die einfache Handhabung der MicroBeads und die Möglichkeit

der anschließenden FACS- Analyse bieten einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Zellseparation mit Dynabeads, wie sie von Drake und Loke bzw. Leach *et al.* durchgeführt wurde.

Wie oben erwähnt, exprimieren zwar vor allem, jedoch keinesfalls ausschließlich Endothelzellen CD 105. Darum ist es wichtig, Kontaminationen mit anderen Zelltypen zu verhindern. Vor allem auf eine Verunreinigung mit makrovaskulären Endothelzellen und Synzytiotrophoblasten ist zu achten. Um eine besonders reine Kultur mikrovaskulärer Endothelzellen zu erreichen, ist eine genaue Präparation des Gewebes mit direktem Präparieren und Verwerten der Mikrogefäße nötig. Auf diese Weise läßt sich nicht nur die Reinheit der Kultur, sondern auch die Zellausbeute erhöhen.

In der FACS- Analyse ließ sich die endotheliale Herkunft der Zellen durch den Einsatz von klassischen endothelialen Markern wie CD 31 und vWF nachweisen. Die Doppelfärbungen mit CD 105 verdeutlichen, daß es sich bei den mit CD 105 MicroBeads isolierten Zellen gleichzeitig um Endothelzellen und nicht etwa um Synzytiotrophoblasten handelt. Auch die Aufnahme von Fluoreszein-markiertem Dil-Ac-LDL spricht für die endotheliale Herkunft der Zellen.

Im Gegensatz zu den der Makrovaskulatur entstammenden HUVEC, wurden HPMVEC als *nicht* pflastersteinartig angeordnet wachsend beschrieben. (Kacemi *et al.*, 1996; Leach *et al.*, 1994; Schütz und Friedl, 1996). Vielmehr wird ihre Form im konfluenten Monolayer als langgezogen, sowie teilweise „sternförmig“ oder polygonal beschrieben (Leach *et al.*, 1994). Kacemi *et al.* sprechen von spindelförmigen, langgezogenen Zellen, die zum Teil zirkuläre Formationen bilden. Dementsprechend spricht auch die Morphologie der von uns isolierten Zellen für deren mikrovaskuläre Herkunft. Wir beobachteten ebenfalls, daß die Zellen sich nicht in typischer Formation pflastersteinartig anordneten, sondern zum großen Teil langgestreckt bzw. polygonal wuchsen.

### 5.3 Ausblick

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, bietet die Plazenta ein wichtiges Modell für Vaskulogenese und Angiogenese. Um die Vorgänge der Vaskulogenese, bei der endotheliale Vorläuferzellen ein primitives Gefäßgeflecht ausbilden, näher untersuchen zu können, werden zur Zeit von unserer Arbeitsgruppe endotheliale Vorläuferzellen aus CD 133 positiven Stammzellen gewonnen (Baal *et al.*, 2004). Hierbei sind die genau charakterisierten mikrovaskulären Endothelzellen als Vergleichspopulation unerlässlich.

Eine noch bessere Lösung wäre die Isolierung der Zellen mit einem ausschließlichen Endothelmarker, wie z.B. CD 31. CD 31 ist ein Adhäsionsmolekül und vermittelt die Adhäsion an PECAM-1. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Diapedese im Rahmen der Leukozyten-Emigration bei Entzündungsreaktionen, sowie bei der Angiogenese. CD 31 ist ein sensitiver und spezifischer Marker für endotheliale Zellen. CD 31 MicroBeads waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht erhältlich. Auch zum jetzigen Zeitpunkt werden sie noch nicht kommerziell vermarktet. Mit Hilfe der von Milteny Biotec freundlicherweise zur Verfügung gestellten Produktprobe arbeitet unsere Forschungsgruppe jedoch zur Zeit an einer Isolierung von mikrovaskulären plazentaren Endothelzellen mit CD 31 MicroBeads.

Im Rahmen der Angiogenese (neue Kapillaren entspringen aus präexistenten Gefäßen) spielen viele angiogene Substanzen wie z.B. hCG und AFP eine Rolle. In unserer Arbeitsgruppe konnte in einem dreidimensionalen Angiogenese Assay bereits gezeigt werden, daß an uterinen Endothelzellen physiologische Konzentrationen von hCG die Angiogenese fördern (Aussprossen von tubulären Strukturen aus den Plastikträgern in die Matrix) (Zygmunt *et al.*, 2002). Im folgenden werden nun auch mikrovaskuläre Endothelzellen unter dem Einfluß angiogener Substanzen untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, daß hCG die Proliferation von HPMVEC fördert und deren Apoptose entgegenwirkt (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Außerdem wurde ein proliferativer Effekt von AFP auf HPMVEC nachgewiesen. AFP zeigte im Sprout Assay zudem synergistische Effekte mit VEGF zusammen (Liang *et al.*, 2004).

## 6 Zusammenfassung

Die Entwicklung des Gefäßsystems in der Plazenta ist Voraussetzung für einen adäquaten Gasaustausch, für den Transport von Nährstoffen zwischen Mutter und Fetus und somit für eine normale embryonale Entwicklung und das fetale Wachstum. Die Bildung neuer Blutgefäße in der Plazenta als fetalem Organ erfolgt im Rahmen der Vaskulogenese und Angiogenese. Während der Vaskulogenese bilden Endothelvorläuferzellen (Angioblasten) ein primitives Gefäßgeflecht aus. Der Ausbau eines komplexen Gefäßsystemes erfolgt im Rahmen der Angiogenese. Hierbei kommt es zunächst zur Steigerung der Gefäßpermeabilität und Auflösung der Basalmembran bereits existierender Blutgefäße mit anschließender Proliferation und Migration von Endothelzellen zu den Orten der Gefäßneubildung. Dort kommt es zunächst zur Formation röhrenförmiger Strukturen, die nach Assoziation mit glatten Muskelzellen bzw. Perizyten im Zusammenspiel mit Angiogenesefaktoren zu intakten Blutgefäßen maturieren. Die Angiogenese in der Plazenta ist ein Prozeß, der sich in der Mikrovaskulatur abspielt. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß nicht nur Endothelzellen verschiedener Organe unterschiedliche Aufgaben erfüllen, sondern daß sich auch die Eigenschaften makrovaskulärer und mikrovaskulärer Endothelzellen deutlich unterscheiden. Bisher wurden als *in vitro* Modell der Angiogenese vor allem Endothelzellen aus der Nabelschnurvene verwendet. Diese sind einfach in der Gewinnung und Kultivierung, es handelt sich jedoch um makrovaskuläre extraplazentare Endothelzellen. In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Modell basierend auf plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen etabliert. Die Isolierung der Endothelzellen erfolgte aus dem Zottengewebe frischer Plazenta. Nach der Präparation von Mikrogefäßen erfolgte ein Verdau mit Kollagenase und Trypsin. Nach der Filtration der Suspension durch ein Zellsieb wurde die so gewonnene Mischkultur kultiviert. Ein Teil der Kultur wurde mittels FACS analysiert, wobei sich nur ein geringer Anteil endothelialer Zellen und ein großer Anteil stromaler und trophoblastischer Zellen zeigte. Der andere Teil wurde mit Hilfe von CD 105 MicroBeads aufgereinigt, wobei die magnetischen Beads mit dem Oberflächenmolekül CD 105 reagieren, welches sehr stark auf Endothelzellen, die sich in der Angiogenese befinden, exprimiert wird. Die Charakterisierung der erhaltenen Endothelzellkultur erfolgte mittels FACS Analyse. Hierbei konnte die endotheliale Herkunft der Zellen anhand von spezifischen Oberflächenmarkern (CD 31, CD 144,

vWF, VEGFR-2) aufgezeigt werden. Außerdem wurde die Aufnahme von Dil-Ac-LDL demonstriert, die endothelialen Zellen vorbehalten ist.

Die etablierte Methode zur Gewinnung von plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen ist einfach reproduzierbar und bietet ein *in vitro* Modell, welches zum besseren Verständnis der Gefäßneubildung während der Schwangerschaft und somit zur Erschließung neuer therapeutischer Ansätze bei der Behandlung vaskulärer Störungen während der Schwangerschaft beitragen soll.

## 6 Summary

Normal fetal growth and development, including an adequate gas exchange as well as the transport of nutrients between mother and fetus, requires the development of placental vasculature. The two distinct processes defining the formation of new blood vessels in the fetal organ placenta are called vasculogenesis and angiogenesis. During vasculogenesis endothelial precursor cells (angioblasts) build up a formation of primitive vascular structure. The sprouting of capillaries from preexisting blood vessels takes place during angiogenesis. In angiogenesis the proteolytic degradation of the extracellular matrix is followed by proliferation and migration of endothelial cells towards the locations of new blood vessel formation. After the formation of tube-like structures and their association with pericytes and smooth muscle cells, mature blood vessels can develop with the help of angiogenic growth factors. Angiogenic processes in the placenta take place in the microvasculature. In recent years it became clear that endothelial cells display remarkable heterogeneity in different organs. In addition to that it was found that macrovascular and microvascular endothelial cells display different features. Until now mostly endothelial cells from umbilical cord vein were used as an *in vitro* model for angiogenesis. These cells can easily be isolated and cultured but represent macrovascular extraplacental endothelial cells.

An *in vitro* model based on placental microvascular endothelial cells was established within this thesis. Fresh placental villous tissue was used for the isolation of endothelial cells. Preparation of microvessels was followed by digestion with collagenase and trypsin. The filtrate of the cell suspension was cultured. One part of this mixed culture was analyzed by FACS. Only few endothelial cells could be detected whereas the major part turned out to consist of stromal and trophoblastic cells. The other part of the mixed culture was purified with CD 105 MicroBeads. These magnetic beads react with CD 105, which is highly expressed by endothelial cells that are involved in angiogenesis. The endothelial cell culture was characterized by FACS using specific antibodies (CD 31, CD 144, vWF, VEGFR-2) to show the endothelial origin of the cells. The absorption of Dil-Ac-LDL which is considered as one of the most sensitive markers for endothelial cells could also be demonstrated.

This method for isolation and cultivation of placental microvascular endothelial cells is easily reproducible. Used as an *in vitro* model it might lead to a better understanding of

placental vessel formation during pregnancy and might allow the establishment of new therapeutic strategies for the treatment of pregnancy related vascular pathology.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL.  
Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells.  
Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jun 9;247(1):33-7.
2. Anders E, Alles JU, Delvos U, Potzsch B, Preissner KT, Muller-Berghaus G.  
Microvascular endothelial cells from human omental tissue: modified method for long-term cultivation and new aspects of characterization.  
Microvasc Res. 1987 Sep;34(2):239-49.
3. Asan E, Kaymaz FF, Cakar AN, Dagdeviren A, Beksac MS.  
Vasculogenesis in early human placental villi: an ultrastructural study.  
Anat Anz. 1999 Dec;181(6):549-54.
4. Augustin HG.  
Angiogenesis in the female reproductive system.  
EXS. 2005;(94):35-52.
5. Baal N, Reisinger K, Jahr H, Bohle RM, Liang O, Munstedt K, Rao CV, Preissner KT, Zygmunt MT.  
Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood.  
Thromb Haemost. 2004 Oct;92(4):767-75.
6. Barker DJ.  
The intrauterine origins of cardiovascular and obstructive lung disease in adult life. The Marc Daniels Lecture 1990.  
J R Coll Physicians Lond. 1991 Apr;25(2):129-33.

7. Belloni PN, Tressler RJ.  
Microvascular endothelial cell heterogeneity: interactions with leukocytes and tumor cells.  
Cancer Metastasis Rev. 1990 Feb;8(4):353-89.
8. Bergers G, Benjamin LE.  
Tumorigenesis and the angiogenic switch.  
Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):401-10.
9. Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C.  
Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex.  
J Cell Physiol. 2005 Aug;204(2):574-84.
10. Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G.  
Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening.  
Placenta. 2000 Sep;21(7):733-41.
11. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE.  
Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization.  
Anticancer Res. 1998 Sep-Oct;18(5A):3621-8.
12. Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH.  
Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research.  
Angiogenesis. 2001;4(2):91-102.
13. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L.  
Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing.  
J Exp Med. 1992 Nov 1;176(5):1375-9.

14. Bühring HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmuller A, van Agthoven AJ, Busch FW.  
Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow.  
Leukemia. 1991 Oct;5(10):841-7.
15. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE.  
Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy.  
Clin Cancer Res. 1995 Dec;1(12):1623-34.
16. Chan AO.  
E-cadherin in gastric cancer.  
World J Gastroenterol. 2006 Jan 14;12(2):199-203.
17. Dagdeviren A, Muftuoglu SF, Cakar AN, Ors U.  
Endoglin (CD 105) expression in human lymphoid organs and placenta.  
Ann Anat. 1998 Oct;180(5):461-9.
18. Davison PM, Bensch K, Karasek MA.  
Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture.  
J Invest Dermatol. 1980 Oct;75(4):316-21.
19. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM.  
Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis.  
Am J Pathol. 1997 Sep;151(3):671-7.
20. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM.  
Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31.  
Immunol Today. 1994 Oct;15(10):490-5.

21. Del Vecchio PJ, Siflinger-Birnboim A, Belloni PN, Holleran LA, Lum H, Malik AB.  
Culture and characterization of pulmonary microvascular endothelial cells.  
*In Vitro Cell Dev Biol.* 1992 Nov-Dec;28A(11-12):711-5.
22. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A.  
Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi.  
*Acta Anat (Basel).* 1989;136(3):190-203.
23. Drake BL, Loke YW.  
Isolation of endothelial cells from human first trimester decidua using immunomagnetic beads.  
*Hum Reprod.* 1991 Sep;6(8):1156-9.
24. Drake CJ, LaRue A, Ferrara N, Little CD.  
VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis.  
*Dev Biol.* 2000 Aug 15;224(2):178-88.
25. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S.  
CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications.  
*FASEB J.* 2003 Jun;17(9):984-92.
26. Esmon CT.  
Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface.  
*FASEB J.* 1995 Jul;9(10):946-55.
27. Flamme I, Frolich T, Risau W.  
Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis.  
*J Cell Physiol.* 1997 Nov;173(2):206-10.

28. Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M.  
Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies.  
Curr Cancer Drug Targets. 2003 Dec;3(6):427-32.
29. Garlanda C, Dejana E.  
Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Jul;17(7):1193-202.
30. Gerritsen ME.  
Functional heterogeneity of vascular endothelial cells.  
Biochem Pharmacol. 1987 Sep 1;36(17):2701-11.
31. Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB.  
Angiogenesis in the human female reproductive tract.  
Obstet Gynecol Surv. 1995 Sep;50(9):688-97.
32. Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhring HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M.  
Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts.  
Int Immunol. 1992 Jan;4(1):83-92.
33. Gougos A, Letarte M.  
Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line.  
J Immunol. 1988 Sep 15;141(6):1925-33.
34. Guo B, Slevin M, Li C, Parameshwar S, Liu D, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S.  
CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling.  
Anticancer Res. 2004 May-Jun;24(3a):1337-45.

35. Hanahan D, Folkman J.  
Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.  
Cell. 1996 Aug 9;86(3):353-64.
36. Herr F, Liang OD, Herrero J, Lang U, Preissner KT, Han VK, Zygumnt M.  
Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy.  
J Clin Endocrinol Metab. 2003 Oct;88(10):4811-7.
37. Hewett PW, Murray JC.  
Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization.  
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1993 Nov;29A(11):823-30.
38. Hewett PW, Murray JC, Price EA, Watts ME, Woodcock M.  
Isolation and characterization of microvessel endothelial cells from human mammary adipose tissue.  
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1993 Apr;29A(4):325-31.
39. Hitschold T, Weiss E, Beck T, Hunterfering H, Berle P.  
Low target birth weight or growth retardation? Umbilical Doppler flow velocity waveforms and histometric analysis of fetoplacental vascular tree.  
Am J Obstet Gynecol. 1993 Apr;168(4):1260-4.
40. Jackson CJ, Garbett PK, Nissen B, Schrieber L.  
Binding of human endothelium to Ulex europaeus I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium.  
J Cell Sci. 1990 Jun;96 ( Pt 2):257-62.
41. Jackson MR, Walsh AJ, Morrow RJ, Mullen JB, Lye SJ, Ritchie JW.  
Reduced placental villous tree elaboration in small-for-gestational-age pregnancies: relationship with umbilical artery Doppler waveforms.  
Am J Obstet Gynecol. 1995 Feb;172(2 Pt 1):518-25.

42. Jackson CJ, Nguyen M.  
Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases.  
Int J Biochem Cell Biol. 1997 Oct;29(10):1167-77.
43. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR.  
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.  
J Clin Invest. 1973 Nov;52(11):2745-56.
44. Jinga VV, Gafencu A, Antohe F, Constantinescu E, Heltianu C, Raicu M, Manolescu I, Hunziker W, Simionescu M.  
Establishment of a pure vascular endothelial cell line from human placenta.  
Placenta. 2000 May;21(4):325-36.
45. Kacemi A, Challier JC, Galtier M, Olive G.  
Culture of endothelial cells from human placental microvessels.  
Cell Tissue Res. 1996 Feb;283(2):183-90.
46. Kern PA, Knedler A, Eckel RH.  
Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue.  
J Clin Invest. 1983 Jun;71(6):1822-9.
47. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I.  
Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants.  
Br J Obstet Gynaecol. 1986 Oct;93(10):1049-59.
48. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS.  
CD34: structure, biology, and clinical utility.  
Blood. 1996 Jan 1;87(1):1-13.

49. Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JC.  
Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree.  
Am J Obstet Gynecol. 1996 Dec;175(6):1534-42.
50. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N.  
Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis.  
Cancer Res. 1999 Feb 15;59(4):856-61.
51. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C.  
CD 105 and angiogenesis.  
J Pathol. 1996 Apr;178(4):363-6.
52. Kumar S, West DC, Ager A.  
Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels.  
Differentiation. 1987;36(1):57-70.
53. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E.  
A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts.  
J Cell Biol. 1992 Sep;118(6):1511-22.
54. Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabeu C.  
Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen.  
Eur J Immunol. 1992 Feb;22(2):393-7.

55. Leach L, Bhasin Y, Clark P, Firth JA.  
Isolation of endothelial cells from human term placental villi using immunomagnetic beads.  
Placenta. 1994 Jun;15(4):355-64.
56. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P.  
TGF-beta receptor function in the endothelium.  
Cardiovasc Res. 2005 Feb 15;65(3):599-608.
57. Liang OD, Korff T, Eckhardt J, Rifaat J, Baal N, Herr F, Preissner KT, Zygmunt M.  
Oncodevelopmental alpha-fetoprotein acts as a selective proangiogenic factor on endothelial cell from the fetomaternal unit.  
J Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;89(3):1415-22.
58. Lindl T.  
Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 4.Aufl. Spektrum: Akademischer Verlag Heidelberg (2000).
59. Maldonado-Estrada J, Menu E, Roques P, Barre-Sinoussi F, Chaouat G.  
Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry.  
J Immunol Methods. 2004 Mar;286(1-2):21-34.
60. Manoussaka MS, Jackson DJ, Lock RJ, Sooranna SR, Kumpel BM.  
Flow cytometric characterisation of cells of differing densities isolated from human term placentae and enrichment of villous trophoblast cells.  
Placenta. 2005 Apr;26(4):308-18.

61. Marks RM, Czerniecki M, Penny R.  
Human dermal microvascular endothelial cells: an improved method for tissue culture and a description of some singular properties in culture.  
In Vitro Cell Dev Biol. 1985 Nov;21(11):627-35.
62. McDouall RM, Yacoub M, Rose ML.  
Isolation, culture, and characterisation of MHC class II-positive microvascular endothelial cells from the human heart.  
Microvasc Res. 1996 Mar;51(2):137-52.
63. Meegdes BH, Ingenhoes R, Peeters LL, Exalto N.  
Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development.  
Fertil Steril. 1988 Feb;49(2):216-20.
64. Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A.  
High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.  
Cell. 1993 Mar 26;72(6):835-46.
65. Moore KL, Persaud TVN.  
Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen.  
4., überarb. und erw. Aufl. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York (1996).
66. Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R.  
Antigenic heterogeneity of vascular endothelium.  
Am J Pathol. 1992 Sep;141(3):673-83.
67. Petzelbauer P, Bender JR, Wilson J, Pober JS.  
Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture.  
J Immunol. 1993 Nov 1;151(9):5062-72.

68. Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS.  
Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome.  
Diabetes. 1997 Sep;46 Suppl 2:S9-13.
69. Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA.  
Angiogenesis in the female reproductive system.  
FASEB J. 1992 Feb 1;6(3):886-92.
70. Risau W.  
Mechanisms of angiogenesis.  
Nature. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
71. Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo AG, Bernabeu C, Sanchez-Madrid F, Teixido J.  
Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells.  
Br J Haematol. 1996 Jun;93(3):507-14.
72. Ruoslahti E, Rajotte D.  
An address system in the vasculature of normal tissues and tumors.  
Annu Rev Immunol. 2000;18:813-27.
73. Schütz M, Friedl P.  
Isolation and cultivation of endothelial cells derived from human placenta.  
Eur J Cell Biol. 1996 Dec;71(4):395-401.
74. Springer TA.  
Adhesion receptors of the immune system.  
Nature. 1990 Aug 2;346(6283):425-34.

75. St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M.  
Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells.  
Endocrinology. 1994 Jun;134(6):2645-57.
76. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD.  
Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis.  
Cell. 1996 Dec 27;87(7):1171-80.
77. Teasdale F.  
Idiopathic intrauterine growth retardation: histomorphometry of the human placenta.  
Placenta. 1984 Jan-Feb;5(1):83-92.
78. Ugele B, Lange F.  
Isolation of endothelial cells from human placental microvessels: effect of different proteolytic enzymes on releasing endothelial cells from villous tissue.  
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2001 Jul-Aug;37(7):408-13.
79. Ulfing N.  
Kurzlehrbuch Embryologie.  
1. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York (2005).
80. Urbich C, Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S.  
Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis.  
Circ Res. 2000 Oct 13;87(8):683-9.

81. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR.  
Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein.  
J Cell Biol. 1984 Dec;99(6):2034-40.
82. Zhang EG, Smith SK, Charnock-Jones DS.  
Expression of CD105 (endoglin) in arteriolar endothelial cells of human endometrium throughout the menstrual cycle.  
Reproduction. 2002 Nov;124(5):703-11.
83. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, Lang U, Preissner KT.  
Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor.  
J Clin Endocrinol Metab. 2002 Nov;87(11):5290-6.
84. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD.  
Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy.  
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S10-8.
85. Zygmunt M.  
Placental circulation: Clinical significance.  
Early Pregnancy. 2001 Jan;5(1):72-3.
86. Zygmunt M.  
Kapitel 17: Plazenta. Klinische Pathophysiologie. [Siegenthaler/ Blum, Hrsg.], 9. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York (2006): 407-427.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Ac-LDL	Acetyliertes Low Density Lipoprotein
AFP	Alpha-Fetoprotein
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
Dil	1,1`-dioctadecyl-3,3,3`,3`-tetramethylindo- carbocyanine-perchlorate
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBM	Endothelial Basal Medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FACS	fluorescent activated cell sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenzkanal/Fluoreszenzintensität
FSC	Forward scatter
GMP 140	Granulum-Membranprotein 140
HBSS	Hanks` Balanced Salt Solution
hCG	humanes Choriongonadotropin
13-HODE	13-Hydroxylinolensäure
HPMVEC	humane plazentare mikrovaskuläre Endothelzellen
hPL	humanes Plazentalaktogen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I-CAM	Induzierbares Zelladhäsionsmolekül
IGF-II	insulin-like growth factor-II
IgG	Immunglobulin
MACS	magnetic cell sorting
min.	Minuten
NO	Stickstoffmonoxid
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphat Buffered Saline

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGF-Receptor $\beta$	Platelet Derived Growth Factor-Receptor $\beta$
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PerCP	Peridin Chlorophyll-a Protein
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
rpm	rounds per minute
SSC	Side Scatter
Std.	Stunden
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
TGF- $\beta$ 2	Transforming Growth Factor $\beta$ 2
UMVEC	Uterine Microvascular Endothelial Cells
VE-cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
vWF	von-Willebrand-Faktor
V-CAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül

## 10 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

München, den 07.06.2006

Jessica Eckhardt

## 11 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. M. Zygmunt danke ich für die Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme in sein Team sowie für die fachliche und menschliche Betreuung meiner Arbeit.

Frau Nelli Baal gilt besonderer Dank für die große Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und tatkräftige Unterstützung bei dem experimentellen Teil der Arbeit, sowie für die stetige Gesprächsbereitschaft und Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Frau Bettina Gill für die Einführung in die Methoden des Zellkulturlabors und die freundliche Zusammenarbeit.

Meinem Vater für die tatkräftige Unterstützung und das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Meiner Mutter für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und die stete Erinnerung an ein Leben neben der Medizin.

Meinem Freund Lars Walz für seine Geduld und seine liebevolle Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Meinen Freundinnen Anja Wilton, Wiebke Niemeyer, Lena Peters und Kerstin Seyer für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Jessica Eckhardt  
Geburtsdatum: 14.07.1978  
Geburtsort: New York, N.Y., USA  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

1984 - 1988 Grundschule, Gießen-Allendorf  
1988 - 1994 Brüder-Grimm-Schule, Klein-Linden  
1994 - 1997 Liebigschule, Gießen  
Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

---

Okt - Dez 1997 Studium Englisch und Philosophie, University of Durham, England  
Jan - Mrz 1998 Krankenpflegepraktikum, Marienhospital Papenburg  
Jul - Aug 1998 Redaktionspraktikum bei der Oberhessischen Presse, Marburg

Okt 1998 - Studium der Humanmedizin,  
Apr 2005 Justus-Liebig-Universität, Gießen

### seit September 2005:

Assistenzärztin in der Augenklinik der Technischen Universität München, Klinikum  
Rechts der Isar,  
Prof. Dr. Dr. Chris P. Lohmann

### Publikationen:

Liang OD, Korff T, Eckhardt J, Rifaat J, Baal N, Herr F, Preissner KT,  
Zygmunt M. Oncodevelopmental alpha-fetoprotein acts as a selective proangiogenic  
factor on endothelial cell from the fetomaternal unit. J Clin Endocrinol Metab. 2004  
Mar;89(3):1415-22.