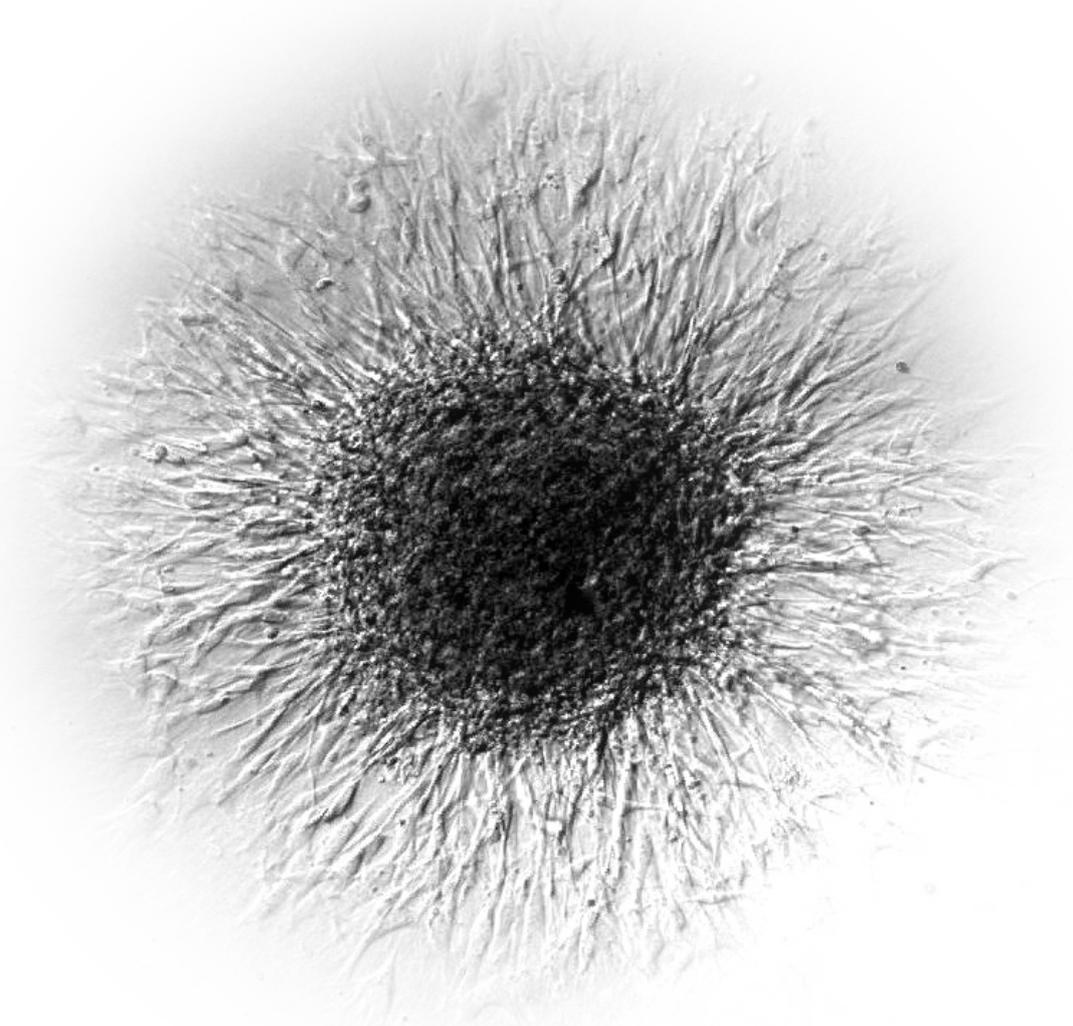


Das humane Choriongonadotropin und sein Einfluss auf die
mikrovaskulären Endothelzellen der Plazenta in einem *in vitro* Modell



Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Anne Lorenz
aus Radebeul

Gießen 2010

Das humane Choriongonadotropin und sein Einfluss auf die
mikrovaskulären Endothelzellen der humanen Plazenta in einem *in vitro* Modell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lorenz, Anne
aus Radebeul

Gießen 2010

Aus dem medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. H.-R. Tinneberg

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Zygmunt

Gutachter: Prof. Dr. med. R. Schulz

Tag der Disputation: 12.07.2011

Für meine Eltern

Verzeichnisse

Inhalt

Abbildungen

Abkürzungen

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Die Vaskulatur	1
1.2. Die Plazenta	3
1.2.1. Die Entwicklung der Plazenta und deren Gefäßbildung	3
1.2.2. Die reife Plazenta	6
1.2.3. Der Aufbau der Zotten	8
1.2.4. Die Funktion der Plazenta	10
1.3. Die feto-maternale Einheit	12
1.4. Gefäße und Endothel	12
1.5. Das humane Choriongonadotropin	14
1.6. Der LH/hCG-Rezeptor	16
2. Zielsetzung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Material	19
3.1.1. Geräte	19
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3. Chemikalien	20
3.1.4. Kommerzielle Assays/ Programme zur Datenauswertung	22
3.1.5. Antikörper	22

3.2. Methoden	23
3.2.1. Die Isolierung der HPMVEC	23
3.2.2. Die Aufreinigung der Mischkultur	25
3.2.3. Die Kultivierung der HPMVEC	27
3.2.4. Die Charakterisierung der HPMVEC	28
3.2.5. Einfrieren und Auftauen der HPMVEC	31
3.2.6. Der Proliferationsassay	31
3.2.7. Der Nachweis des LH/hCG-Rezeptors	32
3.2.8. Der Apoptose-Assay	34
3.2.9. Die Herstellung von Kollagen	36
3.2.10. Die Sphäroid-Kultur	37
3.2.11. Statistik	40
4. Ergebnisse	41
4.1. Die Isolierung und Aufreinigung der HPMVEC	41
4.1.1. Die Isolierung	41
4.1.2. Die Aufreinigung der Mischkultur	42
4.2. Charakterisierung der HPMVEC	44
4.3. Der Nachweis des LH/hCG-Rezeptors auf HPMVEC	46
4.4. Die Proliferation der HPMVEC	47
4.5. Der Einfluss von hCG auf die Apoptose der HPMVEC	48
4.6. Die Sphäroid-Kultur als <i>in vitro</i> Angiogenesetest für HPMVEC	52
5. Diskussion	55
5.1. Die Isolierung von HMPVECs	55
5.2. Der LH/hCG-Rezeptor im Zusammenhang mit der plazentaren Angiogenese	57
5.3. Der Einfluss von hCG auf die Proliferation und Apoptose	58
5.4. Die Sphäroidbildung	61
5.5. hCG in der Angiogenese	62
6. Zusammenfassung	64
7. Summary	65

8. Literaturverzeichnis	66
Erklärung	84
Danksagung	85
Lebenslauf	86

Abbildungen

Abb. 1-1:	Zellteilung: von der Oozyte zur Morula	3
Abb. 1-2:	Entwicklung der Zotten	4
Abb. 1-3:	Photographie einer termingerechten reifen Plazenta	6
Abb. 1-4:	Schematische Darstellung der reifen Plazenta	8
Abb. 1-5:	Schematische Darstellung einer Chorionzotte	10
Abb. 1-6:	Kristallstruktur von hCG	14
Abb. 3-1:	Pufferzusammensetzung / Waschlösung	25
Abb. 3-2:	Schematische Darstellung der magnetische Zellseparation	26
Abb. 3-3:	Zusammensetzung des MACS-Puffers	27
Abb. 3-4:	Punktwolkendarstellung der detektierten Zellpopulation	30
Abb. 3-5:	Zusammensetzung des Einfriermediums	31
Abb. 3-6:	Zusammensetzung Tris-acetate-EDTA Puffer	33
Abb. 3-7:	Zusammensetzung des Methylcellulose-Mediums	38
Abb. 3-8:	Zusammensetzung der Kollagenlösung	38
Abb. 4-1:	Photo der Mischkultur aus Endothelzellen, Perizyten und Muskelzellen	41
Abb. 4-2a:	Photo der Zellpopulation nach der ersten immunomagnetischen Separation	42
Abb. 4-2b:	FACS-Analyse: CD31 markierte HPMVEC nach der ersten immunomagnetischen Separation	43
Abb. 4-3a:	Photo nach der dritten immunomagnetischen Separation mit CD31 Mikrobeads	43
Abb. 4-3b:	FACS-Analyse: CD31 markierte HPMVEC	43

Abb. 4-4:	FACS-Analyse: Doppelmarkierung mit CD31 und CD141	44
Abb. 4-5:	FACS-Analyse: Doppelmarkierung mit CD31 und CD144	45
Abb. 4-6:	FACS-Analyse: Doppelmarkierung mit CD31 und VEGFR-2	45
Abb. 4-7:	FACS-Analyse: Doppelmarkierung mit CD31 und vWF	45
Abb. 4-8:	Der Nachweis des LH/hCG-Rezeptors in HPMVEC	46
Abb. 4-9:	Proliferation der HPMVEC	47
Abb. 4-10:	Die Basalapoptose bei den HPMVEC	48
Abb. 4-11:	Die induzierte Apoptose und unterschiedliche hCG-Konzentrationen	49
Abb. 4-12:	Die induzierte Apoptose und hCG mit VEGF	49
Abb. 4-13:	Die Apoptose bei VEGF behandelten HPMVEC	50
Abb. 4-14:	Die hCG-stimulierten HPMVEC und die induzierte Apoptose	51
Abb. 4-15:	Die Apoptoserate der mit hCG und VEGF stimulierten HPMVEC	52
Abb. 4-16:	Die Sproutbildung bei unstimulierten HPMVEC mit 1 % FKS	53
Abb. 4-17:	Die Sproutbildung bei der mit 1 U/ml hCG stimulierten HPMVEC	53
Abb. 4-18:	Die Sproutbildung bei der mit 10 U/ml hCG stimulierten HPMVEC	53
Abb. 4-19:	Die Sproutbildung bei der mit 100 U/ml hCG stimulierten HPMVEC	54
Abb. 4-20:	Zusammenfassung: Der Einfluss von hCG auf die Sproutbildung	54

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	Cyklische Desoxyribonukleinsäure
CD 31	Cluster of differentiation 31
CD105	Cluster of differentiation 105
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBM	Endothelial basal Cell Medium MV-2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und weitere)
FACS	fluorescence-activated cell sorting
(a/b) FGF	(acid/ basic) fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetaöes Kälberserum
GDP /GTP	Guanindiphosphat / Guanintriphosphat
ggf.	gegebenenfalls
HBSS	Hanks balanced salt solution
hCG	Humanes Choriongonadotropin
hCT	Chorionthyreotropin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure 1M
hPL	Humanes Plazentalaktogen
HPMVEC	Humane plazentare mikrovaskuläre Endothelzellen
HUMVEC	Humane uterine mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	Humane umbilikale venöse Endothelzellen
IGF	Insulin-like growth factor
Jeg-3 Zellen	Chorionkarzinom-Zelllinie
LH	Luteinisierendes Hormon
MACS	Magnetic activated Cell Sorting
MCM	Methylcellulose-Medium
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Wasserstoff
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PIGF	Placenta growth factor
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	(Tris-acetate-EDTA)-Puffer
TGF- α/β	Transforming Growth Factor alpha / beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
IE	Internationale Einheit
mm, cm	Millimeter, Zentimeter
µg, mg, g	Mikrogramm, Milligramm, Gramm
µl, ml	Mikroliter, Milliliter
mM, M	Millimol, Mol
min, sek	Minute, Sekunde
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilo Dalton
U, mU	Units, Milliunits

1. Einleitung

1.1. Die Vaskulatur und ihre Entstehung

Das verzweigte Blutgefäßsystem im menschlichen Organismus sorgt für die optimale Versorgung einer jeden Zelle mit Nährstoffen und Sauerstoff. Um dies zu gewährleisten, besteht ein exaktes Gleichgewicht zwischen Faktoren, die die Bildung von Blutgefäßen positiv beeinflussen und denen, die sie hemmen (Bergers und Benjamin, 2003). Die überschießende Blutbahnbildung geht mit pathologischen Zuständen wie beispielsweise Tumorproliferation, Metastasierung, rheumatoider Arthritis und Kollateralenbildung bei okklusiven Gefäßprozessen einher (Hanahan *et al.*, 1996). Im gesunden erwachsenen Organismus erfolgt die Neovaskularisierung lediglich im Zusammenhang mit der Wundheilung (Brown *et al.*, 1992) und während des Aufbaus der Plazenta in der Schwangerschaft (Reynolds *et al.*, 1992; Augustin, 2005).

Prinzipiell wird zwischen der Vaskulogenese und anschließender Angiogenese unterschieden. Die Vaskulogenese beschränkt sich auf die Bildung eines groben primitiven Gefäßsystems aus Angioblasten (Risau, 1997; Flamme *et al.*, 1997, Zygmunt, 2006), während die Angiogenese die Ausbildung der feinen Verzweigungen der Gefäße beinhaltet und somit zu einem komplexen Netzwerk der Vaskulatur führt. Der Prozess der Angiogenese kann in zwei Mechanismen unterteilt werden: Es existieren ein verzweigender und ein nichtverzweigender Angiogeneseweg. Zu letzterem werden die proliferative (Extension der Gefäße durch Vermehrung von Endothelzellen) und die interkalare (Extension der Gefäße durch Inkorporation von Endothelzellen) Elongation von Blutgefäßen gezählt. Die verzweigende Form wird in die Intussuszeption (longitudinale und transversale Partitionierung des Gefäßlumens) und in die sprossende (sprouting) Angiogenese (Bildung neuer Verzweigungen durch laterale Aussprossung an Gefäßen) eingeteilt (Charnock-Jones *et al.*, 2004). Diese Vorgänge werden durch verschiedene Angiogenesefaktoren wie beispielsweise VEGF (vascular endothelial growth factor), der a- bzw. bFGF (acid- und basic fibroblast growth factor), PIGF (placenta growth factor) und PDGF (platelet derived growth factor) eingeleitet, ebenfalls durch TGF- α

und TGF- β (Transforming Growth Factor alpha und beta) und TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) (Folkman *et al.*, 1992).

VEGF ist ein sezernierter, endothelspezifischer, chemotaktischer Wachstumsfaktor und gehört in die Familie der Heparin-bindenden Glykoproteine mit einer Größe von 45 kDa, das über freie Diffusion direkt auf die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der Endothelzellen wirkt und Proliferation und Angiogenese bewirkt (Rizk *et al.*, 1997).

Die Wirkung der Angiogenesefaktoren wird durch gewebespezifische Faktoren ergänzt. In der Plazenta sowie dem Uterus wurde hCG (humanes Choriongonadotropin) als gewebespezifischer Angiogenesefaktor etabliert (Zygmunt *et al.*, 2002), ebenso IGF-II (insulin like growth factor) (Herr *et al.*, 2002) und AFP (alpha fetoprotein) (Liang *et al.*, 2004). Die Angiogenesefaktoren induzieren die Permeabilisierung der Gefäße und die Auflösung der Basalmembran von bereits bestehenden Blutgefäßen. Die Endothelzellen, welche die Blutbahnen auskleiden, lösen sich aus dem Zellverband und wandern zu Orten der Gefäßbildung. Diese Migration wird von der Proliferation der Zellen begleitet. Durch Zusammenlagerung der Endothelzellen zu röhrenförmigen Strukturen entstehen im Verlauf intakte Blutgefäße.

Als Inhibitoren der Angiogenese seien das Plasminogenfragment Angiostatin (O'Reilly *et al.*, 1994), das Calreticulinfragment Vasostatin (Pike *et al.*, 1998) und Thrombospondin (Dipietro, 1997) erwähnt.

1.2. Die Plazenta

1.2.1. Entwicklung der Plazenta und deren Gefäßbildung

Für den optimalen Verlauf einer Schwangerschaft bedarf es einer adäquaten Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff über die Vaskulatur. Dies wird zum einen durch Vasodilatation der maternalen Blutgefäße erreicht, und zum anderen werden im Rahmen der Angiogenese neue Gefäße gebildet. Eine Störung dieser Prozesse steigert das Risiko von Frühaborten und intrauterinem Fruchttod (Meedges *et al.*, 1988) oder erhöht die Gefahr fetaler Wachstumsretardierung (Krebs *et al.*, 1996). Auch andere Erkrankungen werden mit vaskulären Fehlfunktionen assoziiert wie beispielsweise die Präeklampsie. In epidemiologischen Studien konnte belegt werden, dass eine erhöhte Inzidenz von Hypertonie, Diabetes mellitus, Apoplex und kardiovaskulären Erkrankungen in der Adoleszenz in Zusammenhang mit einer Maladaptation der intrauterinen plazentaren Gefäßentwicklung steht (Baker, 1991).

Die Entwicklung der menschlichen Plazenta beginnt etwa am 4. Tag nach der Befruchtung. Die Oozyte befindet sich bereits im Morula-Stadium (Abb. 1-1) und hat das Cavum uteri erreicht. Es lassen sich prinzipiell zwei Zellarten unterscheiden: eine äußere Zelllage (Trophoblast; spätere Plazenta) und eine innere Zelllage (Embryoblast; späterer Embryo) (Scheuner, 1971).

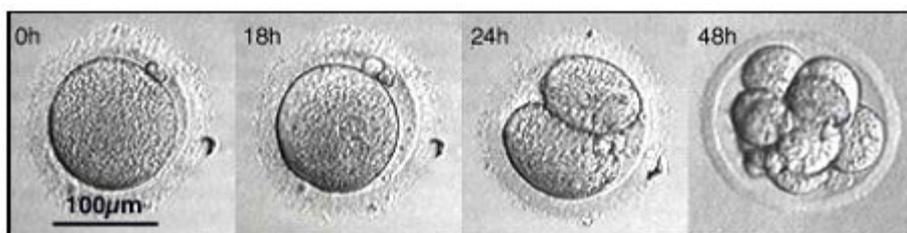


Abb. 1-1: **0h:** Sekundäre Oozyte (1 Polkörperchen) bei der Befruchtung; **18h:** Zygote, der weibliche und männliche Vorkern sind sichtbar (um 17h) ebenso zwei Polkörperchen unter der Zona pellucida; **24h:** Embryo im zwei-Zell-Stadium; **48h:** Furchungsteilung; man sieht die Blastomeren, die die Morula bilden (Quelle: www.embryology.ch/allemand/fplacenta/fecond01.html, Download 22.03.2007)

Man unterscheidet ein lakunäres Stadium (noch ohne Zotten), ein Zottenstadium (Primärzotten) und ein Stadium der Zottenverzweigung (Sekundär- und Tertiärzotten). Im lakunären Stadium, etwa am 5.- 6. Tag *post conceptionem* (*p. c.*),

lagert sich die Blastozyste an das Uterusepithel an. Etwa am 7. Tag beginnt ihre Implantation in das Endometrium. Sie ist dabei so polarisiert, dass der den Embryoblasten tragende Pol zuerst Kontakt mit der Gebärmutter Schleimhaut bekommt. Am Implantationsort beginnt der Blastozystentrophoblast zu proliferieren und lytische Aktivität zu entfalten (Scheuner, 1971). Nun kommt es zur Differenzierung von Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast. Der Zytotrophoblast besitzt eine hohe Mitoserate. Durch die Verschmelzung mehrerer Zytotrophoblasten bildet sich der Synzytiotrophoblast. Ab dem 9. Tag wird dieser Synzytiotrophoblast durch die zunehmende Bildung von Lakunen ähnlich einem Schwamm aufgelockert. Später entspricht dies dem intervillösen Raum. Die maternalen Gefäße sind an der Implantationstelle gestaut und erweitert (Scheuner, 1971). Sie werden als Sinusoide bezeichnet. Etwa am 12. Tag *p. c.* ist die Implantation abgeschlossen.

Durch die Proliferation des Zytotrophoblasten entstehen ab dem 11.- 13. Tag die sogenannten Primärzotten. Das einwachsende Mesenchym ab dem 16. Tag charakterisiert die Sekundärzotten und durch das Einsprossen von Kapillaren aus den Angioblasten werden diese zu Tertiärzotten (Abb. 1-2).

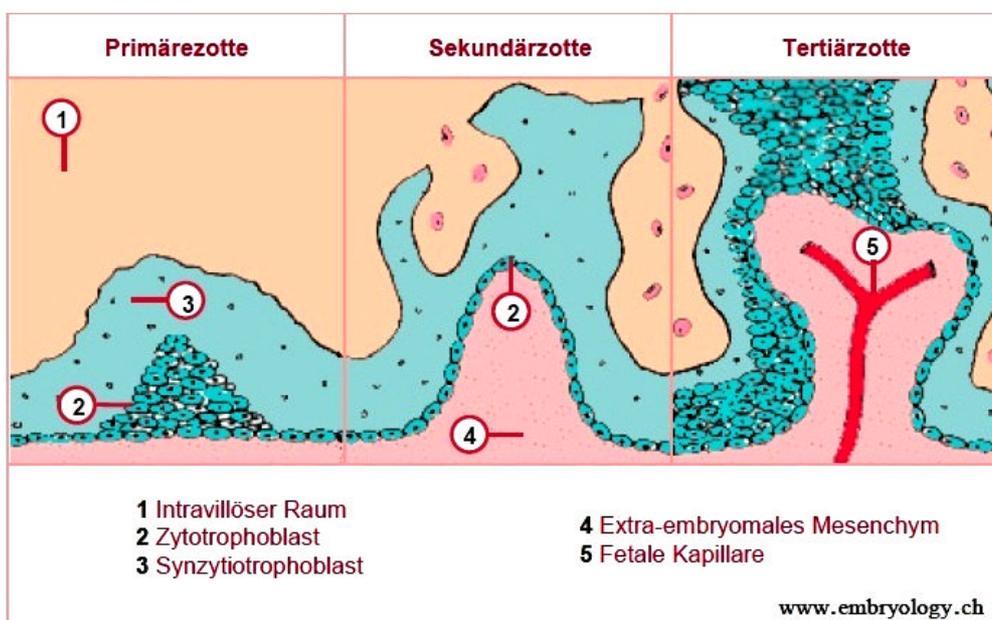


Abb. 1-2: Entwicklung der placentaren Zotten: Durch die Proliferation des Trophoblasten entstehen lokale Zellansammlungen, die in das Synzytium vordringen und damit die Primärzotten bilden. Durch Einsprossung des extraembryonalen Mesenchyms differenzieren Primärzotten zu Sekundärzotten, aus denen sich durch die Ausbildung von ersten Kapillaren aus Angioblasten Tertiärzotten entwickeln. (Quelle: www.embryology.ch/allemand/fplacenta/villosite02.html, Download 22.04.2008).

Die humane plazentare Vaskulogenese beginnt um den 21.- 22. Tag *p. c.* (Demir *et al.*, 1989). In diesem Zeitraum werden die Sekundärzotten durch die Bildung von Kapillaren in die Tertiärzotten (Abb. 1-2) umgewandelt und die embryonale Blutzirkulation beginnt. Am Termin liegt der Gesamtdurchmesser der Tertiärzotte bei etwa 50 μm und das Kapillarlumen kann bis zu 30 μm messen.

Ab dem 28. Tag *p. c.* können die ersten Lumina der neu entstandenen Gefäße differenziert und ab dem 32. Tag die ersten Erythrozyten nachgewiesen werden.

Die Vaskulogenese findet etwa bis zur 12. Schwangerschaftswoche (SSW) statt, während die Angiogenese bereits um den 32. Tag beginnt. Im Rahmen der Gefäßreifung werden die Gefäße mit Perizyten ausgekleidet und eine Basalmembran gebildet. Im weiteren Verlauf differenzieren sich die Kapillaren zu Sinusoiden und wachsen in die Trophoblastenschicht ein.

Die Entstehung neuer Gefäße wird zum größten Teil in der ersten Schwangerschaftshälfte abgeschlossen (Zygmunt, 2001; Zygmunt *et al.*, 2003). Nach der 20. SSW konnte eine Neuentwicklung von Kapillaren nur äußerst selten gesehen werden (Demir *et al.*, 1989; Asan *et al.*, 1999; Charnock-Jones *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2004).

1.2.2. Die reife Plazenta

Die Plazenta erreicht um die 14. Woche ihre endgültige runde bis ovale Struktur. Mit dem 5. Monat ist ihr Dickenwachstum abgeschlossen. Es ist nur noch ein Flächenwachstum nachweisbar. Der Durchmesser beträgt in der 20. SSW etwa 10 cm und am Geburtstermin 20 cm mit einer durchschnittlichen Dicke von 2 bis 4 cm. Das Gewicht der Plazenta korreliert signifikant mit dem regelgerechten Gewicht des Kindes und liegt zwischen 350 und 700 g (Stauber und Weyerstahl, 2005).

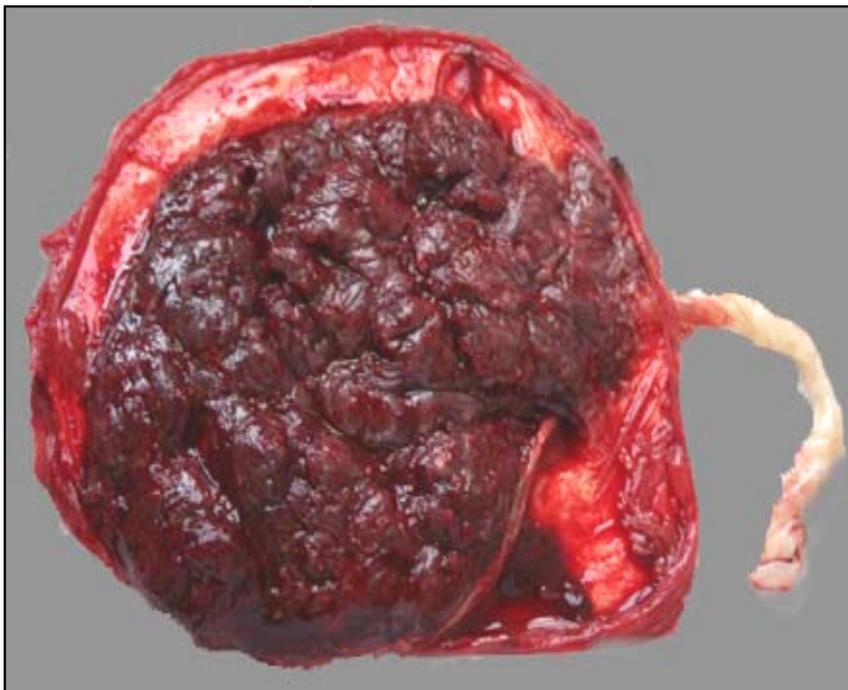


Abb. 1-3: eigene Photographie einer termingerechten reifen postpartalen Plazenta, Ansicht der maternalen Seite

Die reife Plazenta zeigt folgenden strukturellen Aufbau: In der Nabelschnur sind zwei *arteriae umbilicales*, die um eine zentrale *vena umbilicalis* gewunden sind, erkennbar. Die Gefäßwand der *arteriae umbilicales* von wachstumsretardierten Kindern ist auf Grund des verminderten intrauterinen IGF-I-Serumlevels dünner und wird für die Ausbildung eines adulten Hypertonus verantwortlich gemacht (Burkhardt *et al.*, 2008). Bei etwa 0,5 % der Neugeborenen existiert nur eine Umbilikalarterie. Diese Anomalie ist häufig mit anderen Fehlbildungen assoziiert.

Die Nabelschnur inseriert an der Chorionplatte, während die drei Gefäße radiär weiter nach peripher verlaufen und schließlich in die Zottenbäume übergehen.

Die Plazenta enthält fetale und maternale Anteile. Der mütterliche Teil wird von der Dezidua basalis, deren kompakte Grenzschicht als Deziduaplatte bezeichnet wird (Moore und Persaud, 2001), und den maternalen Gefäßen gebildet, während zum fetalen Teil die Chorionplatte, die Zotten und der intervillöse Raum gehören. Die Choriondeck- und Deziduaplatte begrenzen den intervillösen Raum, in dem das mütterliche Blut zirkuliert und in direktem Kontakt mit den Chorionzottenbäumen steht. Im Verlauf der Schwangerschaft wachsen Haftzotten in die Dezidua ein und verankern die Embryonalanlage fest mit dem Endometrium.

Die Chorionplatte besteht aus Amnionzellen, Stroma, Trophoblast und Synzytiotrophoblast. Der Trophoblast hat direkten Kontakt mit dem intervillösen Raum, der uterin von der Basalplatte begrenzt wird. Die Basalplatte ist vom Synzytiotrophoblast umgeben.

Die Plazenta wird durch Septen in 10 bis 38 unregelmäßig gestaltete Läppchen die sogenannten Kotyledonen unterteilt. Jede dieser Kotyledonen enthält mindestens zwei Stammzotten und kann als funktionelle Untereinheit der Plazenta angesehen werden. Da die Septen nicht bis an die Chorionplatte heranreichen, stehen die einzelnen Kotyledonen untereinander in Verbindung. Zwischen ihnen befindet sich der intervillöse Raum. Das maternale Blut fließt von den etwa 70 arrodieren Spiralarterien an die Kotyledonen, umspült diese, und gelangt durch im Endometrium befindliche Venen zurück in den mütterlichen Kreislauf.

Am Rand der Plazenta vereinigen sich die Dezidua basalis und die Basalplatte zum Chorion laeve, das überwiegend aus Bindegewebe besteht.

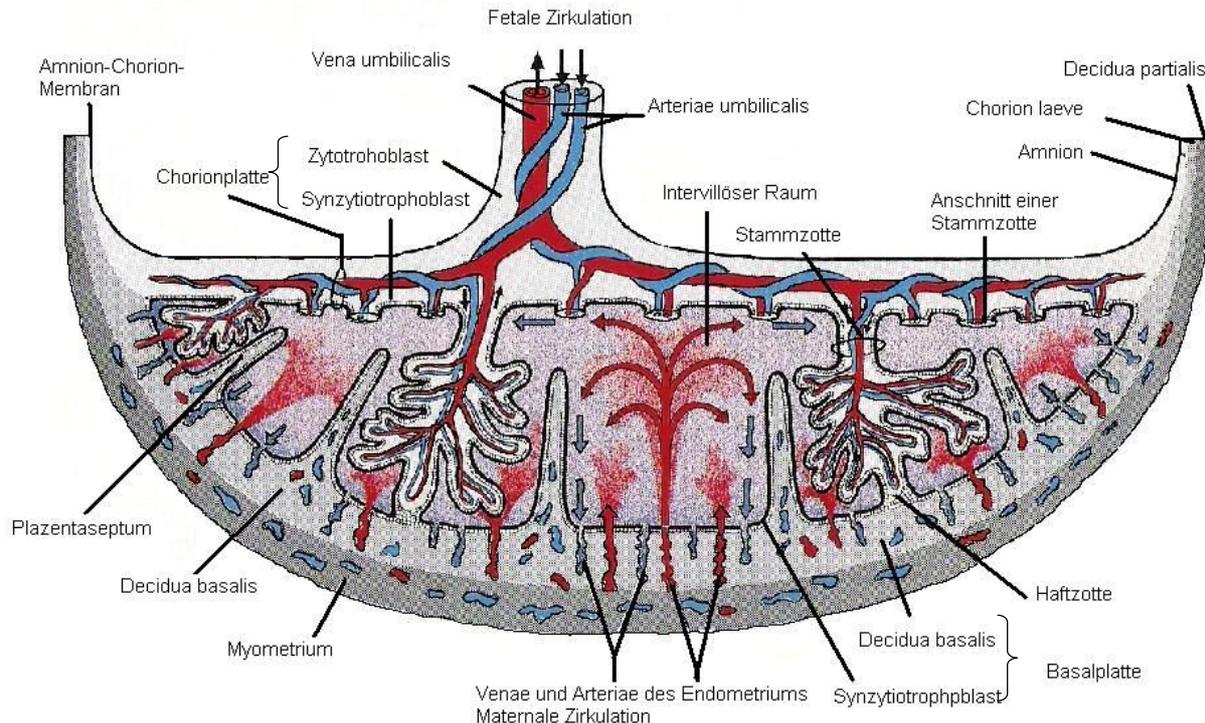


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der reifen Plazenta, Die ausgereifte Plazenta besteht aus einem fetalen und einem maternalen Anteil. Der fetale Anteil der Plazenta wird durch die Chorionplatte mit ihren plazentaren Zotten, der Zytotrophoblastschale und den intravillösen Räumen gebildet. Die einzelnen Kotyledonen sind durch die Deziduasepten der maternalen Plazenta voneinander abgegrenzt. Jede Kotyledone besteht aus zwei oder mehr Stammzotten mit ihren Verzweigungen (Quelle: Moore und Persaud 2001; „Embryologie- Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen“)

Das plazentare fetale Blutvolumen beträgt etwa 100 ml und der uterine Blutfluss steigt bis zu einer Durchflussrate von circa 500 ml/min im dritten Trimester.

1.2.3. Aufbau der Zotten

Zum Zeitpunkt der Geburt enthält die Plazenta etwa 40 bis 60 Zottenbäume. Diese werden von maternalem Blut umspült, während im Inneren dieser Bäume das fetale Blut fließt. Es sind sechs Zotten-Typen in der reifen Plazenta zu finden: Stammzotten, Tertiärzotten, unreife intermediäre Zotten, reife intermediäre Zotten, terminale oder freie Zotten und Trophoblastknospen (Bernischke und Kaufmann, 2000).

Es werden ein Zottenstamm, größere Äste und Terminalzotten unterschieden. Der Stamm und auch die größeren Äste tragen zum Bluttransport bei, die Terminalzotten

nehmen die Transport-, Synthese- und endokrine Leistung wahr. In den Terminalzotten sind die Kapillaren zu Sinusoiden erweitert.

Die Plazentazotten sind wie folgt aufgebaut: Die äußere Schicht, die direkt dem intervillösen Raum anliegt, bildet der Synzytiotrophoblast, der somit die Grenze zwischen fetaler und maternaler Blutzirkulation schafft. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Synzytiotrophoblast zahlreiche Mikrovilli ausbildet, durch die die Oberfläche zwischen kindlichem und mütterlichem Blut vergrößert wird (Moore und Persaud, 2001). Insgesamt wird eine Zottenoberfläche von 10 bis 15 m² angegeben (Stauber und Weyerstahl, 2005), wodurch die hier stattfindenden Transportprozesse erleichtert werden. Ferner sind in diesem Gewebe keine Interzellularspalten zu finden, so dass ein unkontrollierter Stoffaustausch verhindert wird. Dem Synzytiotrophoblast liegt innen der Zytotrophoblast an. Zu Beginn der Schwangerschaft umgibt er fast vollständig die Zotten. Im Verlauf trägt er zum Wachstum, zur Regeneration und zur Regulation der Hormonsynthese (Somatostatin) des Synzytiotrophoblasten bei. Durch die Reifung der Plazenta wird der Zytotrophoblast langsam abgebaut, so dass die fetalen Gefäße zum Teil direkt dem Synzytium anliegen. Dementsprechend wird der Stoffaustausch ab dem 4. Monat *p. c.* zwischen Mutter und Kind erleichtert. Diese synzytiokapillare Stoffwechsellmembran ist 2 bis 4 µm stark.

Das Zottengewebe besteht aus Fibroblasten und Perizyten, die durch die Bildung von Kollagenfasern im Bereich der Basalplatte zur Stabilität der Plazenta beitragen (Castellucci *et al.*, 1990). Während der Schwangerschaft dienen sogenannte Hofbauer-Zellen als Makrophagen (Benirschke *et al.*, 1995) und beeinflussen durch Sezernierung von Faktoren (Glykosaminoglykane, Mukproteine und Lipide) das Wachstum und die Differenzierung der Zotten. Die Hofbauer-Zellen vermitteln den Proteintransport zwischen Mutter und Fetus, da nur Immunglobuline die Grenze zwischen beiden Kreisläufen ungehindert überschreiten können. Zwischen den fetalen Gefäßen und dem Zottengewebe befindet sich eine fetale Basalmembran (Bernischke und Kaufmann, 2000).

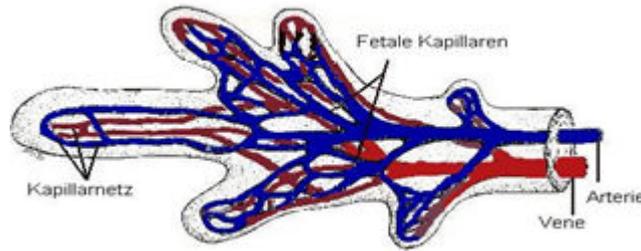


Abb.1-5: Schematische Darstellung des Kapillarnetzes und des fetalen Blutes in einer Chorionzotte (Quelle: Moore und Persaud 2001; „Embryologie- Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen“).

Ab der 5. Woche *p. c.* existieren die vier Schichten der Plazentazotte: von der fetalen zur maternalen Seite sind dies der Synzytiotrophoblast, der Zytotrophoblast, das Bindegewebe der Zotten und das Kapillarendothel der fetalen Kapillaren. Zusammen tragen sie die Bezeichnung „Plazentaschranke“.

Gelegentlich werden ungewöhnlich große Plazenten (bis 1000 g) geboren. Diese weisen kaum Endothel auf und bestehen zum größten Teil aus unreifen Intermediärzotten. Im Gegenzug dazu weisen zu kleine Plazenten (Gewicht kleiner 400 g) oft keine unreifen Intermediärzotten auf, sondern zeigen reife Intermediärzotten, die übermäßig mit Endzotten besetzt sind. Beides geht mit einer insuffizienten Austauschfunktion der Plazenta einher und es werden häufig dystrophe mangelernährte Neugeborene (small-for-date babies) entbunden (Junqueira und Carneira, 1996).

1.2.4. Funktion der Plazenta

Die Aufgaben der Plazenta variieren je nach Gestationsalter. Zu den Hauptfunktionen gehört bis zur 12. SSW der Schutz des Embryos vor oxidativem Stress später auch die Produktion von schwangerschaftsspezifischen Hormonen und Proteinen, immunologischer Schutz des Fetus vor Abstoßung sowie die Regulation des Wärmehaushaltes, des pH-Wertes und des Wasserhaushaltes.

Die Plazenta hat zum einen die Stoffwechselfunktion zu erfüllen zum anderen besitzt sie Stofftransport- und Stoffaustauschfunktionen und letztlich eine endo-, para- und autokrine Funktionen (Stauber und Weyerstahl, 2005). Besonders in der

Frühschwangerschaft synthetisiert die Plazenta Glykogen, Cholesterin und Fettsäuren und liefert dem Embryo somit Nahrungsstoffe und Energieträger. Die Bedeutung dieser Funktion wird jedoch später von den Stoffaustauschfunktionen und der endokrinen Sekretion abgelöst. So findet letztlich der Austausch von Sauerstoff, Kohlendioxid und Nährstoffen sowie von Abbauprodukten statt aber auch von Medikamenten, Blutzellen und Immunglobulinen.

Die Erfüllung dieser Funktion wird erst durch die räumliche Trennung des maternalen und fetalen Gefäßsystems möglich. Es kommt jedoch zu keiner Durchmischung von fetalem mit maternalem Blut. Vielmehr finden die Stofftransport- und Stoffaustauschfunktionen entlang der synzytiokapillären Membran statt.

Es existieren aktive und passive Austauschmechanismen. Bei dem aktiven Transportweg können zwei Mechanismen unterschieden werden: zum einen gibt es den aktiven energieverbrauchenden Transport für beispielsweise Fettsäuren, Aminosäuren, anorganische Ionen oder Vitamine und Hormone, zum anderen werden Proteine, Lipide und Immunglobuline durch Pinozytose (Page *et al.*, 1981) aufgenommen. Bei dem passiven Mechanismus wird zwischen einfacher und erleichterter Diffusion sowie der Diapedese unterschieden. Durch einfache Diffusion (entlang eines Konzentrations- oder Druckgefälles) gelangen beispielsweise Sauerstoff, Kohlendioxid, Wasser, Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin und Medikamente durch die Zottenmembran. Glukose und Laktat können durch die Bindung an Carrier-Proteine die sogenannte erleichterte Diffusion transportiert werden. Durch Diapedese gelangen Erythrozyten, Leukozyten, Medikamente mit einem Molekulargewicht von circa 600 kDa oder auch Viren, Bakterien und Protozoen durch die Zellmembran des Zytotrophoblasten.

Die Plazenta produziert Proteo- und Steroidhormone. Zu den Proteohormonen zählt das humane Choriongonadotropin (hCG), das humane Plazentalaktogen (hPL) und das humane Chorionthyreotropin (hCT). Auf hCG wird im Folgenden näher eingegangen (Kapitel 1.5.).

1.3. Die feto-maternale Einheit

Definition:

Die feto-maternale Einheit ist eine funktionelle Einheit, die alle Zellarten bzw. Zellschichten umfasst, die während der Schwangerschaft in Verbindung mit dem fetalen und maternalen Kreislauf stehen oder für die Entwicklung des Fetus von Bedeutung sind.

Dazu zählen unter anderem die uterinen mikro- und makrovaskulären Endothelzellen (HUMVEC), die plazentaren vaskulären Endothelzellen (HPMVEC), die Endothelzellen in der Nabelschnur (HUVEC) und vaskulären Muskelzellen sowie sämtliche Parenchymzellen.

1.4. Gefäße und Endothelzellen

Die Gefäße sind in ihrem Aufbau größtenteils alle ähnlich strukturiert. Entwicklungsgeschichtlich entstammen alle Abschnitte der Gefäßwand einschließlich des Endothels mesenchymaler Herkunft.

Die kleinsten Gefäße sind die Kapillaren, die die Endstrombahn bilden. Endothelzellen kleiden die Lumina der Kapillaren allseitig aus. Sie schaffen ein flaches einschichtiges Endothel. Sie haben eine Dicke von 0,1– 1 µm und sind in Längsrichtung der Kapillaren angeordnet. Charakteristisch sind sogenannte *Weibel-Palade-Körperchen* (osmiophile Gebilde mit Mikrotubuli). Sie enthalten den Von-Willebrand-Faktor (Blutplättchenaggregationsfaktor) und Endothelin (vasoaktives Peptid). Durch *Zonulae occludentes* sowie durch *Nexi* stehen diese Zellen untereinander in Verbindung. Ihre Enden überlappen sich häufig.

In den verschiedenen Organen des menschlichen Körpers können unterschiedliche Arten von Kapillaren aufgezeigt werden. Es finden sich Kapillaren mit nichtfenestriertem, fenestriertem und diskontinuierlichem Endothel. Das nichtfenestrierte Endothel findet man in den Kapillaren im Gehirn, im Muskel, in der Retina und in der Lunge. Für die Nieren, die Leber und den Darm ist das fenestrierte

Endothel typisch. Es kommt somit überall dort vor, wo ein Stofftransport in das Lumen stattfindet. Das diskontinuierliche Kapillarendothel befindet sich unter anderem in Milz und Knochenmark.

Da sich die Endothelzellen in ihrer Enzymausstattung unterscheiden, sind sie nicht als einheitliche Zellpopulation zu betrachten. Im Besonderen sind die Phosphatasen different. Auch funktionell existieren unterschiedliche Zellen. Einige sind für den Stoff- und Gasaustausch verantwortlich während andere mit überwiegend metabolischer Eigenschaft sekretorische Funktion besitzen.

Durch die Expression von Oberflächenmolekülen wie endotheliale Leukozytenadhäsionsprotein, Granulum-Membranprotein 140 und induzierbarem sowie vaskulärem Zelladhäsionsmolekülen regulieren die Endothelien die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Dies stellt einen wichtigen Schritt bei der Immunabwehr dar und ist somit an der Entzündungsreaktion maßgeblich beteiligt. Die Endothelzellen sezernieren für die subendothelialen Schichten verschiedene Faktoren wie Kollagen, Elastin und Proteoglykane, aber sie bilden auch Stoffe, durch die sie in die Blutgerinnung, in die Weitenregulierung der Gefäßlumen und in die Angiogenese eingreifen. In die Kaskade der Blutgerinnung greift das Endothel beispielsweise durch die Produktion des Von-Willebrand-Faktors und des Prostazyklins (stärkster Inhibitor der Blutplättchenaggregation) ein. Über die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid wird die Weite des Gefäßlumens reguliert. Durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren beispielweise bFGF tragen die Endothelien zur Angiogenese bei. Auf einige Endothelzellen entfallen spezielle Funktionen. So können die Alveolarkapillaren Angiotensin I in Angiotensin II umwandeln und modifizieren dadurch die Vasokonstriktion. Untersuchungen zu folge ist die funktionelle und morphologische Heterogenität durch Unterschiede in den Interaktionen zwischen Endothelzellen und umliegendem spezifischen Gewebe determiniert (Garlanda und Dejana, 1997).

Anhand von spezifischen Markern können die Endothelzellen eindeutig identifiziert werden. Zu diesen Markern zählen unter anderem CD31 /PECAM (Platelet endothelial cell adhesion molecule), CD141 (Thrombomodulin), CD144 (VE-Catherin), VEGFR-2 (VEGF-Rezeptor-2) und der von-Willebrand-Faktor (vWF).

Zu den physiologisch wichtigen Vasokonstriktoren zählt Angiotensin II und Endothelin. Bei den Vasodilatoren sind Stickstoffmonoxid und Prostacyclin II zu nennen.

Die Endothelien können sich den Druck- und Strömungsverhältnissen im Blutgefäß anpassen (Urbich *et al.*, 2000) und geben diese Information an die benachbarten Zellen weiter. Die Anpassung verhindert die Apoptose der Endothelzellen und gewährleistet ein funktionstüchtiges Gefäß.

1.5. Das humane Choriongonadotropin (hCG)

Das hCG ist ein Glykoproteinormon mit einem Molekulargewicht von 39 kDa. Aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur gehört es in die Familie der „Cystin-Knot“-Wachstumsfaktoren.



Abb. 1-6: Kristallstruktur eines dreidimensionalen Komplexes zwischen hCG und den zwei Fr-Fragmenten, die für α - und β -Subeinheiten spezifisch sind (Quelle: Tegoni *et al.*, J. Mol. Biol. r28q pp.1375-1385, 1999).

Bereits 8 bis 10 Tage *p. c.*, also ein bis zwei Tage nach Implantation der Blastozyste, kann das Schwangerschaftshormon im maternalen Blut nachgewiesen werden. Da das inaktivierte hCG über die Niere und die Leber ausgeschieden wird, wird es im Urin als Schwangerschaftstest herangezogen. Bis zur 10- 14. SSW *p. m.* steigt die hCG-Konzentration im mütterlichen Blut auf 15000- 200000 U/l an. In der Frühschwangerschaft findet alle zwei Tage eine Verdopplung der Konzentration statt (Zygmunt *et al.*, 2002). Ab der 16. SSW fällt die hCG-Konzentration auf ca. 5000- 65000 U/l ab und bleibt bis zum Schwangerschaftsende auf diesem Level (Martal und Cedard, 1993).

Die physiologische endokrine Wirkung von Choriongonadotropin sorgt unter anderem für die Erhaltung des Corpus luteum, dessen Progesteronproduktion die Uterusschleimhaut für die Schwangerschaft stabilisiert. Die Bildung von Steroidhormonen wird im Verlauf von der Plazenta übernommen. Ebenso entwickelt hCG auch eine immunmodulatorische Wirkung (Wass M *et al.*, 1977; Harris *et al.*, 1984; Teodorczyk-Injeyan und Kellen, 1988; Reinisch *et al.*, 1994). Auf neutrophile Granulozyten und Monozyten wirkt hCG chemotaktisch (Reinisch *et al.*, 1994) und löst nach Injektion am Hoden von Ratten eine entzündungsähnliche Reaktion aus, die durch die Migration von Lymphozyten in das Intestitium charakterisiert ist. Auch die Synthese von polyklonalen Immunglobulinen bei humanen mononukleären Zellen wird mittels hCG induziert (Teodorczyk-Injeyan und Kellen, 1988). Nach Stimulation mit hCG steigt direkt die VEGF-Produktion und Sekretion in den Granulosazellen des Ovars von Frauen und Primaten an (Christenson und Stouffer, 1997; Lee *et al.*, 1997).

hCG wird vorwiegend im Synzytiotrophoblasten gebildet, aber auch maligne Tumoren, wie das Chorionkarzinom, Nieren-, Hoden- und Brusttumoren, Prostata-, Lungen-, Ovarialkarzinome, endometriale Adeno- und einige Pankreas- und Magenkarzinome können das Hormon produzieren und sezernieren (Braunstein *et al.*, 1973; Monteiro J.C. *et al.*, 1983; Wimalasena *et al.*, 1993; Meduri *et al.*, 1997; Bidart *et al.*, 1997). Mit Hilfe von anti-hCG-Antikörpern können hCG-sezernierende Tumorzellen nekrotisch bzw. in ihrem Wachstum gehemmt werden (Kumar *et al.*, 1992; Acevedo HF und Hartsock RJ., 1996).

hCG besteht ähnlich dem luteinisierenden Hormon (LH) aus einer α - und β -Untereinheit. Die α -Untereinheit ist bei beiden Hormonen identisch und besteht aus 92 Aminosäuren (AS) mit 2 Oligosaccharidsubstituenten. Zu 81 % stimmt die β -Einheit, die die biologische Funktion determiniert (Lapthorn *et al.*, 1994) mit der α -Untereinheit überein. Sie ist aus 145 AS zusammengesetzt.

Die Wirkung des hCGs entspricht qualitativ der des in der Hypophyse gebildeten LH. Aufgrund der längeren Halbwertszeit besitzt es aber einen verstärkten Effekt.

Die Untersuchungen von Rao (1998) zeigen, dass hCG für eine Vielzahl von schwangerschaftsassozierten Veränderungen verantwortlich ist: So erhöht sich beispielsweise die Anzahl und Größe der myometrialen glatten Muskelzellen und gleichzeitig wird durch die Verminderung der Zellkontakte die Kontraktilität der Muskelzellen inhibiert. Durch den exogenen Effekt auf die Endothelzellen von uterinen Arterien wird der Gefäßwiderstand gemindert und somit der Blutfluss erhöht. Auch die Synthese von vasodilatatorischen Substanzen wie Prostazyklin wird gesteigert. Ebenso ist es ein autokriner und parakriner Regulator für EGF (epidermal growth factor), TGF-alpha (transforming growth factor-alpha) und LIF (leukemia inhibitory factor) beim Wachstum des humanen plazentaren Synzytiums, nicht aber für cAMP (cyklisches Adenosinmonophosphat) (Yang *et al.*, 2003).

1.6. Der LH/hCG-Rezeptor

Die Rezeptorproteine auf der Oberfläche von Zellen lassen sich in eine der fünf folgenden Familien einteilen: ligandenaktivierte Ionenkanäle, Tyrosinkinase-Rezeptoren, 7-Transmembran-domänen-Rezeptoren, Cytokinrezeptoren oder Guanylatzyklasen. Der Unterschied besteht im differentiellen Signaltransduktionsweg und somit in der Erzeugung des intrazellulären Signals. Durch „Second messengers“ (sekundäre Botenstoffe) können Gene aktiviert oder inhibiert werden.

Die strukturelle Ähnlichkeit zu LH ist der Grund, dass hCG an den LH-Rezeptor binden und ihn aktivieren kann. Dieser Rezeptor gehört in die Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Er ist ein einkettiges transmembranes Glykoprotein. Die

extrazelluläre Bindungsdomäne für die Hormone ist aus 335 AS, die siebenteilige transmembrane Region aus 267 AS und der kurze intrazelluläre Teil aus 72 AS aufgebaut (Minegishi *et al.*, 1990). Im inaktivierten Zustand besteht der heterotrimere Rezeptor aus einer α -, β - und γ - Untereinheit.

Es werden zwei Signale übertragen: zum einen wird die Phospholipase C und damit Inositolphosphat aktiviert und zum anderen kommt es durch die Aktivierung der Adenylatzyklase zum Anstieg des intraplasmatischen cAMP (Combarous, 1993).

An die α -Untereinheit ist GDP (Guanindiphosphat) gebunden, das bei entsprechender Aktivierung gegen GTP (Guanintriphosphat) ausgetauscht wird. Als Folge der Katalyse dissoziiert das G-Protein in ein α -GTP und ein $\beta\gamma$ -Dimer und kann in Interaktion mit den intrazellulären Effektoren treten. Neben dem G-inhibitorischen Protein, das die Aktivierung der Adenylatzyklase hemmt, gibt es das G-stimulierende Protein, das die Adenylatzyklase aktiviert.

hCG/LH-Rezeptoren sind mittels *in situ* Hybridisierung und Immunzytochemie unter anderem auf vaskulären glatten Muskel- und Endothelzellen im Endo- und Myometrium, Drüsen- und Stromazellen im Endometrium, glatten Muskelzellen im Myometrium sowie auf uterinen Makrophagen nachgewiesen wurden. Das Parametrium ist rezeptorfrei (Reshef *et al.*, 1990; Lei *et al.*, 1992; Toth *et al.*, 1994). Auch bei Blasenmolen und beim Chorionkarzinom wurde der hCG/LH-Rezeptor detektiert (Lei *et al.*, 1992), auf Brustkrebszellen spielt der β -hCG/LH-Rezeptor eine entscheidende Rolle (Hudelist *et al.*, 2008).

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung und die uneingeschränkte Funktion der plazentaren Vaskulatur sind für die normale Entwicklung des Embryos und des gesamten fetalen Wachstums von entscheidender Bedeutung. Veränderungen an den Gefäßen werden beispielsweise bei schwangerschaftsassozierten Erkrankungen wie der intrauterinen Wachstumsretardierung oder der Präeklampsie festgestellt.

Eine wichtige Rolle bei der vaskulären Morphogenese der fetomaternalen Einheit können schwangerschafts- bzw. trophoblastspezifische Faktoren wie das humane Choriongonadotropin (hCG) (Zygmunt *et al.*, 2002) spielen.

An uterinen mikrovaskulären Endothelzellen wurde gezeigt, dass hCG die Migration und die Bildung von tubulären Strukturen (Sproutbildung) signifikant erhöht, ohne die Proliferation zu beeinflussen (Zygmunt *et al.*, 2002).

Im Hinblick auf die plazentare Angiogenese soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von hCG analysiert werden. Hierzu ist es zunächst erforderlich die Methoden der Isolation und die Charakterisierung der HPMVEC zu etablieren. Der Einfluss von hCG auf die plazentare Angiogenese wird in folgenden Versuchen aufgezeigt.

1. Die Stimulation der HPMVECs mit hCG (10- 50- 100 mU/ml) und die Bestimmung der Proliferationsrate mittels einer durchflusszytometrischen Methode
2. Der Nachweis des hCG/LH-Rezeptors auf HPMVEC mit Hilfe einer Nested RT-PCR
3. Durchflusszytometrische Analyse des Apoptoseprozesses bei den mit hCG inkubierten HPMVEC nach Induktion mit Staurosporin
4. *In vitro* Untersuchungen zum Einfluss von hCG auf die Angiogenese mit einem dreidimensionalen Spheroidassay

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Canon Eos 300 Digital	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Casy Counter	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Dynatech MR 5000 (ELISA-Reader)	Dynatech, Guyanocourt, Frankreich
FACS - Gerät	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus, Hanau
Laborpumpe Vacusafe	Integra bioscience, Fernwald
Gelaire® Flow Laboratories	Gruppo Flow, Opera, Italien
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Mikroskop mit Kamera	Olympus, Hamburg
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipettboy acu	Integra bioscience, Fernwald
Vario-MACS	Miltenyi Bioscience, Bergisch Gladbach
Vortex	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach
Wasserbad	Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach
Zentrifuge (Labofuge GL)	Heraeus Sepatech, Hanau

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

6-Well-Multischalen Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen
24-Well-Multischalen	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
96-Well-Mikrotiterplatten	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
96-Well- Suspensionsplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen

Biocoat® Cell Culture Inserts	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Bottle Top Filter	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Combitips, Combitips plus (2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Cryotube TM Vials	Nunc TM Brand Products, Roskilde, Dänemark
Deckgläser	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co.KG, Braunschweig
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Falcon-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filter Millex 0,22 µm	Millipore GmbH, Eschborn
MACS Column MS, LS (Magnetsäule)	Miltenyi Bioscience, Bergisch Gladbach
Nierenschale	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co.KG, Braunschweig
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH, Wertheim
Pinzetten	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Pipetten (serologisch)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell (11, 20)	PFM, Köln
Spritze 20 ml	Braun, Melsungen
Wattestäbchen	Karl Beese GmbH, Barsbüttel
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 150 cm ²)	Biochrom, Berlin
Zellschaber	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb	Becton Dickinson Labware, Heidelberg

3.1.3. Chemikalien

Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antibiotische Lösung (Penicillin/Streptomycin)	Invitrogen, Karlsruhe
Choriongonadotropin Ovitrelle®	Serono, Unterschleißheim
Collagenase	Invitrogen, Karlsruhe
Corbit-Balsam	Hecht, Kiel-Hassee

Material und Methoden

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Endothelial Basal Cell Medium MV 2 (EBM)	Promocell®, Heidelberg
Eosin	Merck, Darmstadt
(Ethyldiamin)tetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (100 %, Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol, 70 % (EtOH)	Fischer, Saarbrücken
Ethanol (96 %, 99,8 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Hämatoxylin	Waldeck, Münster
Hank's balanced salt solution (HBSS-Puffer) 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Hank's balanced salt solution 1x + CaCl ₂ / MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) 1 M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin 200 mM	Cambrax bioscience, Walkersville, USA
Medium 199 10x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MEM alpha Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol (MetOH)	Riedel-de Hæn, Seelze
Methylcellulose-Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Braun, Melsungen
Natriumhydroxid (NaOH) 1 M	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS tablets	Invitrogen, Karlsruhe
rhVEGF	R&D Systems, Wiesbaden
Rinderserumalbumin (BSA)	Bio Labs, Frankfurt
Staurosporine	Alexis, Grünberg
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)	Roth, Karlsruhe
Triton® X100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Flow Laboratories, Irvine, Schottland
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.4. kommerzielle Assays/ Programme zur Datenauswertung

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Bio-Rad D _c Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
RNeasy Mini RNA extraction kit	Qiagen, Hilden
QantatiOwn Programm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CellQuestPro, FACS-Analyse	Becton Dickinson Labware, Heidelberg

3.1.5. Antikörper

CD31	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD31 Mikrobeads	Miltenyi Bioscience, Bergisch Gladbach
CD105 Mikrobeads	Miltenyi Bioscience, Bergisch Gladbach
CD105	Serotec, Düsseldorf
CD141	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD144	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
VEGFR-2	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
vWF	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Fc-Block	Miltenyi Bioscience, Bergisch Gladbach

3.2. Methoden

3.2.1. Die Isolierung der HPMVEC

Die Isolierung der HPMVEC wurde zur genaueren Charakterisierung der Zellen mit Hilfe der mechanischen und enzymatischen Methode vorgenommen (Herr *et al.*, 2007).

Als Ausgangsmaterial bei der Isolierung der HPMVEC diente immer eine am Geburtstermin per primärer *Sectio caesarea* entwickelte Plazenta ohne Pathologien. So wurden Plazenten von Schwangeren mit Gestationsdiabetes, wachstumsretardierten Kindern oder schwangerschaftsinduziertem Hypertonus nicht für die experimentellen Untersuchungen herangezogen. Die Experimente mit den humanen Plazenten wurden durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig Universität Gießen bewilligt und jede der Patientinnen wurde über die weitere Nutzung der Nachgeburt informiert und aufgeklärt. Die jeweilige Einwilligung wurde schriftlich dokumentiert.

Die Kotyledonen der maternalen Seite der Plazenta wurden mit dem Skalpell abgetrennt und in kaltem PBS (Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis gesammelt. Das Gewicht des gewonnenen Materials wurde bestimmt. Anschließend konnten die Zotten in 3 - 4 Schritten mit dem Skalpell weiter zerkleinert werden. Die Präparation erfolgte entlang der großen Gefäße. Nachher wurde das makrovaskuläre Gewebe verworfen und mit dem restlichen Gewebe weitergearbeitet. Zwischen den Zerkleinerungsschritten wurden die Plazentazotten mit Hanks balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen, Karlsruhe), das mit Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin), Antimykotikum (Amphotericin B) und L-Glutamin versetzt war, gewaschen und durch ein Sieb (90 µm Porengröße) (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) gegeben, um die Erythrozyten zu entfernen (siehe Tab. 3-1).

Nach dem letzten Abtropfen wurde das Plazentagewebe gewogen und in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Biochrom, Berlin) gegeben. In einer Lösung aus HBSS mit Calcium, Magnesium und Collagenase (1,4 ml pro 1 g Plazentagewebe) (Invitrogen, Karlsruhe) wurde das Gewebe für 80 bis 90 min bei 37 °C schüttelnd im Wasserbad

(Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach) inkubiert. Um eine gute Durchmischung mit Collagenase zu erreichen, wurden die Zellkulturflaschen alle 20 min intensiv geschüttelt.

Von den verdauten Zotten wurden jeweils 25 ml in 50 ml-Falcon-Röhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) aufgeteilt, diese wurden mit weiteren 25 ml HBSS aufgefüllt. Es folgte eine 3-minütige Zentrifugation (Heraeus Sepatech, Hanau) bei 300 rpm und 4 °C. Die Überstände enthielten die gewünschten Zellsuspensionen und konnten vorsichtig abgenommen werden. Die Gewebepellets wurden wieder mit HBSS aufgefüllt und abermals zentrifugiert.

Der entnommene Überstand wurde bei 1500 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Dieses Pellet wurde in wenig HBSS-Puffer resuspendiert und auf Eis gesammelt. Die Zentrifugationsschritte wurden dreimal wiederholt.

Die auf Eis gesammelten in HBSS resuspendierten Pellets wurden nochmals bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wurde in 20 ml Trypsin / EDTA pro 60 g Zottengewicht (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und 20 min bei 3 °C im Wasserbad inkubiert. Die Neutralisation des Trypsins wurde mit der entsprechenden Menge MEM (MEM alpha Medium) (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin) herbeigeführt. Diese Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (40 µm Porengröße) (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) gegeben, um verbliebene Gewebeteile von der Zellsuspension zu trennen. Das entstandene Filtrat konnte in einer sterilen Petrischale aufgefangen und bei 1500 rpm 10 min zentrifugiert werden.

Das Pellet konnte nun in EBM (Endothelial basal Cell Medium MV-2) (Promocell®, Heidelberg) mit 20 % FKS und Supplements [hEGF (human epithelial growth factor), Hydrokortison, hFGF-B (human fibroblast growth factor) mit Heparin, VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-I (Insulin like growth factor-I), Vitamin C, Gentamicin, Amphotericin-B] resuspendiert, in 1 - 2 Zellkulturflaschen gegeben und im Brutschrank kultiviert werden.

Um restliche Erythrozyten zu entfernen, wurde an den folgenden vier Tagen die Mischkultur mindestens zweimal sorgfältig mit PBS gewaschen und das Medium erneuert. Die Mischkultur enthielt zu diesem Zeitpunkt die gewünschten humanen placentaren mikrovaskulären Endothelzellen aber auch mesenchymale Zellen wie Perizyten und Muskelzellen. Somit musste die Mischkultur weiter aufgereinigt werden (siehe Kapitel 3.2.2.).

HBSS-Puffer	PBS-Puffer	Collagenase-Lösung
500 ml HBSS - Ca ²⁺ /Mg ²⁺	500 ml PBS (pH 7,2)	500 ml HBSS + Ca ²⁺ /Mg ²⁺
10 ⁴ U/ml Penicillin/ Streptomycin (10 mg/ml)	10 ⁴ U/ml Penicillin / Streptomycin (10 mg/ml)	1 g Collagenase im Verhältnis 1:2 verdünnen
2,5 µg/ml Amphotericin B	2,5 µg/ml Amphotericin B	
200 mM L-Glutamin		

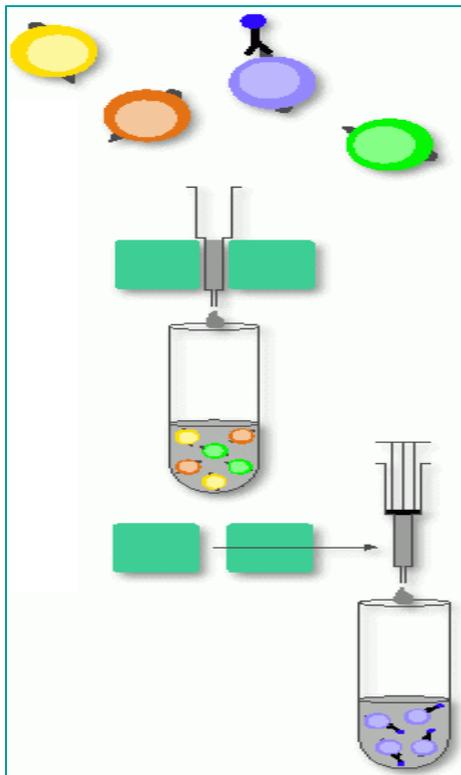
Abb. 3-1: Pufferzusammensetzung / Waschlösung

3.2.2. Die Aufreinigung der Mischkultur

Um eine Reinkultur der HPMVEC zu erhalten, war eine weitere Aufreinigung notwendig (Herr *et al.*, 2007). Die Separation der HPMVEC aus der Mischkultur (siehe 2.2.1.) wurde mit der magnetischen Zellseparation der sogenannten MACS® - Technik (Miltenyi Bioscience, Bergisch Gladbach) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei diesem System wurden mit magnetischen Mikropartikeln gekoppelte Antikörper die sogenannten Mikrobeads verwendet. Die gewünschte Zellsuspension wurde mit den entsprechenden Mikrobeads markiert und über eine Trennsäule, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet, gegeben. Zwischen den Stahlwollfäden in der Säule entsteht ein Hochgradientenmagnetfeld. In diesem werden die markierten Zellen zurückgehalten, während die unmarkierten Partikel ausgewaschen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die durch Mikrobeads-gekoppelten Zellen können beim Herausnehmen der Säule aus dem Magnetfeld leicht eluiert werden.

Das MACS® -System wird zur positiven und negativen Selektion von Zellpopulationen verwendet.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Aufreinigungsprozess.



Zunächst erfolgt die Markierung der gewünschten Zellen mit eisenhaltigen Antikörpern.

Nach der Inkubation wird die Zellpopulation über die im Magnetfeld befindliche Trennsäule gegeben. Die markierten Zellen werden im Hochgradientenmagnetfeld zurückgehalten und die unmarkierten Zellen als Negativfraktion ausgewaschen.

Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Durch Spülen der Säule mit PBS können die Zellen gewonnen und nachfolgend kultiviert werden.

Abb. 3-2: Schematische Darstellung der magnetische Zellseparation (Milteny Bioscience, MACS technologies, 2004).

3.2.2.1. Die Aufreinigung mit CD105 Mikrobeads

Die Mischkulturzellen aus der Plazenta, die in einer 150 cm²-Zellkulturflasche kultiviert wurden, wurden trypsinisiert und einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Das Pellet von $6 - 8 \cdot 10^6$ Zellen wurde in 150 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 50 μ l F_c-Block (Miltenyi Bioscience) kann das unspezifische Binden der Mikrobeads an den F_c-Rezeptor exprimierenden Zellen verhindert werden. Die Inkubationszeit auf Eis betrug 15 min. Es folgte die Zugabe von 40 μ l CD105 Mikrobeads (Miltenyi Bioscience). Diese Mikrobeads sind speziell entwickelt worden für die Separation von humanen Zellen basierend auf der Expression des Antigens CD105. Die Endothelzellen exprimieren CD105. Die Inkubation betrug 20- 30 min auf Eis.

Für die Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden 10 ml MACS-Puffer zugegeben und 5 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurde

die Magnetsäule Column LS (Miltenyi Bioscience) bzw. MS in den Vario-MACS (Miltenyi Bioscience) eingesetzt und ein Mal mit 4 ml MACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule gegeben. Diese wurde anschließend vier Mal mit dem Puffer gewaschen.

Die Magnetsäule wurde aus dem Magnetfeld genommen und mit dem Stempel in ein Falcon-Röhrchen ausgedrückt. Es wurden nochmals 5–6 ml MACS-Puffer hinzugegeben und zentrifugiert. Das Pellet wurde in EBM mit 20 % FKS resuspendiert, in eine Zellkulturflasche gegeben und im Inkubator kultiviert (siehe 3.2.3.).

3.2.2.2. Die Aufreinigung mit CD31 Mikrobeads

Bei der Separation mit dem Antikörper CD31, welcher an Endothelzellen spezifisch bindet, wurde nach der MACS® -Technik verfahren. Die Zellen wurden in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 100 µl F_c-Block und 100 µl CD31-Mikrobeads (Miltenyi Bioscience) inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch die MACS-Säule filtriert. Es wurde wie mit CD105 weiterverfahren.

500 ml	PBS
2 mM	EDTA
0,5 %	BSA

Abb. 3-3: Zusammensetzung des MACS-Puffers

3.2.3. Die Kultivierung der HPMVEC

Die adhärennten HPMVECs wurden in EBM versetzt mit Supplements [hEGF (human epithelial growth factor), Hydrokortison, hFGF-B (human fibroblast growth factor) mit Heparin, VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-I (Insulin like growth factor-I), Vitamin C, Gentamicin, Amphotericin-B] mit 20 % FKS in 150 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen (Biochrom, Berlin) im Inkubator (Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Mindestens zweimal pro Woche wurde das Medium in den Zellkulturflaschen gewechselt. Dazu wurde das EBM abpipettiert, die Zellkultur mindestens einmal mit PBS gewaschen und anschließend neues EBM zugegeben. Die verwendeten Medien und Puffer wurden zuvor im Wasserbad (Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach) bei 37 °C erwärmt.

Zum Ablösen der adhärennten HPMVECs wurde mit PBS-Puffer gewaschen, Trypsin/EDTA hinzupipettiert, 5 min bei 37 °C inkubiert und zur Neutralisation die entsprechende Menge MEM mit 10 % FKS verwendet. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Anschließend wurde das Zellpellet in EBM mit 20 % FKS resuspendiert und in eine entsprechende Zellkulturflasche überführt. Nach jedem Trypsinieren erhöhte sich die Passagezahl um 1. Es wurde maximal mit Passage 8 gearbeitet.

Die Zellzahl wurde mittels eines Hämocytometers (= Neubauer Zählkammer) (Roth, Karlsruhe) bestimmt. Dazu wurden 90 µl Trypanblau (Flow Laboratories, Irvine, Schottland) und 10 µl Zellsuspension vermischt. Es wurden 10 µl dieser Verdünnung in den Kapillarspalt der Neubauer Zählkammer gegeben. Die vier großen Quadrate der Kammer wurden unter dem Mikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt. Nach folgender Formel wurde die Zellzahl berechnet:

$$n = \bar{x} \times \text{Kammerfaktor} 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}(x) \times \text{Volumen}_{\text{susp}}$$

n ... Zellzahl

\bar{x} ... Mittelwert der Zellzahl in den Quadraten

V_{susp} ... Volumen der Zellsuspension

3.2.4. Charakterisierung von HPMVEC

Die phänotypische Charakterisierung wurde mit Hilfe des fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Gerätes (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) durchgeführt. Das FACS beruht auf einer Technologie, die die Eigenschaften einzelner Zellen misst und analysiert, während sie in einem Flüssigkeitsstrom transportiert werden und einen

Laserstrahl passieren. Die Eigenschaften werden durch ein optisches System bestimmt, das ermittelt wie die Zellen das gestreute Laserlicht streuen und die Fluoreszenz emittieren. Dieses Durchflusszytometer besteht aus drei Hauptkomponenten: dem Flüssigkeitssystem, der Optik und der Elektronik.

Das Flüssigkeitssystem transportiert die Zellen in einen laminären Probenstrom und führt diese der Analyse durch einen Laserstrahl zu. Das optische System besteht aus Lasern, die die Zellen durch fokussiertes kohärentes Licht anstrahlen und optischen Filtern, die die austretenden Lichtsignale zu den Detektoren leiten. Das elektronische System wandelt diese Lichtsignale in elektronische und dann in digitale Signale um. Wenn Partikel das Laserlicht passieren, verändern sie dieses. Die Lichtstreuung ist von der Zellgröße und der internen Komplexität abhängig. Es wird zwischen einem Vorwärtslicht (Forward Scatter, FSC) und einem Seitwärtslicht (Side Scatter, SSC) unterschieden. Das FSC entspricht dem gebeugten Licht von der Zelloberfläche. Es wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes detektiert. Das SSC ist proportional zur internen Komplexität, der Zellgranularität. Es entsteht durch gebrochenes und reflektiertes Licht. Die gleichzeitige Messung des FSC und SSC und deren korrelierte Darstellung ermöglicht die Unterscheidung von Zelltypen. Neben der Lichtstreuung misst das Durchflusszytometer die spezifische Fluoreszenz und deren entsprechende Intensität. Die Zellen haben eine Eigenfluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität 1 (FL 1) ist proportional zur Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). FITC hat ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm. Es entstehen somit spezifische Absorptions- und Emissionsspektren.

In der Punktwolkendarstellung lässt sich durch Festlegen eines Gates (Region) die Zellpopulation definieren. Jeder Punkt repräsentiert ein Ereignis.

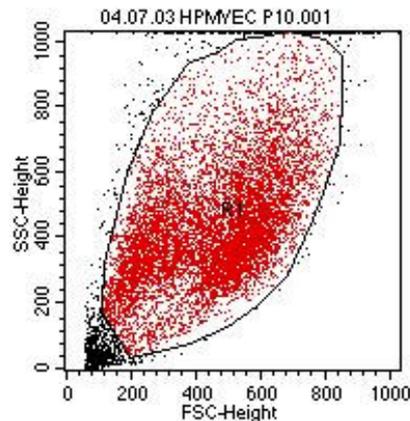


Abb. 3-4: Punktwolkendarstellung der detektierten Zellpopulation.

Zur Charakterisierung der HPMVEC mittels Durchflusszytometrie wurden die adhärennten Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen (3x) und auf eine Zellkonzentration von 2×10^5 / ml eingestellt. Hiervon wurden 100 μ l / FACS-Röhrchen verwendet. Zur Blockierung der unspezifischen Antikörperbindung wurde die Zellsuspension mit 10 % humanem Serum für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Cytofix/Cytoperm (Formalin/Saponin-haltige Lösung) permeabilisiert und fixiert (20 min auf Eis). Nach zwei Waschschritten mit Perm/Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit folgenden Primärantikörpern: CD31-FITC (PECAM, Becton Dickinson Labware, Heidelberg), CD141-PE (Thrombomodulin, Becton Dickinson Labware, Heidelberg), CD144 unmarkiert (VE-Cadherin, Becton Dickinson Labware, Heidelberg), VEGF-Rezeptor-2-PE (VEGFR-2, R&D, Wiesbaden-Nordenstadt) und vWF unmarkiert (von-Willebrand-Faktor, Becton Dickinson Labware, Heidelberg) für 45 min auf Eis im Dunkeln nach Herstellerangaben. Nach der Inkubation wurden die Proben 2x mit PBS gewaschen. Die Proben mit unmarkierten Primärantikörpern wurden mit dem Sekundärantikörper Ziege anti-Maus-APC (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und in 500 μ l PBS je Röhrchen aufgenommen. Die Messung erfolgte mit dem Programm Cell Quest Pro des FACS-Gerätes (Becton Dickinson Labware, Heidelberg).

3.2.5. Einfrieren und Auftauen von HPMVECs

Die HPMVECs wurden zum Einfrieren trypsiniert, in Einzelzellsuspensionen überführt und bei 4 °C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und durch vorgekühltes Einfriermedium (siehe Abb. 3-4) ersetzt. Das Pellet von $4 \cdot 10^6$ Zellen einer subkonfluenten 150 cm²-Zellkulturflasche wurde in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und auf zwei Cryotubes verteilt, die unverzüglich auf Eis gelagert wurden. Zum schrittweisen Einfrieren wurden die Zellen zunächst 24 Stunden bei - 80 °C gelagert, um dann in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Tank überführt zu werden.

50 %	EBM
40 %	FKS
10 %	DMSO (steril)

Abb. 3-5: Zusammensetzung des Einfriermediums

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C aufgetaut und unverzüglich in 5 ml EBM verdünnt. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 4 °C, 1500 rpm und 5 min wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets in 13–25 ml EBM mit 20 % FKS und den bereits genannten Supplements resuspendiert, um in einer 75 cm²- bzw. 150 cm²-Flasche kultiviert zu werden.

3.2.6. Der Proliferationsassay

Zur Bestimmung der proliferativen Aktivität der HPMVEC unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurde das Casy® Counter System verwendet. Dabei wurde das Widerstandsprinzip gemäß dem Protokoll von Glauner, B. (Cytotoxicity quantification with a cell counter and analyzer system, 1996), angewandt. Dabei werden die Zellen in einem Elektrolytpuffer durch eine Kapillare mit genau definiertem Durchmesser aspiriert. Während des Durchflusses werden eine Million Ereignisse pro Sekunde in einem Niederenergiefeld zwischen zwei Platinelektroden gemessen. Die daraus resultierenden Signale einer jeden Zelle werden analysiert und in einem Mehrkanalanalysator mit $5,12 \cdot 10^5$ Kanälen dargestellt.

Am ersten Tag wurden die HPMVECs in 24-Well-Multischalen in einer Dichte von $5 - 24 \cdot 10^3$ Zellen/ml ausgesät. Die Endothelzellen wurden in EBM mit 20 % FKS für zwei Tage bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden sie für 24 Stunden auf Mangel gesetzt, indem man das Medium absaugte, eine Waschung mit PBS durchführte um Mediumreste zu entfernen und in jedes Well 500 µl EBM mit 1 % FKS pipettierte. Eine 48- stündige Stimulationsphase mit verschiedenen Konzentrationen von humanem Choriongonadotropin (hCG) (Serono, Unterschleißheim) (1– 100 U/ml) schloss sich an. Am sechsten Tag erfolgte die Auswertung. Dazu wurden die adhärennten HPMVECs trypsinisiert und mit Hilfe des Casy Counters (Schärfe System, Reutlingen) die Zellzahl pro Well bestimmt. Hieraus ließ sich die Proliferationsrate der HPMVECs errechnen. Als Positivkontrolle wurde 20 % FKS und 10 ng/ml VEGF verwendet. 1 % FKS diente als Negativkontrolle.

3.2.7. Der Nachweis des LH/hCG-Rezeptors

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes (Saiki *et al.*, 1988). Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase ausgehend von Startermolekülen einen neuen DNA-Strang an einer einsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Die Matrize der PCR ist eine DNA.

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgt mittels der reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR). Die RT-PCR beginnt mit einer cDNA-Erststrangsynthese mit einer RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Die nested PCR ist eine Modifikation der konventionellen RT-PCR, die zur Reduktion der Kontamination von unerwünschten Primerbindungen angewendet wird. Hierbei werden 2 Primerpaare in 2 aufeinanderfolgenden Durchläufen der PCR verwendet, wobei das DNA-Produkt, das durch das erste Primerpaar selektiert wurde, im zweiten Durchlauf mit einem wesentlich kürzeren Primerpaar eingesetzt wird. Dadurch wird die Anzahl unerwünschter PCR-Produkte, wie Primer Dimer oder alternative Primer Zielsequenzen reduziert.

Die Spezifität der Amplifikationsreaktion wird durch die Sequenz der 15- 40 bp langen Primer gewährleistet, die komplementär zu den DNA-Bereichen der zu amplifizierenden Region sind.

Der Nachweis des LH/hCG-Rezeptors wurde mit Hilfe der Nested PCR nach Peter Licht (Licht *et al.*, 2003) durchgeführt. Granulosazellen aus der *in vitro* Fertilisation des Zentrums für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Justus-Liebig-Universität dienten als Positivkontrolle.

Die RNA der HPMVEC und der Granulosazellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden) extrahiert.

Die mRNA wurde mit Super Skript II (Invitrogen, Karlsruhe) in eine cDNA umgeschrieben. Der LH/hCG-Rezeptor-cDNA wurden zur Amplifikation 2 µl RT-Lösung, 2 µl 3' (GGAATTCGGGGCAACATAGCAATTAGAGAAG) sowie 5' (CGCGGATCCACCCCGATGTGCTCCTGAACC) Primer korrespondierend zu den publizierten Sequenzen der humanen LH/hCG-Rezeptor-cDNA (bp 1028- 1512) (Minegishi *et al.*, 1990), 2 µl dNTP-Lösung, 5 µl 10x Accu Prime Puffer, 2,5 µl MgCl₂ und 0,5 µl *Taq* DNA Polymerase (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe) zugegeben. Das Gesamtvolumen beläuft sich auf 50 µl.

In der ersten Phase konnte 1 µl des Aliquots unter Verwendung von Primerpaaren, die Exons 2-4 enthalten, in der nested PCR reamplifiziert werden. Die PCR wurde mit 30 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung dauerte 1 min bei 95 °C, das Annealing 1 min bei 60 °C und die Extension ebenfalls 1 min bei 72 °C. Die visualisierte Analyse des cDNA-Produktes erfolgte auf einem 2 % Agarose Gel mittels Elektrophorese bei 110 V in TAE (Tris-acetate-EDTA)-Puffer (Abb. 3-6) und Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,3 ng/ml), welches durch UV-Strahlung (245 nm) angeregt wird.

Das Gel wurde mit dem Quantity One Programm analysiert.

50x TAE-Puffer	1x TAE-Puffer
242 g Tris Base 57 ml Essigsäure 100 ml von 0,5 M EDTA bis 1000 ml mit ddH ₂ O	40 mM Tris-acetate 1 mM EDTA

Abb.3-6: Zusammensetzung Tris-acetate-EDTA Puffer

3.2.8. Der Apoptose-Assay

Die Apoptose ist ein genetisch gesteuerter Prozess des Zelltodes. In frühen Stadien finden Veränderungen in der Zellmembran statt. Die Plasmamembran von Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser Asymmetrie ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Phosphatidylserin (PS), das unter normalen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite als ein Zeichen der frühen Apoptose auf. Das Protein Annexin-V bindet spezifisch an PS. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis von einer gerade einsetzenden Apoptose. Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin-V binden kann, muss gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit Propidiumjodid (PJ) durchgeführt werden. Lebende Zellen sind dabei Annexin-V und PJ negativ. Zellen, die sich im frühen Stadium der Apoptose befinden, sind Annexin-V positiv und PJ negativ. Tote Zellen gleichwohl durch Apoptose oder durch Nekrose sind Annexin-V und PJ positiv.

Um die Wirkung von hCG auf den programmierten Zelltod von Endothelzellen zu untersuchen, wurde der folgende Apoptose-Assay mit Hilfe des Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) durchgeführt.

1. Schritt: Aussaat und Stimulation der HPMVECs

Hierzu wurden die HPMVECs in 6-Well-Multischalen über Nacht kultiviert. Nach einer Waschung mit PBS wurden die Zellen mit 1 % FKS-haltigem EBM für eine Stunde auf Mangel gesetzt. Anschließend konnten die Endothelzellen mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen (1 – 100 U/ml) in 2 % FKS-haltigem EBM stimuliert und über 24 Stunden inkubiert werden. Gleichzeitig erfolgte eine kombinierte Stimulation mit den verschiedenen hCG-Konzentrationen und 10 ng/ml rhVEGF.

Als Positivkontrolle diente abermals 10 ng/ml rhVEGF und als Negativkontrolle 2 % FKS-haltiges EBM.

1. Schritt: Induktion der Apoptose

Die Zugabe von Staurosporin (Alexis, Grünberg) induziert die Apoptose bei Endothelzellen. Dieses Zellgift wurde in verschiedenen Konzentrationen getestet und letztlich in einer Konzentration von 2 nM verwendet. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden.

Zur Kontrolle blieben einige Wells der Zellkultur unbehandelt.

2. Schritt: FACS-Analyse und Messung

Die Auswertung des Assays erfolgte mit Hilfe des FACS-Gerätes. Dazu wurden die Ansätze unterschiedlich behandelt. Bei den mit Staurosporin inkubierten Zellen wurden die Überstände, die PBS-Waschung und die trypsinierten Zellen gesammelt, um die größtmögliche Apoptoserate zu erhalten. Bei den Kontrollen wurden nur die abgelösten Zellen in Falconröhrchen überführt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Diese Überstände wurden vorsichtig abgesaugt und verworfen. Die Pellets wurden in 100 µl Annexin-binding-Puffer pro 10^5 Zellen resuspendiert. Der Puffer wurde zuvor im Verhältnis 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) überführt. Es wurden Annexin nach den Angaben des Herstellers und 50 µg/ml Propidiumjodid in die entsprechenden Röhrchen pipettiert, kurz mit dem Vortex (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) geschüttelt und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300- 400 µl verdünnten Annexin-binding-Puffer erfolgte die Messung mit dem Programm Cell Quest Pro des FACS-Gerätes.

Annexin-V ist FITC markiert und fluoresziert grün und Propidiumjodid ist rot fluoreszierend. Mit Hilfe der unterschiedlichen Fluoreszenzen wurde es möglich, lebende intakte von in Apoptose befindliche und nekrotische Zellen zu differenzieren. Zur Bestimmung der Grundpopulation blieb ein Teil der Staurosporin-unbehandelten Zellen ungefärbt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den detektierten Zellen um Endothelzellen handelt, wurde eine unbehandelte und ungefärbte Kontrolle mit dem Antikörper CD31 (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) bzw. mit CD105 (Serotec, Düsseldorf) für 15 min inkubiert, mit Annexin-binding-Puffer behandelt und im FACS-Gerät gemessen.

3.2.9. Die Herstellung von Kollagen

Kollagen wurde als extrazelluläre Matrix für den Angiogeneseassay verwendet. Dafür wurden eingefrorene Schwänze von ausgewachsenen Wistar-Ratten für 20 min in 70 %-igem Ethanol bei Raumtemperatur aufgetaut. Zuerst erfolgte die Entfernung der Fellreste von den Rattenschwänzen. Anschließend wurde die Haut längs aufgeschnitten und vom Schwanz abgezogen. Die letzten Segmente der Schwänze wurden mit der Schere abgeschnitten. Nachdem die Spitzen nach beiden Seiten geknickt wurden, konnten die Kollagenfasern mit einer Pinzette herausgezogen werden. Die Sehnen wurden in einer Petrischale aufgefangen, für 20 min in 70 %-igem Ethanol inkubiert und anschließend luftgetrocknet. Danach folgte eine 48-stündige Inkubationsphase, bei der die Kollagensehnen bei 4 °C in 0,1 %-iger Essigsäure eingelegt wurden.

Die resultierende visköse, kollagenhaltige Lösung wurde in Zentrifugenröhrchen aliquotiert und eine Stunde bei 235440 m/s^2 und 4 °C in einer Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Aufbewahrung der Kollagenlösung erfolgte bei 4 °C.

Der Kollagengehalt der Lösung konnte nach der Lowry-Methode, einer im Alkalischen stattfindenden kolometrischen Nachweismethode, mit Hilfe des Bio-Rad D_c Protein Assays (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestimmt werden. Ein Standard wurde aus Albumin Fraktion V (Roth, Karlsruhe) hergestellt. Der Proteingehalt wurde auf 2 mg/ml mit 0,1 % Essigsäure eingestellt.

3.2.10. Die Sphäroid-Kultur

Zum Testen der Angiogenese wurde ein bereits etabliertes dreidimensionales Sphäroid-Modell von Korff herangezogen und modifiziert (Korff und Augustin, 1998; Korff *et al.*, 2004). Die Sproutbildung ist dabei klar von der Migration zu unterscheiden. Letztere beinhaltet die Herauslösung von einzelnen Zellen aus dem Zellverband, während die Bildung von Sprouts die Entstehung von tubulären Strukturen bestehend aus mindestens zwei adhärennten Zellen darstellt, die mindestens so lang sind wie der Durchmesser des Sphäroids.

1. Schritt: Herstellung der Methylcellulose- Stock Solution (MCM)

Das Methylcellulose-Pulver (6 g) (Sigma-Aldrich) wurde in einer 500 ml Flasche autoklaviert. Es wurden 250 ml EBM Medium hinzugegeben und bei 60 °C für 20 Minuten gerührt. Anschließend wurden weitere 250 ml Medium hinzugefügt. Eine Inkubationsphase von zwei Stunden bei 4 °C schloss sich an.

Die Methylcelluloselösung wurde nun in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und zwei Stunden bei 5000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der klare visköse Überstand konnte jetzt abgenommen und bei 4 °C aufbewahrt werden.

2. Schritt: Herstellung der Sphäroide

Die HPMVECs wurden trypsinisiert und mit PBS gewaschen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Neubauer Zählkammer (siehe Kapitel 2.2.3.).

Die Zellsuspension wurde mit 20 % Methylcellulose-Medium und 80 % EBM mit 20 % FKS vorsichtig gemischt. Diese Lösung wurde auf einen Mikrotiterplattendeckel pipettiert. Mit einer Multikanalpipette (Eppendorf, Hamburg) wurden 100 µl/Well in eine 96-Well-Suspensionsplatte (Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt. In dieser Platte können die HPMVECs nicht adhärennt wachsen, sie bilden kugelartige dreidimensionale Sphäroide.

Die Platten wurden bei 37 °C im Inkubator für die nächsten 24 Stunden inkubiert.

3. Schritt: Gießen der Kollagengele mit Einbettung der Sphäroide

Eine 24-Well-Multischale wurde zunächst zum Anwärmen in den Inkubator gestellt. Der gesamte Arbeitsprozess wurde unverzüglich und auf Eis durchgeführt. Es wurde nach folgendem Schema (Abb. 3-7) pipettiert:

a) Methylcellulose-Medium

MCM	8 ml
FKS	80 μ l

Abb. 3-7: Zusammensetzung des Methylcellulose-Mediums (MCM).

Aufgrund der zähen Konsistenz der Methylcellulose-Lösung wurde mehr Medium angesetzt als letztlich verwendet.

b) Sphäroide

Bei der Multikanalpipette wurden mit einer sterilen Schere die Spitzen gleichlang abgeschnitten und auf $>130 \mu$ l eingestellt. Damit konnten die Sphäroide aus der 96-Well-Suspensionsplatte auf einen Mikrotiterplattendeckel herauspipettiert werden. Die gesammelten Sphäroide wurden in einem Falcon-Röhrchen bei 1500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert, die Suspension gemischt und auf Eis gestellt.

Nach Zugabe von 4,5 ml MCM/ FKS-Lösung, erfolgte die vorsichtige Durchmischung der Sphäroid-MCM-Lösung, die im Anschluss kurz auf Eis gestellt wurde.

c) Herstellung der Kollagenlösung

Die Kollagenlösung wurde nach dem folgendem Schema (Abb. 3-8) für jeden Versuchsansatz jeweils neu hergestellt.

Medium 199	500 μ l
Kollagen	4 ml
NaOH 1 M	400 μ l
HEPES Puffer 1 M	90 μ l

Abb. 3-8: Zusammensetzung der Kollagenlösung

d) Gießen der Gele

Die Sphäroid-MCM-Lösung (b) wurde mit der Kollagenlösung (c) vermischt und 1 ml/Well in die vorgewärmte 24-Well-Platte pipettiert und für mindestens 30 min in den Inkubator gestellt bis die Gele deutlich polymerisiert waren.

e) Stimulation

Die Stimulation erfolgte durch die Zugabe von 200 µl EBM (1 % FKS) und verschiedenen hCG-Konzentrationen (1– 100 U/ml) pro Well. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Als Positivkontrollen dienten 10 ng/ml VEGF bzw. EBM (20 % FKS).

f) Fixierung

Die Paraformaldehydlösung bestand aus 20 g Paraformaldehyd-Pulver und 500 ml PBS und wurde bei 70 °C im Wasserbad schüttelnd gelöst. Auf die Kollagensphäroide wurden 1 ml Paraformaldehydlösung gegeben, um die Gele zu fixieren. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurden die Sphäroidgele mit PBS überschichtet und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

4. Die Dokumentation des Sproutings der Sphäroide und deren Auswertung

Die Dokumentation der Sproutbildung in einer Gelmatrix erfolgte mit dem Mikroskop und der Kamera von Olympus (Life imaging) über 24 Stunden und wurde mit Hilfe des Programms Cell® aufgezeichnet und bearbeitet.

Bei der Auswertung der Daten wurde von der Gesamtfläche des Sphäroids die Kernfläche subtrahiert und somit die Sproutfläche ermittelt. Die mit den Testsubstanzen stimulierten Ansätze (hCG 1– 100 U/ml) wurden mit der Positivkontrolle (10 ng/ml VEGF) und der Negativkontrolle (1 % FKS haltigem EBM2) verglichen. Die Versuche wurden drei Mal wiederholt.

3.2.11. Statistik

Die statistische Auswertung der Methoden wurde mit dem Programm Graph Pad In Stat (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) vorgenommen.

Die Ergebnisse der Proliferation und der Apoptose von mindestens 3 unabhängigen Experimenten wurden mit Hilfe des Normality tests (gemäß Kolmogorov-Smirnov) und falls angemessen mit Hilfe des Student-Newmann-Kents und Dunett multiple comparisons test beurteilt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant (*) gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Die Isolierung und Aufreinigung der HPMVEC

4.1.1. Die Isolierung

Nach der sofortigen Isolierung der mikrovaskulären Endothelzellen aus der humanen Plazenta von termingerechten Schwangerschaften entsteht zunächst eine Mischkultur. Diese enthält mesenchymale Zellen ebenso wie Perizyten, Trophoblasten und glatte Muskelzellen.

Die gewünschten Endothelzellen (HPMVEC) haben einen kolbenförmigen Phänotyp und lagern sich rosettenförmig in Nestern zusammen. Sie sind zu diesem Zeitpunkt nur zu einem geringen Prozentsatz (~5 %) vorhanden und müssen durch weitere Aufreinigungsprozesse weiter isoliert und kultiviert werden (Abb. 4-1).

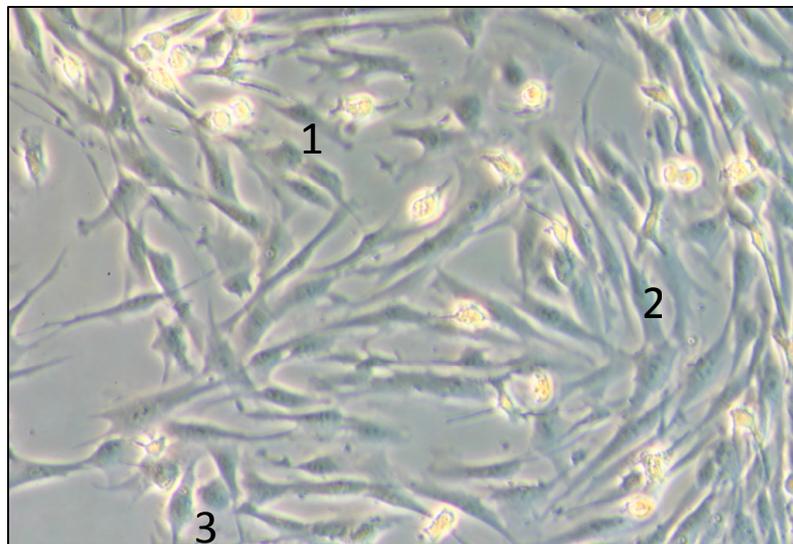


Abb.4-1: Photo der Mischkultur mit Endothelzellen (HPMVEC) (1), Perizyten, Fibroblasten und glatte Muskelzellen (2), Trophoblasten (3) (Vergrößerung 400x).

4.1.2. Die Aufreinigung der Mischkultur

Unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Endothelzellmediums EBM-2 wurden mittels immunomagnetischer Aufreinigung der Mischkultur mit anti-CD31 gekoppelten Mikrobeads die mikrovaskulären Endothelzellen weiter separiert, isoliert und kultiviert.

Durch die Wiederholung der magnetischen Zellseparation entsteht eine mikroskopisch homogenere Fraktion aus HPMVECs, die in der Kultur ein rosettenartiges Wachstum zeigen.

Nach der ersten Separation wurden mittels FACS-Analyse 20- 40 % Endothelzellen in der Kultur detektiert (Abb. 4-2a und 4-2b), anschließend konnte nach der dritten Auftrennung mit CD31 eine 70- 95 %-ige HPMVEC-Population beobachtet werden (Abb. 4-3a und Abb. 4-3b).

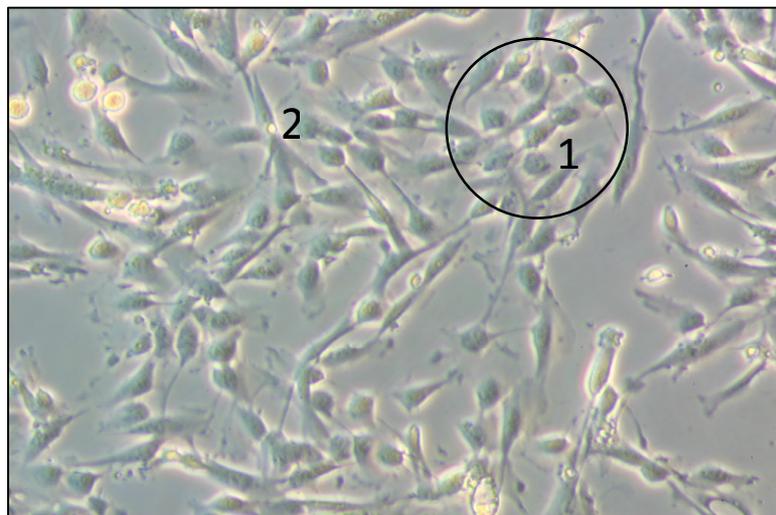


Abb. 4-2a: Photo nach der ersten immunomagnetischen Separation: Nach einmaliger Aufreinigung mit CD31 Mikrobeads zeigt sich eine homogenere Zellkultur, in der Endothelzellen (1) vorhanden sind, aber auch noch Fibroblasten (2) (Vergrößerung 400x).

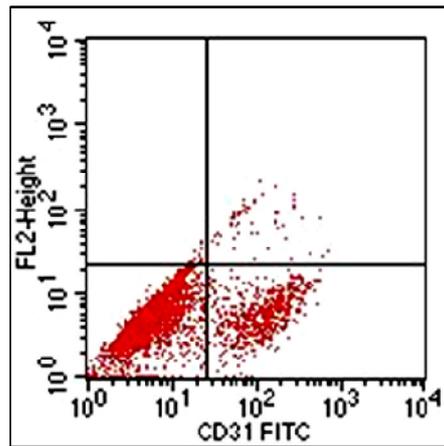


Abb.: 4-2b: FACS-Analyse: CD31 markierte HPMVEC nach der ersten immunomagnetischen Separation. 20 % der Zellen waren CD31 positiv.

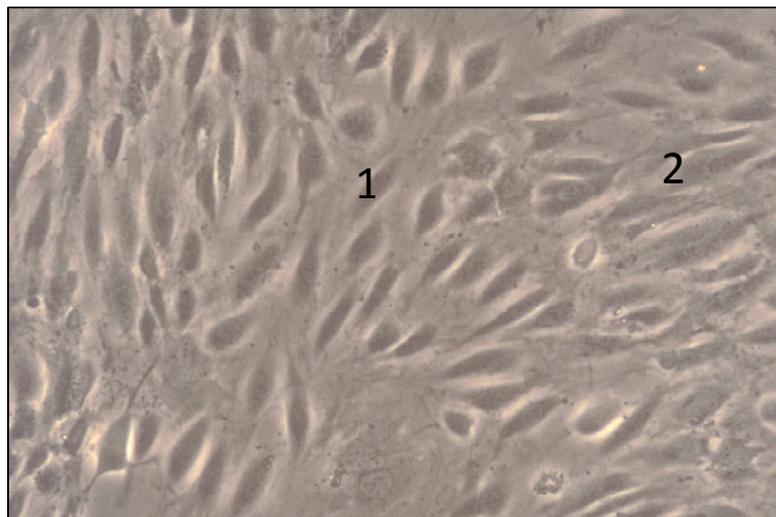


Abb. 4-3a: Photo nach der dritten immunomagnetischen Separation: Nach dreimaliger Aufreinigung mit CD31 Mikrobeads zeigt sich eine homogene Kultur aus HPMVEC (1), nur noch ganz vereinzelte Fibroblasten (2).

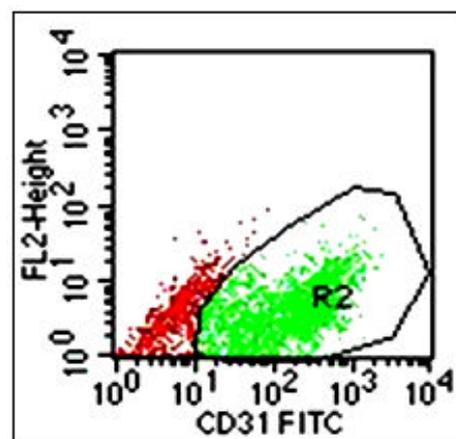


Abb.4-3b: FACS-Analyse nach dem dritten MACS: CD 31 markierte HPMVEC: Zu 90 % sind die isolierten Zellen CD31 positiv.

Die Analyse nach der dritten magnetischen Zellseparation ergab mittels Durchflusszytometrie und vorheriger Markierung mit CD31-Mikrobeads, dass die Zellpopulation nun zu 70- 95 % CD31 positive Zellen enthält.

4.2. Charakterisierung der HPMVEC

Die Charakterisierung der isolierten und kultivierten HPMVEC erfolgte mit verschiedenen endothelialen Antikörpern. Die Marker CD31 (PECAM-1), Thrombomodulin (CD141), VE-Catherin (CD144), VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) und der von-Willebrand-Faktor (vWF) binden an die endothelspezifischen Rezeptoren der HPMVEC und wurden mit Hilfe des FACS-Gerätes detektiert.

Im Einzelnen sind 91 % der Zellen für CD141 und CD31 positiv (Abb. 4-4). Auch die Markierung mit CD31 und CD144 zeigte eine 85 %ige Ausbeute (Abb. 4-5). Als weiterer Endothelzellmarker wurde VEGFR-2 verwendet. Zu 74 % tragen die Zellen dieses Oberflächenmolekül (Abb. 4-6). Bei der Doppelmarkierung mit vWF präsentierten 97 % der Zellen diesen Oberflächenmarker (Abb. 4-7).

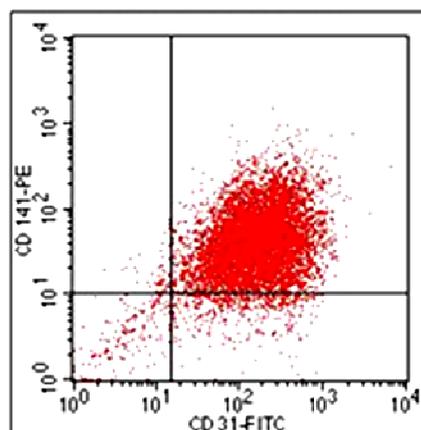


Abb. 4-4: FACS-Analyse: Doppelmarkierung mit CD31 und CD141: Die Endothelzellen exprimieren zu 91 % sowohl CD31 als auch CD141.

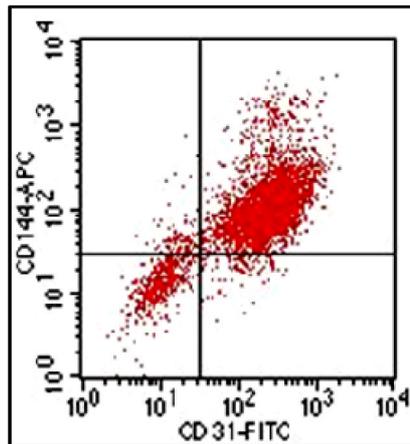


Abb. 4-5: FACS-Analyse: Doppelfärbung mit CD31 und CD144: Die HPMVEC tragen zu 85 % sowohl CD31 als auch CD144 als Oberflächenmoleküle.

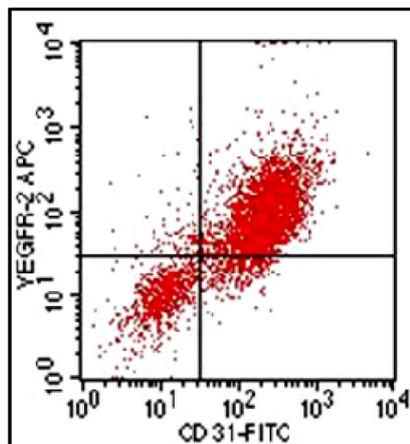


Abb. 4-6: FACS-Analyse: Doppelmarkierung CD31 und VEGFR-2: Die HPMVEC tragen zu 74 % CD31 und VEGFR-2.

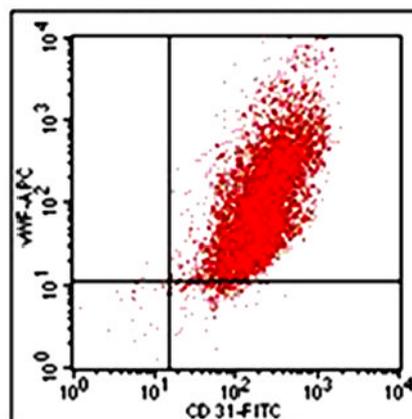


Abb. 4-7: FACS-Analyse: Doppelmarkierung mit CD31 und vWF: Zu 97 % exprimieren die Zellen sowohl CD31 als auch vWF.

Auf Grund dieser Charakterisierung mit endothelialen Markern konnten die HPMVEC eindeutig als Endothelzellen klassifiziert werden.

4.3. Der Nachweis des LH/hCG-Rezeptors auf HPMVEC

Der Nachweis der LH/hCG-Rezeptor mRNA in den HPMVEC erfolgte mit Hilfe der Nested RT-PCR nach Licht (Licht *et al.*, 2003). Die gesamte RNA stammt aus konfluenten und subkonfluenten HPMVEC-Monolayerkulturen der Passage 4. Humane Granulosazellen aus der *in vitro* Fertilisationsabteilung des Zentrums für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Justus Liebig Universität Giessen wurden hierbei als Positivkontrolle verwendet. Es konnte ein positives Signal bei 179 bp eruiert werden, das charakteristisch für den LH/hCG-Rezeptor ist.

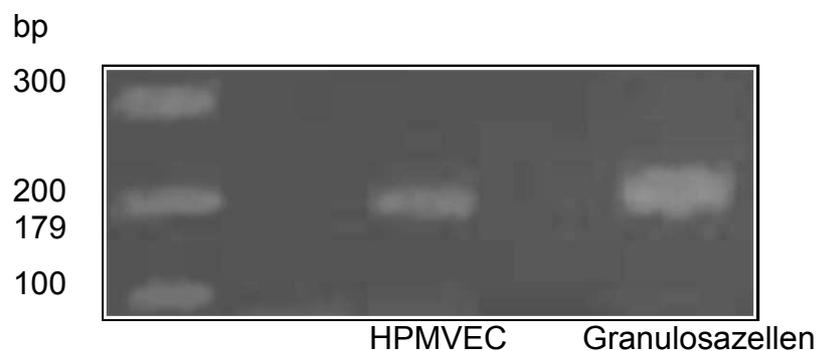


Abb. 4-8: Der Nachweis des LH/hCG-Rezeptors auf HPMVEC: Als Positivkontrolle dienten frisch isolierte Granulosazellen.

Die Stimulation der HPMVEC mit hCG (1- 100 U/ml) hatte keinen qualitativen Effekt auf die Expression der mRNA des LH/hCG-Rezeptors (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

4.4. Die Proliferation der HPMVEC

Nach der Stimulation der HPMVEC mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen konnte mit Hilfe des Casy Counters die Zellzahl bestimmt und somit die Proliferationsrate berechnet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass hCG (10– 100 U/ml) eine konzentrationsabhängige proliferative Wirkung auf die humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen besitzt, das heißt, mit steigender hCG-Konzentration konnte auch eine gesteigerte Proliferation dokumentiert werden. Als Positivkontrollen dienten VEGF (10 ng/ml) und 20 %iges FKS, während 0,1 %iges FKS die Negativkontrolle darstellte (*p < 0,05).

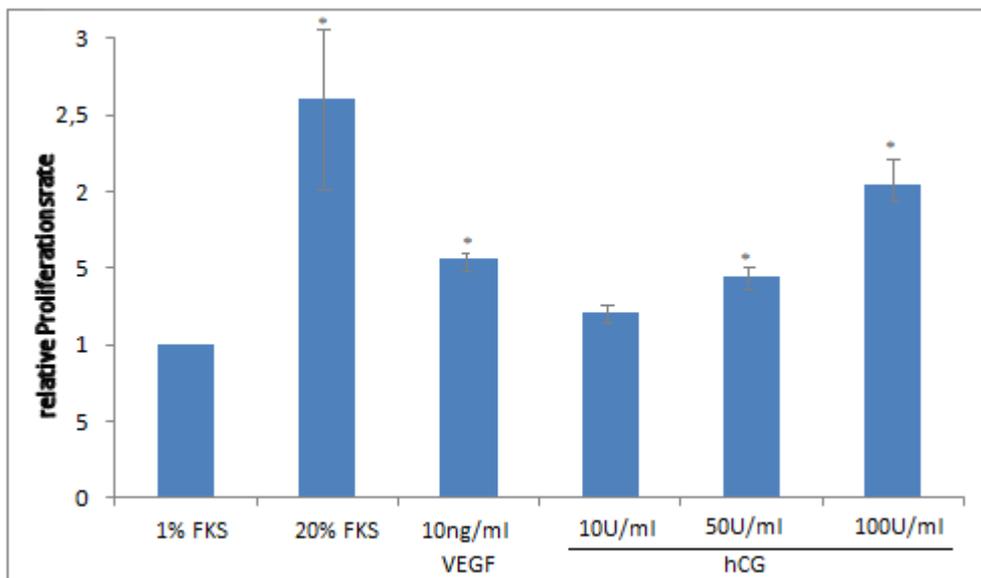


Abb. 4-9: Proliferation der HPMVEC nach Stimulation mit hCG (10 – 100 U/ml): Durch die Zellzählung mit Hilfe des Casy Counters wurde das Ergebnis verifiziert. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (1 % FKS) zeigen die HPMVEC eine steigende relative Proliferationsrate.

4.5. Der Einfluss von hCG auf die Apoptose der HPMVEC

Der Einfluss von hCG auf die Apoptoserate der HPMVEC wurde mit Hilfe des Annexin-V-Bindungs-Versuchs untersucht. Mittels einer Immunfluoreszenzanalyse wurde der Anteil an "frühapoptotischen" Zellen bestimmt. Die Apoptose wurde mit Staurosporin (SS) in einer Konzentration von 2 nM induziert. Eine Differenzierung zwischen vitalen, sich in Apoptose befindlichen Zellen und nekrotischem Material war somit möglich. Die HPMVEC in der frühen Apoptose konnten mit Annexin-V identifiziert werden, während die späte Apoptose bis hin zur Nekrose durch Propidiumjodid markiert wurden.

In den ersten Experimenten wurde der antiapoptotische Effekt von hCG auf die HPMVEC untersucht. Zunächst wurde die Staurosporin induzierte Apoptose der unstimulierten HPMVEC gemessen. Diese lag bei 46,52 % (Abb. 4-10).

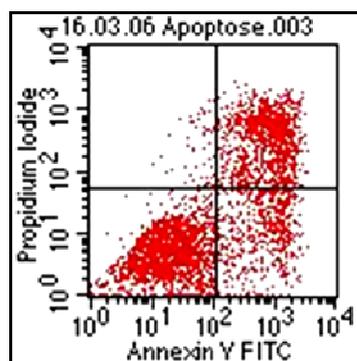
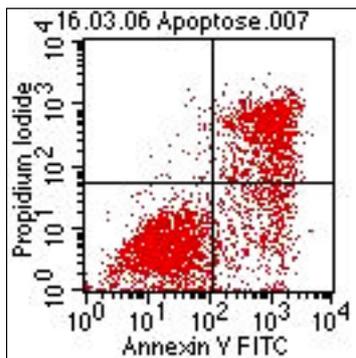
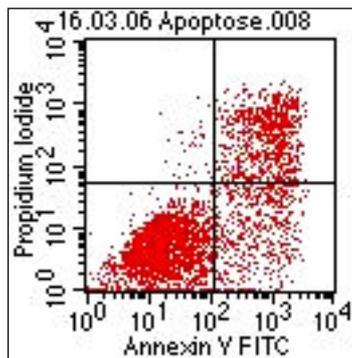


Abb.4-10: Die Apoptose bei den HPMVEC betrug 46,52 % nach Induktion mit 2 nM Staurosporin.

A. 1 U/ml hCG



B. 10 U/ml hCG



C. 100 U/ml hCG

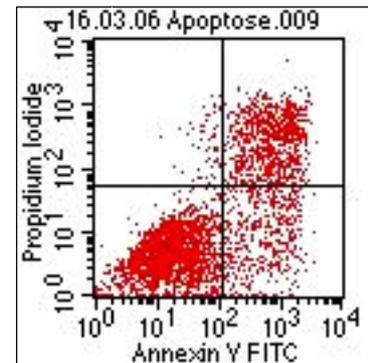
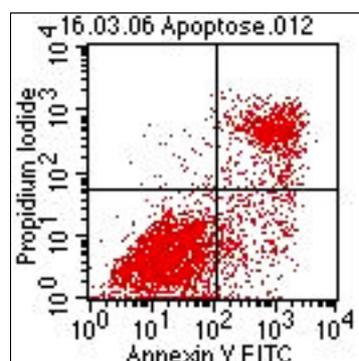


Abb. 4-11: Die induzierte Apoptose bei den mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen inkubierten HPMVEC: Die Apoptoserate konnte mit Hilfe des FACS-Gerätes detektiert werden: Bei 1 U/ml hCG beträgt die Apoptoserate 47,04 % (A), bei 10 U/ml hCG 38,25 % (B) und bei 100 U/ml hCG 38,74 % (C).

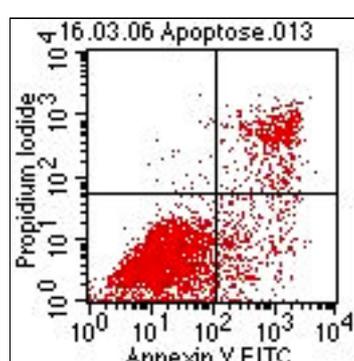
Bei der Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen von hCG (1- 100 U/ml) konnte kein signifikanter antiapoptotischer Effekt auf die behandelten HPMVEC herausgestellt werden. Durch die Inkubation mit 10 bzw. 100 U/ml hCG konnte die Staurosporinwirkung lediglich um etwa 8 % reduziert werden und lag bei 38,25 % bzw. 38,74 % (Abb. 4-11).

In weiteren Untersuchungen wurden die HPMVEC mit der Kombination aus hCG und 10 ng/ml VEGF behandelt. Danach folgte die Induktion der Apoptose mit je 2 nM Staurosporin (Abb. 4-12).

A. 1 U/ml hCG/ VEGF



B. 10 U/ml hCG/ VEGF



C. 100 U/ml hCG/ VEGF

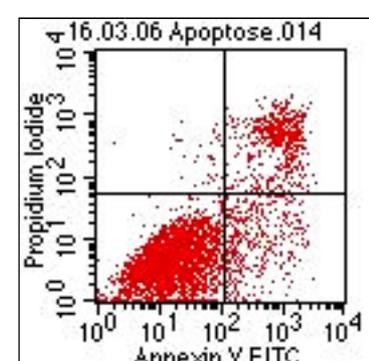


Abb. 4-12: Die induzierte Apoptose bei den mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen und 10 ng/ml VEGF inkubierten HPMVEC: Bei 1 U/ml hCG in Kombination mit 10 ng/ml VEGF beträgt die Apoptoserate 30,96 % (A), bei 10 U/ml hCG mit 10 ng/ml VEGF 26,21 % (B) und bei 100 U/ml hCG mit 10 ng/ml VEGF 25,70 % (C).

Die FACS-Analyse ergab, dass durch die Stimulation der HPMVEC mit hCG und in Kombination mit VEGF die durch Staurosporin induzierte Apoptose signifikant verringert werden konnte (Abb. 4-12). Hierbei wurde eine Apoptoserate von 25,70 % (bei 100 U/ml hCG+ 10 ng/ml VEGF) (C) bis 30,96 % (bei 1 U/ml hCG+ 10 ng/ml VEGF) (A) gemessen (Abb. 4-13). Als Positivkontrolle diente jeweils 10 ng/ml VEGF.

10ng/ml VEGF

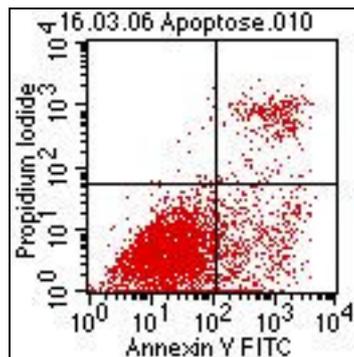


Abb. 4-13: Die Apoptose bei VEGF behandelten HPMVEC: Die Positivkontrolle der mit 10 ng/ml VEGF inkubierten HPMVEC ergab eine Apoptoserate von 20,45 %.

Nach der Inkubation der HPMVEC mit 10 ng/ml VEGF und anschließender Apoptoseinduktion mit 2 nM Staurosporin konnte eine Apoptoserate von 20,45 % erzielt werden (Abb. 4-13).

Zusammenfassend zeigt die Graphik (Abb. 4-14), dass hCG allein keinen Schutz vor Apoptose bietet. Als Positivkontrolle dienten unstimulierte mit Staurosporin behandelte HPMVEC (SS-Apoptose), während unstimulierte und unbehandelte Endothelzellen (Basalapoptose) zur Negativkontrolle herangezogen wurden (Abb. 4-14).

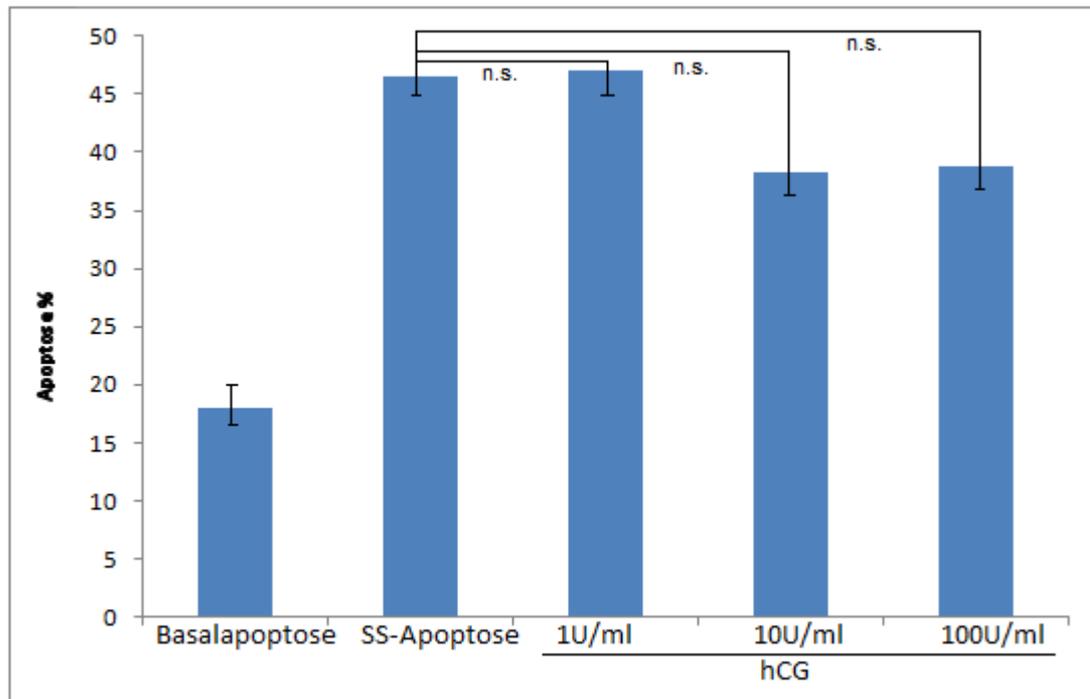


Abb. 4-14: Die hCG-stimulierten HPMVEC und der mit Staurosporin induzierte Zelltod: hCG hat keine signifikante (n. s. = nicht signifikant) protektive Wirkung auf die induzierte Apoptose in den HPMVEC.

Bei der zusätzlichen Inkubation mit VEGF (10 ng/ml) konnte ein signifikanter protektiver Effekt gegenüber dem induzierten Zelltod herausgestellt werden. Die Kombination von VEGF und hCG erhöht die Protektion vor der Staurosporin induzierten Apoptose stärker als VEGF allein (Abb. 4-15).

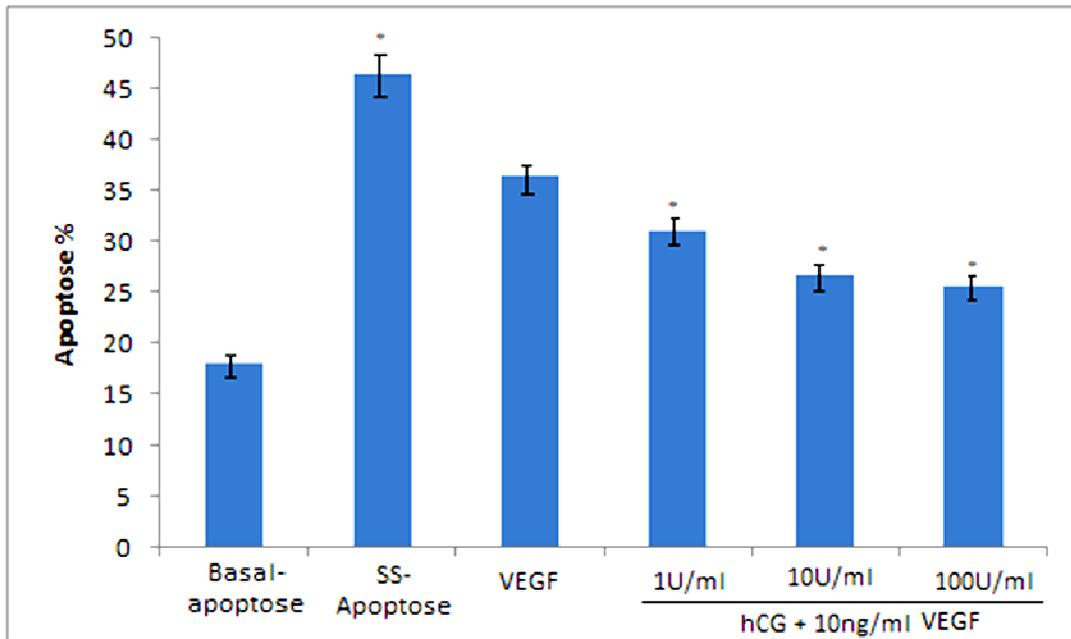


Abb. 4-15: Die Apoptoserate, der mit hCG und VEGF stimulierten HPMVEC: Die kombinierte Stimulation der HPMVEC mit hCG und VEGF hat einen signifikanten protektiven Effekt auf die induzierte Apoptose (* $p < 0,05$).

4.6. Die Sphäroid-Kultur als *in vitro* Angiogenese-Test für HPMVEC

Das dreidimensionale *in vitro* System wurde für die Untersuchung der Rolle von hCG auf die Bildung von Sprouts von Endothelzellen benutzt. Nach Einbettung der Sphäroide in die Kollagen-Matrix und die Stimulation mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen (1- 100 U/ml) konnte eine Sproutbildung von den HPMVEC beobachtet werden (Abb. 4-16 bis Abb. 4-19).

Als Kontrollen dienten HPMVEC, die mit 20 % FKS bzw. 10 ng/ml VEGF inkubiert wurden. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen dar. In Form von Filmen wurde das Ausbilden der Sprouts zeitlich dokumentiert.

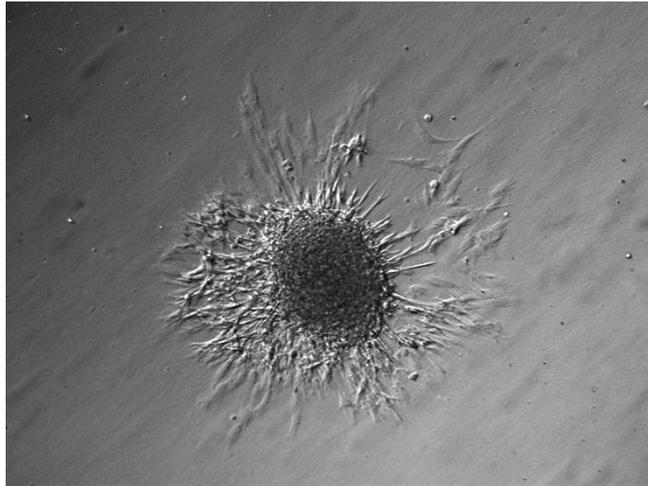


Abb. 4-16: Die Sproutbildung bei den unstimulierten HPMVEC in 1 % FKS (Vergrößerung 200x).

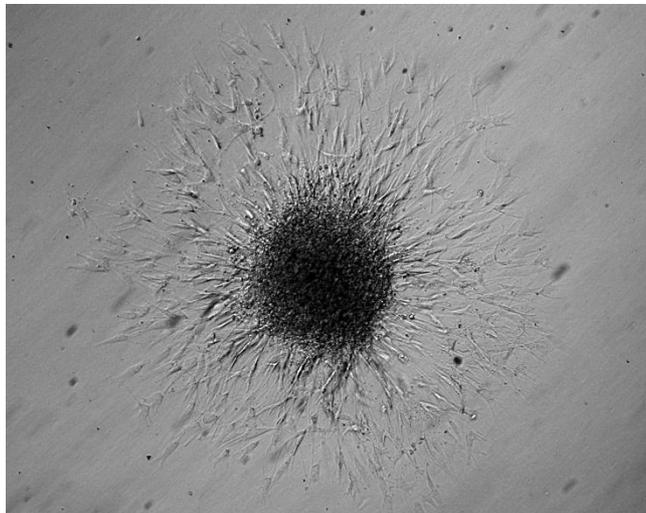


Abb. 4-17: Die Sproutbildung bei den mit 1 U/ml hCG stimulierten HPMVEC (Vergrößerung 200x).

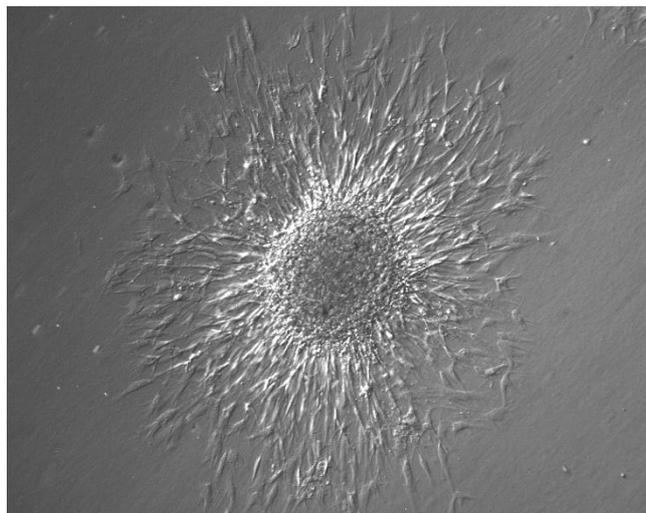


Abb. 4-18: Die Sproutbildung bei den mit 10 U/ml hCG stimulierten HPMVEC (Vergrößerung 200x).

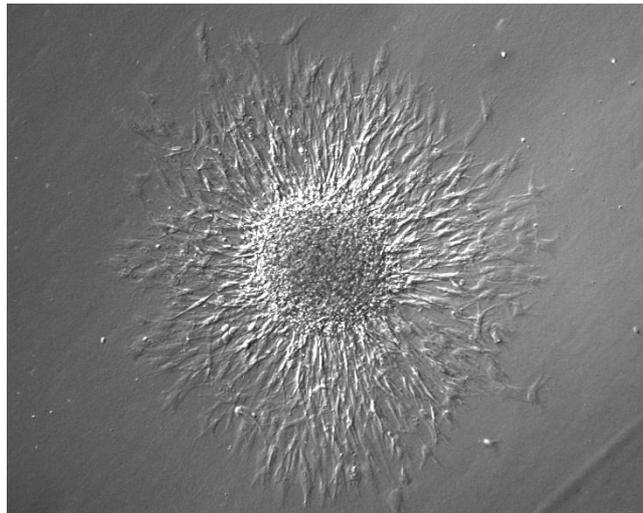


Abb. 4-19: Die Sproutbildung bei den mit 100 U/ml hCG stimulierten HPMVEC (Vergrößerung 200x).

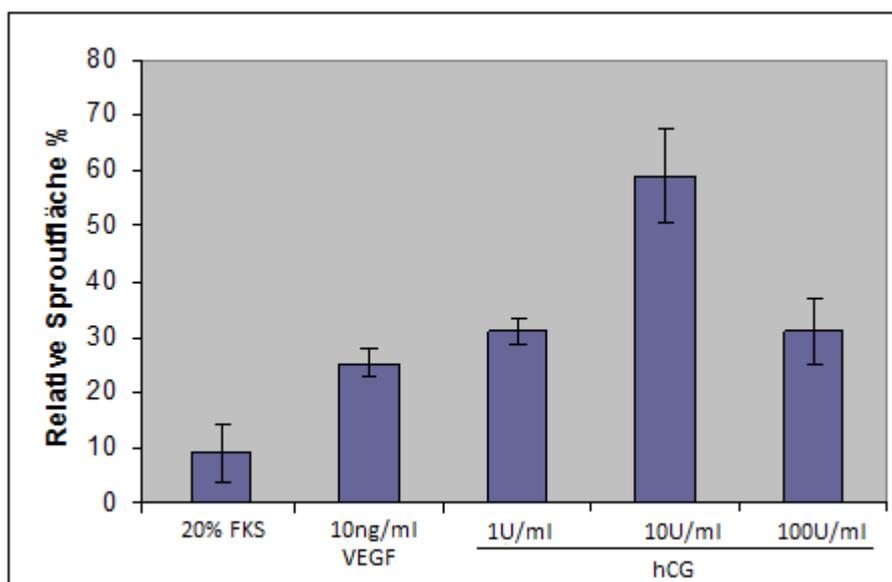


Abb.4-20: Der Einfluss von hCG auf die Sproutbildung: Die Graphik zeigt, dass hCG konzentrationsabhängig die Bildung von Sprouts und damit der Fläche des Sproutings fördert. Als Positivkontrolle diente 20 % FKS und VEGF (10 ng/ml). 1 % FKS wurde als Negativkontrolle herangezogen und alle Ergebnisse darauf bezogen.

Die relative Sproutfläche von HPMVEC, die mit 1 U/ml bzw. 100 U/ml hCG stimuliert wurden, ist 31 % größer als die der Negativkontrolle (1 % FKS). Bei der Stimulation mit 10 U/ml hCG konnte eine 59 %ig größere Sproutfläche gemessen werden.

5. Diskussion

Für die ungestörte Embryonalentwicklung ist eine normale Vaskularisierung der Plazenta von größter Bedeutung. Nicht nur während der Implantation gilt hCG als ein wichtiges Peptidhormon (Tao *et al.*, 1995), sondern es wird auch als direkt beeinflussender angiogener Faktor *in vitro* dargestellt (Zygmunt *et al.*, 2002).

5.1. Die Isolierung der HMPVECs

In vitro Studien über die Funktion von humanen Endothelzellen sind von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die Pathophysiologie der intrauterinen Wachstumsretardierung und der Präeklampsie, denn beide stehen in Verbindung mit einer inadäquaten Entwicklung der Plazentavaskulatur. Obwohl die Plazenta mit einer Nährstoff- und Substrataustauschfläche von 10- 15 m² eine reiche Quelle an Endothelzellen darstellt, bedarf die Isolierung und Charakterisierung der humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen der weiteren Optimierung.

Drake und Loke beschrieben 1991 eine Methode zur Isolierung von Endothelzellen aus der Plazenta mit anti-Thrombomodulin-Antikörper gekoppelten Dynabeads. Dieses zeitaufwendige Vorgehen der Zell-Antikörperbindung konnte jedoch keiner FACS-Analyse zugeführt werden, da das Ablösen der Dynabeads von den mikrovaskulären Zellen nicht möglich war. Daraufhin wurde Fucose für das Ablösen der Dynabeads nach der Separation verwendet (Jackson *et al.*, 1990). Auch mit Lecthin beschichtete Dynabeads wurden zur Isolierung von Endothelzellen benutzt (Cha *et al.*, 1996).

Das Wissen über die Endothelzellfunktion im Hinblick auf die Plazenta stammt von *in vitro* Experimenten mit HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) (Jaffe *et al.*, 1973). Die HUVEC sind leicht zu isolieren und zu kultivieren, während die Kultivierung der HPMVEC technisch aufwendiger und zeitintensiver ist und besonders durch kontaminierende Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen erschwert wird (McDouall *et al.*, 1996). Bei HUVECs handelt es sich allerdings um

makrovaskuläre extraplazentare Endothelzellen, welche nicht die Eigenschaften von mikrovaskulären intraplazentaren Zellen repräsentieren (Kacemi *et al.*, 1996). Die unterschiedlichen Eigenschaften von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen konnten beispielsweise 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).

Andere Protokolle beschreiben die Verwendung von Trypsin zur Isolierung von placentaren mikrovaskulären Zellen mittels Perfusion des Organs (Schütz und Friedl, 1996). Die Reinheit dieser Methode ist fraglich, da sich in der Zellpopulation auch Zellen der Nabelschnurvene oder Zellen der Chorionplattengefäße befinden können (Ugele und Lange, 2001).

Einen größeren Ertrag an placentaren mikrovaskulären Zellen wurde durch die enzymatische Verdauung von zerkleinertem Plazentagewebe zusammen mit verbesserten Zellkulturtechniken erzielt. Durch die Verwendung von mit Mikrobeads gekoppelten Antikörpern (Thrombomodulin oder Ulex europeus-1 lectin) konnten die Endothelzellen isoliert werden. Die Reinheit der Zellpopulation wurde mittels Immunocytochemie sowie elektronenmikroskopisch kontrolliert (Leach *et al.*, 1994; Kacemi *et al.*, 1996). Nachteile dieser Methode waren die zeitintensive Präparation, die geringe Spezifität und das niedrige Ergebnis an Thrombomodulin.

Die in drei Schritten erfolgte immunomagnetische Isolierung der Plazentaendothelzellen stellt ein optimiertes Protokoll dar. Die verwendeten Mikrobeads konnten 24 Stunden nach der Separation nicht mehr nachgewiesen werden und die Zellen fanden bis Passage 10 für funktionelle Analysen Verwendung. Zunächst wurden anti-CD105-Antikörper benutzt. Die Endothelzellen exprimieren das 180 kDa, eine Rolle bei der Angiogenese spielendes Oberflächenantigen CD105 (=Endoglin) (Fonsatti *et al.*, 2003). Aber auch andere Zelltypen besitzen das Molekül auf ihrer Zelloberfläche, so beispielsweise Fibroblasten (St-Jaques *et al.*, 1994), vaskuläre glatte Muskelzellen (Adam *et al.*, 1998) und der Synzytiotrophoblast sowie der extravillöse Trophoblast (Gougos *et al.*, 1992). Da zu Beginn dieser Arbeit nur

CD105 kommerziell erhältlich war, wurde zunächst mit diesem Antikörper gearbeitet. Im Verlauf wurde uns eine neu entwickelte Produktprobe der CD31 Mikrobeads (Miltenyi Bioscience) zur Verfügung gestellt. CD31 ist ein sensitiver und spezifischer Marker für endotheliale Zellen und das Synonym für PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) (DeLisser und Newman, 1993). Letztlich konnte die Verwendung von CD31 Mikrobeads verbesserte Ergebnisse erzielen. Das Ergebnis wurde mit der Durchflusszytometrie quantifiziert. Nach der ersten Aufreinigung bestand die Zellpopulation zu 20 % aus Endothelzellen, nach der dritten immunomagnetischen Separation mittels MACS® konnten bis zu 70- 95 % der Zellen im FACS als Endothelzellen detektiert werden und wurden für die Untersuchungen verwendet.

5.2. Der LH/hCG-Rezeptor im Zusammenhang mit der plazentaren Angiogenese

Der LH/hCG-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer langen transmembranären Region, einer extrazellulären Bindungsdomäne und einem relativ kurzen zytoplasmatischen Anteil (Minegishi *et al.*, 1990). Dieser Rezeptor wird von den Zellen des weiblichen Reproduktionstraktes exprimiert (Lei *et al.*, 1993), ebenso von Zellen des Uterus (Licht *et al.*, 2003), Amnion-, Chorion- und Deciduazellen (Toth *et al.*, 1996), Nabelschnurzellen (Rao *et al.*, 1993) und Plazentazellen. Auch die Jeg-3-Zellen exprimieren den hCG/LH-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche ebenso die Zelllinien der Ovarialkarzinome (Kuroda *et al.*, 1998; Zygmunt *et al.*, 1998).

hCG bindet mit hoher Affinität an den LH/hCG Rezeptor. Nach hCG-Bindung an den Rezeptor scheinen Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA) und die extrazellulär-regulierten Proteinkinasen 1/2 (Erk 1/2) in uterinen mikrovaskulären Endothelzellen und präovulatorischen Granulosazellen aktiviert zu werden (Salvador *et al.*, 2002; Zygmunt *et al.*, 2002). Darüber hinaus scheint die PKC auch an der Externalisierung des Rezeptors in mikrovaskulären Endothelzellen beteiligt zu sein (Zhang *et al.*, 1998).

Im Hinblick auf die Beteiligung der CD133⁺ Zellen an der Vaskulogenese konnte ebenfalls der LH/hCG-Rezeptor auf CD133⁺ Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass hCG die Proliferation der Zellen konzentrationsabhängig stimuliert (Baal *et al.*, 2004).

hCG vermag die Expression von VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 sowie Ang-2 zu induzieren (Sugino *et al.*, 2000; Wulff *et al.*, 2000; Haggstrom Rudolfsson *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2004). Frühere Arbeiten weisen auf Interaktionen zwischen dem hCG- und dem IGF-II-Signalweg in der fetomaternalen Einheit hin. Es konnte gezeigt werden, dass hCG die Externalisierung des IGF-II/ M6PR auf Trophoblastenzellen induziert und damit die IGF-II-induzierte Migration der Zellen *in vitro* vermittelt (Zygmunt *et al.*, 2005). In einer weiteren publizierten Studie zeigten Martinez-Chequer und seine Mitarbeiter (2003), dass IGF-II synergistisch mit hCG die VEGF-A Proteinexpression in Granulosazellen induzieren kann. Die Untersuchung an uterinen mikrovaskulären Endothelzellen ergab, dass IGF-II nach Bindung an den IGF-II/ M6PR unter Beteiligung von PKC Aussprossungen der Zellen in einem dreidimensionalen *in vitro* Angiogenese Assay bewirkt (Herr *et al.*, 2003).

5.3. Der Einfluss von hCG auf Proliferation und Apoptose

HCG ist nicht nur als ein wichtiges Peptidhormon während der Implantation (Lei *et al.*, 1993; Tao *et al.*, 1995) sondern auch als ein Angiogenesefaktor für uterine Endothelzellen (Zygmunt *et al.*, 2002) beschrieben worden. Das Hormon bewirkt eine starke Vasodilatation in uterinen Arterien von graviden und nichtgraviden Ratten (Hermsteiner *et al.*, 1999) sowie in den Gefäßen des humanen Corpus luteum und des fröhschwangeren Uterus (Jauniaux *et al.*, 1992).

Im Angiogeneseprozess sind Proliferation und Apoptose von entscheidender Relevanz. Über die Eigenschaften von hCG die Apoptose und Antiapoptose betreffend wurde in der Vergangenheit berichtet. Angiogenesefaktoren, wie VEGF, bFGF und auch hCG induzieren die Proliferation und hemmen die Apoptose (Zygmunt *et al.*, 2003).

Bei den LH/ hCG-Rezeptor exprimierenden uterinen Endothelzellen konnte unter dem Einfluss von hCG ein signifikanter Migrationsanstieg gezeigt werden (Zygmunt *et al.*, 2002). Die Proliferation blieb davon jedoch unberührt. In dieser Arbeit konnte bei der Stimulation der HPMVEC mit hCG ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Proliferation beobachtet werden. In früheren Untersuchungen wurde der proliferative Effekt von VEGF auf Endothelzellen gezeigt (Rizk *et al.*, 1997). Deshalb wurde VEGF in dieser Arbeit als Positivkontrolle herangezogen. In anderen Studien konnte der Effekt von hCG nicht nachgewiesen werden, so beispielsweise bei den ovariellen mikrovaskulären Endothelzellen (Christenson und Stouffer, 1996) oder auch bei den Endometriumkarzinomzellen. Bei diesen Karzinomzellen wird eine Erhöhung der Population durch eine verminderte Apoptoserate hervorgerufen (Butler *et al.*, 2000). Bei dem Karposisarkom und bei humanen Brustepithelzellen kommt es durch den Einfluss von hCG zur Induktion der Apoptose (Samaniego *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 1998). Da die Tumorzellen unabhängig von externen Wachstumssignalen proliferieren, die Apoptose gehemmt wird und eine Aktivierung der Angiogenese stattfindet, kommt es schließlich zur Metastasierung. Die Transfektion von antisense- β -CG in Chorionkarzinomzellen hemmte ihre Proliferation und vergrößerte die Apoptoserate, wohingegen durch die Zugabe von hCG die veränderten Zellen vollständig wiederhergestellt werden konnten (Hamada *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von hCG auf die HPMVECs im Rahmen der Proliferation und deren durch Staurosporin induzierte Apoptose untersucht. Im Gegensatz zu den uterinen Endothelzellen (Zygmunt *et al.*, 2002) konnte ein positiver proliferativer Effekt bei den humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen festgestellt werden, welcher konzentrationsabhängig war. *In vitro* Studien zeigten, dass humane Zytotrophoblasten einen positiven Einfluss auf die Proliferation uteriner Endothelzellen haben und sie vor der Apoptose schützen (Zhou *et al.*, 2003).

Die Apoptose findet in der Plazenta in allen Trimestern der Schwangerschaft statt (Kim *et al.*, 1995). Die intrazytoplasmatische Expression des bcl-2-Genes, als Maß für die Zahl der in Apoptose befindlichen Zellen, wurde in villösen und extravillösen Trophoblastzellen, in Synzytiotrophoblastzellen, in Intermediärtrophoblasten, im Zottenstroma, in Kapillarendothelien, in Hofbauerzellen, in der Dezidua und in Amnionepithelien nachgewiesen. Über 50 % der apoptotischen Zellen in der

Plazenta sind Trophoblastzellen, weniger als 5 % Endothelzellen. Die Apoptose ist ein normaler Bestandteil der Differenzierung und des Umsatzes des villösen Trophoblasten. Er besteht aus einer Lage proliferierender Stammzellen mit direktem Kontakt zur Basalmembran, dem Zytotrophoblasten und einer zweiten Lage, dem multinukleären Synzytiotrophoblasten, der aufgrund seines hohen Grades der Differenzierung die Fähigkeit zur Teilung und Regeneration verloren hat (Benirschke, 2000; Geier *et al.*, 1975; Huppertz, 2005). Die Häufigkeit des Auftretens der Apoptose variiert im Laufe der Schwangerschaft. Ihren Höhepunkt erreicht sie im dritten Trimester, hier weisen 0,07 bis 0,25 % der untersuchten Zellen Zeichen der Apoptose auf. Die abnehmende bcl-2-Expression in der Plazenta mit fortschreitendem Gestationsalter korreliert mit der physiologischen Funktion von bcl-2. Ab einem bestimmten Zeitpunkt ist das Überleben der plazentaren Zellen keine zwingende Notwendigkeit mehr und der programmierte Zelltod am physiologischen Geburtstermin oder kurz davor setzt ein. Differenzen zwischen den Lokalisationen der apoptotischen Veränderungen in der Plazenta (Randbereich/ zentraler Anteil) waren nicht nachweisbar (Gerber *et al.*, 1998; Nör *et al.*, 1999; Spyridopoulos *et al.*, 1997).

Um zu untersuchen, inwieweit hCG allein und in Kombination mit VEGF die Apoptose beeinflussen, wurden die HPMVEC mit Staurosporin behandelt und die Apoptoserate mittels FACS gemessen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch hCG die Zellen mit Staurosporin induzierter Apoptose nicht geschützt werden konnten. Nur die Kombination von VEGF und hCG hatte einen protektiven Effekt auf die mit Staurosporin inkubierten HPMVEC, das heißt, die antiapoptotische Wirkung von VEGF wurde durch hCG unterstützt (Herr *et al.*, 2007). Bei der Untersuchung von CD133+-Zellen konnte nach Stimulation mit hCG kein Effekt auf die Apoptose verzeichnet werden (Baal *et al.*, 2004). In einer anderen Studie zeigten Brustkrebszellen von Mäusen eine drastische apoptotische Reaktion auf hCG (Shi *et al.*, 2006).

Durch die Verwendung von termingerechten Plazenten war ein positiver Effekt von hCG auf die Proliferation HPMVEC zwar nachweisbar, aber Experimente mit Plazenten von früheren Schwangerschaftswochen könnten eine sinnvolle Ergänzung bilden, um einen genauen Vergleich zu erstellen, da die maximale hCG-Konzentration um die 12. SSW auftritt. In diesem Zeitraum ist auch die maximale

plazentare Angiogenese zu verzeichnen. Dennoch ist bereits ab der 32. SSW eine steigende Apoptoserate in Zyto- und Synzytiotrophoblast nachweisbar (Kim *et al.*, 1995; Reed JC, 1994), die unter Umständen auch auf die HMPVEC Einfluss haben kann.

5.4. Die Sphäroidbildung

Die Angiogenese wird in einen sprossenden und einen nichtsprossenden Mechanismus unterteilt, dabei entstehen neue Kapillaren aus präexistenten Blutgefäßen. Es kommt zur Migration in Richtung des angiogenen Stimulus, zur Proliferation und zur Ausbildung eines dreidimensionalen Kapillarnetzwerkes (Augustin HG, 1998; Risau W, 1997). Der komplexe Prozess der Angiogenese erfordert eine perfekte Kommunikation mit der extrazellulären Matrix. Eine Balance zwischen Invasion und Adhäsion ist hier wichtig. Außerdem geben die Endothelzellen selbst Faktoren ab, die ein Wachstum der aussprossenden Kapillaren ermöglicht (Sephel *et al.*, 1996; Haralabopoulos *et al.*, 1994).

Es wurde eine Vielzahl von zweidimensionalen Assays propagiert, die die Migration und Proliferation der Endothelzellen darstellen (Kim *et al.*, 1998). Um den potentiellen Einfluss von hCG auf die Migration zu untersuchen, erfolgten Voruntersuchungen mittels eines modifizierten Boydenkammer-Assays (Zygmunt *et al.*, 2002). Die Zellen sollten durch die mit Poren versehene Membran migrieren und auf der anderen Seite adhären und ggf. sich vermehren. Eine Adhäsion der HPMVEC konnten wir nicht beobachten, lediglich in den Kontrollansätzen mit FKS und VEGF zeigten sich auswertbare Ergebnisse, während die Proben, die mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen behandelt wurden, eine sehr geringe Anzahl an vitalen HPMVEC aufwiesen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Deshalb wurden Versuche mit dreidimensionalen Sphäroiden durchgeführt. Durch Baal *et al.* (2009) wurde dieser Sphäroidassay als *in vitro* Modell der plazentaren Vaskulogenese weiterentwickelt. Das Phänomen der Sproutbildung in einer Kollagenmatrix sollte illustriert werden. Einen solchen Sproutassay konnten Korff und

seine Mitarbeiter (1998) bereits erfolgreich für die Angiogenesefaktoren bFGF und VEGF etablieren.

In dieser Arbeit wurden die Sphäroide mit hCG inkubiert und die Größe der Sproutflächen vergleichend zur Auswertung herangezogen. Es konnte ein konzentrationsabhängiger positiver Einfluss von hCG auf die sproutbildenden HPMVEC herausgestellt werden. Die Ergebnisse dieses Prozesses wurden mit einer Kamera als Film dokumentiert.

Ein Vorteil von dreidimensionalen auf Zellaggregation beruhenden Assays ist die Möglichkeit zur Beobachtung der Endothelzellinvasion in die extrazelluläre Matrix. Im Rahmen der Untersuchung von UMVEC wurde bereits ein signifikanter Anstieg von kapillaren Neoformationen bei der Stimulation mit physiologischen hCG-Konzentrationen herausgestellt (Zygmunt *et al.*, 2002).

5.5. hCG in der Angiogenese

Der Einfluss von hCG auf den Angiogeneseprozess kann direkt über den LH/hCG-Rezeptor und beispielsweise die Proteinkinase C erfolgen oder indirekt durch die Produktion von Angiogenesefaktoren oder anderen Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF) (Reisinger *et al.*, 2007). Obwohl mehrere Veränderungen im Bezug auf die Funktion (Funktionsgewinn, Funktionsverlust) der hCG Subeinheiten und des LH/hCG-Rezeptors publiziert worden sind (Einstein *et al.*, 2001; Rodien *et al.*, 1998), wurde bisher kein direkter Einfluss von hCG auf das plazentare Gefäßsystem gezeigt.

Die mononukleären Zellen, die gehäuft im Uterus und der Plazenta anzutreffen sind, scheinen unter dem Einfluss von hCG die Schwangerschaft durch ihre Funktion im Rahmen der Immunreaktion zu unterstützen (Schäfer *et al.*, 1992). Die Zelllinie Mono-Mac-6 (Zelltypen der humanen akuten Monozytenleukämie) exprimieren den LH/hCG-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. HCG bewirkt konzentrationsabhängig eine Erhöhung der angiogenen VEGF-Sekretion. Die sehr seltene Isoform VEGF₂₀₆ wird in der Plazenta gefunden, ist basisch und bindet Heparin, so dass es an die extrazelluläre Matrix gebunden wird (Park *et al.*, 1993).

Der direkte Beweis, dass hCG die Expression von VEGF beeinflusst, lieferten Laitinen und seine Kollegen (Laitinen *et al.*, 1997). Bei Frauen, die im Rahmen des IVF-Programms mit hCG stimuliert wurden, wurde eine vermehrte Induktion der VEGF-Expression in den Follikeln gesehen (Lee *et al.*, 1997). Die Proliferation von Perizyten und Endothelzellen sowie die Erhaltung des Corpus luteum ist ebenso auf die Wirkung von hCG zurückzuführen (Wulff *et al.*, 2000). Christenson und Stouffer demonstrierten 1997, dass die Synthese und die Sekretion von VEGF in den Granulosazellen bei Rhesusaffen achtfach erhöht sind durch die Einwirkung von hCG. Ähnliche Daten wurden von Hazzard veröffentlicht (Hazzard *et al.*, 2000), wobei in den Follikelflüssigkeiten eine sechsfache Zunahme von VEGF nach Behandlung mit hCG gezeigt wurde. hCG moduliert auch die Angiopoietinfamilie (Wulff *et al.*, 2000).

Obwohl es Anzeichen dafür gibt, dass VEGF-A und nicht hCG an der Angiogenese der uterinen Endothelzellen während der Implantation beteiligt ist (Kapiteijn *et al.*, 2006), haben Zygmunt *et al.* (2002) gezeigt, dass hCG eine direkte positive Wirkung auf die Sproutbildung der uterinen Endothelzellen besitzt jedoch nicht auf makrovaskuläre Zellen. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass hCG eine mögliche Rolle als Modulator der Gefäßentwicklung in der fetomaternalen Einheit darstellt. In klinischen Daten wurde gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen Veränderungen des mütterlichen hCG-Serum-Levels und der Schwangerschaft gibt. Dies betrifft beispielsweise die intrauterine Wachstumsretardierung, Gestationsdiabetes und die Präeklampsie (Hershkovitz *et al.*, 2005; Merviel *et al.*, 2001).

6. Zusammenfassung

Für den optimalen Schwangerschaftsverlauf bedarf es einer adäquaten Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff über die Vaskulatur. Dies wird zum einen durch Vasodilatation der maternalen Blutgefäße erreicht und zum anderen werden im Rahmen der Angiogenese neue Gefäße gebildet. Eine Störung dieser Prozesse steigert das Risiko von Frühaborten, intrauterinem Fruchttod oder erhöht die Gefahr fetaler Wachstumsretardierung oder auch Präeklampsie. Neben den ubiquitär vorhandenen VEGF-A und bFGF wurde hCG als gewebespezifischer Angiogenesefaktor identifiziert.

Zunächst wurden die humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen von termingerechten Plazenten, die durch *Sectio caesarea* entwickelt worden waren, mittels enzymatischer und immunomagnetischer Separation (CD105 und CD31 Mikrobeads) isoliert und aufgereinigt. Nach der dritten Aufreinigung konnten bis zu 95 %ige Reinkulturen erhalten werden. Durch die Endothelzellmarker (CD31, CD141, CD144, VEGF-Rezeptor-2 und der von-Willebrand-Faktor) konnten die HPMVEC eindeutig charakterisiert werden. Die Expression des LH/hCG-Rezeptors auf den HPMVEC konnte auf mRNA- Ebene gezeigt werden.

Da hCG als angiogener Faktor bekannt ist, wurden die HPMVEC in einem Proliferationsassay mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass hCG eine konzentrationsabhängige proliferative Wirkung auf die Endothelzellen besitzt. Im Rahmen der Apoptose konnte kein signifikanter antiapoptotischer Effekt auf die behandelten HPMVEC herausgestellt werden. Erst durch die Kombination mit VEGF konnte eine Protektion erzielt werden. Das dreidimensionale *in vitro* System wurde für die Untersuchung der Rolle von hCG auf die Bildung von Sprouts von Endothelzellen benutzt. Nach der Stimulation mit unterschiedlichen hCG-Konzentrationen konnte eine gesteigerte Sproutbildung bei den HPMVEC beobachtet werden.

Zusammenfassend bieten die Methode zur Gewinnung von humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen und die Studien mit hCG ein *in vitro* Modell, welches zum besseren Verständnis der Gefäßneubildung während der Schwangerschaft beitragen soll.

7. Summary

For an uncomplicated pregnancy an adequate supply of the embryo with nutrients and oxygen via the vasculature is necessary. This can be achieved on the one hand by vasodilatation of the maternal blood vessels and on the other hand new vessels are developed by angiogenesis. A dysfunction of these processes increases the risk of early pregnancy losses, intrauterine death, fetal growth restriction or even preeclampsia. Beside the ubiquitously available VEGF-A and bFGF hCG was identified as an specific angiogenetic factor.

At first human placental microvascular endothelial cells of placentae from caesarean sections at term were isolated and purified by enzymatic digestion and multistep immunomagnetic sorting (CD105 and CD31 mircobeads). After the third immunomagnetic sorting purification was obtained. Endothelial markers (CD31, CD141, CD144, VEGFR-2 and von-Willebrand-factor) characterized the HPMVEC unambiguously. The LH/hCG-receptor is expressed by HPMVEC on mRNA-level.

As hCG is known as an angiogenic factor, the HPMVEC were cultured with different concentrations of the hCG during a proliferation assay. Depending on its concentration hCG stimulates the proliferation of endothelial cells. No significant antiapoptotic effect on staurosporin treated HPMVEC could be demonstrated. A protection against staurosporin induced apoptosis could only be achieved by combining hCG with VEGF.

The three-dimensional *in vitro* angiogenesis system was used to study the role of hCG on endothelial cell sprouting. Incubation of HPMVEC with hCG resulted in a dose- specific increase in sprout formation.

In summary, both the isolation of human placental microvascular endothelial cells and the studies on hCG provide an *in vitro* model which can lead to a better understanding of vascular development in the feto-maternal unit during pregnancy.

8. Literaturverzeichnis

Acevedo HF, Hartsock RJ.

Metastatic phenotype correlates with high expression of membrane-associated complete beta-human chorionic gonadotropin in vivo.

Cancer. 1996; 78(11):2388-99.

Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL.

Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells.

Biochem Biophys Res Commun. 1998; 247(1):33-7.

Asan E, Kaymaz FF, Cakar AN, Dagdeviren A, Beksac MS.

Vasculogenesis in early human placental villi: an ultrastructural study.

Anat Anz. 1999; 181(6):549-54.

Augustin HG.

Angiogenesis in the female reproductive system.

EXS. 2005; (94):35-52.

Augustin HG.

Antiangiogenic tumour therapy: will it work?

Trends Pharmacol Sci. 1998; 19(6):216-22.

Baal N, Reisinger K, Jahr H, Bohle RM, Münstedt K, Rao CV, Preissner KT, Zygmunt M.

Expression of transcriptional factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from umbilical cord blood.

Thromb Haemost. 2004; 92:767-75.

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; 25(2):129-33.

Benirschke K, Kaufmann P.

Pathology of human placenta.

4nd Edition; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 2000.

Bergers G, Benjamin LE.

Tumorigenesis and the angiogenic switch.

Nat Rev Cancer. 2003; 3(6):401-10.

Bidart JM, Baudin E, Troalen F, Bellet D, Schlumberger M.

Eutopic and ectopic production of glycoprotein hormones alpha and beta subunits

Ann Endocrinol (Paris). 1997; 58(2):125-8.

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; 176(5):1375-9.

Burkhardt T, Matter CM, Lohmann C, Cai H, Lüscher TF, Zisch AH, Beinder E.

Decreased Umbilical Artery Compliance and IGF-I Plasma Levels in Infants with Intrauterine Growth Restriction - Implications for Fetal Programming of Hypertension.

Placenta. 2009; 30(2):136-41.

Butler SA, Ikram MS, Mathieu S, Iles RK.

The increase in bladder carcinoma cell population induced by the beta subunit of human chorionic gonadotrophin is a result of anti-apoptosis effect and not cell proliferation

Br J Cancer 2000; 82, 1553-6.

Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, Kaufmann P.

The development of the human placental villous tree.

Anat Embryol. 1990; 181: 117-128.

Cha MS, Rah DK, Lee KH.

Isolation and pure culture of microvascular endothelial cells from the fetal skin.

Yonsei Med J. 1996; 37(3):186-93.

Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM.

Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation.

Placenta. 2004; 25(2-3):103-13.

Christenson LK, Stouffer RL.

Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles.

J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(7):2135-42.

Combarous Y.

Gonadotropins: Structure, synthesis, functions; Reproductions im mammals and man, (ED.) C. Thibault, M.C. Levsseur, R.H.F. Hunter

Paris: Ellipses. 1993: 61-450

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.

DiPietro LA.

Thrombospondin as a regulator of angiogenesis.

In: Rosen E, Goldberg ID: Regulation of Angiogenesis

Springer, Berlin EXS. 1997; 79:295-314.

Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O.

Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis.

Q J Nucl Med. 2003; 47(3):149-61.

Drake BL, Loke YW.

Isolation of endothelial cells from human first trimester decidua using immunomagnetic beads.

Hum Reprod. 1991; 6(8):1156-9.

DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM.

Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31).

Curr Top Microbiol Immunol. 1993; 184:37-45.

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; 151(3):671-7.

DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM.

Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31.

Immunol Today. 1994; 15(10):490-5.

Einstein M, Lin W, MacDonald GJ, Moyle WR.

Partial restoration of lutropin activity by an intersubunit disulfide bond: implications for structure/function studies.

Exp Biol Med (Maywood). 2001; 226(6):581-90.

Flamme I, Frolich T, Risau W.

Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis.

J Cell Physiol. 1997; 173(2):206-10.

Folkman J, Shing Y.

Angiogenesis.

J Biol Chem. 1992; 267(16):10931-4.

Folkman J, Klagsbrun M.

Angiogenic factors.

Science. 1987; 235(4787):442-7.

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; 3(6):427-32.

Garlanda C, Dejana E.

Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; 17(7):1193-202.

Geier G, Schuhmann R, Kraus H.

Regional unterschiedliche Zellproliferation innerhalb der Plazentone reifer menschlicher Plazenten.

Autoradiographische Untersuchungen. Arch Gynaekol 1975; 218: 31–7.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N.

Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.

J Biol Chem. 1998; 273 (21):13313-6.

Glauner B.

Cytotoxicity quantification with a cell counter and analyzer system.

Am Biotechnol Lab, 1996; 14:24-6.

Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Bühring 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 ;4(1):83-92.

Haggstrom Rudolfsson S, Johansson A, Franck Lissbrant I, Wikstrom P, Bergh A.

Localized expression of angiopoietin 1 and 2 may explain unique characteristics of the rat testicular microvasculature.

Biol Reprod. 2003; 69:1231-7.

Hamada AL, Nakabayashi K, Sato A, Kiyoshi K, Takamatsu Y, Laoag-Fernandez JB, Ohara N, Maruo T.

Transfection of antisense chorionic gonadotropin beta gene into choriocarcinoma cells suppresses the cell proliferation and induces apoptosis.

J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(8):4873-9.

Hanahan D, Folkman J.

Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.

Cell. 1996; 86(3):353-64.

Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, Lelkes PI, Papaioannou SP, Maragoudakis ME.

Inhibitors of basement membrane collagen synthesis prevent endothelial cell alignment in matrigel in vitro and angiogenesis in vivo.

Lab Invest. 1994; 71(4):575-82.

Harris SJ, Anthony FW, Jones DB, Masson GM.

Pregnancy-specific-beta 1-glycoprotein: effect on lymphocyte proliferation in vitro.

J Reprod Immunol. 1984; 6(4):267-70.

Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval.

Mol Hum Reprod. 2000; 6(3):289.

Hermsteiner M, Zoltan DR, Doetsch J, Rascher W, Kuenzel W.

Human chorionic gonadotropin dilates uterine and mesenteric resistance arteries in pregnant and nonpregnant rats.

Pflugers Arch. 1999; 439(1-2):186-94.

Herr F, Liang OD, Herrero J, Lang U, Preissner KT, Han VK, Zygmunt M.
Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy.

J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88: 4811-7.

Herr F, Baal N, Reisinger K, Lorenz A, McKinnon T, Preissner KT, Zygmunt M.
HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study.
Placenta. 2007; 28 Suppl A:S85-93.

HersHKovitz R, de Swiet M, Kingdom J.

Mid-trimester placentation assessment in high-risk pregnancies using maternal serum screening and uterine artery Doppler.

Hypertens Pregnancy. 2005; 24(3):273-80.

Hudelist G, Wuelfing P, Czerwenka K, Knöfler M, Haider S, Fink-Retter A, Gschwantler-Kaulich D, Pfeiler G, Kubista E, Singer CF.

Beta-hCG/LH receptor (b-HCG/LH-R) expression is increased in invasive versus preinvasive breast cancer: implications for breast carcinogenesis?

J Cancer Res Clin Oncol. 2008.

Huppertz B.

Das Epithel der Plazentazotten: Veränderungen des Trophoblasten bei Präeklampsie
J. Reproduktionsmed Endokrinol 2005; 2 (2), 84-89.

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; 96 (Pt 2):257-62.

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; 52(11):2745-56.

Jauniaux E, Jurkovic D, Delogne-Desnoek J, Meuris S.

Influence of human chorionic gonadotrophin, oestradiol and progesterone on uteroplacental and corpus luteum blood flow in normal early pregnancy.

Hum Reprod. 1992; 7(10):1467-73.

Junqueira LC, Carneira J.

Kapitel 23: Histologie. Weibliche Geschlechtsorgane. [Schiebler TH, Hrsg.], 4. Korrigierte und aktualisierte Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1996: 606-19.

Kacemi A, Challier JC, Galtier M, Olive G.

Culture of endothelial cells from human placental microvessels.

Cell Tissue Res. 1996; 283(2):183-90.

Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS.

Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy.

Placenta. 2004; 25(2-3):114-26.

Kim CJ, Choe YJ, Yoon BH, Kim CW, Chi JG.

Patterns of bcl-2 expression in placenta.

Pathol Res Pract. 1995; 191(12):1239-44.

Kim CS, Wang T, Madri JA.

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression modulates endothelial cell migration in vitro.

Lab Invest. 1998; 78(5):583-90.

Korff T, Augustin HG.

Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation.

J Cell Biol. 1998; 143(5):1341-52.

Korff T, Krauss T, Augustin HG.

Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies.

Exp Cell Res. 2004; 297(2):415-23.

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; 175(6):1534-42.

Kumar S, Talwar GP, Biswas DK.

Necrosis and inhibition of growth of human lung tumor by anti-alpha-human chorionic gonadotropin antibody.

J Natl Cancer Inst. 1992; 84(1):42-7.

Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Yura Y, Tsuruta Y, Hamid AA, Nanbu K, Matsushita K, Mori T.

Human chorionic gonadotropin (hCG) inhibits cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells: possible role of up-regulation of insulin-like growth factor-1 by hCG.

Int J Cancer. 1998; 76(4):571-8

Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O.

Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells.

Endocrinology. 1997; 138(11):4748-56.

Lam PM, Briton-Jones C, Cheung CK, Cheung LP, Haines C.

Upregulation of mRNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors by exogenous human chorionic gonadotropin in cultured oviduct mucosal cells.

Fertil Steril. 2004; 82:1708-10.

Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Morgan FJ, Isaacs NW.

Crystal structure of human chorionic gonadotropin.

Nature. 1994; 369(6480):455-61.

Leach L, Bhasin Y, Clark P, Firth JA.

Isolation of endothelial cells from human term placental villi using immunomagnetic beads.

Placenta. 1994; 15(4):355-64.

Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA, Stouffer RL.

Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro.

Hum Reprod. 1997; 12(12):2756-61.

Lei ZM, Rao CV, Kornyei JL, Licht P, Hiatt ES.

Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain.

Endocrinology. 1993; 132(5):2262-70.

Lei ZM, Reshef E, Rao V.

The expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels.

J Clin Endocrinol Metab. 1992; 75(2):651-9.

Lei ZM, Rao CV, Ackerman DM, Day TG.

The expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors in human gestational trophoblastic neoplasms.

J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74(6):1236-41.

Liang O.D., Korff T., Eckhardt J., Rifaat J., Baal N., Herr F., Preissner K.T., Zygmunt M.

Oncodevelopmental {alpha}-Fetoprotein Acts as a Selective Proangiogenic Factor on Endothelial Cell from the Fetomaternal Unit.

J Clin Endocrinol Metab 2004; 89, 1415-1422.

Licht P, von Wolff M, Berkholz A, Wildt L.

Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinising hormone receptor mRNA in human endometrium and decidua.

Fertil Steril. 2003; 79 Suppl 1:718-23.

Martal J, Cedard L.

Endocrine function of the placenta

Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF (eds) Reproduction in mammals and man.

Edition Marketing, Paris, English, revised edition, 1993; 435-460.

Martinez-Chequer JC, Stouffer RL, Hazzard TM, Patton PE, Molskness TA.

Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles.

Biol Reprod. 2003; 68(4):1112-8.

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; 51(2):137-52.

Meegdes BH, Ingenhoes R, Peeters LL, Exalto N.

Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development.

Fertil Steril. 1988; 49(2):216-20.

Merviel P, Müller F, Guibourdenche J, Berkane N, Gaudet R, Bréart G, Uzan S.
Correlations between serum assays of human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) and pre-eclampsia or intrauterine growth restriction (IUGR) among nulliparas younger than 38 years.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2001; 95(1):59-67.

Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M.

Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA.

Biochem Biophys Res Commun. 1990; 172(3):1049-54.

Erratum in: Biochem Biophys Res Commun 1994; 201(2):1057.

Monteiro JC, Barker G, Ferguson KM, Wiltshaw E, Neville AM.

Ectopic production of human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) by ovarian carcinoma.

Eur J Cancer Clin Oncol. 1983; 19(2):173-8.

Moore KL, Persaud TVN.

Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen.

4., überarb. und erw. Aufl. Schattauer Verlag, 2001.

Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression.

Am J Pathol. 1999; 154(2):375-84.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J.

Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.

Cell. 1994; 79(2):315-28.

Park JE, Keller GA, Ferrara N.

The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF.

Mol Biol Cell. 1993; 4(12):1317-26.

Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G.

Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth.

J Exp Med. 1998; 188(12):2349-56.

Rao CV.

Novel concepts in neuroendocrine regulation of reproductive tract functions.

In the Endocrinology of Pregnancy,

Humana Press Inc., Totwa, New York, 1998; 125-44.

Rao CV, Li X, Toth P, Lei ZM, Cook VD.

Novel expression of functional human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in human umbilical cords.

J Clin Endocrinol Metab. 1993; 77(6):1706-14.

Reed JC.

Bcl-2 and the regulation of programmed cell death

J Cell Biol. 1994; 124 (1-2):1-6.

Reinisch N, Sitte BA, Kähler CM, Wiedermann CJ.

Human chorionic gonadotrophin: a chemoattractant for human blood monocytes, neutrophils and lymphocytes.

J Endocrinol. 1994; 142(1):167-70.

Reisinger K, Baal N, McKinnon T, Münstedt K, Zygmunt M.

The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors?

Mol Cell Endocrinol. 2007 Apr 15; 269(1-2):65-80.

Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL.

The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua.

J Clin Endocrinol Metab. 1990; 70(2):421-30.

Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA.

Angiogenesis in the female reproductive system.

FASEB J. 1992; 6(3):886-92.

Risau W.

Mechanisms of angiogenesis.

Nature. 1997; 386(6626):671-4.

Rizk B, Aboulghar M, Smitz J, Ron-El R.

The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome.

Hum Reprod Update. 1997; 3(3):255-66.

Rodien P, Cetani F, Costagliola S, Tonacchera M, Duprez L, Minegishi T, Govaerts C, Vassart G.

Evidences for an allelic variant of the human LC/CG receptor rather than a gene duplication: functional comparison of wild-type and variant receptors.

J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83(12):4431-4.

Salvador LM, Maizels E, Hales DB, Miyamoto E, Yamamoto H, Hunzicker-Dunn M.

Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation.

Endocrinology. 2002; 143:2986-94.

Samaniego F, Bryant JL, Liu N, Karp JE, Sabichi AL, Thierry A, Lunardi-Iskandar Y, Gallo RC.

Induction of programmed cell death in Kaposi's sarcoma cells by preparations of human chorionic gonadotropin.

J Natl Cancer Inst. 1999; 91(2):135-43.

Scheuner G.

Untersuchung zur Struktur der materno-fetalen Stoffwechselschranke in der menschlichen Placenta.

Nova Acta Leopoldina 1971; 36:25.

Schütz M, Friedl P.

Isolation and cultivation of endothelial cell derived from human placenta.

Eur J Cell Biol. 1996; 71(4):395-401.

Sephel GC, Kennedy R, Kudravi S.

Expression of capillary basement membrane components during sequential phases of wound angiogenesis.

Matrix Biol. 1996; 15(4):263-79.

Shi SQ, Xu L, Zhao G, Yang Y, Peng JP.

Apoptosis and tumor inhibition induced by human chorionic gonadotropin beta in mouse breast carcinoma.

J Mol Med. 2006; 84(11):933-41.

Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube A, Kato H.

Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy.

J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85:3919-24.

Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, Losordo DW.

Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals.

J Mol Cell Cardiol. 1997; 29 (5):1321-30.

Srivastava P, Russo J, Mgbonyebi OP, Russo IH.

Growth inhibition and activation of apoptotic gene expression by human chorionic gonadotropin in human breast epithelial cells.

Anticancer Res. 1998; 18(6A):4003-10.

Stauber M, Weyerstahl T.

Gynäkologie und Geburtshilfe, Duale Reihe, Kapitel E 1.5 1., Entwicklung und Aufbau der Plazenta.

2. Aktualisierte Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 2005; 463-464.

St-Jaques S, Forte M, Lye SJ, Letarte M.

Localisation of endoglin, a transforming growth factor – beta binding protein, and of CD 144 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy.

Biol Reprod. 1994; 51:405-413.

Tao YX, Lei ZM, Hofmann GE, Rao CV.

Human intermediate trophoblasts express chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene.

Biol Reprod. 1995; 53(4):899-904.

Teodorczyk-Injeyan JA, Kellen JA

Chorionic gonadotropin-induced cell proliferation and polyclonal immunoglobulin synthesis in human mononuclear cells.

Biomed Pharmacother. 1988; 42(1):49-53.

Torry RJ, Rongish BJ.

Angiogenesis in the uterus: potential regulation and relation to tumor angiogenesis.

Am J Reprod Immunol. 1992; 27(3-4):171-9.

Toth P, Li X, Rao CV, Lincoln SR, Sanfilippo JS, Spinnato JA 2nd, Yussman MA
Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries.

J Clin Endocrinol Metab. 1994; 79(1):307-15.

Toth P, Li X, Lei ZM, Rao CV.

Expression of human chorionic gonadotropin (hCG)/luteinizing hormone receptors and regulation of the cyclooxygenase-1 gene by exogenous hCG in human fetal membranes.

J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81(3):1283-8.

Ugele B, Lange F.

Isolation of endothelial cells from human placental microvessels: effect of different proteolytic enzymes on releasing endothelial cell from villous tissue.

In Vitro Cell Dev Boil Anim. 2001; 37(7): 408-13.

Urbich C, Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S.

Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis.

Circ Res. 2000; 87(8):683-9.

Wass M, Rawlins GA, Pentycross CR, Bagshawe KD.

Response of lymphocytes from cancer patients to human chorionic gonadotrophin.

Lancet. 1977; 1(8004):171-2.

Wimalasena J, Meehan D, Dostal R, Foster JS, Cameron M, Smith M.

Growth factors interact with estradiol and gonadotropins in the regulation of ovarian cancer cell growth and growth factor receptors.

Oncol Res. 1993; 5(8):325-37.

Wulff C, Wilson H, Lague P, Duncan WC, Armstrong DG, Fraser HM.

Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiotensin, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid.

J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85:4302-9.

Yang M, Lei ZM, Rao ChV.

The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium.

Endocrinology. 2003; 144(3):1108-20.

Zhou, Y., Bellingard, V., Feng, K.T., McMaster, M., Fisher, S.J.

Humancytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C.

Dev Biol. 2003; 263: 114-25.

Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Münstedt K, Rao CV, Lang U, Preissner KT.

Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor.

J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87(11):5290-6.

Zygmunt M.

Kapitel 17: Plazenta. Klinische Pathophysiologie. [Siegenthaler/ Blum, Hrsg.], 9.

Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2006: 407-427.

Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD.

Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003; 110 Suppl. 1:S10-8.

Zygmunt M.

Placental circulation: Clinical significance.

Early Pregnancy. 2001; 5(1):72-3.

Zygmunt M, Hahn D, Münstedt K, Bischof P, Lang U.

Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro.

Placenta. 1998; 19(8):587-93.

Zygmunt M, Hahn D, Kiesenbauer N, Münstedt K, Lang U.

Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 in vitro.

Am J Reprod Immunol. 1998; 40(5):326-31.

Zygmunt M, McKinnon T, Herr F, Lala PK, Han VK.

HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor.

Mol Hum Reprod. 2005; 11(4):261-7.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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.

Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Marek T. Zygmunt danke ich für die Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme in sein Team sowie für die Betreuung meiner Arbeit.

Vielen lieben Dank allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Frau Bettina Gill und Frau Dr. Kerstin Reisinger. Sie standen mir von Anfang an bei dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite. Ein riesiges Dankeschön gilt Frau Dr. Nelli Baal 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.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Dr. med. Friederike Herr, die mir immer konstruktiv und helfend zur Seite stand während der Arbeit im Labor und des Schreibens.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder Martin sagen, die mich immer unterstützt und mit regem Interesse mein Studium und meine Promotion verfolgt haben. Auch meinem Freund René Rauschenbach danke ich für die liebevolle Unterstützung.

Kesselsdorf, Oktober 2010

Anne Lorenz