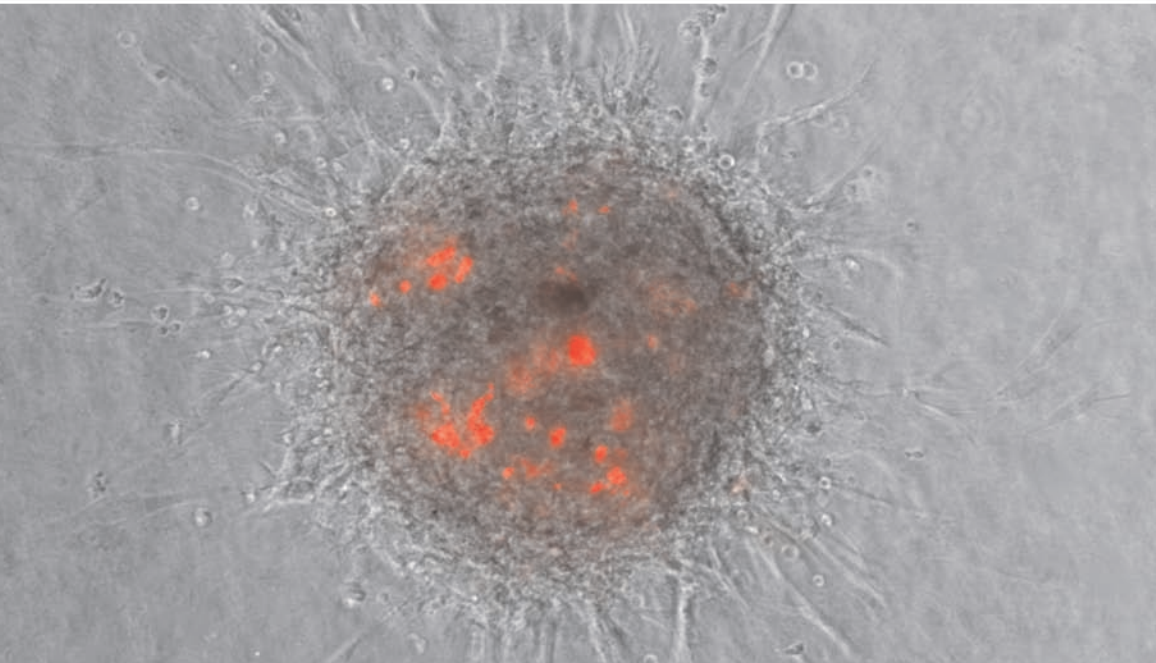
ZELLULÄRE INTERAKTIONEN WÄHREND DER PLAZENTAREN VASKULARISATION: MODELL DER PLAZENTAREN VASKULOGENESE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER ROLLE DES TROPHOBLASTEN

NELLI BAAL



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

ZELLULÄRE INTERAKTIONEN WÄHREND DER PLAZENTAREN VASKULARISATION:

Modell der plazentaren Vaskulogenese unter besonderer Berücksichtigung der Rolle des Trophoblasten

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

NELLI BAAL

aus Taldy-Kurgan/Kasachstan

Giessen 2007

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

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Zygmunt

Gutachter: Prof. Dr. med. L. Fink

Tag der Disputation: 25.09.2007

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

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG **8**

1.1. Menschliche Plazenta 8

1.1.1. Entwicklung und Aufbau der Plazenta 8

1.1.2. Entwicklung des vaskulären Systems der Plazenta 12

1.1.3. Vaskulogenese und Angiogenese 12

1.1.4. Plazentares Gefäßsystem 14

1.1.5. Molekulare Mediatoren der Zell-Zell-Interaktionen während der Gefäßbildung in der Plazenta 15

1.1.6. Besonderheiten der menschlichen Plazenta 16

1.1.7. Modelle zur plazentaren Gefäßbildung 18

1.2. Stammzellen **19**

1.2.1. Definition von Stammzellen 20

1.2.2. Molekulare Marker der Pluripotenz 20

1.2.3. Pluripotente Stammzellen im Nabelschnurblut 21

1.2.4. Hämangioblast 23

2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG **26**

3. METHODEN **28**

3.1. Zellkulturmethoden **28**

3.1.1. Isolierung von $CD133^+$-Zellen aus Nabelschnurblut 28

3.1.2. Aufreinigung von Zytotrophoblasten 29

3.1.3. Isolierung von Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene 30

3.1.4. Kultivierung eukaryontischer Zellen 31

3.1.5. Passagieren von adhärenten Zellen 32

3.1.7. Herstellung von konditioniertem Medium 32

3.2. Molekularbiologische Methoden **32**

3.2.1. RNA-Aufreinigung 32

3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 33

3.2.3. PCR 33

3.2.4. Sequenzierung von PCR-Produkten 36

3.2.5. Protein-Blotting 37
3.3. Methoden zur Phänotypisierung von Zellen (bzw. Gewebe) 42
3.3.1. Phänotypisierung der Zellen mittels FACS 42
3.3.2. Immunhistochemie 46
3.4. Methoden zur Untersuchung von funktionellen Eigenschaften der Zellen 49
3.4.1. Migrationsassay 49
3.4.2. Endotheliale und neuronale Differenzierung der $CD133^+$-Zellen 50
3.4.4. Identifizierung von Endothelzellen durch Färbung mit acetyliertem low density lipoprotein (Dil-Ac-LDL) 50
3.5. *In vitro* Angiogenese-Assays 51
3.5.1. Matrigel-Assay 51
2.5.2. 3D-Sphäroid-Modell 51
3.6. Proliferationsassay 52
3.7. Detektion der Apoptose 53
3.8. Markierung der $CD133^+$-Zellen mit „PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit“ 54
3.9 Statistische Methoden 54

4. MATERIAL 56
4.1. Geräte 56
4.2. Verbrauchsmaterialien 57
4.3. Chemikalien 58
4.4. Kommerzielle Assays und Tests 60
4.5. Antikörper 60
4.6. Zellkulturmedien 61
4.7. Softwarte zur Datenauswertung 61

5. ERGEBNISSE 62
5.1. Untersuchungen von $CD133^+$-Zellen 62
5.1.1. Isolierung und Kultivierung von CD133+-Zellen aus Nabelschnurblut 62
5.1.2. Charakterisierung von $CD133^+$-Zellen 64
5.1.3. Expression von Oct-4 und anderen Pluripotenzmarkern in 65

CD133$^+$-Zellen

5.1.4. Endotheliale und neuronale Differenzierung von CD133$^+$-Zellen 67

5.2. Expression von CD34- und CD31-Rezeptoren auf CD133$^+$-Zellen und Endothelzellen der plazentaren Gefäße 69

5.3. Isolierung und Charakterisierung von Zytotrophoblasten 70

5.4. Einfluss von Zytotrohpoblasten auf die funktionele Eigenschaften der CD133$^+$-Zellen 72

5.4.1. Migration der CD133$^+$-Zellen unter Zugabe von konditioniertem Trohpoblastenmedium 73

5.4.2. Adhäsion der CD133$^+$-Zellen an Trophoblasten 73

5.4.3. Proliferation der CD133$^+$-Zellen unter Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium 74

5.5. Untersuchung der Apoptose von CD133$^+$-Zellen unter dem Einfluss von konditioniertem Trophoblastenmedium 76

5.6. Einfluss von hCG auf CD133$^+$-Zellen 77

5.7. Charakterisierung der CD133$^+$-Zellen während der Kultivierung in konditioniertem Trophoblastenmedium 79

5.7.1. Kultivierung der CD133$^+$-Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium innerhalb von 7 Tage 79

5.7.2. Charakterisierung von differenzierten CD14$^+$CD11b$^+$-Zellen 81

5.7.3. Langzeitkultivierung von CD133$^+$-Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium 82

5.8. CD133$^+$-Zellen und HUVEC-Endothel 84

5.9. 3-D-Sphäroid-Modell zur Untersuchung der plazentaren Vaskulogenese 85

6. DISKUSSION 87

6.1. Plazentarer Angioblast 87

6.2. Interaktion zwischen CD133$^+$-Zellen und Trophoblasten *in vitro* 87

6.2.1. Isolierung und Kultivierung von Trophoblasten 88

6.2.2. Einfluss von Trophoblasten auf CD133$^+$-Zellen 90

6.2.3. Phänotypische Charakterisierung der CD133$^+$-Zellen unter dem Einfluss von Zytotrophoblasten 93

7. ZUSAMMENFASSUNG **101**

8. SUMMARY **103**

9. LITERATURVERZEICHNIS **105**

10. DANKSAGUNG **129**

11. ABKÜRZUNGEN **131**

Lebenslauf **132**

Eigene Publikationen **133**

1. EINLEITUNG

1.1 Menschliche Plazenta

1.1.1 Entwicklung und Aufbau der Plazenta

Die Entwicklung der menschlichen Plazenta beginnt etwa am 4. Tag nach der Befruchtung. Die befruchtete Eizelle befindet sich bereits im Morula-Stadium und hat den Uterus erreicht. Durch das Eindringen der Flüssigkeit aus dem Uteruslumen entsteht innerhalb der Morula ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum. Die Morula wird damit zur Blastozyste. Diese besteht aus zwei voneinander abgrenzbaren Zellarten: eine äußere Zelllage (Trophoblast; spätere Plazenta) und eine innere Zelllage (Embryoblast; späterer Embryo) (Scheuner 1971). Während der Plazentaentwicklung unterscheidet man ein lakunäres Stadium (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 *p.c.* beginnt ihre Implantation in die Uterusschleimhaut. Am Implantationsort kommt es zur Differenzierung von Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast. Der Zytotrophoblast ist mitotisch sehr aktiv und bildet ständig neue Zellen. Durch die Verschmelzung mehrerer Zytotrophoblasten kommt es zur Bildung von Synzytiotrophoblasten. Etwa zwischen dem 8. und 9. Tag *p.c.* treten im verdickten Synzytium des Implantationspols Einschmelzungsherde auf, die sich zu einem kommunizierenden System von Hohlräumen (Lakunen), dem späteren intravillösen Raum, vereinigen. Am 13.-14. Tag *p.c.* entstehen durch die Proliferation des Zytotrophoblasten lokalisierte fingerförmige Zellansammlungen, die in das Synzytium vordringen und damit die primären Zotten bilden. Durch die Einsprossung des extraembryonalen Mesenchyms ab dem 15. Tag *p.c.* differenzieren sie zu Sekundärzotten. Diese sind durch eine verstärkte Bindegewebsproliferation gekennzeichnet. Ende der 3. Schwangerschaftswoche (SSW) dringen die ersten Kapillaren in das Zottenstroma ein, wodurch die sogenannten Tertiärzotten entstehen (Abbildung 1).

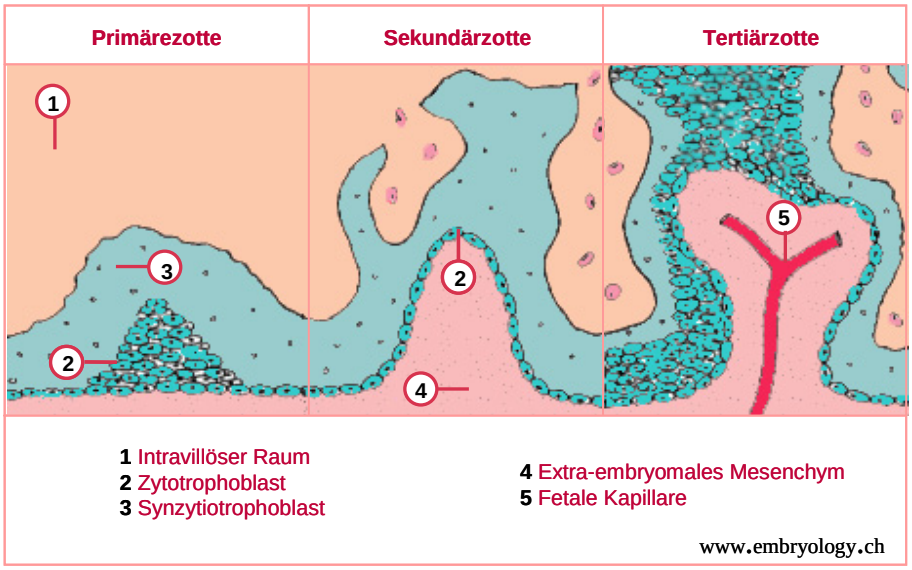


Abbildung 1: Entwicklung der plazentaren Zotten.
Durch Proliferation des Trophoblasten entstehen lokale Zellansammlungen, die in das Synzytium vordringen und damit die Primärzotten bilden. Durch Einsprossung des extraembryonalen Mesenchyms differenzieren Primärzotten zu Sekundärzotten, aus denen sich durch die Ausbildung von ersten Kapillaren aus Angioblasten Tertiärzotten entwickeln. Quelle: www.embryology.ch.

Zytotrophoblastzellen verbreiten sich pilzförmig nach peripher und bilden schließlich eine zusammenhängende Zytotrophoblastenschale, die den Chorionsack im Endometrium verankert.

Am Ende der 4. SSW haben alle plazentaren Zotten das Stadium der Tertiärzotten erreicht. Sie entwickeln sich histologisch und morphologisch weiter in Richtung eines neuen Zottentyps, der besser an die wachsenden embryonalen Bedürfnisse angepasst ist.

Zwischen der 9. und 16. SSW verlängern sich die Tertiärzotten, vernetzen und verändern sich durch Proliferation des terminalen Zottenmesenchyms des Trophoblasten und der fetalen Endothelzellen, um anschließend intermediäre unreife Zotten zu bilden. Letztere generieren ihrerseits Trophoblastknospen, aus denen neue Zotten entstehen. Diese Zotten sind reich an fetalen Gefäßen mit großem Durchmesser. Damit ist eine erhöhte Perfusion gewährleistet.

Ab ca. der 26. SSW entwickeln die Tertiärzotten längere und dünnere Zotten, in denen das fetale Kapillarnetz noch verstärkt wird: es handelt sich um reife intermediäre Zotten, die ihrerseits kleine Vernetzungen bilden. Am Ende der

Schwangerschaft sind in der Plazenta sechs Zotten-Typen von zu finden: Stammzotten, Tertiärzotten, unreife intermediäre Zotten, reife intermediäre Zotten, terminale oder freie Zotten und Trophoblastknospen. Die Stammzotten garantieren eine mechanische Stabilität des Zottenbaums. Die unreifen intermediären Zotten sind der Proliferationsort des Trophoblasten. Tertiärzotten sind verantwortlich für das Längenwachstum des Zottenbaums. Aus den reifen intermediären Zotten entstehen die freien Zotten oder terminalen Zotten mit maximaler fetaler Durchblutung, die 40 % des Volumens und 50 % der Austauschoberfläche der Plazenta vor der Geburt ausmachen.

In der ausgereiften menschlichen Plazenta unterscheidet man zwischen einem fetalen und einem maternalen Anteil (Abbildung 2).

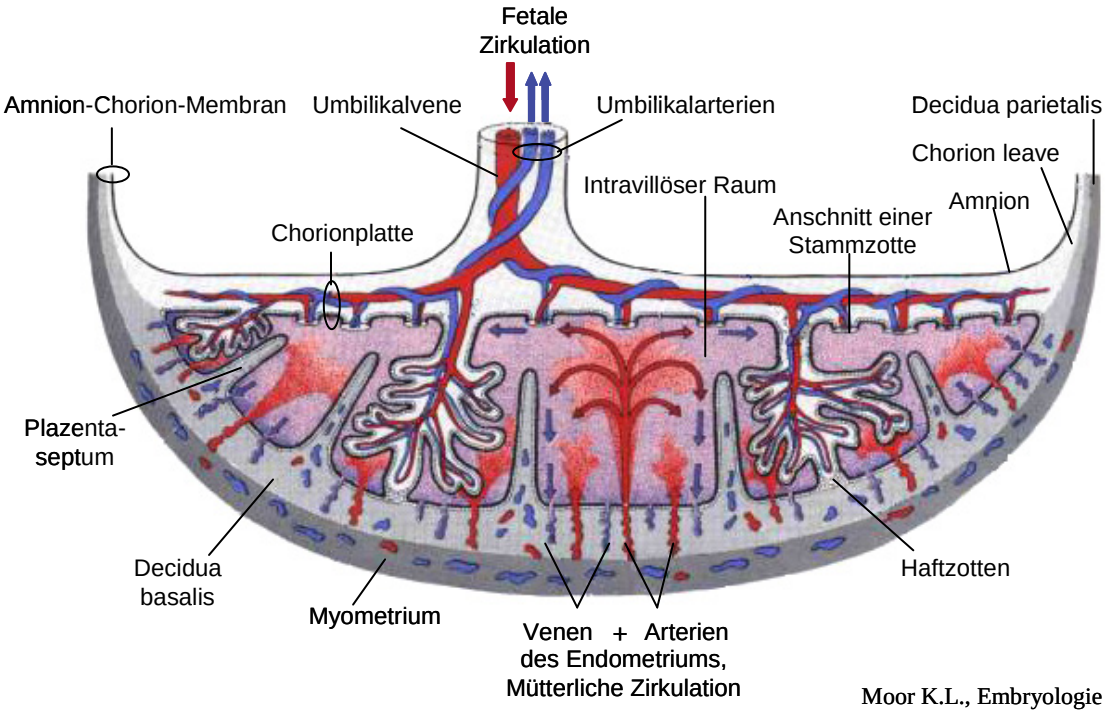


Abbildung 2: Schnitt durch eine reife Plazenta, schematische Darstellung des plazentaren Aufbaues.

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: Moor, 2001.

Der fetale Anteil der Plazenta besteht aus der Choriondeckplatte und den Chorionzotten, die von der Deckplatte entspringen und in die, mit mütterlichem Blut gefüllten intervillösen Räume hineinragen. Der maternale Teil der Plazenta wird von der *Decidua basalis* gebildet, deren kompakte Grenzschicht als Deziduaplatte bezeichnet wird.

Das fetale Blut wird vom mütterlichen durch eine Gewebeschranke getrennt, die als Plazentamembran bezeichnet wird. Im ersten Trimester besteht sie aus den Synzytiotrophoblasten, den Zytotrophoblasten, dem Zottenmesenchym, in dem sich zahlreiche Hofbauer-Zellen befinden, die Eigenschaften von Makrophagen zeigen, und der Wand der fetalen Kapillaren. Während des 4. Monats verschwindet der Zytotrophoblast aus der Zottenwand, die Dicke der Plazentaschranke nimmt ab, während die Oberfläche sich signifikant vergrößert. Gegen Ende der Schwangerschaft erreicht sie eine Fläche von ca. 12 m^2. Gleichzeitig haben sich die fetalen Gefäße vermehrt und der Zottenoberfläche genähert (Abbildung 3).

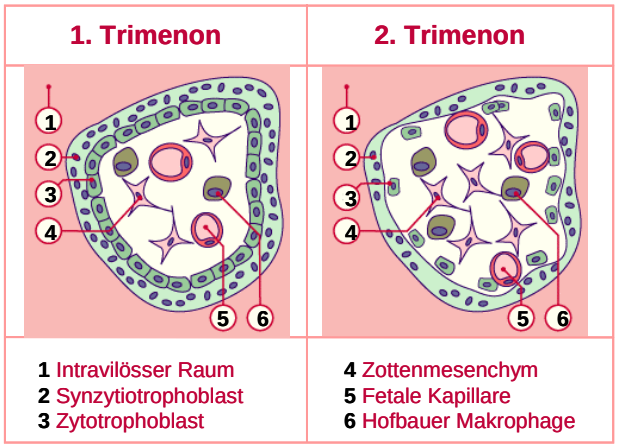


Abbildung 3: Plazentare Gewebeschranke während des 1. und 2. Trimenons.
Im ersten Trimenon besteht die Plazentaschranke aus Synzytiotrophoblasten, Zytotrophoblasten, dem Zottenmesenchym, in dem sich die Hofbauer-Zellen befinden und der Wand der fetalen Kapillaren. Im 2. Trimenon verschwindet der Zytotrophoblast aus der Zottenwand, die Dicke der Schranke nimmt ab. Quelle: www.embryology.ch

Fetaler und maternaler Anteil bilden eine funktionelle Einheit und sorgen für einen differenzierten Stofftransport vom und zum Embryo.

Während sich der Embryo in der ersten Woche durch einfache Diffusion ernährt, braucht er später, wegen seines schnellen Wachstums, ein leistungsfähigeres

Austauschsystem. Dies wird durch die Entwicklung des uteroplazentaren Kreislaufs realisiert.

1.1.2. Entwicklung des vaskulären Systems der Plazenta

Die Entwicklung des Gefäßsystems der Plazenta und dessen uneingeschränkte Funktion erlauben einen adäquaten Gasaustausch, sowie den Transport von Nährstoffen zwischen Mutter und Fetus und sind somit für eine normale embryonale Entwicklung und für das fetale Wachstum von entscheidender Bedeutung. Ein unterentwickeltes plazentares Gefäßsystem ist häufig mit Frühaborten, Restriktion des fetalen Wachstums, hohem Risiko von intrauterinem Fruchttod, hoher perinataler Mortalität und Morbidität (Khong *et al*., 1986; Hill und Han, 1997) sowie, belegt durch epidemiologische Studien, hoher Inzidenz von Hypertonie, Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und Schlaganfällen im Erwachsenenalter assoziiert (Barker *et al*., 1990). Obwohl die Gefäßentwicklung im gesamten Organismus nach ähnlichen molekularen Mustern erfolgt, konnten wichtige organspezifische Modifikationen beobachtet werden. Sie reflektieren die morphologische und funktionale Heterogenität unterschiedlicher Organe und deren spezialisierte Gefäße (Garlanda und Dejana, 1997). Diese Prozesse sind im fetomaternalen System kaum bekannt.

1.1.3. Vaskulogenese und Angiogenese

Der *de novo* Blutgefäßentwicklung liegen zwei verschiedene Mechanismen zugrunde: die Vaskulogenese und die Angiogenese.

Als Vaskulogenese wird ein Zweischrittmechanismus bezeichnet. Er besteht zum einen aus Determination und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Mesoderm, zum anderen aus der Organisation eines neuen primitiven vaskulären Gefäßgeflechtes (Flamme *et al*., 1997).

Die Vaskulogenese beginnt damit, dass Mesenchymzellen zu Angioblasten werden und sich zu Zellhaufen und Zellsträngen, sogenannten Blutinseln gruppieren (Abbildung 4). Die Zellen der Blutinseln lassen sich in einen äußeren und einen inneren mesenchymalen Anteil differenzieren. Aus dem äußeren Anteil gehen die Angioblasten hervor, die für die Bildung von Endothelzellen verantwortlich sind. Der innere Teil liefert die hämatopoetischen Vorläufer (Risau und Flamme, 1995; Wilting

und Christ, 1996). Des Weiteren verschmelzen die benachbarten Blutinseln miteinander und verzweigen sich zum primären Gefäßgeflecht.

Initial entstehen durch den Prozess der Vaskulogenese die extraembryonale Dottersackzirkulation, das primitive Herz und der primäre vaskuläre Plexus innerhalb des Embryos (deMello *et al*., 1997; Robert *et al*., 1998; Gebb und Shannon, 2000; Lammert *et al*., 2001; Matsumoto *et al*., 2001, Vokes und Krieg, 2002; Patan, 2004). Die Plazenta wird von einigen Autoren auch als ein Organ, in dem die Blutgefäßbildung initial durch Vaskulogonese entsteht, genannt (Mayhew *et al*., 2003; Charnock-Jones *et al*., 2002; Kaufmann *et al*., 2004).

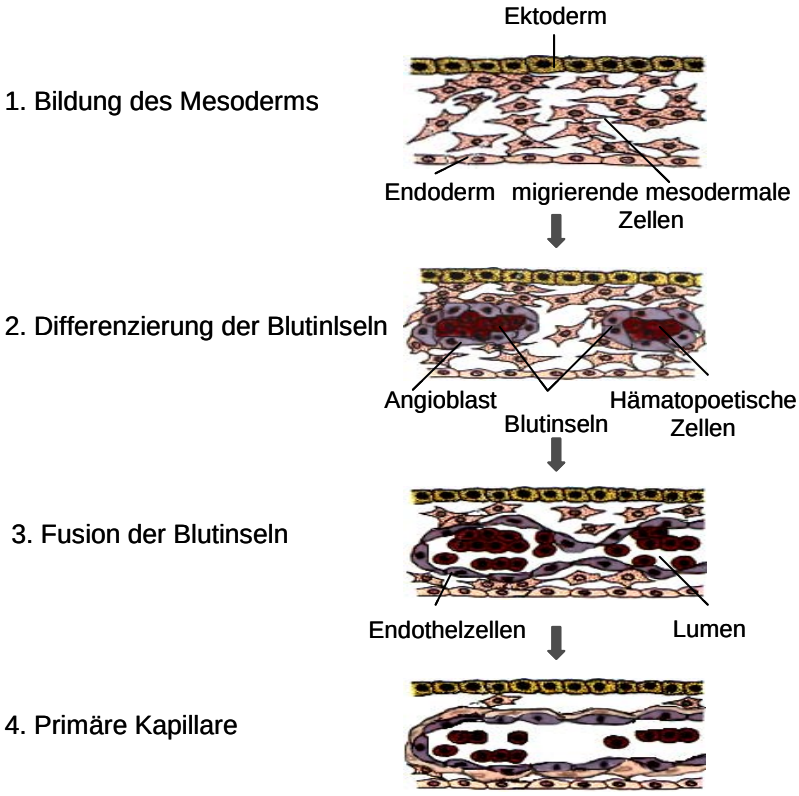


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vaskulogenese.
Die Blutinseln entwickeln sich aus migrierenden und proliferierenden Mesodermzellen. Die äußeren Zellen der Blutinseln, sogenannten Angioblasten, entwickeln sich zu Endothelzellen und die inneren zu hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Blutinseln fusionieren und bilden die ersten Kapillaren. Quelle: Risau und Flamme, 1995.

Die Vergrößerung des embryonalen Gefäßnetzes erfolgt durch Prozesse der Angiogenese: zum einen durch Aussprossung neuer Kapillaren aus schon vorhandenen Gefäßen und zum anderen durch die Verschmelzung dieser Gefäße

mit unabhängig davon entstandenen Gefäßen anderer Regionen (Carmeliet, 2000; Patan, 2000; Moore, 2001).

1.1.4. Plazentares Gefäßsystem

Die publizierten Erkenntnisse der plazentaren Gefäßentwicklung haben einen fast ausschließlich deskriptiven Charakter (Demir *et al*., 1989; Asan *et al*., 1999; Geva *et al*., 2002; Kaufmann *et al*., 2004; Mayhew *et al*., 2004; Charnock-Jones *et al*., 2004). Die plazentare Gefäßbildung beginnt zwischen dem 21. und 32. Tag, im Stadium der Tertiärzotten. Das Zottenstroma ist grobmaschig, mit wenigen retikulären Fasern und Makrophagen (Demir *e .al*., 1989, Kaufmann *et al*., 1985, Kaufmann *et al*., 1988, Castellucci *et al*., 1990). Das frühe Erscheinen der Makrophagen und die Beobachtung, dass diese Zellen angiogene Faktoren exprimieren, läßt an eine parakrine Rolle in der Initiation der Vaskulogenese denken (Ahmed *et al*., 1995; Magness 1998; Krishnamurthy *et al*., 1999; Reynolds und Redmer, 1995; Geva *et al*., 2002). Außerdem ist bekannt, dass Makrophagen selbst in der Lage sind, zu endothelialen Zellen zu differenzieren (Zhao *et al*., 2003).

Etwa am 21. Tag *p.c.* konnten in den Zotten die schnurförmigen Zellstränge, die aus polygonalen CD34-positiven Zellen (Angioblasten) bestehen, immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Herkunft der plazentaren Angioblasten ist umstritten. Als mögliche Quellen werden sowohl das Zottenmesenchym (die Angioblasten bilden sich initial in der Plazenta), das den gleichen Ursprung wie die Blutinseln des Dottersackes zu haben scheint (Enders und King, 1988; Mayhew *et al*., 2003; Charnock-Jones *et al*., 2002; Kaufmann *et al*., 2004), als auch die hämato-poetischen Organe genannt (die Angioblasten wandern aus dem Dottersack, bzw. Chorion oder Haftstiel in das plazentare Mesenchym) (Demir *et al*., 1989; Kingdom, 2000; Demir *et al*., 2004). Die Angioblasten zeigen am Anfang noch keine zelluläre Verbindung zueinander. Der schmale interzelluläre Raum durch Desmosomen oder „tight junctions“ verbunden. Diese Zellansammlungen sind von mesenchymalen Zellen, die oft auch selbst in die Inseln integriert sind, umgeben (Kaufmann *et al*., 2003; Ahmed *et al*., 2003). Durch Vergrößerung der interzellulären Spalte kommt es zur der Formation von mit Endothel ausgekleideten Tuben (primitive Kapillaren). Die Wand der primitiven Kapillaren wird später durch Perizyten stabilisiert. Die Zottengefäße anastomosieren mit den Gefäßen von Chorion und Haftstiel. Damit wird der Kreislauf zwischen Plazenta und Embryo geschlossen. Am Anfang der 5.

SSW sind zum ersten Mal Erythrozyten in noch unreifen Gefäßen darstellbar. Die Entwicklung neuer Gefäße aus Angioblasten kann bis in die 10. und 12. SSW beobachtet werden. Zwischen der 13. und 20. SSW findet ein Umbau und die Ausreifung des villösen Gefäßsystems statt. Jenseits der 20. SSW konnte die Neuentwicklung von Kapillaren nur sporadisch beobachtet werden (Demir *et al*., 1989; Asan *et al*., 1999).

Die plazentare Zirkulation verbindet zwei Kreisläufe: den mütterlichen und den fetalen. Das embryonale Blut fließt in den Zottengefäßen, die vom mütterlichen Blut der intravillösen Räume durch die Plazentaschranke getrennt sind. Die Zottengefäße sind mit den Nabelgefäßen verbunden. Das Blut wird über zwei Nabelschnurarterien in die Zotten geführt und verlässt diese über eine einzige Nabelvene. Das mütterliche Blut gelangt über die Spiralarterien, die aus den *Arteriae uterinae* kommen, und verlässt die intravillösen Räume anschließend über die uterinen Venen.

1.1.5. Molekulare Mediatoren der Zell-Zell-Interaktionen während der Gefäßbildung in der Plazenta

Die Plazenta und insbesondere der Trophoblast, stellen reichhaltige Quellen einer Vielzahl von ubiquitär sowie, gewebespezifisch fungierender Angiogenesefaktoren dar, die an der Differenzierung der Angioblasten beteiligt sein können. Die Expression dieser Faktoren wird in Krankheitsbildern, die mit einer gestörten Gefäßneubildung einhergehen, wie Präklampsie oder intrauteriner Wachstumsredardierung, pathologisch verändert (Kingdom *et al*., 2000).

Die Angiogenesefaktoren werden in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsstadium in variierenden Konzentrationen und von verschiedenen Zelltypen exprimiert. Den publizierten Befunden zur VEGF-Familie kann entnommen werden, dass VEGF-A im 1. Trimenon im villösen Zyto- und Synzytiotrophoblasten, sowie während der gesamten Schwangerschaft im extravillösen Trophoblasten exprimiert wird. Die VEGF-A Expression im extravillösen Trophoblasten, nimmt im Laufe der Schwangerschaft zu Gunsten der Expression in plazentaren Makrophagen ab (Sharkey *et al*., 1993; Shiraishi *et al*., 1996; Geva *et al*., 2002, Demir *et al*., 2004). Die Expression in fetalen Endothelzellen ist erwartungsgemäß gering. Diese sind jedoch Orte hoher VEGFR-2 (KDR/flk-1) Konzentration, während VEGFR-1 (Flt-1) verstärkt auf Zyto- und Synzytiotrophoblast und im 1. Trimenon auf $CD34^+$-Zellen innerhalb des Zottenstromas detektiert wird (Geva *et al*., 2002).

Der Plazentawachstumsfaktor (PlGF) nimmt sowohl autokrinen als auch parakrinen Einfluss auf die plazentare Gefäßneubildung. Dies geschieht zum einen durch parallele Expression von PlGF und VEGFR-1 in Trophoblastenzellen und zum anderen durch die Expression von PlGF in fetalen Gefäßen der Stammzotten (Khaliq *et al*., 1996; Torry *et al*., 2004). Die Wirkung der VEGF-Familie wird durch die Expression der Angiopoetine ergänzt und moduliert. Angiopoetin-2 (Ang-2) im Gegensatz zu Angiopoetin-1 (Ang-1), wird in hohen Konzentrationen im Synzytiotrophoblasten während des 1. und 2. Trimenons exprimiert. Die Synthese von „destabilisierendem" Ang-2 nimmt im 3. Trimenon signifikant ab, wohingegen die Expression von „stabilisierendem" Ang-1 zunimmt. Dies erlaubt die weitere Maturierung von Blutbahnen und einen Übergang von der verzweigten zur unverzweigten Angiogenese (Geva *et al*., 2002). Die Expression von bFGF ist auf Regionen starken Plazentawachstums wie dem Stroma sekundärer Zotten und den extravillösen Trophoblasten fokussiert (Mühlhauser *et al*., 1996; Hamai *et al*., 1998).
Die neuesten Untersuchungen zeigten, dass weitere, schwangerschafts- bzw. trophoblastspezifische Faktoren wie hCG, AFP oder IGF-II ebenfalls eine wichtige Rolle bei der vaskulären Morphogenese in der fetomaternalen Einheit spielen können (Zygmunt *et al*., 2002; Herr *et al*., 2003; Liang *et al*., 2004).

1.1.6. Besonderheiten der menschlichen Plazenta.

Obwohl die Plazenta bei allen Mammaliern die gleiche Aufgabe besitzt, zeigt die Anatomie eine hohe zwischenartige Variabilität (Cross *et al*., 1994).
Besonders stark sind die Unterschiede im Aufbau der Plazentaschranke ausgeprägt. Die menschliche Plazenta wird nach dem Aufbau der Plazentaschranke den hämochorialen Plazenten zugeordnet. Bei der hämochorialen Plazenta schwimmen die von Synzytium begrenzten Zotten im mütterlichen Blut. Zum Vergleich konnten die endotheliochoriale (Hund, Katze) oder epitheliochoriale Plazenten (Schwein, Pferd) genannt werden. In der endotheliochorialen Plazenta ist das Gewebe mütterlicherseits auf das Endothel reduziert. Für die epitheliochoriale Plazenta ist typisch, dass das Epithel der mütterlichen Schleimhaut ganz bestehen bleibt. Der Trophoblast lagert sich ihm einfach an.
Auf der fetalen Seite ist also immer fetales Gefäß-endothel, Zottenbindegewebe und Trophoblast vorhanden. Auf der mütterlichen Seite variiert dies. Entweder ist das

ganze uterine Epithel oder nur noch das Endothel der mütterlichen Gefäße intakt oder aber, wie beim Menschen, fehlen beide (Abbildung 5).

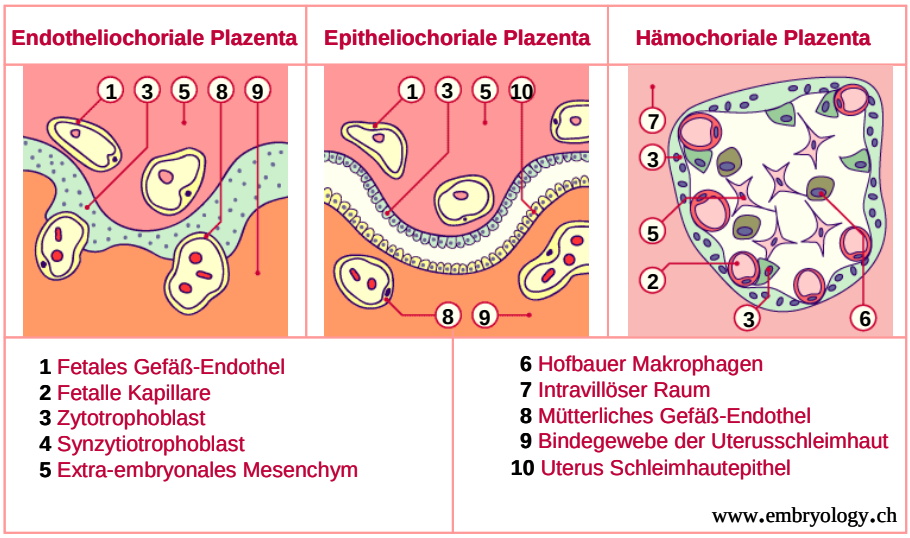


Abbildung 5: Unterschiede im Aufbau der Plazentaschranke.
Bei der endotheliochorialen Plazenta bleibt das Epithel der mütterlichen Schleimhaut ganz bestehen und der Trophoblast lagert sich ihm an. In der endotheliochorialen Plazenta ist das Gewebe mütterlicherseits auf das Endothel reduziert worden. Die hämochoriale Plazenta wird durch das Fehlen der beiden (endoteliale und epitheliale Schicht) Schichten charakterisiert. Quelle: www.embryology.ch.

Die menschliche Plazenta unterscheidet sich von anderen Plazentatypen nicht nur durch anatomische Merkmale, sondern auch durch eine besondere endokrine Funktion. Dazu gehört die Sekretion von zahlreichen Hormonen (z.B.: hCG, PlGF, Östrogene, Progesterone) (Malassine *et al*., 2003). Beispielsweise reguliert hCG nicht nur die Aufrechterhaltung und Umformung des *Corpus luteum*, sondern es hat zusätzlich Einfluss auf die embryonale Gonadenanlage und ist in die autokrine und parakrine Regulation der Differenzierung von Zytotrophoblasten involviert (Shi *et al*., 1993; Yang *et al*., 2003). Außerdem wurde es als neuer angiogener Faktor, der für die normale Implantation und Entwicklung der plazentaren Vaskulatur essentiell ist, definiert (Zygmunt *et al*., 2002; Herr *et al*., 2007).

1.1.7. Modelle zur plazentaren Gefäßbildung

Aufgrund des einzigartigen Aufbaus der humanen Plazenta, sind funktionelle Untersuchungen zur plazentaren Gefäßentwicklung z.B. unter Verwendung von Tiermodellen nur sehr eingeschränkt möglich (Malassine *et al*., 2003).

Zur Untersuchung der Trophoblastendifferenzierung und der Trophoblasteninvasion sind mehrere Modelle bereits etabliert. Die Kultivierung der plazentaren Zottenfragmente in einem speziellen Medium ist über kurze Zeit möglich. Mit Hilfe dieses Modells, konnte die Formation der zytotrophoblastischen Zellknospen und die Differenzierung des extravillösen Trophoblasten untersucht werden (Genbacev *et al*., 1992; Vicovac *et al*., 1995; Caniggia *et al*., 2000). Das Einbringen von Zottenfragmenten oder aufgereinigten Zytotrophoblasten in eine Matrix (z.B.: Matrigel), führt zu einem invasiven Wachstum der Trophoblasten und konnte durch Einsatz von verschiedenen Substanzen beeinflusst werden (Fisher *et al*., 1989; Burrows *et al*., 1993; Bischof *et al*., 1995; Caniggia *et al*., 1997).

Eine langzeitige Kultivierung der Plazentazotten ist nicht möglich. In den letzten Jahren wurde ein Sphäroid-Modell entwickelt, indem Zellsphäroide mit einer definierten Anzahl der Zytotrophoblasten (300-1000 Zellen Sphäroid) eingesetzt wurden. Die Sphäroide konnten bis zu einer Woche in Medium oder in Kollagenmatrix kultiviert werden. Damit wurde ein Trophoblastenmodel zur Langzeituntersuchung der Invasion und Differenzierung der Zytotrophoblasten etabliert (Korff *et al*., 2004).

Die aufgereinigten Zytotrophoblasten bilden bei der Kultivierung auf Plastik Zellaggregate, die aus nicht proliferierenden, multinuklearen, hCG-produzierenden Zellen (Synzytiotrophoblast) bestehen. Solche Kulturen konnten für die Untersuchung der Zell-Zell-Fusion, Regulation der hCG-Produktion und Synzytiotrophoblastausbildung eingesetzt werden (Kliman *et al*., 1986; Alsat *et al*., 1991; Cronier *et al*., 1994; Morrish *et al*., 1998; Malassine und Cronier, 2002).

Zur Untersuchung der Vorgänge der Plazentation, wurde von Red-Horse und Mitarbeitern ein Maus-Modell entwickelt. Es wurden kleine Chorionzottenfragmente die Nierenkapsel der SCID-Mäuse implantiert. Die Trophoblasten wuchsen in benachbarte Mausgefäße ein. In diesem Modell konnte die Invasion von Trophoblasten in einer *in vivo*-ähnlichen Situation untersucht werden (Red-Horse *et al*., 2006). Die Verwendung von embryonalen Stammzellen ermöglichte die Entwicklung von neuen Modellen zur Untersuchung der genomischen Regulation der

Trophoblastendifferenzierung (Schaiff *et al*., 2000; Tarrade *et al*., 2001b; Xu *et al*., 2002).

Um die molekularen Regulationsmechanismen der embryonalen Vaskulo- und Angiogenese zu erforschen, wurden mehrere knock-out-Maus-Modelle entwickelt. Durch das VEGFR-1 knock-out-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass VEGFR-1 eine essentielle Rolle in die Gefäßformation spielt. Die VEGFR-$1^{-/-}$-Mäusen zeigten eine abnormal entwickelte Vaskulatur und starben vor der Geburt (Fong *et al*., 1995). Im VEGFR-$2^{-/-}$-Maus-Modell wurde bewiesen, dass VEGFR-2 nicht nur die Angiogenese, sondern auch die Hämatopoese steuert (Shalaby *et al*., 1995).

Experimentelle Modelle zur plazentaren Gefäßbildung begrenzen sich bislang auf die Untersuchung der Angiogenese durch etablierte Methoden. Bisher wurden Proliferation, Migration, Tuben-Bildung oder Bildung von Kapillaren unter Zugabe von plazentaspezifischen angiogenen Faktoren (hCG, PlGF, AFP) untersucht (Prager *et al*., 2004; Liang *et al*., 2004; Xu *et al*., 2006).

Durch die Etablierung einer Aufreinigungsmethode von humanen plazentaren mikrovaskulatorischen endothelialen Zellen (HPMVEC) wurden die Untersuchungen zur Angiogenese mit plazentaspezifischen Endothelzellen ermöglicht (Herr *et al*., 2007). Allerdings beantworten die oben beschriebenen Modelle die Fragestellung über die Mechanismen der Initialisierung der Vaskulogenese in der Plazenta nicht. Deshalb erscheinen Ko-Kultur-Modelle aus endothelialen Vorläuferzellen und Trophoblasten (bzw. plazentaren Stroma-Zellen oder plazentaren Makrophagen) notwendig. Die Etablierung von entsprechenden, komplexen organähnlichen *in vitro* Ko-Kultur-Modellen ist für die Untersuchung der plazentaren Vaskulogenese von entscheidender Bedeutung.

1.2. Stammzellen

Die Eigenschaft der Stammzellen, ein spezialisiertes Gewebe in physiologischen und pathophysiologischen Situationen zu regenerieren, machen sie einerseits zu einem Modellsystem für entwicklungsbiologische Fragestellungen und andererseits zu einem potenziellen Therapeutikum für Krankheitszustände mit Untergang von körpereigenem Gewebe wie z.B. Myokardinfarkte, Diabetes mellitus Typ I, Morbus Parkinson, Leberzirrhose oder periphere Durchblutungsstörungen (Weissman, 2000).

1.2.1. Definition von Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen , die bei der Zellteilung zwei Tochterzellen produzieren können, von denen eine den Stammzellphänotyp behält und die andere sich in mindestens einen bestimmten Zelltyp differenziert. Durch diese asymmetrische Zellteilung haben Stammzellen die einzigartige Eigenschaft, sich zu differenzieren und gleichzeitig selbst zu erneuern (Raff, 2003).

Die Fähigkeit einer Stammzelle in verschiedene Zelltypen des Körpers zu differenzieren bezeichnet man als Pluripotenz. Man unterscheidet zwischen totipotenten (lat.: „zu allem fähig“), pluripotenten (lat.: „zu vielem fähig) und multipotenten (lat.: „zu mehrerem fähig“) Zellen (Weiss und Orkin, 1996; Wobus, 2001). Totipotente Zellen besitzen die unbegrenzte Kapazität, sich in alle intra- und extraembryonalen Gewebe und in alle postembryonalen Gewebe und Organe zu entwickeln. Pluripotente Zellen dagegen, können sich in alle Zelltypen, bis auf die Zellen der Plazenta differenzieren und damit alleine keinen lebensfähigen Organismus ausbilden. Multipotente Stammzellen sind Zellen mit einem höheren Spezialisierungsgrad, die in Zellen mit einer spezifischen Funktion differenzieren. Je nach Herkunftsort der Stammzellen unterscheidet man embryonale (aus dem Embryo), fetale (aus dem Fetus), Stammzellen aus dem Nabelschnurblut und Stammzellen aus dem erwachsenen Organismus (von Säuglingen, Kindern, Erwachsenen).

1.2.2. Molekulare Marker der Pluripotenz

Die Untersuchungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass die Stammzellen parallel zu ihrer Fähigkeit unterschiedliche Zelltypen zu bilden, auch eine Reihe von Pluripotenzmarkern exprimieren (Saito *et al*., 2004; Bayer *et al*., 2006).

Ein charakteristisches Gen für die Pluripotenz von Stammzellen ist *Oct4*, ein Transkriptionsfaktor der POU-Familie (*Oct 4* oder *Oct 3* oder *Pou5f1*) (Ptashne 1988; Pesce *et al*., 1998; Okamoto *et al*., 1990; Rosner *et al*., 1990; Pesce und Schöler 2001). Die Expression lässt sich in Oozyten, in befruchteten Eizellen, in der inneren Zellmasse der Blastozyste, im primitiven Ektoderm, im Eizylinder und in primordalen Keimzellen nachweisen (Palmieri *et al*., 1994; Schöler *et al*., 1990). *Oct-4* wird auch in kultivierten embryonalen Karzinomzellen und kultivierten embryonalen Keimzellen präsentiert. Differenzierte somatische Zellen zeigen keine Expression von

Oct-4 in vitro sowie auch *in vivo* (Yeom *et al*., 1996; Lenardo *et al*., 1989; Schöler *et al*., 1989).

Die Rolle von *Oct-4* in der Mausembryogenese wurde durch gezielte Gendeletion untersucht. *Oct-4*-defiziente Embryos sterben während der Implantation, da sie unfähig sind, die innere Zellmasse zu bilden (Nichols *et al*., 1998). Embryonale Stammzellen benötigen eine kritische Expressionsrate von *Oct-4* um sich zu erneuern. Ein Expressionsanstieg des *Oct-4*-Gens führt zur Differenzierung in Endoderm und Mesoderm, eine Reduktion führt zu Differenzierung in Trophektoderm (Niwa, *et al*., 2000; Shimozaki *et al*., 2003). Vor kurzem wurde gezeigt, dass *Oct-4* zusammen mit *Nanog* und *Sox-2* mehre Gene, die für die Differenzierung von Stammzellen verantwortlich sind, an- oder abschalten können. Beispielsweise, wird durch dieses Protein das Gen zur Bildung von *FGF-4* reguliert (Boyer *et al*., 2005). *Oct-4* scheint auch bei der Tumorentwicklung als ein Regulator eine wichtige Rolle zu spielen (Gidekel *et al*., 2003; Cheng *et al*., 2004; Hochedlinger *et al*., 2005).

1.2.3. Pluripotente Zellen im Nabelschnurblut

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Nabelschnurblut eine reichhaltige Quelle von pluripotenten Zellen ist. Diese Zellen exprimieren ein spezifisches Oberflächenantigen, das als CD133 bezeichnet wird (Yin *et al*., 1997).

CD133, auch Prominin-1 genannt, wurde auf neuroepithelialen Stammzellen der Maus entdeckt (Weigmann, 1997). Es ist ein glykosyliertes Transmembranprotein mit fünf transmembranen Domänen und einem Molekulargewicht von 120 kDa. Prominin-1 wird auf verschiedenen Typen der Stammzellen exprimiert. Die physiologische Funktion des Rezeptors ist noch nicht eindeutig geklärt. Mutationen des menschlichen Prominin-Gens können zur Degenerierung der Retina führen (Maw *et al*., 2000).

Das CD133-Epitop ist auf VEGF-R2-positiven endothelialen Progenitorzellen vorhanden und wird mit der Differenzierung der Zellen rasch herrunterreguliert (Peichev *et al*., 2000). $CD133^+CD34^+VEGF\text{-}R3^+$ Zellen wurden als Population von lymphatischen Vorläuferzellen definiert (Salven *et al*., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass $CD133^+CD34^+CD3^-$-Zellen aus der fetalen Leber (Hao *et. al*., 2003) und $CD133^+$-Zellen, die aus der Haut stammen (Belicchi *et al*., 2004), in der Lage sind, sich in Neuronen und Astrozyten zu differenzieren. Die zirkulierenden $CD133^+$-Zellen, die *in vitro* fähig sind sich in Myoblasten zu differenzieren, beteiligen

sich an der Regeneration der Skelettmuskulatur im Mausmodell bei der muskulären Dystrophie Typ Duchenne (Torrente *et al*., 2004).

Von der heterogenen $CD133^+$-Zellpopulation sind am besten die hämatopoetischen $CD133^+$-Zellen untersucht. Sie lassen sich mittels spezifischer Erkennung durch CD133-Antikörpern aus Knochenmark, peripherem Blut und Nabelschnurblut isolieren. Der Anteil der $CD133^+$-Zellen im Knochenmark ist gering (ca. 0,2-0,5 %) (de Wynter *et al*., 1998). Da die Menge der $CD133^+$-Zellen im Nabelschnurblut fast um den Faktor 10 höher ist (1-2 %), können Stammzellen aus Nabelschnurblut für therapeutische Zwecke genutzt werden.

Nabelschnurblutstammzellen wurden 1988 erstmals von der französische Ärztin Eliane Gluckman in Paris medizinisch genutzt, um ein Kind mit Fanconi-Anämie zu behandeln. Seither wurden weltweit mehrere allogene Nabelschnurbluttransplantationen durchgeführt. Der große Vorteil der Nabelschnurbluttransplantation ist das niedrige Risiko für eine „Transplantat-gegen-Wirt-Erkankung“ (Graft-versus-Host Disease [GvHD]), einer der Hauptursachen für die hohe transplantations-assoziierte Morbidität und Mortalität (Wagner *et al*., 1992; Wagner *et al*., 1996; O´Brien *et al*., 2006; Brunstein und Wagner, 2006). Das geringe GvHD-Risiko wird auf den niedrigen Anteil transplantierter T-Zellen und die funktionelle Unreife der fetalen Lymphozyten zurückgeführt (Wang *et al*., 1997; Haque *et al*., 1999; Dick, 1999). Darüber hinaus ist das Nabelschnurblut seltener mit dem Cytomegalie- und anderen Viren belastet, was die Transplantation für den Patienten sicherer macht (Rubinstein *et al*., 1998; Behzad-Behbahani *et al*., 2005). Das Nabelschnurblut wird ohne Risiko für Mutter und Kind nach der Geburt gewonnen und kann durch Tiefkühlkonservierung fast unbegrenzt gelagert werden. Die Nabelschnurblutpräparate stehen als HLA-A und HLA-B-typisierte, qualitativ und quantitativ überprüfte und definierte, tiefkühlgelagerte Transplantate bei Bedarf umgehend zur Verfügung. Dies kann sowohl für die klinische Durchführbarkeit einer Transplantation als auch für den klinischen Erfolg von entscheidender Bedeutung sein.

Nabeschnurblutzellen werden nicht nur bei der Therapie maligner Erkrankungen des Blutes erfolgreich verwendet, sondern es ist auch durch ihr hohes Differenzierungspotential möglich, sie bei der Behandlung anderer Krankheiten einzusetzen. Das Nabelschnurblut enthält eine große Menge von endothelialen Vorläuferzellen und wird dadurch seit einigen Jahren bei der experimentellen Therapie von Gefäßerkrankungen und ischämischen Verletzungen des Herzes

angewendet (Kalka *et al*., 2000; Kewamoto *et al*., 2001; Yang *et al*., 2004; Droetto *et al*., 2004; Leor *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2006). Im Nabeschnurblut wurden Zellen gefunden, die spezifische Marker für β-Zellen des Pankreas exprimieren (Pessina *et al*., 2004). Nach der Transplantation solcher Zellen, konnte in den Inseln diabetischer Mäuse humanes Insulin nachgewiesen werden (Yoshida *et al*., 2005). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Stammzellen aus Nabelschnurblut auch ein Potential für die Therapie des *Diabetes mellitus* in der Zukunft haben können (Koblas *et al*., 2005). Einige Studien zeigen, dass Nabelschnurblutzellen eine Relevanz für die Behandlung von neuronalen Erkrankungen aufweisen (Peterson, 2004; Sanberg *et al*., 2005; Garbuzova-Devis *et al*., 2006). Durch die Transplantation der mononuklearen Zellen aus Nabelschnurblut konnten an Parkinson erkrankte Mäuse geheilt werden (Ende und Chen 2002).

Das Nabelschnurblut wird als Quelle von pluripotenten Stammzellen bereits in der Stammzellforschung breit eingesetzt. Stammzellen aus Nabelschnurblut werden für die klinisch angewandte Forschung sowie auch für die Grundlagenforschung, beispielsweise die Erforschung der Blutgefäßentwicklung verwendet.

1.2.4. Hämangioblast

Die räumliche Nähe von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen legt die Hypothese nahe, dass die beiden Zellarten aus einem gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten, gebildet werden können.

Die Endothelvorläuferzellen (EPC) tragen zum größten Teil dieselben Marker auf der Zelloberfläche wie hämatopoetische Vorläuferzellen. Zudem weisen differenzierte Zellen ebenfalls eine Vielzahl dieser Oberflächenproteine auf. Auf Grund dessen wird angenommen, dass ein gemeinsamer Vorläufer von Blut- und Endothelzellen, der Hämangioblast, existiert (Choi *et al*., 1998; Schatteman und Awad, 2004).

So werden zum Beispiel Tyrosinrezeptorkinasen Tie-2, VEGFR-1 und VEGFR-2 sowohl auf Endothelzellen als auch auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Yano *et al*., 1997) (Abbildung 6).

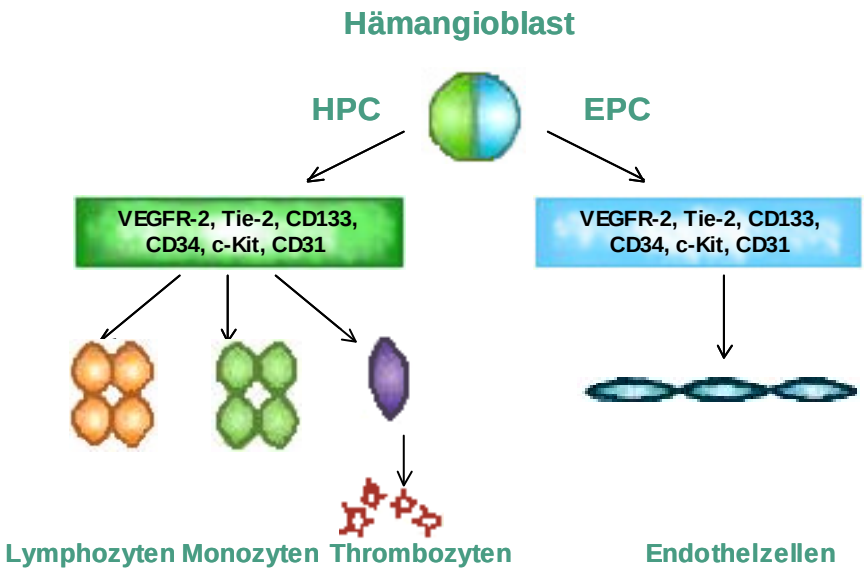


Abbildung 6: Der Hämangioblast als Vorläuferzelle von Endothel- und Blutzellen.

Des Weiteren wird die Existenz des Hämangioblasten durch die Zebrafischmutante *cloche* unterstützt, bei der sowohl die Differenzierung von Endothelzellen, als auch die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, durch eine Deletion des Genes *cloche* verhindert wird (Stainier *et al*., 1995). *In vitro* konnte die These einer gemeinsamen Ursprungszelle durch die Bildung von „embryoid bodies“ aus embryonalen Stammzellen, die während ihrer Differenzierung entstehen, bestätigt werden (Keller, 1995). Bei den „embryoid bodies“ handelt es sich um dreidimensionale Strukturen embryonaler Stammzellen in denen verschiedene Zelltypen, wie neuronale Zellen, Muskelzellen, Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen ausdifferenzieren können (Keller *et al*., 1993; Nakano *et al*., 1994; 1995; Wiles und Keller, 1991). Die Bildung von endothelialen und hämatopoetischen Zellen innerhalb dieser „embryoid bodies“, spiegelt Aspekte der natürlichen Entwicklung im Dottersack wieder. In den „embryoid bodies“ wurde eine bestimmte Zellart die Blastkolonien-bildenden Zellen (BL-CFC) nachgewiesen. Diese exprimieren unter anderem CD34 und VEGFR-2, die sowohl auf hämatopoetischen als auch auf endothelialen Zellen gefunden wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von hämatopoetischen, beziehungsweise endothelialen Wachstumsfaktoren, sowohl hämatopoetische, als auch endotheliale Vorläuferzellen entstehen können (Choi *et al*., 1998; Kennedy *et al*., 1997). Die aus Blastkolonien gebildeten Endothelzellen wurden adhärent, exprimierten charakteristische endotheliale Marker

CD31, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-2 und konnten Dil-Ac-LDL aufnehmen. Die hämatopoetischen Zellen blieben in Suspension und wurden durch die Expression der Gene βH1, β-major und c-fms charakterisiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die hämatopoetischen Zellen und Endothel-Vorläuferzellen in den Blastzellkolonien gleichen Ursprungs sind. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass es sich bei den BL-CFC um Hämangioblasten handelt (Choi *et al*., 1998).

Die ersten Hämangioblasten im menschlichen Embryo differenzieren sich aus extraembryonalem Mesoderm im Dottersack, Haftstiel, Chorion (Moore, 2001) und intraembryonal gelegenen mesodermalen Zellen der AGM-Region (Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region) (Ema und Rossant, 2003).

Unabhängig von ihrem Ursprungsort scheinen sich Hämangioblasten aus dem Mesoderm durch direkte Interaktionen mit Zellen des benachbarten Endoderms zu differenzieren. So konnte im *Xenopus laevis* Modell nach Entfernung des Endoderms gezeigt werden, dass zwar die Expression von vaskulären Markern in Vorläuferzellen weiterhin nachgewiesen werden konnte und die Zugabe von basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) die Differenzierung von Angioblasten induzierte, die Bildung von tubulären Strukturen durch Angioblasten allerdings ausblieb (Vokes und Krieg, 2002). Pardanaud und Dieterelen-Lievere (1999) zeigten zum einen, dass die Induktion der Angioblasten durch das Endoderm vermittelt durch VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A), bFGF (Fibroblast Growth Factor) sowie TGF-β (transforming Growth Factor β-1) positiv und zum anderen durch das Ektoderm vermittelt durch EGF (Epidermal Growth Factor) sowie TGF-β negativ beeinflusst werden kann. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Fibroblasten, im Gegensatz zu ektodermalen Epithelzellen, die okulare Vaskulo- und Angiogenese *in vitro* stimulieren (Ma *et al*., 1999). Deshalb scheinen die Zell-Zell-Interaktionen für die Determination der Hämangioblasten essenziell zu sein.

2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Untersuchungen der molekularen und zellulären Mechanismen der plazentaren Gefäßbildung haben eine besondere Bedeutung für das Verständnis der Entwicklung im der Frühschwangerschaft, sowie der Pathophysiologie von schwangerschafts-assozierten Erkrankungen.

Die Gefäßentwicklung in der Plazenta wird über molekulare Prozesse der Vaskulo- und Angiogenese durch spezifische Wachstums- und Differenzierungsfaktoren reguliert. Die Plazenta und insbesondere der Trophoblast stellen reichhaltige Quellen einer Vielzahl von ubiquitär, sowie gewebespezifisch fungierender Angiogenese-faktoren dar, die an der Differenzierung der Angioblasten beteiligt sein können. In der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, dass der Trophoblast eine entscheidende Rolle als Regulator der Gefäßbildung spielt, und dass seine Wirkung die Bildung villöser Gefäße aus Angioblasten (Vaskulogenese) während der Plazentation (Angiogenese) beeinflusst.

Die Herkunft der plazentaren Angioblasten ist umstritten. $CD133^+$-Zellen wurden zum heutigen Zeitpunkt von mehreren Arbeitsgruppen als Angioblasten im erwachsenen Organismus definiert (Gehling *et al*., 2000; Kalka *et al*., 2000; Peichev *et al*., 2000). In der vorliegender Arbeit sollte geklärt werden, ob $CD133^+$-Zellen aus Nabelschnurblut, als eine mögliche Quelle von plazentaren Angioblasten betrachtet werden können und ob die Interaktion zwischen Zytotrophoblasten und der $CD133^+$-Zellen zur endothelialen Differenzierung der letzteren führen könnte.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sollten die $CD133^+$-Zellen aus Nabelschnurblut aufgereinigt und charakterisiert werden. Um ausreichende Mengen von pluripotenten Stammzellen für die weiteren Experimente zu erreichen, sollten Expansionsbedingungen entwickelt werden, unter denen sichdie $CD133^+$-Zellen ausreichend teilen können und im pluripotenten Zustand erhalten bleiben. Mögliche Interaktionen zwischen $CD133^+$-Zellen und Zytotrophoblasten, sollten durch die Untersuchung der Migration, Proliferation und Adhäsion der $CD133^+$-Zellen, unter Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium durchgeführt werden. Die Differenzierung der $CD133^+$ Zellen unter dem Einfluss von Trophoblasten sollte durch die Expressionsanalyse spezifischer Endothelzell- bzw. Differenzierungsmarker verfolgt werden.

Für die *in vitro* Untersuchungen der Zell-Zell-Interaktionen zwischen $CD133^+$-Zellen und Trophoblasten, sollte ein experimentelles Modell entwickelt werden, in dem die Zellen auf einem Niveau, das physiologisch der *in vivo* Situation entspricht, miteinander interagieren können.

Die folgenden Punkte wurden als Ziel der vorliegenden Arbeit definiert:

1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von $CD133^+$-Zellen aus Nabelschnurblut
2. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Zytotrophoblasten
3. Untersuchungen zur $CD133^+$-Zellen-Trophoblasten-Interaktionen *in vitro*.

3. METHODEN

3.1. Zellkulturmethoden

3.1.1. Isolierung von CD133$^+$-Zellen aus Nabelschnurblut

Für die Entnahme des Nabelschnurblutes wurden Terminplazenten von gesunden Frauen nach Kaiserschnittentbindungen (*Sectio caesarea*) verwendet. Das Nabelschnurblut wurde aus den Plazentargefäßen nach der Abnabelung des Kindes, steril entnommen.

Die Verwendung von Patientenmaterial (Nabelschnurblut, Plazentagewebe) für Forschungszwecke wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Giessen genehmigt. Die Erlaubnis von Patientinnen zur Materialentnahme wurde durch Unterzeichnen des Aufklärungsformulars bestätigt.

Ficoll-Gradient

Für die Separation von mononukleären Zellen aus humanem Nabelschnurblut wurde das Ficollgradient-Verfahren durchgeführt.

Das frisch entnommene heparinisierte Nabelschnurblut wurde 1:4 mit PBS/2mM EDTA verdünnt, auf Ficoll-Paque geschichtet und bei 400g 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellkonzentration bestimmt.

Die Zelltrennung erfolgte mittels magnetischer Zellseparation.

Magnetische Zellseparation (MACS)

Durch die magnetische Zellseparation (engl.: magnetic cell sorting, MACS®) können Zellen aus komplexen Zellgemischen mit hoher Reinheit für weitere Untersuchungen isoliert werden. Bei diesem System werden mit superparamagnetischen Mikropartikeln (ca. 50 nm Durchmesser) konjugierte Antikörper (MACS MicroBeads) verwendet. Die gewünschten Zellen werden durch spezifische Antikörperbindung an MicroBeads markiert und auf eine Trennsäule aufgeschichtet. Die Trennsäule befindet sich zwischen Magnetpolen eines Hochleistungsmagneten. Die markierten Zellen werden in der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen durch Waschen aus der Säule gespült und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Das MACS-System kann zur Anreicherung

(positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) von Zellpopulationen verwendet werden.

Für die Aufreinigung von $CD133^+$-Zellen wurde der CD133 Cell Isolation Kit verwendet. Die aus dem Nabelschnurblut isolierten mononukleären Zellen (maximal 2 x 10^8 Zellen pro Ansatz) wurden mit MACS-Puffer gewaschen und in 300 µl MACS-Puffer (Tabelle 1) aufgenommen, jeweils mit 100 µl Fc-Blocking Reagent und CD133-MicroBeads gut vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die MACS Säule im Magnetfeld mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellen wurden nach der Markierung gewaschen, in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die Säule pipettiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Säule aus dem Magneten entfernt. Die in der Säule gebundenen Zellen wurden mit 1 ml MACS-Puffer aus der Säule eluiert. Die Reinheit der Separation wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

MACS-Puffer	
0,5% BSA 2mM EDTA	2,5 g BSA 2 ml von 0,5M EDTA
bis 500 ml mit PBS auffüllen	

Tabelle 1: MACS-Puffer

3.1.2. Aufreinigung von Zytotrophoblasten

Für die Gewinnung der Zytotrophoblastzellen wurde Material aus legalen Schwanger-schaftsabbrüchen (8.-12. SSW) verwendet.

Das steril entnommene Trophoblastgewebe wurde 2-3mal mit HBSS gewaschen. Nachdem die Chorionzotten mechanisch von der Chorionplatte abgetrennt und zerkleinert waren, wurde ein Trypsin-DNAse-Verdau (modifiziert nach Kliman *et al*., 1986) angesetzt. 2,5% (10x) Trypsin wurde mit HBSS 1:10 verdünnt und mit 10 µg/ml DNAse (2000 Units/mg) versetzt. Ein Verdauvorgang des Trophoblast-gewebes dauerte bei 37°C im Wasserbad 20 min und wurde 2mal wiederholt. Nach jedem Verdauschritt wurde der Überstand gesammelt, durch ein 80 µm Nylon-Sieb filtriert und mit FKS neutralisiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1500 U/min wurde das Zellpellet in MACS Puffer aufgenommen und die Zellkonzentration bestimmt. Die magnetische Zellseparation wurde nach dem im Kapitel 3.1.1. beschriebenen Protokoll unter Verwendung von CD326-Beads vorgenommen. Die isolierten Zellen wurden in AmnioMax^{TM}-100 Medium aufgenommen und in einer

Kulturflasche 3 Tage bei 37 °C, 5% CO_2 kultiviert. Nach 3 Tagen wurden nicht angewachsene Zellen durch Waschen entfernt. Die Zellen wurden mit frischem Medium versetzt und weiter kultiviert. Die negative Fraktion ($CD326^-$-Zellen, plazentare Fibroblasten) wurde ebenfalls in AmnioMax^{TM}-100 Medium kultiviert.

3.1.3. Isolierung von Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene

Die Isolierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) erfolgte in Anlehnung an die von Jaffe (Jaffe *et al*., 1973) beschriebene Methode mit geringfügigen Modifikationen.

Die Nabelschnur wurde zunächst von Blutresten gesäubert. In ein Ende der Nabelschnur wurde ein Katheter in die Nabelschnurvene eingeführt und die Vene mit Hilfe einer Perfusionsspritze mit 50 ml PBS durchgespült. Anschließend wurde das PBS ausgestreift und das untere Ende der Nabelschnur mit einer Klemme verschlossen. Die Vene wurde durch den Katheter mit auf 37°C vorgewärmter Kollagenase-Lösung (Tabelle 2) prall gefüllt und das andere Ende der Nabelschnur ebenfalls mit einer Klemme verschlossen.

Kollagenase-Lösung	
1 g (200-265 U/ml) Kollagenase	1000 ml HBSS mit Ca/Mg
Endkonzentration: 1 mg/ml (entspricht 200-265 U/ml) aliquotieren und bei -20°C lagern	

Tabelle 2: Kollagenase-Lösung

Die mit der Kollagenase-Lösung gefüllte Nabelschnur wurde nun in einer sterilen Schale 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenase-Lösung mit den abgelösten Zellen mit serumhaltigem PBS ausgespült. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert und in EBM-MV2-Medium mit Wachstumsfaktoren resuspendiert. Nach 24 Stunden Kultivierungszeit wurde das Medium gewechselt, um Erythrozyten und nicht angewachsenen Zellen zu entfernen. HUVEC wurden bis zur 7. Passage verwendet.

3.1.4. Kultivierung eukaryontischer Zellen

CD133$^+$-Zellen wurden nach der Aufreinigung aus Nabelschnurblut in IMDM Medium (ohne Phenolrot) mit 10% FKS und den Wachstumsfaktoren: 50 ng/ml FLT3L, 20 ng/ml SCF (Stem Cell Factor), 10 ng/ml TPO (Trombopoetin) und einer 2% antibiotischen Lösung (Endkonzentration: 200 U/ml Penicillin, 0,2 mg/ml Streptomycin) in 12,5 cm^2 Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte kultiviert. Für den Mediumwechsel wurden die Zellen aus der Flasche abpipettiert, 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert, mit frischem Medium resuspendiert und in eine neue Flasche transferiert.

Bei der Kultivierung im konditionierten Trophoblastenmedium wurde das Medium mit Wachstumsfaktoren nach 7 Tagen durch Trophoblastenmedium mit 1% FKS ersetzt. Die Zellen wurden 3 bis 7 Tage weiter kultiviert.

Zur Langzeitkultivierung wurden CD133$^+$-Zellen 4 Wochen in konditioniertem Trophoblastenmedium kultiviert. Nach der vierten Woche wurden CD133$^+$-Zellen aus dem konditionierten Medium abpipettiert und weitere 1 bis 2 Tage in IMDM-Medium (1% FKS) kultiviert.

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurden nach der Isolierung in EBM-MV2 Medium (ohne Phenol rot) mit 20% FKS und Supplement Pack/Endothelial Cell Growth Medium MV2 bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte in den Passagen eins bis sieben in 75-cm^2- bzw. 150-cm^2-Zellkulturflaschen kultiviert. **Zytotrophoblasten (Syn. Trophoblasten) aus der Plazenta** wurden nach der Isolierung mit AmnioMax^{TM}-100 Medium in eine Zellkulturflasche (12,5 cm^2) gesetzt. Am dritten Kultivierungstag wurden Erythrozyten und nicht angewachsene Zellen entfernt. Die adhärenten Zellen wurden mit PBS gewaschen und in AmnioMax^{TM}-100 Medium kultiviert. Für die Experimente wurden Zytotrophoblasten bis zur 6. Passage verwendet. Das Umsetzen der Zellen erfolgte nach der in Kapitel 3.1.5 beschrie-benen Methode.

Plazentare Stroma-Zellen (CD326$^-$-Zellen, plazentare Fibroblasten) wurden in AmnioMax^{TM}-100 Medium kultiviert. Die Umsetzung der Zellen erfolgte durch Trypsin (Kapitel 3.1.5.) maximal bis zur 6. Passage.

P-19 (DSMZ) eine murine embryonale Karzinom-Zelllinie wurde in alpha-MEM mit 10% FKS bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren wurde wie in Kapitel 3.1.5. beschrieben, Trypsin verwendet.

3.1.5. Passagieren von adhärenten Zellen

Zum Passagieren wurden konfluente Monolayer nach Entfernung des Mediums mit PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{+} gewaschen, um Mediumüberreste zu entfernen und Zell-Zellkontakte aufzulösen, da PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{+} die Funktion von Ca^{2+}-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen wie Cadherinen und Selektinen einschränkt. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch 5minütige Inkubation bei 37°C mit einer Trypsin/EDTA-Lösung. Anschließend wurden die Zellen in MEM Medium, supplementiert mit 10% FKS (fetalem Kälberserum), aufgenommen und 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

3.1.6. Herstellung von konditioniertem Medium

Die Zellen wurden in 150 cm^2 Flaschen (1 x 10^6 pro Flasche) in Kulturmedium (Kapitel 3.1.4) ausgesät und 2-3 Tage kultiviert. Als die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreichten, wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Herstellung von konditioniertem Medium wurde phenolrotfreies IMDM-Medium verwendet. Die Zellen wurden in 12 ml IMDM Medium versetzt mit 1% FKS und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin), pro Flasche gegeben und 12 h kultiviert. Anschließend wurde das Medium aus den Flaschen zusammengefügt, 15 min bei 400g, 4°C zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert (max. 4 Monate).

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. RNA-Aufreinigung

RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits aufgereinigt. Das Prinzip des Rneasy Kits beruht auf der Kombination von selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik.

Die aufgereinigten Zellen oder Zellen aus der Kultur wurden mit PBS gewaschen und in Lysis-Puffer aufgenommen. Der Lysis-Puffer enthielt β-Mercaptoethanol GITC

(Guanidiniumisothiocyanat) als Reduktionsmittel zur reversiblen Inaktivierung von RNasen. Die Zellysate wurde in QIAshredder Spin Colums bei 2minutiger Zentrifugation (13 000 U/min) homogenisiert. Die homogenisierten Lysate wurden nach dem Versetzen mit Ethanol auf RNeasy Mini Spin Colums pipettiert. Mögliche DNA-Reste wurden durch Verdau mit RNase-freier DNase eliminiert. Die anschließende Eluierung erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt.

3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren), wobei zur Überprüfung der Reinheit jeweils Quotienten der Extinktionen (260nm : 280nm) gebildet wurden. Ein Quotient von 1,8 charakterisiert eine reine DNA-Lösung, 2,0 eine reine RNA-Lösung.
Für die Konzentrationsberechnung von Nukleinsäuren gilt folgende Gleichung:

$$C(\mu g/ml) = OD_{260nm} \times N \times f$$

c = Konzentration der Nukleinsäure-Lösung
OD_{260nm} = optische Dichte gemessen bei 260 nm
N = Eichfaktor: 50 bei dsDNA, 40 bei ssRNA
f = Verdünnungsfaktor

3.2.3. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988). Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einsträngigen Nukleinsäure-Matrize.
Matrize der PCR ist DNA. Diese kann aus rekombinanter DNA in verschiedenen Vektoren, genomischer DNA und umgeschriebene cDNA aus RNA bestehen. Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgt mittels reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR).
Die RT-PCR beginnt mit einer cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Das PCR Produkt wird anschließend durch Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt. Die aufgrund des Phosphatgerüstes negativ geladene DNA lässt sich im elektrischen Feld einer Agarosegelmatrix gemäß ihres Molekulargewichtes auftrennen. Die Anfärbung des

Gels erfolg durch Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr). Da EtBr durch UV-Strahlung (245 nm) angeregt wird, ermöglicht es die indirekte Visualisierung der DNA.

Durchführung

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde mit SuperScript II Reverse Transkriptase Kit und Random Primers durchgeführt. 5 µg gesamte RNA und 1 µl Random Primers wurden bei 70°C 10 min in der PCR-Maschine für die Primer-Hybridisierung inkubiert. Nach der Primer-Hybridisierung wurde das Reaktionsgefäß kurz auf Eis gestellt und mit 8 µl Master Mix, das aus 5x first Strand Buffer 0.1M DTT und 0.1mM dNTP Mix besteht, versetzt. Nach zweiminütiger Inkubation bei 42°C wurde SuperScript Reverse Transkriptase zugegeben und für 50 min bei 42°C in die PCR-Maschine gestellt. Eine anschließende 15minutige Inkubation bei 70°C beendet die RT-Reaktion.

Die PCR wurde mit AccuPrime *Taq* DNA Polymerase System durchgeführt. 1 µl (entspricht 200 ng cDNA) cDNA-Reaktion wurde mit PCR-Komponenten (Tabelle 4) in einem PCR-Gefäß pipettiert. Für jedes Primerpaar wurde ein entsprechendes PCR-Programm ausgewählt (Tabelle 5) und durchgeführt.

Komponenten	50 µl Ansatz
10x AccuPrime PCR Buffer*	5 µl
Primer 1 (10µM)	1 µl
Primer 2 (10µM)	1 µl
Template cDNA **	X µl
Accu Prime *Taq* Polymerase	1 µl
H_2O	Bis 50 µl
* Buffer I für cDNA <200bp, Buffer II für cDNA 200-4000bp ** enspricht 200 ng cDNA	

Tabelle 4: PCR Pipettierschema

Die Primer Sequenzen wurden entweder der Literatur entnommen oder mit dem Primer Design Programm von BioTools @ UMass Medical School hergestellt (Tabelle 5). Als Positivkontrolle wurde bei jeder Probe die Expression von des „house-keeping“-Gens β-actin überprüft.

Primer	Sequenz	Annealing Tmp
OCT-4 F OCT-4 B	5´-GGGCTCGAGAAGGATGTGGT-3´ 5´-GGGCTCCCATAGCCTGGG-3´	T=55°C Produktgröße: 181 bp
SOX1 F SOX1 B	5´-CTCACTTTCCTCCGCGTTGCTTCC-3´ 5´-TGCCCTGGTCTTTGTCCTTCATCC-3´	T=58°C Produktgröße: 848 bp
SOX2 F SOX2 B	5´-CCCCCGGCGGCAATAGCA-3´ 5´-TCGGCGCCGGGGAGATACAT-3´	T=60°C Produktgröße: 448 bp
REX1 F REX1 B	5´-GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA-3´ 5´-CAGCATCCTAAACAGCTCGCAGAAT-3´	T=56°C Produktgröße: 306 bp
HCGR F HCGR B	5´-GGAAACCACTCTCTCACAAGT -3´ 5´- GGTGGATTGAGAAGGCTTATTTG -3	T=54°C Produktgröße: 474 bp
β-Actin F β-Actin B	5´-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3´ 5´-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3´	T=54°C-58°C Produktgröße: bp 800

Tabelle 5: Primer Sequenzen

Zur Überprüfung der generierten PCR-Produkte wurden die PCR-Ansätze auf einem 1%igen bis 2%igen Agarosegel zur Separierung von DNA-Molekülen aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer aufgelöst, der ebenfalls als Laufpuffer diente (Tabelle 6).

50x TAE-Puffer	1x TAE-Puffer
242 g Tris Base 57 ml Essigsäure 100 ml von 0,5M EDTA bis 1000 ml mit ddH_2O	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA

Tabelle 6: Tris-Acetat-EDTA Puffer

Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid (EtBr, Endkonzentration: 0,3 ng/ml) zugegeben, das in die DNA interkaliert. Zur Beurteilung der Fragmentlänge wurde ein Standard-Molekulargrößenmarker (100 bp DNA Gene Ruler Ladder) im Gel mitgeführt. Zur Beschickung des Gels wurden 10 µl der jeweiligen PCR-Ansätze mit 2 µl Gel-Lade-Puffer versetzt (6x Loading Dye Puffer) und in die Kammern des Agarosegels pipettiert. Anschließend wurde das Gel mit dem QantatiOwn Programm analysiert.

Um die amplifizierten Gene genauer zu identifizieren, wurde die PCR-Produkte sequenziert.

3.2.4. Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde von der Sequence Laboratories GmbH (Göttingen, www.SEQLAB.de) durchgeführt.

Für die Sequenzierung wurden 3 µg (200 ng/µl) Plasmid DNA verwendet. Um die entsprechende Menge zu erreichen wurde ein Klonierungsverfahren durchgeführt.

Hierbei wird die spezifische DNA (Insert) in einen Vektor eingebaut (Ligation), der in Bakterien eingeschleust wird (Transformation), um auf diese Weise vermehrt zu werden. Zur Ligation wurde der pGEM®-TEasy-Vektor verwendet. Dieser Vektor enthält Basensequenzen häufiger Restriktionsendonukleasen, ein Ampicillin-Resistenz-Gen und das für ß-Galactosidase kodierende lacZ-Gen. Bakterien, die dieses Plasmid enthalten, exprimieren das Enzym ß-Galactosidase, welches galactosidische Bindungen spaltet und einen blauen Farbstoff bildet. Das lacZ-Gen wird nur exprimiert, wenn kein DNA-Insert dieses Gen unterbricht. Weiße Kolonien enthalten daher das gewünschte Klonierungsprodukt.

Die PCR-Produkte wurden aus den Agarosegelen ausgestanzt und mit dem MinElute™ Gel Extraktions Kit nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt.

Ein aufgereinigtes DNA-Fragment, wurde mit T4 DNA Ligase dem Vektor eingebaut. Die Ligationsreaktion wurde nach dem Herstellerprotokoll bei 4°C über Nacht angesetzt. Für die Klonierung wurden kompetente E.coli (Stamm JM109) verwendet. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl Bakterien gegeben, 20 min auf Eis inkubiert und 50 Sekunden mit Hitze (42°C) behandelt. Direkt nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien in 1 ml SOC Medium transferiert und 1 h bei 37°C im Rotationshaker (200 U/min) inkubiert. 100 µl der Bakterienkultur wurden auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal (Tabelle 7) verteilt und anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

IPTG induziert die Expression über den lac-Promotor. X-Gal ist ein Substrat für ß-Galactosidase. Ampicillin verhindert das Wachstum von Bakterien, die kein Ampicillin-Resistenz kodierendes Plasmid enthalten. Die mit der Bakterienlösung ausgestrichenen Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Da die Bakterien ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthalten, können sie sich auf den Agar-Platten vermehren. Am nächsten Tag wurden mehrere weiße Kolonien einzeln gepickt und in 3ml LB-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert.

Zusammensetzung der Agar-Platten
10 Trypton 5 g Hefe-Extrakt 15 g Agar 5g NaCl 20 ml 1M NaOH bis 1 L ddH_2O bei 120°C autoklavieren bis 50°C abkühlen und 100 µg/ml Anpicillin ansetzen 35 ml in die Petrischale gießen
100 µl von 100mM IPTG 20 µl von 50mg/ml X-Gal auf der Agar-Platte verteilen 30 min bei 37°C trocken
Bakterien aussähen

Tabelle 7: LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal Platten

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits nach dem Protokoll des Herstellers.

Zur Kontrolle der hergestellten Plasmide wurde ein Probeverdau mit dem Restriktionsenzym Not-I durchgeführt. Not-I schneidet beiderseits des Inserts in den multiplen Kloning-Regionen des pGem®-TEasy-Vektors. Die erhaltenen Fragmente wurden in einem 1,6% Agarose-Gel aufgetrennt und analysiert.

Anschließend wurde die Plasmidkonzentration spektrophotometrisch gemessen und auf die benötige Konzentration (3µg (200µg/µl)) eingestellt.

Die von SEQLAB bestimmten Sequenzen wurden mit Hilfe der „BLAST“-Daten Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) identifiziert und mit beschriebenen Sequenzen verglichen. Der Vergleich zwischen einem sequenzierten Produkt und einem Gen aus der Datenbank wurde bei einer Ähnlichkeit über 99.9% als „identisch“ anerkannt.

3.2.5. Protein-Blotting

Als **Western Blot** bezeichnet man den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, welche anschließend anhand von unterschiedlichen Reaktionen nachgewiesen werden können.

Probenvorbereitung

Proteinaufreinigung: zur Isolierung nukleärer Extrakte wurden Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach der zweiten Zentrifugation (3500 U/min, 5 min, 4°C) wurde das PBS durch 500 µl Puffer A (ohne Detergenz) ersetzt und die Zellen durch

10 Sekunden Zentrifugation bei 13 000 U/min als Pellet gesammelt. Das Pellet wurde, je nach Zelltyp (Tabelle 8) in entsprechenden Volumina von Puffer A mit 0,1%-NP-40 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert.

Zelltyp	Puffer A mit NP-40	Puffer C
mononukleäre Zellen	5 µl pro 10^6 Zellen	10 µl pro 10^6 Zellen
adhärente Zellen (HUVEC, Trophoblasten und Stroma Zellen)	15 µl pro 10^6 Zellen	15 µl pro 10^6 Zellen

Tabelle 8: Volumen von Puffer A und C für die Proteinaufreinigung

Durch Zentrifugation bei 3500 U/min für 8 min bei 4°C wurden Membranen und Zellkerne pellettiert. Der Überstand enthielt zytoplasmatische Proteine, die bei -80°C gelagert werden konnten. Das Pellet wurde in Puffer C aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 14000 U/min und 4°C wurde der nukleäre Proteine enthaltende Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Puffer A und C wurden mit den unten aufgeführten Proteinase-Inhibitoren supplemen-tiert (Tabelle 9).

Puffer A	Puffer C
10mM Hepes pH 7.9 1.5mM $MgCl_2$ 10mM KCl	20mM Hepes pH 7.0 25% Glycerol 420mM NaCl 1.2mM $MgCl_2$ 0.2 EDTA pH 8.0
Proteinasenihibitoren	
PMSF 1mM Pepstatin A 1.0 µg/ml Antipain 2 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin 2.2 µg/ml DTT 1mM	

Tabelle 9: Zusammensetzung von Puffer A und Puffer C mit Proteinaseninhibitoren

Für den Western Blot wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

Proteinbestimmung: Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des C Protein Assays, einer kolorimetrischen Nachweismethode, modifiziert nach Lowry. Proteingruppen der Aminosäuren Tyrosin, Thryptophan, Cystin, Cystein und Histidin reagierten im alkalischen mit Kupfertartrat und gewährleisteten damit einen statistischen Nachweis der Gesamtproteinkonzentration einer Lösung. Das Cu^{+}-komplexierte Protein reduzierte nachfolgend die Folin-Reagenz unter Abgabe einer unterschiedlichen Anzahl von Sauerstoffatomen. Die unterschiedlich reduzierten Moleküle zeigten eine charakteristische Blaufärbung, die spektrophotometrisch bei 650 nm detektiert wurde. Durch die mitgeführte Standardkurve wurde die Proteinkonzentration proportional zur Farbintensität errechnet.

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden 5-10 µg Proteinextrakt mit 3x Proben-puffer (Tabelle 10) gemischt, 3 min bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf SDS-Polyamidacrylgel aufgetragen. Die Volumendifferenz zwischen den unterschied-lichen Ansätzen wurde mit Probenpuffer ausgeglichen.

3x Proben Puffer (100 ml)	
187.5mM Tris-HCl (pH 6.8)	2.27 g
6% SDS	6 g
30% Glycerol	30 ml
150mM DTT	2.3 g
0,3% Bromphenolblau	0.3 g

Tabelle 10: Zusammensetzung von 3x Proben Puffer

Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die Gelelektrophorese verwendet.

SDS-PAGE (**s**odium **d**odecyl**s**ulfate **p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis) ist eine Variante der Gelelektrophorese zur Trennung von Molekülen im elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Polymerisiertes Acrylamid bildet ein engmaschiges Netzwerk, das die Wanderung der sich trennenden Moleküle im elektrischen Feld behindert. Bei der SDS-PAGE Trennung kommt zusätzlich SDS (deutsch: Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. Dieses anionische Detergenz überdeckt die Eigenladungen der Proteine. Bei der Probenvorbereitung wird den Proteinen SDS im Überschuss zugegeben. Die Probe wird anschließend auf 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasser-stoffbrücken und Strecken der Moleküle aufzubrechen.

In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) verwendet.

Die Proben wurden in einem Gesamtvolumen (Proteinextrakte + Proben-Puffer) von 20µl (maximal 40µl) in die Geltaschen pipettiert und aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde Laemmli Puffer angesetzt (siehe unten). Jede Gelbeschickung wurde durch einen Protein Standard Marker komplementiert.
Die Proteine durchliefen zur Konzentrierung bei 80 V zunächst ein Sammelgel (0,5M Tris-HCl pH 6.8, 0,4% SDS), um dann im Trenngel (1,5M Tris-HCl pH 8.8, 0,4% SDS) bei 120 V separiert zu werden.

Elektroblotting (Transfer)

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im elektrischen Feld auf eine Membran mit hoher Proteinbindungskapazität transferiert. Die immobilisierten Proteine konnten danach durch Antikörper analysiert werden (Towbin *et al*., 1979).
Der Proteintransfer vom Polyamidacrylgel auf eine PVDF (Polyvinylidendiflourid)-Membran wurde direkt im Anschluss an die Elektrophorese durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde 15 Sek. in Methanol aktiviert, 2 min in Aqua dest. und mindestens 5 min in Tansfer-Puffer gewaschen. Der Aufbau des Blottes (luftblasenfrei) erfolgte horizontal, nach dem "Sandwich-Prinzip", von der Anode zur Kathode, bestehend aus einem Schwamm, einem Filterpapier, der PVDF-Membran, dem Gel, einem Filterpapier und einem Schwamm. Die Trennung erfolgte im Transferpuffer (siehe unten) bei 45 V über 45 min.

Nachweisreaktion

Nach dem Transfer wurde die Membran vom Gel getrennt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 2stündige Inkubation mit 5% BSA in TBS/Tween bei Raumtemperatur blockiert.
Anschließend wurde die Membran mit spezifischen Primär-Antikörpern über Nacht bei 4°C in BSA/TBS/Tween inkubiert (Tabelle 11). Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschschritte (3 x 10 min) mit TBS/Tween entfernt. Nachfolgende Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper (für 60 min, RT) wurde mit Waschen der Membran abgeschlossen.

Primär-Antikörper					
Epitop	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
OCT-4	Maus IgG_1	9E3	unmarkiert	1:1000	Chemicon
HSP 90	Maus IgG_{2b}	3B6	unmarkiert	1:1000	Abcam
Sekundär-Antikörper					
Anti-MausIgG	Schaf IgG	-	Peroxidase	1:2000	Amersham

Tabelle 11: Western Blot Antikörper

Visualisierung

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem ECL^{MT} Analyse System. Die Membran wurde mit 2 ml ECL Reagenz 2 min im Dunkeln behandelt. Anschließend wurde ein ECL-Hyperfilm auf die Membran gelegt. Die freigesetzte Lichtemission wurde auf dem Film festgehalten. Der Film wurde in Curex Compait Plus Foto-Entwicklermaschine entwickelt.

Gesamtproteinfärbung

Die Effizienz des Blotvorganges wurde mit Coomassie Färbung kontrolliert. Die Membran wurde nach der Nachweisreaktion 1 Stunde in Färbe-Lösung gefärbt. Danach erfolgten Waschschritte in der Entfärbe-Lösung (Tabelle 12) bis der Hintergrund abgewaschen war.

Coomassie Lösung	
Färbe-Lösung	Entfärbe-Lösung
0.04% Brilliant Blau (Coomassie) 40% Methanol 10% Essigsäure mit dd H_2O auffüllen 1-4 h rühren, filtrieren	40% Methanol

Tabelle 12: Coomassie Lösung

Western-Blot Reagenzien

5x Laemmli Puffer		Transfer-Puffer	
25mM Tris 250mM Glycin 0.1% SDS	15,1 g 94,0 g 5,0 g	25mM Tris 129mM Glycin 10 % Methanol	12,11 g 57,65 g 400 ml
mit ddH_2O auf 1 Liter auffüllen pH auf 8.3 einstellen		mit ddH_2O auf 1 Liter auffüllen pH auf 8.3 einstellen	

10x TBS Puffer		Blocking-Puffer	
199mM Tris 1,5M NaCl	24,2 g 80 g	1x TBS 5% BSA 0,1% Tween-20	150 ml 7,5 g 150 µl
mit ddH_2O auf 1 Liter auffüllen pH auf 7.6 einstellen		frisch ansetzen mindestens 15 min rühren	

4x Tris/HCl SDS			
für Sammelgel		für Trenngel	
0,5M Tris 0,4% SDS H_2O	6,05 g 0,4 g 100 ml	1,5mM Tris 0,4% SDS H_2O	18 g 0,4 g 100 ml
pH auf 6.8 einstellen		pH auf 8.8 einstellen	

3.3. Methoden zur Phänotypisierung von Zellen (bzw. Gewebe)

3.3.1. Phänotypisierung der Zellen mittels Durchflußzytometrie

Prinzip der Durchflußzytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse- Flourescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage der FACS-Analyse ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird.

Das Messprinzip beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung (Abbildung 7). Das heißt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Partikel werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Durch Pressluft gelangen die in Suspension vereinzelt und gefärbt vorliegende Partikel in eine Kapillare, aus der sie in die Probenkammer geschleust werden. Ein Hüllstrom aus entgastem Wasser erzeugt in dieser Kapillare mit dem Probenstrom eine laminare Strömung, mit der die Partikel zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf

die Messstelle zugeführt werden. Auf diese Weise wird jeder Partikel einzeln durch die optimale Fokussierungsebene des Objektivs geleitet.

Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge, welches in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Durchflussrate (Partikel/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert.

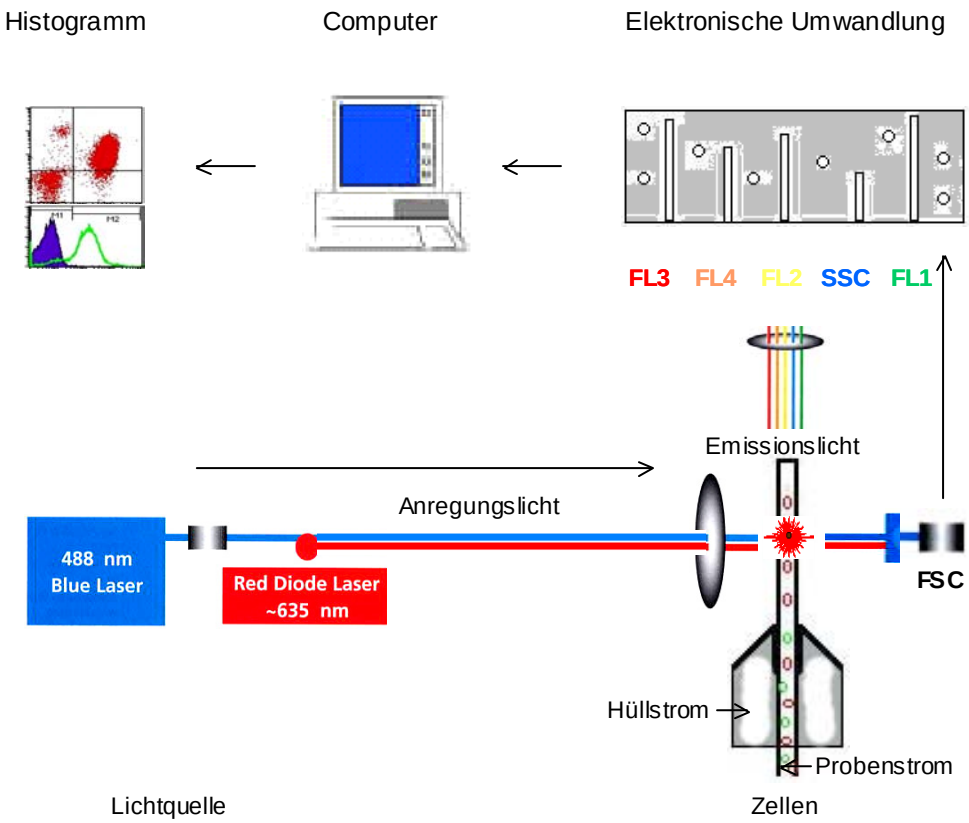


Abbildung 7: Schematische Darstellung der FACS-Messung.
Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden mit dem Probenstrom in die Messzelle geleitet. Der Hüllstrom beschleunigt die Zellen und führt sie einzeln hintereinander in die Mitte des Probenflusses zur Messkapillare (hydrodynamische Fokussierung). Wenn die Zelle die Lichtquelle passiert, wird ein Fluorochrom angeregt und als Emissionslicht zum Photomultiplier geleitet. Das Lichtsignal wird verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der Computer berechnet ankommende Signale und zeigt diese digital an (Histogramm).

In einer Ein-Parameter Darstellung (Histogramm) wird nur ein einzelner Messparameter gegen die Zahl der Ereignisse dargestellt. Eine Punktwolken-

darstellung (Dot Plot) ermöglicht die gleichzeitige Analyse von zwei Parametern. Mit Hilfe des Quadrantenmarkers teilt man das zweiparametrische Plot in vier Sektionen (UL, UR, LL, LR), um darin jeweils nur negative, einzeln positive oder doppelpositive Populationen statistisch zu erfassen (Abbildung 8).

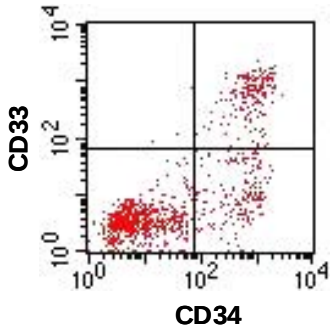


Abbildung 8: Punktwolkendarstellung (Dot Plot).
Der Quadrantenmarker teilt die zweitparametrische Plot in vier Sektionen:
LL-negative Population,
UL-Zellen sind CD33 positiv
LR- Zellen sind CD34 positiv
UR- Zellen sind CD33 und CD34 positiv

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, wenn sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emmissionsspektren verfügen.
Da sich die Emissionsspektren der drei Fluoreszenzen teilweise überschneiden, muss eine Korrektur erfolgen. Dazu verwendet man darauf ausgerichtete Software, die automatisch die spektrale Überlappung korrigiert, indem die spektral überlappenden Fluoreszenzanteile subtrahiert werden.
Furch die Lichtbeugung und Lichtstreuung werden zusätzlich Informationen über die Zellgröße (Vorwärtsstreulicht-FSC) und die Granularität des Zytoplasmas oder der Größe des Zellkerns (Seitwärtsstreulicht-SSC) der Zellen gewonnen (BD Bio-sciences, Training Manual Flow Cytometry, 2001).

Durchführung

Die Suspensionszellen oder adhärenten Zellen wurden nach der Trypsinierung 2-3mal mit PBS gewaschen und gezählt. Die Zellkonzentration wurde für die extrazelluläre Färbung auf 2 x 10^6/ml und für die intrazelluläre Färbung auf 5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt.

Extrazelluläre Färbung

Es wurden 2 x 10^4-Zellen in 100µl PBS pro Röhrchen angesetzt. Zur Blockierung der unspezifischen Antikörperbindung an den Fc-Rezeptoren, wurden die Zellen 15 min mit 10% humanem Serum auf Eis behandelt. Anschließend wurden die spezifischen Antikörper zugegeben (Tabelle 14) und weitere 45 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 2mal mit 2 ml PBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Epitop	Markierung	Färbe-Konz.	µl pro Probe	Firma
Antikörper für extrazelluläre Färbung				
CD11b	PE	2,5 µg/ml	5	BD
CD13	APC	20 µl/10^6Zellen	5	BD
CD14	PerCP	0,25 µg/ml	5	BD
CD31	FITC	20 µl/10^6Zellen	5	BD
CD33	PE	20 µl/10^6Zellen	5	BD
CD34	FITC	2,75 µg/ml	5	Miltenyi
CD45	PerCP	1,25 µg/ml	5	BD
CD117	APC	20 µl/10^6Zellen	1	BD
CD133	PE	2,75 µg/ml	5	Miltenyi
CD140b	PE	20 µl/10^6Zellen	5	BD
CD144	unmarkiert	5 µg/ml	5	BD
Tie-2	PE	4 µg/ml	5	R&D
VEGFR-1	PE	10 µg/ml	1	R&D
VEGFR-2	PR	10 µg/ml	1	R&D
Vimentin	PE	1 µg/10^6Zellen	2,5	SantaCruz
Antikörper für extrazelluläre Färbung				
Cytokeratin-7	FITC	20 µl/10^6Zellen	7	Dako
Pan-Cytokeratin	FITC	20 µl/10^6Zellen	5	BD
vWF	unmarkiert	5 µg/ml	5	BD
Maus IgG_{2a}	FITC	20 µl/10^6Zellen	5	BD
Isotypkontrolle				
Maus IgG_1	PE	20 µl/10^6Zellen	5	BD
Maus IgG_1	PE	4 µg/ml	5	R&D
Maus IgG_1	unmarkiert	5 µg/ml	5	BD
Maus IgG_1	PE	10 µg/ml	1	Myltenyi
Sekundär-Antikörper				
Ziege IgG_1 anti-Maus	APC	1 µg/10^6Zellen	1	BD

Tabelle 14: FACS-Antikörper

Die Proben mit nicht direkt fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern, wurden mit den entsprechenden sekundären Antikörpern 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Bevor die Messung erfolgte, wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 500 µl PBS aufgenommen und im FACS analysiert.

Intrazelluläre Färbung

Um die Färbung von intrazellulären Strukturen zu ermöglichen musste die Zellmembran permeabilisiert und fixiert werden. Dies erfolgte durch die Zugabe einer Formalin/Saponin-haltigen Lösung (Cytofix/Cytoperm). Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 2mal mit Perm/Wash-Puffer gewaschen, in 100 µl Perm/Wash Puffer aufgenommen und wie bei der extrazellulären Färbung weiter gefärbt. Für die Messung wurden die Proben in 500 µl PBS aufgenommen und im FACS analysiert. Um die nukleären Proteine nachzuweisen wurden die Zellen mit Methanol bei -20°C über Nacht permeabilisiert.

3.3.2. Immunhistochemie

Prinzip

Als Immunhistochemie bezeichnet man die Untersuchung von Gewebe mit immunchemischen Methoden, beispielsweise die Anfärbung von Zell- oder Gewebestrukturen mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen.

Dabei unterscheidet man direkte Färbungen, bei der ein primärer Antikörper mit einem Marker gekoppelt ist und indirekte Färbungen, bei der ein, mit dem Marker gekoppelter sekundärer Antikörper, gegen das F_C-Fragment des primären eingesetzt wird. Als Markierung der Antikörper werden entweder Enzyme (Peroxidase, Alkalische Phosphatase) oder Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, PE) verwendet.

Durchführung

Herstellung von unfixierten Gewebeschnitten

Die Gewebestücke (5x5x5 mm) wurden in Tissue-Tek® eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die gefrorenen Gewebeblöcke wurden bei -70°C gelagert. Die 8 µm dicken Schnitte wurden in Kryostat angefertigt und auf SuperFrost Objektträger aufgezogen, 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und gefärbt.

Herstellung von fixierten Gewebeschnitten

Die entnommenen Gewebestücke wurden in Zamboni-Lösung (Tabelle 17) je nach der Präparat-Größe von 8 bis 12 Stunden auf dem Rotationsshaker bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Gewebe wurden mit PBS gewaschen, in Tissue-Tek® Medium angelegt und in Flüssigstickstoff eingefroren. 8 µm dicke Schnitte wurden im Kryostat geschnitten und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf den Objektträgern getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden entweder gleich nach dem Schneiden angefärbt oder für die weiteren Färbungen bei 4°C gelagert.

Herstellung von zytologischen Präparaten

Adhärente Zellen wurden im 8-Chamber-Slide ausgesät. Nachdem die Zellen eine 80%ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Kulturmedium entfernt. Die Zellen wurden 2mal mit PBS gewaschen und 15 min mit Zamboni-Lösung (Tabelle 16) fixiert. Das Waschen mit PBS wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Die Suspensionszellen wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in Zamboni-Lösung aufgenommen. Die Fixierung dauerte 15 min bei Raumtenperatur. Nach der Fixierung wurden Zellen gründlich mit PBS über Nacht bei 4°C gewaschen und anschließend zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer kleinen Menge PBS aufgenommen (ca 1 x 10^6 Zellen pro 10 µl PBS), mit der Pipettenspitze auf dem Super Frost Ultra Plus Objektträger (10 µl pro Objektträger) verteilt, 24 Stunden getrocknet und anschließend angefärbt.

Immunhistochemie mit Labelled (Strept)Avidin-Biotin-Methode (LSAB)

Die Methode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin. Die Biotin-markierten Sekundärantikörper reagieren mit dem Meerrettichperoxidase(HRP)-markierten Streptavidin. Nach Zugabe des Substrates 3,3´-Diaminobenzidin (DAB) entsteht ein gefärbtes unlösliches Produkt. Dadurch wird eine immun-histochemische Färbung visualisiert.

Um die unspezifische Färbung, die durch endogene Peroxidase-Aktivität und zelleigenes Biotin entsteht zu vermeiden, wurden die Präparate 10 min mit 0,03% H_2O_2 und mit Biotin Blocking Kit behandelt. Die unmarkierten Primär-Antikörper wurden in Antikörper-Diluent verdünnt (Tabelle 15) und auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation dauerte 1 Stunde bei RT. Nicht gebundene Antikörper wurden durch das Waschen mit PBS (2x 5 min) entfernt. Die verdünnten Sekundär-Antikörper (Tabelle 15) wurden für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden Präparate 3x 5min mit PBS gewaschen und mit Streptavidin-HRP 7 min bei RT behandelt.

Nach der Zugabe von DAB entwickelte sich eine violett-braune Färbung. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxilin durchgeführt. Nach der Entfärbung mit Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte mit Glycergel abgedeckt und mikroskopisch untersucht.

Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurden Antikörper, die mit einem Fluorochrom gekoppelt sind, verwendet.

Für die Blockierung der unspezifischen Bindung der Antikörper, wurden die Präparate zunächst 10 min bei RT mit 10% Serum/ PBS blockiert. Die Überreste der Blockingreagenz wurden abgetupft.

Epitop	Isotyp	Markierung	Vergünnung	Firma
Primär-Antikörper				
CD31	Maus IgG_1	unmarkiert	1:20	BD
CD34	Maus IgG_1	unmarkiert	1:30	BD
CD68	Maus IgG_1	unmarkiert	1:300	BD
CD117	Maus IgG_1	unmarkiert	1:50	BD
CD326	Maus IgG_1	PE	1:11	Milteniy
Cytokeratin-7	Maus IgG_1	FITC	1:20	Dako
OCT-4	Maus IgG_1	unmarkiert	1:50	Chemicon
anti-β-III-tubulin	Maus IgG_{2a}	unmarkiert	1:300	Chemicon
VEGF-R1	Maus IgG_1	PE	1:10	R&D
VEGFR-2	Maus IgG_1	PE	1:10	R&D
VEGFR-3	Maus IgG_1	PE	1:10	R&D
HCG-R		unmarkiert		geschenkt von Dr. Rao (Indrapichate *et al*., 1992)
Isotyp-Kontrolle				
Maus IgG_1	PE		1:30	Milteniy
Maus IgG_1	unmarkiert		1:50	Chemicon
Maus IgG_{2a}	unmarkiert		1:300	Chemicon
Maus IgG_1	unmarkiert		wie Probe	BD
Sekundär-Antikörper				
Esel IgG_1 anti Maus	Esel	FITC	1:200	dianova
Esel IgG_1 anti Maus	Esel	PE	1:200	dianova
Ziege IgG1 anti Maus	Ziege	PE	1:10	R&D
Ziege IgG1 anti Maus	Ziege	biotinilisiert	1:200	Dako

Tabelle 15: Antikörper und deren Verdünnungen für die Immunhistochemie.

Die Primär-Antikörper (Tabelle 16) wurden in Puffer 1 (Tabelle 17) verdünnt und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Bei der Färbung mit direkt markierten Antikörpern wurden die Schnitte nach diesem Schritt mit Höchst gefärbt und mit ProLong® Medium abgedeckt. Nach den Waschschritten mit PBS (3x 5 min), wurden in Puffer 2 (Tabelle 17) verdünnte Sekundär-Antikörper (Tabelle 15) für 1 Stunde bei RT aufgetragen. Die Entfernung der nicht gebundenen Antikörper erfolgte durch Waschen (2x 5 min). Für die Kernfärbung wurde Höchst-Farbstoff 1:1000 mit Tris pH 7.6 Puffer verdünnt, für 1 min aufgetragen und anschließend mit Leitungswasser abgespült. Auf die Objektträger wurde ProLong® Medium pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert.

Zamboni-Lösung	
Paraformaldehyd gesättigte Pikrinsäure	20 g 150 ml
2 h bei 60°C im Wasserbad schütteln mit 2,5% NaOH neutralisieren (klare Lösung) auf 1 L mit PBS auffüllen	

Tabelle 16: Zamboni-Lösung

Antikörperverdünnungspuffer	
Puffer 1	Puffer 2
1% Blocking Serum 0,1% TritonX-100 PBS	1% Blocking Serum 0,1% TritonX-100 5% Human Serum PBS

Tabelle 17: Antikörperverdünnungspuffer

3.4. Methoden zur Untersuchung von funktionellen Eigenschaften der Zellen

3.4.1. Migrationsassay

Die Migration von $CD133^+$-Zellen wurde mit der modifizierten Boyden-Kammer gemessen. Der Boden der Boyden-Kammer besteht aus einem Polycarbonat-Filter mit 8 µm Poren. Da die Poren wesentlich kleiner sind als die Zellgröße (15-20 µm), können die Zellen den Filter nur passieren, wenn die aktiv wandern (migrieren).

$CD133^+$-Zellen wurden in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml in IMDM-Medium mit 1% FKS/0,25%BSA resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurde in die obere Kammer, die in eine 24-Well Platte eingesetzt worden war, überführt. In die untere Kammer (das Well der 24-Well-Platte) wurde 800 µl Testsubstanz gegeben. Die

Platten wurden 6 Stunden bei 37°C, 5% CO_2 kultiviert. Anschließend wurden die obere Kammer entfernt, die migrierenden Zellen resuspendiert und die Zellkonzentration jedes Wells mit dem Casy Counter bestimmt.

3.4.2. Endotheliale und neuronale Differenzierung der CD133$^+$-Zellen

Die Differenzierung der pluripotenten Stammzellen wird vor allem durch Umgebungsstimuli beeinflusst.

Für die endotheliale Differenzierung wurden CD133$^+$-Zellen in EBM-2 Medium mit VEGF, EGF, bFGF und IGF-1 (kommerzielle Zusammensetzung; Konzentrationen sind nicht angegeben) 3 Wochen kultiviert.

Die neuronale Differenzierung der Stammzellen wurde nach dem Protokoll von Jang mit Kollegen (2004) mit einigen Modifikationen durchgeführt. CD133$^+$-Zellen wurden 7 Tage im IMDM Medium mit 40 ng/ml FLT3-Ligand, 20 ng/ml SCF, 10 ng/ml TPO, einer 2%igen antibiotischen Lösung (Endkonzentration: 200 U/ml Penicillin, 0,2 mg/ml Streptomycin), 10% FKS und 30% Metylzellylose kultiviert. Nach einer Woche wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in alpha-MEM Medium transferiert (10% FKS). Die Zellen wurden mit 10^{-6}M *all-trans*-Retinsäure 7 Tage behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Zamboni-Lösung fixiert.

3.4.4. Identifizierung von Endothelzellen durch Färbung mit acetyliertem low density lipoprotein (Dil-Ac-LDL)

Ein funktioneller Test für endotheliale Zellen ist die Aufnahme von Dil-Ac-LDL (Voyta *et al*., 1984). Hierzu wird acetyliertes LDL verwendet, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil (1,1´-Dioctadecyl-1-3,3,3´,3´-tetramethyl-indocarbocyanin perchlorat) markiert ist. Das Lipoprotein wird von den Endothelzellen endozytotisch aufgenommen und durch lysosomale Enzyme degradiert. Der freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff wird in der lysosomalen Membran angebaut. Die rotfluoreszierende Färbung kann man mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops oder mittels FACS Verfahren detektieren.

Die Zellen wurden 4 Stunden mit 10 µg/ml Dil-Ac-LDL in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop oder im FACS analysiert.

3.5. *In vitro* Angiogenese-Assays

3.5.1. Matrigel-Assay

Die Matrigel™ Basement Membran wird als Substrat (vergleichbar mit der Basalmembran in Gefäßen) für die *in vitro* Studien zur Angiogenese benutzt. Matrigel ist das gelöste Extrakt aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarkom, einem Tumor, der reich an extrazellulärem Matrixprotein ist. Matrigel besteht vor allem aus Laminin. Daneben enthält es Kollagen IV, Heparinsulfat, Proteoglycane, Entactin, FGF, TGF-β, Tissue Plasminogen Aktivator und andere Faktoren, welche in dem EHS-Tumor entstehen. Als Formulierung ist es in DMEM-Medium mit 50 µg/ml Gentamycin gelöst und bleibt bei 4°C flüssig. Eine Erhöhung der Temperatur auf 22-37°C führt zur Polymerisierung des Gels.

Für die Versuche wurde Growth Factor Reduced Matrigel Matrix verwendet, um den Einfluss von Wachstumsfaktoren aus dem Gel auf die Zellen zu reduzieren. Für die Beschichtung von Platten wurde das Dickschicht Verfahren (150-200 µl Matrigel pro 1 cm^2) verwendet.

Matrigel wurde bei -80°C gelagert und vor der Verwendung über Nacht bei 4°C auf Eis aufgetaut. Vor der Beschichtung wurde Matrigel erst mit kaltem IMDM ohne Zusätze 1:2 verdünnt und in Volumina von 50 µl für eine Vertiefung in einer 96-Well Platte und 150 µl für 8-Chamber Slides pro Vertiefung pipettiert. Die Polymerisierung dauerte 1-2 Stunden bei 37°C.

3.5.2. 3D-Sphäroid-Modell

Für die Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen zwischen $CD133^+$-Zellen und Zytotrophoblasten wurde das 3D-Sphäroid-Modell nach Korff (Korff und Augustin, 1998; Korff *et al*., 2004) verwendet.

Sphäroidbildung

Das Monolayer von Zytotrophoblastzellen wurde mit Trypsin abgelöst und 2mal mit PBS gewaschen. Die $CD133^+$-Zellen wurden aus der Kultur genommen und zentrifugiert. Um die verschiedenen Zelltype im Sphäroid zu unterscheiden, wurden entweder $CD133^+$-Zellen oder Trophoblasten mit PKH-26 markiert (Kapitel 3.8.). Nach der Zellzahlbestimmung wurden die $CD133^+$-Zellen und Trophoblasten in bestimmten Konzentrationen (Tabelle 18) zusammengemischt, zentrifugiert und anschließend in Zellkulturmedium (AmnioMax™-100:IMDM/1% FKS (1:2)) mit 0.25%

Methylzellylose aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurden in eine 96-Well-Platte für die Suspensionzellen pro Well gegeben und bei 37°C, 5% CO_2 kultiviert. Nach 20-24 Stunden wurden die gebildeten Sphäroiden geerntet und für weitere Versuche angesetzt.

Zellkonzentration x 10^4/ml					
Zellzahl pro Sphäroid	ein Zelltyp	Gemischte Sphäroide 1:1		Gemischte Sphäroide 1:3	
5000 Zellen	5	2,5	2,5	1	2
3000 Zellen	3	1,5	1,5	1,7	3,3

Tabelle 18: Zellzahlkonzentration in Sphäroiden

Einbettung von Sphäroiden in Kollagen

Kollagen wurde aus Rattenschwänzen ausgewachsener Wistar-Ratten gewonnen. Vier Rattenschwänze wurden 20 min mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde vorsichtig aufgeschnitten und abgezogen. Die Kollagenfasern wurden heraus gezogen, 20 min in 70% Ethanol inkubiert und getrocknet. Anschließend wurden die Sehnen für 48 Stunden in 350 ml 0,1% Essigsäure verdaut. Die visköse, kollagenhaltige Lösung wurde 1 Stunde bei 24.000g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und in 50 ml Röhrchen aliquotiert. Der Proteingehalt der Stammlösung wurde wie in Kapitel 3.2.5. bestimmt und auf 2 mg/ml mit 0,1% Essigsäure eingestellt.

Für 8 Kollagengele (1 ml/Well in 24-Well-Platte) wurden ca. 130 Sphäroide geerntet und bei 1200 U/min, 4°C 5 min zentrifugiert. Das Sphäroidenpellet wurde mit 4,5 ml 1,2% Metylzellylose in IMDM Medium (5% FKS) resuspendiert und auf Eis gestellt.

4 ml Kollagenlösung wurden mit 400 µl 10x 199-Medium versetzt und mit 500 µl 0,2 M NaOH neutralisiert (Farbumschlag: von gelb auf rot). Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 90 µl HEPES 1M (pH 7.5) auf 7.4 eingestellt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine frühzeitige Polymerisierung des Gels zu vermeiden. Anschließend wurden die Sphäroide mit der Kollagenlösung gemischt und auf eine 24-Well-Platte (1ml pro Well) verteilt. Die Polymerisierung der Gele erfolgte bei 37°C innerhalb von 30 min.

3.6. Proliferationsassay

Die Proliferation der Zellen wurde durch Zellzahlbestimmung im Casy Counter gemessen. Es wurden 2 x 10^5 $CD133^+$-Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte in 1 ml

Medium oder in 1 ml Testsubstanz (konditioniertes Trophoblastenmedium oder Fibroblastenmedium) jeweils 3x Ansätze angesetzt. Nach 1, 3 oder 7 Tagen wurden Zellen resuspendiert und in Casy Counter gezählt.
Der Einfluss von Choriongonadotropin (hCG) auf die Proliferation wurde nach Zugabe von hCG in einer Konzentrationsreihe (0,5, 5, 50 und 100 U/ml) untersucht.

3.7. Detektion der Apoptose

Apoptose ist ein genetisch gesteuerter Prozess des Zelltodes. In frühen Apoptosestadien finden Änderungen 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 auf. Das Protein Annexin-V bindet spezifisch an PS. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis von Apoptose. Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin-V binden kann, muß gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt werden.

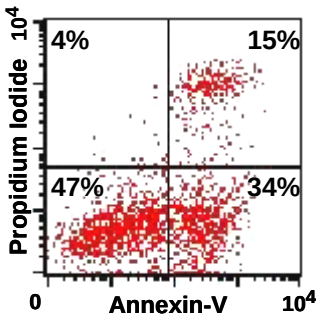


Abbildung 9: Färbung der apoptotischen Zellen mit Annexin-V.
Die Zellen wurden mit Staurosporin behandelt um die Apoptose auszulösen. 34% der Zellen, die nur mit Annexin-V angefärbt sind, befinden sich in Apoptose. 4% der Zellen zeigen positive Färbung mit Propidium Jodid und daher sind nekrotisch. Die Zellen, die sich mit Annexin-V und Propidium Jodid anfärben lassen sind entweder durch Apoptose oder Nekrose gestorben. 47% der Zellen leben und zeigen keine Färbung.

Dieser Farbstoff färbt nur DNA von toten Zellen. Zellen, die sich sowohl mit Annexin-V als auch mit Propidiumjodid färben lassen, sind daher tot. Sie können

durch Apoptose oder Nekrose gestorben sein. Zellen, die sich nur mit Annexin-V anfärben, befinden sich im Apoptoseprozess (Abbildung 9).
In der Zellkultur kann Apoptose durch Serumreduktion oder durch Zugabe von Staurosporin, einem Proteinkinaseinhibitor, induziert werden.
Zum Nachweis der Apoptose wurde Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit verwendet. Die Anfärbung der Zellen mit Annexin-V wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.
Bei Staurosporin-induzierter Apoptose wurden Zellen erst mit einer Testsubstanz 24 Stunden preinkubiert und anschließend mit 20nM Staurosporin behandelt. Die apoptotischen Zellen wurden nach 12 Stunden mit FITC-markiertem Annexin-V angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.
Die durch Serumreduktion induzierte Apoptose wurde durch die Kultivierung der Zellen von 3 bis 7 Tagen ohne Serumzugabe ausgelöst.

3.8. Markierung der $CD133^+$-Zellen mit „PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit“

Der PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit erlaubt eine langzeitige (7-14 Tage) Membranmarkierung von lebenden Zellen. PKH26 ist ein aliphatischer lipophiler Farbstoff, der in die Lipidschicht der Zellmembran eingebaut werden kann. Der eingebaute Farbstoff kann bei 551 nm angeregt werden. Das freigesetzte Emissionslicht wird bei 567 nm detektiert.
Die Zellen wurden vor der Markierung zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen und zunächst in 25 µl PBS und dann in Diluent C (100 µl pro 2 x 10^6 Zellen; erhältlich im Kit) resuspendiert. Der Farbstoff wurde mit Diluent C bis zur zweifachen Konzentration (4 x 10^{-6}M) verdünnt und schnell zu den Zellen gegeben. Unter ständiger Resuspendierung der Probe wurden die Zellen bei Raumtemperatur 5 Minuten angefärbt. Zum Abstoppen der Färbungsreaktion, wurde die äquivalente Menge von serumhaltigem Medium (10% FCS) zugegeben und 1 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Effizienz der Markierung wurde im FACS überprüft. Die Zellen konnten direkt nach der Markierung für weitere Versuche eingesetzt werden.

3.9. Statistische Methoden

Die Daten wurden auf statistische Signifikanz mit dem Programm Excel getestet. Die gemessenen Werte von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten

wurden auf Normalverteilung überprüft. Falls angemessen wurde weiterführend der t-Test (einseitiger Test mit ungleichen Varianzen) angewendet. Eine Irrtumswahrschein-lichkeit von $p<0,01$ (**) bzw. $p<0,05$ (*) wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Standardabweichung (SD, standard deviation) wurde als ein Maß für die Streuung von Werten bezüglich deren Mittelwert berechnet

4. MATERIAL

4.1. Geräte

Canon Eos 300 Digital	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Casy Counter	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Cryostat CM1850	Leica, Wetzlar
Curex Compait Plus (Entwickler für Röntgenfilme)	Agfa, Göttingen
Dampfsterilisator, VARIOKLAV®	H+P, Oberschleimheim
Dynatech MR 5000 (ELISA-Reader)	Dynatech, Guyanocourt, Frankreich
FACS - Gerät	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
UV-Lichtquelle GelDoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus, Hanau
Laborpumpe Vacusafe	Integra bioscience, Fernwald
Live Imaging Mikroskop TE2000	Nikon, Düsseldorf
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop DM-LB	Leica, Wetzlar
Mikroskop MS-5	Leica, Wetzlar
Milli-DL aqua dest Anlage	Millipore GmbH, Eschborn
MiniTrans-Blot ElectrophoreticTransfer Cells	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter CG840	Schott, Mainz
Pipettboy acu	Integra bioscience, Fernwald
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rotationsschüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach
Spectophotometer SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermo-cycler, Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Vario-MACS	Miltenyi Bioscience, Bergisch Gladbach
Vortex-Gerät	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach
Wasserbad	Memmert Gmbh&Co.KG, Schwabach
Zentrifuge (Labofuge GL)	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

4.2. Verbrauchsmaterialien

6-Well-Multiwell Platten Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well- Suspensionsplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well-Mikrotiterplatten	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
BD BioCoat™ Fibronectin 12-well Multiwell Platten	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
BD BioCoat™ Fibronectin 6-well Multiwell Platten	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Cell Culture Insert (0,4µm und 3µm Porengröße)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Combitips plus (2,5ml, 5ml)	Eppendorf, Hamburg
Cryotube TM Vials	Nunc TM Brand Products, Roskilde, Dänemark
Deckgläser	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co.KG, Braunschweig
Einfrierungsförmchen "Tissue-Tek"	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holland
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Filter Millex 0,22µm	Millipore GmbH, Eschborn
Filter Millex 0,4µm	Millipore GmbH, Eschborn
Hyperfilm ECL	Amersham Bioscience, Freiburg
Immobilon-P Transfermembran	Millipore, Schwalbach
Impfschlingen (gelb, blau)	Nunc, New York, USA
Lab-Tek Chamber Slide	Nunc, New York, USA
MACS Column LS (Magnetsäule)	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
Neubauer Zahlkammer	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH, Wertheim
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym, Oldendorf
Petrischalen 10x15	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten (serologisch)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Röhrchen 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Röhrchen 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Skalpell (Größe 11 und 20)	PFM, Köln
Spritze 20ml	Braun, Melsungen
SuperFrost Ultra Plus Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH&Co.KG, Braunschweig
Zellkulturflaschen (12,5cm² und 25cm²)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75cm² und 150cm²)	Biochrom, Berlin
Zellscharber	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb 80µm	Becton Dickinson Labware, Heidelberg

4.3. Chemikalien

Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose Neeo, Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammonium Bicarbonat (NH_4 HCO_3)	Fluka Chemie, Buchs
Ammonium Cloride (NH_4 Cl)	Fluka Chemie, Buchs
Ammoniumpersulfate (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antibiotische Lösung Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Antipain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bisacrylamide	Roth, Karlsruhe
Bisbenzimide Höchst 33342	Merck Biosciences, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Casy Counter Clean Solution	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Choriongonadotropin Predalon®	Organon, Oberschleißheim
Collagenase	Invitrogen, Karlsruhe
Cytofix/Cytoperm™	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Dil-Ac-LDL	Biomedical Technologies Inc Stoughton, MA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiotriol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim
dNTP Mix	Eurogentec, Seraing, Belgium
Dodecylsulfate sodium salt (SDS)	Roth, Karlsruhe
Esel Serum	West Grove, Pennsylvania, USA Jackson immuno Research
Essigsäure (100%, Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Fischer, Saarbrücken
Ethidium Bromide	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Clean	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
FACS Flow™	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Ficoll-Paque™ Plus	Amersham Bioscience, Freiburg
Flt-3 Ligand (FLT-3L)	PromoCell, Heidelberg
Gelatin Solution 2 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycergel Mounting Medium	Dako, Hamburg

Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycine Hydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Growth Factor Reduced Matrigel Matrix	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Hämatoxylin	Waldeck, Münster
Hank´s balanced salt solution (HBSS-buffer) 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES Puffer 1M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Humanes Choriongonadotropin (hCG)	Organon, Oberschleißheim
Human Serum	PAA, Pasching, Österreich
IPTG	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin 200mM	Cambrax bioscience, Walkersville, USA
Liquid DAB-Substrate Chromogen System	Dako, Hamburg
Loading Dye Solution 6x	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Maus Serum	Dako, Hamburg
Medium 199 10x	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol (MetOH)	Riedel-de Häen, Seelze
Methylcellulose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH) 1M	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
NP-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Perm/Wash™ 10X Puffer	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Phenylmethyl-sulfonylfluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pickrinsäure	Fluka Chemie, Buchs
Precision Plus Protein Standards, dual color	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ProLong® Gold antifade reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Random Primers	Promega, Mannheim
Retinoic Acid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VEGF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
RNase Reverse Transcriptase, SuperScript II	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 1M	Merck, Darmstadt
Stem Cell Factor (SCF)	PromoCell, Heidelberg
Streptavidin-HRP	Dako, Hamburg
Sucrose	Serva, Heidelberg
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

Temed	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek® Einfrierungsmedium	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holland
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-ropanediol)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trombopoetin (TPO)	PromoCell, Heidelberg
Trypanblau	Flow Laboratories, Irrine, Schottland
Trypsin 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA 1x	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween-20®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ultra pure Water	Biochrom, Berlin
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 %	Roth, Karlsruhe
X-GAL	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.4. Kommerzielle Assays und Tests

CD133-MicroBead Kit human	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Bio-Rad D_c Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Biotin Blocking System	Dako, Hamburg
CD326 MicroBead Kit human	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Bioscience, Freiburg
MinElute™ Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden
pGEM®-TEasy-Vektor System	Promega, Mannheim
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini RNA extraction kit	Qiagen, Hilden
Endocult™ Liquid Medium Kit	StemCell Technologies,

4.5. Antikörper

anti-β-III-tubulin	Chemicon, Schwalbach
CD 117 APC	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD 11b PE	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD 133 PE	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
CD 14 PerCP	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD 144 unmarkiert	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD 31 FITC	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD 31 unmarkiert	Becton Dickinson Labware, Heidelberg

CD 326 PE	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
CD 34 FITC	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
CD 34 unmarkiert	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD 45 PerCP	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
CD 68 unmarkiert	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Cytokeratin-7 FITC	Biozol (abcam), Eching
ECL Peroxidase Labelled anti Maus IgG	Amersham Bioscience, Freiburg
Esel IgG_1 anti Maus FITC	Dianova, Hamburg
Esel IgG1 anti Maus PE	Dianova, Hamburg
HSP 90 unmarkiert	Biozol (abcam), Eching
Maus IgG_1 unmarkiert	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Maus IgG_1 unmarkiert	Biozol (abcam), Eching
Maus IgG_1-FITC	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Maus IgG_1-PE	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Maus IgG_1-PE	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
OCT-4 unmarkiert	Chemicon, Schwalbach
Tie-2 PE	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
VEGFR-1PE	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
VEGFR-2 PE	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
VEGFR-3 PE	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
Vimentin PE	Santa Cruz,Heidelberg
vWF unmarkiert	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Ziege IgG1 anti mouse biotinylated	Dako, Hamburg
Ziege IgG1-APC	Becton Dickinson Labware, Heidelberg

4.6. Zellkulturmedien

alpha MEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
AmnioMax^{TM}-100	Invitrogen, Karlsruhe
Endothelial Basal Cell Meduim MV 2	PromoCell, Heidelberg
IMDM, ohne Phenol Rot	Invitrogen, Karlsruhe
Medium-199, 10x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe

4.7. Software zur Datenauswertung

CellQuestPro, FACS-Analyse	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
NIS Elements, live imanging Mikroskopie	Nikon, Düsseldorf
QantatiOwn, PCR Auswertung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

5. ERGEBNISSE

5.1. Untersuchungen von CD133$^+$-Zellen

5.1.1. Isolierung und Kultivierung von CD133$^+$-Zellen aus Nabelschnurblut

Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme. Die mononukleären Zellen (MNC) wurden von Erythrozyten, Trombozyten und den Granulozyten mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt und anschließend mittels CD133-Beads separiert. Die Reinheit der Population wurde mittels FASC-Analyse bestimmt und lag über 90% (Abbildung 10).

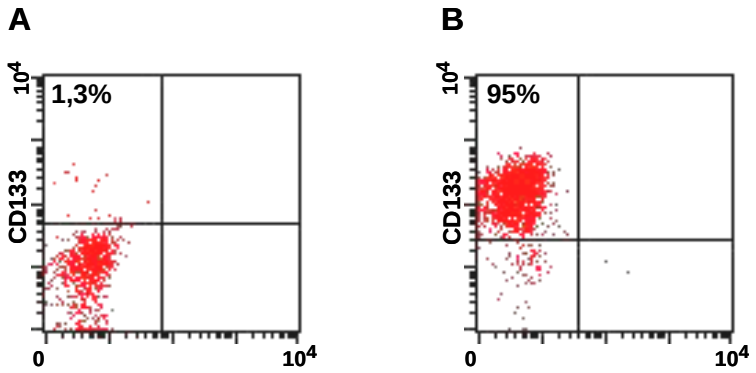


Abbildung 10: FACS-Analyse der CD133$^+$-Zellen vor und nach der Aufreinigung.
Die Zellen wurden vor der Aufreinigung mit CD133-PE-Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert (A). Nach der Aufreinigung mit CD133-Beads wurde die Reinheit der isolierten Zellpopulation überprüft (B).

Für die Etablierung von *in vitro* Expansionsbedingungen der Zellen wurden, bereits aus der Literatur bekannte Zusammensetzungen des Kultivierungsmediums ausgewählt. Die CD133$^+$-Zellen wurden in IMDM-Medium mit 10% FKS, FLT3L, SCF und TPO (50 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml) kultiviert. Diese Zusammensetzung des Mediums induzierte eine starke Proliferation der CD133$^+$-Zellen und erwies sich daher, bezüglich der Zellproliferation, als eine effektive Kombination. Abbildung 11 zeigt die Zunahme der Anzahl der isolierten Stammzellen von Tag 0 bis zum Tag 34. Innerhalb der ersten 3 Kultivierungswochen konnte ein exponentieller Anstieg der Zellzahl beobachtet werden.

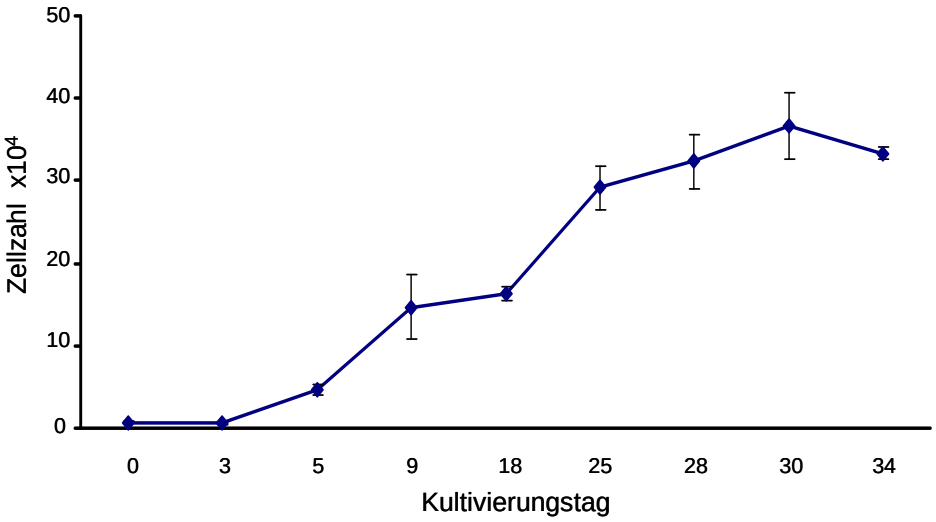


Abbildung 11: Proliferation von CD133$^+$-Zellen in Wachstumsmedium.
Die CD133$^+$-Zellen wurden in IMDM-Medium mit 10% FKS, FLT3L, SCF und TPO (50 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml) 34 Tage kultiviert. Die Zellzahl wurde im Casy Counter bestimmt. Bis Tag 21 nahm die Zellzahl exponentiell zu. Ab Tag 25 verlangsamte sich die Zellteilung und ab Tag 30 wurde keine Proliferation mehr beobachtet. Die Grafik präsentiert Mittelwerte aus 7 Versuchen. (+/- Standardabweichung)

Die Morphologie der proliferierenden Zellen blieb weitgehend unverändert. Es bildete sich eine überwiegend nicht-adhärente, homogene, locker zusammenhängende Zellpopulation von kleinen, runden Zellen. Es konnte beobachtet werden, dass die Zahl von leicht adhärenten, kolbenförmigen Zellen im Verlauf der Kultivierung zunahm (Abbildung 12).

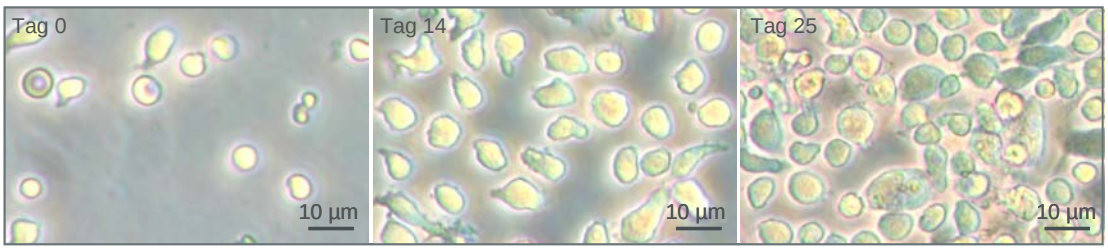


Abbildung 12: Morphologie der CD133$^+$-Zellen.
Die Zellkultur besteht aus überwiegend nicht-adhärenten, homogenen, relativ locker zusammenhängenden Zellen. Während der Kultivierung (Tag 14 und Tag 25) haften einige Zellen am Boden und zeigen eine kolbenförmige Morphologie. Die Originalbilder sind 100x vergrößert.

5.1.2. Charakterisierung von CD133$^+$-Zellen

Die Phänotypisierug der CD133$^+$-Zellen wurde mittels FACS-Analyse am Tag 0, 3, 7, 10 und 14 durchgeführt. Als typische hämatopoetische Stammzellmarker wurden CD133 und CD117 eingesetzt. Für den Nachweis von Zellen mit endothelialen Eigenschaften wurden VEGFR-1, VEGFR-2, CD31, CD34 und Tie-2 gewählt.

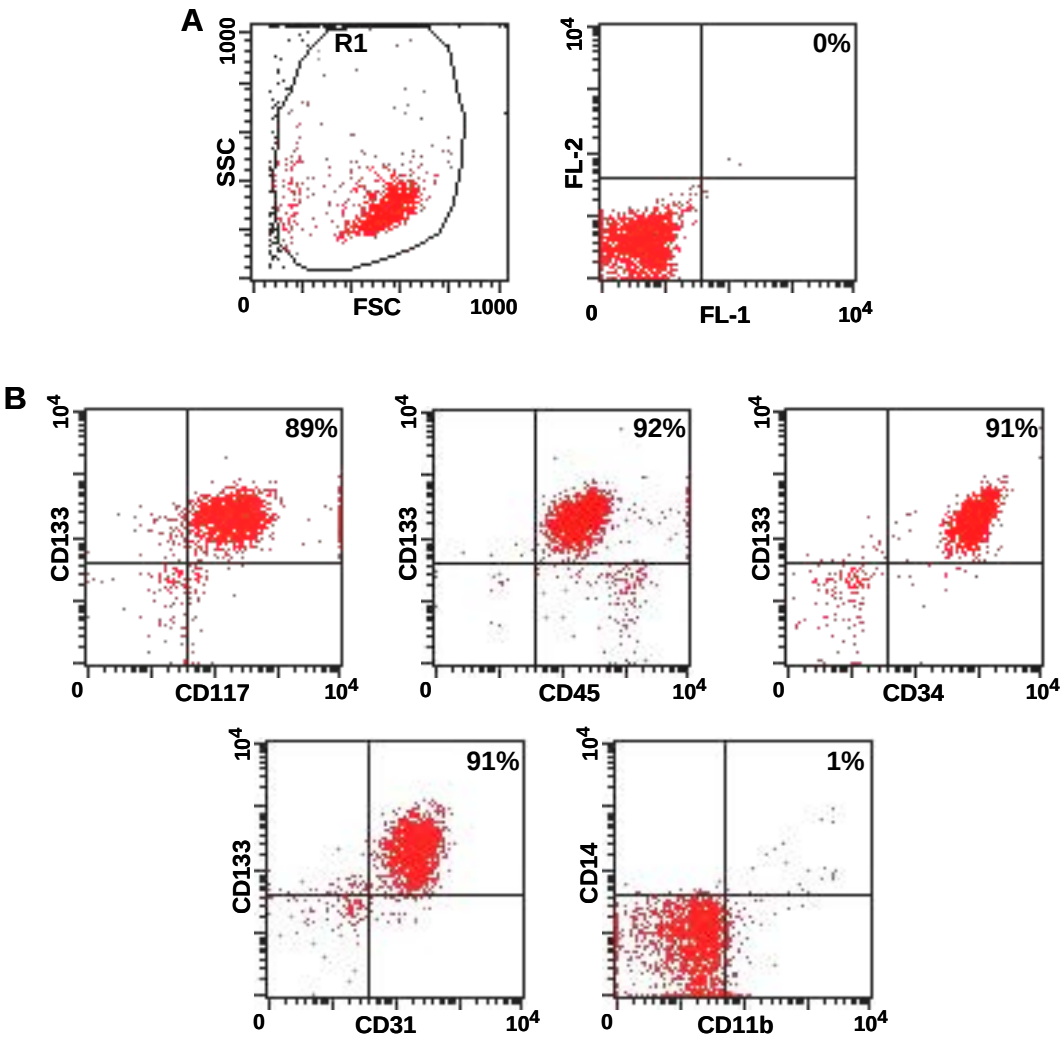


Abbildung 13: FACS-Analyse von CD133$^+$-Zellen unmittelbar nach der Aufreinigung (Tag 0).

Die Zellen wurden mittels MACS-Verfahren mit CD133-Beads aufgereinigt, mit unterschiedlichen Antikörperkombinationen angefärbt und mittels FACS analysiert. Eine Zellpopulation wurde ausgewählt und mit Region 1 (R1) eingegrenzt, um die Auswertung der anderen Messungen nur auf diese Zellen zu beziehen. Die Position der Quadrantbalken wurde auf die ungefärbte Probe eingestellt (A). Die Fluoreszenz der angefärbten Zellen wurde im Wolkendiagramm dargestellt (B).

CD11b und CD14 charakterisierten die Differenzierung der Stammzellen zu Monozyten.

Wie in Abbildung 13 (Bild B) zu sehen, exprimierten die $CD133^+$-Zellen direkt nach der Isolierung die Stammzellmarker CD133 und CD117 (c-kit). 91% der $CD133^+CD117^+$-Zellen zeigten eine gleichzeitige Expression von CD45, CD31 und CD34. Der Anteil von Zellen mit den monozytären Markern CD14 und CD11b war gering und betrug ca. 1%. Die endothelzellspezifischen Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2, vWF und CD144 konnten nicht nachgewiesen werden.

Im Verlauf der Kultivierung wurden CD133 und CD34 rasch herunterreguliert und ab Tag 7 konnte nur noch eine kleine $CD133^+CD34^+$-Zellpopulation (10,7%) detektiert werden. Der CD117-Stammzelmarker blieb bis zum Tag 14 auf den Zellen detektierbar, obwohl der Anteil an $CD117^+$-Zellen langsam sank. Der Anteil von Zellen mit monozytären Markern erhöhte sich von 1% am Tag 0, auf 6,4% am Tag 14 (Tabelle 19). Die Zellen zeigten an allen Tagen eine konstant starke Expression von CD45- und CD31-Rezeptoren.

Marker	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14
	Anteil der Zellen %			
$CD133^+CD117^+$	**85,8±1,5**	**75,6±9,2**	**14,7±4,0**	**10,0±1,5**
$CD133^+CD34^+$	**89,6±2,1**	**74,3±7,9**	**8,8±2,7**	**5,6±3,8**
$CD45^+$	97,9±0,6	97,3±1,1	95,6±2,9	97,7±1,1
$CD31^+$	96,5±2,9	93,8±3,5	89,6±7,5	92,9±1,5
$CD14^+$	1,4±0,2	1,9±0,4	6,7±1,5	5,8±0,6
$CD11b^+$	2,5±0,6	4,9±1,8	6,3±2,5	10,8±4,0
$CD14^+CD11b^+$	**1,6±0,9**	**5,2±2,0**	**8,0±1,0**	**14,2±4,2**

Tabelle 19: FACS-Analyse von $CD133^+$-Zellen während der *in vitro* Kultivierung.
Die Tabelle präsentiert Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. (+/- Standardabweichung)

5.1.3. Expression von Oct-4 und anderen Pluripotenzmarkern in $CD133^+$-Zellen

Im nächsten Schritt der Charakterisierung von $CD133^+$-Zellen aus Nabelschnurblut sollte die Expression von Pluripotenzmarkern untersucht werden. Es konnte mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden, dass die $CD133^+$-Zellen direkt nach der Isolierung und

zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro* Kultivierung das *Oct-4* Gen auf mRNA-Ebene exprimieren (Abbildung 14, A).

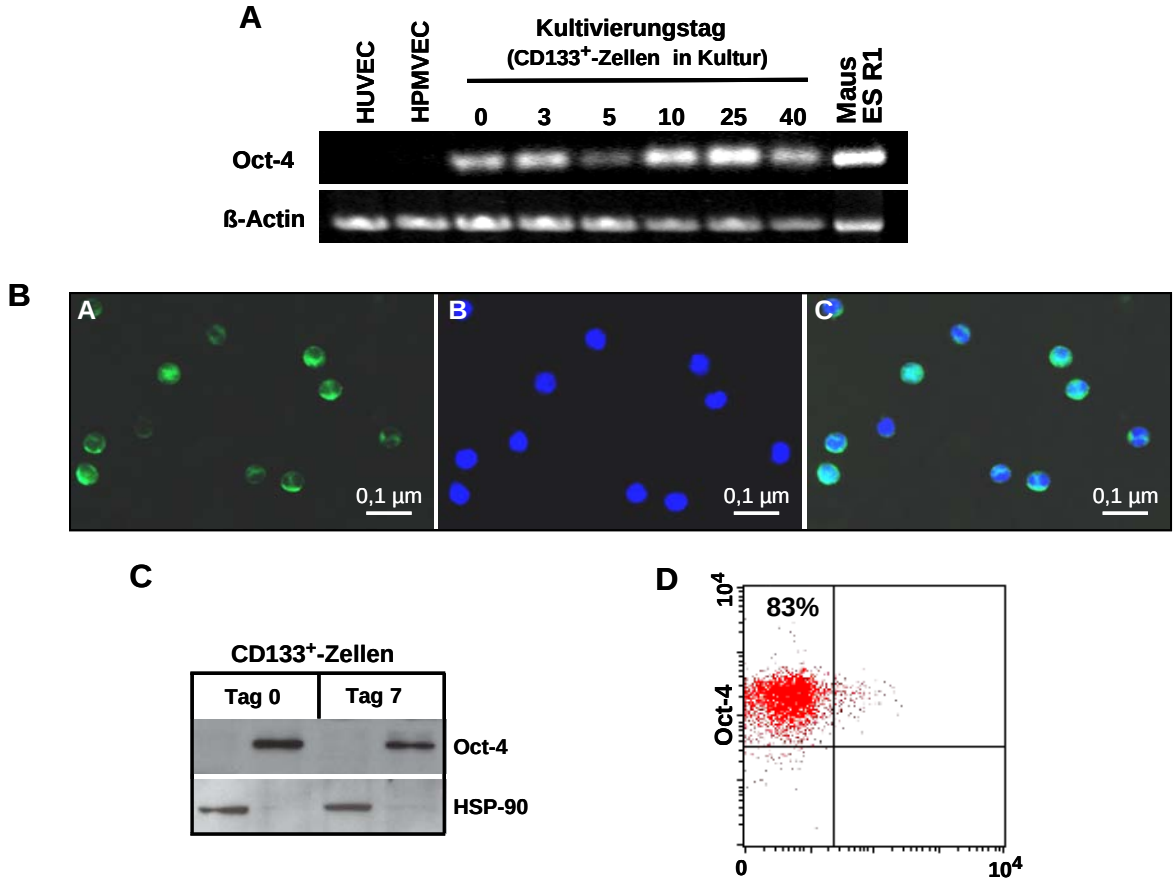


Abbildung 14: Expression von Oct-4 in CD133$^+$-Zellen.

RT-PCR-Analyse (A): mRNA von CD133$^+$-Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Expression von Oct-4 nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz mit mRNA aus differenzierten endothelialen Zellen (HUVEC und HPMVEC). Als Positivkontrolle wurde mRNA von murinen embryonalen Stammzellen (ES R1) eingesetzt (murines und humanes *Oct-4* Gen sind identisch).

Immunhistochemische Färbung von Oct-4 (B): Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen Oct-4 inkubiert und mit DAPI gefärbt. Die Originalbilder sind 200x vergrößert.

Western-Blot Analyse (C): An Tag 0 und Tag 7 wurden zytoplasmatische und nukleäre Proteine von CD133$^+$-Zellen isoliert und getrennt auf das Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen Oct-4 (nukleäres Protein) und Antikörpern gegen HSP-90 (zytoplasmatisches Protein) inkubiert.

FACS-Analyse (D): Am Tag 0 isolierte CD133$^+$-Zellen wurden mit Methanol permeabilisiert und der Anteil der Oct-4-positiven Zellen im FACS-Verfahren bestimmt.

Die Expression von Oct-4 konnte auch auf Proteinebene mit Hilfe von Immunfluoreszenz, Western-Blot und FACS-Analyse nachgewiesen werden. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass das Oct-4-Protein im Kern lokalisiert ist (Abbildung 14, Bild B). Dasselbe Ergebnis konnte auch mittels Western Blot bestätigt werden. Die Oct-4-Expression war erwartungsgemäß auf den Zellkern beschränkt. Durch die gleichzeitige Überprüfung der zytoplasmatischen Fraktion mit einem zytoplasmaspezifischen Antikörper (HSP-90), konnte eine gegenseitige Kontamination der beiden Fraktionen ausgeschlossen werden (Abbildung 14, Bild C). Der Anteil der Zellen, die Oct-4 exprimieren, wurde durch FACS-Analyse bestimmt (Abbildung 14, Bild D). 83% der $CD133^+$-Zellen waren Oct-4-positiv.

Sox-1, Sox-2, FGF-4 und *Rex-1* sind ebenfalls Gene, die nur in pluripotenten Zellen exprimiert werden. Die Expression dieser Gene wurde in $CD133^+$-Zellen mit Hilfe von RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 15). Zur Kontrolle der amplifizierten Gene wurden die PCR-Produkte sequenziert und mit den in der „BLAST"-DNA-Daten-Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) vorhandenen Sequenzen verglichen. Die Ähnlichkeit der Sequenzen der PCR-Produkte mit den Sequenzen der verglichenen Gene lag bei 99,9 %. Alle 4 Gene wurden in $CD133^+$-Zellen exprimiert.

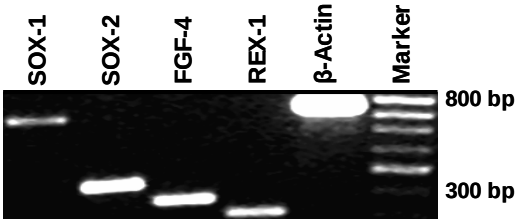


Abbildung 15: Expression von *Sox-1, Sox-2, FGF-4* und *Rex-1* in $CD133^+$-Zellen.
RNA wurde von $CD133^+$-Zellen nach der Aufreinigung am Tag 0 isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. β-Actin diente als Positivkontrolle.

5.1.4. Endotheliale und neuronale Differenzierung von $CD133^+$-Zellen

Mit dem Nachweis von Oct-4 in $CD133^+$-Zellen konnte bestätigt werden, dass die Stammzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden, einige Marker pluripotenter Zellen exprimieren. Im nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die isolierten $CD133^+$-Zellen die Fähigkeiten besitzen, in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren.

Für die endotheliale Differenzierung wurden CD133$^+$-Zellen in EBM-2-Medium (enthält: VEGF, EGF, bFGF und IGF-1) inkubiert. Nach 3 Wochen waren die Zellen zum größten Teil adhärent und zeigten eine, für Endothelzellen typische Morphologie (Abbildung 16, Bild A). Die endotheliale Differenzierung der CD133$^+$-Zellen, konnte durch die Aufnahme von Dil-Ac-LDL (Lipoprotein, markiert mit Dil-Fluoreszenz-farbstoff) bestätigt werden. Außerdem zeigten die, unter diesen Kulturbedinungen entstandenen Zellen, eine positive Färbung für den Rezeptor von *Ulex europaeus* (Daten nicht präsentiert).

Die 2wöchige Kultivierung der C133$^+$-Zellen mit *all-trans*-Retinsäure führte zu einer neuronalen Differenzierung. Die Zellen wurden adhärent und zeigten eine den neuronalen Zellen ähnliche Morphologie (Abbildung 16, Bild C). Die so differenzierten Zellen konnten mit einem Antikörper gegen beta-III-Tubulin, einem spezifischen Marker neuronaler Zellen, angefärbt werden.

Die pluripotenten CD133$^+$-Zellen sind zu einer Differenzierung zu endothelialen oder neuronalen Zellen befähigt.

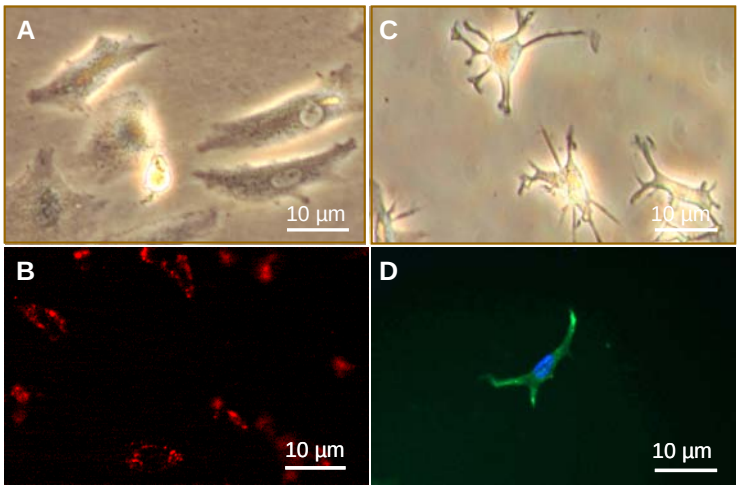


Abbildung 16: Endotheliale und neuronale Differenzierung von CD133$^+$-Zellen.

Nach der endothelialen Differenzierung zeigten CD133$^+$-Zellen eine für Endothelzellen typische Morphologie (A). Nach der Aufnahme des Dil-Ac-LDL-Farbstoffes, konnte eine Fluoreszenzfärbung im Zytoplasma dieser Zellen detektiert werden (B). Bei der neuronalen Differenzierung zeigten Zellen eine den neuronalen Zellen ähnliche Morphologie (C) und konnten mit beta-III-Tubulin spezifischen Antikörpern angefärbt werden (D). Die Originalbilder sind 200x vergrößert.

5.2. Expression von CD34- und CD31-Rezeptoren auf CD133$^+$-Zellen und Endothelzellen der plazentaren Gefäße

Um zu zeigen, dass CD133$^+$-Zellen und endotheliale Zellen plazentarer Blutgefäße eine mögliche gemeinsame Abstammung haben können, wurden CD133$^+$-Zellen und Plazentagewebe mit CD31- und CD34-Antikörpern angefärbt. Es konnte festgestellt werden, dass die CD133$^+$-Zellen aus Nabelschnurblut, sowie die Endothelzellen der Plazenta CD31- und CD34-Rezeptoren exprimieren (Abbildung 17).

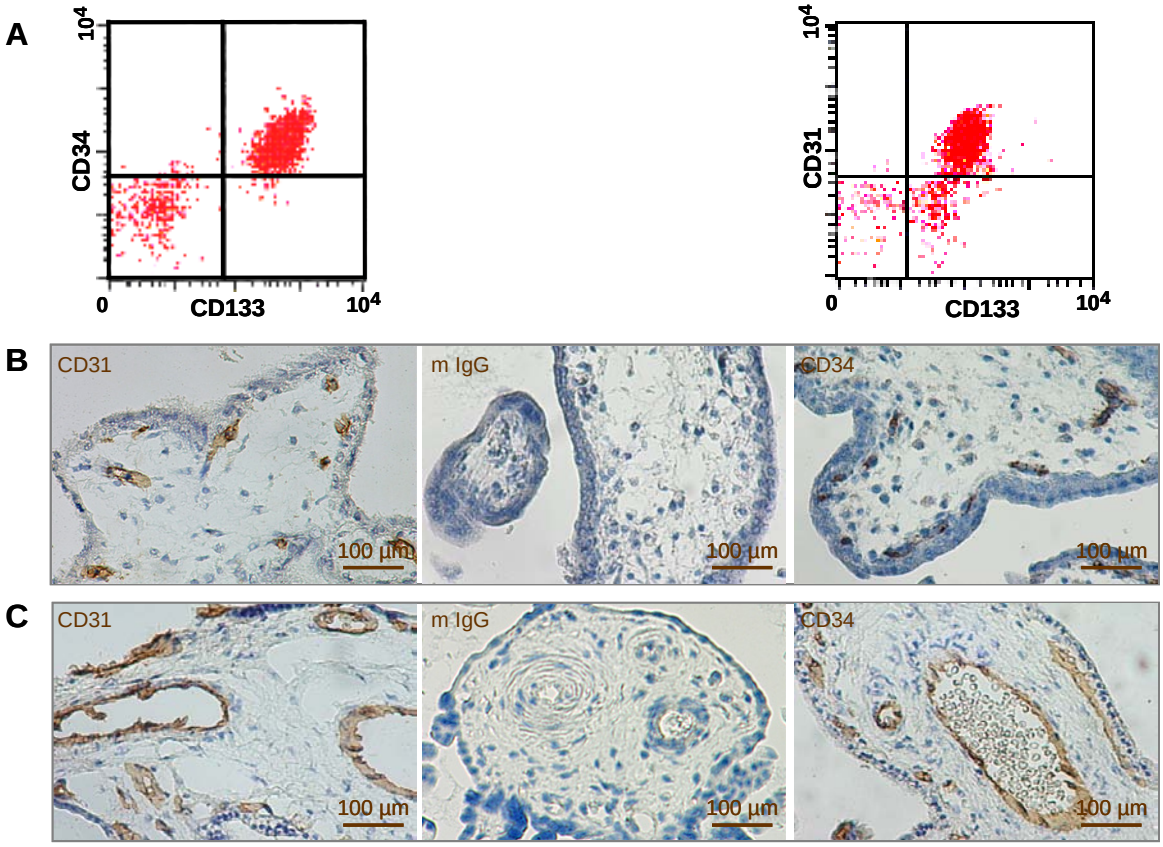


Abbildung 17: Expression der CD31- und CD34-Rezeptoren auf den CD133$^+$-Zellen aus Nabelschnurblut und auf den Endothelzellen der plazentaren Blutgefäßen.

Die CD133$^+$-Zellen wurden direkt nach der Isolierung mit der Antikörperkombination CD31/CD133 oder CD34/CD133 angefärbt und mittels FACS analysiert (A). Das Plazentagewebe aus der frühen (8. SSW, B) und späteren Plazenta (38. SSW, C) wurde mit CD34 oder mit CD31 immunhistochemisch untersucht. Als Negativkontrolle wurde die Färbung mit einem entsprechenden Isotyp-Antikörper (mIgG) durchgeführt. Originalbilder sind 160x vergrößert.

Um die Lokalisation der ersten Blutgefäße in der Plazenta zu untersuchen, wurde Plazentagewebe aus frühen Schwangerschaftswochen (6.-8. SSW) mit Cytokeratin-7 (trophoblastspezifischer Marker) und CD34 (Marker für Endothelzellen) angefärbt.
Es stellte sich heraus, dass die ersten plazentaren Blutgefäße in der unmittelbaren Nähe von Trophoblasten entstehen (Abbildung 18).

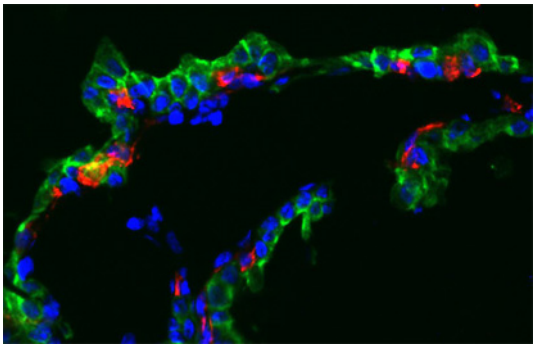


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung der Plazenta mit Cytokeratin-7, CD34 und Höchst.
Das Plazentagewebe (6. SSW) wurde mit Cytokeratin-7, CD34 und Höchst (Kernfärbung) angefärbt und durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Im Bild ist der Längsschnitt einer Chorionzotte präsentiert. Die entstehenden Plazentagefäße (mit CD34-Antikörper angefärbte Inseln) befanden sich in unmittelbarer Nähe der Trophoblasten (Cytokeratin-7-positive Zellen). Die Originalbilder sind 200x vergrößert.

5.3. Isolierung und Charakterisierung von Zytotrophoblasten

Um eine neue Aufreinigungsmethode für die Zytotrophoblasten zu etablieren, wurde die Expression des CD326-Rezeptors auf Zytotrophoblasten untersucht. Das CD326-Antigen ist auf epithelialen Zellen und Tumorzellen epithelialen Ursprungs vorhanden. Es wird auch als epitheliales zellspezifisches Adhäsions-molekül (EpCAM) oder als humanes epitheliales Antigen (HEA-125) bezeichnet. CD326 ist ein Oberflächenmarker. Dies ermöglicht die Verwendung von CD326-Beads für die magnetische Separation der Zellen mittels MACS-Verfahren.
Es wurden Plazentaschnitte aus frühen Schwangerschaftswochen mit CD326- und Cytokeratin-7-Antikörpern angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass Cytokeratin-7-positive Zytotrophoblasten ebenfalls CD326 exprimieren (Abbildung 19). CD326-Beads konnten für die Zytotrophoblasten-Aufreinigung eingesetzt werden.

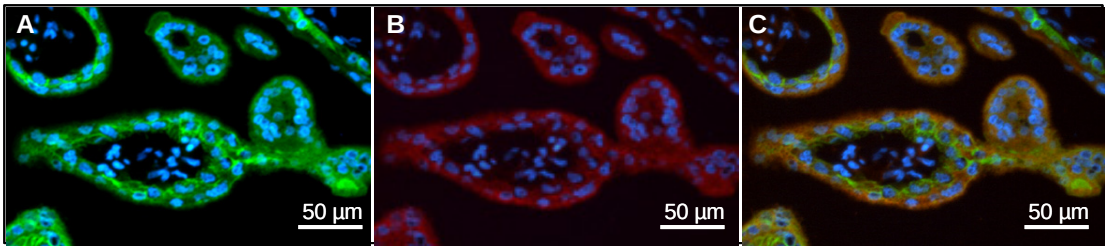


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung der Plazenta (6. SSW).
Das Plazentagewebe wurde mit Cytokeratin-7 (A) und CD326 (B) gefärbt. Die Überlagerung der beiden Farbstoffe ist auf Bild C dargestellt. Die Kerne sind mit Höchst-Farbstoff markiert. Die Originalbilder sind 400x vergrößert.

Abbildung 20 präsentiert Zytotrophoblasten vor und nach der Isolierung mit anti-CD326-Beads-markierten Antikörpern. Der Anteil der Cytokeratin-7/CD326-positiven Zellen lag vor der Aufreinigung bei 36%. Nach der Anreicherung mit CD326-Beads steigerte sich die Zellzahl der Zytotrophoblasten bis zu 95%. Die Ausbeute der Zellen betrug 4 bis 6 x 10^6 Zellen pro 1g Gewebe.

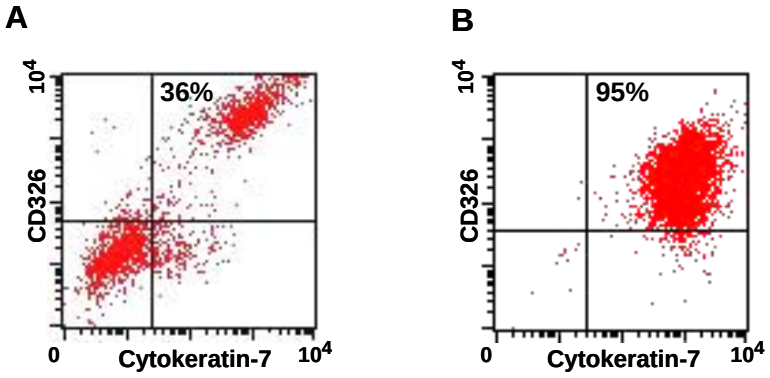


Abbildung 20: Anteil der Zytotrophoblasten vor und nach der Aufreinigung mit CD326-Beads.
Das Plazentagewebe wurde enzymatisch verdaut. Die Trophoblasten wurden mit CD326-Beads angereichert. Das Bild präsentiert den Anteil der Zytotrophoblasten in der gesamten Zellpopulation der Plazenta vor (A) und nach der Aufreinigung (B).

Nach der Isolierung wurden Zytotrophoblasten in Amniomax-100-Medium ohne Serumzusatz kultiviert. Die Zellen wuchsen adhärent in einem Monolayer und zeigten

eine, den epithelialen Zellen ähnliche Morphologie (Abbildung 21). Dieser Phänotyp blieb bis zur 5. Passage unverändert. In höheren Passagen kam es zur Synzytiumbildung. Die Zellen verschmolzen miteinander und bildeten multinukleäre Zellen mit großem Zytoplasma-Anteil (Synzytiotrophoblasten).

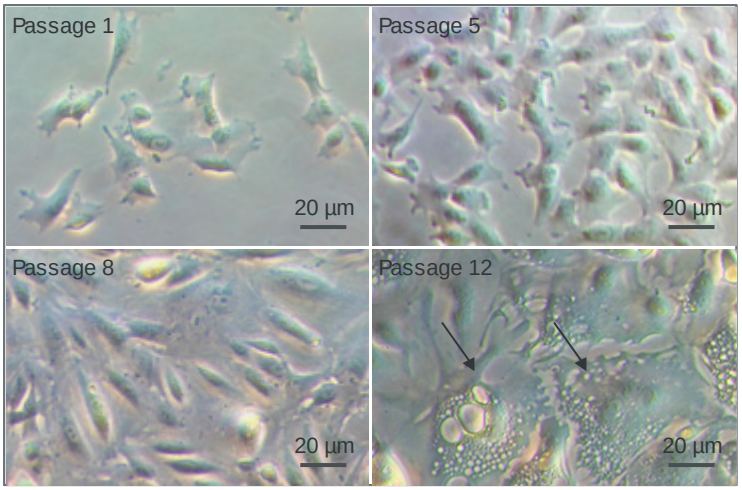


Abbildung 21: Morphologie von isolierten Zytotrophoblasten.
Auf dem Bild sind Zytotrophoblasten in Passagen den 1, 5, 8, und 12 presäntiert. In höheren Passagen konnten mehrere große, multinukleäre Synzytium-Zellen beobachtet werden (mit Pfeilen markiert). Die Originalbilder sind 100x vergrößert.

Bei der FACS-Analyse von Zellen aus verschiedenen Passagen konnte festgestellt werden, dass der Anteil der Cytokeratin-7-positiven Zellen von 87%±8 (n=7) in der 1. Passage bis zu 38% in der 8. Passage sank (Daten nicht präsentiert).
Diese Ergebnisse führten zu der Entscheidung, die Trophoblasten nur bis zur 5. Passage zu kultivieren und für Experimente einzusetzen.

5.4. Einfluss von Zytotrophoblasten auf die funktionellen Eigenschaften der $CD133^+$-Zellen

Während der Entwicklung von Gefäßen sind Migration, Adhäsion und Proliferation der endothelialen Zellen am Ort der Gefäßbildung von entscheidender Bedeutung. Es stellte sich die Frage, ob Trophoblasten einen Einfluss auf Migration, Adhäsion und Proliferationsverhalten der Stammzellen haben.

5.4.1. Migration der CD133$^+$-Zellen unter Zugabe von konditioniertem Trohpoblastenmedium

Die Migration von CD133$^+$-Zellen wurde mit der modifizierten Boyden-Kammer gemessen. Bei der Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium erhöhte sich die Zellzahl der migrierenden Stammzellen signifikant um das 2,5fache (Abbildung 22). In konditioniertem Fibroblastenmedium wurde eine geringere Migration beobachtet. In IMDM-Medium mit 20% FKS zeigte sich wiederum eine starke Erhöhung der Anzahl von migrierenden Zellen.

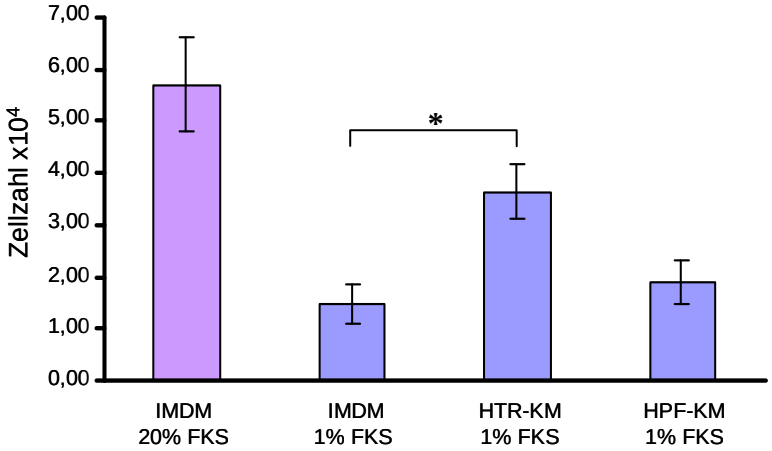


Abbildung 22: Migration der CD133$^+$-Zellen in der modifizierten Boyden-Kammer.

Als Testsubstanzen wurden konditioniertes Trophoblastenmedium (HTR-KM) und konditioniertes Medium von plazentaren Fibroblasten (HPF-KM) eingesetzt. Als basale Migration wurde die Zellzahl von migrierenden Zellen in IMDM-Medium mit 1% FKS angenommen. Als Positivkontrolle diente die Migration von Zellen unter dem Einfluss von 20% FKS. Die Werte sind in absoluten Zahlen präsentiert und entsprechen der Zellzahl von migrierenden Zellen. Der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt. (+/- Standardabweichung, $*p<0,001$).

5.4.2. Adhäsion der CD133$^+$-Zellen an Trophoblasten

Die Kultur von CD133$^+$-Zellen besteht vorwiegend aus Suspensionszellen und einem kleinen Anteil leicht adhärenter Zellen. Unter bestimmten Bedingungen (z.B. Beschichtung der Oberfläche der Zellkulturplatten mit Fibronektin) erhöht sich die Adhäsion der Zellen. CD133$^+$-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markiert und auf Platten mit Trophoblasten oder plazentaren Fibroblasten gegeben.

Durch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff konnten die adhärierenden CD133$^+$-Zellen von den adhärenten Zellen (Trophoblasten oder Fibroblasten) unterschieden werden. Die Adhäsion der CD133$^+$-Zellen an Trophoblasten wird in Abbildung 23 präsentiert. Im Vergleich zur Adhäsion der Stammzellen auf Plastik war die Adhäsion an Trophoblasten signifikant erhöht. Die Zellzahl der an plazentaren Fibroblasten adhärierenden CD133$^+$-Zellen war doppelt so hoch wie diejenige auf den Trophoblasten. Die stärkste Adhäsion konnte in Fibronektin-beschichteten Zellkultur-Platten beobachtet werden.

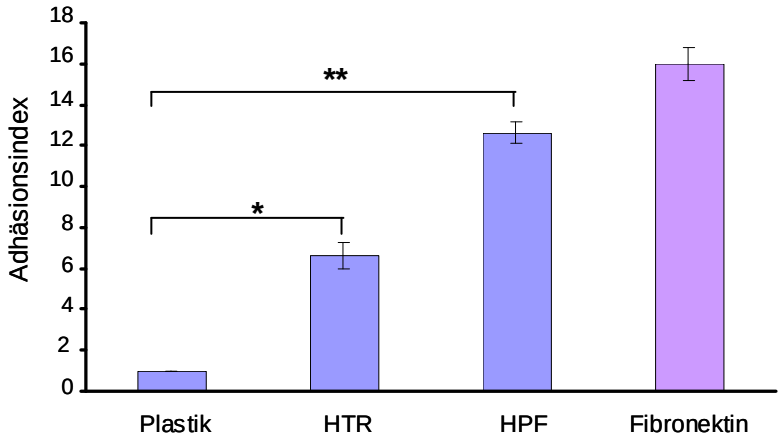


Abbildung 23: Adhäsion von CD133$^+$-Zellen.
CD133$^+$-Zellen wurden mit Trophoblasten (HTR) oder mit plazentaren Fibroblasten (HPF) zusammen kultiviert. Als Positivkontrolle wurde die Adhäsion von CD133$^+$-Zellen auf Fibronektin durchgeführt. Die Werte sind als Adhäsionsindex im Vergleich zur Zellzahl der auf Plastik adhärierenden Zellen dargestellt (Wert 1). Der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt. (+/- Standardabweichung, $*p<0,05/**p<0,001$).

5.4.3. Proliferation der CD133$^+$-Zellen unter Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium

In Anwesenheit von Serum und von Wachstumsfaktoren (SCF, FLT3L und TPO) zeigen CD133$^+$-Zellen eine exponentielle Proliferation. Unter diesen Bedingungen proliferieren die Stammzellen in der Kultur bis zum Tag 30. Eine Reduktion von Serum und das Absetzen von Wachstumsfaktoren führten zu einer Reduktion der Zellproliferation und anschließender Apoptose. Es stellte sich daher die Frage, ob die

Proliferation von CD133$^+$-Zellen durch die Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium beeinflusst wird.

Es konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Trophoblastenmedium (1% FKS) die Proliferation der CD133$^+$-Zellen nach drei Tagen konzentrationsabhängig induziert. Die Proliferation war signifikant höher als die Proliferation der Stammzellen in IMDM-Medium mit ebenfalls 1% FKS und entsprach der Anzahl der Zellen in Wachstumsmedium (10% FKS und Wachstumsfaktoren). Fibroblasten-konditioniertes Medium induzierte die Proliferation von CD133$^+$-Zellen hingegen nicht (Abbildung 24).

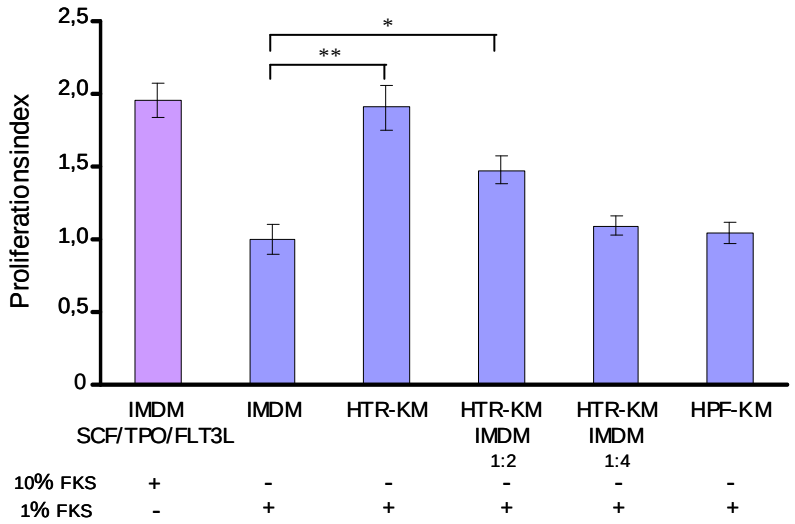


Abbildung 24: Proliferation der CD133$^+$-Zellen unter Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium.

CD133$^+$-Zellen wurden in konditioniertem Trophoblastenmedium (HTR-KM), konditioniertem Medium von plazentaren Fibroblasten (HPF-KM) oder in IMDM-Medium kultiviert. Nach drei Tagen wurde die Zellkonzentrationen mit dem Casy Counter bestimmt und der Proliferationsindex berechnet (im Bezug zur Proliferation in IMDM-Midium mit 1% FKS: Wert 1). Als Positivkontrolle diente ein Versuchsansatz in IMDM-Medium mit Wachstumsfaktoren und 10% FKS. Der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen ist dargestellt. (+/- Standardabweichung, $*p<0,05/**p<0,001$).

Bei längerer Kultivierung (bis 14 Tage) der CD133$^+$-Zellen in Trophoblastenmedium, konnte kein exponentieller Anstieg der Proliferation beobachtet werden. Wie Abbildung 25 zeigt, blieb ab Tag 7 die Zellzahl der CD133$^+$-Zellen unverändert, jedoch höher als in IMDM-Medium mit 1% FKS oder in konditioniertem Medium von

plazentaren Fibroblasten. Die Zellzahl von lebenden Zellen in IMDM-Medium mit 1% FKS und in Fibroblastenmedium reduzierte sich sogar, was auf die Reduktion von FKS zurückzuführen ist.

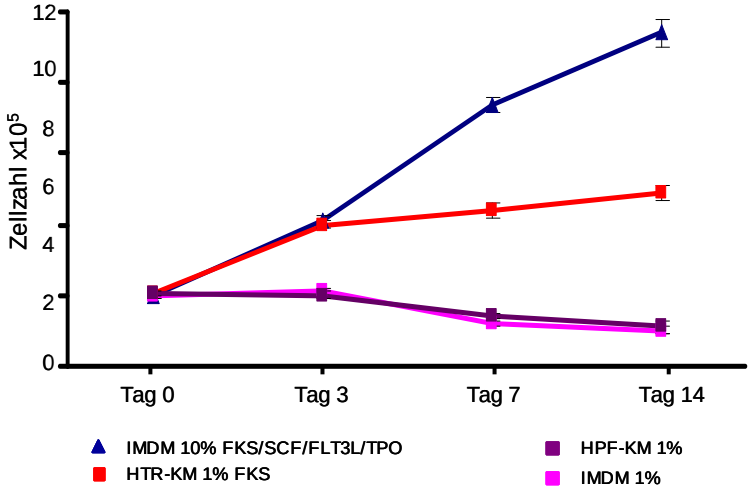


Abbildung 25: Proliferationsdynamik der CD133$^+$-Zellen im Verlauf von 14 Tagen unter Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium.
Die CD133$^+$-Zellen wurden von 14 Tage in konditioniertem Trophoblastenmedium (HTR-KM), konditioniertem Medium von plazentaren Fibroblasten (HPF-KM) oder in IMDM-Medium kultiviert. Die Zellkonzentration wurde am Tag 0, 3, 7 und 14 im Casy Counter gemessen. Als Positivkontrolle diente ein Versuchsansatz in IMDM-Medium mit 10% FKS und Wachstumsfaktoren (SCF/FLT3L/TPO). Die Werte sind in absoluten Zahlen präsentiert und entsprechen der Konzentration der gezählten Zellen. Der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen ist dargestellt. (+/- Standardabweichung).

In konditioniertem Trophoblastenmedium zeigten die CD133$^+$-Zellen trotz Serumreduktion eine deutlich höhere Proliferationsrate und bessere Vitalität.

5.5. Untersuchung der Apoptose von CD133$^+$-Zellen unter dem Einfluss von konditioniertem Trophoblastenmedium

Die Tatsache, dass CD133$^+$-Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium trotz Serumreduktion in der Lage sind sich zu teilen und länger zu überleben, lässt vermuten, dass das Trophoblastenmedium eine anti-apoptotische Wirkung besitzt. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde die Apoptoserate der Zellen mit Hilfe des Annexin-V-Assays bestimmt. Die Anzahl apoptotischer Zellen war in konditioniertem Trophoblastenmedium im Vergleich zu Zellen in IMDM-Medium mit

gleichem Serumgehalt um 25% reduziert. Die Kultivierung der CD133$^+$-Zellen in konditioniertem Medium von plazentaren Fibroblasten führte nur zur 15%igen Apoptosereduktion.

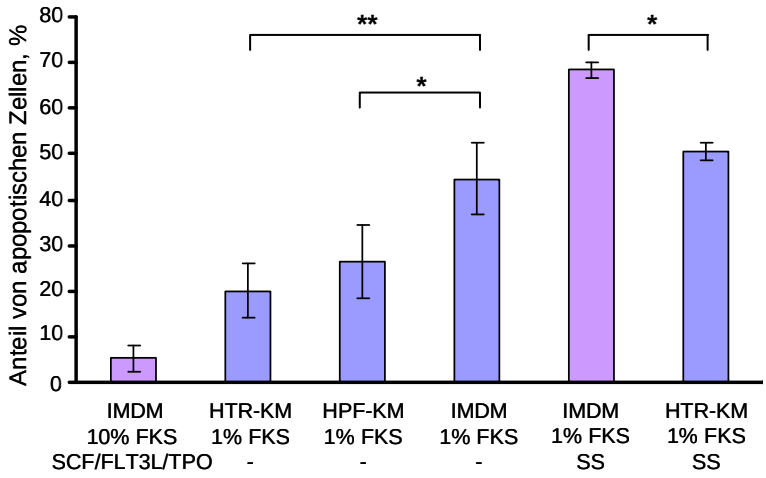


Abbildung 26: Durch Serumreduktion induzierte Apoptose.
Die CD133$^+$-Zellen wurden 3 Tage in konditioniertem Trophoblastenmedium (HTR-KM), konditioniertem Medium von plazentaren Fibroblasten (HPF-KM) mit oder ohne Zugabe von Staurosporin (SS) kultiviert. Der Serumgehalt betrug 1%. Als Kontrolle für die anti-apoptotische Wirkung diente ein Ansatz mit IMDM-Medium mit Wachstumsfaktoren (SCF/FLT3L/TPO) und 10% FKS. Die Apoptoserate wurde durch die Färbung mit Annexin-V gemessen. Die Werte sind in relativen Zahlen dargestellt und entsprechen der Prozentzahl der gezählten apoptotischen Zellen. Der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt. (+/- Standardabweichung, $*p<0,05/**p<0,01$).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die durch Staurosporin-induzierte Apoptose bei der Kultivierung der Stammzellen in konditioniertem Trophoblastenmedium um 15% geringer war, als die Staurosporin-induzierte Apoptose der Zellen in IMDM-Medium mit 1% FKS (Abbildung 26).

5.6. Einfluss von hCG auf CD133$^+$-Zellen

Die Kultivierung von CD133$^+$-Zellen in Trophoblastenmedium führte bei den Zellen zu einem Anstieg der Proliferationsrate und zu erhöhter Migration und Adhäsion. Zudem wurden HTR-KM kultivierte Zellen vor Apoptose geschützt. Es stellte sich die Frage, worauf diese Effekte zurückzuführen sind.

hCG (humanes Choriongonadotropin) ist ein Hormon, das während der Schwangerschaft von Trophoblasten, insbesondere während des ersten Trimesters

produziert wird. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass hCG einer der Faktoren im Trophoblasten-konditionierten Medium ist, die Differenzierung und Verhalten von CD133$^+$-Zellen beeinflussen könnten.

Es wurde zunächst untersucht, ob CD133$^+$-Zellen den Rezeptor für hCG exprimieren. Dies wurde mittels RT-PCR (Abbildung 26, A) und mit immunhistochemischer Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern (Abbildung 27, B) nachgewiesen.

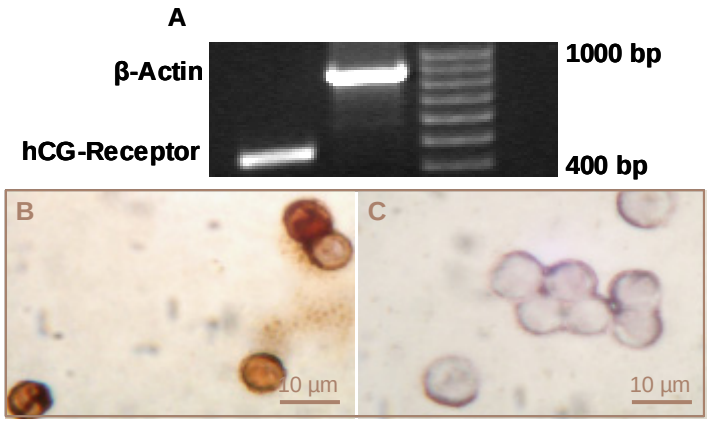


Abbildung 27: Expression des hCG-Rezeptors in CD133$^+$-Zellen.
RT-PCR-Analyse (A). mRNA von CD133+-Zellen wurde isoliert und mit Hilfe der RT-PCR die Expression des hCG-Rezetors nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente die RT-PCR von β-Actin.
Immunhistochemische Färbung von CD133$^+$-Zellen zum Nachweis des hCG-Rezeptors (B). Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen den hCG-Rezeptor inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die Färbung mit einem entsprechenden Isotyp-Antikörper durchgeführt (C). Die Originalbilder sind 200x vergrößert.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von hCG die Proliferation der CD133$^+$-Zellen dosisabhängig induzierbar war, wobei der Zusatz von 50 U/ml hCG die stärkste proliferative Wirkung zeigte (Abbildung 28).

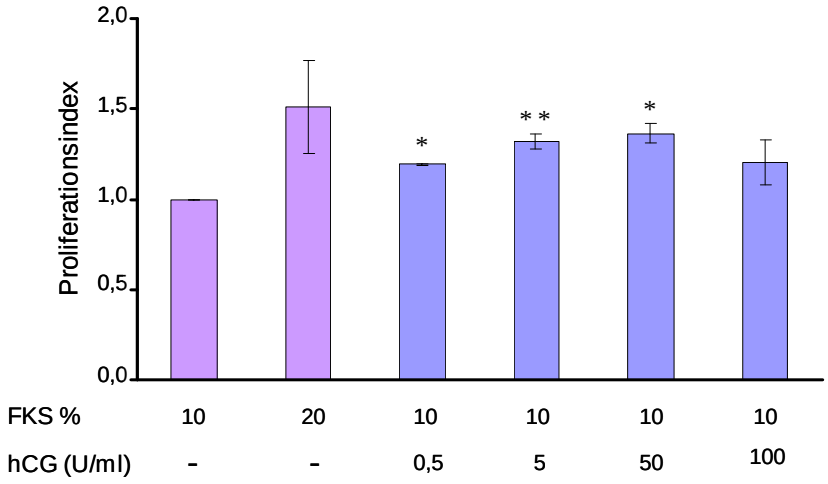


Abbildung 28: Proliferation von CD133$^+$-Zellen unter Einfluss von hCG. CD133$^+$-Zellen wurden 24 Stunden in Anwesenheit von hCG kultiviert. Die Zellkonzentration wurde im Casy Counter gemessen und der Proliferationsindex berechnet (im Vergleich zur Proliferation in IMDM-Midium mit 10% FKS: Wert 1). Als Positivkontrolle diente ein Ansatz in IMDM-Medium mit Wachstumsfaktoren und 10% FKS. Der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt. (+/-Standardabweichung, ∗p<0,05)

Es wurde ebenfalls der Einfluss von hCG auf Apoptose und Migration der CD133$^+$-Zellen untersucht. In beiden Fällen zeigte jedoch der Zusatz von hCG keine Wirkung (Daten nicht gezeigt).

5.7. Charakterisierung der CD133$^+$-Zellen während der Kultivierung in konditioniertem Trophoblastenmedium

5.7.1. Kultivierung der CD133$^+$-Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium innerhalb von 7 Tagen

Um den Einfluss von konditioniertem Trophoblastenmedium auf die Differenzierung der CD133$^+$-Zellen zu untersuchen, wurden sie 3 bzw. 7 Tage in Trophoblasten-konditioniertem Medium kultiviert (1% FKS). Die Zellen wurden am Tag 3 oder Tag 7 mit verschiedenen Antikörperkombinationen angefärbt und im FACS analysiert. Als Vergleichsgruppe wurden CD133$^+$-Zellen, die in IMDM-Medium mit 10% FKS und Wachstumsfaktoren kultiviert worden waren, verwendet. Der Einfluss von Fibroblasten-konditioniertem Medium auf CD133$^+$-Zellen unter gleichen Versuchsbedingungen konnte nicht untersucht werden, da die CD133$^+$-Zellen in

diesem Medium nicht lange überleben konnten (kein Schutz vor Apoptose unter Serumreduktion).

Die FACS-Analysen zeigten, dass die Anzahl der Zellen, die die Stammzell-spezifischen Rezeptoren CD133 und CD117 exprimierten, nach 3 Tagen Kultivierung im konditionierten Trophoblastenmedium auf 24% und nach 7 Tagen auf 12% sank, wohingegen die Zahl der in IMDM-Medium kultivierten Stammzellen entsprechend auf 41% und 34% sank (Tabelle 20).

	Kultivierungstag 3		Kultivierungstag 7	
Marker	HTR-KM	IMDM	HTR-KM	IMDM
	Anteil der Zellen an der gesamten Zellpopulation %			
$CD133^+CD117^+$	**24,4±2,6**	**41,6±3,1**	**12,2±1,9**	**34,9±3,5**
$CD133^+CD34^+$	**10,6±1,9**	**19,3±3,2**	**3,3±1,5**	**10,7±2,1**
$CD45^+$	94,0±5,2	98,3±3,2	95,6±2,5	96,8±2,1
$CD31^+$	89,6±4,2	90,3±1,6	83,6±5,1	91,2±3,8
$CD14^+$	1,3±0,9	4,2±1,6	1,2±0,6	5±1,3
$CD11b^+$	21,6±2,6	7,9±2,7	21±2,3	7±2,2
$CD14^+CD11b^+$	**35,6±2,1**	**9,2±1,6**	**43±2,5**	**13±0,9**

Tabelle 20: FACS-Analyse von $CD133^+$-Zellen unter dem Einfluss von konditioniertem Trophoblastenmedium.
Die Tabelle präsentiert Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. (+/- Standardabweichung)

Ebenso sank die Zahl der CD133- und CD34-positiven Zellen, im Vergleich zu IMDM-kultivierten Zellen, nach 3 Tagen um annähernd 50% und nach 7 Tagen sogar um 70%. Im Gegensatz dazu, wurde die Expression der Monozyten-spezifischen Marker CD11b und CD14 durch Kultivierung in Trophoblasten-konditioniertem Medium stark induziert. Die Anzahl von Zellen, die CD14- und CD11b-positiv waren, stieg um das 3-4fache. Die Expression von CD45 und CD31, Marker der hämatopoetischen Zellen, wurde durch Trophoblasten-konditioniertes Medium nicht beeinflusst.

5.7.2. Charakterisierung von differenzierten CD14$^+$CD11b$^+$-Zellen

Durch die Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium konnte die Differenzierung der CD133$^+$-Zellen beeinflusst werden. Der Phänotyp der entstehenden CD14$^+$CD11b$^+$-Zellen sollte durch weitere FACS-Analysen untersucht werden. Einige der für die Analysen verwendeten Antikörper besaßen eine Markierung mit gleichen Fluorochromen. Daher konnten diese Antikörper für eine Mehrfachfärbung nicht gleichzeitig eingesetzt werden. Eine weitere Charakterisierung der CD14$^+$CD11b$^+$-Zellen erfolgte mit Hilfe der Analysen-Funktion der Software CellQestPro. Das Prinzip dieser Analyse besteht aus einer mehrfachen Eingrenzung ausgewählter Zellpopulationen.

Zuerst wurden CD14$^+$CD11b$^+$-Zellen in dem Region 1 (R1, grün) eingegrenzt (Abbildung 29, Bild A).

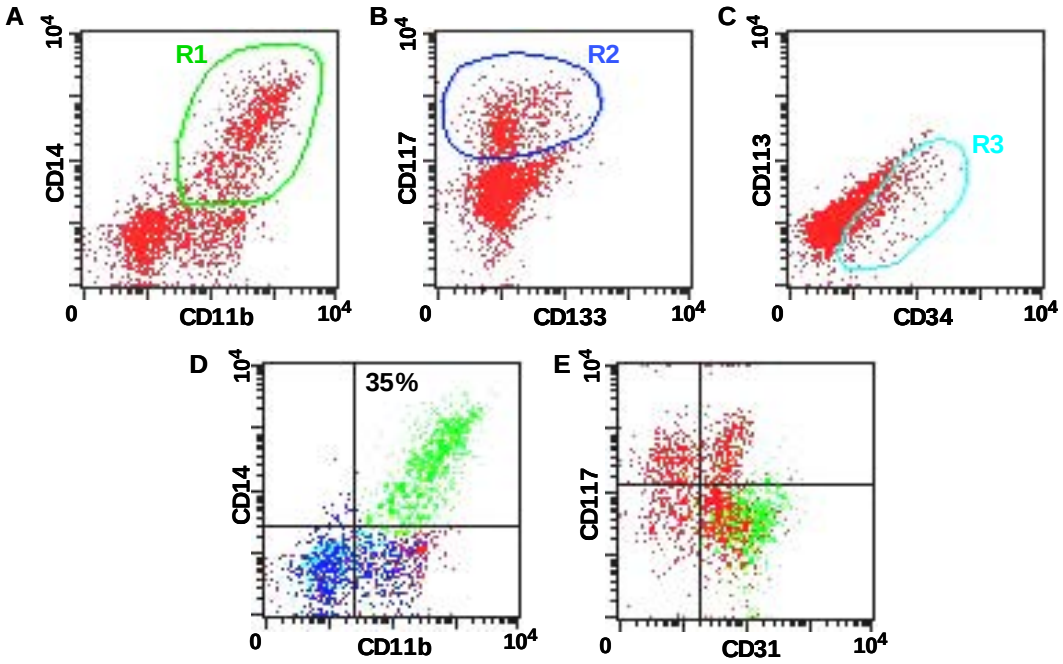


Abbildung 29: FACS-Analyse von CD14$^+$CD11b$^+$ -Zellen.
Für die Analyse der CD14$^+$CD11b$^+$-Zellen wurde das Prinzip mehrfacher Eingrenzung der Zellpopulationen eingesetzt (siehe Text).
R1- sind CD14$^+$CD11b$^+$ -Zellen
R2- sind CD117$^+$CD133$^+$-Zellen
R3-sind CD34$^+$CD133$^+$-Zellen

Diese Zellen sind in Bild D als grüne Punktwolke dargestellt. Die CD117$^+$CD133$^+$-Zellen befanden sich in Region 2 (R2, blau) und sind in Bild D blau markiert. CD34$^+$CD113$^+$-Zellen wurden in Region 3 (R3, hellblau) zusammengefasst und sind in Bild D als hellblaue Punktwolke präsentiert. Die mehrfache Eingrenzung der

Zellpopulationen (R1, R2 und R3) zeigte, dass die $CD14^+CD11b^+$-Zellen CD117, CD133 sowie CD34 nicht exprimieren. Bild E zeigt jedoch, dass die grüne Zellpopulation ($CD14^+CD11b^+$-Zellen) ebenfalls in der Region der $CD31^+$-Zellen zu finden ist. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser FACS-Analyse, dass die in Trophoblasten-konditioniertem Medium kultivierten $CD14^+CD11b^+$-Zellen folgenden Phänotyp besaßen: $CD31^+CD117^-CD133^-CD34^-$.

5.7.3. Langzeitkultivierung von $CD133^+$-Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium

Die Kultivierung von $CD133^+$-Zellen innerhalb von 7 Tagen im Trophoblastenmedium, zeigte eine deutliche Differenzierung der Stammzellen zu Zellen mit monozytären Markern. Es stellte sich die Frage, welche weitere Differenzierung der Zellen durch die längere Kultivierung im Trophoblastenmedium möglicherweise beeinflusst wird.

Während der Langzeitkultivierung wurden $CD133^+$-Zellen 4 Wochen in konditioniertem Trophoblastenmedium (1% FKS) gehalten. Ab der dritten Woche traten die Zellen untereinander in Kontakt und bildeten mehrere Zellsphäroide (Abbildung 30, Bild A und B).

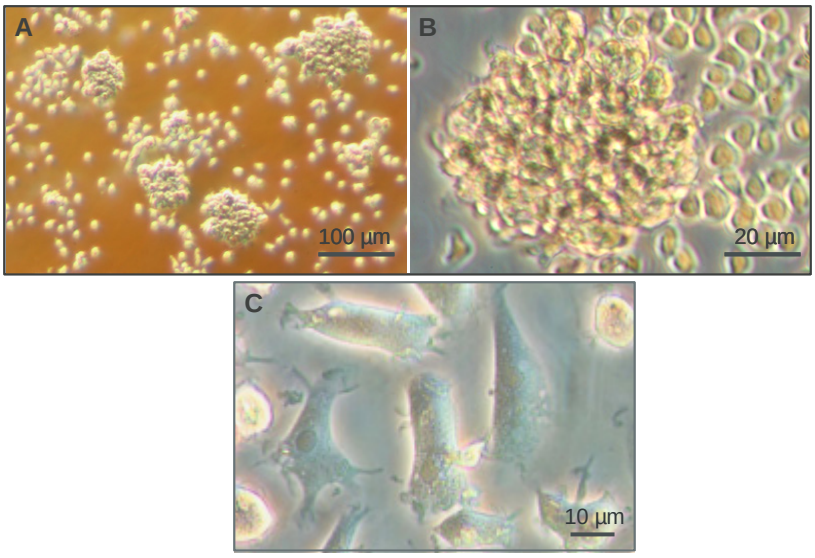


Abbildung 30: Morphologie von langzeitkultivierten $CD133^+$-Zellen.
Die $CD133^+$-Zellen wurden 4 Wochen in konditioniertem Trophoblasten-medium kultiviert. Die Zellen hafteten untereinander und bildeten nicht-adhärente Sphäroide (A: Vergrößerung 50x, B: Vergrößerung 100x). Nach anschließende 24stündiger Kultivierung in IMDM-Medium wurden die Zellen adhärent und zeigten eine endothelzellähnliche Morphologie (C, 200x Vergrößerung).

Die Zellen und die Zellsphäroide wurden jedoch nicht adhärent. Nach dem Transfer der Zellen in IMDM-Medium (1% FKS) wurden die Zellen innerhalb von 24 Stunden adhärent und breiteten sich aus (Abbildung 30, Bild C). Die Morphologie der Zellen ähnelte nun Endothelzellen.

Aufgrund der stark entwickelten Autofluoreszenz der Zellen und der sehr hohen Empfindlichkeit des FACS-Verfahrens, war die durchflusszytometrische Untersuchung nicht möglich. Die Zellen wurden mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen, bzw. Immunfluoreszenzfärbungen auf die Expression von CD68, CD144, vWF, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGF-3 untersucht.

Abbildung 31 zeigt die Färbung mit einem CD68-Antikörper. CD68, Macrosialin, ist ein spezifischer Monozyten/Makrophagenmarker. Die positive intrazelluläre Färbung mit CD68 konnte bei allen Zellen nachgewiesen werden.

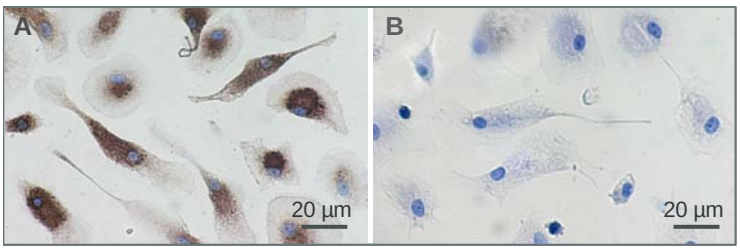


Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung von langzeitkultivierten $CD133^+$-Zellen mit einem CD68-Antikörper.
Die Zellen wurden mit einem CD68-Antikörper gefärbt (A). Als Negativkontrolle wurde die Färbung mit einem entsprechenden Isotyp-Antikörper durchgeführt (B). Die Originalbilder sind 250x vergrößert.

Bei der Färbung der langzeitkultivierten CD133$^+$-Zellen mit VEGFR-1-, VEGFR-2- und mit VEGFR-3-Antikörpern konnte eine positive Färbung für VEGFR-3, aber nicht für VEGFR-1 und VEGFR-2 nachgewiesen werden (Abbildung 32).

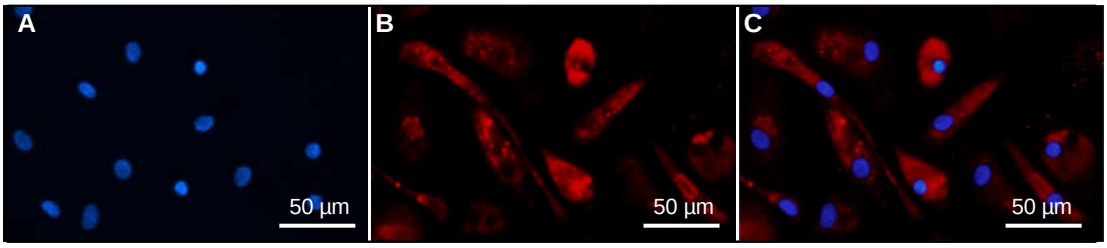


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung von langzeitkultivierten CD133$^+$-Zellen mit VEGFR-3.
Die CD133$^+$-Zellen wurden fixiert und mit anti-VEGFR-3 angefärbt (B). Die Kerne wurden mit Höchst markiert. Die Überlagerung beider Farbstoffe ist in Bild C präsentiert. Die Originalbilder sind 400x vergrößert.

Nach langzeitiger Kultivierung der CD133$^+$-Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium, konnte eine Expression von CD68- und VEGFR-3-Rezeptoren nachgewiesen werden.

5.8. CD133$^+$-Zellen und HUVEC-Endothel

In den oben beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die CD133$^+$-Zellen, nach der langzeitigen Kultivierung in konditioniertem Trophoblastenmedium, VEGFR-3 exprimierten. Im nächsten Schritt der Arbeit sollte geklärt werden, ob sich CD133$^+$-Zellen, die mit HTR-KM behandelt wurden, an der Bildung von Kapillarnetzen (z.B. mit HUVEC- human umbilical vein endothelial cells) beteiligen.

CD133$^+$-Zellen wurden nach Langzeitkultivierung mit PKH26 markiert und zusammen mit HUVEC auf eine Matrigel-Matrix gegeben. Als Kontrolle dienten CD133$^+$-Zellen, die parallel in IMDM-Medium mit Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Nach 14 Stunden formten die HUVEC ein Kapillarnetz, in das CD133$^+$-Zellen eingebaut wurden. CD133$^+$-Zellen, die vorher in IMDM-Medium mit Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, wurden in HUVEC-Kapillarstrukturen nicht involviert (Abbildung 33).

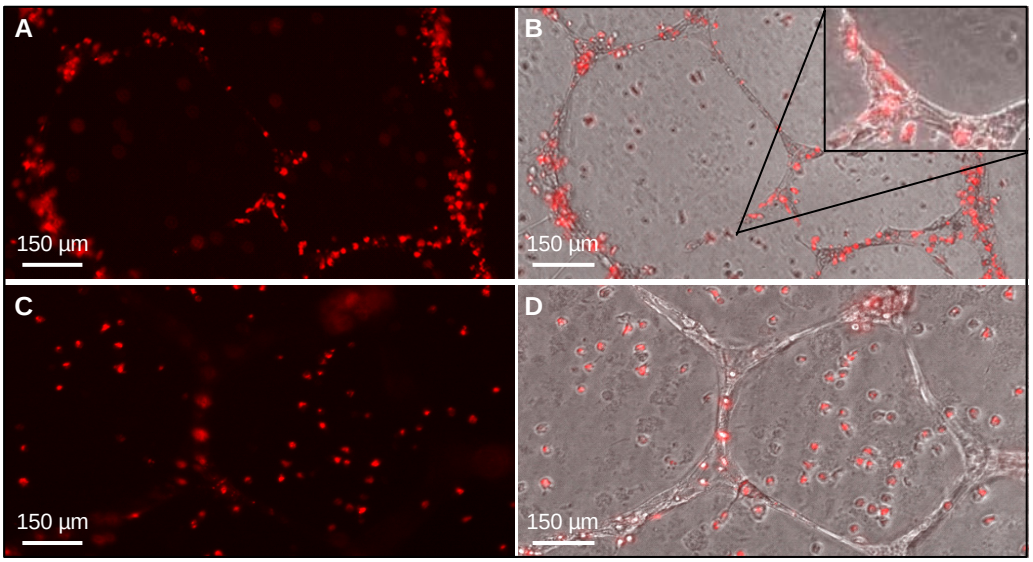


Abbildung 33: *Tube Formation Assay* mit HUVEC und CD133$^+$-Zellen.
Die CD133$^+$-Zellen wurden nach Langzeitkultivierung mit PKH26 markiert und zusammen mit HUVEC auf eine Matrigel-Matrix gegeben. HUVEC formten ein Kapillarnetz, in das CD133$^+$-Zellen eingebaut wurden (A: nur Fluoreszenz Bild; B: Fluoreszenzbild mit Phasenkontrast). CD133$^+$-Zellen, die vorher in IMDM-Medium mit Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, wurden in HUVEC-Kapillarenstrukturen nicht involviert (A: nur Fluoreszenzbild; B: Fluoreszenzbild mit Phasenkontrast). Originalbinder sind 100x vergrößert.

5.9. 3-D-Sphäroid-Modell zur Untersuchung der plazentaren Vaskulogenese

Für die Entwicklung eines neuen experimentellen Modells zur Untersuchung der plazentaren Gefäßbildung wurde ein bereits etabliertes Sphäroid-Modell von Korff herangezogen und modifiziert (Korff *et al*., 2004).

Die Bildung von Sphäroiden wurde mit Hilfe eines *Live imaging*-Systems im Zeitverlauf aufgenommen. Es konnte beobachtet werden, dass die CD133$^+$-Zellen unter dem Einfluss von Zytotrophoblasten aneinander hafteten und in die Trophoblast-Sphäroid-Struktur als „Inseln“ eingebaut wurden. Nach Einbettung der Sphäroide in eine Kollagen-Matrix konnte eine invasive Migration von Zytotrophoblasten beobachtet werden (Abbildung 34).

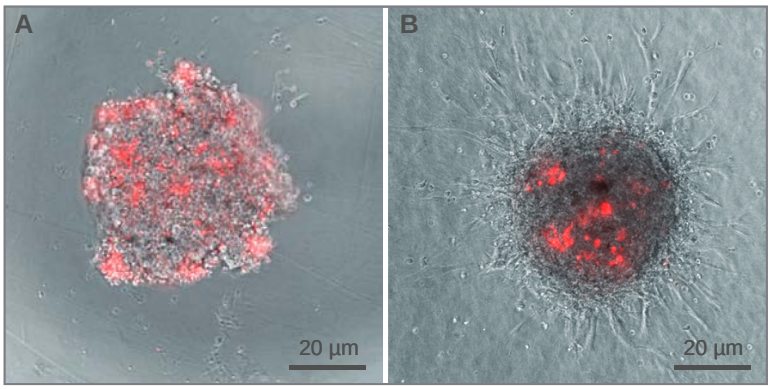


Abbildung 34: Sphäroid-Modell.
$CD133^+$-Zellen wurden mit PKH26 (rote Zellen) markiert und für die Sphäroidbildung zusammen mit Zytotrophoblasten (unmarkierte Zellen) 24 Stunden kultiviert (A). Die gebildeten Sphäroide wurden in eine Kollagen-Matrix eingebettet. Es konnte eine invasive Migration von Zytotrophoblasten beobachtet werden (B). Originalbilder sind 100x vergrößert.

Nach dem Schneiden der fixierten Kollagen-Gele wurde die innere Struktur der Sphäroide untersucht. Die Zellen im Sphäroid bildeten ein Zellnetz, das eine starke Ähnlichkeit mit der Struktur der frühen plazentaren Zotten aufweist (Abbildung 35).

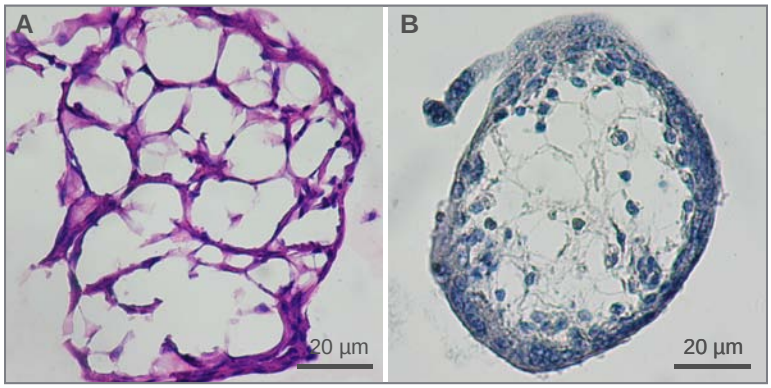


Abbildung 35: Querschnitt durch ein Sphäroid (A, HE-Färbung) und eine Plazentazotte (B, Hämatoxilin-Färbung). Die Originalbilder sind 200x vergrößert.

6. DISKUSSION

6.1. Plazentarer Angioblast

Bei der plazentaren Gefäßentwicklung, genauso wie bei der embryonalen Vaskulogenese, steht der Angioblast im Mittelpunkt (Zygmunt, 2001; Zygmunt *et al*., 2003; Kaufmann *et al*., 2004; Demir *et al*., 2006). Es gibt in der zum gegenwärtigen Zeitpunkt vorliegenden Literatur keine Angaben über die Herkunft der plazentaren Angioblasten.

$CD133^+$-Zellen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen als Hämangioblasten im erwachsenen Organismus genannt. Diese Zellen besitzen Fähigkeiten der pluripotenten Zellen und lassen sich in endotheliale und hämatopoetische Vorläuferzellen differenzieren (de Wynter *et al*., 1995; Yin *et al*., 1997; Peichev *et al*., 2000; Gehling *et al*., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass $CD133^+$-Zellen aus Nabelschnurblut plazentare Angioblasten sein könnten. Die nähere Charakterisierung dieser Zellen zeigte, dass $CD133^+$-Zellen die Stammzellmarker CD34 und CD117 exprimierten und gleichzeitig die Expression von einem typischen hämatopoetischen CD45-, sowie einem endothelialen CD31-Rezeptor zeigten. Durch die Stimulation mit Angiogenesefaktoren wie VEGF, EGF, bFGF und IGF-1 konnten $CD133^+$-Zellen in endothelähnliche Zellen differenziert werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass $CD133^+$-Zellen mehrere Pluripotenzmarker wie *Oct-4*, sowie *Sox-1*, *Sox*-2, *Rex-1* und *FGF-4* besitzen.

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente war aus der Literatur bekannt, dass sich die Expression von *Oct-4* nur auf pluripotenten, undifferenzierten Zellen nachweisen lässt (Palmieri *et al*., 1994; Schöler *et al*., 1990). Interessant ist die Tatsache, dass die Expression von *Oct-4* im Embryo im extraembyonalem Mesoderm, dem Ort der Bildung der Angioblasten, am stärkstem detektiert wurde (Niwa *et al*., 2000). Furuta und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in der *Oct-3/4*/CD31-positiven Zellpopulation im Maus-Embryo die meisten Angioblasten vorkommen (Furuta *et al*., 2006). Der in der vorliegender Arbeit geführte Nachweis von Oct-4 in $CD133^+$-Zellen konnte bestätigen, dass die Stammzellen aus Nabelschnurblut ein höheres Pluripotenzpotenzial besitzen (Baal *et al*., 2004).

Nach der immunhistochemischen Untersuchung der Plazentagefäße im Rahmen dieser Arbeit, konnte festgestellt werden, dass die plazentaren Endothelzellen ein

ähnliches Muster von Oberflächenmolekülen wie die CD133$^+$-Zellen aufweisen. Sowohl CD133$^+$-Zellen aus Nabelschnurblut, als auch Endothelzellen aus der Plazenta exprimierten CD34 und CD31 Rezeptoren. Die Expression dieser Proteine wurde bei Angioblasten beschrieben (Gehling *et al*., 2000; Schmeisser und Strasser, 2002). Diese Ergebnisse stehen der Hypothese von der Abstammung der plazentaren Endothelzellen von CD133$^+$-Zellen nahe.

6.2. Interaktionen zwischen CD133$^+$-Zellen und Trophoblasten *in vitro*

Die Angioblasten wandern ab dem 15. Tag *p.c.* in sekundäre Zotten ein und differenzieren in der Folge, um sich zu einem ersten Gefäßnetzwerk zusammenzulagern.

Bei der Untersuchung der Lokalisation der ersten Blutgefäße in der Plazenta konnte festgestellt werden, dass sich die CD34-positiv angefärbten Strukturen (primitive Kapillaren) in unmittelbarer Nähe von Zytotrophoblasten befanden. Welche Zellen und humorale Faktoren die Migration und die Differenzierung der Angioblasten vermitteln, ist bisher ungeklärt. Durch die Expression zahlreicher Angiogenese-faktoren scheint der Trophoblast eine entscheidende Rolle bei diesen Vorgängen einzunehmen (Kingdom *et al*., 2000; Anson-Cartwright *et al*., 2000).

Basierend auf eigenen Erkenntnissen und Literaturangaben wurde die Hypothese erstellt, dass der Trophoblast eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen, sowie bei der Entstehung eines primitiven Netzwerkes spielen könnte.

6.2.1. Isolierung und Kultivierung von Trophoblasten

Für die Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen CD133$^+$-Zellen und Zytotrophoblasten (Syn. Trophoblasten), sollten im Rahmen dieser Arbeit Zytotrophoblasten aus früheren Plazenten (bis zur 11. SSW) aufgereinigt werden. Als wichtiger Aspekt sollte berücksichtigt werden, dass nur sehr geringe Mengen des Ausgangsmaterials zu Verfügung standen (maximal 3 g Gewebe).

Die meistbeschriebene Isolierungsmethode von Zytotrophoblasten wurde von Kliman entwickelt (Kliman *et al*., 1986). Das Aufreinigungsverfahren beruht auf einem enzymatischen Trypsin/DNAse-Verdau mit anschließender Auftrennung der verschiedenen Zellpopulationen mit Hilfe des Percoll-Gradienten (Kliman *et al*., 1986). Der wesentliche Nachteil der Methode war eine nicht ausreichende Reinheit

der isolierten Zellen (60% Cytokeratin-7 positiven Zellen). Durch die Gradientzentrifugation ging ein großer Anteil der Zellen verloren, so das die Ausbeute der Zytotrophoblasten gering war (2-3 x 10^6 Zellen/pro 1 g Gewebe) (Frank *et al*., 2000).
Um die Reinheit der isolierten Zellen zu erhöhen, wurden von anderen Arbeitsgruppen zusätzliche Aufreinigungsschritte eingeführt. Nagamatsu und Mitarbeiter verwendeten nach der Percoll-Zentrifugation anti-CD9-markierte Dynabeads für die Entfernung der Fibroblasten, Makrophagen und extravilösen Zytotrophoblasten aus der Zytotrophoblastenpopulation (Nagamatsu *et al*., 2004). Bei einer anderen Methode wurden anti-CD45- und anti-HLA II-markierte Dynabeads eingesetzt. Nach der negativen Selektion mit CD45-Dynabeds wurde eine Reinheit der isolierten Zellen bis zu 70% erreicht (Manoussaka *et al*., 2005). Durch die zusätzlichen Schritte kam es zu einer höheren Reinheit, aber die Menge der isolierten Zellen wurde entsprechend kleiner.
Bei der Aufreinigungsmethode, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, wurde die magnetische Zellseparation (MACS) mit anti-CD326-markierten MicroBeads eingesetzt. Das CD326 Antigen wird von epithelialen Zellen und Tumorzellen epithelialen Ursprungs extrazellulär exprimiert. Es wird auch als epitheliales zellspezifisches Adhäsionsmolekül (EpCAM) oder als humanes epitheliales Antigen (HEA-125) bezeichnet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cytokeratin-7-positiven Zytotrophoblasten eine gleichzeitige Expression von CD326-Rezeptoren aufweisen. Dieses Ergebnis ermöglichte den Einsatz von CD326-markierten MicroBeads für die Aufreinigung der Trophoblasten. Aufgrund der sehr hohen Spezifität der CD326-Antikörper, konnte die Separation der Zellen mit MicroBeads direkt nach dem enzymatischen Verdau durchgeführt werden. Ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt mit Percoll-Gradient war nicht notwendig. Die Reinheit der isolierten Zellen lag bei 87-95% und die Zellzahlrate der isolierten Zytotrophoblasten betrug 4-6 x 10^6 Zellen pro 1g Gewebe. Die in dieser Arbeit etablierte Methode zeigte sich hoch qualitativ und spezifisch und ermöglichte die Zytotrophoblastengewinnung in höheren Mengen.
Zum Zeitpunkt der Versuche beschrieben sämtliche Veröffentlichungen, dass eine Langzeitkultivierung von Zytotrophoblasten nicht möglich sei, da Zytotrophoblasten *in vitro* eine schnelle spontane Synzytiumbildung aufweisen. Nach Angaben von Kliman wandelten sich Zytotrophoblasten nach 72-120 Stunden in Kultur zum Synzytium um (Kliman *et al*., 1986). Eine Serumreduktion im Kultivierungsmedium

konnte die Ausbildung des Synzytiums verlangsamen (Kao *et al*., 1988). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Reduktion des Ca^{2+}-Gehalts (weniger als 0,1mM) im Medium zu einer längeren Kultivierung von Zytotrophoblasten ohne Ausbildung von multinukleären Zellen (6 Tagen) führte (Nagamatsu *et al*., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Langzeitkultivierung von Zytotrophoblasten durch den Einsatz von serumfreiem AmnioMax^{TM}-100 Medium erreicht. Die Zytotrophoblasten bildeten bis zur Passage 5 kein Synzytium und zeigten trotz Serumreduktion eine starke Proliferation. Der höhere Ca^{2+}-Gehalt im AmnioMax^{TM}-100 Medium (1,4mM) zeigte keine Auswirkung auf die Synzytium-bildung.

6.2.2. Einfluss von Trophoblasten auf CD133$^+$-Zellen

In diesem Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob der Trophoblast die Migration, Adhäsion und das Proliferationsverhalten von CD133$^+$-Zellen beeinflusst, und ob die Interaktionen zwischen Trophoblasten und CD133$^+$-Zellen zur endothelialen Differenzierung der letzteren führen kann.

Die Interaktionen zwischen Trophoblasten und CD133$^+$-Zellen wurde durch die Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Migration der CD133$^+$-Zellen durch die Zugabe von Trophoblastenmedium stark induziert war. Der positive Einfluss von Trophoblasten auf die Stammzellmigration, ist in der gegenwärtigen Literatur nicht beschrieben. In einer Studie von Drake wurde gezeigt, dass konditioniertes Trophoblastenmedium die Migration von maternalen Lymphozyten erhöhte (Drake *et al*., 2001). Die Migration wurde durch ein von Zytotrophoblasten produziertes Chemokin, MIP-1-alpha (monocyte inflammatory protein), reguliert. Außerdem ist bekannt, dass der Trophoblast mehrere angiogene Faktoren (VEGF-A, Ang-2 und PlGF), die die Migrationsprozesse der Zellen beeinflussen, in ausreichenden Mengen produziert. Ang-2 stimulierte die Migration von Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen (Mochizuki *et al*., 2002; Gill und Brindle, 2005; Harfouche und Hussain, 2006). Für VEGF und PlGF wurde eine regulatorische Wirkung bei der Migration der mesenchymalen Stammzellen beschrieben (Mac und Popel 2004; Fiedler *et al*., 2005; Li *et al*., 2006). Die beobachteten Effekte von konditioniertem Trophoblastenmedium auf die Migration der CD133$^+$-Zellen könnten auf die mögliche Wirkung dieser Faktoren in konditioniertem Medium zurückgeführt werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Trophoblasten auf die Adhäsion der $CD133^+$-Zellen stellte sich heraus, dass $CD133^+$-Zellen deutlich besser an Trophoblasten adhärierten, obwohl die Stammzelladhäsion an plazentare Stromazellen stärker war. Eine stärkere Adhäsion von $CD133^+$-Zellen an Stromazellen konnte durch verschiedene Mechanismen der Interaktion zwischen Stammzellen und Stroma geklärt werden. Nach Literaturangaben scheint das SDF-1/CXCR4 System bei Migrations-Adhäsionsprozessen der Stammzellen eine wichtige Rolle zu spielen. SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) wird von Stromazellen (stromalen Fibroblasten) produziert und ist als Chemoatraktant, der eine homing-spezifische Migration von Stammzellen bewirkt, für die hämatopoetischen Vorläufer, bekannt. Als ein spezifischer Rezeptor für SDF-1 gilt der CXCR4 Rezeptor, der vor allem auf Stammzellen exprimiert wird (Aiuti *et al*., 1999). Eine Wechselwirkung zwischen CXCR4 und β_2-Integrinen erlaubt eine adhäsionsabhängige Wanderung der hämatopoetischen Zellen auf der Oberfläche der Stromazellen im Knochenmark (Nakata *et al*., 2006). In unserer Arbeitsgruppe konnte die SDF-1 Expression im Zytotrophoblast, als auch in plazentaren Stromazellen nachgewiesen werden. Wobei die Konzentration von SDF-1 im Stroma signifikant höher war als im Trophoblasten (McKinnon *et al*., Manuskript in Vorbereitung). Diese Ergebnisse könnten eine stärkere Adhäsion auf Stromazellen erklären. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung der $CD133^+$-Zellen in konditioniertem plazentaren Fibroblastenmedium zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen ICAM-I und VCAM auf den $CD133^+$-Zellen führte (Horndasch *et al*., Manuskript im Vorbereitung).

Die Initialisierung des Gefäßaufbaus beginnt mit der Proliferation der endothelialen Zellen am Ort der Gefäßbildung. Bei der Untersuchung der Proliferation von $CD133^+$-Zellen unter Zugabe von konditioniertem Trophoblastenmedium konnte festgestellt werden, dass konditioniertes Trophoblastenmedium die Proliferation in den ersten drei Tagen konzentrationsabhängig induzierte. Nach dem dritten Kultivierungstag im konditionierten Trophoblastenmedium konnte kein exponentieller Anstieg der Proliferation beobachtet werden, aber die $CD133^+$-Zellen konnten im Trophoblastenmedium trotz Serumreduktion über längere Zeit überleben. Dies könnte auf eine antiapotopische Wirkung des Mediums hinweisen. Die vermutete antiapoptotische Wirkung des Trophoblastenmediums wurde mit Hilfe des Apoptose-Assays bestätigt. Diese Ergebnisse stimmten mit den Literaturangaben überein. *In*

vitro Studien zeigten, dass humane Zytotrophoblasten einen positiven Einfluss auf die Proliferation uteriner Endothelzellen haben und sie vor Apoptose schützen (Zhou *et al*., 2003). Die im weiteren Verlauf beobachtete Reduktion der trophoblasteninduzierten Proliferation, kann in unseren Augen mit der Enddifferenzierung der Zellen einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bestandteile des konditionierten Trophoblastenmediums nicht untersucht. Als ein möglicher Faktor, der die beschriebenen Prozesse beeinflussen könnte, wurde Wirkung von hCG auf $CD133^+$-Zellen getestet. Unseren eigenen Untersuchungen konnte entnommen werden, dass schwangerschafts- bzw. trophoblastspezifische Faktoren wie hCG, AFP oder IGF-II eine wichtige Rolle bei der vaskulären Morphogenese der fetomaternalen Einheit spielen können (Zygmunt *et al*., 2002; Herr *et al*., 2003; Liang *et al*., 2004). Es wurde bereits nachgewiesen, dass hCG die Proliferation der plazentaren Endothelzellen induziert, die Zellen vor Apoptose schützt und die Kapillarformation im *sprouting-assay* induziert (Herr *et al*., 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die hCG-Rezeptor Expression auf $CD133^+$-Zellen nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von hCG wurde die Proliferation der $CD133^+$-Zellen dosisabhängig induziert. Ein Einfluss von hCG auf Apoptose und Migration von $CD133^+$-Zellen konnte nicht festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass der Einfluss von Trophoblasten auf $CD133^+$-Zellen auf unterschiedliche Faktoren zurückgeführt werden muss.

Als ein weiteres Verfahren zur Aufklärung, welche Faktoren die beschriebenen Effekte hervorrufen könnten, sollten in Zukunft 2-D Gele mit Proteinextrakten aus konditioniertem Trophoblastenmedium durchgeführt werden. Durch die Sequenzierung der auf dem Gel aufgetrennten Proteine, konnten die von Trophoblasten sezernierten Faktoren näher charakterisiert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits erste Versuche zur Untersuchung von konditioniertem Medium durchgeführt. Die Analyse des konditionierten Mediums von Jeg-3-Zellen (Chorionkarzinom-Zelllinie, ein Modell für Trophoblasten) konnte gezeigt werden, dass dieses konditionierte Medium große Mengen von biologisch aktiven Substanzen enthält.

6.2.3. Phänotypische Charakterisierung der CD133$^+$-Zellen unter dem Einfluss von konditioniertem Trophoblastenmedium

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass Zytotrophoblasten die Migration, Proliferation und Adhäsion der CD133$^+$-Zellen beeinflussen. Als nächster Schritt dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die Interaktion mit Trophoblasten die Differenzierung von CD133$^+$-Zellen zu Endothelzellen induziert werden kann.

Durch die Kultivierung der CD133$^+$-Zellen innerhalb von 7 Tagen in konditioniertem Trophoblastenmedium konnte festgestellt werden, dass die CD133$^+$-Zellen zu den Zellen mit monozyten/makrophagen-spezifischen Marker differenzieren. Die Zellen zeigten eine negative Regulation von Stammzell-spezifischen Markern aber eine positive Regulation von CD11b- und CD14-Rezeptoren. Die unter dem Einfluss von Trophoblastenmedium differenzierten CD11b$^+$CD14$^+$-Zellen zeigten eine gleichzeitige Expression von CD31-Rezeptor.

Die Expression von CD31 auf den unter dem Einfluss von Trophoblastenmedium differenzierten Zellen scheint sehr wichtig zu sein. CD31 (PECAM-1) ist ein Transmembran-Glykoprotein und Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie (Ig-Cam). Als in erster Linie endothelzellspezifisches Adhäsionsmolekül ist es vorwiegend an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Eine geringere Expression konnte auch an Knochenmarksstammzellen, Leukozyten, T-Lymphozyten, Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden (Robson, 2001). CD31 ist an der Entwicklung des primären vaskulären Plexus aus embryonalen Blutinseln beteiligt. Im Verlauf der Differenzierung von Angioblasten zu Endothelzellen, zeigt sich CD31 als erstes nachweisbares Adhäsionsmolekül an der Oberfläche der Endothelzellen (Pinter *et al*., 1997; Drake und Fleming, 2000). Während der Ontogenese spielt die Präsenz von CD31-Rezeptoren zunächst nicht nur für Endothelzellen eine Rolle, sondern offenbar für die meisten nicht differenzierten embryonalen Stammzellen. Einige Studien zeigten, dass die Zellen der inneren Zellmasse der embryonalen Blastozyste, CD31 an ihren intrazellulären Domänen exprimieren (Drake und Fleming, 2000; Robson, 2001; Furusawa *et al*., 2004). Von diesen Zellen stammen die nicht-differenzierten embryonalen Stammzellen ab. Da CD31 bei den nicht-differenzierten embryonalen Stammzellen ausschließlich an den Zellgrenzen lokalisiert ist, geht man davon aus, dass das Molekül zu diesem frühen Zeitpunkt dazu dient, die Formation des Zellclusters zu stabilisieren, um den pluripotenten Charakter der Zellen zu garantieren. Diese Erkenntnisse bestätigten sich in *in vitro*

Untersuchungen. Die Gruppe von Li fand heraus, dass undifferenzierte murine embryonale Stammzellen Zellcluster bildeten. Bis zu 95% der undifferenzierten Zellen innerhalb der Cluster exprimierten CD31. Während den folgenden Differenzierungsschritten wurde die Expression von CD31 zunächst rapide herunterreguliert. Danach folgte die Zunahme der CD31-mRNA-Expression innerhalb dieser Zellen. Bei Zugabe angiogener Faktoren organisierten sich bis zu 70% der embryonalen Stammzellen in einem Netzwerk vaskulärer Strukturen, welche CD31 exprimierten (Li *et al*., 2005).

Ein monozytenähnlicher Phänotyp der unter dem Einfluss von Trophoblastenmedium differenzierten Zellen konnte in unseren Augen als eine Differenzierungstufe zu den endothelialen Zellen betrachtet werden. Neuere Erkenntnisse zeigten eine sehr enge Verwandtschaft zwischen endothelialen und monozytären Zellen. Verschiedene Zelloberflächenmarker wie CD14 und CD105 kommen auf beiden Zelltypen vor. Es konnte nachgewiesen werden, dass der als monozytenspezifisch geltende Marker CD14 auch auf HUVEC zu finden ist (Jersmann *et al*., 2001). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in einer Untergruppe CD14-positiver Monozyten CD34-negative Angioblasten definieren (Fernandez *et al*., 2000; Moldovan *et al*., 2000; Harraz *et al*., 2001; Schmeisser und Strasser, 2001). Solche Zellen vermögen unter proangiogenen Wachstumsbedingungen *in vitro* endotheliale, tubuläre Strukturen zu bilden. Das antigene Profil der Zellen entspricht zum einen den Endothelzellen (Expression spezifischer Endothelzellmarker), zusätzlich erscheinen aber auch Monozyten-spezifische Antigene auf der Oberfläche, wie z.B. CD68, CD80, CD45 und CD36. Außerdem konnten funktionelle Eigenschaften des Endothels in diesen, aus Monozyten generierten Kulturen nachgewiesen werden, wie z.B. die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). *In vivo* Experimente bestätigten diese Ergebnisse, indem $CD14^{+}CD34^{-}$-Monozyten bzw. Makrophagen in ischämischem Gewebe gefäßähnliche Kanäle ausbildeten (Moldovan *et al*., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass aus dem peripheren Blut isolierte $CD14^{+}$-Zellen, die die endothelialen Antigene vWF, VE-Cadherin oder Tie-2 nicht exprimierten, sich unter dem Einfluss von VEGF *in vitro* in Endothelzellen (*trans*)-differenzierten (Fernandez *et al*., 2000). $CD14^{+}$-Monozyten konnten erfolgreich zur Reendothelialisierung von durch Ballondilatation verletzten Gefäßwänden von Ratten eingesetzt werden (Fujiyama *et al*., 2003).

Auch Makrophagen scheinen eine wichtige regulatorische Funktion auf die Differenzierung und Reifung der endothelialen Zellen zu vermitteln (Hur *et al*., 2004; Neumüller *et al*., 2006). Sie produzierten wichtige angiogene Faktoren VEGF A und Ang-2 (Geva *et al*., 2002). Dagtekin und Kollegen konnten zeigen, dass konditioniertes Makrophagenmedium die Proliferation von Endothelzellen und die Aussprossung der Kapillaren aus plazentaren Gefäßfragmenten *in vitro* positiv, sowie negativ z.B. durch Angiotensin-1-Produktion beeinflussen konnte (Dagtekin *et al*., 2003). Mehreren Literaturangaben zufolge scheint der Monozyt/Makrophage eine besondere Zelle zu sein, die eine sehr hohe Plastizität besitzt und in der Lage ist, sich unter bestimmten Bedingungen in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren (Harraz *et al*., 2001; Moldovan 2005; Thorgeirsson und Grisham 2006).

In einem weiteren Schritt der Arbeit wurde postuliert, dass die durch den Einfluss von konditioniertem Trophoblastenmedium entstandenen $CD14^+CD11b^+CD31^+$-Zellen, durch die langzeitige Kultivierung im Trophoblastenmedium zu Endothelzellen differenzieren könnten. Nach vierwöchiger Kultivierung der Zellen im Trophoblastenmedium konnte beobachtet werden, dass die Zellen ihr Verhalten in Kultur ändern. Die Zellen hafteten aneinander und bildeten mehrere Zellsphäroide. Die Sphäroidbildung wurde nicht näher untersucht. Es konnte nur vermutet werden, dass die Zellen den „embryoid bodies“ ähnlichen Strukturen bildeten. Nach dem Transfer der Zellen aus dem konditionierten Trophoblastenmedium in IMDM-Medium adhärierten Zellen und zeigten eine endothelzellähnliche Morphologie. Diese Zellen exprimierten CD68 und VEGFR-3 und konnten in die von HUVEC gebildeten Kapillarnetze eingebaut werden. Es kann angenommen werden, dass Stammzellen durch den Kontakt mit den vom Trophoblasten freigesetzten Faktoren die Fähigkeit erwerben, sich an der Vaskulogenese bzw. Angiogenese zu beteiligen.

In der gegenwärtigen Literatur gibt es keine Angaben zu endothelialen Vorläufer-zellen, die eine gleichzeitige Expression von monozyten-makrophagen-spezifischen Markern und einem endothelialen VEGFR-3-Rezeptor zeigen. Ein ähnlicher Phänotyp wurde auf aktivierten tumorassoziierten Makrophagen beschrieben. Diese Zellen beteiligen sich bei der peritumoralen Lymphangiogenese und vermitteln dadurch die Metastasierung des Tumors (Schoppman *et al*., *2002*).

VEGFR-3 (Flt-4) gehört zu der VEGF-Rezeptor Familie. Die regulatorischen Funktionen von VEGFR-1, VEGFR-2 und dem entsprechenden Ligand VEGF-A sind gut erforscht. Als Liganden für VEGFR-3 gelten VEGF-C und VEGF-D. VEGF-C

sowie VEGF-A konnten in der Plazenta im ersten und zweiten Schwangerschaftstrimester nachgewiesen werden, wobei die Lokalisation von VEGF-A vorwiegend in Plazentazotten, auf Gefäßen und Stromazellen und die Lokalisation von VEGF-C auf den Zytotrophoblasten detektiert wurde (Zhou *et al*., 2002).

Früher wurde angenommen, dass VEGFR-3 nur in lymphatischen Gefäßen exprimiert wird. Dumont konnte eine Expression von VEGFR-3 auf den vaskulären Endothelzellen in der früheren Embryogenese nachweisen (Dumont *et al*., 1998). VEGF-C und VEGFR-3 werden im Mäuseembryo bereits exprimiert bevor VEGFR-2 auftritt. Eventuell spielt daher VEGF-C/VEGFR-3-System eine Rolle in der frühen Blutgefäßbildung und erst später in der Lymphangiogenese (Kukk *et al*., 1996). In einem VEGFR-$3^{-/-}$-Mausmodel konnte gezeigt werden, dass VEGFR-3 eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von endothelialen Zellen, beim Aufbau des primitiven Gefäßnetzes und später bei der Formation der großen Gefäße spielte. VEGFR-$3^{-/-}$-Maus Embryonen zeigten 100% Letalität. Die Vaskulatur im Dottersack wurde nicht entwickelt, im perineuronalen Plexus fehlten die aus großen und kleineren Gefäßen aufgebauten Gefäßbäume, die Perikardhöhle wurde mit Flüssigkeit gefüllt und die Herzentwicklung blieb aus (Dumont *et al*., 1998). Hamada konnte in einer Explantkultur von paraaortalem splanchnopleuralem Mesoderm zeigen, dass das VEGF-C/VEGFR-3-System eine essentielle Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von vaskulären endothelialen und hämatopoetischen Zellen in der früheren Embryogenese spielt. VEGF-C stimulierte die Vaskulogenese und supprimierte die Hämatopoese. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von VEGF-C an VEGFR-3 die VEGFR-2 vermittelte Signaltransduktion reguliert (Hamada *et al*., 2000). Die regulatorischen Effekte von VEGF-C sind nicht nur bei der Vaskulogenese, sondern auch bei der Morphogenese wichtig. Die Anwesenheit von VEGF-C war bei der Bildung von Endoderm im Zebrafisch erforderlich (Ober *et al*., 2004). Das VEGF-C/VEGFR-3 System scheint auch bei der Tumorentwicklung wichtig zu sein. In experimentellen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass einige besonders bösartigen Tumorzellen (A431, MDA-MB-231 und OVCAR) eine starke Expression von VEGF-C/VEGFR-3 aufwiesen (Laakkonen *et al*., 2007). Mehrere Studien zeigten, dass die intratumorale und peritumorale Lymphaniogese und Metastasierung des Tumors in die regionalen Lymphknoten von der VEGFR-3 Expression abhängig waren (Mandriota *et al*., 2001; Karpanen *et al*., 2001; Stacker *et al*., 2001; Skobe *et al*., 2001; Mattila *et al*., 2002).

Durch die Inhibierung von VEGFR-3 und die Ausschaltung der VEGF-C Signaltransduktion konnten beide Prozesse aufgehoben werden (Skobe *et al*., 2001; He *et al*., 2002; Krishnan *et al*., 2003; Lin *et al*., 2005). Eine vor kurzem erschienene Publikation belegte, dass VEGFR-3 nicht nur in Lymphgefäßen des Tumors, sondern auch in den Blutgefäßen vorhanden war (Laakkonen *et al*., 2007). Zusammenfassend konnte gesagt werden, dass das VEGF-C/VEGFR-3-System in sehr frühen Vaskulogeneseprozessen eine entscheidende Rolle spielt. Die positive Regulation der VEGFR-3 Expression in $CD133^+$-Zellen durch konditioniertes Trophoblastenmedium gibt Anlass zu der Vermutung, dass der Trophoblast in der frühen Vaskulogenese durch das VEGF-C/VEGFR-3-System an der Rekrutierung und Differenzierung der Angioblasten beteiligt sein könnte. Dadurch könnte die Tatsache, dass die Interaktion mit dem Trophoblasten zu keiner positiven Regulation von VEGFR-1 und VEGFR-2 auf den $CD133^+$-Zellen führte, geklärt werden.

Die phänotypischen Merkmale der unter dem Einfluss von Trophoblasten entstandenen Zellen unterschieden sich von dem klassischen Phänotypmuster der endothelialen Vorläuferzellen. Die differenzierten $CD133^+$-Zellen zeigten keine Expression von vWF und CD144.

Eine fehlende Expression des von Willebrand Faktors, kann durch die hohe Heterogenität der vWF-Expression in endothelialen Zellen erklärt werden. Das Verteilungsmuster des von Willebrand-Faktors wurde eingehend von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Dabei konnte aufgedeckt werden, dass der von Willebrand Faktor in glomerulären Kapillaren der Niere und im sinusoidalen Endothel der Leber nicht nachweisbar ist (McCarthy *et al*., 1991). Im Endothel des venösen Schenkels wird der vWF in höheren Mengen exprimiert, als im arteriellen (Smith *et al*., 1996; Yamamoto *et al*., 1998). Auch große Gefäße und das Endothel des Endokards exprimieren den vWF stärker als kleine Gefäße (Smith *et al*., 1996).

Im Adhäsionsmechanismus, der für die Stabilität von Endothelzellkontakten sorgt, wird auch das endothelspezifische Mitglied der Familie der Cadherine CD144 (VE-Cadherin) beteiligt. Durch die VE-Cadherin-Kontakte werden die Endothelzellen fest miteinander verbunden. Diese Bindungen ermöglichen die mechanische Belastbarkeit und die Ausbildung einer Permeabilitätsbarriere. VE-Cadherin spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Gefäßbildung. VE-Cadherin defiziente Mäuse entwickelten kein Gefäßsystem, so dass die Embryonen am Tag 9,5 starben. Dabei verlief die initiale Bildung der Gefäße (Vaskulogenese) bei diesen Mäusen

völlig normal. Vielmehr scheint VE-Cadherin eine Funktion als Signalmolekül für die weitere Entwicklung und korrekte Proliferation der Endothelzellen zu übernehmen (Butz und Kemler, 1994). Nach unserer Arbeitshypothese initialisiert der Trophoblast die ersten Angioblasten mit anschließender Aktivierung der Vaskulogenese. Wenn es sich, bei den unter dem Einfluss von Trophoblasten entwickelten Zellen um frühe Angioblasten handelt, dann ist es möglich, dass es zu keiner CD144-Expression dieser Zellen kommt.

Die beobachteten Effekte von Trophoblasten auf $CD133^+$-Zellen wurden vor allem durch die löslichen Faktoren, die in konditioniertem Medium vorhanden sind, vermittelt.

Für die Determination der Angioblasten spielen die Zell-Zell-Interaktionen eine besonders wichtige Rolle. In den beschriebenen Ko-Kultur-Systemen werden Zellen zusammen in einem Monolayer (2-D-Modell) kultiviert. Die zusätzliche Einbringung von Matrixkomponenten ins System ist nicht optimal. Bei den Differenzierungsprozessen der Stammzellen, scheinen dreidimensionale Bedingungen sehr wichtig zu sein. Es ist bekannt, dass die Kultivierung adhärenter embryonaler Stammzellen in dreidimensionaler Matrix unter entsprechenden Bedingungen zur Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen führen kann (Flamme und Risau, 1992). Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte 3-D-Sphäriod-Modell kann die Untersuchungen der plazentaren Vaskulogenese (Stammzellen-Trophoblast-Interaktionen) auf einem *in vivo* ähnlichen Niveau ermöglichen. Durch das Einbringen von Trophoblasten, Stammzellen und plazentaren Fibroblasten in ein Sphäroid, kann in zukünftigen Experimenten eine Struktur, die morphologisch den plazentaren Zotten entspricht, aufgebaut werden. Die Kultivierung solcher Sphäroide in einem Bioreaktor (z.B. SYNTHECON Rotary Cell Culture System, Cellon S.A, Luxemburg) kann zum Aufbau der plazentaren Zotten *in vitro* durchführen

Durch die Ergebnisse der vorliegender Arbeit konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass $CD133^+$-Zellen und Zytotrophoblasten miteinander interagieren. Der Trophoblast beeinflusst nicht nur Migration, Proliferation und Adhäsion der Stammzellen, sondern steuert die Differenzierung der $CD133^+$-Zellen in monozytenähnliche Zellen und führt zur Expression von VEGFR-3. Um zu beweisen, dass das VEGF-C/VEGFR-3-System zur Regulation der plazentaren Vaskulogenese beitragen könnte, soll in weiteren Experimenten die Expression von VEGFR-3 auf $CD133^+$-Zellen und plazentaren Strukturen näher untersucht werden. Die positive

Regulation von VEGFR-3 auf den $CD133^+$-Zellen unter dem Einfluss von Trophoblasten soll quantitativ zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation der Zellen mit Zytotrophoblasten bestimmt werden. Durch die Zugabe von spezifischen Diffusionsproteinen oder blockierenden Antikörpern zum konditionierten Trophoblastenmedium soll geklärt werden, ob die in dieser Arbeit beobachteten Effekte des Trophoblastenmediums, auf die Wirkung von VEGF-C zurückzuführen sind. Ein besseres Verständnis der physiologischen Bedeutung des VEGF-C/VEGFR-3 Systems in der frühen plazentaren Gefäßbildung, könnte durch die Untersuchung der VEGF-C/VEGFR-3 vermittelten Signaltransduktion erworben werden. Dafür könnten einige, für die VEGF-Familie bekannten Signalwege wie PI3K/Akt, Ras/Raf-MEK/Erk, eNOS/NO und $IP37Ca^{2+}$ in den $CD133^+$-Zellen unter den Einfluss von Trophoblasten untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Inkubation in konditioniertem Trophoblastenmedium entstandenen Zellen im Kapillarnetz von Endothelzellen bei der Tubenbildung involviert wurden. Es konnte aber nicht beobachtet werden, dass $CD133^+$-Zellen durch Interaktionen mit von Trophoblasten sezernierten Faktoren in der Lage sind, die tubulären Strukturen selbst zu bilden. Im weiteren soll mit Hilfe des 3-D-Sphäroid-Modells untersucht werden, ob die direkten Zell-Zell-Interaktionen der $CD133^+$-Zellen mit Trophoblasten zu der Kapillarbildung von $CD133^+$-Zellen führen kann.

Bei den Zell-Zell-Interaktionen während der Gefäßbildung spielen Adhäsions-moleküle eine wichtige Rolle. Das 3-D-Sphäriod-Modell könnte für die Untersuchungen der Expression von Adhäsionsrezeptoren eingesetzt werden. Dieses Modell ermöglicht die Kultivierung der Zellen in einem engen Kontakt miteinander und durch die Einbettung in verschiedene Matrixkomponenten (Kollagen, Fibrin) simuliert es eine physiologische Situation. Um den Einfluss des Trophoblasten auf die Expression von Integrinen in undifferenzierten und differenzierten $CD133^+$ Zellen bzw. plazentaren Endothelzellen zu untersuchen, sollte die Expression folgender Integrinuntereinheiten: $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$, $\alpha5$, αV und $\beta1$-$\beta3$ mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Begleitend sollte die Expression der entsprechenden Liganden wie Kollagen IV, Fibronektin, Vitronektin und Laminin mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Um die Prozesse der Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Matrixinteraktionen und Wechsel-wirkungen zwischen den Proteinen in der Zelle besser zu verstehen, sollten die

Ko-Kultursysteme (Sphäroid-Modell, Ko-Kultur der unterschiedlichen Zellen) durch die *live imaging*-Mikroskopie untersucht werden. Durch die Verwendung von neuen Markierungsmethoden wie dem Quantum Dots Verfahren (Halbleiter-Nanokristalle, die aus einem Cadmium-Selen-Kern mit einer Zink-Sulfid-Hülle bestehen) ist es möglich die Zellen, einzelne Zellkompatimente, Matrix-Konponenten oder Proteine langzeitig (über mehrere Monate) zu markieren und im Fluoreszenzmikroskop lebend zu untersuchen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung und die uneingeschränkte Funktion des plazentaren Gefäßsystems sind für die normale Embryonalentwicklung und das fetale Wachstum von entscheidender Bedeutung.

Die plazentare Gefäßbildung beginnt zwischen dem 21. und 32. Tag *p.c.* und wird durch die Differenzierung von Angioblasten und den Aufbau des primitiven Gefäßnetzwerkes charakterisiert. Durch die Expression zahlreicher angiogen wirkender Substanzen scheint der Trophoblast bei der Initialisierung der Angioblasten essenziell zu sein. Es wird postuliert, dass der Trophoblast über Wechselwirkungen mit den Vorläuferzellen (Angioblasten) an der Entstehung des plazentaren Gefäßsystems ursächlich beteiligt ist.

Die Herkunft der plazentaren Angioblasten ist umstritten. Als mögliche Quellen werden sowohl das Zottenmesenchym, als auch die hämatopoetischen Organe genannt. Das Nabelschnurblut enthält große Mengen von Vorläuferzellen, die sowohl zur hämatopoetischen, als auch zu endothelialen Zellen differenzieren können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionen zwischen Trophoblasten und $CD133^+$-Zellen untersucht. Um diese Untersuchungen zu ermöglichen, wurden Methoden zur primären Isolierung von Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut und Trophoblasten aus frühem Plazentagewebe etabliert.

Es konnte gezeigt werden, dass $CD133^+$-Zellen wichtige Pluripotenzmarker wie *Oct-4, SOX-1, SOX-2, FGF-4 und REX-1* exprimieren und die Fähigkeit besitzen sich in endotheliale Zellen zu differenzieren. Darüber hinaus exprimieren diese Zellen ähnliche Marker wie die villösen Angioblasten und konnten als plazentare Angioblasten betrachten werden.

Der Einfluss von Trophoblasten auf die funktionellen Eigenschaften und Differenzierungsprozesse der $CD133^+$-Zellen wurde durch die Kultivierung der Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Migration der $CD133^+$-Zellen unter dem Einfluss von konditioniertem Trophoblastemedium stark erhöht war. Konditioniertes Trophoblastenmedium induzierte zudem konzentrationsabhängig die Proliferation der $CD133^+$-Zellen und wies eine antiapoptotische Wirkung auf. Durch die Kultivierung der $CD133^+$-Zellen in konditioniertem Trophoblastenmedium konnte festgestellt werden, dass $CD133^+$-Zellen zu Zellen mit monozyten/makrophagen-spezifischen Markern differenzieren. Die Zellen zeigten eine negative Regulation von Stammzell-

spezifischen Markern, aber eine positive Regulation von CD11b- und CD14-Rezeptoren. Die unter dem Einfluss von Trophoblastenmedium differenzierten $CD11b^+CD14^+$-Zellen zeigten eine gleichzeitige Expression des CD31-Rezeptors.

Die langzeitige Kultivierung der $CD133^+$-Zellen im Trophoblastenmedium führte zu der Expression von CD68 und VEGFR-3. Die unter dem Einfluss von Trophoblasten entstandenen Zellen, konnten in die von HUVEC gebildeten Kapillarnetze eingebaut werden. Es kann angenommen werden, dass Stammzellen durch den Kontakt mit von Trophoblasten freigesetzten Faktoren die Fähigkeit erwerben, sich an der Vaskulogenese zu beteiligen.

Da hCG ein trophoblastspezifischer Faktor ist, sollte seine Wirkung auf $CD133^+$-Zellen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der hCG-Rezeptor von $CD133^+$-Zellen exprimiert wird. Durch die Zugabe von hCG wurde die Proliferation der $CD133^+$-Zellen dosisabhängig induziert. Ein Einfluss von hCG auf Apoptose und Migration der $CD133^+$-Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Bei den Prozessen der Blutgefäßentwicklung spielen nicht nur humorale Faktoren eine wichtige Rolle, es sind auch die direkten Zell-Zell-Interaktionen zwischen Angioblasten und den benachbarten Zellen von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein komplexes dreidimensionales Sphäroid-Modell zur *in vitro*-Untersuchung der plazentaren Vaskulogenese, unter besonderer Berücksichtigung der Rolle des Trophoblasten etabliert. Die Ähnlichkeit des Modells zur *in vivo*-Situation ermöglicht die Erforschung der plazentaren Gefäßentwicklung auf einem physiologischen Niveau.

8. Summary

Development of a functional placental vascular system of the placental vascular system is essential for normal embryonal and fetal growth.

Placental vascular development begins between day 21 and 32 p.c. and is characterised by differentiation of angioblasts and construction of a primitive vascular network. The trophoblast, which expresses numerous substances, seems to be essential for the initialisation of angioblasts. It is postulated, trophoblast interact with precursor cells (angioblasts) and that this interaction leads to development of the placental vascular system.

The origin of placental angioblasts is a controversial issue; possible sources are mesenchymal stroma of placental villi and hematopoetic organs. Cord blood contains a large number of precursor cells, which can differentiate either into hematopoetic or into endothelial cells. Cells expressing the CD133 antigen were isolated with magnetic beads.

In this work the interaction of trophoblasts and $CD133^+$cells was investigated. To enable this investigation, methods for isolating precursor cells from cord blood and trophoblasts from early placenta tissue were established.

It was shown that $CD133^+$cells express important markers of pluripotency such as *Oct-4, SOX-1, SOX-2, FGF-4* and *REX-1*. $CD133^+$cells were able to differentiate into various cell types including endothelial cells or neural cells. This leads to the assumption, that $CD133^+$cells are potential placental angioblasts.

The influence of trophoblast on functional properties and differentiation of $CD133^+$cells was investigated by cultivation of $CD133^+$cells in trophoblast conditioned medium.

A strong increase of $CD133^+$cells migration in trophoblast conditioned medium was shown. Furthermore, trophoblast conditioned medium dose dependently increased $CD133^+$cells proliferation and inhibited apoptosis. Cultivation in trophoblast conditioned medium lead to differentiation of $CD133^+$cells. Stem cell specific markers (e.g. CD133, CD117) were downregulated. The cells showed a positive expression of monocytic receptors (CD11b, CD14). Long term cultivation of $CD133^+$cells in trophoblast conditioned medium lead to the expression of CD68 and VEGFR-3. Cells cultured under the influence of trophoblasts incorporate into capillary networks

generated by HUVEC. It can be assumed, that factors released by trophoblasts enable stem cells to take part in vasculogenesis.

hCG is one of the trophoblast specific angiogenic factors. $CD133^+$cells express the hCG receptor. hCG dosedependently influences the proliferation of $CD133^+$cells. Influence of hCG on apoptosis and migration was not observed.

In vascular development, not only humoral factors, but also cell-cell-interactions between neighbouring cells are of critical importance. In this work a complex three dimensional spheroid model for in vitro investigation of placental vasculogenesis with regard to trophoblasts was established. The similarity of this model to the in vivo-situation allowes investigation of placental vascular development under more physiological conditions.

9. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed,A., Gilbert-Barness,E. (2003). Placenta membranacea: a developmental anomaly with diverse clinical presentation. Pediatr Dev Pathol 6, 201-202.

Ahmed,A., Li,X.F., Dunk,C., Whittle,M.J., Rushton,D.I., Rollason,T. (1995). Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. Growth Factors 12, 235-243.

Aiuti,A., Tavian,M., Cipponi,A., Ficara,F., Zappone,E., Hoxie,J., Peault,B., Bordignon,C. (1999). Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. Eur J Immunol 29, 1823-1831.

Alsat,E., Mirlesse,V., Fondacci,C., Dodeur,M., Evain-Brion,D. (1991). Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. J Clin Endocrinol Metab 73, 288-295.

Anson-Cartwright,L., Dawson,K., Holmyard,D., Fisher,S.J., Lazzarini,R.A., Cross,J.C. (2000). The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. Nat Genet 25, 311-314.

Asan,E., Kaymaz,F.F., Cakar,A.N., Dagdeviren,A., Beksac,M.S. (1999). Vasculo-genesis in early human placental villi: an ultrastructural study. Ann Anat 181, 549-554.

Baal,N., Reisinger,K., Jahr,H., Bohle,R.M., Liang,O., Munstedt,K., Rao,C.V., Preissner,K.T., Zygmunt,M.T.(2004). Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133positive cells from human umbilical cord blood. Thromb Haemost 92, 767-775.

Barker,D.J., Bull,A.R., Osmond,C., Simmonds,S.J. (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. BMJ 301, 259-262.

BD Biosciences, Training Manuel Flow Cytometry. (2001).

Beck,L., Jr. and D'Amore,P.A. (1997). Vascular development: cellular and molecular regulation. FASEB J 11, 365-373.

Behzad-Behbahani,A., Pouransari,R., Tabei,S.Z., Rahiminejad,M.S., Robati,M., Yaghobi,R., Nourani,H., Ramzi,M.M., Farhadi-Andarabi,A., Mojiri,A., Rahsaz,M., Banihashemi,M., Zare,N. (2005). Risk of viral transmission via bone marrow progenitor cells versus umbilical cord blood hematopoietic stem cells in bone marrow transplantation. Transplant Proc 37, 3211-3212.

Belicchi,M., Pisati,F., Lopa,R., Porretti,L., Fortunato,F., Sironi,M., Scalamogna,M., Parati,E.A., Bresolin,N., Torrente,Y. (2004). Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. JNeurosci Res 77, 475-486.

Bischof,P., Haenggeli,L., Campana,A. (1995). Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion is dependent on integrin expression on human cytotrophoblasts. Hum Reprod 10, 734-742.

Boyer,L.A., Lee,T.I., Cole,M.F., Johnstone,S.E., Levine,S.S., Zucker,J.P., Guenther,M.G., Kumar,R.M., Murray,H.L., Jenner,R.G., Gifford,D.K., Melton,D.A., Jaenisch,R., Young,R.A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 122, 947-956.

Boyer,L.A., Mathur,D., Jaenisch,R. (2006). Molecular control of pluripotency. Curr Opin Genet Dev 16, 455-462.

Brunstein,C.G., Wagner,J.E., (2006). Cord blood transplantation for adults. Vox Sang 91, 195-205.

Burrows,T.D., King,A., Loke,Y.W. (1993). Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. Hum. Reprod 8, 475-484.

Butz,S., Kemler,R. (1994). Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. FEBS Lett 28, 195-200.

Caniggia,I., Lye,S.J., Cross,J.C. (1997). Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. Endocrinology 138, 3976-3986.

Caniggia,I., Mostachfi,H., Winter,J., Gassmann,M., Lye,S.J., Kuliszewski,M., Post,M. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). J Clin Invest 105, 577-587.

Cao,G., O'Brien,C.D., Zhou,Z., Sanders,S.M., Greenbaum,J.N., Makrigiannakis,A., DeLisser,H.M. (2002). Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. Am J Physiol Cell Physiol 282, C1181-C1190.

Carmeliet,P., Collen,D. (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. Ann N Y Acad Sci 902, 249-262.

Carter,A.M. (2006). Animal Models of Human Placentation. Placenta 27, 41-47.

Castellucc,M., Scheper,M., Scheffen,I., Celona,A., Kaufmann,P. (1990) The development of the human placental villous tree. Anat Embryol 181, 117-128.

Charnock-Jones,D.S. (2002). Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. J Anat 200, 607-615.

Cheng,L., Thomas,A., Roth,L.M., Zheng,W., Michael,H., Karim,F.W. (2004). OCT4: a novel biomarker for dysgerminoma of the ovary. Am J Surg Pathol 28, 1341-1346.

Choi,K. (1998). Hemangioblast development and regulation. Biochem. Cell Biol 76, 947-956.

Cronier,L., Bastide,B., Herve,J.C., Deleze,J., Malassine,A. (1994). Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. Endocrinology 135, 402-408.

Cross,J.C., Werb,Z., Fisher,S.J. (1994). Implantation the placenta: key pieces of the development puzzle. Science 266, 1508-1518.

Dagtekin,G., Schiffer,R., Klein,B., Jahnen-Dechent,W., Zwadlo-Klarwasser,G. (2003). Modulation of angiogenic functions in human macrophages by biomaterials. Biomaterials 24, 3395-3401.

deMello,D.E., Sawyer,D., Galvin,N., Reid,L.M. (1997). Early fetal development of lung vasculature. Am. J. Respir. Cell Mol Biol 16, 568-581.

Demir,R., Kaufmann,P., Castellucci,M., Erbengi,T., Kotowski,A. (1989). Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. Acta Anat (Basel) 136, 190-203.

Demir,R., Kayisli,U.A., Cayli,S., Huppertz,B. (2006). Sequential Steps During Vasculogenesis and Angiogenesis in the Very Early Human Placenta. Placenta 27, 535-539.

Demir,R., Kayisli,U.A., Seval,Y., Celik-Ozenci,C., Korgun,E.T., Demir-Weusten,A.Y., Huppertz,B. (2004). Sequential Expression of VEGF and its Receptors in Human Placental Villi During Very Early Pregnancy: Differences Between Placental Vasculogenesis and Angiogenesis. Placenta 25 , 560-572.

deWynter,E.A., Durig,J., Cross,M.A., Heyworth,C.M., Testa,N.G. (1998). Differential response of CD34+ cells isolated from cord blood and bone marrow to MIP-1 alpha and the expression of MIP-1 alpha receptors on these immature cells. Stem Cells 16, 349-356.

Dick,J.E. (1999). Absence of CD34 on some human SCID-repopulating cells. Ann N Y Acad Sci 872, 211-217.

Drake,P.M., Gunn,M.D., Charo,I.F., Tsou,C.L., Zhou,Y., Huang,L., Fisher,S.J. (2001). Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer

cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. J Exp Med 193, 1199-1212.

Droetto,S., Viale,A., Primo,L., Jordaney,N., Bruno,S., Pagano,M., Piacibello,W., Bussolino,F., Aglietta,M. (2004). Vasculogenic potential of long term repopulating cord blood progenitors. FASEB J 18, 1273-1275.

Dumont,D.J., Jussila,L., Taipale,J., Lymboussaki,A., Mustonen,T., Pajusola,K., Breitman,M., Alitalo,K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. Science 282, 946-949.

Ema,M., Rossant,J. (2003). Cell fate decisions in early blood vessel formation. Trends Cardiovasc Med 13, 254-259.

Ende,N. and Chen,R. (2002). Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. J Med 33, 173-180.

Enders,A.C., King,B.F. (1988). Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey. Am J Anat 181, 327-340.

Fernandez,P.B., Lucibello,F.C., Gehling,U.M., Lindemann,K., Weidner,N., Zuzarte,M.L., Adamkiewicz,J., Elsasser,H.P., Muller,R., Havemann,K. (2000). Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. Differentiation 65, 287-300.

Fiedler,J., Leucht,F., Waltenberger,J., Dehio,C., Brenner,R.E. (2005). VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun 334, 561-568.

Fisher,S.J., Cui,T.Y., Zhang,L., Hartman,L., Grahl,K., Zhang,G.Y., Tarpey,J., Damsky,C.H. (1989). Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. J Cell Biol 109, 891-902.

Flamme,I., Frolich,T., Risau,W. (1997). Molecular mechanisms of vasculo-genesis and embryonic angiogenesis. J Cell Physiol 173, 206-210.

Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M., Breitman,M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 376, 66-70.

Frank,H.G., Genbacev,O., Blaschitz,A., Chen,C.P., Clarson,L., Evain-Brion,D., Gardner,L., Malek,A., Morrish,D., Loke,Y.W., Tarrade,A. (2000). Cell culture models of human trophoblast--primary culture of trophoblast--a workshop report. Placenta 21, 120-S122.

Fujiyama,S., Amano,K., Uehira,K., Yoshida,M., Nishiwaki,Y., Nozawa,Y., Jin,D., Takai,S., Miyazaki,M., Egashira,K., Imada,T., Iwasaka,T., Matsubara,H. (2003). Bone Marrow Monocyte Lineage Cells Adhere on Injured Endothelium in a Monocyte Chemoattractant Protein-1-Dependent Manner and Accelerate Reendothelialization as Endothelial Progenitor Cells. Circ Res 93, 980-989.

Furusawa,T., Ohkoshi,K., Honda,C., Takahashi,S., Tokunaga,T. (2004). Embryonic stem cells expressing both platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and stage-specific embryonic antigen-1 differentiate predominantly into epiblast cells in a chimeric embryo. Biol Reprod 70, 1452-1457.

Furuta,C., Ema,H., Takayanagi,S., Ogaeri,T., Okamura,D., Matsui,Y., Nakauchi,H. (2006). Discordant developmental waves of angioblasts and hemangioblasts in the early. Development 133, 2771-2779.

Garbuzova-Davis,S., Willing,A.E., Saporta,S., Bickford,P.C., Gemma,C., Chen,N., Sanberg,C.D., Klasko,S.K., Borlongan,C.V., Sanberg,P.R. (2006). Novel cell therapy approaches for brain repair. Prog Brain Res 157, 207-222.

Garlanda,C., Dejana,E. (1997). Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17, 1193-1202.

Gebb,S.A., Shannon,J.M. (2000). Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis. Dev Dyn 217, 159-169.

Gehling,U.M., Ergun,S., Schumacher,U., Wagener,C., Pantel,K., Otte,M., Schuch,G., Schafhausen,P., Mende,T., Kilic,N., Kluge,K., Schafer,B., Hossfeld,D.K., Fiedler,W. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. Blood 95, 3106-3112.

Genbacev,O., Schubach,S.A., Miller,R.K. (1992). Villous culture of first trimester human placenta-model to study extravillous trophoblast (EVT) differentiation. Placenta 13, 439-461.

Geva,E., Ginzinger,D.G., Zaloudek,C.J., Moore,D.H., Byrne,A., Jaffe,R.B. (2002). Human Placental Vascular Development: Vasculogenic and Angiogenic (Branching and Nonbranching) Transformation Is Regulated by Vascular Endothelial Growth Factor-A, Angiopoietin-1, and Angiopoietin-2. J Clin Endocrinol Metab 87, 4213-4224.

Gidekel,S., Pizov,G., Bergman,Y., Pikarsky,E. (2003). Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. Cancer Cell 4, 361-370.

Gill,K.A., Brindle,N.P. (2005). Angiopoietin-2 stimulates migration of endothelial progenitors and their interaction with endothelium. Biochem Biophys Res Commun. 336, 392-396.

Hamada,K., Oike,Y., Takakura,N., Ito,Y., Jussila,L., Dumont,D.J., Alitalo,K., Suda,T. (2000). VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. Blood 96, 3793-3800.

Hamai,Y., Fujii,T., Yamashita,T., Kozuma,S., Okai,T., Taketani,Y. (1998). Evidence for basic fibroblast growth factor as a crucial angiogenic growth. Placenta 19, 149-155.

Hao,H.N., Zhao,J., Thomas,R.L., Parker,G.C., Lyman,W.D. (2003). Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro. J. Hematother. Stem Cell Res 12, 23-32.

Haque,K., Truman,C., Dittmer,I., Denning-Kendall,P., Hows,J., Bradley,B. (1999). Frequencies of cytotoxic T lymphocyte precursor estimate in three different populations. Asian Pac. J Allergy Immunol 17, 93-99.

Harfouche,R. and Hussain,S.N. (2006). Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291, H1635-H1645.

Harraz,M., Jiao,C., Hanlon,H.D., Hartley,R.S., Schatteman,G.C. (2001). CD34-blood-derived human endothelial cell progenitors. Stem Cells 19(4), 304-12.

He,Y., Kozaki,K., Karpanen,T., Koshikawa,K., Yla-Herttuala,S., Takahashi,T., Alitalo,K. (2002). Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. J Natl Cancer Inst 94, 819-825.

Herr,F., Baal,N., Reisinger,K., Lorenz,A., McKinnon,T., Preissner,K.T., Zygmunt,M. (2007). HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. Placenta 28 Suppl A, S85-S93.

Herr,F., Liang,O.D., Herrero,J., Lang,U., Preissner,K.T., Han,V.K., Zygmunt,M. (2003). Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 88, 4811-4817.

Hill,D.J., Han,V.K.M. (1997). Growth factors and cytokines in health and desease. Eds Derek Le Roith and Carolyn Bondy 3A, 26-31.

Hochedlinger,K., Yamada,Y., Beard,C., Jaenisch,R. (2005). Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. Cell 121, 465-477.

Hur,J., Yoon,C.H., Kim,H.S., Choi,J.H., Kang,H.J., Hwang,K.K., Oh,B.H., Lee,M.M., Park,Y.B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 288-293.

Indrapichate,K., Meehan,D., Lane,T.A., Chu,S.Y., Rao,C.V., Johnson,D., Chen,T.T., Wimalasena,J. (1992). Biological actions of monoclonal luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor antibodies. Biol Reprod 46, 265-278.

Jaffe,E.A., Nachman,R.L., Becker,C.G., Minick,C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 52, 2745-2756.

Jang,Y.K., Park,J.J., Lee,M.C., Yoon,B.H., Yang,Y.S., Yang,S.E., Kim,S.U. (2004). Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. J Neurosci Res 15, 573-584.

Jersmann,H.P., Hii,C.S., Hodge,G.L., Ferrante,A. (2001). Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. Infect. Immun 69, 479-485.

Kalka,C., Masuda,H., Takahashi,T., Kalka-Moll,W.M., Silver,M., Kearney,M., Li,T., Isner,J.M.,Asahara,T. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA 97, 3422-3427.

Kao,L.C., Caltabiano,S., Wu,S., Strauss,J.F., III, Kliman,H.J. (1988). The human villous cytotrophoblast: interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation. Dev Biol 130, 693-702.

Karpanen,T., Egeblad,M., Karkkainen,M.J., Kubo,H., Yla-Herttuala,S., Jaattela,M., Alitalo,K. (2001). Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. Cancer Res 61, 1786-1790.

Kaufmann P, Luckhardt M, Leiser R (1988) Three-dirnensional represention of the fetal vessel system in the human placenta. Trophoblast Res 3,113-137.

Kaufmann,P., Black,S., Huppertz,B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. Biol Reprod 69, 1-7.

Kaufmann,P., Bruns,U., Leiser,R., Luckhardt,M., Winterhager,E. (1985). The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. Anat Embryol (Berl) 173, 203-214.

Kaufmann,P., Mayhew,T.M., Charnock-Jones,D.S. (2004). Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. II. Changes During Normal Pregnancy. Placenta 25, 114-126.

Kawamoto,A., Gwon,H.C., Iwaguro,H., Yamaguchi,J.I., Uchida,S., Masuda,H., Silver,M., Ma,H., Kearney,M., Isner,J.M., Asahara,T. (2001). Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation 103, 634-637.

Keller,G., Kennedy,M., Papayannopoulou,T., Wiles,M.V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. Mol Cell Biol 13, 473-486.

Keller,G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. Curr Opin Cell Biol 7, 862-869.

Kennedy,M., Firpo,M., Choi,K., Wall,C., Robertson,S., Kabrun,N., Keller,G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. Nature 386, 488-493.

Khaliq,A., Li,X.F., Shams,M., Sisi,P., Acevedo,C.A., Whittle,M.J., Weich,H., Ahmed,A. (1996). Localisation of placenta growth factor (PIGF) in human term placenta. Growth Factors 13, 111-121.

Khong,T.Y., Lane,E.B., Robertson,W.B. (1986). An immunocytochemical study of fetal cells at the maternal-placental interface using monoclonal antibodies to keratins, vimentin and desmin. Cell Tissue Res 246, 189-195.

Kingdom,J., Huppertz,B., Seaward,G., Kaufmann,P. (2000). Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 92, 35-43.

Kliman,H.J., Nestler,J.E., Sermasi,E., Sanger,J.M., Strauss,J.F. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology 118, 1567-1582.

Koblas,T., Harman,S.M., Saudek,F. (2005). The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. Rev Diabet Stud 2, 228-234.

Korff,T., Augustin,H.G. (1998). Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. J Cell Biol 143, 1341-1352.

Korff,T., Kimmina,S., Martiny-Baron,G., Augusti,H.G. (2001). Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. FASEB J 15, 447-457.

Korff,T., Krauss,T., Augustin,H.G. (2004). Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. Exp Cell Res 297, 415-423.

Krishnamurthy,P., Bird,I.M., Sheppard,C., Magness,R.R. (1999). Effects of angiogenic growth factors on endothelium-derived prostacyclin production by ovine uterine and placental arteries. Prostaglandins Other Lipid Mediat 57, 1-12.

Krishnan,J., Kirkin,V., Steffen,A., Hegen,M., Weih,D., Tomarev,S., Wilting,J., Sleeman,J.P. (2003). Differential in vivo and in vitro expression of vascular

endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. Cancer Res 63, 713-722.

Kukk,E., Lymboussaki,A., Taira,S., Kaipainen,A., Jeltsch,M., Joukov,V., Alitalo,K. (1996). VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role. Development 122, 3829-3837.

Laakkonen,P., Waltari,M., Holopainen,T., Takahashi,T., Pytowski,B., Steiner,P., Hicklin,D., Persaud,K., Tonra,J.R., Witte,L., Alitalo,K. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. Cancer Res 67, 593-599.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 15, 680-685.

Lammert,E., Cleaver,O., Melton,D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. Science 294, 564-567.

Lenardo,M.J., Staudt,L., Robbins,P., Kuang,A., Mulligan,R.C., Baltimore,D. (1989). Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. Science 243, 544-546.

Leor,J., Guetta,E., Chouraqui,P., Guetta,V., Nagler,A. (2005). Human umbilical cord blood cells: a new alternative for myocardial repair? Cytotherapy 7, 251-257.

Li,B., Sharpe,E.E., Maupin,A.B., Teleron,A.A., Pyle,A.L., Carmeliet,P., Young,P.P. (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. FASEB J 20, 1495-1497.

Li,Z.J., Wang,Z.Z., Zheng,Y.Z., Xu,B., Yang,R.C., Scadden,D.T., Han,Z.C. (2005). Kinetic expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) during embryonic stem cell differentiation. J Cell Biochem 95, 559-570.

Liang,O.D., Korff,T., Eckhardt,J., Rifaat,J., Baal,N., Herr,F., Preissner,K.T., Zygmunt,M. (2004). Oncodevelopmental {alpha}-Fetoprotein Acts as a Selective Proangiogenic Factor on Endothelial Cell from the Fetomaternal Unit. J Clin Endocrinol Metab 89, 1415-1422.

Lin,J., Lalani,A.S., Harding,T.C., Gonzalez,M., Wu,W.W., Luan,B., Tu,G.H., Koprivnikar,K., VanRoey,M.J., He,Y., Alitalo,K., Jooss,K. (2005). Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. Cancer Res 65, 6901-6909.

Ma,D.H.-K., Tsai,R.J.-F., Chu,W.K., Kao,C.H., Chen,J.K. (1999). Inhibition of Vascular Endothelial Cell Morphogenesis in Cultures by Limbal Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 1822-1828.

Mac,G.F., Popel,A.S. (2004). Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286, H153-H164.

Magness,R.R. (1998) Maternal cardiovascular and other physiologic responses to the endocrinology of pregnancy. In: Bazer F, editor. Endocrinology of pregnancy. Totowa NJ Humana Press Inc 18, 507-539

Malassine,A., Cronier,L. (2002). Hormones and human trophoblast differentiation: a review. Endocrine 19, 3-11.

Malassine,A., Frendo,J.L., Evain-Brion,D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. Hum Reprod Update 9, 531-539.

Mandriota,S.J., Jussila,L., Jeltsch,M., Compagni,A., Baetens,D., Prevo,R., Banerji,S., Huarte,J., Montesano,R., Jackson,D.G., Orci,L., Alitalo,K., Christofori,G., Pepper,M.S. (2001). Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. EMBO J 20, 672-682.

Manoussaka,M.S., Jackson,D.J., Lock,R.J., Sooranna,S.R., Kumpel,B.M. (2005). Flow cytometric characterisation of cells of differing densities isolated from human term placentae and enrichment of villous trophoblast cells. Placenta 26, 308-318.

Matsumoto,T., Claesson-Welsh,L. (2001). VEGF receptor signal transduction. Sci STKE 2001, RE21.

Mattila,M.M., Ruohola,J.K., Karpanen,T., Jackson,D.G., Alitalo,K., Harkonen,P.L. (2002). VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. Int J Cancer 98, 946-951.

Maw,M.A., Corbeil,D., Koch,J., Hellwig,A., Wilson-Wheeler,J.C., Bridges,R.J., Kumaramanickavel,G., John,S., Nancarrow,D., Roper,K., Weigmann,A., Huttner,W.B., Denton,M.J. (2000). A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. Hum Mol Genet 9, 27-34.

Mayhew,T.M., Charnock-Jones,D.S., Kaufmann,P. (2004). Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. III. Changes in Complicated Pregnancies. Placenta 25, 127-139.

Mayhew,T.M., Huppertz,B., Kaufmann,P., Kingdom,J.C. (2003). The 'reference trap' revisited: examples of the dangers in using ratios to describe fetoplacental angiogenesis and trophoblast turnover. Placenta. 24, 1-7.

McCarthy,S.A., Kuzu,I., Gatter,K.C., Bicknell,R. (1991). Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. Trends Pharmacol Sci 12, 462-467.

Mochizuki,Y., Nakamura,T., Kanetake,H., Kanda,S. (2002). Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. J Cell Sci 115, 175-183.

Moldovan,N.I. (2005). Functional adaptation: the key to plasticity of cardiovascular "stem" cells? Stem Cells Dev 14, 111-121.

Moldovan,N.I., Goldschmidt-Clermont,P.J., Parker-Thornburg,J., Shapiro,S.D., Kolattukudy,P.E. (2000). Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. Circ Res 87, 378-384.

Moore,K.L. (2001). Embryologie. Auflage:4.

Morrish,D.W., Dakour,J., Li,H. (1998). Functional regulation of human trophoblast differentiation. J Reprod. Immunol 39, 179-195.

Mühlhauser,J., Marzioni,D., Morroni,M., Vuckovic,M., Crescimanno,C., Castellucci,M. (1996). Codistribution of basic fibroblast growth factor and heparan sulphate proteoglycan in the growth zones of the human placenta. Cell Tissue Res 285, 101-107.

Mustonen,T., Alitalo,K. (1995). Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. J Cell Biol 129, 895-898.

Nagamatsu,T., Fujii,T., Ishikawa,T., Kanai,T., Hyodo,H., Yamashita,T., Osuga,Y., Momoeda,M., Kozuma,S., Taketani,Y. (2004). A primary cell culture system for human cytotrophoblasts of proximal cytotrophoblast cell columns enabling in vitro acquisition of the extra-villous phenotype. Placenta 25, 153-165.

Nakano,T., Kodama,H., Honjo,T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. Science 265, 1098-1101.

Nakata,Y., Tomkowicz,B., Gewirtz,A.M., Ptasznik,A. (2006). Integrin inhibition through Lyn-dependent cross talk from CXCR4 chemokine receptors in normal human CD34+ marrow cells. Blood 107, 4234-4239.

Neumuller,J., Neumuller-Guber,S.E., Lipovac,M., Mosgoeller,W., Vetterlein,M., Pavelka,M., Huber,J. (2006). Immunological and ultrastructural characterization of endothelial cell cultures differentiated from human cord blood derived endothelial progenitor cells. Histochem. Cell Biol 126, 649-664.

Nichols,J., Zevnik,B., Anastassiadis,K., Niwa,H., Klewe-Nebenius,D., Chambers,I., Scholer,H., Smith,A. (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. Cell 95, 379-391.

Niwa,H., Miyazaki,J., Smith,A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet 24, 372-376.

Ober,E.A., Olofsson,B., Makinen,T., Jin,S.W., Shoji,W., Koh,G.Y., Alitalo,K., Stainier,D.Y. (2004). Vegfc is required for vascular development and endoderm morphogenesis in zebrafish. EMBO Rep 5, 78-84.

O'Brien,T.A., Tiedemann,K., Vowels,M.R. (2006). No longer a biological waste product: umbilical cord blood. Med J Aust 184, 407-410.

Okamoto,K., Okazawa,H., Okuda,A., Sakai,M., Muramatsu,M., Hamada,H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. Cell 60, 461-472.

Palmieri,S.L., Peter,W., Hess,H., Scholer,H.R. (1994). Oct-4 Transcription Factor Is Differentially Expressed in the Mouse Embryo during Establishment of the First Two Extraembryonic Cell Lineages Involved in Implantation. Developmental Biology 166, 259-267.

Patan,S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. J Neurooncol 50, 1-15.

Patan,S. (2004). Vasculogenesis and angiogenesis. Cancer Treat Res 117, 3-32.

Peichev,M., Naiyer,A.J., Pereira,D., Zhu,Z., Lane,W.J., Williams,M., Oz,M.C., Hicklin,D.J., Witte,L., Moore,M.A., Rafii,S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood 95, 952-958.

Pesce,M., Scholer,H.R. (2001). Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. Stem Cells 19, 271-278.

Pesce,M., Gross,M.K., Scholer,H.R. (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. Bioessays 20, 722-732.

Pessina,A., Eletti,B., Croera,C., Savalli,N., Diodovich,C., Gribaldo,L. (2004). Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells. Biochem. Biophys. Res Commun 323, 315-322.

Peterson,D.A. (2004). Umbilical cord blood cells and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem. J Clin Invest 114, 312-314.

Pinter,E., Barreuther,M., Lu,T., Imhof,B.A., Madri,J.A. (1997). Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus. Am J Pathol 150, 1523-1530.

Prager,G.W., Breuss,J.M., Steurer,S., Olcaydu,D., Mihaly,J., Brunner,P.M., Stockinger,H., Binder,B.R. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2-Induced Initial Endothelial Cell Migration Depends on the Presence of the Urokinase Receptor. Circ Res 94, 1562-1570.

Ptashne,M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. Nature 335, 683-689.

Raff M. (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? Annu Rev Cell Dev Biol 19, 1-22.

Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, Kapidzic M, Maltepe E, Okazaki

Reynolds,L.P., Redmer,D.A. (1995). Utero-placental vascular development and placental function. J Anim Sci 73, 1839-1851.

Risau,W., Flamme,I. (1995). Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 11, 73-91.

Robert,B., St John,P.L., Abrahamson,D.R. (1998). Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. Am J Physiol 275, F164-F172.

Robson,P., Stein,P., Zhou,B., Schultz,R.M., Baldwin,H.S. (2001). Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. Dev Biol 234, 317-329.

Rosner,M.H., Vigano,M.A., Ozato,K., Timmons,P.M., Poirie,F., Rigby,P.W.J., Staudt,L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. Nature 345, 686-692.

Rubinstein,P., Carrier,C., Scaradavou,A., Kurtzberg,J., Adamson,J., Migliaccio,A.R., Berkowitz,R.L., Cabbad,M., Dobrila,N.L., Taylor,P.E., Rosenfield,R.E., Stevens,C.E. (1998). Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N Engl J Med 339, 1565-1577.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi.,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 29, 487-491.

Saito,S, Liu,B, Yokoyama,K. (2004). Animal embryonic stem (ES) cells: self-renewal, pluripotency, transgenesis and nuclear transfer. Hum Cell 17, 107-115.

Salven,P., Mustjoki,S., Alitalo,R., Alitalo,K., Rafii,S. (2003). VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. Blood 101, 168-172.

Sanberg,P.R., Willing,A.E., Garbuzova-Davis,S., Saporta,S., Liu,G., Sanberg,C.D., Bickford,P.C., Klasko,S.K., El Badri,N.S. (2005). Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. Ann N Y Acad Sci 1049, 67-83.

Schaiff,W.T., Carlson,M.G., Smith,S.D., Levy,R., Nelson,D.M., Sadovsky,Y. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of

human trophoblast in a ligand-specific manner. J Clin Endocrinol Metab 85, 3874-3881.

Scheuner,G. (1971) Untersuchung zur Struktur der materno-fetalen Stoffwechselschranke in der menschlichen Placenta. Nova Acta Leopoldina 36, 25

Schmeisser,A., Strasser,R.H. (2002). Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. J Hematother. Stem Cell Res 11, 69-79.

Schmeisser,A., Garlichs,C.D., Zhang,H., Eskafi,S., Graffy,C., Ludwig,J., Strasser,R.H., Daniel,W.G. (2001). Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. Cardiovasc Res 49, 671-680.

Schöler,H.R., Dressler,G.R., Balling,R., Rohdewohld,H., Gruss,P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. EMBO J 9, 2185-2195.

Schöler,H.R., Hatzopoulos,A.K., Balling,R., Suzuki,N., Gruss,P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. EMBO J 8, 2543-2550.

Schoppmann,S.F., Birner,P., Stockl,J., Kalt,R., Ullrich,R., Caucig,C., Kriehuber,E., Nagy,K., Alitalo,K., Kerjaschki,D. (2002). Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. Am J Pathol 161, 947-956.

Schuster,M.D., Kocher,A.A., Seki,T., Martens,T.P., Xiang,G., Homma,S., Itescu,S. (2004). Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287, H525-H532.

Shalaby,F., Rossant,J., Yamaguchi,T.P., Gertsenstein,M., Wu,X.F., Breitman,M.L., and Schuh,A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 376, 62-66.

Sharkey,A.M., Charnock-Jones,D.S., Boocock,C.A., Brown,K.D., Smith,S.K. (1993). Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. J Reprod Fertil 99, 609-615.

Shi,Q.J., Lei,Z.M., Rao,C.V., Lin,J. (1993). Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. Endocrinology 132, 1387-1395.

Shimozaki,K., Nakashima,K., Niwa,H., Taga,T. (2003). Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. Development 130, 2505-2512.

Shiraishi,S., Nakagawa,K., Kinukawa,N., Nakano,H., Sueishi,K. (1996). Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. Placenta 17, 111-121.

Skobe,M., Hawighorst,T., Jackson,D.G., Prevo,R., Janes,L., Velasco,P., Riccardi,L., Alitalo,K., Claffey,K., Detmar,M. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. Nat Med 7, 192-198.

Smith,J.M., Meinkoth,J.H., Hochstatter,T., Meyers,K.M. (1996). Differential distribution of von Willebrand factor in canine vascular endothelium. Am J Vet Res 57, 750-755.

Stacker,S.A., Caesar,C., Baldwin,M.E., Thornton,G.E., Williams,R.A., Prevo,R., Jackson,D.G., Nishikawa,S., Kubo,H., Achen,M.G. (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med 7, 186-191.

Stainier,D.Y., Weinstein,B.M., Detrich,H.W., III, Zon,L.I., Fishman,M.C. (1995). Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. Development 121 , 3141-3150.

Tarrade,A., Lai,K.R., Malassine,A., Tricottet,V., Blain,P., Vidaud,M., Evain-Brion,D. (2001). Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. Lab Invest 81, 1199-1211.

Thorgeirsson,S.S., Grisham,J.W. (2006). Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. Hepatology 43, 2-8.

Torrente,Y., Belicchi,M., Sampaolesi,M., Pisati,F., Meregalli,M., D'Antona,G., Tonlorenzi,R., Porretti,L., Gavina,M., Mamchaoui,K., Pellegrino,M.A., Furling,D., Mouly,V., Butler-Browne,G.S., Bottinelli,R., Cossu,G., Bresolin,N. (2004). Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. J Clin Invest 114, 182-195.

Torry,D.S., Hinrichs,M., Torry,R.J. (2004). Determinants of placental vascularity. Am J Reprod Immunol 51, 257-268.

Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotechnology 24, 145-149.

Vicovac,L., Jones,C.J., Aplin,J.D. (1995). Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro. Placenta 16, 41-56.

Vokes,S.A., Krieg,P.A. (2002). Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification. Development 129, 775-785.

Voyta,J.C., Via,D.P., Butterfield,C.E., Zetter,B.R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low densitylipoprotein. J Cell Biol 99, 2034-2040.

Wagner,J.E., Broxmeyer,H.E., Byrd,R.L., Zehnbauer,B., Schmeckpeper,B., Shah,N., Griffin,C., Emanuel,P.D., Zuckerman,K.S., Cooper,S. (1992). Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. Blood 79, 1874-1881.

Wagner,J.E., Rosenthal,J., Sweetman,R., Shu,X.O., Davies,S.M., Ramsay,N.K., McGlave,P.B., Sender,L., Cairo,M.S. (1996). Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. Blood 88, 795-802.

Wang,J.C., Doedens,M., Dick,J.E. (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. Blood 89, 3919-3924.

Weigmann,A., Corbeil,D., Hellwig,A., Huttner,W.B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 94, 12425-12430.

Weiss,M.J., Orkin,S.H. (1996). In Vitro Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells . New Approaches to Old Problems. J Clin Invest 97, 591-595.

Weissman,I.L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 287, 1442-1446.

Wiles,M.V., Keller,G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. Development 111, 259-267.

Wilting,J., Christ,B. (1996). Embryonic angiogenesis: a review. Naturwissenschaften 83, 153-164.

Wobus,A.M. (2001). Potential of embryonic stem cells. Molecular Aspects of Medicine 22, 149-164.

Xu,R.H., Chen,X., Li,D.S., Li,R., Addicks,G.C., Glennon,C., Zwaka,T.P., Thomson,J.A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. Nat Biotechnol 20, 1261-1264.

Xu,Z., Maiti,D., Kisiel,W., Duh,E.J. (2006). Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 Is Upregulated by Vascular Endothelial Growth Factor and Suppresses Growth Factor-Induced Proliferation of Endothelial Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 2819-2825.

Yamamoto,K., de,W., V, Fearns,C., Loskutoff,D.J. (1998). Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. Blood 92, 2791-2801.

Yang,C., Zhang,Z.H., Li,Z.J., Yang,R.C., Qian,G.Q., Han,Z.C. (2004). Enhancement of neovascularization with cord blood CD133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. Thromb Haemost 91, 1202-1212.

Yang,M., Lei,Z.M., Rao,C. (2003). The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. Endocrinology 144, 1108-1120.

Yano,M., Iwama,A., Nishio,H., Suda,J., Takada,G., Suda,T. (1997). Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. Blood 89, 4317-4326.

Yeom,Y.I., Fuhrmann,G., Ovitt,C.E., Brehm,A., Ohbo,K., Gross,M., Hubner,K., Scholer,H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. Development 122, 881-894.

Yin,A.H., Miraglia,S., Zanjani,E.D., Almeida-Porada,G., Ogawa,M., Leary,A.G., Olweus,J., Kearney,J., Buck,D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 90 , 5002-5012.

Yoshida,S., Ishikawa,F., Kawano,N., Shimoda,K., Nagafuchi,S., Shimoda,S., Yasukawa,M., Kanemaru,T., Ishibashi,H., Shultz,L.D., Harada,M. (2005). Human

cord blood--derived cells generate insulin-producing cells in vivo. Stem Cells 23, 1409-1416.

Zhang,L., Yang,R., Han,Z.C. (2006). Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularisation. Eur J Haematol 76, 1-8.

Zhao,Y., Glesne,D., Huberman,E. (2003). A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 100(5), 2426-2431.

Zhou,Y., Bellingard,V., Feng,K.T., McMaster,M., Fisher,S.J. (2003). Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. Dev Biol 263, 114-125.

Zhou,Y., McMaster,M., Woo,K., Janatpour,M., Perry,J., Karpanen,T., Alitalo,K., Damsky,C., Fisher,S.J. (2002). Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. Am J Pathol 160, 1405-1423.

Zygmunt,M. (2001). Placental circulation: Clinical significance. Early Pregnancy 5, 72-73.

Zygmunt,M., Herr,F., Keller-Schoenwetter,S., Kunzi-Rapp,K., Munstedt,K., Rao,C.V., Lang,U., Preissner,K.T. (2002). Characterization of Human Chorionic Gonadotropin as a Novel Angiogenic Factor. J Clin Endocrinol Metab 87, 5290-5296.

Zygmunt,M., Herr,F., Munstedt,K., Lang,U., Liang,O.D. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 110, S10-S18.

10. DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Marek T. Zygmunt möchte ich mich für die Überlassung eines sehr interessanten Themas und die hilfreiche Betreuung meiner Doktorarbeit herzlich bedanken. Neben seinen Anregungen und Ideen gab er mir die Gelegenheit meine eigenen Vorstellungen umzusetzen. Für diese Freiheiten bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Klaus T. Preissner mochte ich sehr danken für die interessanten Diskussionen und die neuen Ideen, die er immer aus einem ganz anderen Sichtwinkel eingebracht hat.

Großen Dank schulde ich der Frau Bettina Gill, die mich als erste im Labor eingearbeitet hat. Ihr Organisationstalent und ihre Hilfsbereitschaft hat mir die Durchführung meine Arbeit ungemein erleichtert.

Ein sehr großes Dankeschön für sein Mitdenken und sehr interessante wissenschaftliche Gespräche geht an meinen Arbeitskollegen Herr Timothy McKinnon.

Für zahlreiche Hinweise, Verbesserungsvorschläge bei der Überarbeitung und Fertigstellung meiner Dissertation und viel Geduld bei den Korrekturen möchte ich mich bei der Frau Dr. Manuela Horndasch, Frau Dr. Kristina Lotz, Désirée Howe und Angelika Kleiner vielmals bedanken.

Danken möchte ich auch bei der Frau Dr. Friederike Herr, Frau Dr. Dörthe Brüggmann und Frau Ruth Gomez-Dominges für die unersetzliche Unterstützung bei der Patientenmaterialentnahme.

Mein Dank gilt für den Herrn PD. Dr. Henning Jahr und seiner Mitarbeiterin Stefanie Fass für die große Hilfe bei der Etablierung der immunhistochemischen Färbungen.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, die nicht nur mich, sondern meine ganze Familie während der gesamten Zeit meiner Promotion Tag für Tag unterstützt haben.

Einen ganz lieben Dank möchte ich meinem Mann Igor und meiner Tochter Christina für das volle Verständnis und für die Liebe, die sie mir in diesen langen Jahren geschenkt haben, aussprechen.

Vielen Dank.

11. ABKÜRZUNGEN

Ac-LDL	acetyliertes low density lipoprotein
BL-CFC	Blastocyste Colony Forming Cells
DiI	1,1´-Dioctadecyl-1-3,3,3´,3´-tetramethyl-indocarbocyanin percholat
FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
FKS	fötales Kälberserum
FLT3L	flt-3-Ligand
hCG	humanes Choriongonadotropin
HFR	humane plazentare Fibroblasten
HPMVEC	Human Placenta Microvasular Endothelial Cells
HTR	humane Trophoblasten
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
MACS	Magnetic Cell Sorting
MNC	mononukleäre Zellen
p.c.	*post conceptionem*
SCF	Stem Cell Factor
SSW	Schwangerschaftswoche
TPO	Tronbopoetin
U/ml	Unit pro Milliliter
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Baal, Nelli
Wohnort:	Ruttershausenerstr.31, 35435 Wettenberg
Telefon:	06406 836561
Geburtsdatum:	10.03.1972
Geburtsort:	Taldy-Kurgan, Kasachstan
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

1979-1989	Besuch einer allgemein bildenden Schule in Taldy-Kurgan Abschluss: Abitur

Studium:

1989-1995	Studium an der medizinischen Universität in Tomsk Abschluss: Diplom-Biochemikerin

Ausreise:

08.08.1996	Ausreise nach Deutschland
01.1997-06.1997	6-monatiger Integrationssprachkurs von interDaf am Herder-Institut der Universität Leipzig als Stipendiatin der Otto-Benecke-Stiftung

Berufspraxis:

1995-1996	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Forschungsinstitut für psychische Gesundheit in Tomsk
03.08.-22.10.1998	Praktikum im Institut für Laboratoriumsmedizin, Chemnitz
11.1998-08.1999	Besuch der Computer- und Bewerbungstraining-Seminare von Otto-Benecke-Stiftung
01.10.1999-31.12.2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene an der Universität Marburg
01.01.2002-30.09.2002	Novartis GmbH als wissenschaftliche Außendienstberater
01.10.2002-aktuell	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Universitäts-klinikum Giessen

Sonstige Kenntnisse: EDV-Kenntnisse in Windows, Winword, Exel, Power Point, Fotoshop
Russische Sprache: Muttersprache
Deutsch: fließend
Englisch: gute Kenntnisse

Eigene Publikationen

Baal,N., Reisinger,K., Jahr,H., Bohle,R.M., Liang,O., Munstedt,K., Rao,C.V., Preissner,K.T., Zygmunt,M.T.(2004). Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133positive cells from human umbilical cord blood. Thromb Haemost 92, 767-775.

Liang,O.D., Korff,T., Eckhardt,J., Rifaat,J., Baal,N., Herr,F., Preissner,K.T., Zygmunt, M. (2004). Oncodevelopmental alpha-fetoprotein acts as a selective proangiogenic factor on endothelial cell from the fetomaternal unit. J Clin Endocrinol Metab 89, 1415-1422.

Reisinger,K., Baal,N., McKinnon,T., Munstedt,K., Zygmunt,M. (2007). The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? Mol Cell Endocrinol 15, 65-80.

Herr,F., Baal,N., Reisinger,K., Lorenz,A., McKinnon,T., Preissner,K.T., Zygmunt,M. (2007). HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. Placenta 28, 85-93.