

EXPRESSION VON NOTCH-REZEPTOREN UND IHREN
LIGANDEN IN DER HUMANEN PLAZENTA

ISABEL SCHREINER

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin 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 2010

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 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. C. Pfarrer

und

der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des
Universitätsklinikums Greifswald

Betreuer: Prof. Dr. M. Zygmunt

Expression von Notch-Rezeptoren und ihren Liganden in der humanen Plazenta

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Isabel Schreiner, geb. Pfahls

Tierärztin aus Bad Soden-Salmünster

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachterin: Prof. Dr. C. Pfarrer

Gutachter: Prof. Dr. M. Zygmunt

Tag der Disputation: 30.04.2010

Verzeichnisse

I) Inhalt

Verzeichnisse	I
I) Inhalt.....	I
II) Abbildungen.....	IV
III) Abkürzungen	VI
1 Einführung	1
1.1 Aufbau der Plazenta und Typisierung.....	1
1.2 Besonderheiten der humanen Plazenta.....	3
1.3 Gefäßentwicklung in der humanen Plazenta	4
1.4 Notch-Rezeptoren und -Liganden.....	5
1.4.1 Lateral Inhibition.....	7
1.4.2 Notch und Differenzierung	9
1.4.3 Notch und Gefäßentwicklung	10
1.4.4 Notch in der fetomaternalen Einheit.....	11
2 Zielsetzung	13
3 Material.....	14
3.1 Plazenten.....	14
3.2 Primer	15
3.3 Antikörper	17
4 Methoden.....	19
4.1 Nachweismethoden auf molekularer Ebene	19
4.1.1 Konventionelle RT-PCR	19
4.1.2 Realtime PCR	22
4.2 Proteinnachweis in Zellen und Geweben.....	25
4.2.1 Immunhistochemie	25
4.2.2 Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB).....	26
4.2.3 Durchflusszytometrie.....	29
5 Ergebnisse.....	33

5.1	Konventioneller Nachweis von mRNA aus der gesamten humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)	33
5.1.1	Konventioneller mRNA-Nachweis der Notch-Rezeptoren	33
5.1.2	Konventioneller mRNA-Nachweis der Notch-Liganden.....	35
5.2	Semiquantitativer Nachweis von mRNA aus der gesamten humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)	37
5.2.1	Semiquantitativer mRNA-Nachweis der Notch-Rezeptoren	37
5.2.2	Semiquantitativer mRNA-Nachweis der Notch-Liganden.....	38
5.3	Qualitativer Nachweis von Proteinen aus dem Tertiärzottenbereich der humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)	41
5.3.1	Qualitativer Proteinnachweis der Notch-Rezeptoren.....	41
5.3.2	Qualitativer Proteinnachweis der Notch-Liganden	44
5.4	Semiquantitativer Nachweis von Proteinen aus der humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)	49
5.4.1	Semiquantitativer Proteinnachweis der Notch-Rezeptoren	49
5.4.2	Semiquantitativer Proteinnachweis der Notch-Liganden.....	51
5.5	Übersicht der erzielten Ergebnisse	54
6	Diskussion	55
6.1	Notch-Rezeptoren und -Liganden Expression in der humanen Plazenta ...	55
6.1.1	Physiologische Expression von Notch-Rezeptoren und -Liganden	56
6.1.2	Schwangerschafts-assoziierte Erkrankungen und Notch-Rezeptoren und -Liganden	59
6.2	Limitierende Faktoren dieser Studie	59
6.2.1	Material: Plazentares Gewebe zwischen der 6.-12. SSW und 37.-41. SSW	59
6.2.2	Methoden: Analyse der Notch-Rezeptoren und -Liganden auf mRNA- und Proteinebene	61
6.3	Ausblick: Direkte Zell-Zell-Interaktion als Kommunikationsweg im Hinblick auf plazentare Angio- und Vaskulogenese	63
7	Zusammenfassung/Kurzfassung	64
8	Summary	66
9	Danksagung	67
10	Erklärung	68

11	Literatur	69
12	Anhang	78
12.1	Geräte.....	78
12.2	Verbrauchsmaterialien.....	79
12.3	Chemikalien.....	80
12.4	Kommerzielle Assays und Tests.....	82
12.5	Zellkulturmedien	82
12.6	Software zur Datenauswertung	82

II) Abbildungen

Abb. 1-1: Schematischer Aufbau der humanen Plazenta	3
Abb. 1-2: Schematischer Aufbau einer reifen humanen Plazenta, histologisch.....	4
Abb. 1-3: Notch-Rezeptor und Delta als Ligand in der schematischen Anordnung	6
Abb. 1-4: Lateral Inhibition.....	8
Abb. 4-1: Amplifikationskurve	22
Abb. 4-2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von SYBR Green I	23
Abb. 4-3: Repräsentative Dissoziationskurve	24
Abb. 4-4: Schematische Darstellung des biotinylierten SAK	27
Abb. 5-1: Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte von Notch1, -2, -3, -4	34
Abb. 5-2: Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte von Jagged1, -2, Delta1, -4.....	36
Abb. 5-3: Notch2 Dissoziationskurve aus realtime PCR.....	37
Abb. 5-4: Vergleich der relativen Notch3 mRNA-Expression mittels realtime PCR ..	38
Abb. 5-5: Vergleich der relativen Notch4 mRNA-Expression mittels realtime PCR ..	38
Abb. 5-6: Vergleich der relativen Jagged1 mRNA-Expression mittels realtime PCR	39
Abb. 5-7: Vergleich der relativen Jagged2 mRNA-Expression mittels realtime PCR	39
Abb. 5-8: Vergleich der relativen Delta1 mRNA-Expression mittels realtime PCR ...	40
Abb. 5-9: Vergleich der relativen Delta4 mRNA-Expression mittels realtime PCR ...	40
Abb. 5-10: Notch1, 1. Trim., 400x.....	42
Abb. 5-11: Notch1, 3. Trim., 400x.....	42
Abb. 5-12: Notch2, 1. Trim., 400x.....	42
Abb. 5-13: Notch2, 3. Trim., 400x.....	42
Abb. 5-14: Notch3, 1. Trim., 400x.....	43
Abb. 5-15: Notch3, 3. Trim., 400x.....	43
Abb. 5-16: Notch4, 1. Trim., 400x.....	43
Abb. 5-17: Notch4, 3. Trim., 400x.....	43
Abb. 5-18: Jagged1, 1. Trim., 400x	45
Abb. 5-19: Jagged1, 3. Trim., 400x	45
Abb. 5-20: Jagged2, 1. Trim., 400x	45
Abb. 5-21: Jagged2, 3. Trim., 400x	45

Abb. 5-22: Delta1, 1. Trim., 400x.....	46
Abb. 5-23: Delta1, 3. Trim., 400x.....	46
Abb. 5-24: Delta4, 1. Trim., 400x.....	46
Abb. 5-25: Delta4, 3. Trim., 400x.....	46
Abb. 5-26: K. \ominus , 1. Trim., 400x.....	47
Abb. 5-27: K. \ominus , 3. Trim., 400x.....	47
Abb. 5-28: K. \oplus , CD31, 1. Trim., 400x.....	47
Abb. 5-29: K. \oplus , CD31, 3. Trim., 400x.....	47
Abb. 5-30: K. \oplus , Cytokeratin7, 1. Trim., 400x.....	48
Abb. 5-31: K. \oplus , Cytokeratin7, 3. Trim., 400x.....	48
Abb. 5-32: K. \oplus , Vimentin, 1. Trim., 400x.....	48
Abb. 5-33: K. \oplus , Vimentin, 3. Trim., 400x.....	48
Abb. 5-34: K. \oplus , CD68, 1. Trim., 400x.....	49
Abb. 5-35: K. \oplus , CD68, 3. Trim., 400x.....	49
Abb. 5-36: FACS 1. + 3. Trimester, Notch1 und Isotypkontrolle 1:50, FITC 1:500 ...	50
Abb. 5-37: FACS 1. + 3. Trimester, Notch2 und Isotypkontrolle 1:40, PE 1:500	50
Abb. 5-38: FACS 1. + 3. Trimester, Notch3 und Isotypkontrolle 1:50, PE 1:500	51
Abb. 5-39: FACS 1. + 3. Trimester, Notch4 und Isotypkontrolle 1:50, PE 1:200	51
Abb. 5-40: FACS 1. + 3. Trimester, Jagged1 und Isotypkontrolle 1:100, FITC 1:500	52
Abb. 5-41: FACS 1. + 3. Trimester, Jagged2 und Isotypkontrolle 1:50, FITC 1:200.	52
Abb. 5-42: FACS 1. + 3. Trimester, Delta1 und Isotypkontrolle 1:100, AF. 1:500.....	53
Abb. 5-43: FACS 1. + 3. Trimester, Delta4 und Isotypkontrolle 1:50, FITC 1:200	53
Abb. 5-44: Schematische Zusammenfassung immunhistologischer Ergebnisse.....	54

III) Abkürzungen

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AF.	AlexaFluor 647
AK	Antikörper
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Protein
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Kohlendioxid
DAB	3,3´ -Diaminobenzidin
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol (= Clelands Reagenz)
EBM2 Medium	Endotheliales Basalmedium, enthält zusätzlich 10%FKS, 2% Penicillin / Streptomycin, Plasmocin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermale Growth Factor
EZ	Endothelzellen
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Flouoroisothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
FSC	Forward Scatter
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution

HeLa-Zellen	Henrietta Lacks Zellen
HERP	HES-related repressor protein
HIF	Hypoxia inducible factor
HOPE	HEPES-Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
HZ	Hofbauer-Zellen
Kan.	Kaninchen
MACS-Technik	Immunomagnetische Zellseparation
MEM Medium	Minimal Eagle's Medium
Mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NICD	Notch intracellular domain
p. c.	post conceptionem
PAK	Primärantikörper
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerytherin
PFA	Paraformaldehyd
RBP	recombination signal sequence-binding protein
Rnase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	polymerase chain reaction
s	Sekunde
SAK	Sekundärantikörper
SEM	standard error of the mean
SSC	Sidewards Scatter

ssRNA	single-stranded ribonucleic acid
ST	Synzytiotrophoblast
SZ	Stromazellen
TAE-Puffer	Tris-acetate-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Lösung
Trim.	Trimester
U	Units
Zg	Ziege
ZT	Zytotrophoblast

1 Einführung

In der vorgestellten experimentellen Arbeit steht der Nachweis von Notch-Rezeptoren 1 bis -4 und ihren Liganden, Delta1 und -4, Jagged1 und -2, in der humanen Plazenta im Zentrum. Diese Rezeptoren und Liganden spielen eine wesentliche Rolle in der Gefäßentwicklung von physiologisch und pathologisch wachsenden Geweben und Organen. Das Gefäßwachstum ist in der humanen Plazenta für einen adäquaten Gasaustausch und Transport von Nährstoffen zwischen Mutter und Embryo und damit für eine normale Schwangerschaftsentwicklung verantwortlich. Eine unzureichende Ausbildung des placentaren Gefäßsystems führt häufig zu Frühaborten, intrauterinem Fruchttod (Meegdes et al., 1988) oder Restriktion des fetalen Wachstums (Krebs et al., 1996). Schwerwiegende Schwangerschaftskomplikationen wie die Präeklampsie (Meekins et al., 1994) sind mit Gefäßpathologien der Plazenta assoziiert. In epidemiologischen Studien wird eine erhöhte Inzidenz von Hypertonie, Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und Schlaganfällen betroffener Kinder im Erwachsenenalter gesehen (Barker, 1990).

1.1 Aufbau der Plazenta und Typisierung

Für die erfolgreiche Entwicklung eines Embryos bzw. Fetus muss bei allen Säugetieren eine Plazenta ausgebildet werden. Prinzipiell wird diese aus fetalem (Chorion) und maternalem (Endometrium) Gewebe gebildet. Allerdings gibt es speziesspezifische Unterschiede. Bei Betrachtung der Uterusmukosa nach der Geburt lassen sich zwei große Plazentatypen unterscheiden (Strahl, 1906). Zum einen die adeziduate Plazenta, eine Semiplazenta, bei der das Endometrium während der Trächtigkeit und der Geburt fast vollständig erhalten bleibt. Somit entstehen hier keine maternalen Verluste von Gewebe und Blut und die Nachgeburt besteht nur aus fetalen Anteilen. Dieser Plazentatyp kommt bei Pferden, Wiederkäuern und Schweinen vor.

Zum anderen die deziduate Plazenta, eine Vollplazenta, die sich durch eine Degeneration von Anteilen des Endometriums (Epithel, Stroma, Gefäßendothelien) auszeichnet, wodurch eine besonders innige Verbindung des Chorions mit dem Endometrium zustande kommt. Hier kommt es bei der Geburt zu Verlust von maternalem Gewebe und Blut. Im Uterus entsteht eine Wundfläche durch das Abstoßen der transformierten Anteile des Endometriums, die als Dezidua bezeichnet

werden. Die Nachgeburt besteht hier aus fetalen und maternalen Anteilen. Dieser Plazentatyp ist bei Hunden, Katzen, Mäusen, Ratten, Menschen und anderen Primaten zu finden.

Weiterhin kann man die Invasivität des jeweiligen Trophoblasten auf histologischer Ebene zur Einteilung der verschiedenen Plazenta-Typen heranziehen (Grosser, 1927). Die epitheliochoriale Plazenta entspricht der adeziduaten Plazenta. Hier kann keine Invasion des Trophoblasten beobachtet werden. Maternales Epithel, Bindegewebe und Gefäßendothel bleiben bestehen und die Trennung des Trophoblasten vom uterinen Epithel verläuft entlang des apikalen Mikrovillisaumes.

Bei der endotheliochorialen Plazenta, die zu den deziduaten Plazenten gezählt wird, dringt der Trophoblast in das maternale Gewebe ein. Dabei wird die Degeneration von uterinem Epithel und endometrialem Bindegewebe sichtbar, wodurch der Trophoblast direkt in Kontakt mit maternalen Endothelzellen der Uterusgefäße kommt (Strahl, 1906). Zu finden ist dieser Plazentationstyp bei Fleischfressern.

Die hämochoriale Plazenta, ebenfalls zu den deziduaten Plazenten gehörend, bezeichnet die invasivste Form des Trophoblasten. Es kommt zum Abbau des maternalen Endometriums inklusive der Endothelien uteriner Blutgefäße. Damit werden die Zellen des Chorionepithels direkt von mütterlichem Blut umspült (Abb. 1-1). Dieser Plazentatyp, der bei Nagern und Primaten vorkommt, lässt sich weiter anhand der Anzahl der Schichten des Trophoblasten unterteilen. Die hämomonochoriale Plazenta, die bei Mensch und Meerschwein vorkommt, hat ein zum Synzytium umgewandeltes einschichtiges Chorionepithel. Das Meerschwein unterscheidet sich in der Form der Plazentation vom Menschen, in dem es eine Subplazenta besitzt. Darüber hinaus bleibt der Dottersack bis zur Entbindung erhalten (Carter, 2007). Die hämodichoriale Plazenta ist bei Kaninchen zu finden und besteht aus einer synzytialen äußeren und einer zellulären inneren Schicht des Trophoblasten. Die hämotrichoriale Plazenta, bei der die äußere Schicht zellulär und die tiefer liegenden Trophoblastschichten synzytial sind, ist bei Ratte und Maus beschrieben (Carter und Enders, 2004). Darüber hinaus unterscheidet sich die humane Plazenta von den Plazenten des übrigen Tierreiches hinsichtlich der maternofetalen Interaktionszone. Beim Menschen liegt ein Villöser- während bei der Maus ein Labyrinth-Typ vorliegt (Kaufmann und Davidoff, 1977).

1.2 Besonderheiten der humanen Plazenta

Die humane Plazenta ist im ausgereiften Zustand etwa 600g schwer und hat einen Durchmesser von 15 bis 20cm. Zwischen dem Chorion und der basalen Dezidua, die auch als maternale Basalplatte bezeichnet wird, befindet sich der intervillöse Raum. Dieser ist mit maternalem Blut gefüllt und wird von der Dezidua aus durch bindegewebige Septen in Kotyledonen unterteilt. Die am Nährstoffaustausch beteiligten und bei der Osmose zu überwindenden Schichten sind Synzytio- und Zytotrophoblast und Endothelzellen.

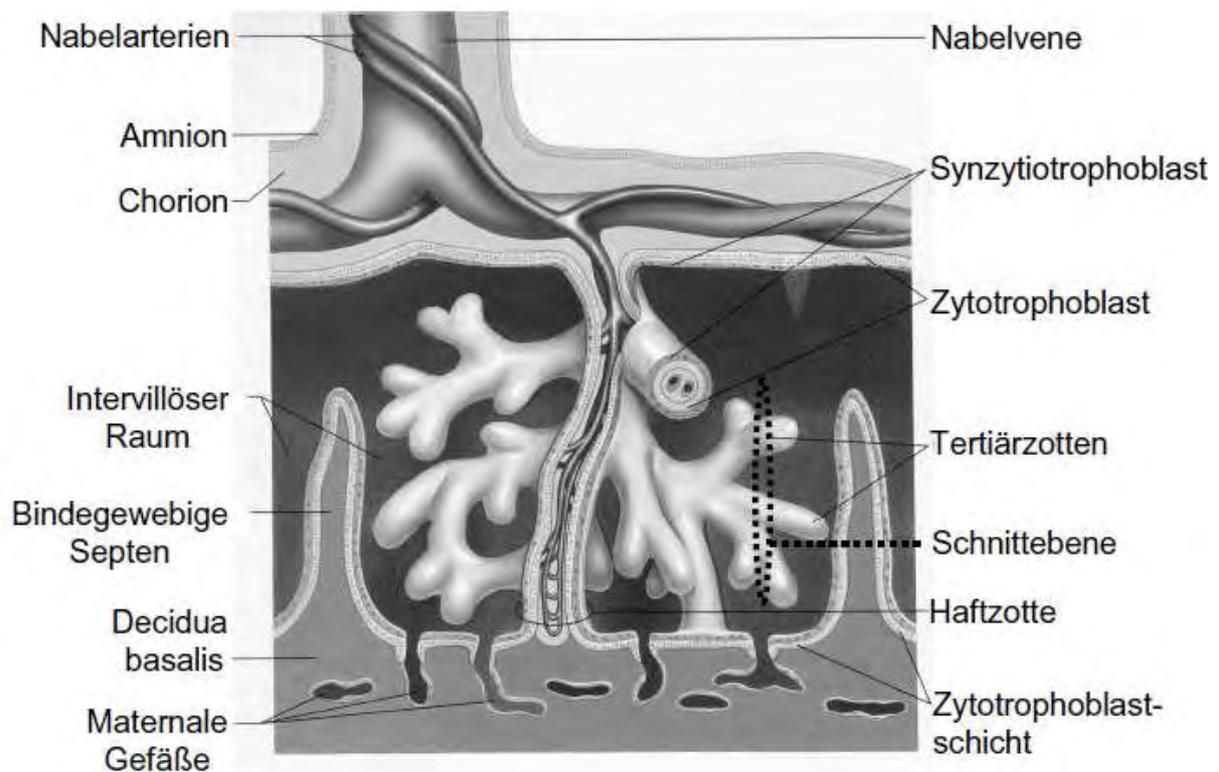


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau der humanen Plazenta. Aus Cochard (2002), modifiziert. (Cochard, 2002)

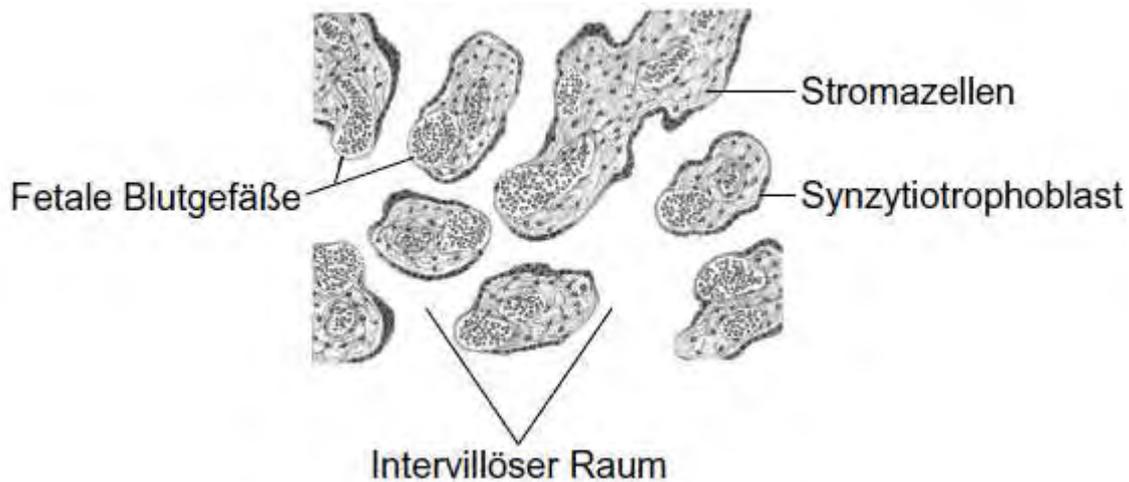


Abb. 1-2: Schematischer Aufbau einer reifen humanen Plazenta, histologisch. Aus in Abb. 1-1 eingezeichneter Schnittebene aus Cochard (2002), modifiziert. (Cochard, 2002)

Im Zottenstroma von Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten humaner Plazenten sind Makrophagen, die als Hofbauer-Zellen bezeichnet werden, zu finden (Castellucci et al., 1980). Im Gegensatz zu den in der Dezidua lokalisierten dendritischen Zellen, sind die Hofbauer-Zellen nicht direkt an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz der Mutter gegenüber dem Feten beteiligt. Die Aufgaben der Hofbauer-Zellen sind vielfältig. In der frühen Plazenta sind sie an der Flüssigkeitsbilanz beteiligt. Sie tragen CD64, CD32 und CD16 Rezeptoren und sind damit in der Lage maternale anti-fetale Antigen-Antikörper-Komplexe zu binden. Weiterhin ermöglicht ihnen ihr Fc Rezeptor die Bindung von IgG. Hofbauer-Zellen produzieren alpha-1 Antitrypsin und alpha-1 Antichymotrypsin, was zu der Annahme führt, dass sie eine Rolle im Prozess der Modellierung und Differenzierung von Plazentazotten spielen. Außerdem geht man von einer Antigen-Präsentation gegenüber fetalen Lymphozyten aus, was für eine Beteiligung an transplazentaren Infektionen spricht (Benirschke et al., 2006).

1.3 Gefäßentwicklung in der humanen Plazenta

Die Entwicklung des vaskulären Systems der Plazenta stellt eine essenzielle Voraussetzung für die Versorgung des sich entwickelnden Fetus dar, da hierüber der Transport von Flüssigkeiten, gelösten Stoffen, Gasen, Makromoleküle und Zellen sichergestellt werden kann. Während des Prozesses der Implantation werden Primärzotten gebildet (5./6. Tag post conceptionem (p. c.)). Der erste Hinweis für placentare Vaskulogenese ist bereits ab dem 15. Tag p. c. zu finden. In diesem

Stadium der Sekundärzotten differenzieren aus mesenchymalen Zellen vaskuläre endotheliale Progenitorzellen. Die Bildung von tertiären Plazentazotten wird durch den ersten Nachweis von Blutgefäßen ab dem 22. Tag p.c. eingeleitet (Charnock-Jones et al., 2004; Kaufmann et al., 2004; Mayhew et al., 2004). Die de novo Entstehung von Blutgefäßen, die sogenannte Vaskulogenese, ist bis zur 10.-12. Schwangerschaftswoche (SSW) zu sehen. Zwischen der 13. und der 20. SSW findet eine kontinuierliche Umgestaltung und Reifung des Gefäßsystems in den Zotten statt. Nach der 20. SSW ist keine weitere Vaskulogenese mehr erkennbar (Asan et al., 1999; Demir et al., 1989).

Die Rolle der vaskulären Zelldifferenzierung in dem Prozess der plazentaren Angio- und Vaskulogenese ist nicht vollständig bekannt. Die Differenzierung der Zellen scheint das Resultat einer intensiven Interaktion zwischen Mesoderm, Trophoblast und Endothelzellen zu sein (Kingdom et al., 2000). Hinweise darauf sind in einem Mausmodell zu finden, bei dem die gezielte Zerstörung des Trophoblasten-Transkriptionsfaktors glial cell missing-1 signifikant die Entstehung von Gefäßen in der fetomaternalen Einheit reduzierte (Anson-Cartwright et al., 2000).

1.4 Notch-Rezeptoren und -Liganden

Die Notch-Rezeptoren und -Liganden sind während der Evolution in Vertebraten nahezu unverändert geblieben. Säugetiere besitzen vier Notch Proteine (Notch1 bis -4), welche membranständige, transmembranöse Rezeptoren sind (Del Amo et al., 1992; Lardelli et al., 1994; Uyttendaele et al., 1996; Weinmaster et al., 1992). Die große extrazelluläre Domäne umfasst eine variable Anzahl von epidermalen Wachstumsfaktor-Sequenzen (EGF). EGFs sind die eigentlichen Bindungsstellen, da sie den Kontakt zwischen Rezeptoren und Liganden herstellen (Fehon et al., 1990; Rebay et al., 1991). Exemplarisch ist die Verbindung eines Notch-Rezeptors mit einem Delta-Liganden gezeigt (Abb. 1-3). Die Verbindungen zwischen Notch-Rezeptoren und ihren anderen Liganden sind analog.

Insgesamt wird der Rezeptor an drei Stellen proteolytisch gespalten. Durch Glykosylierung erhält er die Spezifität für seine Liganden (Alberts et al., 2002a).

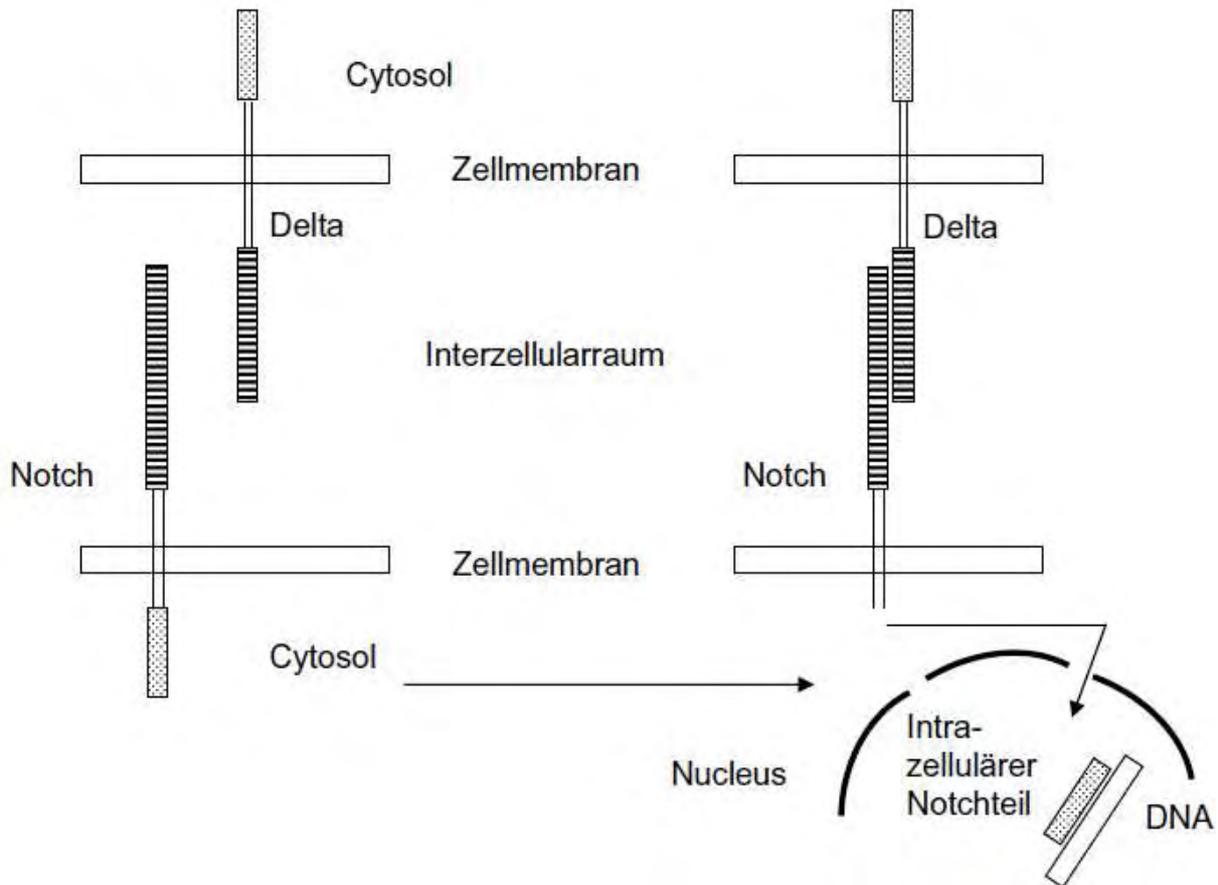


Abb. 1-3: Notch-Rezeptor und Delta als Ligand in der schematischen Anordnung. Bei Kontakt von Notch mit Delta kommt es zur Abspaltung des intrazellulären Anteils von Notch. Dieser wird in den Nucleus transloziert und interagiert mit einem DNA-Bindungsprotein, um damit die Transkription genau zu regulieren. Aus Alberts (1994), modifiziert.

Die Notch Liganden Delta1 (Bettenhausen et al., 1995), Delta3 (Dunwoodie et al., 1997), Delta4 (Shutter et al., 2000), Jagged1 (Lindsell et al., 1995) und Jagged2 (Shawber et al., 1996) sind ebenfalls membrangebunden und beinhalten genauso wie die Rezeptoren eine variable Anzahl von EGF-Sequenzen. Die Interaktion eines Liganden mit seinem Rezeptor führt zu einer proteolytischen Spaltung und Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD: Notch intracellular domain). Diese wandert in den Zellkern, um dort mit dem DNA-Bindungsprotein RBP-Jk (auch als LAG-1, CSL, CBF1 oder Su(H) bezeichnet) zu interagieren (Borggreve und Oswald, 2009). Dieser Komplex aktiviert die Expression der HES/E(spl)-Familie (Enhancer of split). HES/E(spl) ist ein transkriptionaler Repressor, der zu dem Typ der basischen Helix-Loop-Helix-Protein-Familie (bHLH) gehört. Ohne die Aktivierung durch NICD unterdrückt dieser die Expression

nachgeschalteter Zielgene, bei denen es sich um gewebsspezifische transkriptionale Aktivatoren handelt. Folglich beeinflusst HES/E(spl) als erster bekannter Notch-Effektor die Entscheidung über die Differenzierung der Zelle.

Weiterhin ist HERP (HES-related repressor protein, auch als Hey/Hesr/HRT/CHF/gridlock bezeichnet), bekannt. Es handelt sich dabei um eine eigenständige bHLH-Protein-Familie, die der HES/E(spl)-Familie sehr ähnlich ist.

Eine Schlüsselbeobachtung wurde bei der Kombination von HES und HERP gemacht. Zusammen bilden sie ein Heterodimer aus, der als transkriptionaler Repressor wirkt (Iso et al., 2003a).

Über die Expression von Notch-Rezeptoren und -Liganden ist bekannt, dass sie in verschiedenen Spezies an der Differenzierung von unspezifischen Zellen zu spezifischen Zelllinien mitwirken. Dies wird durch den Kontakt von Rezeptor und Ligand vermittelt, es kommt zur Hemmung oder Aktivierung der Zelldifferenzierung, bzw. -entwicklung (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

1.4.1 Lateral Inhibition

Ein möglicher Wirkungsmechanismus der Notch-Delta-Jagged Interaktion ist der Prozess der Lateralen Inhibition. Beschrieben ist dieser Differenzierungsablauf bei *Drosophila*, die als Prototyp für Notch und ihre Liganden gelten (Alberts et al., 2002b).

Unter dem Begriff der „lateral inhibition“ versteht man einen interzellulären Interaktionsmechanismus, bei dem unmittelbar benachbarte gleichartige Zellen sich nicht zur selben Zeit in derselben Weise entwickeln (Alberts et al., 2002a).

Im Gegensatz zu unidirektionaler oder reziproker Interaktion findet die laterale Inhibition zwischen gleichwertigen Zellen statt. So kommt es zu unterschiedlichsten Entwicklungen einzelner Zellen aus gleichwertig entwickelten Zellclustern heraus (Lodish et al., 2000).

Vermittelt wird dies durch folgenden Mechanismus (Abb. 1-4). Zu Beginn eines Differenzierungsabschnittes von homogenen Vorläuferzellen exprimieren diese Zellen eines Clusters gleichzeitig beispielsweise Notch-Rezeptoren und Delta-Liganden. Gelingt es einem Delta-Liganden einen Notch-Rezeptor durch Bindung zu aktivieren, gelangt in die Notch exprimierende Zelle ein hemmendes Signal. Anfänglich hemmen sich alle Zellen eines Clusters gegenseitig. Bekommt eine Zelle ein hemmendes Signal, geht man davon aus, dass dies zwei Reaktionen

bei der empfangenden Zelle auslöst. Erstens reduziert sich die Tendenz dieser Zelle eine sogenannte Sensory Mother Cell, sensorische Mutterzelle, zu werden. Zweitens reduziert sich die Fähigkeit als Antwort ein hemmendes Delta Signal weiter zu geben. So wird eine Wettkampfsituation geschaffen. Eine einzelne Zelle in jeder kleinen Region kann als Gewinnerin, als sensorische Mutterzelle, hervorgehen. Diese sendet dann starke hemmende Signale zu ihren unmittelbar benachbarten Zellen, was dazu führt, dass von den Nachbarzellen keine weitere Hemmung bei der sensorischen Mutterzelle ankommen kann (Alberts et al., 2002b).

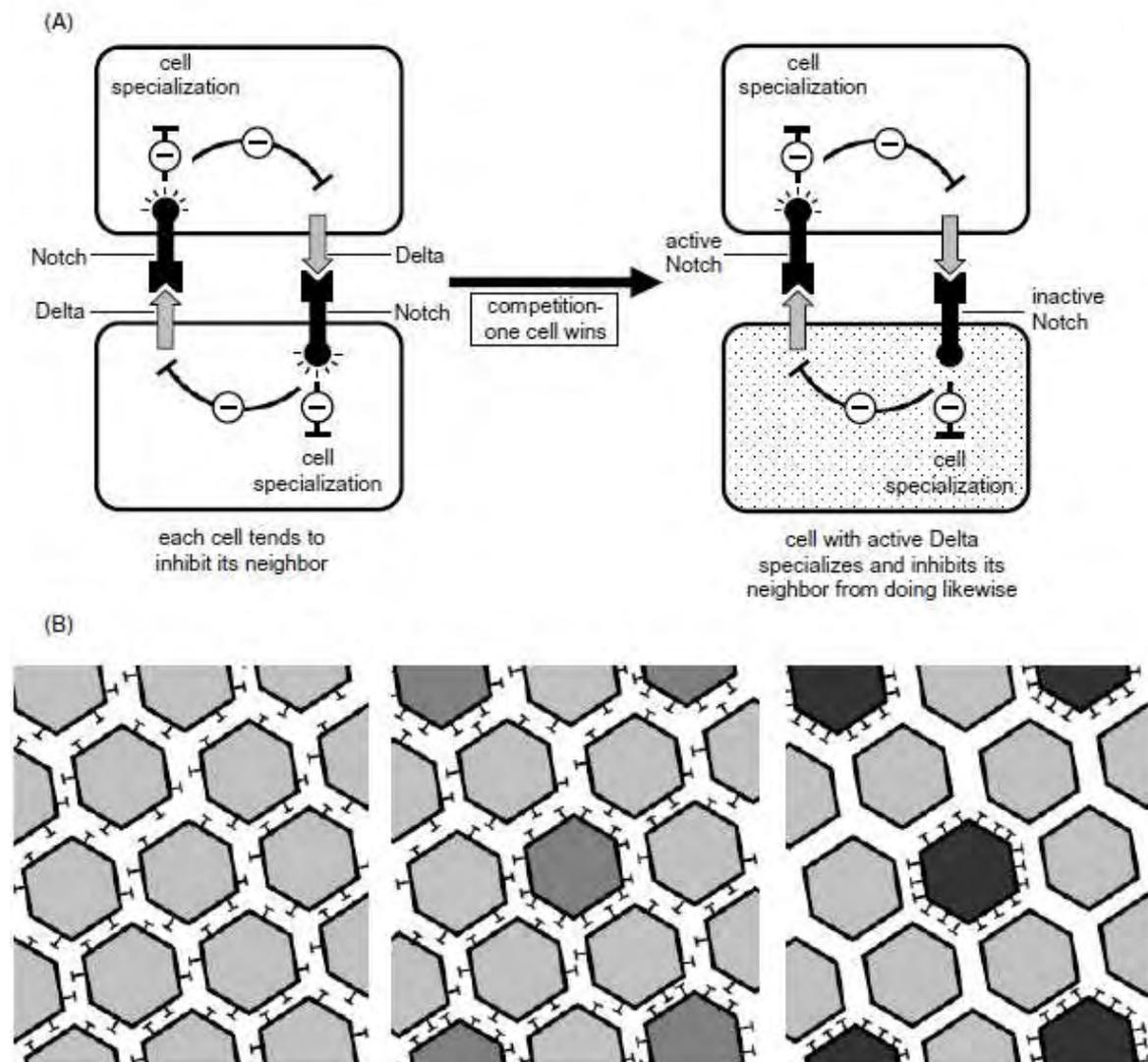


Abb. 1-4: Lateral Inhibition. Zellen eines Clusters exprimieren zeitgleich Rezeptor und Ligand. Durch Bindung von Delta an Notch wird Notch aktiviert und die Zelle, die Notch exprimiert, erhält ein hemmendes Signal. Diese Zelle tendiert daraufhin dazu, keine sensorische Mutterzelle zu werden. Weiterhin reduziert sich die Fähigkeit zum Senden eines hemmenden Delta Signals als Antwort. Aus Alberts (2002b), modifiziert.

1.4.2 Notch und Differenzierung

Die Notch-Signalwirkung ist streng Kontext abhängig und Unterschiede in Intensität, Zeit, Zelltyp und Kontext des Signals beeinflussen das erzeugte Resultat (Bolos et al., 2007). Die Funktion von Notch-Rezeptoren und ihren Liganden wurde im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems und der kardiovaskulären und endokrinologischen Entwicklung beschrieben. Weiterhin sind die Notch-Rezeptoren und ihre Liganden als Onkogene oder Tumorsupressor Gene bekannt (Bolos et al., 2007). Abhängig von der Umgebung kann Notch hemmend, verzögernd oder auslösend auf den Prozess der Differenzierung wirken. Weiterhin kann Notch die Apoptose fördern, zu Zellteilung führen oder an der Beibehaltung des momentanen Zustandes beteiligt sein. Eine andere Form von Notch Signalen löst spezifische Zellentwicklungen aus und bildet Grenzen zwischen differenzierten Zellarten (Lai, 2004). Über eine gerichtete Signalwirkung wird eine Feedback Regulation an benachbarte Zellen weitergegeben. Diese reagieren mit wechselseitiger Expression von Notch-Rezeptoren und Liganden. So kommt es dazu, dass in einer Zelle nur die Rezeptoren und in Nachbarzellen nur die Liganden exprimiert werden (Christensen et al., 1996; Wilkinson et al., 1994).

Die Notch Expression in der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm der humanen Blastozysten (Adjaye et al., 2005) lässt vermuten, dass Notch und seine Liganden in die sehr frühe Entscheidung über die Zelldifferenzierung involviert sind. Einerseits wird die weitere Differenzierung von hämatopoetische Progenitorzellen im Mausmodell durch Delta4 gehemmt (Han et al., 2000). Andererseits fördert Jagged1 die Bildung von murinen primitiven Vorläuferzellpopulationen in vitro (Varnum-Finney et al., 1998). Neben den in vitro Experimenten und Studien an Stammzellen sind Mutationen der Notch-Rezeptoren und ihren Liganden als Gründe für ererbte Krankheiten sowie für die Entwicklung von Krebs bekannt. Die Folgen von Jagged1 Mutationen bei Menschen sind in dem autosomal dominanten „Alagille Syndrom“ sichtbar. Dieses zeigt eine enorme Variabilität an klinischen Befunden. Es wird von Cholestase berichtet, die durch einen Mangel an Gallengängen verursacht wird und von Bronchialbaumstenosen (Kamath et al., 2003). Weiterhin werden typische Gesichtszüge und das Auftreten von Schmetterlingswirbeln genannt (Li et al., 1997). Auch treten renale und zentralnervöse Abnormalitäten auf. Die Mortalität bei dem „Alagille-Syndrom“ liegt schätzungsweise bei 10%. Gefäßverschlüsse, kardiale

Krankheiten und Lebererkrankungen sind für die meisten Todesfälle verantwortlich (Emerick et al., 1999).

Durch Mutationen des Liganden Delta3 entstehen bestimmte Formen von „Spondylocostaler Dysostosis“, bei der es zu Zusammenschlüssen von Rippen und zu Kleinwüchsigkeit des Rumpfes kommt (Bulman et al., 2000). Überraschenderweise ist die Notch-Signalwirkung auch eng in verschiedene humane Krebsarten eingebunden. Die akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL) ist durch die erhöhte Aktivität von Notch in T-Zellen charakterisiert (Ellisen et al., 1991).

Umgekehrt ist es so, dass bei Mäusen, bei denen Notch1 ausgeschaltet wurde, es zur Ausbildung von Haut- und Korneatumoren kommt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Notch auch bei der Unterdrückung der Krebsentstehung eine Rolle spielt (Nicolas et al., 2003).

Ein weiterer Beweis für eine Schlüsselfunktion von Notch in der vaskulären Entwicklung und Homöostase ist durch die Mutation des humanen Notch3-Gens gegeben. Dies ist die Ursache für Apoplex und vaskuläre Demenz und wird als „CADASIL“ (cerebrale autosomale dominante Arteriopathie mit subcorticalem Infarkt und Leukoencephalopathie) bezeichnet (Joutel et al., 1996).

1.4.3 Notch und Gefäßentwicklung

Eine zentrale Bedeutung haben die Notch-Rezeptoren und -Liganden in der Gefäßentwicklung (Krebs et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass in Gefäßen, in denen Angiogenese oder Vaskulogenese stattfindet, der Notch-Ligand Delta4 exprimiert wird, wohingegen ruhende Gefäße keine Delta4 Expression aufweisen (Ridgway et al., 2006). Im Prozess der Differenzierung zwischen Vene und Arterie wird bei abgeschaltetem Notch-Signalweg der venöse Phänotyp ausgebildet (You et al., 2005).

Darüber hinaus konnte eine Beteiligung von Delta4 an der Tumorangio-genese gezeigt werden. Es kommt dabei zur Hochregulation der Angiogenese, allerdings ist diese nicht-produktiv, da das ausgebildete Netz von Blutgefäßen nicht geschlossen wird. Aufgrund der so entstehenden Lücken im Gefäßnetz kommt es zu einer Minderperfusion des umliegenden Gewebes. Die daraus resultierende Hypoxie führt dann zur Hemmung des Tumorwachstums (Noguera-Troise et al., 2006).

Beim Ovarialkarzinom binden endotheliale Zellen das Notch-Rezeptoren und -Ligandensystem mit ein. Jagged1 wurde hier 3- bis 4fach überexprimiert

vorgefunden (Lu et al., 2007). Jagged1 wird ebenfalls in Tumorzellen exprimiert und hat einen positiven Einfluss auf die Tumorangiogenese (Dufraine et al., 2008).

Die Rolle von Notch-Rezeptoren und ihren Liganden in Angio- und Vaskulogenese ist für verschiedene Spezies und Kompartimente beschrieben. Beim Umbau des primären Gefäßsystems sind neben VEGF und Notch die Angiopoietine und Tie Rezeptoren zu finden (Thurston, 2003). Aus Studien mit Zebrafischen ist Notch als ein eng eingebundener Akteur in der frühen Entscheidung über die Differenzierung von Arterien und Venen bekannt. Das Einbringen einer dominant-negativen Form eines Suppressors of Hairless (SuH) führt in dem gemeinsamen Notch-Signal-Transduktionsweg zu geringerer Expression von arteriellen Markern, wie EphrinB2, und zu ektopischer Expression von venösen Markern in der Aorta von Zebrafischembryonen (Lawson et al., 2001; Zhong et al., 2001).

Umgekehrt induziert die Expression von aktivierten Notch-Rezeptoren ektope arterielle Marker in der Vena cava (Lawson et al., 2001). Notch1 defiziente Mäuse sterben im embryonalen Alter mit schweren vaskulären Defekten, wie dem mangelhaften Einwachsen der Gefäße in das plazentare Labyrinth (Limbourg et al., 2005). Mutationen von Delta4 bei Mäuseembryonen führen zu fehlerhaften Entwicklungen der Aorta und Vena cava mit Entstehung von arteriell-venösen Shunts (Duarte et al., 2004). Dieses Geschehen ist mit der Herunterregulation von arteriellen und der Hochregulation von venösen Markern assoziiert. Delta4 scheint in erster Linie auf autokrine Weise an dem arteriellen Endothelium durch die Rezeptoren Notch1 und -4 zu wirken. Die gleichzeitige Mutation von Notch1 und -4 führt zu ähnlichen phänotypischen Veränderungen wie Mutationen von Delta4, inklusive des Fehlens der arteriellen Spezifikation (Krebs et al., 2004). Die Notch Signalwirkung könnte in der Festlegung grundlegender Muster und damit in der Anzahl der Aufzweigungspunkte der Angiogenese ebenso wichtig sein, wie auch in der Spezifikation zur Arterie oder Vene.

1.4.4 Notch in der fetomaternalen Einheit

Über die Expression von Notch und seinen Liganden in der fetomaternalen Einheit ist wenig bekannt. Bei Mäusen sind Notch1, Notch2, Notch4 und Delta4 an der Differenzierung bestimmter Trophoblastzelltypen, der fetalen Vaskulomorphogenese und der Bildung des maternalen Blutgefäßsystems beteiligt. Dabei ist Notch2 für die maternale Blutgefäßbildung in der Plazenta verantwortlich. Notch1 und Notch4 sind

an der fetalen Angiogenese bei Mäusen maßgeblich beteiligt (Gasperowicz und Otto, 2008). Für humanes Plazentagewebe des ersten und des dritten Trimesters wird die Expression von Notch1, Notch4 und Jagged1 im Zytotrophoblast, im Synzytiotrophoblast, in endothelialen Zellen und in dem Stroma der plazentaren Zotten beschrieben (De Falco et al., 2007). Die Notch1 Expression war in der Dezidua mittel bis hoch. Im Gegensatz dazu lag eine niedrige Notch1 Expression im Synzytiotrophoblast der Plazentazotten vor. Eine moderate Expression von Notch1 war im Endothel der Arterien zu finden, wohingegen in den Venen kein Notch1 exprimiert war (Baldi et al., 2004). In Anbetracht der Beteiligung der Notch-Rezeptoren und seinen Liganden an dem Prozess der Differenzierung von Zellen in der Angio- und Vaskulogenese, ist eine genaue Beschreibung der Lokalisation aller Notch-Rezeptoren und -Liganden innerhalb der Plazenta für ein besseres Verständnis ihrer möglichen Wechselwirkungen nötig.

2 Zielsetzung

Bei schwangerschaftsassozierten Erkrankungen, wie beispielsweise der intrauterinen Wachstumsretardierung und der Präeklampsie, weist das Gefäßsystem eine veränderte Entwicklung auf. Verschiedene Knock-out-Maus-Modelle, sowie Syndrome im menschlichen Organismus, die mit Mutationen im Notch-Jagged-Delta System assoziiert sind, zeigten die essenzielle Rolle der Notch-Rezeptoren und ihrer Liganden in der Entwicklung des Gefäßsystems. Der zugrundeliegende Notch-Signalweg ist aus der Differenzierung humaner hämatopoetischer Zellen bekannt. Um nun den Prozess der Vaskulo- und Angiogenese in der humanen Plazenta genauer zu charakterisieren, wird im Rahmen der vorgelegten Untersuchung die Expression von Notch-Rezeptoren und ihren Liganden während der Schwangerschaft untersucht.

Dabei werden folgende Fragen adressiert:

- Welche Komponenten der Notchfamilie werden in der humanen Plazenta exprimiert?
- Gibt es Unterschiede in der Expression von Notch und ihren Liganden zwischen dem 1. und dem 3. Trimester – also zwischen dem sich noch entwickelnden placentaren Gefäßsystem und einem ausgereiften placentaren Gefäßsystem?

Hierzu werden die Notch-Rezeptoren 1 bis 4, die -Liganden Jagged1 und -2 und Delta1 und -4 im 1. und 3. Trimester in ihrer Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene analysiert. Humanes placentares Gewebe wird aus Abruptiones (6.-12. SSW) sowie aus Kaiserschnitten (37.-41. SSW) entnommen. Die mRNA Analyse wird qualitativ mit Hilfe von konventioneller RT-PCR und semiquantitativ mit realtime PCR durchgeführt. Die Analyse der Proteine erfolgt qualitativ mittels Immunhistochemie und semiquantitativ mittels Durchflusszytometrie. Für die zuletzt genannte Methode ist eine Isolation und Kultivierung von placentaren Zellen mittels mechanischer und enzymatischer Techniken erforderlich.

3 Material

Die verwendeten humanen Plazenten wurden aus elektiven Kaiserschnitten am Entbindungstermin gewonnen. Ausschlusskriterien waren vorzeitige Entbindung, Amnioninfektionssyndrom, Gestationsdiabetes, intrauterine Wachstumsretardierung und Präeklampsie. Trophoblastmaterial wurde aus Schwangerschaftsabbrüchen aus sozialer Indikation (§ 218 StGB) gesammelt. Die Patientinnen wurden über die Materialentnahme aufgeklärt und stimmten schriftlich zu. Die Studie erhielt von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Genehmigung. Insgesamt wurden jeweils mindestens drei Plazenten aus dem 1. und dem 3. Trimester verwendet. Aus ethischen Gründen und wegen oben genannter Ausschlusskriterien musste auf die Untersuchung von Plazenten aus dem 2. Trimester verzichtet werden.

3.1 Plazenten

Tab. 3-1: verwendete Plazenten

Methode	Erstes Trimester	Drittes Trimester
Konventionelle PCR	7., 8., 10., 11. SSW	39., 40., 41. SSW
Realtime PCR	8., 10., 11., SSW	41., 2 x 40. SSW
Immunhistochemie	8., 9., 12. SSW	37., 38., 39. SSW
Durchflusszytometrie	6., 10., 12. SSW	38., 39., 40. SSW

3.2 Primer

Tab. 3-2: Primer für die konventionelle PCR

Produkt (Größe)	Chromo- som / NM		Primer Sequenz (5'-3')
Beta-Aktin 800bp	7 / 001101	forward reverse	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC
Notch1 505bp	9 / 017617	forward reverse	GCGGCCGCCTTTGTGCTTCTGTTC CGGCCGGCGCGTCCTCCTT
Notch2 474bp	1 / 024408	forward reverse	GCTGATGCTGCCAAGCGT CCGGGGAAGACGATCCAT
Notch3 476bp	19 / 000435	forward reverse	TTGCTGCTGGTCATTCTCG TCCTCTTCAGTTGGCATTGG
Notch4 394bp	6 / 004557	forward reverse	TCCTGGGGCCCCGGGCTGAAGAAAAG ACGCCGGATGAGCTGGAGGACGAGA
Delta1 382bp	6 / 005618	forward reverse	AGACGGAGACCATGAACAAC TCCTCGGATATGACGTACAC
Delta4 620bp	15 / 019074	forward reverse	TGACCACTTCGGCCACTATG AGTTGGAGCCGGTGAAGTTG
Jagged1 227bp	20 / 000214	forward reverse	TCGCTGTATCTGTCCACCTG AGTCACTGGCACGGTTGTAG
Jagged2 600bp	14 / 002226	forward reverse	GATTGGCGGCTATTACTGTG AGGCAGTCGTCAATGTTCTC

Tab. 3-3: Primer für die realtime PCR

Produkt (Größe)		Primer Sequenz (5'-3')
Beta-Aktin 75bp	forward	CCTGGCACCCAGCACAAT
	reverse	GCCGATCCACACGGAGTACT
Notch2 86bp	forward	CCTGGCCTCTCACGCCATA
	reverse	AGCTGAGTGC GTTCTGGAGTCAG
Notch3 55bp	forward	GTGATCGGCTCGGTAGTAATGC
	reverse	GTGATCATTCTCAGGCGACTGC
Notch4 69bp	forward	CCACTAGGCGAGGACAGCATT
	reverse	CAACTCCATCCTCATCAACTTCTG
Delta1 70bp	forward	CAGGCCATCTGCTTCACCA
	reverse	AAGACGATACCCACAGTGCCC
Delta4 60bp	forward	CTGGAGCTCAGCGAGTGTGAC
	reverse	CCTGGTCCTTACAGCTGCCTC
Jagged1 73bp	forward	GGCTGCAGTCCTAAGCATGG
	reverse	TACAGGCCTTGCCAGCCA
Jagged2 95bp	forward	ATGCCTTAACGCTTTTTCTTGCA
	reverse	TTGACGTTGATATGGCAGTTGATG

3.3 Antikörper

Tab. 3-4: Primärantikörper (PAK)

Anti-human-	aus	-klonal	Markierung	Firma	Katalognr.
Notch1 (L-18)	Zg (Ziege)	poly	ohne	Santa Cruz	sc-23299
Notch2 (25-255)	Kan. (Kaninchen)	poly	ohne	Santa Cruz	sc-5545
Notch3 (M-134)	Kan.	poly	ohne	Santa Cruz	sc-5593
Notch4 (H-225)	Kan.	poly	ohne	Santa Cruz	sc-5594
DLL1	Maus	mono	ohne	RnDSystems	MAB18181
Delta4 (C20)	Zg	poly	ohne	Santa Cruz	sc-18640
Jagged1(C-20)	Zg	poly	ohne	Santa Cruz	sc-6011
Jagged2 (N19)	Zg	poly	ohne	Santa Cruz	sc-34475
CD68	Maus IgG1	mono	ohne	BD	556059
CD31	Maus IgG1	mono	ohne	BD	550389
Vimentin (V9)	Maus	mono	ohne	Santa Cruz	sc-6260
Cytokeratin7	Maus	mono	ohne	Dako	M7018

Tab. 3-5: Sekundärantikörper (SAK)

aus	anti-	Markierung	Firma	Katalognummer
Zg	Maus	Biotin	DakoCytomation	E 0433
Zg	Kan.	Biotin	DakoCytomation	E 0432
Kan.	Zg	Biotin	DakoCytomation	E 0466
Rind	Zg	FITC	Santa Cruz	sc-2348
Zg	Kan.	PE	Molecular Probes	P2771MP
Zg	Maus	AlexaFluor 647 (AF.)	Molecular Probes	A21235

Tab. 3-6: Isotypkontrollen

	-klonal	Markierung	Firma	Katalognummer
Normal Zg IgG	poly	ohne	Santa Cruz	sc-3887
Kan. IgG-Isotype Control	poly	ohne	Abcam	ab37415-5
Maus IgG1	mono	ohne	BD	555746
Maus IgG1	mono	PE	Acris	SM10R
Maus IgG1	mono	FITC	Acris	SM10F

Im Anhang sind weitere verwendete Materialien, Chemikalien, Software etc. mit den Herstellernamen zu finden.

4 Methoden

Aus den erhaltenen Plazenten wurden Gewebestücke entnommen. Diese wurden zum einen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert, um daraus RNA zu isolieren, die mittels PCR untersucht wurde. Zum anderen wurden die Plazentastücke in HOPE (Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect) fixiert und in Paraffin (low melting) eingebettet, um sie zur immunhistologischen Untersuchung zur Verfügung zu stellen. Außerdem wurden Zellen aus den Plazenten isoliert, kultiviert und in der Durchflusszytometrie untersucht.

4.1 Nachweismethoden auf molekularer Ebene

4.1.1 Konventionelle RT-PCR

Unter RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) versteht man eine molekularbiologische Methode, mit deren Hilfe die Expression spezifischer Gene in Zellen oder Geweben nachgewiesen wird.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten (Saiki et al., 1988). Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss die aus den Zellen isolierte mRNA untersucht werden. Daher ist es zunächst nötig, die mRNA mit einer Reversen Transkriptase (RT) in cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) umzuschreiben. Dies wird auch als First Strand Synthese (cDNA-Erststrangsynthese) bezeichnet. Die so gewonnene cDNA wird anschließend in einer PCR eingesetzt. Die dabei entstehenden Produkte werden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der verschiedenen Größen der DNA-Fragmente wandern diese unterschiedlich schnell im Gel. Durch Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA-Fragmente interkaliert, können diese mit UV-Strahlung (245nm) sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Die so dokumentierten DNA-Fragmente werden als Banden bezeichnet.

4.1.1.1 RNA Aufreinigung

RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits aufgereinigt. Das Funktionsprinzip des RNeasy Kits besteht aus der Kombination von selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik.

In Stickstoff kryokonserviertes und bei -80°C gelagertes Plazentagewebe sowie aufgereinigte und kultivierte Zellen wurden mit einem Lysis Puffer aufgenommen. Dieser enthielt als Reduktionsmittel zur reversiblen Inaktivierung von RNAsen β -Mercaptoethanol GITC (Guanidiniumisothiocyanat). Zur Homogenisierung des Zelllysates wurde dies in Qiashredder Spin Columns zwei Minuten (min) bei 13.000U/min zentrifugiert. Die homogenisierten Lysate wurden mit Ethanol versetzt und auf RNeasy mini spin columns pipettiert. Eventuell vorhandene DNA-Reste wurden durch Verdau mit RNase-freier DNase eliminiert. Anschließend erfolgte die Eluierung mit RNase-freiem Wasser. Die RNA-Konzentration wurde spektralfotometrisch bestimmt.

4.1.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte spektralfotometrisch in Quarzküvetten bei 260nm (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:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD } 260\text{nm} \times N \times f$$

c = Konzentration der Nukleinsäure-Lösung

OD 260nm = optische Dichte gemessen bei 260nm

N = Kalibrierungsfaktor: 50 bei dsDNA (double-stranded DNA),

40 bei ssRNA (single-stranded RNA)

f = Verdünnungsfaktor

4.1.1.3 PCR

Durchführung

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurden der SuperScript II Reverse Transkriptase Kit und Random Primers verwendet. 1,5 μ g bis 5 μ g der gesamten RNA und 1 μ l Random Primers wurden bei 70°C 10min im Thermo-Cycler zur Primer-Hybridisierung inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß kurz auf Eis gestellt und mit 8 μ l Master Mix, bestehend aus 5x first Strand Buffer, 0,1M DTT und 0,1mM dNTP Mix, versetzt. Nach einer Inkubation von 2min bei 42°C wurde

SuperScript Reverse Transkriptase dazugegeben und für weitere 50min bei 42°C in den Thermo-Cycler eingesetzt. Die RT Reaktion wurde mit einer 15min dauernden Inkubation bei 70°C beendet.

Die PCR wurde mit Hilfe des AccuPrime Taq DNA Polymerase Systems durchgeführt. 1µl cDNA (200ng cDNA) aus der First Strand Synthese wurde in einem Eppendorfhütchen mit 5µl 10x AccuPrime PCR Buffer, 1µl Primer 1 (10µmol/L), 1µl Primer 2 (10µmol/L), 1µl cDNA und 1µl AccuPrime Taq Polymerase vermischt. Das Volumen wurde auf 50µl mit ddH₂O (zweifach destilliertes Wasser) aufgefüllt.

Die Primer-Sequenzen wurden aus der Literatur entnommen und mithilfe verschiedener Internetanbieter:

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear>;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&itool=tollbar>;

<http://www.bioinformatics.org/seqext/>;

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>

auf folgende Kriterien, die das hier verwendete und mehrfach publizierte Protokoll (Fluhr et al., 2010) vor gibt, hin überprüft:

- Forward-Primer liegt in einem Exon.
- Reverse-Primer liegt in einem anderen Exon (wobei die Überlappung zwischen einem Primer und der Exon-Exon-Grenze mindestens 3 Basenpaare betragen sollte).
- Primer sollte nicht auf letztem Exon liegen.
- Maximal 70% des Primers bestehen aus Cytosin und Guanin.

Länge des PCR-Produktes sollte bei der realtime PCR 80 bis 120 Basenpaare sein und bei der konventionellen PCR 100 bis 2000 Basenpaare.

Als Positivkontrolle fand das „house-keeping“-Gen Beta-Aktin Verwendung.

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf 1 bis 2%iges Agarosegel aufgetragen. 1x TAE-Puffer (Tris-acetate-EDTA-Puffer, bestehend aus 40mM Tris-acetate und 1mM EDTA) wurde zum Auflösen der Agarose und als Laufpuffer in der Elektrophorese verwendet.

Ethidiumbromid wurde dem Agarosegel mit einer Endkonzentration von 0,3ng/ml zugegeben. Ein Standard-Molekulargrößenmarker (100bp DNA Gene Ruler Ladder) wurde zur Zuordnung der Basenpaargröße der PCR-Fragmente im Gel mitgeführt.. Bei der Beschickung des Gels wurden 10µl der jeweiligen PCR-Produkte mit 2µl Gel-

Lade-Puffer (6x Loading Dye Puffer) versetzt und anschließend in die Kammern des Agarosegels pipettiert. Die Analyse erfolgte mit dem Quantity One Programm, das semiquantitativ die optische Dichte der PCR-Fragmente in Relation zur Positivkontrolle (beta-aktin) auswertet.

4.1.2 Realtime PCR

Bei der realtime PCR handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der konventionellen PCR beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Zur Quantifizierung werden Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Ein Durchgang oder Lauf einer PCR besteht aus mehreren Zyklen. Die Produktion von PCR-Produkten ist grafisch in einer sigmoidalen Kurve darstellbar. Die Messungen der Fluoreszenz finden nur in der exponentiellen Phase der PCR statt (Abb. 4-1). Die exponentielle Phase ist meist zwischen dem 14. und dem 31. Zyklus zu sehen.

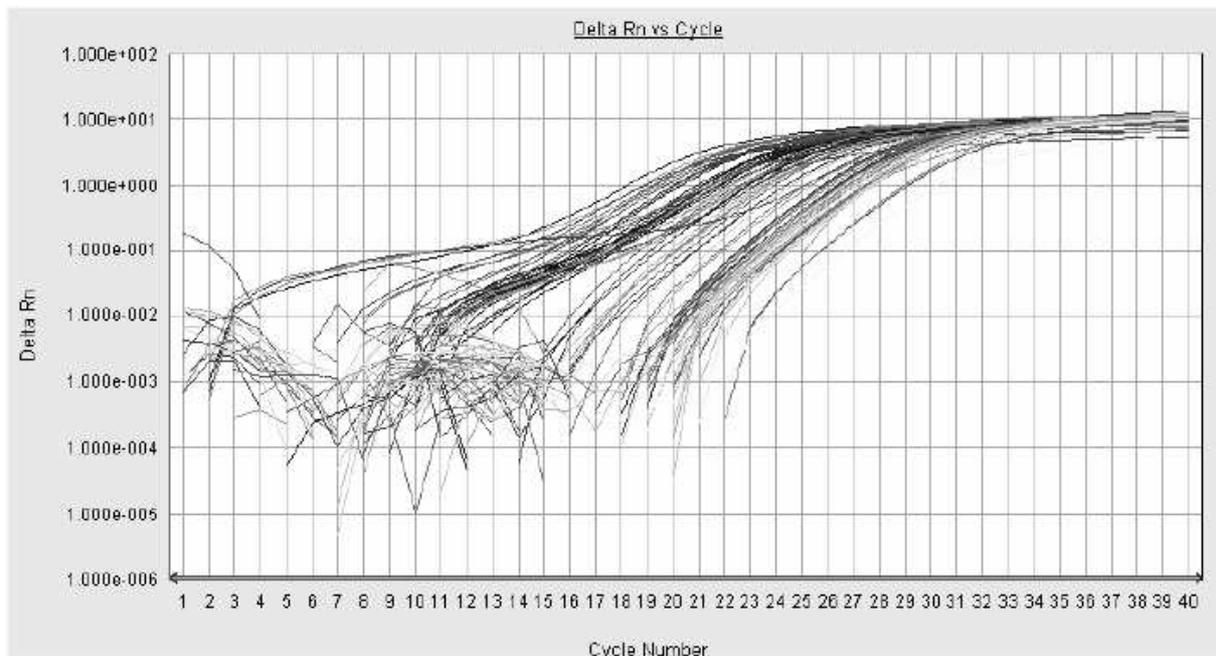


Abb. 4-1: Amplifikationskurve. Grafische Darstellung der Entwicklung der PCR-Produkte in Bezug zur Zykluszahl. Die exponentielle Phase liegt zwischen dem 14. und dem 31. Zyklus.

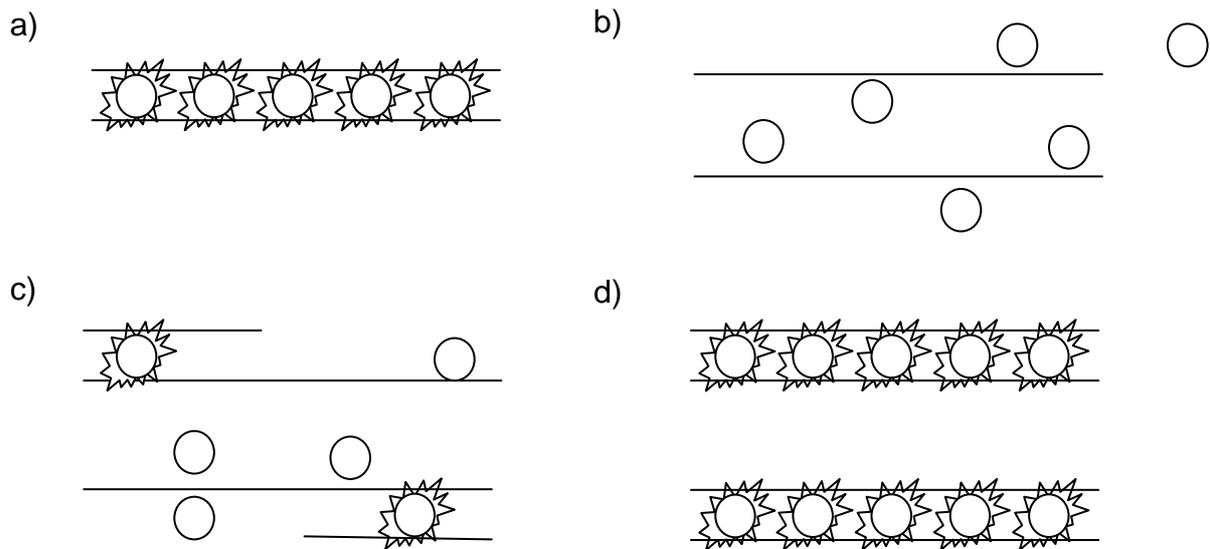


Abb. 4-2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von SYBR Green I. a) Die fluoreszierende Farbe in der dsDNA von SYBR Green I ist sichtbar. b) Durch Temperaturerhöhung denaturiert SYBR Green I und gibt fluoreszierende Partikel frei. c) Polymerisation – neue PCR-Produkte werden erzeugt. d) Signalstärke steigt proportional mit PCR-Produkten.

Der Reaktionsablauf von SYBR Green I (grüner Cyanin-Farbstoff mit darin enthaltener Polymerase) ist in vier Schritte unterteilbar (Abb. 4-2). In der Ausgangssituation ist die fluoreszierende Farbe in der dsDNA von SYBR Green I sichtbar. Im Reaktionsverlauf kommt es zur Temperaturerhöhung und das wenig stabile SYBR Green I denaturiert unter Freigabe der fluoreszierenden Partikel. Während der Polymerisation werden einzelne Fluoreszenzpartikel in die PCR-Produkte eingebaut. So ist gewährleistet, dass die Signalstärke proportional mit der Menge der PCR-Produkte steigt.

Bei dieser Methode werden die Fluoreszenzsignale während der exponentiellen Phase der PCR, bei der optimale Reaktionsbedingungen herrschen, aufgenommen. Die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte wird anhand einer Dissoziationskurve überprüft. Dabei wird das Amplikon nach dem letzten Zyklus durch langsame Erhitzung bis zum Schmelzpunkt denaturiert. Anhand des Schmelzpunktes können die Längen der im Reaktionsgemisch vorhandenen PCR-Produkte und damit die Spezifität der Reaktionen bestimmt werden. In der grafischen Darstellung dieses Vorganges sollte eine eingipflige Kurve zu erkennen sein (Abb. 4-3).

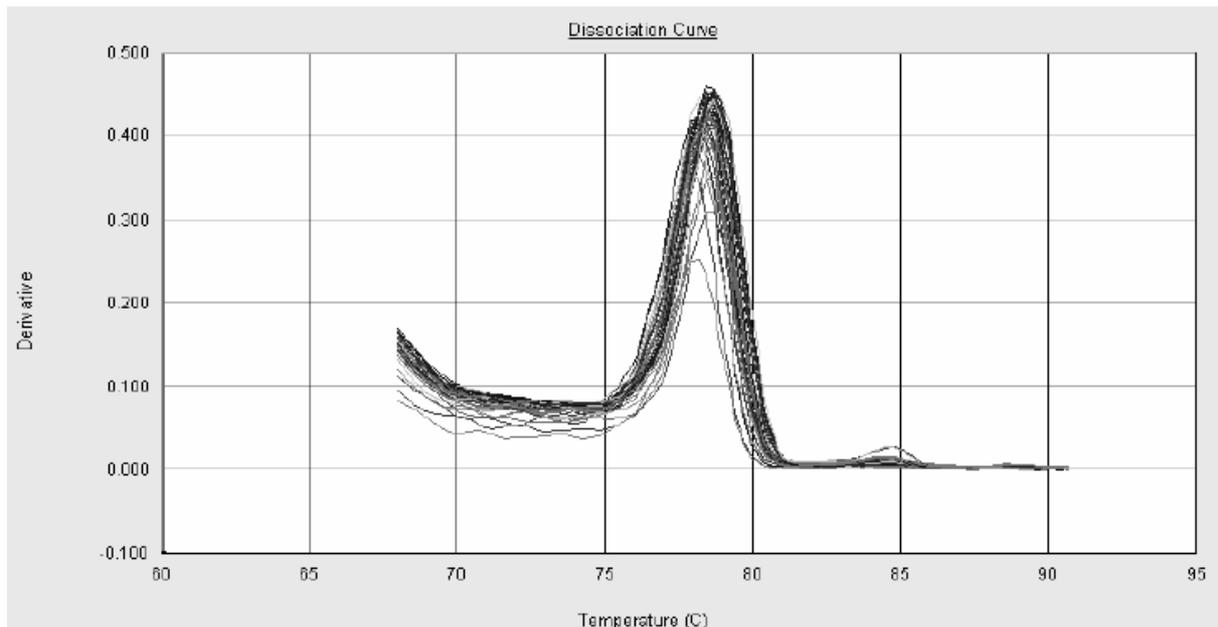


Abb. 4-3: Repräsentative Dissoziationskurve aus der realtime PCR. Hier wurde ein spezifischer Genabschnitt vervielfältigt.

Kommt es bei der realtime PCR zur Vervielfältigung mehrerer PCR-Produkte, wird das bei der Dissoziation ersichtlich. Eine solche Situation führt in der grafischen Darstellung zu einer mehrgipfligen Kurve.

4.1.2.1 RNA Aufreinigung

Das in Stickstoff und dann bei -80°C gelagerte Plaz entagewebe wurde mithilfe des Qiashredders zerkleinert und in Trizol resuspendiert. Nachfolgend wurde gemäß des Protokolls der Firma Invitrogen mit Chloroform, Isopropanol und 75% Ethanol die darin enthaltene mRNA isoliert (Fluhr et al., 2007).

4.1.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte gemäß der Beschreibung unter 4.1.1.2.

4.1.2.3 RT-Reaktion

Die gesamte mRNA wurde mit der Reversen Transkriptase des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor, in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurden 500ng mRNA mit einem Mastermix bestehend aus $2\mu\text{l}$ RT-Puffer (10x), $0,8\mu\text{l}$ dNTPs (25x), $2\mu\text{l}$ Random Primers (10x), $1\mu\text{l}$ RNase Inhibitoren ($20\text{U}/\mu\text{l}$), $1\mu\text{l}$ Multiscribe RT ($50\text{U}/\mu\text{l}$) und $3,2\mu\text{l}$ ddH₂O pro Reaktion auf ein Gesamtvolumen von je

20µl pro PCR-tube resuspendiert. Die RT-Reaktion lief im ThermoCycler über 10min bei 25°C, 120min bei 37°C, 5Sekunden (s) bei 85°C und Kühlung bei 4°C ab.

4.1.2.4 Realtime PCR

Die cDNA wurde in je 10µl mit dem SYBR Green PCR Master Mix vorbereitet. Dieser bestand pro Primerpaar aus Notch1 bis -4 und ihren Liganden, 5µl SYBR Green PCR Master Mix, 0,5µl Primer forward, 0,5µl Primer reverse und 1µl ddH₂O. Ergänzt wurde dies mit 3µl cDNA. Die Polymerasekettenreaktion wurde in Doppelansätzen mit dem ABI Prism 7300 Sequence Detector nach folgendem Protokoll durchgeführt: 2min bei 50°C, 10min bei 95°C, 15s bei 95°C und 1min bei 60°C für insgesamt 40 Zyklen (Fluhr et al., 2007). Die Produkte der PCR wurden durch thermische Dissoziation verifiziert, um zu überprüfen, ob ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wurde. Die relative Expression der Zielgene wurde in Relation zum Referenzgen Beta-Aktin bestimmt und durch das mathematische Modell $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ analysiert (Livaka und Schmittgen, 2001).

4.1.2.5 Statistische Auswertung

Aus drei frühen und drei späten Graviditäten wurden jeweils vier Stichproben statistisch miteinander verglichen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Statistik-Software GraphPad Prism version 5.01. Zum Einsatz kamen eine One Way ANOVA und der Dunnett-Test. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) dargestellt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant (*) gewertet.

4.2 Proteinnachweis in Zellen und Geweben

4.2.1 Immunhistochemie

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis von bestimmten Antigenen in Zellen oder Geweben mittels spezifischer Antikörper, die mit Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise kann bestimmt werden, ob ein gesuchtes Protein im Gewebe vorhanden ist und in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist.

Dabei wird zwischen direkten und indirekten Färbungen unterschieden. Bei den direkten ist der primäre Antikörper (PAK) mit einem Marker gekoppelt, der zur Farbreaktion führt. Bei der indirekten Färbung wird ein weiterer sogenannter Sekundärantikörper (SAK), benötigt. Der PAK ist hier nicht mit einem Marker

versehen. Der SAK trägt bei dieser Methode den Marker und ist in der Regel gegen das F_C -Fragment des PAKs gerichtet. Als Marker finden Enzyme (Peroxidase, alkalische Phosphatase) oder Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, PE) Verwendung. Der biotinylierte SAK reagiert mit dem Streptavidin, welches mit Peroxidase markiert ist. Dort wird das Substrat zu Farbe umgesetzt (Abb. 4-4).

Durchführung:

Die entnommenen Gewebestücke wurden nach manueller Entfernung des Amnions und der dezidualen Anteile in HOPE entsprechend dem Herstellerprotokoll fixiert. Dabei wurden die Gewebestücke in HOPE-Lösung I 24h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit verworfen und das Gewebe mit Aceton-Lösung, bestehend aus 100ml reinem Aceton und 100µl HOPE-Lösung II, 2h bei 2°C gekühlt. Dieser Vorgang erforderte eine zweimalige Wiederholung. Danach wurden die Präparate in Spezialparaffin überführt und bei 55°C 16h inkubiert. Das Ausbetten der Proben erfolgte auf der Wärmeplatte unter Zugabe von frischem Paraffin. Das Gewebe wurde auf Eis abgekühlt und falls erforderlich bis zum Schneiden bei 4°C gelagert. Die Entparaffinisierung der Präparate erfolgte mit Isopropanol bei 60°C für 10min. Nach einem Waschschrift und Lufttrocknung wurde die Rehydratisierung mit 70%igem Aceton für 10min bei 4°C durchgeführt. Nach zwei Waschschriften mit dH_2O , mit einer Gesamtdauer von 10min, wurden die Schnitte auf einer 45°C warmen Heizplatte angetrocknet.

Die Antikörper wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- nach Herstellerangaben für Immunhistochemie geeignet
- gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet (N-terminal)

4.2.2 Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB)

Als Basis dieser Methode dient die hohe Affinität von Streptavidin für Biotin. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, allerdings binden aufgrund der molekularen Ausrichtung nicht alle gleichmäßig. Die prinzipielle Reihenfolge der Reagenzien ist:

- unkonjugierter PAK
- biotinmarkierter (biotinylierter) SAK
- enzymmarkiertes Streptavidin

Das am Streptavidin befindliche Enzym setzt das Substrat zu Farbe um.

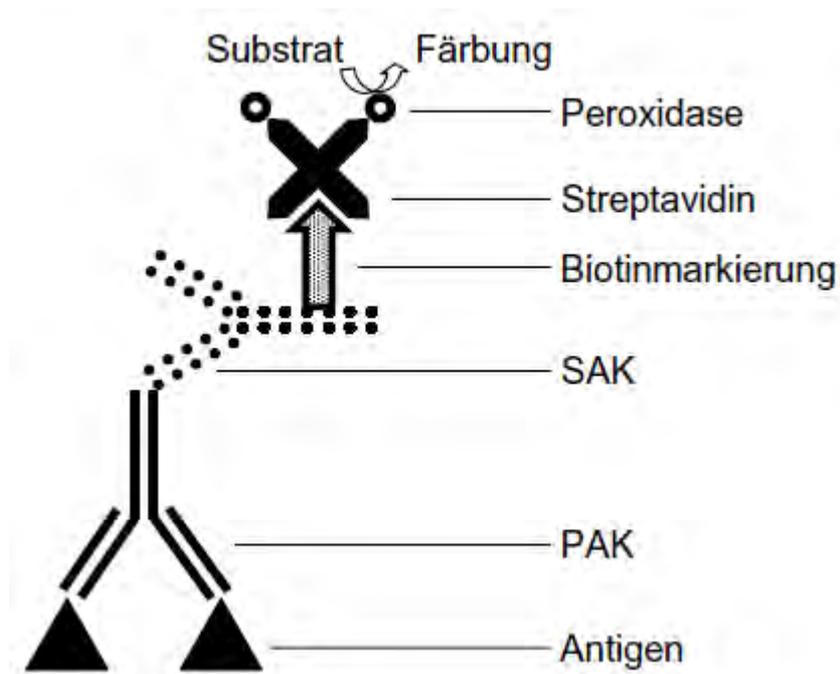


Abb. 4-4: Schematische Darstellung des biotinylierten SAK. Der biotinylierten SAK reagiert mit dem Streptavidin, welches mit Peroxidase markiert ist. Dort wird das Substrat zu Farbe umgesetzt.

Die biotinylierten SAK reagieren mit dem Streptavidin, welches mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert ist (Abb. 4-4). Nach der Zugabe des Substrates 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) entsteht ein bräunliches, unlösliches Produkt, wodurch die visuelle Detektion gewährleistet wird.

Durchführung:

Zur Vermeidung von unspezifischer Färbung durch endogene Peroxidase und zelleigenes Biotin erfolgte eine 10min dauernde Behandlung der Präparate mit 0,03%igem H_2O_2 und Biotin Blocking Kit. Die PAK wurden in Antikörper-Diluent und Triton X 100 (0,1%, zur Zellmembranpermeabilisation) verdünnt, wie in Tab. 4-1 angegeben ist, und auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur (RT) wurden nicht gebundene Antikörper durch zwei PBS-Waschschritte (9,55g/l in dH_2O) (1x) mit je 5min Dauer entfernt. Anschließend wurde noch ein TBS-Waschschritt (5mM Tris, 15mM NaCl) (1x) durchgeführt.

Die ebenfalls in Antibody-Diluent verdünnten SAK, auch in Tab. 4-1 vermerkt, wurden auf die Schnitte aufgetragen und 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3 mal 5min mit PBS gewaschen und mit Streptavidin-HRP 7min bei RT behandelt. Nach der Zugabe von DAB entwickelte sich eine braune

Färbung. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Nach dem Bläuen mit fließendem Leitungswasser für 5 bis 10min, wurden die Gewebeschnitte mit Glycergel abgedeckt und mikroskopisch ausgewertet.

Tab. 4-1: Verdünnungen von PAK und SAK in der Immunhistochemie

PAK	Verdünnungen	SAK	Verdünnungen
Notch1	1:200	Kan. gegen Zg	1:500
Notch2	1:40	Zg gegen Kan.	1:450 / 1:400
Notch3	1:500 / 1:700	Kan. gegen Zg	1:500
Notch4	1:80 / 1:90 / 1:100	Zg gegen Kan.	1:500
Jagged1	1:200	Kan. gegen Zg	1:500
Jagged2	1:200	Kan. gegen Zg	1:300
Delta1	1:100	Zg gegen Maus	1:500
Delta4	1:400	Kan. gegen Zg	1:500
CD31	1:1500 / 1:700 / 1:500	Zg gegen Maus	1:500
Cytokeratin7	1:1500	Zg gegen Maus	1:500
CD68	1:100	Zg gegen Maus	1:500
Vimentin	1:50	Zg gegen Maus	1:500

Zur Beurteilung der angefertigten histologischen Schnitte werden nachfolgende Merkmale berücksichtigt.

Synzytiotrophoblast (ST)

Der ST ist ein vielkerniges Synzytium, welches die Grenze zum intervillösen Raum bildet. Die Kerne dieser Zellen sind eher länglich und liegen quer zur Oberfläche. Im Vergleich zu Kernen der Zytotrophoblastzellen sind die Kerne des ST kleiner und dunkler.

Zytotrophoblast (ZT)

Die Zellen liegen direkt an denen des ST. Die Kerne des ZT sind heller und größer als die des ST.

Hofbauer-Zellen (HZ)

HZ sind einzelne Makrophagen, also freie oder Immunzellen. Sie können daher überall, auch im Stroma der Zotte, liegen. Bevorzugt sind sie allerdings in der Nähe von Gefäßen zu finden. Ihre Kerne sind meist rundlich bis oval. Die HZ sind in der Lage sich innerhalb des Gewebes amöboid zu bewegen.

Stromazellen (SZ)

Bei diesen Zellen handelt es sich um Fibroblasten, beziehungsweise Fibrozyten, welche eher länglich sind und typischerweise und im Gegensatz zu HZ Fortsätze haben. Bei den SZ handelt es sich um ortsständige Zellen.

Endothelzellen (EZ)

Diese Zellen kleiden Gefäße zum Lumen hin aus. Sie sind länglich und besitzen einen abgeflachten Kern.

4.2.3 Durchflusszytometrie

4.2.3.1 Isolierung von placentaren Zellen

Für den Proteinnachweis der Notch-Rezeptoren und -Liganden mittels Durchflusszytometrie wurde Material aus frühen wie auch reifen Plazenten gewonnen und mechanisch und enzymatisch zerkleinert.

Plazenten aus dem letzten Drittel der Schwangerschaft wurden mechanisch und enzymatisch verdaut nach dem geringfügig veränderten Protokoll der HPMVEC-Isolation (Herr et al., 2007). Es wurden jeweils 2 bis 3 Kolyedonen herauspräpariert und mit Skalpell zerkleinert. Das Gewebe wurde in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) gewaschen und zur Entfernung von Erythrozyten durch ein Sieb (200µm) gegeben. Das Gewebe wurde mit 1,4ml Kollagenase pro 1g Gewebe 80min bei 37°C inkubiert. Nach den ersten 60min wurde Trypsin 2,5% (10x) zugegeben. Nach Neutralisation mit MEM Medium (10% FKS) wurde das Gewebe mit HBSS gewaschen und anschließend bei 300rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die Zellsuspension enthielt, wurde abgenommen. Der Überstand wurde dann bei

1500rpm zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erzeugen. Das verbliebene Gewebe wurde erneut mit HBSS gewaschen und bei 300rpm zentrifugiert (insgesamt 3x waschen und zentrifugieren). Das so gewonnene Zellpellet wurde resuspendiert und kultiviert jedoch nicht, wie unter Herr et al. beschrieben, weiter mit einem magnetisch markierten Antikörper aufgereinigt. Die isolierten Zellen wurden in einer Mischung aus drei Medien, EBM2 Medium, AmnioMaxTM-100 und DMEM Medium, aufgenommen und in einer Kulturflasche 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden nicht angewachsene Zellen durch Waschen entfernt.

Bei frühen Plazenten wurde das steril entnommene Trophoblastgewebe zwei- bis dreimal 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 10µg/ml DNAse (2000U/mg) versetzt. Ein Verdauvorgang des Trophoblastgewebes dauerte 20min und wurde zweimal bei 37°C im Wasserbad wiederholt. Nach jedem Verdau Schritt wurde der Überstand gesammelt, durch ein 80µm Nylon-Sieb filtriert und mit FKS neutralisiert.

Zentrifugation und Kultivierung der Zellen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

4.2.3.2 FACS

Häufig findet die Abkürzung FACS (fluorescence activated cell sorting) als Synonym für Durchflusszytometrie Verwendung, so auch in dieser Arbeit. Allerdings handelt es sich hierbei um eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson (BD) und ist irreführend, da die Zellen nicht sortiert werden, sondern eine Messung ihrer Eigenschaften erfolgt.

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Fotomultiplier) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit den Eigenschaften der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel (1-10°) und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im größeren Winkel (ca.

90°), die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird.

Zugleich mit dem gestreuten Licht kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen. Es werden Farbstoffe verwendet, die an bestimmte Bestandteile der Zellen binden. Setzt man z. B. die Farbstoffe DAPI und Propidiumiodid ein, welche in die DNA einer Zelle interkalieren, kann man anhand der Helligkeit der Zelle untersuchen, wie viel DNA sie enthält. Auch Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können verwendet werden. Solche Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet. Nach der Markierung kann dann auch die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch den Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Bei Verwendung mehrerer Laser kann eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden.

Durchführung

Intrazelluläre FACS-Färbung

Die adhärenenten Zellen wurden nach der Trypsinierung gezählt. Die Zellkonzentration wurde für die Färbung auf 1 bis 2×10^5 /ml eingestellt. Sie wurden mit 2% PFA (Paraformaldehyd) 10min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für mindestens 30min auf eiskaltem Methanol, was zur Permeabilisierung der Zellmembran führt. Die Antikörper wurden in PBS (2% FKS) entsprechend verdünnt. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit PBS fand eine Inkubation mit den Antikörpern eine Stunde bei RT statt. Nach erneuten Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit den entsprechend verdünnten SAK 30 min bei RT inkubiert. Für die FACS-Analyse lagen die Zellen in 200µl PBS-Suspension vor. Die verwendeten Verdünnungen der PAK und der SAK sind in Tab.4-2 zusammengestellt.

Tab. 4-2: Verdünnungen von PAK und SAK im FACS

PAK / Isotypkontrollen	Verdünnung	SAK mit Markierung	Verdünnung
Notch1 / Normal Zg IgG	1:50	Rind gegen Zg FITC	1:500
Notch2 / Normal Kan. IgG	1:40	Zg gegen Kan. PE	1:500
Notch3 / Normal Kan. IgG	1:50	Zg gegen Kan. PE	1:500
Notch4 / Normal Kan. IgG	1:50	Zg gegen Kan. PE	1:200
Jagged1 / Normal Zg IgG	1:100	Rind gegen Zg FITC	1:500
Jagged2 / Normal Zg IgG	1:50	Rind gegen Zg FITC	1:200
Delta1 / Maus IgG1	1:100	Zg gegen Maus AF.	1:500
Delta4 / Normal Zg IgG	1:50	Rind gegen Zg FITC	1:200

5 Ergebnisse

5.1 Konventioneller Nachweis von mRNA aus der gesamten humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)

5.1.1 Konventioneller mRNA-Nachweis der Notch-Rezeptoren

Alle verwendeten Primerpaare entsprachen den unter 4.1.1.3 PCR genannten Anforderungen. Die mRNA des Notch1 Rezeptors konnte in beiden untersuchten Trimestern nicht nachgewiesen werden. Dagegen ist der Nachweis der Expression der mRNA des Notch2 Rezeptors in frühen wie auch in reifen Plazenten gelungen. Spezifische Amplifikate von 474 bp konnten in der Gelelektrophorese dargestellt werden. Gleiches gilt für die mRNA des Notch4 Rezeptors. Diese war in Plazenten vom 1. und 3. Trimester gelelektrophoretisch als Bande von 394 bp nachweisbar. Für die mRNA des Notch3 Rezeptors konnte in beiden Entwicklungsstadien der Plazenten keine bis geringe Expression in der Gelelektrophorese als Bande mit 476 bp beobachtet werden (Abb. 5-1).

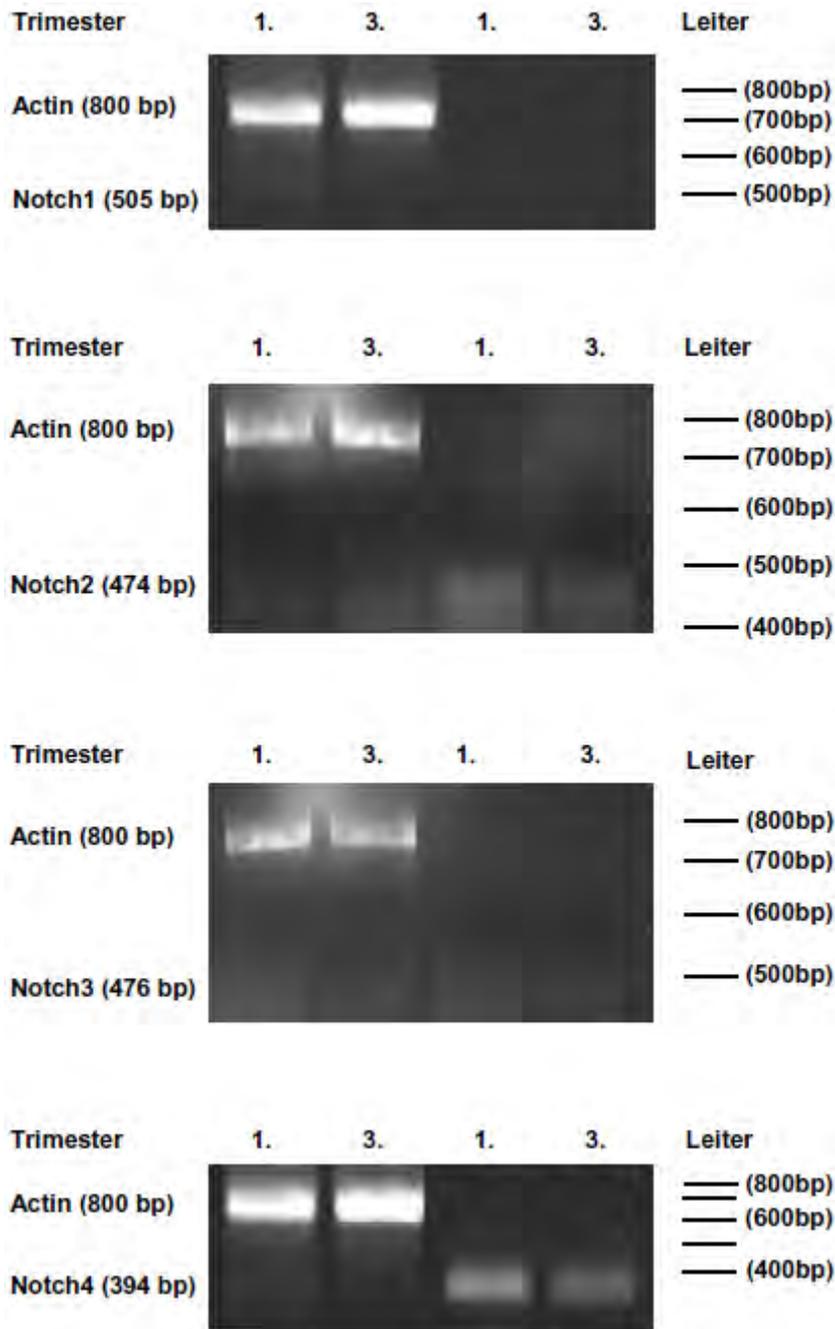


Abb. 5-1: Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte von Notch1, -2, -3, -4 sowie des housekeeping Genes beta-Aktin. Aufgetragen sind jeweils 1. und 3. Trimester. Als Kontrolle für den Nachweis von cDNA findet beta-Aktin Verwendung. Die mRNA des Notch1 Rezeptors ist nicht nachweisbar. Deutliche Banden sind bei der mRNA der Notch2 und Notch4 Rezeptoren erkennbar. Die Banden des Notch3 Rezeptors sind von schwacher Intensität.

5.1.2 Konventioneller mRNA-Nachweis der Notch-Liganden

Auch für die Primerauswahl zum Nachweis der mRNA der Liganden fanden die unter 4.1.1.3 PCR beschriebenen Kriterien Berücksichtigung. Dabei konnten für die mRNA des Jagged1 Liganden spezifische Amplifikate von 227 bp in der Gelelektrophorese aus frühen und reifen Plazenten gezeigt werden. Im Gegensatz dazu steht die mRNA des Jagged2 Liganden. Sie war weder in frühen noch in reifen Plazenten nachweisbar. Gleiches gilt für die mRNA des Delta1 Liganden aus den beiden untersuchten Trimestern. Es konnte hier keine Expression festgestellt werden. Für die mRNA des Delta4 Liganden konnte aus Plazenten des 1. und 3. Trimesters eine geringe Expression in der Gelelektrophorese als Bande mit 620 bp beobachtet werden (Abb. 5-2).

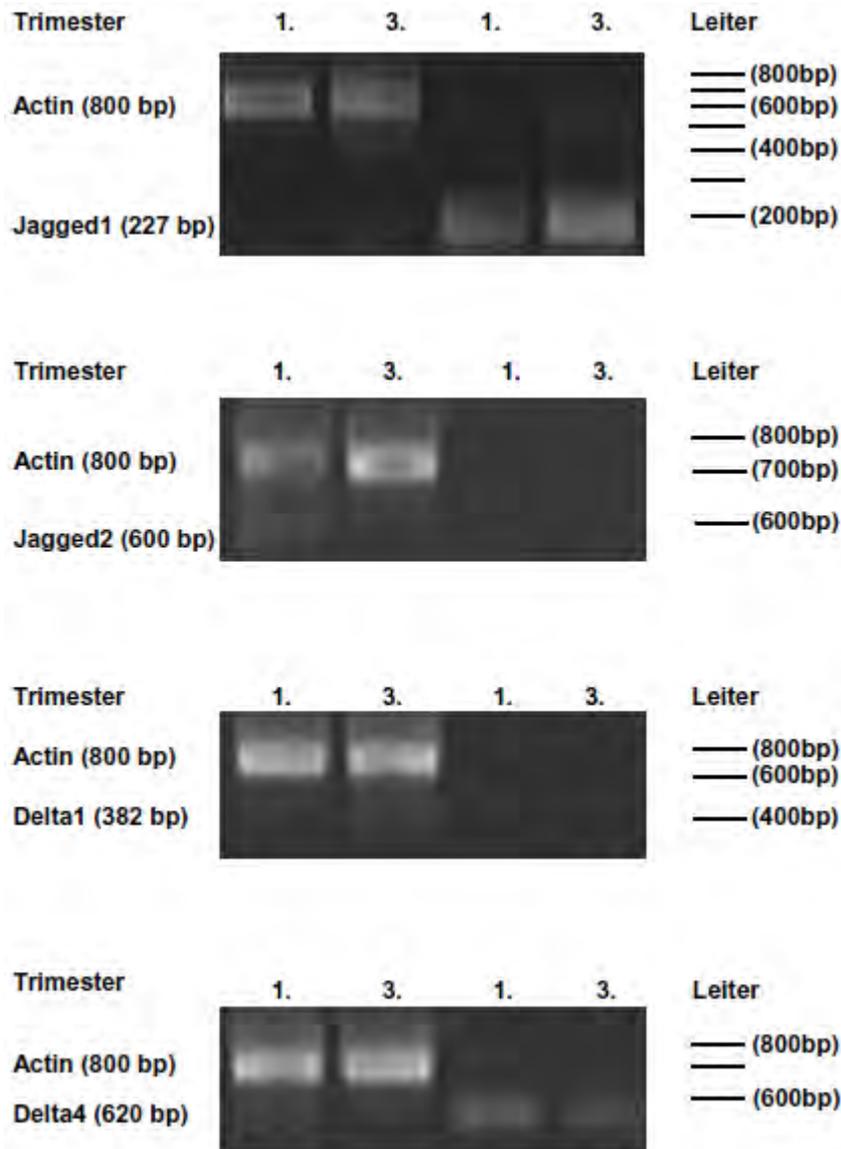


Abb. 5-2: Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte von Jagged1, -2, Delta1, -4 sowie des housekeeping Genes beta-Aktin. Aufgetragen sind jeweils 1. und 3. Trimester. Beta-Aktin findet als Kontrolle Verwendung. Deutliche Banden werden durch die mRNA der Jagged1 und Delta4 Liganden sichtbar. Die mRNA der Jagged2 und Delta1 Liganden ist nicht nachweisbar.

5.2 Semiquantitativer Nachweis von mRNA aus der gesamten humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)

5.2.1 Semiquantitativer mRNA-Nachweis der Notch-Rezeptoren

Die zugrunde gelegten Auswahlkriterien für die verwendeten Primerpaare sind unter 4.1.1.3 PCR aufgeführt. Diesen Maßstäben hielt kein Primerpaar für die mRNA des Notch1 Rezeptors stand. Mit dem Primerpaar für den Notch2 Rezeptor konnte lediglich eine zweigipflige Dissoziationskurve beobachtet werden (Abb. 5-3). Mithilfe der Primer für den Notch3 Rezeptor konnte in den späten Plazenten eine signifikant höhere mRNA-Expression nachgewiesen werden als in den frühen Plazenten (Abb. 5-4). Die Expression der mRNA des Notch4 Rezeptors ist im 3. Trimester ebenfalls signifikant höher als im 1. Trimester (Abb. 5-5).

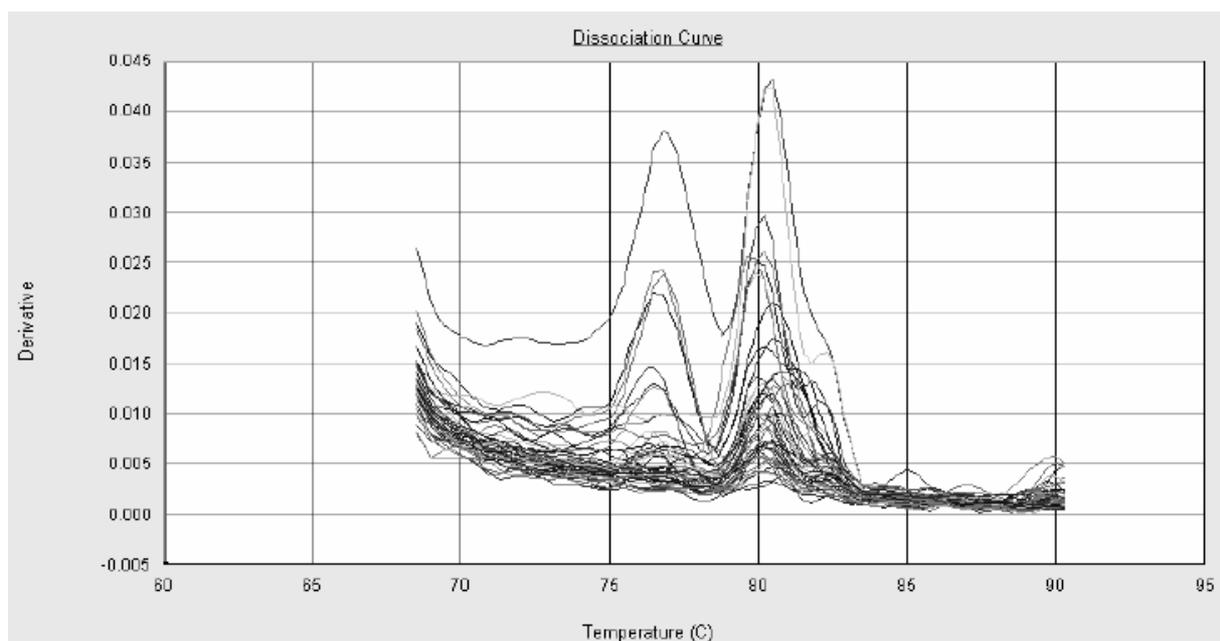


Abb. 5-3: Notch2 Dissoziationskurve aus realtime PCR. Es erfolgt eine Replikation von spezifischen und unspezifischen Genabschnitten oder Primer-Dimeren.

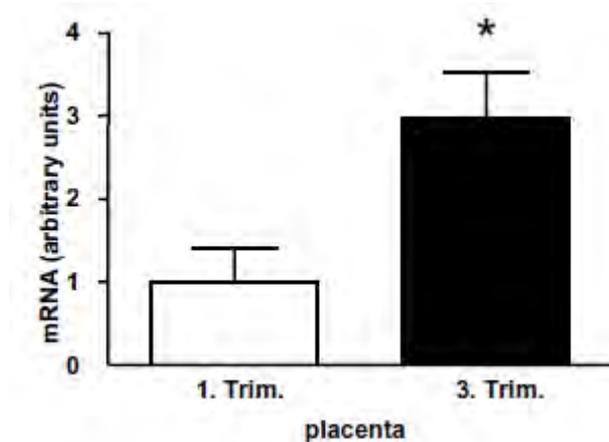


Abb. 5-4: Vergleich der relativen Notch3 mRNA-Expression mittels realtime PCR. Die mRNA Expression von Notch3 war in den späten Plazenten signifikant höher als in den frühen.

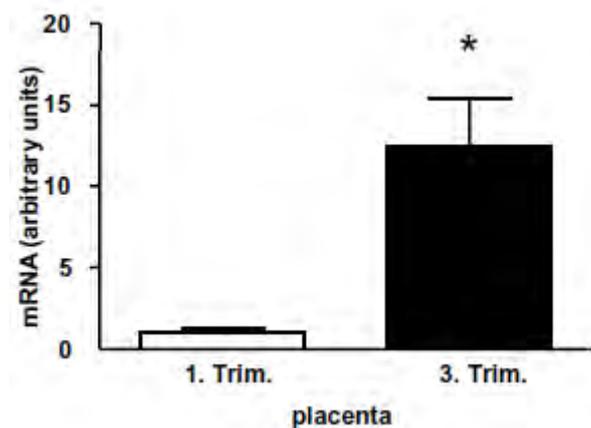


Abb. 5-5: Vergleich der relativen Notch4 mRNA-Expression mittels realtime PCR. Die Expression der mRNA von Notch4 war in den 3. Trimestern signifikant höher als in den 1. Trimestern.

5.2.2 Semiquantitativer mRNA-Nachweis der Notch-Liganden

Auch bei der Auswahl der Primerpaare der Liganden fanden die unter 4.1.1.3 PCR genannten Kriterien Berücksichtigung. Bei der Untersuchung der mRNA von Jagged1 konnte in späten Plazenten eine signifikant höhere Expression gefunden werden als in früheren Plazenten (Abb. 5-6). Jagged2 war auf mRNA Ebene mit der realtime PCR sowohl in frühen als auch in späten Plazenten nachweisbar. Im 1. Trimester war die Expression signifikant niedriger als im 3. Trimester (Abb. 5-7). Es zeigt sich auch eine deutliche mRNA-Expression für Delta1. Allerdings bestand hier kein signifikanter Unterschied zwischen frühen und späten Plazenten (Abb. 5-8).

Delta4 zeigte in späten Plazenten eine signifikant höhere mRNA-Expression als in den frühen (Abb. 5-9).

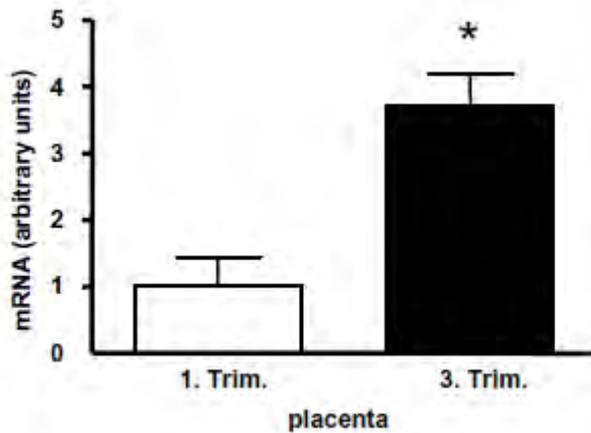


Abb. 5-6: Vergleich der relativen Jagged1 mRNA-Expression mittels realtime PCR. Die mRNA-Expression des Liganden von Jagged1 war in den späten Plazenten signifikant höher als in den frühen.

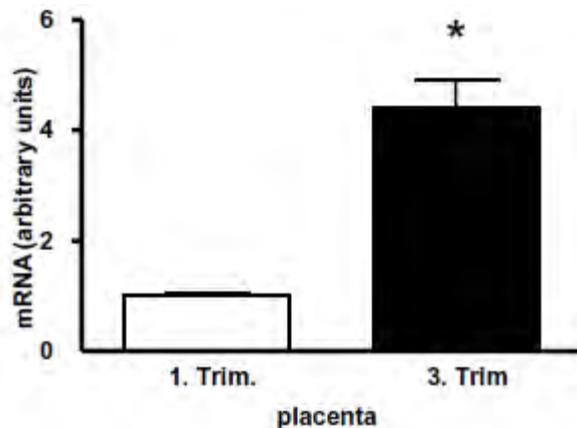


Abb. 5-7: Vergleich der relativen Jagged2 mRNA-Expression mittels realtime PCR. Die Expression der mRNA des Liganden von Jagged2 war in den Proben aus dem 3. Trimestern signifikant höher als in denen des 1. Trimesters.

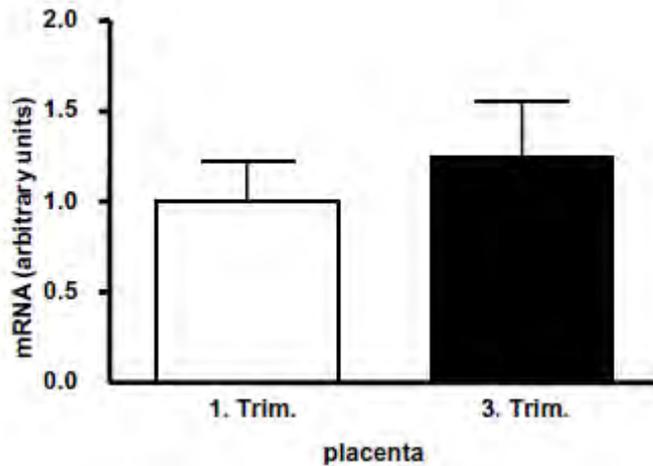


Abb. 5-8: Vergleich der relativen Delta1 mRNA-Expression mittels realtime PCR. In frühen und in späten Plazenten konnte die Expression der mRNA des Delta1 Liganden nachgewiesen werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien.

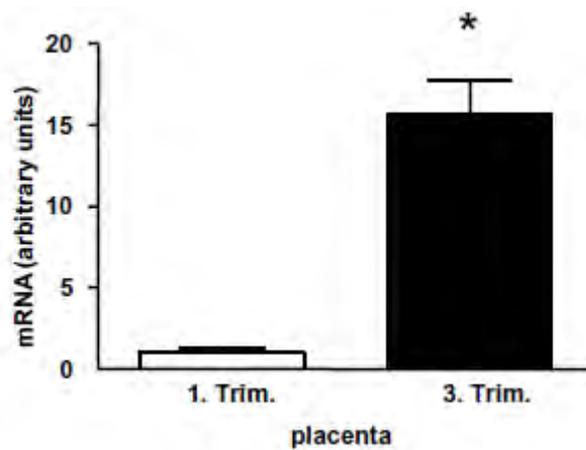


Abb. 5-9: Vergleich der relativen Delta4 mRNA-Expression mittels realtime PCR. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression der Delta4 mRNA. Im 1. Trimester wurde diese signifikant niedriger exprimiert als im 3. Trimester.

5.3 Qualitativer Nachweis von Proteinen aus dem Tertiärzottenbereich der humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)

5.3.1 Qualitativer Proteinnachweis der Notch-Rezeptoren

Für die Auswahl der verwendeten Antikörper wurden die unter 4.2.1 Immunhistochemie aufgeführten Kriterien zugrunde gelegt. Mit den so ausgewählten Antikörpern konnte für den Notch1 Rezeptor in Plazenten aus den 1. und den 3. Trimestern eine deutliche Immunreaktivität, vorwiegend in EZ, nachgewiesen werden (Abb. 5-10 und Abb. 5-11). In frühen und späten Plazenten ließen sich für die Rezeptoren von Notch2, Notch3 und Notch4 deutliche Proteinexpressionen zeigen. Die Lokalisation dieser Färbungen ist hauptsächlich in den HZ zu finden (Abb. 5-12 bis Abb. 5-17).

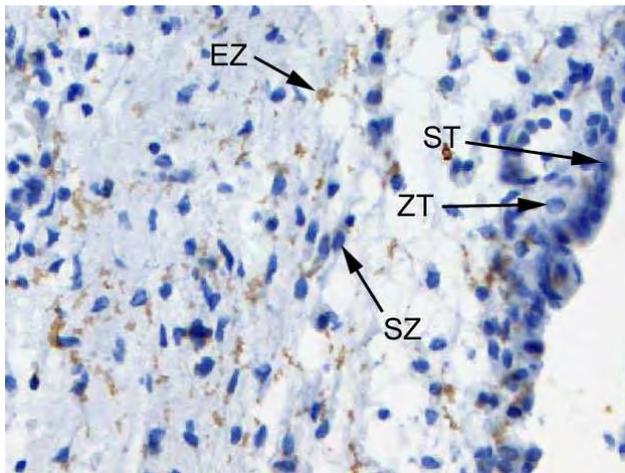


Abb. 5-10: Notch1, 1. Trim., 400x

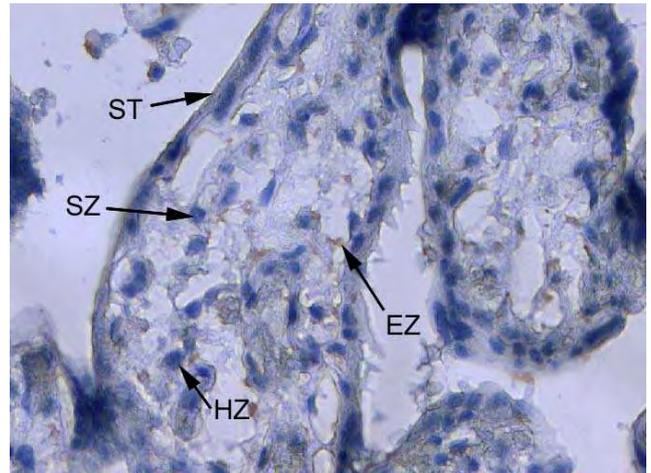


Abb. 5-11: Notch1, 3. Trim., 400x

In beiden Abbildungen sind Tertiärzotten zu sehen. Die von Notch1 vermittelte Färbung ist vorwiegend in den EZ erkennbar.

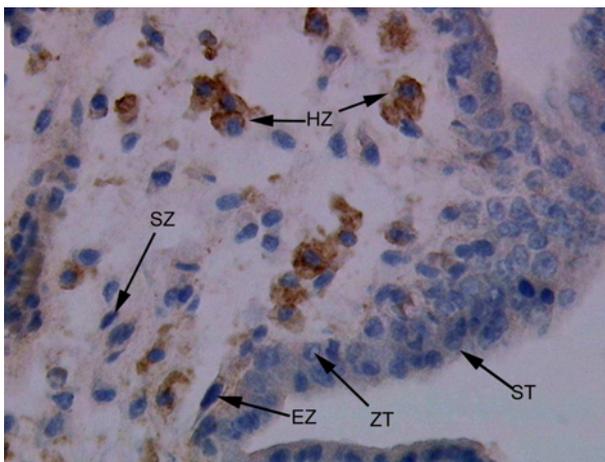


Abb. 5-12: Notch2, 1. Trim., 400x

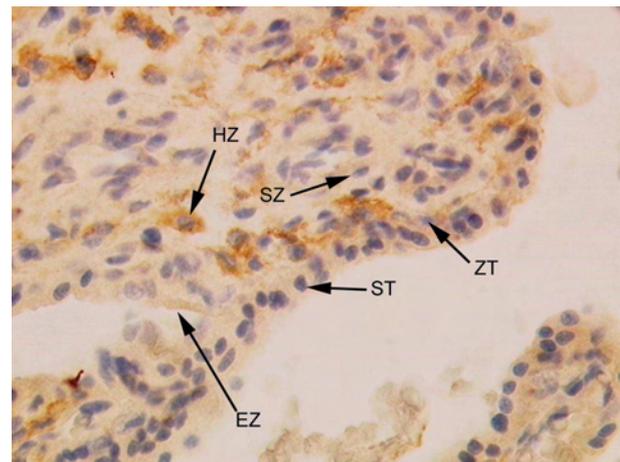


Abb. 5-13: Notch2, 3. Trim., 400x

Beide Aufnahmen zeigen Tertiärzotten. Eine deutliche Färbung durch Notch2 ist hauptsächlich in den HZ zu sehen.

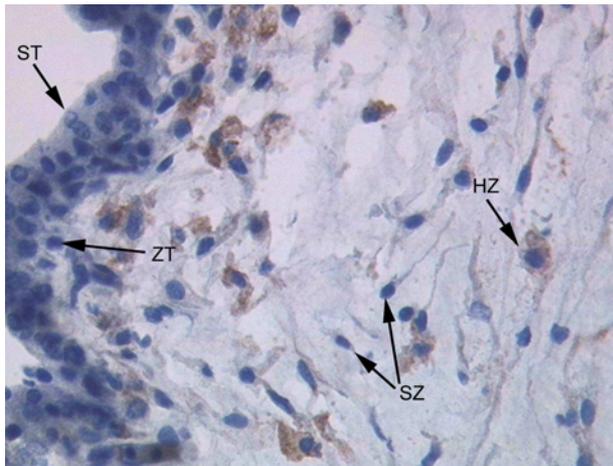


Abb. 5-14: Notch3, 1. Trim., 400x



Abb. 5-15: Notch3, 3. Trim., 400x

In den hier dargestellten Tertiärzotten sind vorwiegend HZ mit dem Notch3 Antikörper gefärbt.

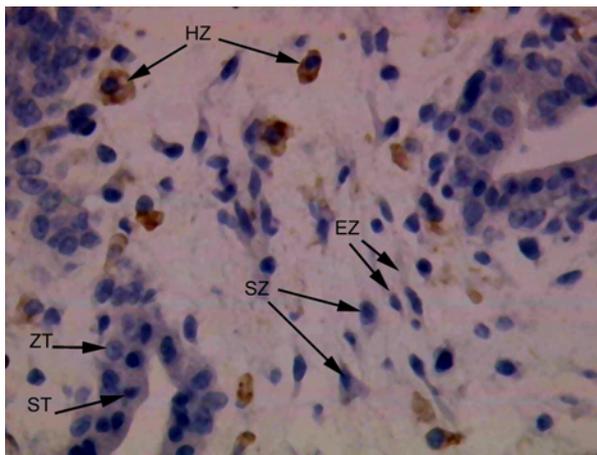


Abb. 5-16: Notch4, 1. Trim., 400x

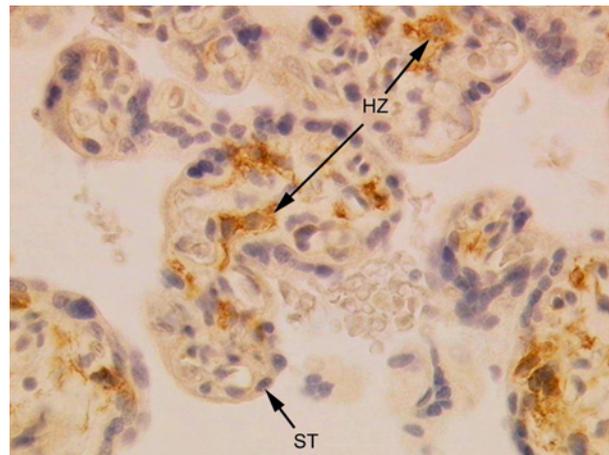


Abb. 5-17: Notch4, 3. Trim., 400x

Notch4 führt zu Färbungen hauptsächlich in den HZ. In beiden Abbildungen werden Tertiärzotten gezeigt.

5.3.2 Qualitativer Proteinnachweis der Notch-Liganden

Die verwendeten Antikörper entsprachen den unter 4.2.1 Immunhistochemie aufgeführten Kriterien. Für den Jagged1 Liganden konnte sowohl in frühen, wie auch in reifen Plazenten eine deutlich sichtbare Proteinexpression gezeigt werden. Hier ist die Färbung hauptsächlich in endothelialen und subendothelialen Bereichen der Plazentazotten erkennbar (Abb. 5-18 und Abb. 5-19). Deutliche Immunoreaktivität ist auch bei Jagged2 in frühen und reifen Plazenten zu beobachten. Allerdings ist hier die Färbung eher im Bereich der SZ zu erkennen (Abb. 5-20 und Abb. 5-21). Delta1 führt ebenfalls in frühen und in reifen Plazenten zu einer deutlichen Immunoreaktivität. Die Lokalisation der Färbung ist hier hauptsächlich in den EZ zu finden (Abb. 5-22 und Abb. 5-23). Ebenso deutlich konnte für Delta4 sowohl in frühen, wie auch in reifen Plazenten eine Proteinexpression gezeigt werden. Die Färbungen sind vorwiegend in EZ lokalisiert (Abb. 5-24 und Abb. 5-25).

Die dazugehörigen negativen Kontrollen (K. ⊖) sind im Anschluss abgebildet (Abb. 5-26 und Abb. 5-27). Es wurde hierbei auf den PAK verzichtet. Die topografischen Kontrollen (K. ⊕) sind daran anschließend aufgeführt (Abb. 5-28 bis Abb. 5-35). Bei CD31 handelt es sich um einen Marker für EZ. Die Markierung des ST erfolgte mit Cytokeratin7. Vimentin reagiert charakteristisch mit SZ und EZ, CD68 markiert die HZ und führt zusätzlich zu Färbung von EZ.

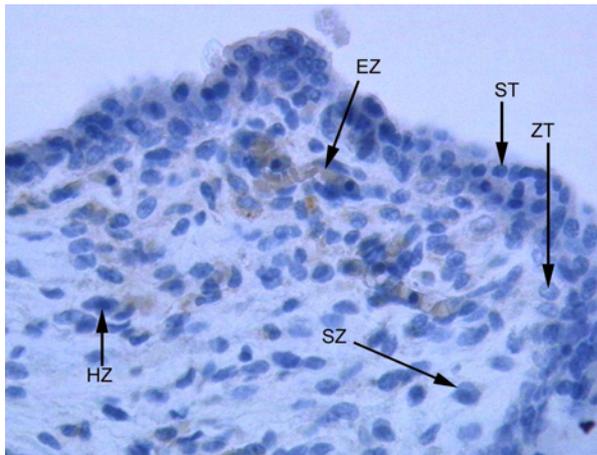


Abb. 5-18: Jagged1, 1. Trim., 400x

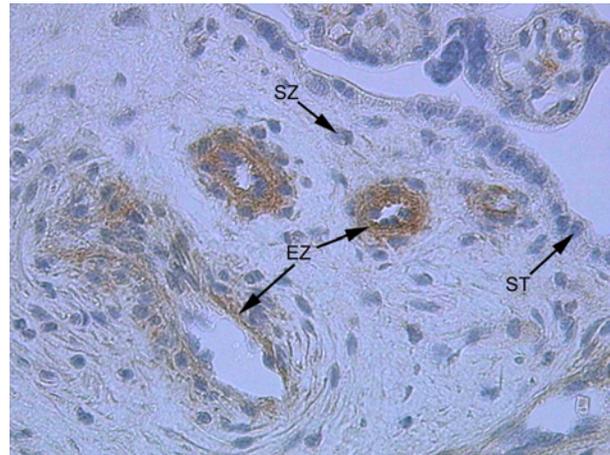


Abb. 5-19: Jagged1, 3. Trim., 400x

In den Tertiärzotten, in beiden Abbildungen sichtbar, zeigt sich die Jagged1 Immunfärbung vorwiegend in EZ.

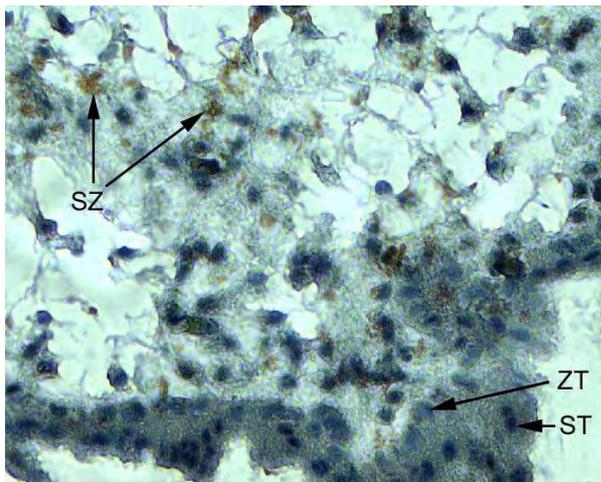


Abb. 5-20: Jagged2, 1. Trim., 400x



Abb. 5-21: Jagged2, 3. Trim., 400x

In beiden Abbildungen sind Tertiärzotten zu sehen. Die von Jagged2 vermittelte Färbung ist hauptsächlich in SZ zu finden.

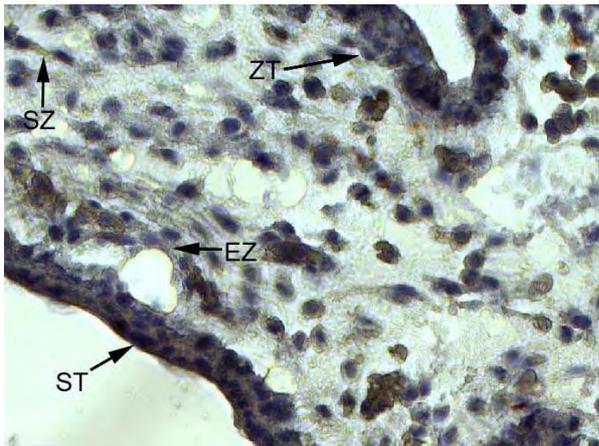


Abb. 5-22: Delta1, 1. Trim., 400x

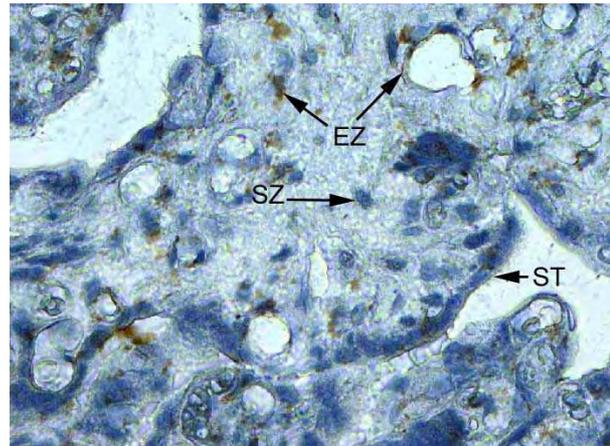


Abb. 5-23: Delta1, 3. Trim., 400x

Dargestellt sind in beiden Abbildungen Tertiärzotten. Der Schwerpunkt der Färbung, die von Delta1 vermittelt wird, liegt im Bereich der EZ.

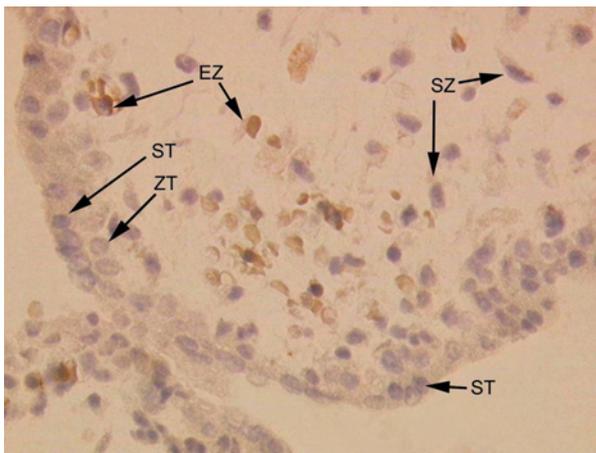


Abb. 5-24: Delta4, 1. Trim., 400x

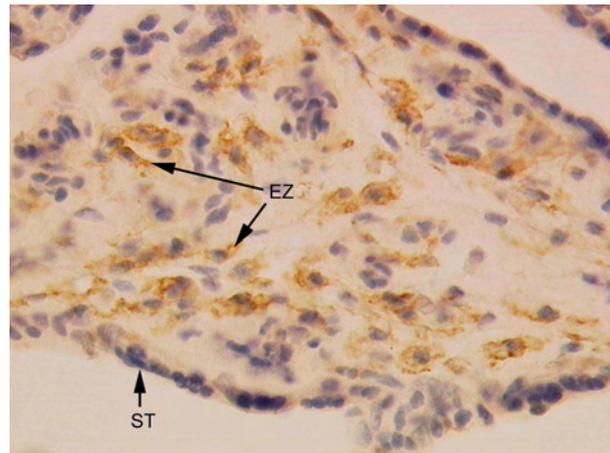


Abb. 5-25: Delta4, 3. Trim., 400x

In beiden Abbildungen sind Tertiärzotten zu sehen. Die Delta4 Immunreaktion ist hauptsächlich in den EZ erkennbar.

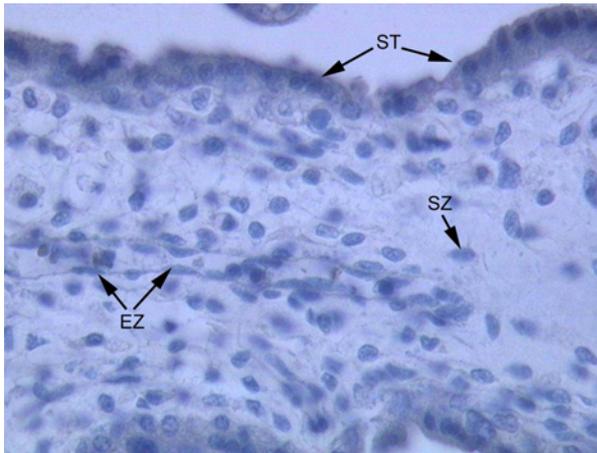


Abb. 5-26: K. ⊖, 1. Trim., 400x

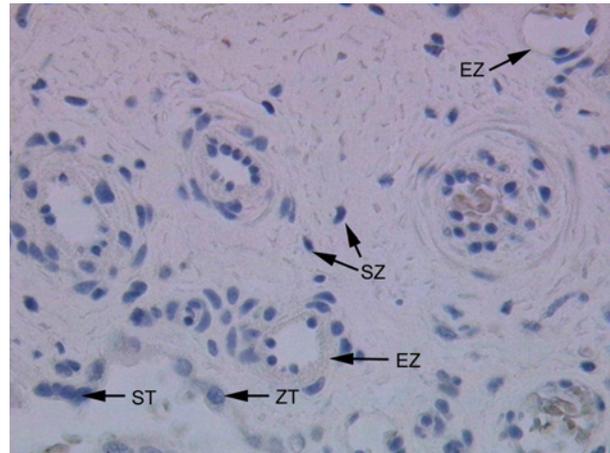


Abb. 5-27: K. ⊖, 3. Trim., 400x

In den negativen Kontrollen sind keine Färbungen erkennbar. Abgebildet sind Tertiärzotten.



Abb. 5-28: K. ⊕, CD31, 1. Trim., 400x

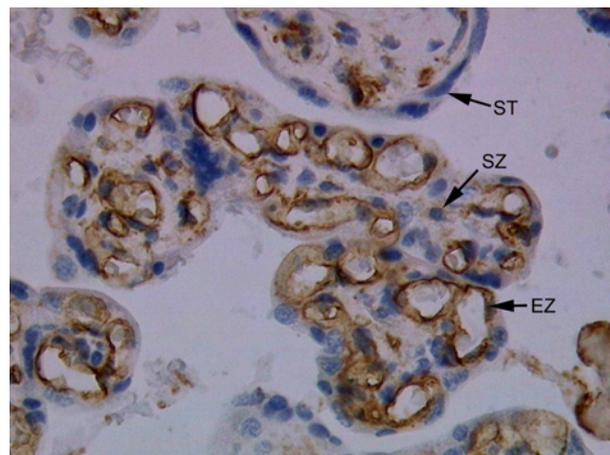


Abb. 5-29: K. ⊕, CD31, 3. Trim., 400x

In beiden Abbildungen sind Tertiärzotten zu sehen. CD31 färbt charakteristischerweise EZ.

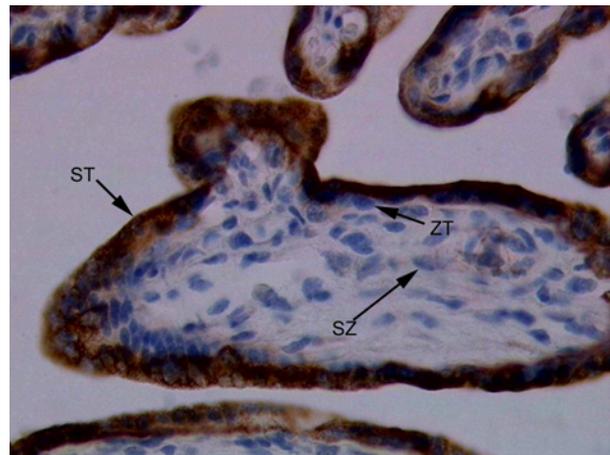
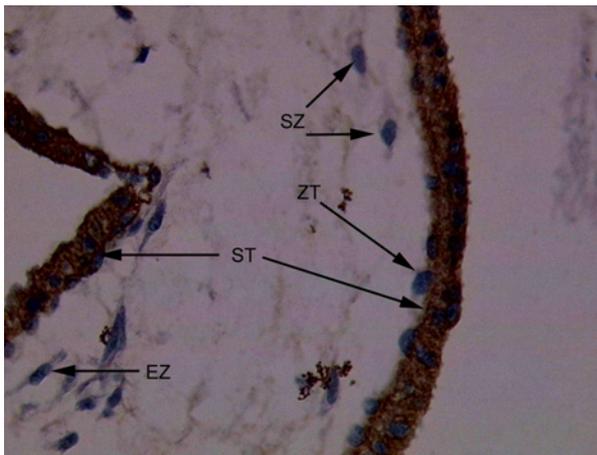


Abb. 5-30: K. \oplus , Cytokeratin7, 1. Trim., 400x Abb. 5-31: K. \oplus , Cytokeratin7, 3. Trim., 400x

In beiden Abbildungen sind Tertiärzotten dargestellt. Wie für Cytokeratin7 typisch, färbt sich der ST.

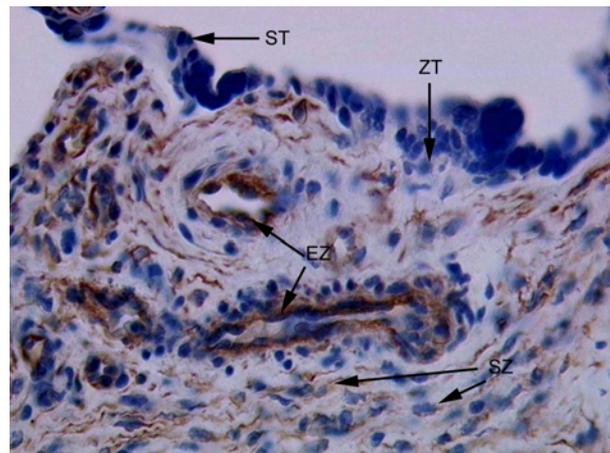
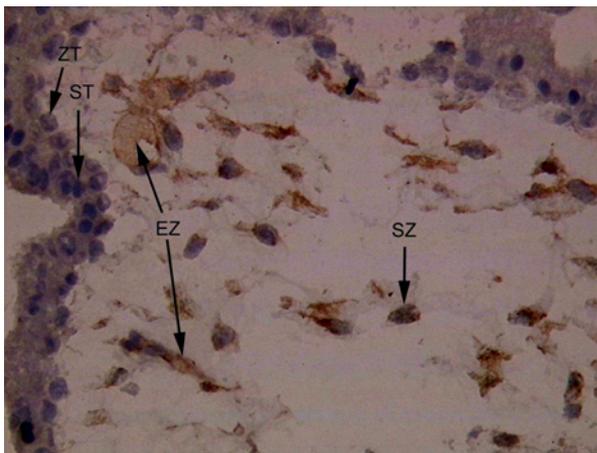
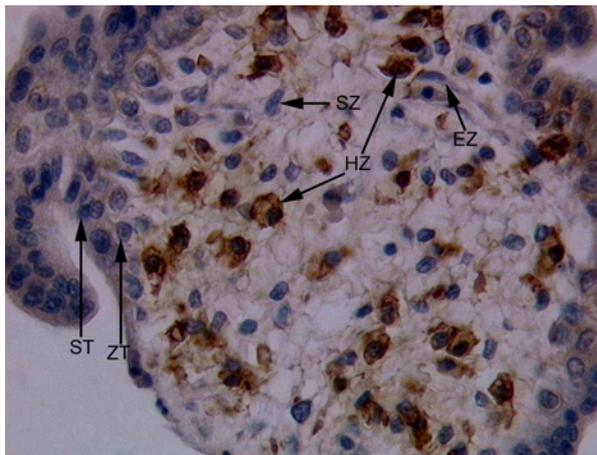
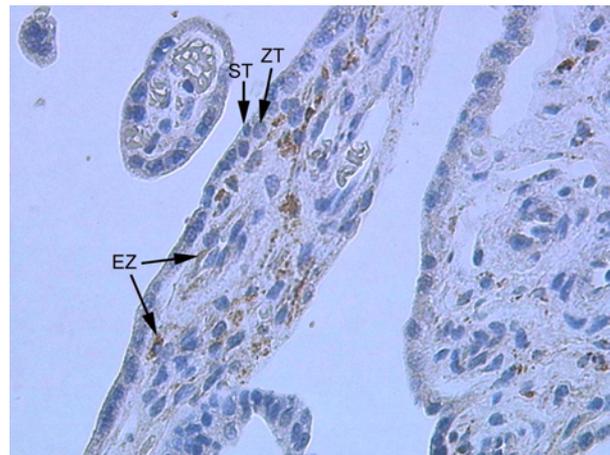


Abb. 5-32: K. \oplus , Vimentin, 1. Trim., 400x Abb. 5-33: K. \oplus , Vimentin, 3. Trim., 400x

Die abgebildeten Tertiärzotten weisen die charakteristischen Färbungen der SZ und EZ für Vimentin auf.

Abb. 5-34: K. \oplus , CD68, 1. Trim., 400xAbb. 5-35: K. \oplus , CD68, 3. Trim., 400x

Abgebildet sind Tertiärzotten. CD68 färbt dort charakteristisch HZ. Zusätzlich werden EZ gefärbt.

5.4 Semiquantitativer Nachweis von Proteinen aus der humanen Plazenta (1. und 3. Trimester)

5.4.1 Semiquantitativer Proteinnachweis der Notch-Rezeptoren

FACS der Notch-Rezeptoren

In dieser Untersuchung kamen die PAKs aus der Immunhistochemie zur Verwendung. Um die Detektion durch das FACS-Gerät zu gewährleisten, wurden diese dann mit fluoreszierenden SAK in Interaktion gebracht. Es wurden mindestens drei Isolationen aus humanen Plazenten des 1. und 3. Trimesters ausgewertet. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Proteinexpression zwischen dem 1. und 3. Trimester gefunden werden. In den unten aufgeführten Abbildungen sind jeweils links die Ergebnisse aus dem 1. Trimester und rechts die Ergebnisse aus dem 3. Trimester zu sehen.

Für Notch1 und Notch3 konnte bei einer Konzentration des PAKs von 1:50 und des SAKs von 1:500 jeweils eine signifikante Proteinexpression des Rezeptors gegenüber der Isotypkontrolle gezeigt werden. Dies war in der frühen wie auch in der späten Plazenta sichtbar (Abb. 5-36 und Abb. 5-38). Ebenfalls eine signifikante Proteinexpression konnte bei Notch2 gegenüber der Isotypkontrolle gefunden werden. Hierfür wurden die Verdünnungen des PAKs von 1:40 und die des SAKs von 1:500 verwendet. In frühen und in späten Plazenten war dies der Fall (Abb. 5-37). Notch4, bei Verwendung einer Konzentration des PAKs von 1:50 und des SAKs von

1:200, führte ebenso zu einer signifikanten Proteinexpression des Rezeptors gegenüber der Isotypkontrolle. Dies war in Plazenten des 1. wie auch des 3. Trimesters der Fall (Abb. 5-39).

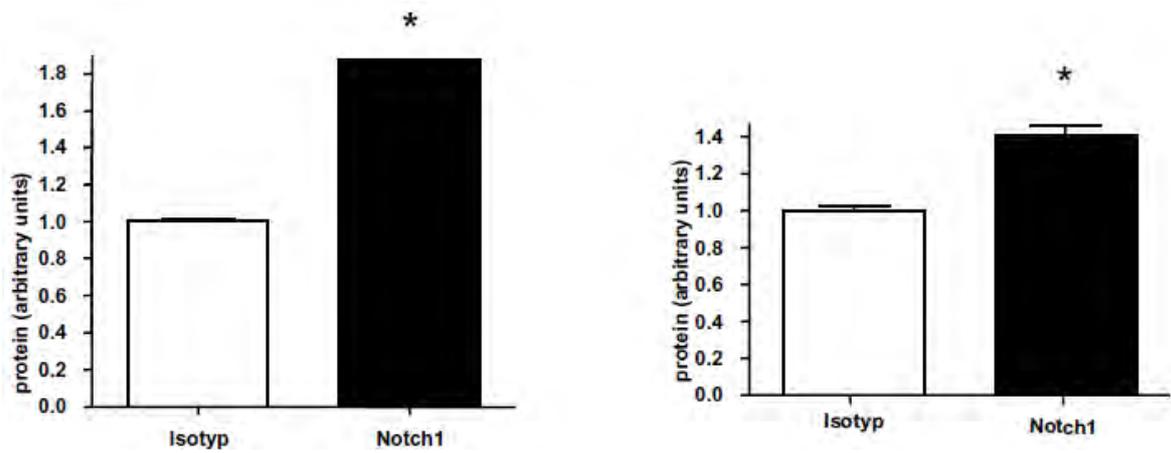


Abb. 5-36: FACS 1. + 3. Trimester, Notch1 und Isotypkontrolle 1:50, FITC 1:500. Für Notch1 konnte eine signifikante Proteinexpression gegenüber der Isotypkontrolle gezeigt werden.

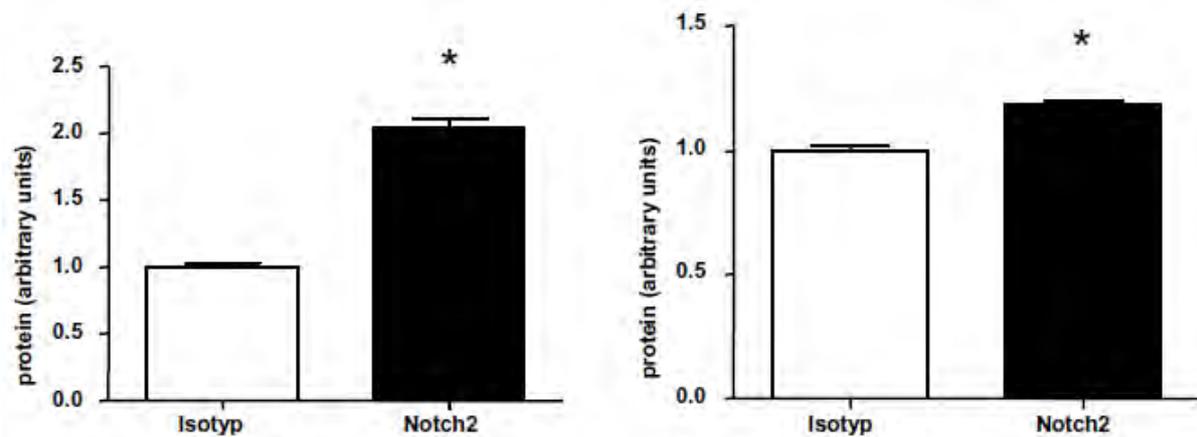


Abb. 5-37: FACS 1. + 3. Trimester, Notch2 und Isotypkontrolle 1:40, PE 1:500. Es konnte für Notch2 eine signifikante Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle gezeigt werden.

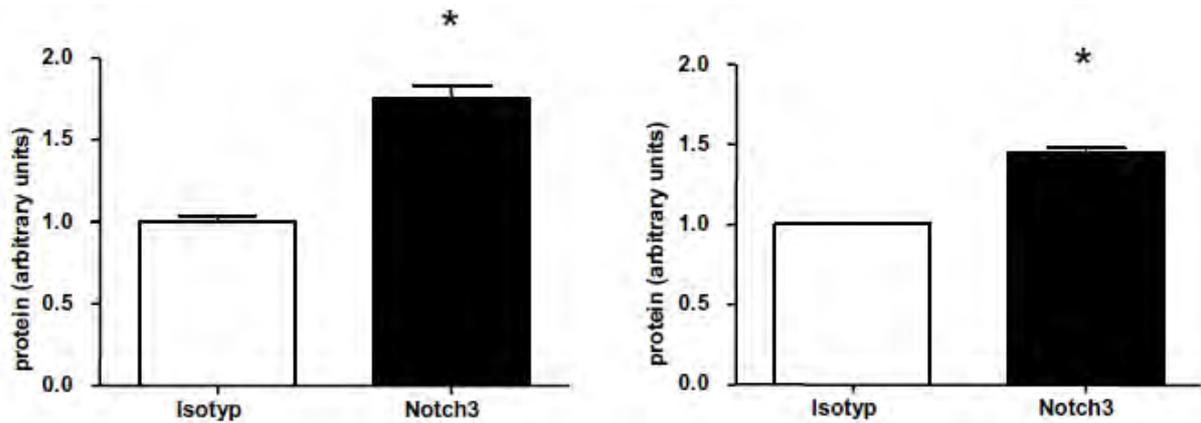


Abb. 5-38: FACS 1. + 3. Trimester, Notch3 und Isotypkontrolle 1:50, PE 1:500. Eine signifikante Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle konnte für Notch3 nachgewiesen werden.

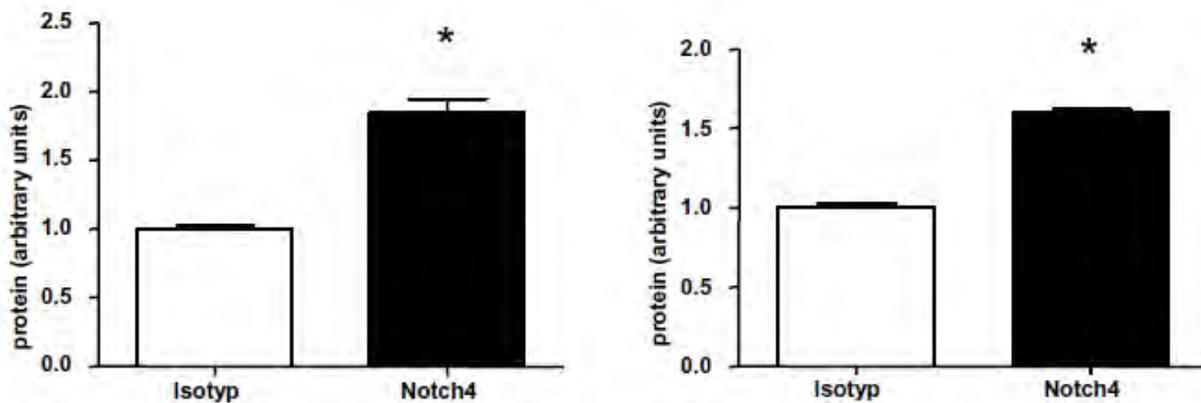


Abb. 5-39: FACS 1. + 3. Trimester, Notch4 und Isotypkontrolle 1:50, PE 1:200. Notch4 führt im Vergleich zur Isotypkontrolle zu einer signifikanten Proteinexpression.

5.4.2 Semiquantitativer Proteinnachweis der Notch-Liganden

FACS der Notch-Liganden

Für den Nachweis der Notch-Liganden gelten die unter 5.4.1 Semiquantitativer Proteinnachweis der Notch-Rezeptoren genannten allgemeinen Voraussetzungen analog.

Für Jagged1 und Delta1 konnte, bei einer Konzentration des PAKs von 1:100 und des SAKs von 1:500, eine signifikante Proteinexpression gegenüber der Isotypkontrolle gezeigt werden. Dies war in frühen wie auch in späten Plazenten erkennbar (Abb. 5-40 und Abb. 5-42). Bei Jagged2 und Delta4 konnte in frühen und in späten Plazenten ebenfalls eine signifikante Proteinexpression gegenüber der

Isotypkontrolle gefunden werden. Hierfür wurde die Verdünnung des PAKs von 1:50 und des SAKs von 1:200 verwendet (Abb. 5-41 und Abb. 5-43).

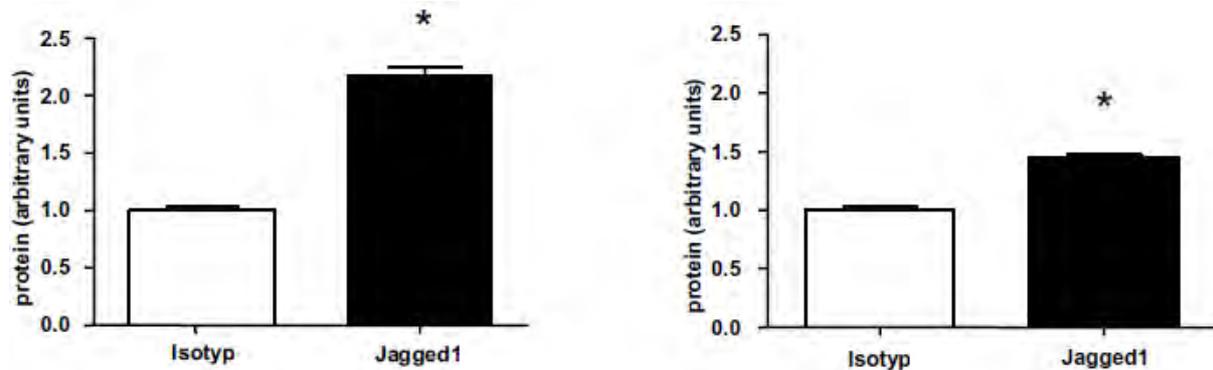


Abb. 5-40: FACS 1. + 3. Trimester, Jagged1 und Isotypkontrolle 1:100, FITC 1:500. Jagged1 führt zu einer signifikanten Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle.

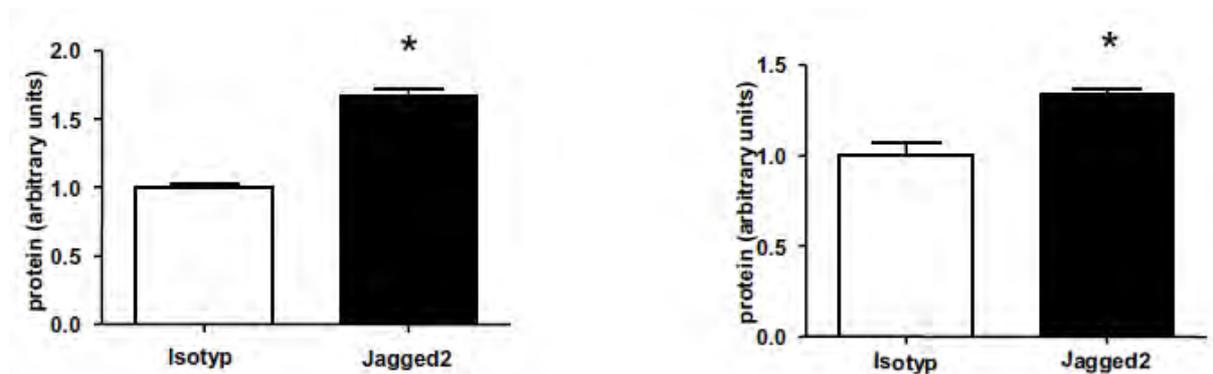


Abb. 5-41: FACS 1. + 3. Trimester, Jagged2 und Isotypkontrolle 1:50, FITC 1:200. Jagged2 führt im Vergleich zur Isotypkontrolle zu einer signifikanten Proteinexpression.

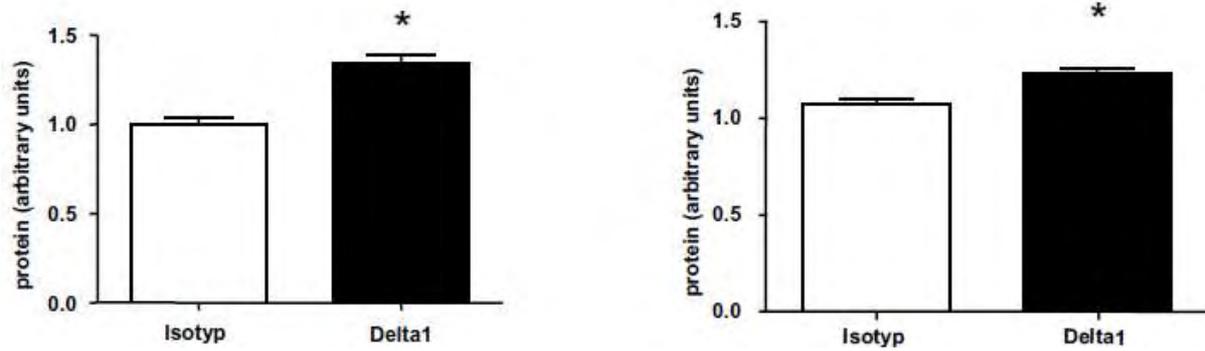


Abb. 5-42: FACS 1. + 3. Trimester, Delta1 und Isotypkontrolle 1:100, AF. 1:500. Bei Delta1 ist im Vergleich zur Isotypkontrolle eine signifikante Proteinexpression erkennbar.

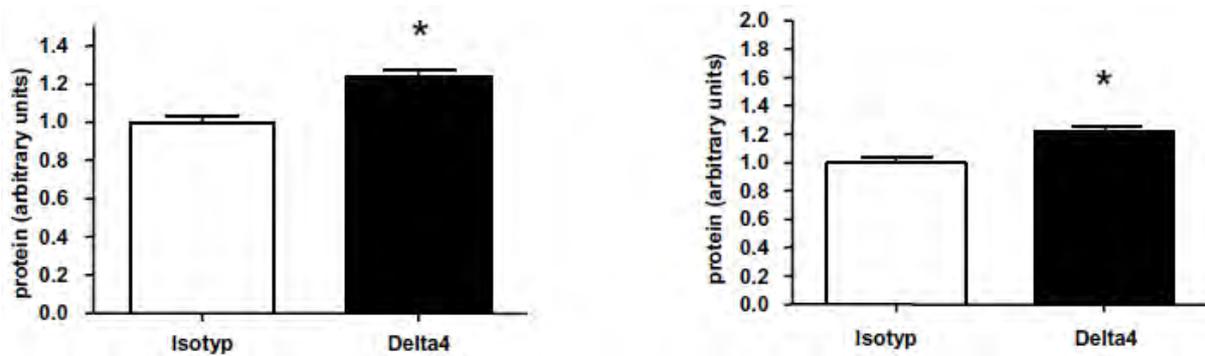


Abb. 5-43: FACS 1. + 3. Trimester, Delta4 und Isotypkontrolle 1:50, FITC 1:200. Auch bei Delta4 kommt es zur signifikanten Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle.

5.5 Übersicht der erzielten Ergebnisse

Tab. 5-1: Tabellarische Zusammenfassung

Rezeptoren/ Liganden	konventionelle PCR		realtime PCR		FACS		Immunhistologie	
	1. Trim.	3. Trim.	1. Trim.	3. Trim.	1. Trim.	3. Trim.	1. Trim.	3. Trim.
Notch1	-	-	K. P.	K. P.	+	+	+	+
Notch2	+	+	K. P.	K. P.	+	+	+	+
Notch3	-/+	-/+	+	+	+	+	+	+
Notch4	+	+	+	+	+	+	+	+
Jagged1	+	+	+	+	+	+	+	+
Jagged2	-	-	+	+	+	+	+	+
Delta1	-	-	+	+	+	+	+	+
Delta4	+	+	+	+	-/+	-/+	+	+

Erläuterung: + deutliches Signal -/+ Signal nicht immer reproduzierbar
 - kein Signal K. P. ungeeignetes Primerpaar

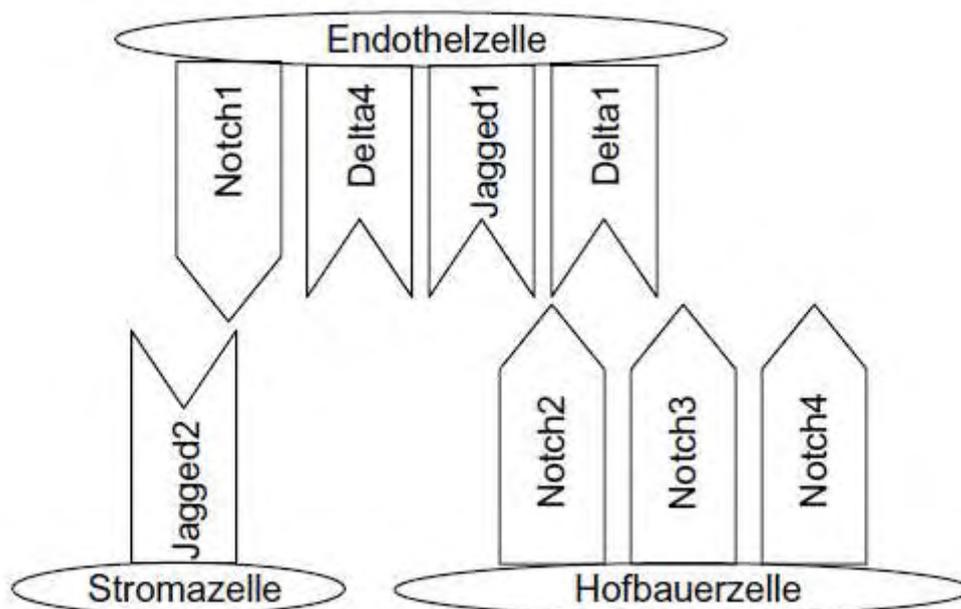


Abb. 5-44: Schematische Zusammenfassung immunhistologischer Ergebnisse.

6 Diskussion

6.1 Notch-Rezeptoren und -Liganden Expression in der humanen Plazenta

Die Notch-Rezeptoren 1 bis 4 und die zugehörigen -Liganden Delta1 und -4 und Jagged1 und -2 können in der hier vorgelegten Arbeit auf mRNA- und Proteinebene in placentarem Gewebe nachgewiesen werden. Bis heute ist nur eine Auswahl der Familie von Notch-Rezeptoren und -Liganden in der humanen Plazenta untersucht worden. Diese Arbeitsgruppe hat sich auf die Analyse der Expression von Notch1, Notch4 und Jagged1 beschränkt (De Falco et al., 2007).

Auf die Untersuchung von Delta2 und Delta3 ist hier verzichtet worden. Delta2 ist ein Gen, dass in der Literatur ausschließlich in Nagetier-Spezies beschrieben wurde (Chan et al., 2006). Bei Mutationen im humanen Delta3 Gen ist hauptsächlich das axiale skeletale System betroffen, woraus die „Spondylocostale Dysostosis“ resultiert. Es gibt keine Hinweise auf bedeutende vaskuläre Defekte, sodass auf eine Analyse von Delta3 innerhalb des placentaren Gewebes verzichtet wurde (Bulman et al., 2000).

In der hier vorgestellten Arbeit ist die Expression der Notch-Rezeptoren und ihrer Liganden hauptsächlich in Zellen des Zottenstromas (Endothel-, Hofbauer- und Stromazellen) zu finden. Dies steht zum Teil im Widerspruch zu den Ergebnissen von De Falco et al., 2007 die zeigen, dass Notch1, Notch4 und Jagged1 auch im Synzytiotrophoblasten gesehen wurden. Dabei wurde nicht unterschieden, welche Zellen im Zottenstroma eine immunhistochemische Färbung zeigen. Die Autoren gehen zusätzlich noch auf das Expressionsmuster innerhalb der Zellen ein, jedoch ist für eine solche Aussage die reine Immunhistochemie ohne elektronenmikroskopische Analyse nicht ausreichend geeignet.

Die Tatsache, dass in den hier vorgestellten Ergebnissen keine Expression von Notch und ihren Liganden im Synzytiotrophoblasten zu finden ist, findet ein Korrelat zu Untersuchungen in der Maus (Gasperowicz und Otto, 2008). Auch in der Plazenta der Maus gibt es Bereiche, die gar keine oder nur vereinzelte Vertreter der Notch-Familie exprimieren. In der maternalen Dezidua produzieren die Glykogenzellen Delta1, während die extravaskulären Trophoblast-Riesenzellen keine Rezeptoren und Liganden der Notch-Familie vorweisen. Die Trophoblast-Riesenzellen, die mit dem Spongiotrophoblasten interagieren, exprimieren Notch2. Wohingegen in den

fetalen Gefäßen, die bei der Maus in Kontakt mit dem Spongiotrophoblasten stehen Delta1 und -4, Notch2 und -4 nachgewiesen werden (Gasperowicz und Otto, 2008). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Stromazelle vorwiegend den Jagged2 Liganden exprimiert. Dagegen befindet sich in den Endothelzellen der Hauptanteil der Liganden (Delta4, Jagged1 und Delta1) sowie der Notch1 Rezeptor. Hier ist eine Übereinstimmung, in Bezug auf Delta1 und 4, unserer Resultate mit den Ergebnissen von Gasperowicz und Otto, 2008, erkennbar. Die Hofbauer-Zellen exprimieren die übrigen Rezeptoren (Notch2, 3, 4).

6.1.1 Physiologische Expression von Notch-Rezeptoren und -Liganden

Endothelzellen

Über die Expression von Notch-Rezeptoren und -Liganden im Gefäßsystem ist bekannt, dass die Notch-Rezeptoren sowohl im Endothel als auch in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert werden. Notch1 und -4 werden in Endothelzellen gefunden. Notch1 wird ebenso in glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben (Iso et al., 2003b). Diese Ergebnisse lassen sich nur zum Teil auf die humane Plazenta übertragen. Hier wird zwar Notch1 in Endothelzellen nachgewiesen, jedoch ist die Notch4 Expression hauptsächlich in Hofbauer-Zellen zu finden. Wohingegen die Notch3 Expression spezifisch in glatten Gefäßmuskelzellen nachzuweisen ist (Lindner et al., 2001). In der hier vorgestellten Arbeit konnte Notch3 vorwiegend in Hofbauer-Zellen gefunden werden, die häufig in der Nähe von Gefäßen liegen. Der Ligand Jagged2 wird in Endothelien von Embryonen und erwachsenen Tieren gefunden (Tsai et al., 2000). Der Zeitpunkt und die Lokalisation von Delta4 verhalten sich synchron zur Expression von Notch1. Allerdings weisen die Delta4 knock-out Mäuse schwerere vaskuläre Defekte auf als die Notch1 knock-out Mäuse. Die Doppel-Mutanten für Notch1 und -4 sind vergleichbar zu Delta4 knock-out Mäusen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass Delta4 mit Notch1 und -4 im Gefäßsystem interagiert (Duarte et al., 2004; Krebs et al., 2004). Dieses, in Mäusen gefundene Expressionsmuster, spiegelt sich auch in Endothelien der humanen Plazenta wider. In Kapillaren ist Jagged1 nicht so präsent wie Delta4, die Expressionsverteilung der beiden Liganden verhält sich eher komplementär als überlappend (Hofmann und Iruela-Arispe, 2007). Jagged1 wird sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen nachgewiesen (Villa et al., 2001). Hierzu lässt sich eine Korrelation zur Expression von Jagged1 in der humanen Plazenta finden. Jagged1 wird dort

hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert und in perivaskulären Zellen größerer Blutgefäße von Plazenten aus dem 3. Trimester. In erwachsenen Organismen wird Delta1 nur noch in arteriellen, nicht mehr jedoch in venösen Endothelzellen gefunden (Limbourg et al., 2007).

Angiogenese

Die Expression des Notch1 Rezeptors und der Liganden Delta4, Jagged1 und Delta1 auf Endothelzellen der humanen Plazenta lässt auf eine Rolle im Prozesse der plazentaren Vaskulo- und Angiogenese schließen. Der Prozess der Angiogenese lässt sich in die Proliferation und Migration von Endothelzellen und die anschließende Bildung eines kapillarähnlichen Gebildes unterteilen.

Hinweise auf eine Verknüpfung von VEGF Signalwirkung und die Notch-Rezeptorenfamilie sind durch Studien über embryonale Stammzellendifferenzierung zu arteriellen und venösen Anteilen bei Mäusen bekannt. Die Blockierung des Notch-Signalweges hemmt die VEGF-induzierte arterielle Spezifikation und fördert venöse Identität (Lanner et al., 2007). Darüber hinaus hemmt Delta4 die Expression von VEGF-Rezeptor-2 in HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) und moduliert dadurch die VEGF-A induzierte endotheliale Zellfunktion (Williams et al., 2006).

Wird der eigentliche Prozess der Angiogenese genauer analysiert, so findet sich in einem neu gebildeten Gefäß eine unterschiedliche Verteilung von Notch-Rezeptoren und -Liganden. Delta4 ist dabei vor allem in der führenden Endothelzelle eines Sprouts zu finden, während Notch1 eher in den darauffolgenden Zellen nachgewiesen werden kann (Claxton und Fruttiger, 2004). Delta4 reguliert über die Aktivierung von Notch1 Rezeptoren die Anordnung von Tip cells bei in vitro Sproutbildung (Hellstrom et al., 2007). Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Untersuchungen an Mausembryonen, in denen Delta4 heterozygot deletiert wurde und in denen die Gamma-Sekretase den Notch-Signalweg hemmt. Auf diese Weise wird gezeigt, dass Delta4 die endotheliale Tip cell Bildung und die Verzweigung von sich neu bildenden Gefäßen als Antwort auf VEGF hemmt (Suchting et al., 2007) VEGF₁₂₀ mutierte Mäuse zeigen eine geringere Expression der arteriellen Marker Notch1, Delta4 und EphrinB2. Umgekehrt verhielt es sich bei den venösen Markern. Hier wurde Alpha Aktin (glatte Muskulatur), Delta1 und Notch3 in den Venen der Mausembryonen verstärkt exprimiert (van den Akker et al., 2008). In der humanen Plazenta ist die Differenzierung von Arterie und Vene nur im Bereich der Stammzotte

erkennbar. In den hier untersuchten Tertiärzotten sind hauptsächlich Kapillaren beurteilt worden. In diesen Bereichen waren die Rezeptoren Notch1 und die Liganden Jagged1, Delta1 und -4 nachzuweisen.

Hofbauer-Zellen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Notch-Rezeptoren und -Liganden hat ergeben, dass die Notch-Rezeptoren 2, 3 und 4 auf Hofbauer-Zellen exprimiert werden und die Liganden Delta1, -4 und Jagged1 auf Endothelzellen nachzuweisen sind. Hofbauer-Zellen sind immer in Zotten unreifer Plazenten zu finden. Sie haben einen wichtigen Anteil an der Flüssigkeitsbilanz der frühen Plazenta, besitzen Fc Rezeptoren für die Bindung von IgG, tragen CD64, CD32 und CD16 und binden damit maternale anti-fetale Antigen-Antikörper-Komplexe. Weiterhin produzieren Hofbauer-Zellen alpha-1 Antitrypsin und alpha-1 Antichymotrypsin, weshalb angenommen wird, dass sie an der Re-Modellierung und Differenzierung von Plazentazotten beteiligt sind. Außerdem geht man davon aus, dass sie die Antigen-Präsentation gegenüber fetalen Lymphozyten übernehmen und damit eine Rolle in transplazentaren Infektionen spielen (Benirschke et al., 2006).

Des weiteren gibt es Autoren, die den Hofbauer-Zellen aufgrund der frühen Nachweisbarkeit in unreifen Plazentazotten und der Expression von VEGF, eine parakrine Rolle während des ersten Abschnittes der Vaskulogenese zusprechen (Demir et al., 2007). Diese Tatsache würde auch die Hauptlokalisierung der Hofbauer-Zellen in Gefäßnähe erklären.

Die Analyse der Expressionsmuster von Notch-Rezeptoren und -Liganden in Monozyten/Makrophagen-Zelllinien zeigt, dass Notch-Rezeptoren und -Liganden temporär während der Differenzierung exprimiert werden, und dass dieses Muster der Expression nach Abschluss der Differenzierung erhalten bleibt (Singh et al., 2000). Eine Aufgabe des Notch-Signalweges in Makrophagen scheint über die Aktivierung von NF-kB die Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression zu sein (Palaga et al., 2008). Sehr aufschlussreich wurde in einer weiteren Untersuchung gezeigt, dass die Infektion von Maus-Makrophagen mit Mycobacterium bovis, dem Erreger der Tuberkulose, die Notch1 Expression hochreguliert und damit über die Expression von Zytokin-Suppressoren eine Schlüsselrolle in diesem Infektionsweg einnimmt (Narayana und Balaji, 2008). Damit würden sich neue Therapieoptionen der Tuberkulose eröffnen, da die Hemmung der

Notch-Rezeptor-Aktivierung mit der Gamma-Sekretase, einem auf dem Gebiet der Alzheimer-Therapie bereits etablierten Medikament, einen positiven Effekt auf die Erkrankung haben könnte.

6.1.2 Schwangerschafts-assoziierte Erkrankungen und Notch-Rezeptoren und -Liganden

Ein wichtiger Bezug zu Schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen wird durch Studien hergestellt, in denen Plazenten aus Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Plazenten untersucht werden. Hierbei wiesen die Plazenten aus Präeklampsie eine deutlich niedrigere Notch1- und -4-, sowie Jagged1-Expression auf (Cobellis et al., 2007). Weitere Schwangerschafts-Pathologien wie etwa das Amnioninfektionssyndrom, das hauptverantwortlich für eine große Anzahl der Frühgeburten gemacht wird, könnte im Zusammenhang mit dem Notch-Rezeptor-Liganden System stehen. In humanen Koronararterien induziert CRP (C-reaktives Protein = Entzündungsmarker bei bakteriellen Infektionen) neben VEGF auch Notch1 und Notch3 und damit die Angiogenese (Turu et al., 2008).

In Bezug auf das hypoxische plazentare Milieu kann ein anderer Anknüpfungspunkt zur Notch-Rezeptorenfamilie gefunden werden: Hypoxische Bedingungen führen zur Induktion des Notch-Liganden Delta4 und den Notch Zielgenen Hey1 und Hey2 in verschiedenen Zelllinien. Stimulationsanalysen haben gezeigt, dass Hey1, Hey2 und Delta4 durch HIF-1alpha (hypoxia inducible factor) und Notch Aktivierung induziert werden. Bei den meisten Genen, die durch Hypoxie reguliert werden, wird die Aktivierung der Transkription durch HIF vermittelt (Diez et al., 2007).

6.2 Limitierende Faktoren dieser Studie

6.2.1 Material: Plazentares Gewebe zwischen der 6.-12. SSW und 37.-41. SSW

Für diese Arbeit stand Untersuchungsmaterial aus der 6.-12. SSW und der 37.-41. SSW zur Verfügung. Die hier erzielten Ergebnisse ließen keine verifizierbare Veränderung der relativen Expressionsmenge von Rezeptoren und Liganden zwischen dem 1. und 3. Trimester feststellen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Regulation der Differenzierung der Notch-Rezeptoren und ihrer -Liganden zu einem so frühen Zeitpunkt stattfinden könnte, zu dem wir nicht in der Lage sind, ihn zu beobachten, nämlich vor der 6. SSW. Hinweise dafür sind bei der Untersuchung der Entwicklung des Pankreas bei Mäusen gefunden worden. Dabei waren die

Notch-Rezeptoren 1, -2 und -3 bereits ab dem zweiten Tag in embryonalem Gewebe exprimiert. Nach dieser Zeit konnte keine weitere Veränderung in der Expressionsmenge beobachtet werden (Mfopou et al., 2005).

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine sehr frühe Veränderung des Notch-Jagged-Delta Expressionsmusters in der Differenzierung von Gewebe ist der Nachweis der Rezeptoren Notch1 und -2 und der Liganden Delta und Jagged in trophektodermalen Zellen und in der Inneren-Zellmasse der humanen Blastozyste. Bei dieser deskriptiven Untersuchung waren größere Anteile von Notch1, Delta und Jagged im Trophektoderm als in der Inneren-Zellmasse zu finden. Im Gegensatz dazu verhielt sich die Expression von Notch2 und Delta4, deren Anteile in der Inneren-Zellmasse höher waren als im Trophektoderm (Adjaye et al., 2005). Auch gibt es Untersuchungen mit Mäusen, bei denen eine Hochregulation von Jagged2, vom Oozyten- bis zum Zweizellstadium, und von Notch3 ab dem Zweizellstadium beschrieben werden. Hier wird ebenfalls vermutet, dass die genannten Expressionsunterschiede an der Vorbereitung zur Implantation beteiligt sind (Wang et al., 2004).

Ein Grund für eine Regulation der Notch-Rezeptoren und -Liganden Expression noch vor der hier untersuchten 6. SSW könnte darin bestehen, dass das Notch-Delta-Jagged System an der plazentaren Vaskulogenese beteiligt ist. Diese beginnt mit der Differenzierung der vaskulären endothelialen Progenitorzellen ab dem 15. Tag p. c. (das entspricht der 4. SSW post menstruationem) (Kaufmann et al., 2004). Auch in diesen tertiären Plazentazotten, in denen Gefäße enthalten sind, könnten die Notch-Rezeptoren und -Liganden von Bedeutung sein. Zwischen der 13. und der 20. SSW findet eine fortlaufende Umgestaltung und Reifung des Gefäßsystems in den Zotten statt (Asan et al., 1999; Demir et al., 1989). Die kontinuierliche Expression des Notch-Jagged-Delta Systems in der humanen Plazenta spricht für eine essenzielle Rolle im Reifungsprozess des Gefäßsystems, ohne dass dies an einer Hochregulation der Rezeptoren oder Liganden zwischen dem 1. und 3. Trimester messbar ist (Limbourg et al., 2005).

6.2.2 Methoden: Analyse der Notch-Rezeptoren und -Liganden auf mRNA- und Proteinebene

PCR

Bei der Planung und der Durchführung der PCRs fiel auf, dass eine große Anzahl Primerpaaren veröffentlicht ist, die einer kritischen Überprüfung nicht standhalten. Das Primerpaar von Notch1 entsprach, wie die Primerpaare der anderen Rezeptoren und Liganden auch, den unter 4.1.1.3 PCR aufgeführten Anforderungen, abgesehen von der Tatsache, dass der reverse Primer im letzten Exon des Notch1 Genes lag. Für Notch2 kamen zwei unterschiedliche Primerpaare zur Anwendung. Das zuerst verwendete Primerpaar war nicht Exon-Exon überspannend. Die Exongrenzen wurden von den Jagged2 Primern ebenfalls nicht überspannt. Bei Delta1 ließ sich das Ergebnis durch zwei unterschiedliche Primerpaare untermauern.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen kann die Präsenz der Rezeptoren Notch1-4 und der Liganden Delta1 und -4, sowie Jagged1 und -2 in frühen (7.-12. SSW) und späten (39.-41. SSW) humanen plazentaren Geweben bestätigt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass bereits viele Daten über die Expression des Notch1 Rezeptors auf mRNA Ebene in humanen Geweben und Zelllinien veröffentlicht wurden, dass jedoch nach genauer Prüfung der verschiedenen publizierten Primersequenzen keine geeigneten Primerpaare nach den oben genannten Auswahlkriterien sowohl in der Literatur als auch mit Hilfe von fachspezifischer Software zu finden waren. Dadurch war es nicht möglich, die mRNA-Expression von Notch1 in der humanen Plazenta nachzuweisen. Da jedoch der Nachweis von Proteinexpression von Notch1 sowohl mit der Durchflusszytometrie als auch mit der Immunhistochemie gelungen ist, wird für die mangelnde Expression auf mRNA Ebene die Primer-Qualität verantwortlich gemacht. Falls ein geeignetes Primerpaar zukünftig gefunden werden kann, sollte den Experimenten eine Verifikation in einem Referenzgewebe, zum Beispiel Leber- oder Nervengewebe, vorgeschaltet werden.

Unter Verwendung der konventionellen PCR war für Notch2 eine mRNA-Expression nachweisbar. Allerdings hat das Primerpaar in der realtime PCR nicht funktioniert, wie an der Dissoziationskurve (siehe Abb. 5-3) erkennbar ist. Für Delta1 und Jagged2 ist der mRNA-Nachweis mithilfe der konventionellen PCR trotz geeigneter Primerpaare nicht gelungen. Als Grund dafür ist sicherlich zu sehen, dass die

Modifikationsmöglichkeiten des PCR-Ablaufes in Bezug auf Temperatur und Anzahl der Zyklen, in der konventionellen PCR doch mehrere Möglichkeiten der Ergebnis-Verbesserungen birgt. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente waren diese noch nicht voll ausgeschöpft. Allerdings wurde im Laufe der Erstellung der vorgelegten Arbeit die konventionelle PCR von der realtime PCR hinsichtlich der Aktualität und Qualität abgelöst. Zur Sicherung der Ergebnis-Interpretation in der konventionellen PCR wäre eine Sequenzierung der Produkte wünschenswert, die in dieser Arbeit allerdings nicht vorgenommen wurde. Die Primervalidierung wurde mit HeLa-Zellen (Henrietta Lacks) (Allenspach et al., 2002) und endothelialen Progenitorzellen (CD34+) aus humanen Nabelschnurblut (Neves et al., 2006) durchgeführt (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Durch die Verwendung unterschiedlicher Nachweismethoden ist es jedoch gelungen, ein vollständiges Bild der Expression von allen Notch-Rezeptoren und den relevanten Liganden in der humanen Plazenta darzustellen.

FACS

Die Zellzahl nach Aufreinigung von ganzen Plazenten war zu gering, um einen FACS-Ansatz für alle Rezeptoren und Liganden gleichzeitig durchzuführen. Aus der Aufreinigung einer Plazenta war eine Zellzahl von $1,8-2,0 \cdot 10^6$ zu erzielen. Für einen optimalen FACS-Ansatz wären $6,4 \cdot 10^6$ Zellen erforderlich gewesen. Die benötigte Zellzahl setzt sich folgendermaßen zusammen: Pro FACS-Röhrchen werden $1 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt. Der Nachweis eines Rezeptors oder Liganden wird im vierfachen Ansatz durchgeführt. Pro Nachweis eines Rezeptors oder Liganden ist jeweils eine Isotypkontrolle in gleicher Konzentration mitzuführen.

Um auf die erforderliche Zellzahl zu kommen, war eine Kultivierung der Zellen nötig. Hierbei fand eine Überwachsung der ursprünglich heterogenen Zellkultur mit Fibroblasten (Stromazellen) statt. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte durch Cytokeratin7 (Trophoblasten), CD31 (Endothelzellen) und Vimentin (Fibroblasten/Stromazellen). Zu Beginn der Kultur waren die isolierten Zellen positiv für alle genannten Marker. Nach Erreichen der Zielzellzahl exprimierten die Zellen nur noch Vimentin.

Immunhistochemie

Zum Zeitpunkt der Planung und der Durchführung der vorliegenden Arbeit waren die Primärantikörper nur aus unterschiedlichen Spezies zu erwerben. Deshalb war es nicht möglich eine kommerziell erhältliche Zusammenstellung von Enzymen und Antikörpern (Fertig-Kit) zu verwenden. Weiterhin ermöglichte die hier verwendete Methode aus technischen Gründen keine Doppelfärbung. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit würde die Anwendung von Isotypkontrollen darstellen.

6.3 Ausblick: Direkte Zell-Zell-Interaktion als Kommunikationsweg im Hinblick auf plazentare Angio- und Vaskulogenese

Die deskriptive Analyse des Notch-Rezeptor-Liganden Systems in der humanen Plazenta ist aufgrund der zahlreichen Hinweise auf eine Beteiligung an der Vaskulo- und Angiogenese in anderen Organen und Spezies weiterhin funktionell zu untersuchen. Notch1, Notch4, Notch2 und Delta4 sind an der Trophoblastzell-Spezifikation und an der fetalen Vaskulomorphogenese sowie an dem mütterlich-plazentaren Blutgefäßsystem der Maus beteiligt. Notch2 ist in diesem Zusammenhang für die maternale Vaskulogenese in der Plazenta verantwortlich. Notch1 und -4 sind maßgeblich involviert an der fetalen Angiogenese bei der Maus (Gasperowicz und Otto, 2008).

Um Untersuchungen im humanen Bereich durchzuführen, steht ein in vitro Modell zur plazentaren Vaskulogenese zur Verfügung, das es erlaubt, die Interaktion von endothelialen Progenitorzellen, villösen Stromazellen und Zytotrophoblasten exakter zu beobachten (Baal et al., 2008).

7 Zusammenfassung/Kurzfassung

Fragestellung:

Die Etablierung des Gefäßsystems in der Plazenta ist wichtig für die komplikationslose Schwangerschaft und die Entwicklung von gesunden Feten. Verschiedene Knock-out-Maus-Modelle zeigten die essenzielle Rolle der Notch-Rezeptoren und deren Liganden in der Differenzierung der Gefäße. Um den Prozess der Vaskulo- und Angiogenese in der humanen Plazenta genauer zu charakterisieren, wurde die Expression von Notch-Rezeptoren und seinen -Liganden während der Schwangerschaft untersucht.

Methoden:

Plazentares Gewebe aus dem 1. und 3. Trimester wurde mittels konventioneller und realtime RT-PCR sowie Durchflusszytometrie und Immunohistochemie untersucht, um die Hypothese der sequentiellen Aktivierung der Notch-Rezeptoren- und ihrer -Ligandenfamilie zu testen. Zur Spezifizierung der exakten Lokalisation wurden Färbungen mit Plazentagewebeschnitten mit CD31, Vimentin, Cytokeratin7 und CD68 durchgeführt.

Ergebnisse:

Die Rezeptoren Notch2, -3, -4 und die Liganden Jagged1 und Delta4 sind auf mRNA- und Proteinebene in den frühen wie auch in den späten Plazenten nachweisbar. Jagged2, Delta1 und Notch1 sind auf Proteinebene nachweisbar, wobei Jagged2 und Delta1 auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurden. Kein Nachweis auf mRNA-Ebene war für Notch1 zu erbringen. Überraschenderweise war die Expression aller Notch-Rezeptoren und -Liganden nicht ausschließlich im Gefäßsystem zu finden. Eine starke Jagged1 Expression wurde in Endothelzellen großer Gefäße gesehen, was mit der bereits bekannten Rolle von Notch und Jagged in der Differenzierung zwischen Arterie und Vene im Einklang steht. Weiterhin wurden Notch1, Delta1 und -4 in Endothelzellen lokalisiert. Die hauptsächliche Expression von Jagged2 konnte den Stromazellen zugeordnet werden. Notch2 bis -4 sind vorwiegend in den Hofbauer-Zellen, die häufig gefäßnah im Zottenstroma liegen, festzustellen. Diese Ergebnisse waren in frühen wie auch in späten Plazenten zu sehen. Die Befunde wurden anhand von aus Plazenten isolierten Zellen verifiziert. Notch-Rezeptoren und ihre Liganden sind ein Beispiel für die Kommunikation zwischen Trophoblast-, Stroma- und Endothelzellen und geben aufgrund ihres

Verteilungsmusters Hinweise auf eine enge Zell-Zell-Interaktion im Rahmen der placentaren Vaskulo- und Angiogenese.

8 Summary

OBJECTIVES: Vascular development in the placenta is important for an uncomplicated pregnancy and the development of a healthy fetus. In the differentiation of blood vessels notch receptors and ligands have been implicated to play an essential role shown by several knock-out mouse models. To further characterize the process of human placental vasculo- and angiogenesis we investigated the expression pattern of the notch receptors and their ligands during pregnancy.

METHODS: Conventional PCR, RT-PCR, flow cytometric analysis and immunohistochemistry were performed in early (6-12 weeks of gestation) and late placenta (37-41 w.o.g.) to test the hypothesis of a sequential activation of the notch-receptor and ligand family. To specify the exact localisation immunohistochemistry of placental tissue with CD31, vimentin, cytokeratin and CD68 were done.

RESULTS: The receptors notch2, -3, -4 and the ligands jagged1 and delta4 were present on mRNA and protein levels either in early and late placenta. Jagged-2, delta1, and notch1 were detected on protein level whereas jagged2 and delta1 were observed as well on mRNA level. Notch1 mRNA was not detected. Surprisingly the protein expression was not to be found exclusively in the endothelium. A strong jagged1 expression was found in the endothelium of larger vessels supporting a role in differentiating between artery and venule. Additionally, notch1, delta1 and -4 were found in endothelial cells. The main expression of jagged2 was localized to stromal cells. Notch2, -3 and -4 were localized in Hofbauer Cells preferably adjoining blood vessels. These results were shown in early and late placenta and verified on isolated cells of the placenta. Notch receptors and their ligands are an example of communication between trophoblast, stroma- and endothelial cells. Their distribution pattern indicates a strong cell-cell interaction in the process of placental vasculo- and angiogenesis.

9 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Marek Zygmunt herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung des Themas. Seine freundliche und engagierte Unterstützung war zu jedem Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit eine sehr große Hilfe. Besonderen Dank gilt seinen schnellen und konstruktiven Korrekturen.

Frau Prof. Dr. Christiane Pfarrer möchte ich herzlich für ihre freundliche und engagierte Unterstützung danken. Insbesondere bei der immunhistochemischen Auswertung hat ihre intensive Begutachtung der hier vorgelegten Arbeit eine entscheidende und sehr gewinnbringende Wendung gebracht.

Meinen ganz besonderen Dank gilt Frau Dr. Friederike Herr. Auch über die zwischenzeitlich entstandene räumliche Distanz hinweg stand sie von der Planung bis zur Beendigung unterstützend und wegweisend an meiner Seite.

Die Arbeitsgruppen in Gießen und in Greifswald insbesondere Frau Bettina Gill und Herrn Dr. Herbert Fluhr waren für Fragen und die Einarbeitung in verschiedene Techniken eine ganz große Hilfe.

Eine wesentliche Vereinfachung der Dokumentation erbrachte die Überlassung des Mikroskops in dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ein herzlicher Dank gilt meinem persönlichen Umfeld zur Aufrechterhaltung des leiblichen und moralischen Wohls:

Dirk Schreiner, Margarete und Richard Pfahls, Michaela Pfahls-Döppenschmitt, Dr. Christine Jöckel, Dr. Almut und Stefan Dolze, Elisabeth und Roland Hacker.

10 Erklärung

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

Isabel Schreiner

11 Literatur

1. Adjaye, J., J. Huntriss, R. Herwig, A. BenKahla, T. C. Brink, C. Wierling, C. Hultschig, D. Groth, M. L. Yaspo, H. M. Picton, R. G. Gosden, and H. Lehrach. 2005. Primary Differentiation in the Human Blastocyst: Comparative Molecular Portraits of Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells. *Stem Cells* 23:1514-1525.
2. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1994. Part 3. Internal Organization of the Cell 15. Cell Signaling. *Molecular Biology Of The Cell*.
3. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002b. V. Cells in Their Social Context 21. Development of Multicellular Organisms. *Molecular Biology Of The Cell*.
4. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002a. IV. Internal Organization of the Cell 15. Cell Communication. *Molecular Biology Of The Cell*.
5. Allenspach, E., I. Maillard, J. Aster, and W. Pear. 2002. Notch signaling in cancer. *Cancer Biology & Therapy* 1:466-476.
6. Anson-Cartwright, L., K. Dawson, D. Holmyard, S. J. Fisher, R. A. Lazzarini, and J. C. Cross. 2000. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nature genetics* 25:311-314.
7. Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 284:770-776.
8. Asan, E., F. F. Kaymaz, A. N. Cakar, A. Dagdeviren, and M. S. Beksac. 1999. Vasculogenesis in early human placental villi: an ultrastructural study. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 181:549-554.
9. Baal, N., R. Widmer-Teske, T. McKinnon, K. T. Preissner, and M. T. Zygmunt. 2008. In vitro spheroid model of placental vasculogenesis: does it work[quest]. *Lab Invest* 89:152-163.
10. Baldi, A., M. De Falco, L. De Luca, G. Cottone, M. Paggi, B. Nickoloff, L. Miele, and A. De Luca. 2004. Characterization of tissue specific expression of Notch-1 in human tissues. *Biology of the Cell* 96:303-311.
11. Barker, D. 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 17:1111.

12. Benirschke, K., P. Kaufmann, and R. Baergen. 2006. Pathology of the Human Placenta, Kapitel 6: basic structure of the villous trees. 5th ed. Springer, Berlin.
13. Bettenhausen, B., M. Hrabe de Angelis, D. Simon, J. L. Guenet, and A. Gossler. 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development* 121:2407-2418.
14. Bolos, V., J. Grego-Bessa, and J. L. de la Pompa. 2007. Notch Signaling in Development and Cancer. *Endocr Rev* 28:339-363.
15. Borggrefe, T. and F. Oswald. 9 A.D. The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:1631-1646.
16. Bulman, M. P., K. Kusumi, T. M. Frayling, C. McKeown, C. Garrett, E. S. Lander, R. Krumlauf, A. T. Hattersley, S. Ellard, and P. D. Turnpenny. 2000. Mutations in the human Delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet* 24:438-441.
17. Carter, A. M. 2007. Animal Models of Human Placentation – A Review. *Placenta* 28:S41-S47.
18. Carter, A. M. and A. C. Enders. 2004. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:46.
19. Castellucci, M., D. Zaccheo, and G. Pescetto. 1980. A three-dimensional study of the normal human placental villous core. I. The Hofbauer cells. *Cell Tissue Res* 210:235-247.
20. Chan, T., R. Satow, H. Kitagawa, S. Kato, and M. Asashima. 2006. Ledgerline, a Novel *Xenopus laevis* Gene, Regulates Differentiation of Presomitic Mesoderm During Somitogenesis. *Zoological Science* 23:689-697.
21. Charnock-Jones, D. S., P. Kaufmann, and T. M. Mayhew. 2004. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. I. Molecular Regulation. *Placenta* 25:103-113.
22. Christensen, S., V. Kodoyianni, M. Bosenberg, L. Friedman, and J. Kimble. 1996. lag-1, a gene required for lin-12 and glp-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). *Development* 122:1373-1383.
23. Claxton, S. and M. Fruttiger. 2004. Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene Expression Patterns* 5:123-127.
24. Cobellis, L., A. Mastrogiacomo, E. Federico, M. Schettino, M. De Falco, L. Manente, G. Coppola, M. Torella, N. Colacurci, and A. De Luca. 2007.

- Distribution of Notch protein members in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Cell and Tissue Research* 330:527-534.
25. Cochard, L. 2002. *Netter's Atlas of Human Embryology*. first Edition ed. Icon Learning Systems LLC.
 26. De Falco, M., L. Cobellis, D. Giraldi, A. Mastrogiacomo, A. Perna, N. Colacurci, L. Miele, and A. De Luca. 2007. Expression and Distribution of Notch Protein Members in Human Placenta Throughout Pregnancy. *Placenta* 28:118-126.
 27. Del Amo, F. F., D. E. Smith, P. J. Swiatek, M. Gendron-Maguire, R. J. Greenspan, A. P. McMahon, and T. Gridley. 1992. Expression pattern of *Motch*, a mouse homolog of *Drosophila Notch*, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development* 115:737-744.
 28. Demir, R., P. Kaufmann, M. Castellucci, T. Erbenji, and A. Kotowski. 1989. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anatomica* 136:190-203.
 29. Demir, R., Y. Seval, and B. Huppertz. 2007. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochemica* 109:257-265.
 30. Diez, H., A. Fischer, A. Winkler, C. Hu, A. Hatzopoulos, G. Breier, and M. Gessler. 2007. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Experimental Cell Research* 313:1-9.
 31. Duarte, A., M. Hirashima, R. Benedito, A. Trindade, P. Diniz, E. Bekman, L. Costa, D. Henrique, and J. Rossant. 2004. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes Dev.* 18:2474-2478.
 32. Dufraigne, J., Y. Funahashi, and J. Kitajewski. 2008. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* 27:5132-5137.
 33. Dunwoodie, S. L., D. Henrique, S. M. Harrison, and R. S. Beddington. 1997. Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124:3065-3076.
 34. Ellisen, L. W., J. Bird, D. C. West, A. L. Soreng, T. C. Reynolds, S. D. Smith, and J. Sklar. 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila Notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66:649-661.
 35. Emerick, K., D. Piccoli, N. Spinner, I. Krantz, E. Goldmuntz, and E. Rand. 1999. Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 29:822-829.

36. Fehon, R. G., P. J. Kooh, I. Rebay, C. L. Regan, T. Xu, M. A. T. Muskavitch, and S. Artavanis-Tsakonas. 1990. Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61:523-534.
37. Fluhr, H., J. Spratte, J. Ehrhardt, F. Steinmüller, P. Licht, and M. Zygmunt. 2010. Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility* 93(8):2581-2587. (Abstr.)
38. Fluhr, H., S. Carli, M. Deperschmidt, D. Wallwiener, M. Zygmunt, and P. Licht. 2007. Differential effects of human chorionic gonadotropin and decidualization on insulin-like growth factors-I and -II in human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility* 90:1384-1389.
39. Gasperowicz, M. and F. Otto. 2008. The Notch Signalling Pathway in the Development of the Mouse Placenta. *Placenta* 29:651-659.
40. Grosser, O. 1927. Frühentwicklung, Eihautbildung und Plazentation des Menschen und der Säugetiere.
41. Han, W., Q. Ye, and M. A. S. Moore. 2000. A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 95:1616-1625.
42. Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt, and C. Betsholtz. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445:776-780.
43. Herr, F., N. Baal, K. Reisinger, A. Lorenz, T. McKinnon, K. T. Preissner, and M. Zygmunt. 2007. hCG in the Regulation of Placental Angiogenesis. Results of an In Vitro Study. *Placenta* 28:S85-S93.
44. Hofmann, J. J. and M. L. Iruela-Arispe. 2007. Notch Signaling in Blood Vessels: Who Is Talking to Whom About What? *Circ Res* 100:1556-1568.
45. Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamada. 2003a. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 194:237-255.
46. Iso, T., Y. Hamamori, and L. Kedes. 2003b. Notch Signaling in Vascular Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:543-553.
47. Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cecillion, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E. A. Cabanis, M. M. Ruchoux, J. Weissenbach, J. F. Bach, M. G. Bousser, and E. Tournier-Lasserre. 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383:707-710.

48. Kamath, B. M., L. Bason, D. A. Piccoli, I. D. Krantz, and N. B. Spinner. 2003. Consequences of JAG1 mutations. *J Med Genet* 40:891-895.
49. Kaufmann, P. and M. Davidoff. 1977. The guinea-pig placenta. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 53:5-91.
50. Kaufmann, P., T. M. Mayhew, and D. S. Charnock-Jones. 2004. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. II. Changes During Normal Pregnancy. *Placenta* 25:114-126.
51. Kingdom, J., B. Huppertz, G. Seaward, and P. Kaufmann. 2000. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 92:35-43.
52. Kliman, H., J. Nestler, E. Sermasi, J. Sanger, and J. 3. Strauss. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-1582.
53. Krebs, C., L. Macara, R. Leiser, A. Bowman, I. Greer, and J. Kingdom. 1996. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am J Obstet Gynecol* 175:1534-1542.
54. Krebs, L. T., J. R. Shutter, K. Tanigaki, T. Honjo, K. L. Stark, and T. Gridley. 2004. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev.* 18:2469-2473.
55. Lai, E. C. 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131:965-973.
56. Lanner, F., M. Sohl, and F. Farnebo. 2007. Functional Arterial and Venous Fate Is Determined by Graded VEGF Signaling and Notch Status During Embryonic Stem Cell Differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:487-493.
57. Lardelli, M., J. Dahlstrand, and U. Lendahl. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mechanisms of Development* 46:123-136.
58. Lawson, N. D., N. Scheer, V. N. Pham, C. H. Kim, A. B. Chitnis, J. A. Campos-Ortega, and B. M. Weinstein. 2001. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128:3675-3683.
59. Li, L., I. D. Krantz, Y. Deng, A. Genin, A. B. Banta, C. C. Collins, M. Qi, B. J. Trask, W. L. Kuo, J. Cochran, T. Costa, M. E. Pierpont, E. B. Rand, D. A. Piccoli, L. Hood, and N. B. Spinner. 1997. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16:243-251.

60. Limbourg, A., M. Ploom, D. Elligsen, I. Sorensen, T. Ziegelhoeffer, A. Gossler, H. Drexler, and F. P. Limbourg. 2007. Notch Ligand Delta-Like 1 Is Essential for Postnatal Arteriogenesis. *Circ Res* 100:363-371.
61. Limbourg, F. P., K. Takeshita, F. Radtke, R. T. Bronson, M. T. Chin, and J. K. Liao. 2005. Essential Role of Endothelial Notch1 in Angiogenesis. *Circulation* 111:1826-1832.
62. Lindner, V., C. Booth, I. Prudovsky, D. Small, T. Maciag, and L. Liaw. 2001. Members of the Jagged/Notch Gene Families Are Expressed in Injured Arteries and Regulate Cell Phenotype via Alterations in Cell Matrix and Cell-Cell Interaction. *Am J Pathol* 159:875-883.
63. Lindsell, C. E., C. J. Shawber, J. Boulter, and G. Weinmaster. 1995. Jagged: A mammalian ligand that activates notch1. *Cell* 80:909-917.
64. Livaka, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DeltaDeltaCT Method. *Methods* 25:402-408.
65. Lodish, H., A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell. 2000. 23. Cell Interactions in Development. *Molecular Cell Biology*. Freeman, W H.
66. Lu, C., T. Bonome, Y. Li, A. Kamat, H. L. , R. Schmandt, R. Coleman, D. Gershenson, R. Jaffe, M. Birrer, and A. Sood. 2007. Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma. *Cancer Res* 67:1757-1768.
67. Mayhew, T. M., D. S. Charnock-Jones, and P. Kaufmann. 2004. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. III. Changes in Complicated Pregnancies. *Placenta* 25:127-139.
68. Meegdes, B., R. Ingenhoes, L. Peeters, and N. Exalto. 1988. Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. *Fertil Steril* 49:216-220.
69. Meekins, J., R. Pijnenborg, M. Hanssens, I. McFadyen, and A. vanAsshe. 1994. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 101:669-674.
70. Mfopou, J., E. Willems, L. Leyns, and L. Bouwens. 2005. Expression of regulatory genes for pancreas development during murine embryonic stem cell differentiation. *Int J Dev Biol* 49:915-922.
71. Narayana, Y. and K. Balaji. 2008. NOTCH1 Up-regulation and Signaling Involved in *Mycobacterium bovis* BCG-induced SOCS3 Expression in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 283:12501-12511.
72. Neves, H., F. Weerkamp, A. Gomes, B. Naber, P. Gameiro, J. Becker, P. Lúcio, N. Clode, J. van Dongen, F. Staal, and L. Parreira. 2006. Effects

- of Delta1 and Jagged1 on Early Human Hematopoiesis: Correlation with Expression of Notch Signaling-Related Genes in CD34+ Cells. *Stem Cells* 24:1328-1337.
73. Nicolas, M., A. Wolfer, K. Raj, J. A. Kummer, P. Mill, M. van Noort, C. c. Hui, H. Clevers, G. P. Dotto, and F. Radtke. 2003. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 33:416-421.
 74. Noguera-Troise, I., C. Daly, N. J. Papadopoulos, S. Coetzee, P. Boland, N. W. Gale, H. Chieh Lin, G. D. Yancopoulos, and G. Thurston. 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444:1032-1037.
 75. Palaga, T., C. Buranaruk, S. Rengpipat, A. Fauq, T. Golde, S. Kaufmann, and B. Osborne. 2008. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *European Journal of Immunology* 38:174-183.
 76. Rebay, I., R. J. Fleming, R. G. Fehon, L. Cherbas, P. Cherbas, and S. Artavanis-Tsakonas. 1991. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and serrate: Implications for notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67:687-699.
 77. Ridgway, J., G. Zhang, Y. Wu, S. Stawicki, W. C. Liang, Y. Chanthery, J. Kowalski, R. J. Watts, C. Callahan, I. Kasman, M. Singh, M. Chien, C. Tan, J. A. Hongo, F. de Sauvage, G. Plowman, and M. Yan. 2006. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444:1083-1087.
 78. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
 79. Shawber, C., J. Boulter, C. E. Lindsell, and G. Weinmaster. 1996. Jagged2: A Serrate-like Gene Expressed during Rat Embryogenesis. *Developmental Biology* 180:370-376.
 80. Shutter, J. R., S. Scully, W. Fan, W. G. Richards, J. Kitajewski, G. A. Deblandre, C. R. Kintner, and K. L. Stark. 2000. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14:1313-1318.
 81. Singh, N., R. Phillips, N. Iscove, and S. Egan. 2000. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Experimental Hematology* 28:527-534.
 82. Strahl, H. 1906. Die Embryonalhüllen der Säugetiere und die Placenta. Hertwigs Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Fischer Jena.
 83. Suchting, S., C. Freitas, F. le Noble, R. Benedito, C. Breant, A. Duarte, and A. Eichmann. 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates

- endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:3225-3230.
84. Thurston, G. 2003. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell and Tissue Research* 314:61-68.
 85. Tsai, S., J. Fero, and S. Bartelmez. 2000. Mouse Jagged2 is differentially expressed in hematopoietic progenitors and endothelial cells and promotes the survival and proliferation of hematopoietic progenitors by direct cell-to-cell contact. *Blood* 96:950-957.
 86. Turu, M., M. Slevin, S. Matou, D. West, C. Rodriguez, A. Luque, M. Grau-Olivares, L. Badimon, J. Martinez-Gonzalez, and J. Krupinski. 2008. C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression. *BMC Cell Biology* 9:47.
 87. Uyttendaele, H., G. Marazzi, G. Wu, Q. Yan, D. Sassoon, and J. Kitajewski. 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122:2251-2259.
 88. van den Akker, N. M. S., V. Caolo, L. J. Wisse, P. P. W. M. Peters, R. E. Poelmann, P. Carmeliet, D. G. M. Molin, and A. C. Gittenberger-de Groot. 2008. Developmental coronary maturation is disturbed by aberrant cardiac vascular endothelial growth factor expression and Notch signalling. *Cardiovasc Res* 78:366-375.
 89. Varnum-Finney, B., L. E. Purton, M. Yu, C. Brashem-Stein, D. Flowers, S. Staats, K. A. Moore, I. Le Roux, R. Mann, G. Gray, S. Artavanis-Tsakonas, and I. D. Bernstein. 1998. The Notch Ligand, Jagged-1, Influences the Development of Primitive Hematopoietic Precursor Cells. *Blood* 91:4084-4091.
 90. Villa, N., L. Walker, C. Lindsell, J. Gasson, M. Iruela-Arispe, and G. Weinmaster. 2001. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev.* 108:161-164.
 91. Wang, Q. T., K. Piotrowska, M. A. Ciemerych, L. Milenkovic, M. P. Scott, R. W. Davis, and M. Zernicka-Goetz. 2004. A Genome-Wide Study of Gene Activity Reveals Developmental Signaling Pathways in the Preimplantation Mouse Embryo. *Developmental Cell* 6:133-144.
 92. Weinmaster, G., V. J. Roberts, and G. Lemke. 1992. Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116:931-941.
 93. Wilkinson, H. A., K. Fitzgerald, and I. Greenwald. 1994. Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision. *Cell* 79:1187-1198.

94. Williams, C. K., J. L. Li, M. Murga, A. L. Harris, and G. Tosato. 2006. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* 107:931-939.
95. You, L. R., F. J. Lin, C. T. Lee, F. J. DeMayo, M. J. Tsai, and S. Y. Tsai. 2005. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature* 435:98-104.
96. Zhong, T. P., S. Childs, J. P. Leu, and M. C. Fishman. 2001. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 414:216-220.

12 Anhang

12.1 Geräte

Canon Eos 300 Digital	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Dampfsterilisator, VARIOKLAV®	H+P, Oberschleimheim
FACS - Gerät	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
UV-Lichtquelle GelDoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus, Hanau
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
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter CG840	Schott, Mainz
Pipettboy acu	Integra bioscience, Fernwald
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spectrophotometer SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermo-cycler, Mastercycler gradient	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

12.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Mikrotiterplatten	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
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Lab-Tek Chamber Slide	Nunc, New York, USA
MACS Column LS (Magnetsäule)	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym, Oldendorf
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
Zellkulturflaschen (12,5cm ² und 25cm ²)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75cm ² und 150cm ²)	Biochrom, Berlin
Zellsieb 80µm	Becton Dickinson Labware, Heidelberg

12.3 Chemikalien

Agarose Neeo, Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammonium Bicarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Fluka Chemie, Buchs
Ammonium Chloride (NH ₄ Cl)	Fluka Chemie, Buchs
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antibiotische Lösung Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Collagenase	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim
dNTP Mix	Eurogentec, Seraing, Belgium
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
Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycergel Mounting Medium	Dako, Hamburg
Hämatoxylin	Waldeck, Münster
Hank's balanced salt solution (HBSS-buffer) 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Human Serum	PAA, Pasching, Österreich
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 Hen, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH) 1M	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS Tabletten	Invitrogen, Karlsruhe
Pickrinsure	Fluka Chemie, Buchs
Plasmocin	Amaxa AG, Köln
ProLong [®] Gold antifade reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Random Primers	Promega, Mannheim
RNase Reverse Transcriptase, SuperScript II	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 1M	Merck, Darmstadt
Streptavidin-HRP	Dako, Hamburg
Streptomycin	Biocompare, San Francisco, CA, USA
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TBS	Tris gepufferte Lösung
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan- 1,3-diol)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Flow Laboratories, Irvine, Schottland
Trypsin 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA 1x	Invitrogen, Karlsruhe
ultra pure Water	Biochrom, Berlin
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

12.4 Kommerzielle Assays und Tests

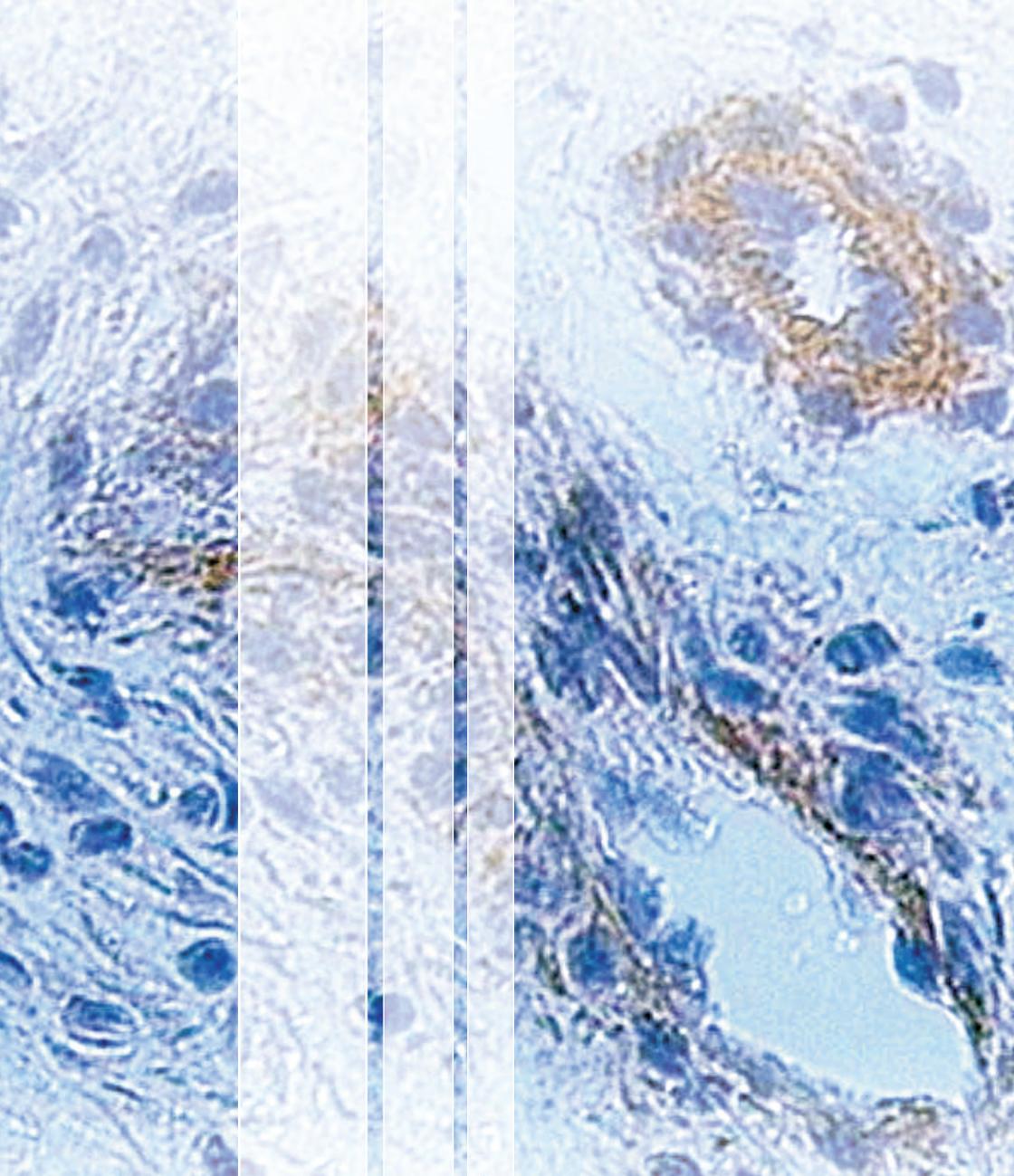
Biotin Blocking System	Dako, Hamburg
CD326 MicroBead Kit human	Miltenyi bioscience, Bergisch Gladbach
High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystem, Foster City, CA, USA
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini RNA extraction kit	Qiagen, Hilden
SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystem, Foster City, CA, USA

12.5 Zellkulturmedien

AmnioMax [™] -100	Invitrogen, Karlsruhe
Endothelial Basal Cell Medium MV 2	PromoCell, Heidelberg
MEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe

12.6 Software zur Datenauswertung

Abi Prism Primer Express 2.0	Applied Biosystem, Foster City, CA, USA
CellQuestPro, FACS-Analyse	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
NIS Elements, live imaging Mikroskopie	Nikon, Düsseldorf
Quantity One, PCR Auswertung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN: 978-3-8359-5593-6

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 783835 119559 3 6