

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Onkologischen Zentrums des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Optimierung der endothelialen
Differenzierungseffizienz von humanen CD133
positiven Stammzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
Im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Estelle Jiongo aus Kamerun

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
Der Universität Hamburg am: 19.02.2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der / die Vorsitzende:	Prof. Dr. W. Fiedler
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter / in:	Prof. Dr. H. Kabisch
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter / in:	Prof. Dr. N. Kröger

Inhaltsverzeichnis

A ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
B EINLEITUNG	6
1 BLUTGEFÄßBILDUNG: VASKULOGENESE UND ANGIOGENESE	6
1.1 Vaskulogenese	6
1.2 Angiogenese	7
2 ANGIOGENE FAKTOREN	8
2.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF) und seine Rezeptoren	8
2.3 Andere angiogene Faktoren	15
3 ENDOTHELZELLEN UND IHRE VORLÄUFER	16
3.1 Endothelzellen	16
3.2 Endothelvorläuferzellen	18
4 ZIELE DIESER ARBEIT	22
C MATERIAL UND METHODEN	24
1 MATERIAL	24
1.1 Laborgeräte	24
1.2 Verbrauchsmaterialien	25
1.3 Chemikalien und Medizinprodukte	26
1.4 Antikörper für die Immunfluoreszenzanalysen	27
1.5 Zusammensetzung der Puffer und Medien	28
2 METHODEN	31
2.1 Verwendete Zellen	31
2.2 Isolierung von Zellen aus den Blutprodukten	32
2.3 Kultivierung der CD133 positiven Zellen	34
2.4 Differenzierung der ex-vivo expandierten hämatopoietischen Stammzellen, der CD133, CD14 positiven Zellen und von den mononukleären Zellen.	34
2.5 Qualitative Einschätzungen	38
2.6 Quantitative Einschätzungen	38
2.7 Immunfluoreszenz: Nachweis der spezifischen Endothelzellmarker von-Willebrand-Faktor und VE-Cadherin	40
2.8 Statistische Analyse: der T-Test	41
D ERGEBNISSE	42
1. SCREENING	42
1.1 Qualitative Einschätzung	42
1.2 Quantifizierung des Differenzierungspotentials der Medien LBMCM + VEGF, EBM-1 und EBM-2 : Methode des Rasters	45
1.3 Ermittlung der optimalen Zellzahl	46
1.4 Ermittlung der optimalen Quantifizierungsmethode	47
1.5 Ermittlung des Zeitpunktes für die Quantifizierung der Endothelzellen	49
2. OPTIMIERUNG DER ENDOTHELIALEN DIFFERENZIERUNG DER EX-VIVO EXPANDIERTEN CD133 POSITIVEN STAMMZELLEN : EBM-1	51
2.1 Kombinationen von EBM-1 mit Zytokinen, die eine Schlüsselrolle in der Angio- und Vaskulogenese spielen	52
2.2 Optimieren des Differenzierungsmediums bestehend aus dem Grundmedium EBM-1, VEGF und Angiopoetin-1	55
2.3 Anderweitige Optimierung des Differenzierungsverhaltens der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen	62
3. UNTERSUCHUNG DES DIFFERENZIERUNGSVERHALTENS DER CD14 POSITIVEN MONOZYTEN UND DER MONONUKLEÄREN ZELLEN AUS BUFFY COAT	69
3.1 Beurteilung der Zellen am Umkehrmikroskop und Quantifizierung der differenzierten Zellen .	69
3.2 Charakterisierungen der differenzierten Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung	72
E DISKUSSION	75
F ZUSAMMENFASSUNG	81
G LITERATURVERZEICHNIS	83

H DANKSAGUNG	102
I EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	103
J ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
K ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	106
L TABELLENVERZEICHNIS	108

A Arbeitshypothese und Fragestellung

In westlichen Ländern ist die Bevölkerung zunehmend von Gefäßerkrankungen betroffen. Dies hängt mit der hohen Lebenserwartung und mit dem Lebensstil zusammen. Heutzutage gibt es zahlreiche Therapiemöglichkeiten, dazu zählen sowohl konservative als auch interventionelle.

Es ist bekannt, dass CD133 positive, hämatopoietische Stammzellen sich endothelial ausdifferenzieren können (Gehling et al., 2000 ; Peichev et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit sollten die Stammzellen in vitro expandiert werden, um eine möglichst hohe Ausgangszellzahl zu erhalten. Aus dem Grundmedium EBM-1 sollte durch Zugabe verschiedener Faktoren wie VEGF, Angiopoietin-1 und -2 ein Differenzierungsmedium mit hoher Differenzierungseffizienz entwickelt werden.

Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob ein sequentielles Verabreichen der oben genannten Zytokine oder die Verdoppelung des Serumgehaltes des Grundmediums EBM-1 ein gesteigertes Differenzierungsverhalten zur Folge hätte.

Da auch die Oberflächenstruktur der Zellkulturgefäße eine Rolle spielen kann, wurden Vergleiche zwischen Kunststoff- und Glaskulturgefäßen durchgeführt. Es sollte ferner festgestellt werden, ob die nicht adhärenenten Zellen sich durch erneutes Aussäen sich ebenfalls ausdifferenzieren könnten, und ob dies zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl der Endothelzellen führen könnte.

Das Differenzierungsverhalten der Stammzellen sollte am Umkehrmikroskop zunächst qualitativ und zudem quantitativ mit Hilfe eines in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Rasters beurteilt werden. Die morphologisch endothelial differenzierten Zellen sollten hinsichtlich der Expression der typischen Marker von Willebrand-Faktor und VE-Cadherin untersucht werden.

Es ist bekannt, dass CD14 positive Zellen (Fernandez et al., 2000) sowie mononukleäre Zellen (MNCs) (Murasawa et al., 2002) sich ebenfalls endothelial differenzieren können. Daher sollte ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit darin bestehen, diese beide Zellenpopulationen mit den ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen bezüglich des Differenzierungsverhaltens miteinander zu vergleichen.

B Einleitung

Das Blutgefäßsystem ist ein Netzwerk aus Arterien und Venen. Durch das Transportieren von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten halten beide Strukturen die Funktion aller Organe im Körper aufrecht. Der Vorgang der Blutgefäßbildung beruht auf zwei wichtigen Prozessen: der Vaskulogenese und der Angiogenese (Rumpold, 2004).

1 Blutgefäßbildung: Vaskulogenese und Angiogenese

1.1 Vaskulogenese

Unter Vaskulogenese versteht man die Bildung von Blutgefäßen durch Endothelvorläuferzellen während der Embryogenese (Carmeliet, 2003). Dabei resultieren die entstandenen Blutgefäße aus der Aggregation von Angioblasten (Rumpold et al., 2004). Larue et al. postulierten, dass es zusätzlich zu diesem Vorgang zur Differenzierung und Integration von zirkulierenden Endothelzellen kommt, und dass beide Mechanismen zur Vaskulogenese in der embryonalen Phase beitragen (Larue et al., 2003).

Asahara et al. kamen zu der Erkenntnis, dass Vaskulogenese auch in der postnatalen Phase vorkommt. Angeregt durch eine Ischämie oder durch eine Blutgefäßschädigung konnten sie zeigen, dass endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut ausgeschwemmt werden (Asahara et al., 1997; 1999). Die Anzahl der mobilisierten Zellen hing stark vom Ausmaß der Schädigung bzw. der Ischämie ab (Takahashi et al., 1999). Der Vorgang der postnatalen Vaskulogenese ließ sich auch in Tiermodellen mit Myokardinfarkten beobachten: das Injizieren von ex-vivo expandierten endothelialen Progenitorzellen führte zu einer ausreichenden Blutversorgung des Herzens und damit zu einer besseren Pumpfunktion (Kocher et al., 2001). Dies konnte zudem für endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark gezeigt werden (Takahashi et al., 1999). Durch Transplantation endothelialer Vorläuferzellen aus embryonalem Blut konnte eine stärkere postnatale Vaskulogenese erreicht werden (Murohara et al., 2000).

Diese Form der Blutgefäßbildung spielt eine wichtige Rolle im Pathomechanismus entzündlicher Krankheitsbilder wie zum Beispiel dem Asthma bronchiale, der Psoriasis oder der rheumatoiden Arthritis (Pousa et al., 2006).

1.2 Angiogenese

Der Begriff Angiogenese beschreibt eine Expansion bereits bestehender Blutgefäße. Dabei kommt es zum Aussprossen von Kapillaren infolge der Migration und Proliferation von Endothelzellen (Folkman et al. 1992, 1995; Young-sup Yoon et al., 2005).

Eingeführt wurde der Begriff Angiogenese 1935 von Hertig im Rahmen der Beschreibung der placentaren Blutversorgung eingeführt (Josko, 2000).

Physiologisch tritt die Angiogenese im Rahmen des Menstruationszyklus der Frau und bei der Wundheilung auf (Rumpold et al., 2004).

Die Angiogenese wird von angiogenen und angiostatischen Faktoren reguliert, die im Gleichgewicht stehen. Die Antwort auf ein angiogenes Signal ist durch eine Veränderung der Endothelzellmorphologie gekennzeichnet. Zunächst nimmt die Anzahl der Zellorganellen wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und Mitochondrien zu. Anschließend wird der Endothelzellkontakt unterbrochen und die Zellen sezernieren proteolytische Enzyme wie Metalloproteinase und Plasmin, welche die Basallamina und die extrazelluläre Matrix auflösen. Die Zellen migrieren ins umliegende Gewebe, wo sie sich röhrenförmig anordnen. Durch Teilung der Endothelzellen an der Grenze zur Basalmembran werden dreidimensionale Netzwerke aufgebaut. Die Bildung einer neuen Basallamina und die Rekrutierung von umgebenden Zellen führen schließlich zur Stabilisierung des Gefäßes (Josko, 2000).

Bei pathologischen Prozessen spielt Angiogenese ebenfalls eine Rolle. So ist für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren eine ausreichende Vaskularisation unabdingbar. In diesem Zusammenhang wird von Tumorangiogenese gesprochen (Coultas et al., 2005). Beim Cervix-Karzinom konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an zirkulierenden Endothelprogenitorzellen proportional zum Oxygenierungsgrad der dysplastischen Zellen steht (Raida et al., 2006).

Die Quantifizierung der Angiogenese am Tumorrand erwies sich als ein aussagekräftiger Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der Angiogenese und der hämatogenen Metastasierung sowie dem Rezidivrisiko gezeigt werden (Choi et al., 1998).

2 Angiogene Faktoren

2.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF) und seine Rezeptoren

VEGF wird von Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert (Josko et al., 2003). Die VEGF-Familie hat sieben Mitglieder: VEGF-A, PlGF (Placenta growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und svVEGF oder snake venom VEGF (Takahashi et al., 2005).

Durch das alternative Spleißen des VEGF-Gens gibt es wiederum neun Isoformen von VEGF-A: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆. Der Mechanismus der Expression durch die verschiedenen Zelltypen ist bisher ungeklärt. VEGF₁₆₅, ein Homodimer von 46kDa Größe, wird am häufigsten exprimiert und ist am besten charakterisiert (Takahashi, 2005): Es wird von den meisten Tumoren, von Zellen des Bindegewebes und im zentralen Nervensystem gebildet (Josko et al., 2003; Hayashi et al., 1997). VEGF₁₆₅ bindet an Heparin, sowie an den Korezeptoren NRP-1 und -2 (Neuropilin-1 und -2). VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ sind mitogen und steigern die vaskuläre Permeabilität. VEGF₁₈₉ wird von den Zellen der extrazellulären Matrix und von perivaskulären Zellen sezerniert und ist ebenfalls heparinbindend. VEGF-A spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese und ist das bislang am besten charakterisierte Molekül. Dieser Faktor bindet mit starker Affinität an VEGFR-1. VEGFR-1, auch als Flt-1 (FMS-like tyrosine kinase-1) bezeichnet, ist ein 180 kDa großer Tyrosin Kinase Rezeptor, der auch mit VEGF-B, PlGF und svVEGF interagiert. Er wird von vaskulären Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert (Olofsson et al., 1999; Hattori et al., 2002). Man findet eine hohe VEGFR-1-Expression in Tumoren, bei der Preeklampsie und in ischämischen Zuständen (Maynard et al., 2003; Toi et al., 2002; Scheufler et al., 2003; Levine et al., 2004). Durch Injektion von Adenoviren, die VEGF-A in Mäusen exprimierten, konnte man die Neubildung von Blutgefäßen durch das Aussprossen von Kapillaren und anderen vaskulären Strukturen beobachten. Innerhalb von wenigen Stunden bildeten die Empfängerzellen VEGF-A und induzierten dann eine Hyperpermeabilität der Blutgefäße. Das proteinhaltige Plasma gelangte in den perivasalen Raum, was zur Fibrinablagerung sowie zur Ödembildung in diesem Kompartiment führte. Parallel dazu konnten eine Wandverdickung der bestehenden Venolen und Kapillaren, eine Abnahme der

Podozytenzahl und damit eine erhöhte Permeabilität beobachtet werden. Im Anschluss kam es zur Bildung zahlreicher Blutgefäße.

VEGF-B wird in zahlreichen Geweben exprimiert, vor allem im Herz und in der Skelettmuskulatur. Die durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen, VEGF-B167 und VEGF-B186 binden an VEGFR-1 und an NRP-1 (Olofsson et al., 1998). VEGF-B spielt eine wichtige Rolle bei Reparaturvorgängen wie bei der entzündlichen Arthritis und schützt zudem das Gehirn vor Ischämie (Mould et al., 2003; Sun et al., 2004).

VEGF-C und -D spielen eine entscheidende Rolle bei der Lymphangiogenese (Karkkainen, 2004) und fördern damit die Metastasierung von Tumorzellen (Stacker, 2001). Sie binden an den Tyrosin Kinase Rezeptor Flt-4, der auch als VEGFR-3 bekannt ist. Dabei handelt es sich um ein 195 kDa großes Molekül, das in dem Prozess der Lymphangiogenese involviert ist. VEGFR-3 schützt die Zellen außerdem vor der Apoptose, dem programmierten Zelltod (Mäkinen et al., 2001). In der embryonalen Phase ist der Rezeptor an der Blutgefäßbildung beteiligt. Experimente, bei denen eine mutierte VEGFR-3-Form von epidermalen Keratinozyten überexprimiert wurde, führten zu einer Vermehrung der Lymphgefäße, wohingegen die Blutgefäße unbeeinflusst blieben (Veikkola et al., 2001). In der löslichen Form verhindert VEGFR-3 die Lymphangiogenese, und führt zusätzlich zur Regression bereits vorhandener Lymphgefäße, was die Ausbildung von Oedemen zur Folge hat (Mäkinen et al., 2001). Chen et al. führten Experimente durch, die auf eine Beteiligung der VEGFR-3 vermittelten Signale an der adaptativen Immunantwort hindeuteten (Chen et al., 2004).

VEGF-E ist ein Sammelbegriff für Proteine, deren kodierendes Gen im Genom vom Parapoxvirus Orf Virus entdeckt wurde (Lyttle et al., 1994). Die VEGF-E-Familie bindet ausschließlich an VEGFR-2 und bewirkt eine Proliferation von Endothelzellen.

svVEGF wurde im Schlangengift entdeckt und steigert den Gifteffekt im Rahmen eines Schlangenbisses.

VEGFR-2, auch als Flk-1/KDR (Fetal liver kinase-1/ kinase insert domain) bezeichnet, ist ein weiterer VEGF-, Tyrosin kinase Rezeptor, mit einer Größe von 200-300kDa, der mit VEGF-A, -E svVEGF sowie mit den prozessierten Formen von VEGF-C und -D Bindungen eingeht (Takahashi et al., 2005). Flk-1/KDR wird von vaskulären und lymphatischen Endothelzellen sowie von Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Katoh et al., 1995). Er dient daher als Marker für Hämangioblasten in der embryonalen Phase (Josko et al., 2003).

Defekte dieses Rezeptors führen zu einer gestörten Bildung von Endothelzellen und zu Defekten in der Hämatopoese (Yamaguchi et al., 1993). Flk-1 Knock-out Mäuse weisen in den frühen Phasen der Vaskulogenese eine verminderte Blutgefäßbildung auf (Shalaby et al., 1995 ; Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Es zeigte sich außerdem, dass die von Flk-1/KDR vermittelten Signale auch die Lymphangiogenese beeinflussen können (Nagy et al., 2002; Hong et al., 2004).

Durch die Bindung an seine Rezeptoren auf den Endothelzellen ist VEGF ein direkter Induktor der Tumorangiogenese in-vivo und in-vitro. Er bewirkt die Zellproliferation und steigert die vaskuläre Permeabilität im Vergleich zu Histamin 50.000-fach (Josko et al., 2003). VEGF fördert die Tumorangiogenese und somit die Tumorprogression sowie die Metastasenbildung, denn bei Sauerstoffmangel produzieren die Tumorzellen VEGF. Die darauffolgende Angiogenese führt zur Zellteilung und Migration. Durch das Diffundieren von Plasminogen und Fibrinogen in den extravasalen Raum wird die Wanderung der endothelialen Zellen gefördert, die Anschluß an andere Blutgefäße gewinnen. Dadurch können sich Tumorzellen ausbreiten, wie es am Beispiel des Lungenkarzinoms von Claffey et al. beschrieben wurde, die einen Zusammenhang zwischen Metastasierung und VEGF-Sekretion sowie Ausbildung des Flk-1/KDR-Rezeptors feststellten (Claffey et al., 1996). Die Therapie bei VEGF-abhängigen Tumoren beruht neben der Chemo- und Radiotherapie auf der Verwendung von Antikörpern, die gegen VEGF gerichtet sind. Ihr Einsatz zeigte Erfolg bei der Behandlung von Gliomen, Myosarkomen (Kim et al., 1993) und bei infantilen vaskulären Tumoren (White et al., 1991) gezeigt haben. Ein immunogenes VEGF-Derivat, murine keyhole limpet hemocyanin -VEGF, auch als mVEGF kinoid bezeichnet, bewirkte bei Mäusen mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom des CT26-Zelltyps eine signifikante Abnahme der Metastasenzahl und -größe in der Lunge (Rad et al., 2007).

In Tiermodellen wurde unter Sauerstoffmangel eine gesteigerte VEGF-gesteuerte Angiogenese sowie eine Vermehrung der VEGF- Rezeptoren beschrieben. Außerdem führte VEGF zu einer Permeabilität der pulmonalen Kapillaren, was einen erhöhten Sauerstoff-, bzw. Kohlendioxidaustausch zufolge hatte (Christou et al., 1998). Das intramyokardiale Injizieren von pCK-VEGF165 führte zu einer Zunahme der Neoangiogenese in den ischämischen Arealen und zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion und Perfusion (Choi et al., 2006). Im Rahmen der pAVK

(periphere arterielle Verschlusskrankheit) brachten Makin et al die Hyperkoagulabilität und die Angiogenese in Verbindung mit hohen Tissue Factor- (T.F) und VEGFspiegeln (Makin et al., 2003). Im Augapfel induziert VEGF Neovaskularisierung und führt zur Erblindung, was bei der diabetischen Retinopathie sowie bei der retinalen Ischämie beobachtet werden kann (Josko et al., 2003). VEGF ist auch an der Entstehung von Hirnödemen beteiligt, der genaue Pathomechanismus konnte bislang jedoch nicht aufgeklärt werden. In Tiermodellen zeigte sich drei Stunden nach einer hypoxischen Episode eine vermehrte VEGF-Sekretion, welche ihren Höhepunkt zwei Tage später erreichte. Drei Tage nach der hypoxischen Episode erhöhte sich zudem die Anzahl an Flt-1-Rezeptoren (Xu et al., 1998).

2.2 Die Angiopoietine und ihre Rezeptoren

Die Familie der Angiopoietine stellt eine weitere Form von Wachstumsfaktoren, die wie die VEGF-Familie für das vaskuläre Endothel wichtig ist (Davis et al. 1996; Suri et al. 1996; Maisonpierre et al. 1997; Valenzuela et al. 1999). Es wurden bisher vier Mitglieder entdeckt: Angiopoietin-1 (Ang-1), Angiopoietin-2 (Ang-2), Angiopoietin-3 (Ang-3) und Angiopoietin-4 (Ang-4). Die beiden ersten Mitglieder dieser Familie wurden ausführlicher charakterisiert als die anderen. Sie binden an den Tyrosinkinase-Rezeptor Tie2 und modulieren je nach gebundenem Faktor ein aktivierendes oder ein reprimierendes Signal (Gale et al. 1999).

2.2.1 Angiopoietin-1 (Ang-1)

Ang-1 wirkt in der späteren Phase der Blutgefäßneubildung (Gale et al. 1999). Durch die Untersuchung von Mäusen, bei denen Tie1 und Tie2 fehlten, zeigten Dumont et al. 1994 die wichtige Rolle bei der embryonalen Blutgefäßbildung. Bei fehlendem Tie2-Rezeptor trat der Tod zwischen Tag 9,5 und Tag 10,5 der embryonalen Phase auf. Die Mäuse, denen der Tie1-Rezeptor fehlte, starben erst am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung. Während sich bei fehlendem VEGF-Rezeptor die damit verbundenen Defekte frühzeitig zeigen, war es bei Tie1- oder Tie2-Mangel anders: Die später auftretenden Defekte betrafen vor allem die vaskulären Reparaturvorgänge und die Integrität der Blutgefäße. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Tie-Rezeptoren bzw. die Angiopoietine ihre Wirkung zu einem späteren Zeitpunkt der

Gefäßentwicklung als die Mitglieder der VEGF-Familie entfalten (Dumont et al. 1994; Puri et al. 1995; Sato et al. 1995)

Die Deletion der für Ang-1 kodierenden Sequenz bei Mäusen führte zum Tod der Tiere während der Embryonalentwicklung, genauso wie der Mangel an Tie-Rezeptoren (Suri et al. 1996).

Suri et al. führten Experimente bei Ang-1-Knock-out Mäusen durch. Sie zeigten, dass der Mangel an Angiopoietin unter anderem in einem missgebildeten, hypotrophen Herzen resultierte. Die Sektion von Ang-1^{-/-} Mäusen zeigte ein rudimentäres Myokard mit fehlender Trabekelausbildung. Die endothelialen Strukturen beschränkten sich auf die Ventrikellinnenseite. Außerdem wurde ein kollabiertes Endokard beschrieben, das sich vom Myokard abhob. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass Ang-1 die Interaktionen zwischen Myo- und Endokard moduliert und zu deren Entwicklung beiträgt. Die Abwesenheit dieses Zytokins führte zu Defekten und bedingt durch die ineffiziente Pumpfunktion letztendlich zum Tod. Elektronenmikroskopisch ließen sich auch Defekte des Aufbaus der vaskulären Strukturen bei den Ang-1^{-/-}-Mäusen feststellen: die periendotheliale Zellen waren eher abgerundet und nur in geringer Zahl vorhanden. Zudem waren die Kollagenfasern strukturlos verteilt.

Um Ang-1 näher zu charakterisieren untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe die Folgen einer Überexpression dieses Faktors. Dabei zeigte sich eine drastische Erhöhung der Blutgefäßzahl und -größe (Suri et al., 1998).

In Tiermodellen zeigte sich, dass die alleinige Überexpression von VEGF in der Haut zu einer Erhöhung der Anzahl an Blutgefäßen führte. Es entwickelte sich außerdem eine chronische Dermatitis mit einer begleitenden Hyperpermeabilität der Gefäße und Leukotaxis (Detmar et al. 1998). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass VEGF allein nicht ausreichend war, um die physiologische Entwicklung von Blutgefäßen zu induzieren. Mittlerweile ist bekannt, dass VEGF und Ang-1 synergistisch und koordiniert auf die Gefäße wirken (Carmeliet et al. 1996; Suri et al. 1996; Maisonpierre et al. 1997). In den früheren Phasen der Vaskulogenese sichert VEGF die physiologische Entwicklung der Blutgefäße, während Ang-1 später für das Erhalten und die Reifung dieser Strukturen zuständig ist (Suri et al. 1998). Im Rahmen einer therapeutischen Beeinflussung der Angiogenese könnten die Signale beider Zytokine durch sorgfältiges Dosieren so gesteuert werden, dass neben einer Erhöhung der Blutgefäßzahl auch eine physiologische Entwicklung dieser Strukturen erreicht wird.

2.2.2 Angiopoietin-2 (Ang-2)

Ang-2 zeigt eine ausgeprägte Homologie zu Ang-1. Ang-2 bindet ausschließlich an Tie2, und verfügt ebenso wie Ang-1 über eine starke Affinität zu diesem Rezeptor (Maisonpierre et al., 1997). Dieser Faktor wird in Körperregionen, in denen vaskuläre Reparaturvorgänge durchgeführt werden, stark exprimiert. Dies ist unter anderem der Fall in den weiblichen Fortpflanzungsorganen (Maisonpierre et al., 1997). Es wurden auch Experimente beschrieben, bei denen eine Gefäßregression in reinem Ang-2-haltigen Kulturmedien zu beobachten war (Gale et al., 1999; Goede et al., 1998; Stratmann et al., 1998; Zagzag et al., 1999). Im Gegensatz dazu beobachtet man bei Zusatz von VEGF vermehrt angiogene Vorgänge. Unter bestimmten Bedingungen, die bisher nicht näher definiert wurden, kann dieser Faktor die Tie2-Signaltransduktion sowohl inhibieren als auch aktivieren (Veikkola et al., 2002; Gale et al., 2002; Maisonpierre et al., 1997). Die blockierende Wirkung von Ang-2 erklärt sich zum Teil dadurch, dass es im Gegensatz zu Ang-1 keine Phosphorylierung von Tie2 bewirkt. Diese Tatsache wird außerdem dadurch untermauert, dass eine transgene Ang-2-Expression im embryonalen Endothel ähnliche Defekte wie eine Deletion von Tie2 hervorruft (Maisonpierre et al., 1997). Ang-2 trägt zur Destabilisierung von Blutgefäßen bei, indem es mit der Ang-1-Tie2-Signalkette interferiert. Außerdem bewirkt Ang-2 eine Störung der Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten (Holash et al., 1999). Andererseits entfaltet Ang-2 eine Ang-1-ähnliche Wirkung auf einige Zelltypen (Davis et al., 1996; Maisonpierre et al., 1997; Gale et al., 2002; Mochizuki et al., 2002; Teichert-Kuliszewska et al., 2001). Bei NIH-3T3-Fibroblasten bewirkte Ang-2 die Phosphorylierung von Tie2 (Maisonpierre et al., 1997). Ang-2 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Bildung von lymphatischen Gefäßen (Gale et al., 2002; Veikkola et al., 2002). Durch Verabreichen von Ang-1- an Ang-2-/-Mäuse wird die Lymphangiogenese aufrechterhalten, während die bei den Blutgefäßen hervorgerufenen Defekte fortbestehen (Gale et al., 2002; Veikkola et al., 2002).

2.2.3 Angiopoietin 3 (Ang-3)

Ang-3 ist ein disulfidkettenhaltiges Dimer, dessen Molekulargröße bei circa 68kDa liegt (Valenzuela et al., 1999; Lee et al., 2004). Dieser Faktor bindet genauso wie alle anderen Mitglieder der Angiopoietin-Familie an Tie2. Ang-3 hemmt dabei die Phosphorylierung von Tie2 (Lee et al., 2004; Maisonpierre et al., 1997; Valenzuela et al., 1999; Xu et al., 2004) und stellt sich somit als ein natürlicher Ang-1-Antagonist dar. Eine starke Expression dieses Faktors wird durch Hypoxie in folgenden Geweben induziert: Lunge, Leber, Kleinhirn und Herz (Lee et al., 2004). Die Überexpression von Ang-3 bewirkt eine Hemmung der Metastasierung von Krebszellen beim Lewis Lungenkarzinom (LLC) und beim TA3 Mammakarzinom (TA3-MaCa) bedingt durch einen antiangiogenen Effekt und Apoptoseinduktion in den Tumorzellen (Xu et al., 2004). In serumfreien Medien sowie unter niedrigen Serumkonzentrationen hemmt Ang-3 die unter anderem auch von VEGF hervorgerufene Endothelzellenproliferation (Xu et al., 2004).

2.2.4 Angiopoietin-4 (Ang-4)

Mit einer Molekulargröße von 72kDa ist Ang-4 ein größeres disulfidkettenhaltiges Dimer als Ang-3 und bindet auch an Tie2. In vitro und in VEGF- und bFGF-haltigen Medien bewirkt Ang-4 eine Phosphorylierung von Tie2 und besitzt dadurch eine agonistische Wirkung (Valenzuela et al., 1999). Man beobachtet eine starke Expression von Ang-4 durch Krebszellen beim humanen colorektalen Carcinom und beim humanen Adenocarcinom des Magens (Nakayama et al., 2004; 2005). Unter Sauerstoffmangel, sowie unter der Wirkung von endothelialen Wachstumsfaktoren (unter anderem VEGF und bFGF) ließ sich sowohl bei Endothelzellen als auch beim humanen Glioblastom eine hohe Ang-4-Konzentration induzieren (Gerritsen et al., 2003; Lee et al., 2004; Lund et al., 2004; Yamakawa et al., 2003). In vitro durchgeführte Versuche zeigten den angiogenen Effekt von Ang-4 im Cornea assay bei Mäusen, sowie eine vermehrte Migration von HUVECS (Lee et al., 2004; Olsen et al., 2006). In vivo durchgeführte Versuche zeigten dagegen einen hemmenden Effekt von Ang-4 auf VEGF und bFGF. Die Transfektion von malignen Zellen mit Ang-4 hat keinen Einfluss auf das Tumorwachstum (Olsen et al., 2006).

2.3 Andere angiogene Faktoren

Die Fibroblast Growth Factors (FGF) bewirken die Proliferation, Migration und Differenzierung von endothelialen Zellen *in vitro* und *in vivo* (Bikfalvi et al., 1997). Diese Zytokine werden außerdem von glatten Muskelzellen und Myoblasten exprimiert und wirken synergistisch mit VEGF (Losordo et al., 2004).

Endothelial Growth Factor (EGF) ist ein 6kDa großes Polypeptid, welches sich durch seine zahlreiche biologische Effekte auszeichnet. Eine Eigenschaft dieses Faktors ist seine starke Mitogenität, die zur Proliferation verschiedener Zelltypen führt, darunter auch von humanen Endothelzellen (Ushiro et al., 1996).

Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist ein Polypeptid, das in seiner Struktur den Enzymen der Koagulationskaskade ähnlich ist. Dieser Faktor entfaltet seine Wirkung durch Bindung an die transmembranöse Tyrosinkinase c-met (Merkulova-Rainon et al., 2003). HGF führt bei Keratinozyten zur vermehrten VEGF-Expression, und spielt damit eine wichtige Rolle beim Prozess der Wundheilung. In Endothelzellen induziert dieser Faktor die Expression des VEGF-Rezeptors KDR und die Bildung von kapillar-ähnlichen Strukturen *in-vivo* (Wojta et al., 1999). Bei der diabetischen Retinopathie bewirkt HGF die Proliferation und die Migration der retinalen Endothelzellen (Cai et al., 2000). Eine starke HGF-Expression wird in lymphatischen Endothelzellen und lymphatischen Gefäßen im Bereich von entzündeten Hautarealen beobachtet beteiligt sich auch am Prozess der lymphogenen Metastasierung (Cao et al., 2006; Kajiya et al., 2005).

Insulin like Growth Factor-1(IGF-1) ist auch an der Angiogenese beteiligt (Chisalita et al., 2006; Kanemitsu et al., 2006; Lopez-Lopez et al., 2004). Während der Embryogenese moduliert dieser Faktor die Vaskulogenese im Gehirn (Hellstrom et al., 2002; Lopez-Lopez et al., 2004). IGF-1 beteiligt sich außerdem an der retinalen Neovaskularisation (Lopez-Lopez et al., 2004; Smith et al., 1999). IGF-1 ist ein Promotor der Lymphangiogenese, denn *in vitro* wird eine gesteigerte Proliferation und Migration lymphatischer Endothelzellen beobachtet (Bjorndahl et al., 2005) Beim Krankheitsbild der ischämischen Kardiomyopathie bei Ratten unterstützte IGF-1 die Myoblastentransplantation und führte zu deren Volumenzunahme (Kanemitsu et al., 2006).

Interleukin 8 (IL-8), auch als CXCL8 bekannt, zeichnet sich durch seine vielfältigen Effekte aus. IL-8 ist ein Angiogenese induzierendes Zytokin (Li et al., 2002; Li et al., 2003; Luppi et al., 2006). Dieser Faktor wird von Endothelzellen exprimiert (Koch et al., 1992; McCord et al., 2006) und bewirkt deren Proliferation (Koch et al., 1992; Li et al., 2002; Li et al., 2003). Bei durch *Bartonella henselae* hervorgerufenen Infektionen wird eine starke IL-8-Expression beobachtet, die in einer Blutgefäßvermehrung resultiert (McCord et al., 2006). Auch in der Rattenhornhaut stellt dieser Faktor einen potenten Modulator der Angiogenese dar (Koch et al., 1992). IL-8 wirkt bei HUVECS sowohl chemotaktisch als auch proliferativ. Auch in der Rattenhornhaut stellt dieser Faktor einen potenten Modulator der Angiogenese dar. IL-8 ist unter anderem für die Aktivierung und die Wanderung von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Immunantwort verantwortlich (Koch et al., 1992; Luppi et al., 2006), und wird außerdem von Monozyten exprimiert (Koch et al., 1992). IL-8 ist in der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen involviert, die mit einer persistierenden Angiogenese einhergehen, wie zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis (Koch et al., 1992; Cho et al., 2007). Beim Bronchialkarzinom wird IL-8 von den malignen Zellen exprimiert (Smith et al., 1994; Luppi et al., 2006). Durch seinen angiogenen Effekt begünstigt IL-8 das Tumorwachstum (Koch et al., 1992; Smith et al., 1994; Luppi et al., 2006).

3 Endothelzellen und ihre Vorläufer

3.1 Endothelzellen

Der Begriff Endothel beschreibt die einschichtige Auskleidung von Gefäßen und Hohlorganen und wird von Plattenepithelzellen gebildet: die Endothelzellen (Reuter, 2004). Sie sind bis zu 50µm lang, 10-15 µm breit und über Zonulae occludentes und einzelne Gap junctions verbunden (Welsch, 2005). Die Umrissform der Endothelzellen ist oval bis polygonal. Die Längsachse der Endothelzellen verläuft in der Längsachse der Kapillare. Das Gleiche gilt für den länglichen Zellkern, in dessen Bereich sich die Endothelzelle ins Kapillarlumen vorwölbt. In der Peripherie nehmen sie eine andere Form an: sie können ausserordentlich dünn ausgezogen sein (Dicke weniger als 100nm), während sie im Bereich des Zellkerns einige Mikrometer dick sind (Junqueira, Carneiro, 2004).

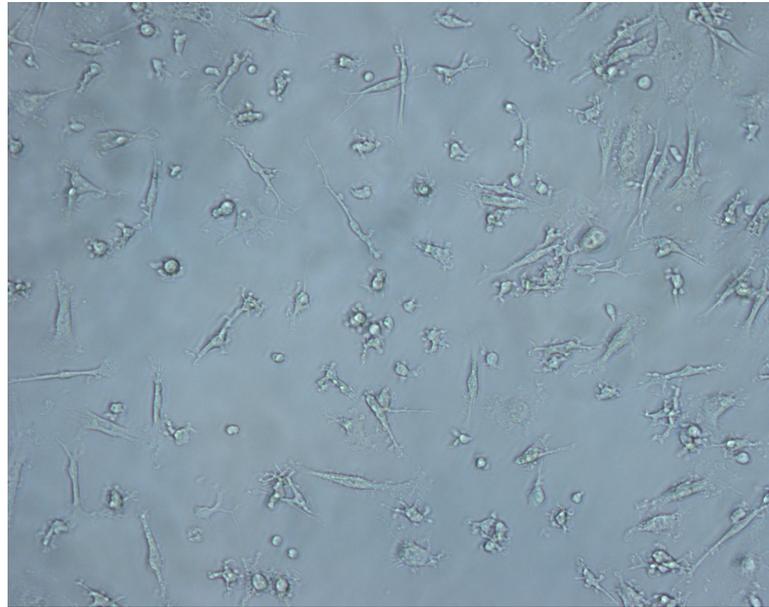


Abbildung1 : Aufnahme von Endothelzellen (10 x Vergrößerung). Endothelzellen mit ihrer typischen, spindelartigen Morphologie. Die Zellen sind außerordentlich ausgezogen, und nehmen perinukleär an Dicke zu.

Im Zellinneren der Endothelzellen befinden sich die Zellorganellen wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum sowie Ribosomen. Desweiteren finden sich auch Intermediärfilamente, auch als stress fibers bezeichnet, sowie Aktinfilamente, die den Zellen Kontraktilität verleihen sollen. Außerdem kommen Weibel-Palade-Körper, längliche Granula mit Binnenstrukturen, vor (Junqueira, Carneiro, 2004; Welsch, 2005). Die Weibel-Palade-Körper enthalten den von-Willebrand-Faktor (vWF), der von allen Endothelzellen gebildet wird (Welsch, 2005). vWF, das als Transportprotein vom Faktor VIII einen wichtigen Platz in der Gerinnungskaskade einnimmt, ist als typischer Endothelzellmarker aufzufassen (Ingram et al., 2004). Weitere Endothelzellmarker sind: Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin), Angiotensin-Converting Enzyme (ACE), CD32, CD34, CD102, CD105 (auch als Endoglin bezeichnet), CD 36 (auch als Thrombospondinrezeptor bezeichnet) und acetylated LDL-Uptake bzw. als Type I scavenger receptor bekannt (Garlanda and Dejana, 1997). Weitere auf Endothelzellen exprimierte Zellenoberflächenmoleküle sind flk-1, Tie-1 und Tie-2 (Ingram et al., 2004).

Durch das Exprimieren angiogener Zytokine vermögen Tumorzellen benachbarte Endothelzellen zum Proliferieren und zum Migrieren anzuregen. Dabei können die Zellen zur Tumorangiogenese beitragen (Folkman J.,1987; Pepper et al.,1997). Bei diesen Vorgängen ist VEGF für die fenestrierten Strukturen der Kapillaren sowie für deren erhöhte Permeabilität verantwortlich (Dvorak et al., 1995; Roberts et al.,1995).

Endothelzellen können maligne entarten. Angiosarkome haben eine endotheliale Herkunft (Arbiser et al., 2000). Das Gleiche gilt für Kaposi Sarkome (Uccini et al., 1994). Es wurde zudem postuliert, dass Endothelzellen für das Entstehen der sogenannten hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie, auch als Rendu-Osler-Weber-Syndrom bekannt, verantwortlich sind (McAllister et al.,1994; Johnson et al.,1996).

Endotheliale Zellen sind auch in thrombotischen Prozessen involviert. Chen et al. beschrieben, dass die Aktivierung von Endothelzellen durch Antiphospholipidantikörper einen möglichen Triggermechanismus des Antiphospholipidsyndroms darstellen könnte (Chen et al., 2006).

Rajashekhar et al. zeigten, dass in Rahmen von chronischen Entzündungen, die durch TNF alpha getriggert werden, die Angiogenese in vivo und in vitro gefördert werden kann. Dies spricht dafür, daß durch die Aktivierung endothelialer Zellen eine Verbindung zwischen Entzündung und Angiogenese besteht (Rajashekhar et al., 2006).

3.2 Endothelvorläuferzellen

Zahlreiche Arbeitsgruppen beschrieben, dass endotheliale Progenitorzellen (EPCs) aus adultem peripherem Blut sowie aus Nabelschnurblut isoliert werden können (Asahara et al., 1997; Shi et al., 1998; Lin et al., 2000; Gulati et al., 2003; Hristov et al., 2003; Rafii et al., 2003; Bompais et al., 2004; Hur et al., 2004). Shintani et al. isolierten EPCs aus mononukleären Zellen (MNCs), die aus dem Knochenmark stammten (Shintani et al., 2001). Außer den EPCs können sich weitere Zellenpopulationen möglicherweise endothelial differenzieren: zum Beispiel multipotente adulte Progenitorzellen (Luttun et al., 2002; Reyes et al., 2002). In der embryonalen Phase haben ECs und Blutzellen einen gemeinsamen Vorläufer: den Hämangioblasten (Mikkola et al., 2002). Der embryonale Hämangioblast ist definiert durch die Expression von VEGFR-2 und SCL (Choi et al., 1998; Faloon et al., 2000; Chung et al., 2002). Gunsilius et al. beschrieben das Vorkommen des adulten Hemangioblasten. Sie kultivierten Knochenmarkzellen von

Patienten mit CML (Chronisch Myeloische Leukämie), die das BCR/ABL-Gen besitzen: die differenzierten Endothelzellen und hämatopoietischen Zellen waren für das Philadelphia-Chromosom positiv (Gunsilius et al., 2000). Endotheliale und hämatopoietische Stammzellen sowie deren Nachkommenschaft besitzen ähnliche Oberflächenmarker, reagieren auf ähnliche Signalen und beeinflussen sich gegenseitig (Carmeliet, 2003). Der adulte Hämangioblast ist charakterisiert durch die Expression von CD34 und VEGFR-2 (Pelosi et al., 2002). Loges et al. führten eine Studie durch, in der das hämangioblastische Potential der CD133 positiven Zellen hervorgehoben wurde: diese Zellen können sich sowohl in endotheliale als auch in hämatopoietische Zellen differenzieren. Sie entwickelten ein Kulturmedium für diese Zellen, das als Wachstumsfaktoren VEGF, Stem Cell Growth Factor (SCGF) und Flt-3 Ligand enthielt. Die somit expandierten Zellen wurden mit einem Vektor transduziert, der das Gen für das grün fluoreszierende Protein – das sogenannte Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) – trug. Die Zellen wurden in Differenzierungsmilieus eingebracht, die entweder Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) oder SCGF und VEGF enthielten. Es entstanden neutrophile Granulozyten oder endotheliale Zellen aus einer Ursprungszelle (Loges et al., 2004).

Das Oberflächenantigen CD133, auch als AC133 oder human prominin-1 bekannt, wird von HSCs (Hämatopoietische Stammzellen) aber nicht von reifen Endothelzellen und Monozyten exprimiert (Handgretinger et al., 2003). Shmelkov et al. fanden heraus, dass aus der fötalen Leber isolierte CD133 positive Zellen sich sowohl in Endothelzellen als auch in Kardiomyozyten differenzieren können. Sie zeigten, dass dieser Prozess der Co-differenzierung von VEGF und Brain-Derived Nerve Growth Factor (BDNF) unterstützt wurde (Shmelkov et al., 2005). Gehling et al. kamen zu dem Erkenntnis, dass die CD133 positiven Zellen, die das Oberflächenantigen CD34 coexprimieren endotheliale Progenitoren sind (Gehling et al., 2000). Peichev et al. fügten hinzu, dass diese Zellen auch VEGFR-2 exprimieren (Peichev et al., 2000). Die CD34 oder CD133 Progenitorzellen machen 0,02% bis 0,1% der MNCs aus (Romagnani et al., 2005).

Auch die humanen CD14 positiven, monozytären MNCs können sich endothelial differenzieren. Fernandez et al isolierten und kultivierten CD14 positive Zellen unter dem Einfluss von angiogenen Faktoren. Innerhalb von vierundzwanzig Stunden wurden die Zellen adhärent und nahmen die für Endothelzellen typische spindelförmige Gestalt an. Nach einer Woche exprimierten sie typische Endothelzellmarker wie vWF, CD144,

flt-1, VEGFR-1 und -2. Elektronenmikroskopisch konnten Strukturen, die den Weibel-Palade-Körperchen ähneln, identifiziert werden. Außerdem bildeten die Zellen Netzwerkstrukturen beim Kultivieren in dreidimensionalem Fibrin-Gel (Fernandez et al., 2000). Die EPCs aus dem peripheren Blut sind größtenteils Zellen, die CD14 und CD34 zusammen exprimieren (Rogmanani et al., 2006). Mittels FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) konnten Rehman et al. aus Buffy Coats isolierte EPCs charakterisieren: Der größte Teil der Zellen exprimierte CD14, den panleukozytären Marker CD45 und den endothelialen Marker CD31. Endotheliale und Stammzellenmarker wurden von wenigen Zellen exprimiert (Rehman et al., 2003).

HSCs und Leukozyten fördern die Blutgefäßneubildung einerseits durch Freisetzung von angiogenen Faktoren und andererseits durch direkte Transdifferenzierung in endotheliale Zellen (Takakura et al., 2000; Gerber et al., 2002; Hattori et al., 2002). Eine einheitliche Definition der EPCs erweist sich als schwierig. Es gibt den Begriff der early-EPCs oder endothelial-like cells (ELCs), die endotheliale und monozytäre Marker coexprimieren. Sie entstehen nach kurzzeitiger Kultur von MNCs. Die Expansion in short-term assays der auch als short-term EPCs bezeichneten Zellen erfolgte lediglich unter Transfizieren mit humaner hTert cDNA (Murasawa et al., 2002). Daneben gibt es die so genannten Outgrowth-Endothelial-Cells (OECs) oder late-EPC, die von mononukleären Zellen abstammen und in Kultur eine pflastersteinartige Morphologie annehmen. Die aus dem peripheren Blut entnommenen mononukleären Zellen durchliefen 20 bis 30 Passagen, die aus dem Knochenmark entnommenen sogar bis zu 100 Passagen (Gulati et al., 2003; Ingram et al., 2004). Sie exprimierten ausschließlich die endothelialen Antigene CD31, CD34, VEGFR-2 und VE-Cadherin (Rumpold et al., 2004).

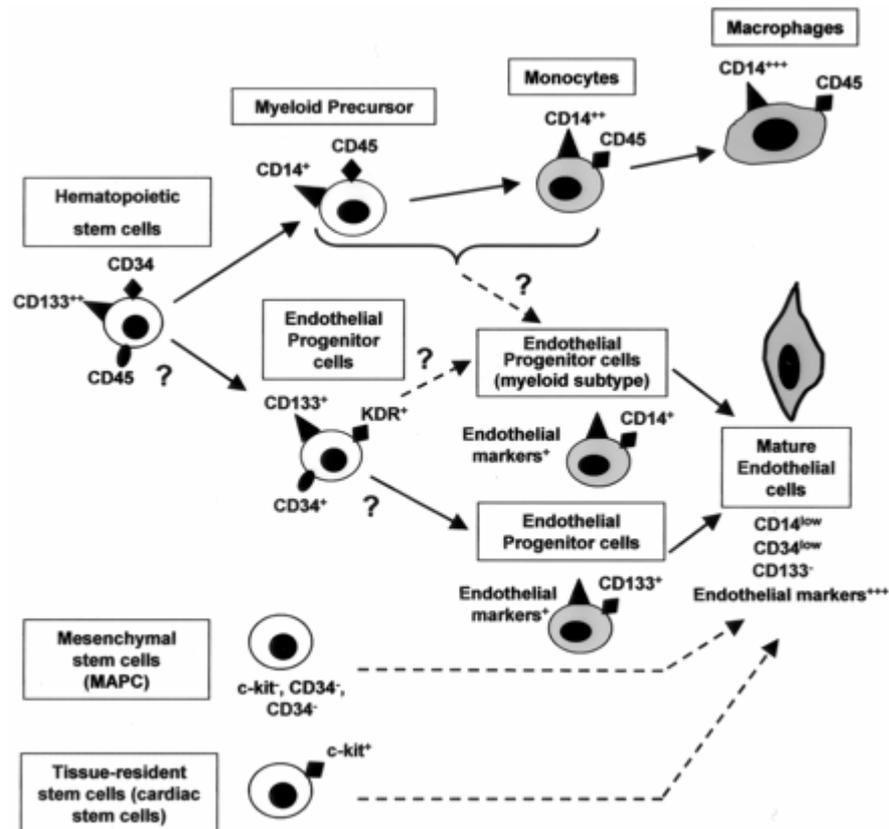


Abbildung 2: Die diversen Zellpopulationen, aus denen EPCs isoliert werden können. HSZs, Mesenchymale Stammzellen und gewebespezifische Stammzellen vermögen sich endothelial zu differenzieren. Abbildung nach Urbich und Dimmeler, 2004.

EPCs können in pathologischen Zuständen eingesetzt werden, um das Blutgefäßwachstum zu fördern (Asahara et al., 2002; Lutun et al., 2002; Rafii et al., 2002). Endothelzellen und glatte Muskelzellen können in Areale mit Gefäßschädigung wandern und die Neovaskulogenese induzieren. EPCs und Progenitorzellen für glatte Muskelzellen stellen eine Biomaterialquelle für die Therapie vaskulärer Schädigung dar (Le Riscousse-Roussanne S. et al., 2004). Endothelzellen, die in ischämischen Linksherzen von Ratten transplantiert wurden, führten über die Bildung von vaskulären Netzwerken zur Verbesserung der ventrikulären Funktion sowie zur Regeneration der Muskulatur (Ott Ilka et al., 2005). Bei Sauerstoffmangel werden EPCs vermehrt aus dem Knochenmark mobilisiert und gelangen über das periphere Blut in Areale mit Blutgefäßschädigung. Somit erklärt sich der Beitrag der EPCs zur Wundheilung bei Diabetikern (Gallagher K.A. et al., 2006). Die Implantation von EPCs in die fibrosierte Leber von Ratten führte nicht nur zum Rückgang der intrahepatischen Umbauvorgänge sondern auch zur Regeneration von gesundem Gewebe (Ueno T. et al., 2006). In Tiermodellen mit ischämischen Extremitäten wurden MNCs direkt in das betroffene

Gewebe transplantiert: es führte zu einer Abnahme der Gewebeschädigung und einer Zunahme der Dichte vaskulärer Netzwerke. MNCs stellen ebenfalls eine Quelle für therapeutische Einsätze bei ischämischen Erkrankungen dar (Moon M. H. et al., 2006).

4 Ziele dieser Arbeit

Eine nicht unbedeutende Fraktion der Bevölkerung leidet unter ischämischen Erkrankungen wie koronare Herzerkrankungen (KHK) oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK). Die Sicherstellung einer optimalen Durchblutung könnte diese Krankheitsbilder heilen oder zumindest die Symptomatik soweit lindern, dass ein Gewinn an Lebensqualität und –erwartung zu erzielen wäre. Eine Therapiemöglichkeit stellt die Verabreichung von Endothelzellen dar. Durch die autologe Transplantation von Endothelzellen könnten außerdem die heterologe Transplantation begleitenden immunologischen Reaktionen verhindert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde beschrieben, dass CD133 positive, hämatopoetische Stammzellen sich endothelial ausdifferenzieren können. Die ex-vivo expandierten Stammzellen wurden mit einem VEGF-haltigen Medium differenziert. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die ex-vivo expandierten CD133 positiven, hämatopoietischen Stammzellen so endothelial auszudifferenzieren, dass eine möglichst hohe Ausbeute an Endothelzellen erreicht werden konnte. Dazu sollten diese Zellen immunmagnetisch aus sogenannten Leukapheresaten isoliert werden. Nachdem die Stammzellen expandiert wurden, sollten sie in den verschiedenen Differenzierungsmedien eingebracht werden. Durch den Einsatz verschiedener angiogener Faktoren wie VEGF, Ang-1 und Ang-2 sollte ein Differenzierungsmedium hergestellt werden, das eine möglichst hohe Differenzierungsrate mit sich bringt. Die Differenzierungsrate sollte quantifiziert werden. Außerdem sollten die differenzierten Zellen immunhistochemisch durch die typischen Endothelzellmarker vWF und CD144 charakterisiert werden.

Das anhand der Quantifizierung und der Charakterisierung der differenzierten Zellen als beste eingestufte Differenzierungsmedium sollte auf zweierlei Weise optimiert werden: durch das sequentielle Zufügen der angiogenen Faktoren, sowie durch Erhöhung des Serumgehaltes im Medium.

In unserer Arbeitsgruppe werden die Zellen größtenteils in Zellkulturgefäße mit Kunststoff-Boden ausgesät. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die Bodenbeschaffenheit des Kulturbedältnisses das Differenzierungsverhalten der

hämatopoietischen Stammzellen beeinflusst. Dazu sollte ein Teil der Zellen auf glashaltigen Böden ausplattiert werden.

Eine weitere Möglichkeit die Differenzierungsrate der hämatopoietischen Stammzellen zu erhöhen, könnte durch Ausdifferenzierung von in den Medienüberständen enthaltenen morphologisch undifferenzierten Zellen erreicht werden. Es sollte durch Wiederausplattieren dieser Zellen die Frage beantwortet werden, ob nicht adhärente Zellen sich endothelial differenzieren würden.

Andere Quellen für Endothelzellen stellen die CD14 positiven, monozytären Stammzellen (Fernandez et al., 2000) und die MNCs (Murasawa et al., 2002) dar. Sie sollten aus Leukapheresaten, aus Buffy Coats und aus dem Knochenmark isoliert werden. Die Untersuchungen sollten sich auf das Quantifizieren der entstehenden Endothelzellen und dessen immunhistochemische Charakterisierung beschränken. Alle drei Zelltypen und die frisch isolierten hämatopoietischen Stammzellen sollten bezüglich des Differenzierungsverhaltens miteinander verglichen werden.

C Material und Methoden

1 Material

1.1 Laborgeräte

Tab. 1 : Verwendete Laborgeräte

Bezugsquelle	Herstellerbezeichnung	Gerät
Brand, Wertheim	Neubauer-Zählkammer	Zählkammer
Eppendorf, Hamburg	Reference 10, 100 und 1000	Pipetten
Forma Scientific, Marietta (USA)	Water-Jacketed Incubator	Brutschrank
Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel	GFL Wasserbad	Wasserbad
Heraeus Instruments, Hanau	Lamin Air HB 2448	Sterile Werkbank
	Varifuge 3.2 RS	Zentrifuge
Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn	Pipetus-akku	Pipettierhilfe
Leica, Solms	LEICA DM IRB mit IM50-Software	Fluoreszenz-Umkehrmikroskop
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	VarioMACS	Immunmagnetisches Zellseparationsgerät
Shandon, Frankfurt	Cytospin 2	Zytozentrifuge
Zeiss, Jena	Axioplan	Fluoreszenz-Umkehrmikroskop
	Axiovert 25	Umkehrmikroskop/ Fluoreszenz-Umkehrmikroskop
	Phomi 3	Mikroskop

1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab .2 : Verbrauchsmaterialien

Bezugsquelle	Verbrauchsmaterial
Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)	Discardit II Sterile Spritzen; 5, 10 und 20 ml
BD Falcon, Heidelberg	Sterile Einweg-Pipetten; 1, 2, 5, 10 und 25 ml
	Zellkultur-Lochplatten; Multiwell 6, 12, 24 oder 96 Well
	Zellsiebe 40µm
	Zentrifugenröhrchen; 15 und 50 mL
Greiner, Frickenhausen	Röhrchen: 15 und 50 mL
Eppendorf, Hamburg	Reaktionsgefäße; 0,5 und 1,5 und 2,0 mL
Heinz Herenz, Hamburg	Pasteurpipetten 230 mm, Glas
Millipore, Schwalbach	Steriflip (Einweg-Sterilisationseinheit)
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	MACS Separation Columns LS und MS
Partec, Münster	30 µm Zellsiebe
Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen	Deckgläser
	Objektträger
Sarstedt, Nümbrecht	Pipettenspitzen (10, 100 und 1000 µl)
Schott, Mainz	Glaswaren
Shandon Inc., Pittsburgh (USA)	Papierfilter für die Cytospin 2 (5991022 Filter Cards Thick)
VWR International, Dietikon (Schweiz)	Sterile Syringe Filter 0,45 und 0,22 µm (Sterile Spritzenfilter)

1.3 Chemikalien und Medizinprodukte

Tab. 3 : Verwendete Chemikalien und Medizinprodukte

Bezugsquelle	Chemikalie/Medizinprodukt
Baxter, München	ACD-A
Biochrom AG, Berlin	Biocoll Separating Solution (Ficoll)
Biotest, Dreieich	AB-Serum
	Humanes Serumalbumin (HSA)
Cambrex, New Jersey (USA)	EGM-2 Bullet Kit
Fährhaus Pharma Handelsgesellschaft mbH, Hamburg	Hydrokortison (HC)
Gibco, Karlsruhe	D-PBS
	Foetales Kälberserum (FKS)
	Fungizone (Amphotericin B)
	Horse Serum (HS)
	IMDM
	Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100x)
	Trypsin-EDTA (10x)
Harbor Bio-Products, Norwood (USA)	Human Fibronektin (FN)
J.T. Baker, Phillipsburg (USA)	Ethanol Absolute
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	CD133 Cell Isolation Kit, human
	CD14 Micro Beads, human
	MACS BSA Stock Solution
R&D Systems, Minneapolis (USA)	rhAng-1 (Rekombinant Human Angiopoietin-1)
	rhAng-2 (Rekombinant Human Angiopoietin-2)
	Trypan Blue Solution (0,4 %)
TEBU, Offenbach	bFGF (Fibroblast Growth Factor-basic)
	EGF (Epidermal Growth Factor)
	Flt-3-Ligand (Flt-3-l, Fms-related tyrosine-kinase 3 ligand)

	HGF (Human Hepatocyte Growth Factor)
	IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor-I)
	IL-8 (Interleukin-8 oder monocyte-derived neutrophil chemotactic factor)
	SCF (Stem Cell Factor)
	SCGF-β (Stem Cell Growth Factor-beta)
	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor oder Recombinat Human VEGF165)

1.4 Antikörper für die Immunfluoreszenzanalysen

Tab. 4 : Verwendete Antikörper

Humanes Antigen	Markierung	Isotyp	Klon	Anwendung	Bezugsquelle
CD144 (VE-Cadherin)	-	Mouse IgG ₁ κ	55-7H1	Immun-histochemie	BD Pharmingen, San Diego (USA)
vWF (von-Willebrand-Faktor)	FITC	Sheep-Anti-Human IgG	-	Immun-histochemie	The Binding Site, Birmingham (UK)
Sekundärer Antikörper für CD144	Texas Red	Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)	-	Immun-histochemie	Jackson ImmunoResearch, West Grove (USA)

1.5 Zusammensetzung der Puffer und Medien

1.5.1 Verwendeten Zytokine und ihre Konzentrationen

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Faktoren und ihre Konzentrationen

Faktoren	Konzentration in der Stammlösung ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Erzielte Konzentration (ng / mL)
bFGF	50	1
EGF	500	20
Flt-3-l	10	50
HGF	10	20
IGF-1	100	2
IL-8	25	50
rhAng-1 (Ang-1)	10	20
rhAng-2 (Ang-2)	10	20
SCF	10	100
SCGF- β	10	100
VEGF	10	50

1.5.2 Grundmedien und die Puffer

AB-PBS

-8 ml PBS

-2 ml AB-Serum

Erylysepuffer (steril filtriert)

-8,29 g NH_4Cl (155 mM)

-1g KHCO_3 (10 mM)

-45,2 mg EDTA (0,1mM)

-1L H_2O

EBM- 1

-90 mL EGM-2 Basalmedium

-10 mL FKS

-1mL Penicillin / Streptomycin (Pen / Strep)

-100 μL Amphotericin B

EBM-1'

- 80 mL EGM-2 Basalmedium
- 20 mL FKS
- 1mL Penicillin / Streptomycin (Pen / Strep)
- 100 µL Amphotericin B

EBM-2

- 450mL EGM-2 Basalmedium
- 50 mL FKS
- 5 mL Penicillin / Streptomycin
- 2 mL rhFGF-BHeparin
- 500 µL Amphotericin B
- 500 µL GA-1000 (Gentamycin)
- 500 µL Ascorbinsäure (AS)
- 500 µL VEGF
- 500 µL R3-IGF-1
- 500 µL Heparin
- 500 µL rhEGF
- 200 µL Hydrocortison

Expansionsmedium (EM; steril filtriert)

- 50 mL LBMCM (Long term Bone Marrow Culture Medium. Dexter T.M;Acta Haematol. 1979; 62(5-6):299-305)
- 500 µL SCGF-β (10µg / mL)
- 250 µL VEGF (10µg / mL)
- 250 µL Flt3-l (10µg / mL)

Fibronectin-Stammlösung (zur Beschichtung der Platten):

- 1 mg Fibronectin (FN)
- 1 mL steriles Wasser
- 24 mL PBS

MACS-Puffer

- 475 mL PBS
- 12,5 mL Humanes Serumalbumin (HSA)
- 3 mL Aqua-Citrat-Dextrose-A (ACD-A)

Stopp-Medium (nach Trypsinieren) für Endothelzellen:

- 20 % FKS in EGM-2 Basalmedium oder in Supermedium

LBMCM

- 400 mL IMDM
- 50 mL Foetal Kalb Serum (FKS)
- 50 mL Horse Serum (HS)
- 500 µL Hydrocortison (HC)

Trypsin-Stammlösung:

- 1 mL Trypsin
- 9 mL PBS

1.5.3 Grundmedien mit Zusatz von Zytokinen als Differenzierungsmedien

-LBMCM als Grundmedium**Tab.6 : Übersicht über die zugesetzten Zytokine**

Zugesetzte Zytokine
VEGF
VEGF + Ang-2
VEGF +bFGF
VEGF +EGF
VEGF +HGF
VEGF +IGF-1
VEGF +IL-8
VEGF +bFGF +EGF
VEGF +bFGF +HGF
VEGF +bFGF +IGF-1
VEGF +bFGF +IL-8
VEGF +bFGF +Ang-2
VEGF +bFGF +EGF +HGF +IGF-1 +IL-8

- EBM-1 als Grundmedium**Tab.7 : Übersicht über die verwendeten Faktoren und Kombinationen**

Zugesetzte Zytokinen
VEGF
VEGF +Ang-1
VEGF +Ang-2

VEGF +IL-8
VEGF +SCF
VEGF +Ang-1 +Ang-2
VEGF +Ang-1 +IL-8
VEGF +Ang-1 +SCF
VEGF +Ang-1 + Heparin + GA-1000 +HC +AS

- EBM-1' als Grundmedium

Tab.8 : Übersicht über die verwendeten Faktorenkombinationen

Zugesetzte Zytokinen
VEGF +Ang-1
VEGF +Ang-1 + Heparin + GA-1000 +HC +AS

2 Methoden

2.1 Verwendete Zellen

Die hämatopoetischen, CD133 positiven Stammzellen wurden mittels eines immunomagnetischen Vefahrens aus Leukaphereseprodukten gewonnen. Zur Herstellung der Leukapheresate wurden die Patienten oder die Spender mit dem stammzellmobilisierenden Faktor G-CSF behandelt, so dass die Stammzellen des peripheren Blutes durch eine Durchflusszentrifuge gewonnen werden konnten. Die Leukaphereseprodukte wurden von der Blutbank des UKE zur Verfügung gestellt

Die monozytären, CD14 positiven Zellen wurden ebenso immunomagnetisch aus Leukaphereseprodukten und aus Buffy Coats gewonnen. Die Buffy Coats kommen während der Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten zustande. Die Buffy Coats entsprechen der Schicht, die zwischen Plasma und sedimentierten Erythrozyten entsteht. Sie wurden ebenfalls von der Blutbank des UKE zur Verfügung gestellt.

HUVECs, Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur, wurden kommerziell erworben (Bezugsquelle: Cambrex, New Jersey,USA). Sie wurden als Kontrolle verwendet.

Die mononukleären Zellen wurden aus Leukapheresaten, Buffy Coats und humanem Knochenmark isoliert. Das Knochenmark wurde mittels Punktion des Beckenkamms

gewonnen. Die Knochenmarkproben wurden von der Klinik für Knochenmarktransplantation des UKE bereitgestellt.

2.2 Isolierung von Zellen aus den Blutprodukten

2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Leukapheresaten, Buffy Coats und Knochenmark

Die mononukleären Zellen wurden mittels Dichtezentrifugation mit Ficoll aufgetrennt. Aufgrund ihrer höheren Dichte durchwandern die Erythrozyten die Ficollschicht und setzen sich ab, und die mononukleäre Zellen verbleiben als weißliche Band zwischen Erythrozyten und Serum.

Die Proben wurden 1:2 bis 1:4 mit PBS verdünnt und vorsichtig auf Ficoll aufgetragen. Dabei sollte das Verhältnis von Ficoll zur verdünnten Probe 1:2 bis 1:2,5 betragen. Die Dichtezentrifugation erfolgte bei 400g für 30 Minuten bei 20°C ohne Bremse.

Die entstandene weißliche Bande zwischen Ficoll und Serum wurde vorsichtig abgenommen, in ein Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an PBS gewaschen.

Beim Vorhandensein von roten Blutkörperchen wurden diese mit Erylysepuffer lysiert. Der Erylysepuffer ist eine hypotonische Salzlösung, die, gemäß des Prinzips der Osmose, einen Wassereinstrom in die Erythrozyten bewirkt, so dass diese platzen. Das Pellet wurde in 5 mL eiskühlem Erylysepuffer resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 10 mL MACS Puffer und Zentrifugation wurde der Lysevorgang gestoppt. Ein weiterer Waschschrift entfernte Reste des Lysepuffers. Es erfolgte anschließend eine Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer.

2.2.2 Isolierung der hämatopoetischen, CD133 positiven Stammzellen durch immunomagnetische Markierung

Die CD133 positiven Zellen wurden aus den mononukleären Zellen aus Leukapheresaten selektioniert.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem CD133-Cell-Isolation-Kit. Das Verfahren beruht auf CD133-Antikörpern, die an auf der Zelloberfläche vorhandene CD133-Moleküle

binden. Die Antikörper sind mit paramagnetischen Beads gekoppelt, so dass die markierten Zellen in einem starken Magnetfeld in der Säule zurückgehalten werden. Die mononukleären Zellen wurden in MACS Puffer aufgenommen (300 μL pro 10^8 Zellen). Es wurde zunächst das FcR-Blocking Reagenz dazu gegeben (100 μL pro 10^8 Zellen). Dieses Reagenz dient zur Blockierung der unspezifischen Fc-Rezeptor-Bindungsstellen. Danach wurden die mit Antikörpern gekoppelten Beads hinzu gegeben (100 μL pro 10^8 Zellen). Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Es erfolgte ein Waschvorgang mit MACS Puffer, um die ungebundenen Beads zu entfernen. Die Zellen wurden danach in einem geringen Volumen von MACS Puffer resuspendiert und durch einen $40\ \mu\text{m}$ -Sieb filtriert. Somit gelangten Einzelzellen auf die Säule und eine Verstopfung konnte vermieden werden. Die Säule wurde zunächst mit MACS Puffer äquilibriert, bevor die Zellen in einer Konzentration von bis zu 10^8 Zellen/ $500\ \mu\text{L}$ aufgetragen werden konnten. Die Säule wurde zur Entfernung der negativen Zellen dreimal mit MACS Puffer gespült. Die Elution mit MACS Puffer erfolgte nachdem die Säule aus dem Magneten entfernt wurde. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Neubauerzählkammer. Die Zellen wurden anschließend im Expansionsmedium aufgenommen und in mit Fibronectin beschichteten Multi-Well-Platten ausplattiert, bis zu 1×10^6 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte, und 1×10^6 bis zu $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 24-Well-Platte. Es wurden auch frisch aufgereinigte Zellen in den Differenzierungsmedien überführt. Sie wurden in mit Fibronectin beschichteten 96-Well-Platte und acht-Kammer-Culture-Slides ausplattiert, a 5×10^5 Zellen pro Well/Chamber.

2.2.3 Isolierung der monozytären, CD 14 positiven Stammzellen aus den Leukapheresaten und aus den Buffy Coats

Die monozytären, CD14 positiven wurden aus den mononukleären Zellen aus Leukaphereseprodukte und Buffy Coats mit Hilfe der CD 14-Beads selektioniert. Diese Beads interagieren mit den Zellen nach demselben Prinzip wie die CD133-Beads. Der einzige Unterschied liegt daran, dass eine Absättigung mit dem FcR-Blocking Reagenz nicht empfohlen ist aufgrund der hohen Konzentration an Monozyten (30%).

Die mononukleären Zellen wurden zunächst in MACS Puffer aufgenommen (80 μL pro 10^7 Zellen). Die Zellen wurden 15 Minuten in Kühlschrank inkubiert, dann wurden sie mit MACS Puffer gewaschen, um die ungebundenen Partikel zu entfernen. Nach

Resuspendieren in einem geringen Volumen des Puffers wurden sie durch das 40- μ m-Sieb gegeben. Danach wurde die Säule mit MACS Puffer äquilibriert, bevor die Zellen in einer Konzentration von bis zu 10^8 Zellen/500 μ l aufgetragen werden konnten. Nach dreimaligem Durchspülen der Säule mit MACS Puffer (Zwecks Entfernung der negativen Zellen) wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Die Elution erfolgte mit MACS Puffer. Nach Ermittlung der Zellzahl mit der Neubauerzählkammer wurden die Zellen in den unterschiedlichen Differenzierungsmedien aufgenommen. Sie wurden anschließend in mit Fibronectin beschichteten 96-Multi-Well-Platten ausplattiert, à 5 x 10^5 Zellen pro Well.

2.3 Kultivierung der CD133 positiven Zellen

Die CD133 positiven Zellen wurden 7 bis zu 28 Tage lang in mit Fibronectin beschichteten Wells expandiert. Sie wurden mit Hilfe des Umkehrmikroskops qualitativ beurteilt. In der Regel wurden sie alle drei Tage mit dem Expansionsmedium gefüttert und bei Erreichen einer hohen Dichte geteilt. Dafür wurde die Suspension im Well vorsichtig durchmischt, dann wurde die Hälfte in ein anderes Well überführt und mit frischem Medium aufgefüllt.

2.4 Differenzierung der ex-vivo expandierten hämatopoietischen Stammzellen, der CD133, CD14 positiven Zellen und von den mononukleären Zellen.

2.4.1 Differenzierung der ex-vivo expandierten hämatopoetischen Stammzellen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Endothelzelldifferenzierung zu optimieren. Dafür wurden die hämatopoetischen Stammzellen ex-vivo expandiert und an unterschiedlichen Zeitpunkten in den Differenzierungsmedien aufgenommen: d7, d14, d21 und d28.

Wir untersuchten die Differenzierung der Zellen sowohl in 96-Well-Platten als auch in Culture Slides aus Glas mit der Frage, ob die Bodenbeschaffenheit des Kulturbehältnisses einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen hatte. Dabei wurden die Zellen unterschiedlich dicht ausgesät.

Tab. 9 : Übersicht über die ausgesäten Zelldichten

Ausgesäte Zelldichte	
Pro Well einer 96-Well-Platte	Pro Chamber eines acht-kammerigen Culture Slide
1 x 10 ⁴	5 x 10 ⁵
2 x 10 ⁴	
1 x 10 ⁵	
2 x 10 ⁵	
5 x 10 ⁵	
1 x 10 ⁶	

Die Kulturgefäße wurden vorab mit Fibronectin behandelt. Bei Fibronectin handelt es sich um große Plasmaproteine, die strukturelle und adhäsive Bestandteile von zell-assoziierten fibrillären Matrices sind. Fibronectin ist eines der primären Zelladhäsionsmoleküle. Wachstum und Differenzierung von Zellen *in vitro* werden wesentlich von dem verwendeten Substrat (Glas, Kunststoff) beeinflusst. Wird die Oberfläche der Kulturgefäße mit Adhäsionsfaktoren beschichtet, wird häufig ein besseres Zellwachstum erreicht. Adhäsionsfaktoren scheinen für eine Vielzahl von Zell-Basalmembran-Interaktionen verantwortlich zu sein, wie z.B. für Adhäsion, Migration aber auch Proliferation. Sie fördern die Anheftung von vielen epithelialen Zelltypen an Typ IV Kollagen. Dies gilt sowohl für normale als auch für Tumorzellen und für alle anderen Zellen, die eine Basalmembran besitzen. Darüber hinaus wird durch Adhäsionsfaktoren die Neigung vieler Zellen zur Entdifferenzierung verhindert.

Die Zellen wurden in den unter 1.4 aufgelisteten Medien aufgenommen. Es ist zu beachten, dass die Kombination von LBMCM mit VEGF dem Expansionsmedium ohne den Faktoren SCGF- β und FLT3L entspricht. Als anderes GrundemEDIUM wurde das EGM-2 basal medium verwendet, mit 10% FKS, Pen/Strep und Amphotericin B (Ingram et al., 2004). Ingram et al. verwendeten dieses Medium zur Differenzierung von MNCs aus Buffy Coat in Endothelzellen. Dieses Medium wurde auch mit 10% mehr FKS angesetzt, um den Einfluss vom Serumgehalt auf die Zellen zu überprüfen. Außerdem wurde dieses Medium mit Faktoren versetzt (siehe Abschnitt 1.4) mit der Frage, ob dadurch eine Optimierung des Differenzierungsvorgangs erreicht werden

konnte. Als wichtigster Faktor ist VEGF aufgrund seiner entscheidenden Rolle in der Angiogenese unabdingbar.

Der sequentielle Faktorenzusatz wurde auch untersucht. Dazu wurden Medien angesetzt und nach 14 Tage der Differenzierung ein weitere Faktor hinzugefügt.

Tab. 10 : Übersicht der verwendeten Faktoren und Medien beim sequentiellen Ansatz

Differenzierungsmedium bis Tag 14	Zusätzlicher Faktor an Tag 14
EBM1 +VEGF +Ang1	IL8
EBM1 +VEGF +Ang1	SCF
EBM1 +VEGF +Ang2	Ang-1

Die ex-vivo expandierten hämatopoetischen Stammzellen wurden an dem ausgewählten Zeitpunkt in den entsprechenden Differenzierungsmedien aufgenommen. Nach vorsichtigem Die Zellsuspension wurde nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in ein Röhrchen überführt. Anschließend wurde einige Male mit PBS gespült, um alle Zellen aus dem Kulturgefäß zu entfernen. Um sicher zu gehen, dass alle Zellen abgenommen wurden, erfolgte eine Beurteilung unter dem Inversionsmikroskop. Wenn nötig wurde erneut mit PBS nachgespült, bis alle Zellen entfernt wurden. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit der Hilfe der Neubauerzählkammer. Die Zellen wurden in den Differenzierungsmedien aufgenommen und ausplattiert. Die Zellen wurden mindestens zweimal pro Woche am Umkehrmikroskop dokumentiert, bezüglich der Vitalität der Zellen, ihrer Morphologie, ihrer Anordnung im Well, Proliferation und Auftreten von Endothelzellen. Das Auswechseln des Mediums erfolgte zweimal pro Woche, indem die Hälfte des Mediums abgenommen wurde und das gleiche Volumen an frischem Medium hinzugegeben wurde. Die in Differenzierungsmedium aufgenommenen Zellen wurden durchschnittlich 4 Wochen untersucht. Zum Abschluß des Experimentes erfolgte eine Charakterisierung der Zellen durch Nachweis der typischen Endothelzellmarker, sowie eine Quantifizierung der Zellen durch drei Methoden, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

2.4.2 Differenzierung der CD133 positiven Zellen

Die frisch aufgereinigten CD133 positiven, hämatopoietischen Stammzellen wurden nur in Wells von 96-Well-Platten differenziert aufgrund der begrenzten Zellzahl. Diese

Wells wurden vorab mit Fibronectin beschichtet. Die frischen hämatopoetischen Stammzellen wurden unterschiedlich dicht ausgesät.

Tab. 11 : Übersicht der Zelldichten und der verwendeten Medienzusammensetzungen

Verwendete Medien	Ausgesäte Zelldichten
-LBMCM	-1×10^4
-LBMCM +VEGF	-2×10^4
-LBMCM +VEGF +bFGF	-1×10^5
-LBMCM +VEGF +IL8	-2×10^5
-LBMCM +VEGF +HGF	
-LBMCM +VEGF +IGF1	
-LBMCM +VEGF +bFGF +EGF +HGF +IGF1 +IL8	
LBMCM+VEGF	-5×10^5
EBM1 +VEGF +Ang1	

Die CD133 positiven Zellen wurden genauso wie die ex-vivo expandierten hämatopoetischen Stammzellen 4 Wochen lang beobachtet und dokumentiert. Dies geschah hinsichtlich ihrer Vitalität, Morphologie, Anordnung im Well, Auftreten von Endothelzellen und Proliferation. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche. Nach ablauf der 28 tage wurden sie quantifiziert.

2.4.3 Differenzierung der mononukleären und der CD14 positiven Zellen

Beide Zellarten wurden nach der Aufreinigung in die folgenden vier Differenzierungsmedien aufgenommen: LBMCM +VEGF, EBM1 +VEGF, EBM1 +VEGF +Ang1 und EBM1 +VEGF +Ang2. Sie wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen in mit Fibronectin beschichteten 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Umkehrmikroskops dokumentiert und vier Wochen lang in diesen Medien differenziert, wobei die Medien zweimal pro Woche erneuert wurden. Die Zellen wurden nach drei Wochen der Differenzierung quantifiziert und bezüglich der Expression der spezifischen Endothelzellmarke CD144 (VE-Cadherin)) und von-Willebrand-Faktor charakterisiert.

2.5 Qualitative Einschätzungen

Die Zellen in den Differenzierungsmedien wurden mindestens zweimal pro Woche am Umkehrmikroskop beurteilt und die Beobachtungen dokumentiert. Dabei wurden mehrere Parameter untersucht: Vitalität der Zellen, Fluktuation der Zelldichte, Zellmorphologie, Zeitpunkt des Auftretens der ersten adhärenen Zellen bzw. Endothelzellen, Anhalten des Differenzierungseffekts. Das Beobachten dieser Faktoren sollte dazu führen die beste Zytokinkombination auszuwählen. Die Zellen wurden durchschnittlich 4 Wochen lang differenziert. Es zeigte sich, dass sie danach an Vitalität verloren.

2.6 Quantitative Einschätzungen

2.6.1 Ermittlung der Endothelzellzahl : das Raster in Form eines Quadrats

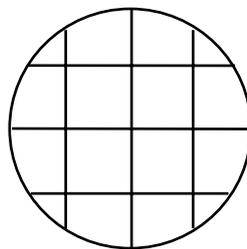


Abbildung 3: Das Raster in Form eines Quadrats

Zur Herstellung des Rasters wurde auf einer Klarsichtfolie ein Kreis gezeichnet, mit den Dimensionen eines Wells einer 96-Well-Platte (0,9 cm Durchmesser). Es wurde in schachbrettartige Vierecke eingeteilt. Dabei ergaben sich 14 Felder, wobei nur die Felder in der Mitte Quadrate darstellten. Die Vierecke wurden so angeordnet, dass sie möglichst mit einem Blick erfasst werden konnten, um Verschiebungen zu vermeiden, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unmöglich machen würden. Außerdem wurde immer im selben Viereck gezählt, damit die Ergebnisse untereinander vergleichbar waren. Zur Ermittlung der Endothelzellzahl wurde der auf der durchsichtigen Klarsichtfolie gemalte Kreis unter das Well gelegt. Unter Beurteilung

am Umkehrmikroskop wurde erneut justiert, damit beide Kreise spiegelbildartig aneinanderpassten. Die sich im ausgewählten Viereck befindenden Endothelzellen wurden mit Hilfe des manuellen Zählers gezählt. Das Endergebnis ergab sich aus dem Multiplizieren der ermittelten Zellzahl mit dem Faktor 14.

Diese Methode hat den Nachteil, dass der Multiplikationsfaktor approximativ ermittelt ist, weil man am Rand des Kreises keine ganzen Vierecke findet. Außerdem erwies sich dieses System als wenig repräsentativ für die Zellen, weil durch die Konkavität der Löcher der Platten, nicht alle Zellen erfasst werden konnten. Deshalb wurde ein neues Raster in Form eines Kreisabschnittes eingeführt, welches die Zellzahl repräsentativ darstellt.

2.6.2 Ermittlung der Endothelzellzahl: das Raster in Form eines Kreisabschnittes.

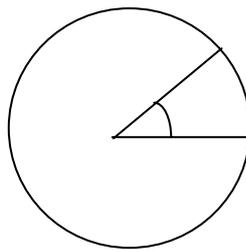


Abbildung 4: Das Raster in Form eines Kreisabschnittes. Der gezeichnete Winkel beträgt 20° .

Genauso wie beim Quadrat wurde auf einer Klarsichtfolie ein Kreis gezeichnet, dessen Durchmesser dem eines einer 96-Wellen entsprach (0,9 cm). Ein Kreis entspricht einem Winkel von 360° . In das Raster wurde ein Winkel von 20° gezeichnet. Die darin ausgezählte Zellzahl wurde mit dem Faktor 18 multipliziert, was die gesamte Endothelzellzahl im Wellen ergab.

2.6.3 Ermittlung der Endothelzellzahl: Trypsin

Die in Multi-well-Platten und Chamber Slides ausplattierten Zellen wurden zum Ablösen der adhären Endothelzellen mit Trypsin (eins zu zehn verdünnt) behandelt. Dazu wurde das Medium vollständig abgesaugt und vorsichtig mit PBS nachgespült. Es wurde $100\ \mu\text{l}$ Trypsin pro Wellen und das doppelte Volumen pro Chamber und noch mal

vorsichtig auf- und abpipettiert. Um den Ablösungsvorgang zu beschleunigen, wurde vorsichtig gegen den Boden der Platten bzw. Culture Slides geklopft und die Kulturgefäße wurden zum Inkubieren in den Brutschrank gestellt. Der Ablösungsvorgang der Zellen konnte am Mikroskop anhand der langsamen Abrundung der Zellen und des Abschwimmens der Zellen beobachtet werden. Zum Stoppen des Vorgangs wurde das gleiche Volumen der jeweiligen Grundmedien (Supermedium und EBM-1), mit 20% FKS versetzt. Danach erfolgte die Zellzahlermittlung mit der Neubauerzählkammer.

2.7 Immunfluoreszenz: Nachweis der spezifischen Endothelzellmarker von-Willebrand-Faktor und VE-Cadherin

Die Immunfluoreszenz dient zur Darstellung von zell- und gewebesspezifischen Antigenen. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei der direkten Färbung bindet ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper an das Antigen. Bei der indirekten Färbung bindet der ungekoppelte Antikörper an die Zellen. Es erfolgt die Zugabe des mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörpers. Er ist gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop kann man diesen Farbstoff mit einer UV-Lampe anregen und somit die gesuchten Proteine sichtbar machen.

Die differenzierten Zellen aus den hämatopoetischen Zellen, den CD14 positiven Zellen und den MNCs wurden zum Nachweis der spezifischen Endothelzellmarker von-Willebrand-Faktor (vWF) und VE-Cadherin (CD144) markiert. Der vWF –Antikörper stammt aus dem Schaf und ist direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (fluorescein isothiocyanate) gekoppelt, während der VE-Cadherin-Antikörper unmarkiert ist. Der VE-Cadherin-Antikörper stammt aus der Maus und wurde in einem zweiten Schritt mit seinem Sekundärantikörper gekoppelt. Für die Färbung wurde vWF-FITC 1:200 mit PBS verdünnt. Es wurde je ein Objektträger für jeden Antikörper vorgesehen, da sie auf diese Weise besser beurteilbar sind. Da der Hintergrund bei dem Vorgang beträchtlich mitgefärbt wird, wurde ein Objektträger für die Inkubation ohne den primären Antikörper und nur mit dem sekundären Antikörper als negative Kontrolle vorgesehen.

Außerdem dienten die HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) als positive Kontrolle.

Die Cytospins wurden mit der Zytocentrifuge Cytospin 2 (Shandon) hergestellt. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die adhärenen Zellen mit Trypsin versetzt und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Sie wurden dann in je 100 µl PBS aufgenommen und zentrifugiert (5 Minuten, 600 rpm). Die Cytospins wurden zwei Stunden lang an der Luft getrocknet. Die Anfärbung der Zellen erfolgte entweder direkt danach oder die Cytospins wurden in Alufolie verpackt und bei -80°C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt angefärbt.

Die Markierung der Zellen erfolgte in einer feuchten Kammer. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden blockiert, indem die Zellen 10 Min. lang mit AB-PBS (PBS mit 10% AB-Serum) überschichtet wurden. Nach dem Entfernen des AB-PBS erfolgte die Zugabe der zu 1:50 mit PBS verdünnten primären Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur wurde zweimal drei Min. mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, 1:200 mit PBS verdünnt. Die Inkubationszeit dauerte ebenfalls 30 Minuten. Es wurde anschließend zweimal drei Minuten mit PBS gespült. Nachdem das PBS abgetropft war, wurden die Objektträger kurz an die Luft getrocknet. folgte die Zugabe von DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an dsDNA bindet und somit spezifisch Zellkerne anfärbt. Die Auswertung erfolgte entweder direkt nach der Färbung oder die Zytospins wurden in einer Dunkelkammer bei 4°C gelagert. Zum Auswerten wurden zuerst alle Zellen bzw. Zellkerne gezählt, dann die das gesuchte Antigen exprimierenden Zellen: aus der Differenz von allen und den vWF und CD144 positiven Zellen ergibt sich der prozentuale Anteil von Endothelzellen.

2.8 Statistische Analyse: der T-Test

Der T-Test gibt eine Angabe über die Konsistenz zweier Mittelwerte. Er erlaubt eine Aussage darüber, ob eine Messung mit einer anderen übereinstimmend ist. Üblicherweise verwendet man Vertrauensgrenzen (Signifikanz-Grenzen) von 5% und 1%. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant bewertet bei einem p-Wert <5%.

D Ergebnisse

1. Screening

1.1 Qualitative Einschätzung

Die isolierten CD133 positiven Stammzellen sollten in verschiedenen Differenzierungsmedien aufgenommen werden und über einem Zeitraum von vier Wochen morphologisch beurteilt werden. Dadurch sollte das Medium, bzw. die Faktorkombination, die die endotheliale Differenzierung der Zellen am besten induzieren kann, ermittelt werden.

Dazu wurden die isolierten CD 133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen in den unterschiedlichen, die endotheliale Differenzierung fördernden Medien aufgenommen und in mit FN vorbeschichteten 96-Well-Platten ausgesät. Außerdem wurde ein Teil dieser Zellen 7, 13, 21 und 28 Tage expandiert, bevor sie ausdifferenziert wurden. Die Zellen wurden unterschiedlich dicht ausgesät.

Tab. 12 : Übersicht über die verwendeten Medien, Faktorkombinationen und Zelldichten

Verwendete Medien und Faktorkombinationen	Ausgesäte Zelldichte pro Well
-EBM-1	-2×10^4
-EBM-2	-5×10^4
-LBMCM	-1×10^5
-LBMCM +VEGF	
-LBMCM +VEGF +Ang-2	
- LBMCM +VEGF +bFGF	
- LBMCM +VEGF +EGF	
- LBMCM +VEGF +HGF	
- LBMCM +VEGF +IGF-1	
- LBMCM +VEGF +IL-8	
- LBMCM +VEGF +bFGF +Ang-2	
- LBMCM +VEGF +bFGF +EGF	
- LBMCM +VEGF +bFGF +HGF	
- LBMCM +VEGF +bFGF +IGF-1	

- LBMCM +VEGF +bFGF +IL-8	
- LBMCM +VEGF +bFGF +EGF +HGF +IGF-1 +IL-8	

Die Zellen differenzierten sich, indem sie eine längliche Form annahmen, und sich in einigen Fällen mit ihren Enden zueinander anordneten.

Die frisch angesetzten CD133 positiven Stammzellen differenzierten sich kaum. In der ersten Woche starb außerdem ein Teil der Zellen, so dass die Ausbeute an Endothelzellen aus den direkt differenzierten hämatopoetischen Stammzellen sehr gering ausfiel.

Bei den ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen zeigte sich ein besserer Differenzierungseffekt bei der höheren Zelldichte, was vermuten ließ, dass die Zellen sich bezüglich ihrer Differenzierung gegenseitig beeinflussten. Von allen Faktorkombinationen mit LBMCM als Grundmedium zeichnete sich die Kombination mit VEGF dadurch aus, dass sie zunächst die Proliferation der Zellen induzierte: dieser Vorgang war schon ein paar Tage nach dem Aussäen der Zellen zu beobachten. Daneben trat der Differenzierungseffekt ca. drei Wochen nach Aufnahme im Medium auf. Bei EBM-1 und EBM-2 waren ab dem zweiten Tag nach Aufnahme endothelartige Zellen zu sehen. Nach vier Wochen waren fast alle Zellen ausdifferenziert.

A



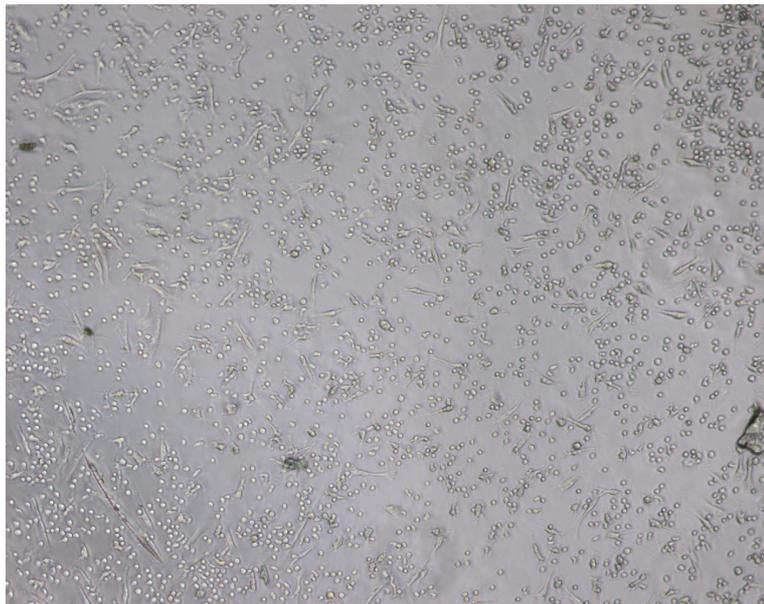
B

Abbildung 5: Differenzierungseffekt von LBMCM +VEGF (A) und von EBM-1 (B) auf die vier Wochen ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen (10 x Vergrößerung). Nachdem die CD133 positiven Stammzellen vier Wochen lang expandiert worden waren, erfolgte die Aufnahme in die in der Tabelle 12 aufgeführten Medien. Unter LBMCM +VEGF proliferierten die Zellen am Anfang zunächst weiter, bevor sie nach ca. drei Wochen die für Endothelzellen typische, spindelförmige Gestalt annahmen. Dieser Prozess stellte sich bei EBM-1 früher ein und es bildeten sich zudem mehr Endothelzellen. Außerdem waren diese differenzierten Zellen dünner und länglicher als die unter LBMCM +VEGF entstandenen Endothelzellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die frischen CD133 positiven Stammzellen sich kaum ausdifferenzierten, weil nach der Aufreinigung ein Teil davon abstarb. Es konnte somit bei dieser Zellpopulation keine Aussage darüber gemacht werden, ob die unterschiedliche Zelldichte einen Effekt auf die Differenzierungseffizienz der Zellen ausübte. Bei den ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen zeigte sich ein besserer Differenzierungseffekt in der höchsten Dichte von 1×10^5 Zellen pro Well. Am stärksten ausgeprägt war die endotheliale Differenzierung bei EBM-1, EBM-2 und LBMCM +VEGF.

1.2 Quantifizierung des Differenzierungspotentials der Medien LBMCM +VEGF, EBM-1 und EBM-2 : Methode des Rasters

Die im Abschnitt 1.1 durchgeführte morphologische Beurteilung der differenzierten Zellen deutete daraufhin, dass die endotheliale Differenzierung unter den Medien EBM-1, EBM-2 und LBMCM +VEGF am stärksten ausgeprägt war. Als nächstes sollte versucht werden, die entstandenen Zellen zu quantifizieren. Dazu wurden die aufgereinigten CD133 positiven Stammzellen 7, 14 und 21 Tage lang expandiert und anschließend in diesen drei Differenzierungsmedien mit jeweils 1×10^5 Zellen pro Well aufgenommen. Diese Dichte wurde den Vorversuchen nach als optimal identifiziert.

Nach drei Wochen Inkubation wurden die Zellzahlen mittels des Rasters in Form eines Quadrats erhoben. Dabei wurden jeweils zwei Patienten untersucht. Das folgende Diagramm stellt die Mittelwerte dar.

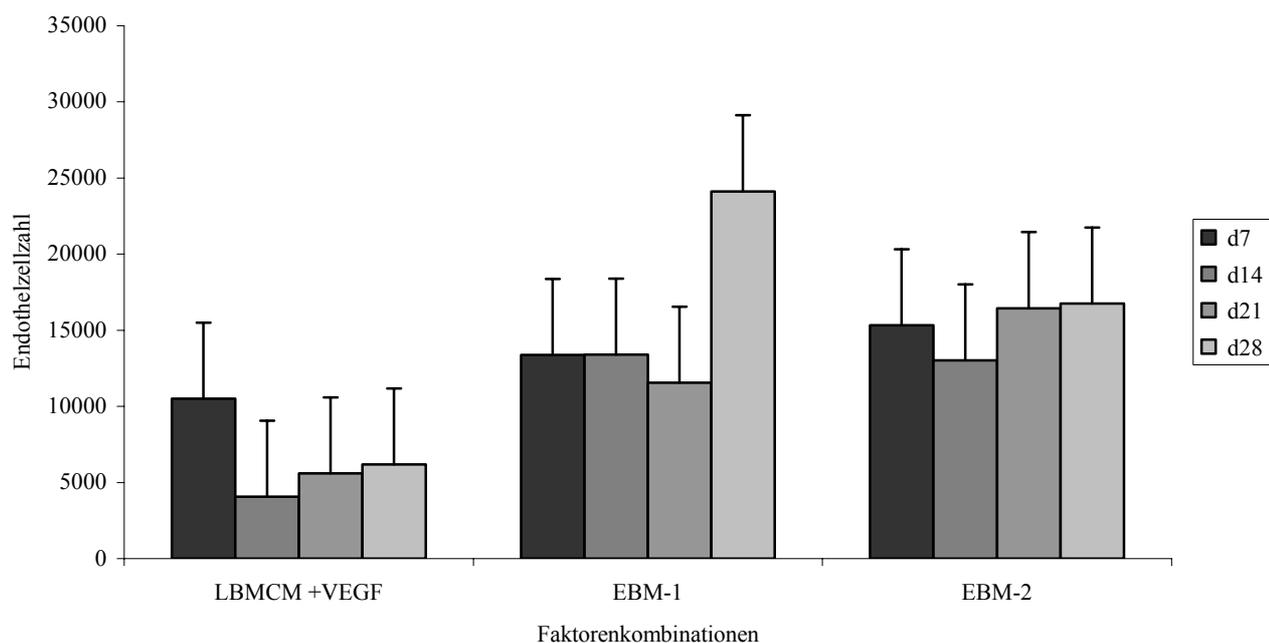


Abbildung 6: Endotheliale Differenzierung von 7, 14, 21 und 28 Tage ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen. EBM-1 und EBM-2 hatten einen besseren Differenzierungseffekt auf die ex-vivo expandierten Stammzellen, da sich in diesen Medien am meisten Zellen in die endotheliale Richtung differenzierten.

Die vier Wochen lang expandierten CD133 positiven Stammzellen differenzierten am effektivsten. EBM-1 induzierte die Differenzierung von 24,12% der Ausgangszellen, gefolgt von EBM-2 mit 16,75%. Das vorher in der Arbeitsgruppe benutzte Differenzierungsmedium, LBMCM +VEGF, bewirkte nur einen Differenzierungseffekt von 6,18%. Mit dem T-Test wurde der p-Wert ermittelt zwischen LBMCM+VEGF und EBM-1 sowie EBM-2 ermittelt. Beide Werte waren größer als 0,05 und damit nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellen, die vier Wochen lang expandiert worden waren, sich am besten in der endothelialen Reihe differenzierten. Außerdem besitzen sie den erheblichen Vorteil, dass sie durch die hohe Ausbeute nach der Expansion eine große Anzahl von Parallelversuchen ermöglichten. Es zeigte sich in diesem Abschnitt, dass das Medium EBM-1 die Differenzierung der Zellen am besten bewirkte. Deshalb sollte dieses Medium bezüglich seines Differenzierungseffekts optimiert werden, indem es mit die endotheliale Differenzierung unterstützenden Zytokinen kombiniert wurde.

Es stellte sich aber die Frage, welche Zelldichte für die Zellen am besten wäre. Ein Well einer 96er-Well-Platte fasst bis zu 1×10^6 Zellen. Es sollte geklärt werden, ob durch ein dichteres Aussäen der Zellen eine größere Ausbeute an Endothelzellen zu erzielen wäre.

1.3 Ermittlung der optimalen Zellzahl

Die zunächst höchste eingesetzte Zelldichte war 1×10^4 Zellen pro Well einer 96er-Well-Platte. Es ist aber möglich bis zu 1×10^6 Zellen auszusäen, um eine größere Ausbeute an differenzierten Zellen zu erhalten. Darum wurden die CD133 positiven Stammzellen vier Wochen lang expandiert. Diese Zellen ermöglichen eine breite Versuchspalette und besitzen eine hohe Differenzierungseffizienz. Als Medien wurden LBMCM +VEGF, EBM-1 und EBM-2 verwendet. Die ausgetesteten Zelldichten betragen: 1×10^6 und 5×10^5 Zellen.

Die Ausbeute an Endothelzellen war bei den beiden höheren Zelldichte größer als bei 1×10^4 . Bei der Dichte von 1×10^6 lagen die Zellen so dicht aneinander, dass der Differenzierungsvorgang später einsetzte, was vermuten lässt, dass die Zellen sich gegenseitig in ihrem Differenzierungspotential hemmten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Dichte von 5×10^5 Zellen pro Well einer 96er-Well-Platte als optimal erwies. Der Differenzierungsvorgang setzte schon wenige Tage nach Beginn des Experiments ein und die ausdifferenzierten Zellen grenzten sich deutlich von den

undifferenzierten Zellen ab. Darum wurde entschieden, diese Zelldichte künftig zu verwenden.

Als Nächstes sollte versucht werden, die Quantifizierungsmethode zu optimieren:

Das Raster in Form eines Quadrats als Quantifizierungsmittel ermöglicht zwar eine grobe Einschätzung der Zahlenverhältnisse in den Wells und damit eine Aussage über den Differenzierungseffekt der zu untersuchenden Medien. Es hat aber den Nachteil, dass aufgrund der ungleichen Verteilung der Zellen im Well die ermittelten Zahlen den genauen Verhältnissen nicht wirklich entsprachen. Aus diesem Grund wurde ein anderes Quantifizierungssystem eingeführt: ein Raster in Form eines Kreisabschnittes. Zum weiteren Vorgehen sollten beide Quantifizierungsmethoden gegenübergestellt werden.

1.4 Ermittlung der optimalen Quantifizierungsmethode

Das Raster in Form eines Quadrats bestand aus einem Kreis, der den Maßen des Wells einer 96er-Well-Platte entspricht (Durchmesser 0,9 cm), in dem Vierecke so aufgetragen wurden, dass sie möglichst mit einem Blick bei der Betrachtung unter dem Mikroskop erfasst werden konnten. Endothelzellen wurden in einem der 14 Vierecke ausgezählt, und die Gesamtzahl der Endothelzellen in dem Well ergab sich durch Multiplizieren der ermittelten Zahl mit dem Faktor 14. Es hatte aber den Nachteil, dass sich am Rand des Kreises keine ganzen Vierecke befanden, so dass der Multiplikationsfaktor recht approximativ war. Außerdem war der Boden des Wells konkav, so dass sich in Zentrum des Wells mehr Endothelzellen befanden als am Rand. Das System des Rasters erwies sich sowohl prinzipiell als auch zahlenmäßig als wenig repräsentativ für das Auszählen der Endothelzellen. Aus diesem Grund wurde eine andere Quantifizierungsmethode entwickelt, die diese Nachteile nicht aufwies.

Das neu entwickelte Raster bestand aus einem Kreis, der den Maßen eines Wells einer 96er-Well-Platte entsprach, in dem ein Winkel von 20° gezeichnet worden war. Alle in diesem Kreisabschnitt erfassten Endothelzellen wurden ausgezählt, und die ermittelte Zahl wurde mit dem Faktor 18 multipliziert, was die Endothelzellzahl in dem ganzen Well widerspiegelte.

Als Grundmedium diente hier EBM-1, das sich im Rahmen der reinen qualitativen Auswertung der ex-vivo expandierten Stammzellen als bestes erwiesen hatte. Es sollte

mit verschiedenen Zytokinen supplementiert werden. Folgende Kombinationen wurden im Rahmen des Vergleichs beider Quantifizierungsmethoden getestet:

- EBM-1 +VEGF +Ang-1
- EBM-1 +VEGF +Ang-2
- EBM-1 +VEGF +SCF

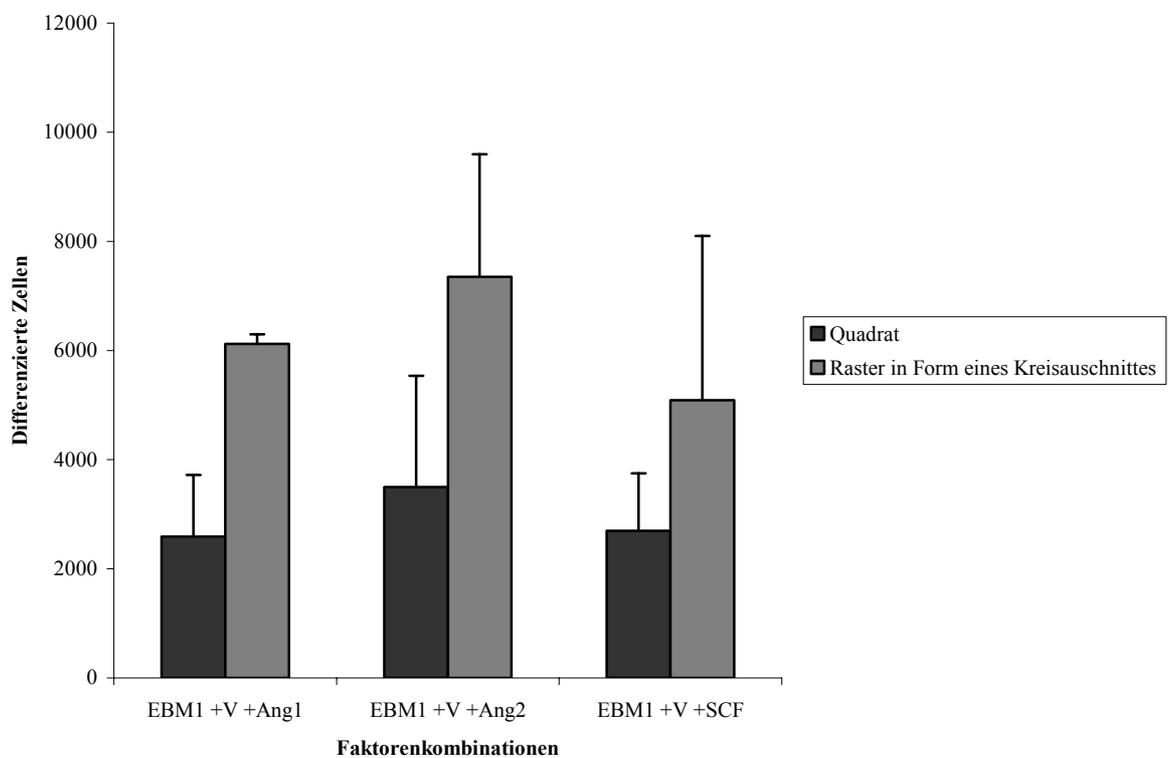


Abbildung 7: Ermittelte Endothelzellzahlen mit dem Quadrat und mit dem Kreisabschnitt drei Wochen nach Aufnahme in den Differenzierungsmedien (n=2). Es wurden je 5×10^5 Zellen pro Well ausgesät.

Tab. 13 : Zusammenfassende Darstellung der unter dem Quadrat und dem Raster in Form eines Kreisabschnittes ermittelten Differenzierungsquoten und Signifikanzwerte

Differenzierungsmedien	Prozent an differenzierten Zellen	
	Quadrat	Kreisabschnitt
EBM-1 +VEGF +Ang-1	0,5%	1,2%
EBM-1 +VEGF +Ang-2	0,7%	1,5%
EBM-1 +VEGF +SCF	0,5%	1,0%

Die in der Tabelle 13 aufgeführten Prozentzahlen ergeben sich aus den Quotienten der für die jeweiligen Medien und Bestimmungsmethoden ausgezählten differenzierten Zellen durch die ursprüngliche Zelldichte (5×10^5 Zellen pro Well). Bei allen Experimenten wurden mit dem Raster in Form eines Kreisabschnittes mehr Endothelzellen gezählt als mit dem quadratischen Raster. Da bei der visuellen Inspektion des ganzen Wells die Endothelzellen im Zentrum stärker konzentriert waren, wurde geschlossen, dass der Kreisabschnitt ein repräsentativeres Ergebnis liefert als das quadratische Raster. Für alle folgenden Experimente wurde daher der Kreisabschnitt verwendet. Die bisher dargestellten Zahlen wurden drei Wochen nach Aufnahme der Zellen ermittelt.

1.5 Ermittlung des Zeitpunktes für die Quantifizierung der Endothelzellen

Durch Auszählen der endothelial differenzierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten sollte versucht werden, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem sich die meisten Endothelzellen im Well befanden. Die Endothelzellen sollten zu diesem Zeitpunkt in großer Zahl nachzuweisen sein und ein hohes Maß an Vitalität aufweisen.

Dazu wurden die CD133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen vier Wochen lang expandiert. Es wurden je 5×10^5 Zellen in mit FN beschichteten Wells ausplattiert. Die Zellbestimmung erfolgte mit oben beschriebenem Kreisabschnitt. Die Quantifizierung begann zwei Wochen nach Aufnahme in die Differenzierungsmedien, weil bis zu diesem Zeitpunkt ausreichend Endothelzellen vorhanden waren. Das Auszählen der ausdifferenzierten Zellen wurde 14, 21, 28 und 35 Tage nach Aufnahme in die Differenzierungsmedien durchgeführt.

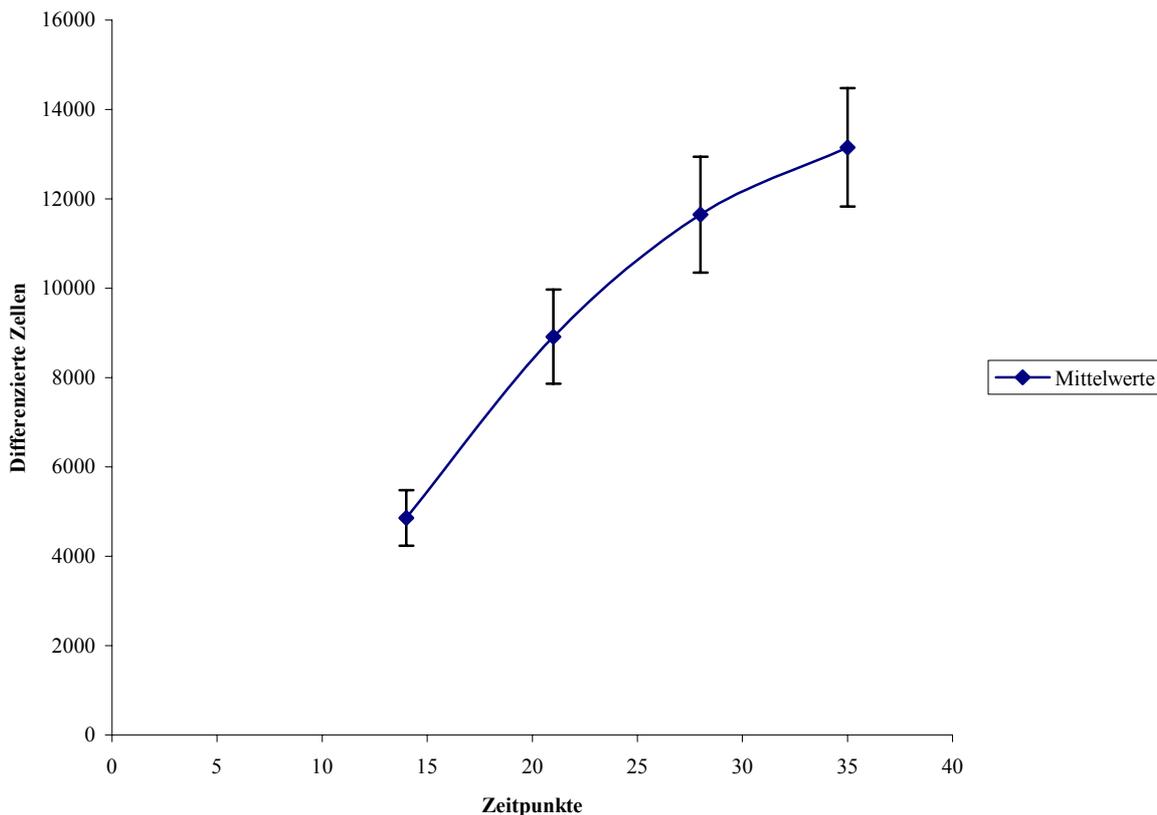


Abbildung 8: Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Zellen über einen Zeitraum von 35 Tagen (n=3). Die Steigung zwischen Tag 14 und Tag 21 betrug 579,45Zellen/Tag, zwischen Tag 21 und Tag 28 390,30 Zellen/Tag und zwischen Tag 28 und Tag 35 214,72Zellen/Tag.

Anhand der Abbildung acht lässt sich sagen, dass die endotheliale Differenzierung der Zellen immer fortschreitend war, aber nicht im gleichen Ausmaß. Im ersten Zeitintervall der Auszählung war die Steigung mit 579,45 Zellen/Tag am höchsten. Im weiteren Verlauf flachte die Kurve ab. Bei der Untersuchung der Zellen unter dem Umkehrmikroskop wurde deutlich, dass die Zellen nach vier Wochen im Differenzierungsmedium deutlich an Vitalität verloren. Es zeigten sich außerdem morphologische Seneszenzzeichen, wie das Auftreten von Blasen. Nach drei Wochen im Differenzierungsmedium zeigte sich, dass die Zellen noch vital waren und sich in hohem Ausmaß differenzierten. Deshalb wurde dieser Zeitpunkt als der am besten geeignete für die Quantifizierung der endothelialen Differenzierung erachtet. Der p-Wert für die Zeitpunkte Tag 14 und Tag 21 betrug $2,25E-05$ und war somit signifikant. Für diesen ersten Abschnitt lässt sich zusammenfassend sagen, dass die vier Wochen ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen für die Versuche am besten

geeignet waren. 5×10^5 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurde als optimale Zelldichte für den Beginn der Kultur identifiziert. Nach einem Zeitraum von drei Wochen in den Differenzierungsmedien konnten reproduzierbare Zellzahlen ermittelt werden. Zum Quantifizieren der Zellen war das Auszählen mit einem Raster in Form eines Kreisausschnittes am besten geeignet. Die Quantifizierungsmethode mit dem Raster in Form eines Kreisausschnittes wies damit ein hohes Maß an Effektivität, Reliabilität und Reproduzierbarkeit auf. Dementsprechend ergaben sich Zahlen, die sich den wahren Verhältnissen näherten. Das Grundmedium LBMCM induzierte eine deutlich schwächere endotheliale Differenzierung. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte EBM-1-Medium bewirkte hingegen eine frühere Induktion von Endothelzellen und damit eine höhere Ausbeute. Deshalb wurde dieses Medium im Folgenden eingehender untersucht, um die Differenzierungseffizienz der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen zu steigern.

Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Differenzierung induzierende Wirkung des Grundmediums EBM-1 durch Kombinieren mit verschiedenen Zytokinen, die eine Schlüsselrolle in der Angiogenese spielen, optimiert werden.

2. Optimierung der endothelialen Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen : EBM-1

Nachdem gezeigt wurde, dass von den drei untersuchten Medien EBM-1 die endotheliale Differenzierung der Zellen am günstigsten fördern konnte, sollte versucht werden, das Differenzierungspotential weiterhin zu steigern. Dies sollte durch Zugabe von die endotheliale Differenzierung fördernden Zytokinen wie z.B. VEGF, Ang-1 und Ang-2 erfolgen.

2.1 Kombinationen von EBM-1 mit Zytokinen, die eine Schlüsselrolle in der Angio- und Vaskulogenese spielen

Nachdem die CD133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen vier Wochen expandiert worden waren, erfolgte die Induktion der endothelialen Differenzierung. Es gab ausreichend Zellen, um verschiedene Kombinationen auszutesten.

Tab. 14 : Aufführung der verwendeten Kombinationsreihen

Grundmedium und zugesetzte Faktoren
EBM-1 +VEGF
EBM-1 +VEGF +Ang-1
EBM-1 +VEGF +Ang-2
EBM-1 +VEGF +IL-8
EBM-1 +VEGF +SCF
EBM-1 +VEGF +Ang-1 +IL-8
EBM-1 +VEGF+Ang-1 +SCF
EBM-1 +VEGF +Ang-2 +Ang-1
EBM-1 +VEGF +Ang-1 +Heparin +Gentamicin-1000 +Hydrokortison +Ascorbinsäure
LBMCM
LBMCM +VEGF

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Differenzierungsmedium zu entwickeln, dass das bisher in der Arbeitsgruppe verwendete Differenzierungsmedium LBMCM +VEGF im Differenzierungspotential übertraf. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieses Versuches LBMCM +VEGF im Vergleich untersucht.

Die ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen wurden in den in der Tabelle aufgeführten Differenzierungsmedien aufgenommen. Bei allen Kombinationsreihen mit EBM-1 wurde wiederholt festgestellt, dass die ersten Endothelzellen schon ab dem dritten Tag nach Ansetzen der Experimente auftraten. Bei der Kombination von EBM-1 mit VEGF und Ang-1 wurden die meisten Endothelzellendetektiert. Diese Beobachtung hielt bis zum Abschluss des Versuches – nach vier Wochen – an und ließ sich mehrmals reproduzieren. Bei den anderen Kombinationen ließen sich auch vereinzelt hohe Endothelzellichten feststellen. Aber die Kombination von EBM-1 mit VEGF und Ang-1 trat immer wieder in den Vordergrund.

Um diese Aussage zu bekräftigen, erfolgte nach drei Wochen eine Quantifizierung der ausdifferenzierten Zellen bei den jeweiligen Faktorenkombinationen.

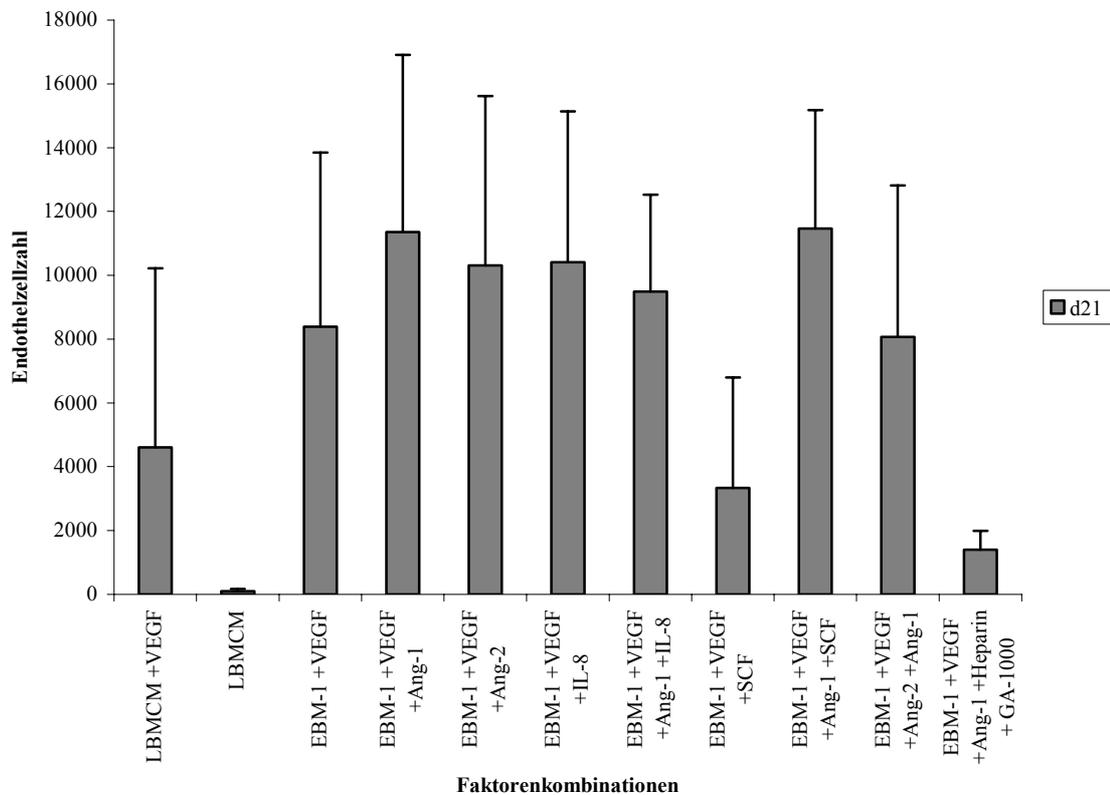


Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung der Differenzierungseffizienz der ex-vivo expandierten CD 133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen (n = 6). Die EBM-1-haltigen Medien waren effizienter als die LBMCM-haltigen Medien. Bei EBM-1 + VEGF + Ang-1 und EBM-1 + VEGF + Ang-1 + SCF differenzierten sich 2,3% der Zellen. LBMCM + VEGF bewirkte eine Differenzierungsquote von 0,9%.

Wie in obiger Abbildung gezeigt, erwies sich die Kombination von EBM-1 mit VEGF und Ang-1 als effizienter als LBMCM + VEGF, mit einer Differenzierungsquote von 2,3%. Der Abbildung nach erreichte EBM-1 + VEGF + Ang-1 + SCF ebenso eine Differenzierungsrate von 2,29%. Die Kombination EBM-1 + VEGF + Ang-1 erwies sich bei sich wiederholenden Beobachtungen am besten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, dass das neu eingeführte Medium, in diesem Fall EBM-1 mit VEGF und Ang-1 besser war als das bisher in der Arbeitsgruppe verwendete Differenzierungsmedium, LBMCM mit VEGF. Es entstanden 2,5-mal mehr Endothelzellen unter dem Einfluss von EBM-1 + VEGF + Ang-1 als im LBMCM + VEGF. Die Differenzierungseffizienz konnte somit mehr als

verdoppelt werden. Diese Beobachtung ließ sich mit einem p-Wert von 0,02 statistisch bestätigen.

A



B

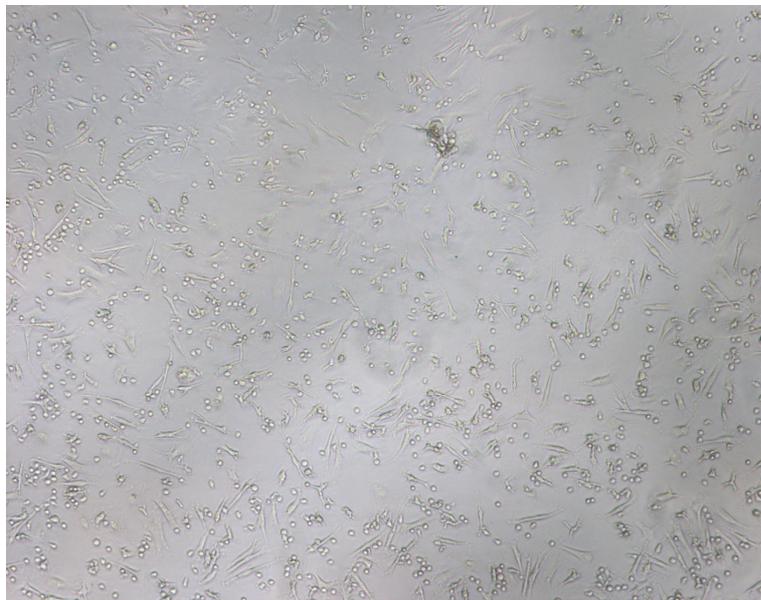


Abbildung 10: Vergleich der Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen unter der Kombination von EBM-1 mit VEGF und Ang-1 (B) und der Kombination von LBMCM mit VEGF (A) 14 Tage nach Aufnahme in den Differenzierungsmedien (10 x Vergrößerung). Nach zwei Wochen hatten sich bei der Kombination EBM-1 +VEGF +Ang-1(B) die Zellen größtenteils ausdifferenziert, während bei der Kombination LBMCM +VEGF (A)

differenzierte Zellen nur vereinzelt anzutreffen waren. Bei dieser Kombination waren die undifferenzierten Zellen morphologisch plumper als an ersten Tag der Differenzierung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination LBMCM +VEGF anfänglich die Proliferation der Zellen, und anschließend ihre endotheliale Differenzierung induzierte. Die Kombination EBM-1 +VEGF +Ang-1 bewirkte eine stärkere endotheliale Differenzierung der Vorläuferzellen. Der Prozentsatz an ausdifferenzierten Zellen betrug 2,3%. Mit LBMCM und VEGF wurde lediglich ein Wert von 0,9% erreicht. Deshalb eignet sich das Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 zur Induktion der endothelialen Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven hämatopoetischen Stammzellen am besten.

2.2 Optimieren des Differenzierungsmediums bestehend aus dem Grundmedium EBM-1, VEGF und Angiopoetin-1

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Differenzierungseffizienz der CD133 positiven Stammzellen. Anhand der bisherigen Versuche konnte gezeigt werden, dass das Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 am effizientesten die endotheliale Differenzierung induzierte. Es sollte weiterhin versucht werden, diesen Effekt zu steigern. Deshalb wurde untersucht, ob durch sequentielles Hinzufügen von Zytokinen dieses Ziel erreicht werden könnte. Außerdem stellte sich auch die Frage, ob der Serumgehalt einen Einfluss auf die Differenzierung hatte. In den folgenden Abschnitten werden diese beiden Aspekte untersucht.

2.2.1 Sequentieller Zusatz von Faktoren

Durch die sequentielle Zugabe von Faktoren sollte versucht werden, die Differenzierungseffizienz der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen zu optimieren. Dazu wurden die Zellen 14 Tage lang in EBM-1 +VEGF +Ang-1 aufgenommen. Im Anschluss daran wurde das Medium je mit einem zusätzlichen Faktor versetzt. Die verwendeten Faktoren waren IL-8 und SCF.

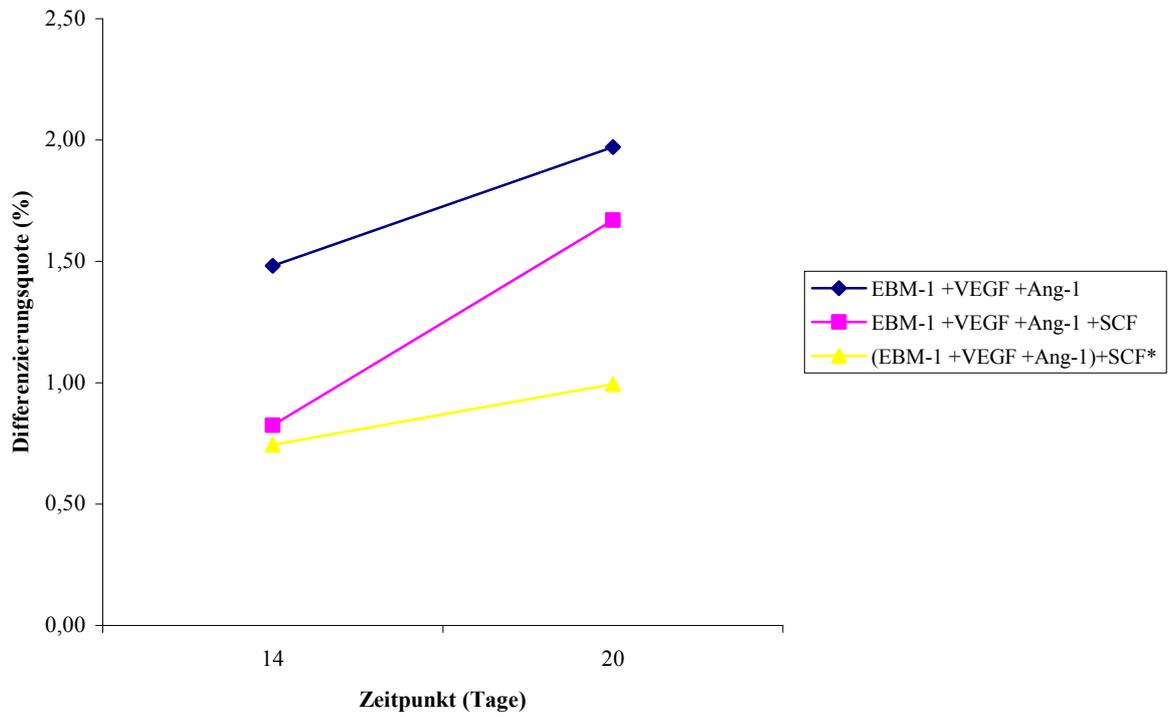
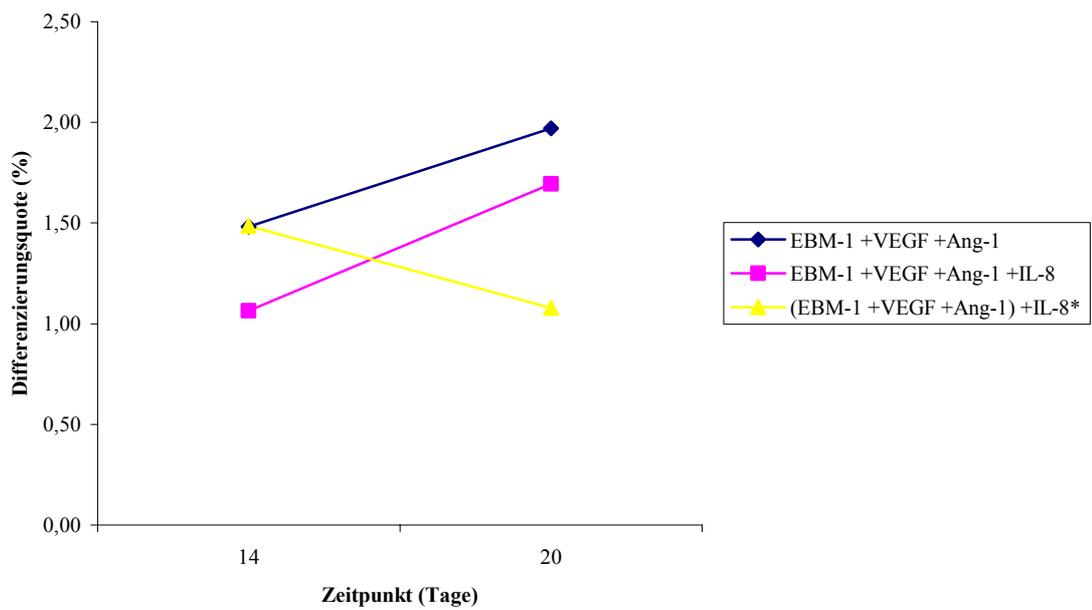
Die Kombination EBM-1 +VEGF +Ang-1 +Ang-2 wurde in Abschnitt 2.1 untersucht und bewirkte eine Differenzierungsrate von 1,6%. Da Ang-2 und VEGF synergistisch die Endothelzellproliferation steigerten und Ang-1 eher einen gefäßstabilisierenden

Effekt bewirkte, sollte der Zusatz von Ang-1 erfolgen, nachdem die Zellen zwei Wochen lang mit EBM-1 +VEGF +Ang-2 vorbehandelt worden waren.

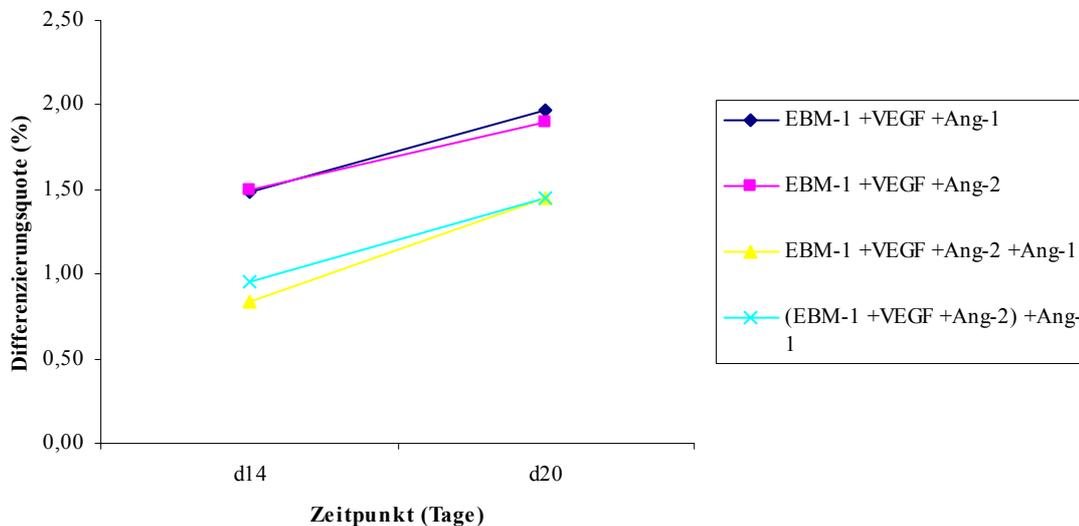
Tab. 15: Systematische Darstellung der im Rahmen des sequentiellen Faktorenzusatzes verwendeten Faktorenkombinationen

Verwendetes Medium während der ersten zwei Wochen	Zugesetzter Faktor am Tag 14 der Differenzierung	Kontrollen
EBM-1 +VEGF +Ang-1	-IL-8 -SCF	-EBM-1 +VEGF +Ang-1 -EBM-1 +VEGF +Ang-1 +IL-8 -EBM-1 +VEGF +Ang-1 +SCF
EBM-1 +VEGF +Ang-2	-Ang-1	-EBM-1 +VEGF +Ang-2 -EBM-1 +VEGF +Ang-1 +Ang-2

Nachdem die Zellen 2 Wochen lang mit den entsprechenden Faktorenkombinationen vorbehandelt wurden, erfolgte die Quantifizierung der differenzierten Zellen. Dann erfolgte die Zugabe von IL-8 und von SCF bei EBM-1 +VEGF +Ang-1 und die Zugabe von Ang-1 bei EBM-1 +VEGF +Ang-2. Nach 1 Woche erfolgte die zweite Quantifizierung der differenzierten Zellen. Die Kombinationen aus EBM-1+VEGF +Ang-1 und EBM-1+VEGF +Ang-2 wurden insgesamt fünfmal getestet, die anderen Kombinationen viermal. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 (A, B, C) dargestellt.

A**B**

C



* Die Faktorenkombinationen in den Klammern wurden 14 lang verwendet, dann erfolgte die Zugabe eines weiteren Faktors.

Abbildung 11: Differenzierungsquote der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen. Bei allen drei Grafiken stellte sich EBM-1 +VEGF +Ang-1 nach wie vor am besten dar. Die sequentiell angesetzten Faktorenkombinationen haben einen geringeren Differenzierungseffekt als die initial mit allen Faktoren angesetzten Medien. Die Zugabe von IL-8 zu EBM-1 +VEGF +Ang1 bewirkt sogar eine Abnahme der Endothelzellzahl um 0,4%.

Die Differenzierungsquote ergab sich aus dem Quotienten der ausgezählten differenzierten Zellen und der ursprünglich ausgesäten Zelldichte multipliziert mit dem Faktor 100.

Aus Teil A der Abbildung geht hervor, dass die Kombination EBM-1 +VEGF +Ang-1 am besten die endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten Stammzellen induzierte. Der steilere Verlauf der Differenzierungsrate bei der Kombination EBM-1 +VEGF +Ang-1 +SCF im Vergleich zum gleichen Medium mit sequentieller Faktorenzugabe deutet daraufhin, dass bei dieser Faktorenkombination das Konzept des sequentiellen Faktorenzusatzes ungünstig ist. Die Zugabe von IL-8 zum Differenzierungsmedium EBM-1 +VEGF +Ang-1 bewirkte eine Abnahme der Differenzierungsquote von 1,5% auf 1,0%. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass sich die Faktoren unter dieser Bedingung gegenseitig hemmen könnten. Beim zunächst

mit folgenden Faktoren angesetzten Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 +IL-8 zeigte sich eine Differenzierungsquote von 1,7% nach drei Wochen.

Die Kombination von EBM-1 mit VEGF , Ang-1 und Ang-2 bewirkte eine Differenzierungsquote von 1,4% nach drei Wochen. Bei der Kombination von EBM-1 mit VEGF und Ang-2 und Zugabe von Ang-1 nach zwei Wochen differenzierten sich ebenso 1,4% der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen. Bei der morphologischen Beobachtung unter dem Umkehrmikroskop ließen sich beide Kombinationen bezüglich ihres Differenzierungseffekts nicht voneinander unterscheiden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Prinzip des sequentiellen Faktorenzusatzes den Differenzierungseffekt von EBM-1 +VEGF +Ang-1 nicht steigerte. Es bewirkte in einzelnen Fällen sogar einen Rückgang der Differenzierungsquote der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen.

2.2.2 Erhöhung des Serumgehaltes

Das Medium EBM-1 Medium hat einen Serumgehalt von 10% FKS. Im Rahmen dieses Experimentes wurde dieses Medium mit 20% FKS versetzt (EBM-1'). Das Medium EBM-1' wurde mit verschiedenen Zytokinen kombiniert.

Tab. 16 : Auführung der verwendeten Medien

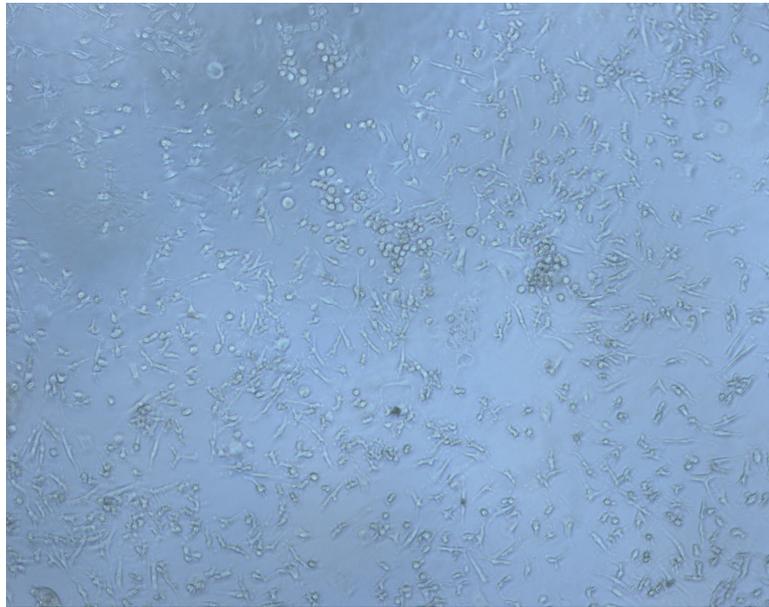
Verwendete Medien
EBM-1' +VEGF +Ang-1
EBM-1' +VEGF +Ang-1 +Heparin + GA-1000 +HC +AS
EBM-1 +VEGF +Ang-1
EBM-1 +VEGF +Ang-1 +Heparin +GA-1000 +HC +AS

Die ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen wurden in diesen Differenzierungsmedien aufgenommen und über einem Zeitraum von vier Wochen untersucht.

Bei dem Medium EBM-1' +VEGF +Ang-1 traten die ersten Endothelzellen nach ca. zwei Wochen auf. Dieses Differenzierungsmedium bewirkt im Vergleich zu EBM-1 +VEGF +Ang-1 eine geringere endotheliale Differenzierungsquote. Bei der Kombination von EBM-1 mit VEGF, Ang-1, Heparin, GA-1000, HC und AS

differenzierten sich wenige Zellen aus. Bei dem gleich zusammengesetzten Medium mit 20% Serum noch weniger.

A



B

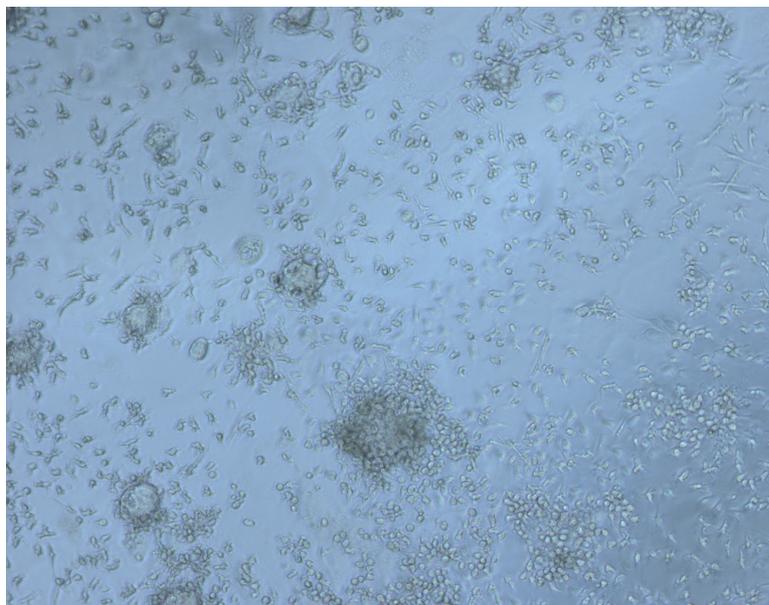


Abbildung 12 : Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen unter der Wirkung von EBM-1 +VEGF +Ang-1 mit 10%FKS (A) und mit 20%FKS (B) (10x Vergrößerung). Die Aufnahmen erfolgten nach drei Wochen. Während bei dem Differenzierungsmedium EBM-1 +VEGF +Ang-1 mit 10%FKS (A) die Differenzierung aufgetreten war,

zeigte sich bei den Zellen unter der Wirkung desselben Medium mit 10% mehr Serum (B) ein anderes Bild: die Zellen differenzierten sich nur stellenweise, und es bildeten sich eher Häufen von morphologisch undifferenzierten Zellen.

Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Wirkung des Differenzierungsmediums EBM-1 +VEGF +Ang-1 mit verschiedenen Serumkonzentrationen. Bei EBM-1' +VEGF +Ang-1 differenzierten sich die Zellen kaum. In einigen Fällen, wie im Bild B, ordneten sich die runden Zellen kreisförmig an und bildeten eine Struktur, die einem Blutgefäßlumen ähnlich sah.

Nach einem Zeitraum von drei Wochen wurde die Anzahl an morphologisch differenzierten Zellen mit dem Raster in Form eines Kreisabschnittes ermittelt.

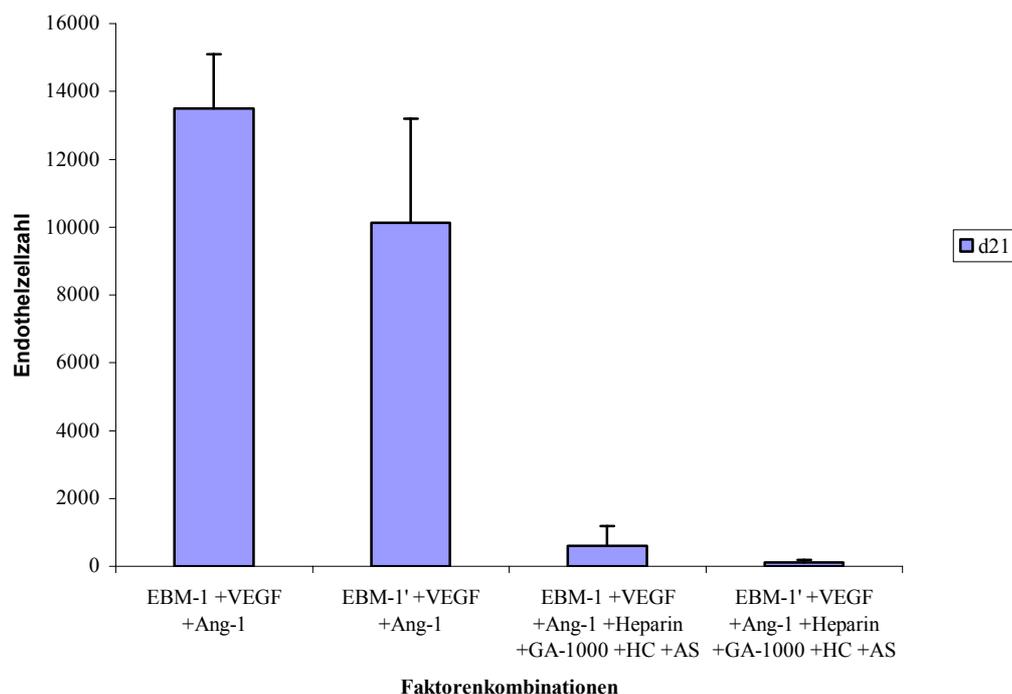


Abbildung 13: Effekt des Serumgehaltes des Differenzierungsmediums auf das Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen (n=3). Darstellung der Endothelzellzahl nach einem Zeitraum von 3 Wochen.

Bei Betrachten der obigen Abbildung wird deutlich, dass das 10%-FKS-haltige Grundmedium (EBM-1) die endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen besser induzierte als das 20%-FKS-haltige EBM-1'. Bei EBM-1 +VEGF +Ang-1 differenzierten sich 2,7% der Stammzellen aus, bei EBM-1'

+VEGF +Ang-1 waren es 2,0%. Unter der Kombination von EBM-1 mit VEGF, Ang-1, Heparin, GA-1000, Hydrokortison und Ascorbinsäure differenzierten sich 0,1%, bei der Kombination von EBM-1' mit denselben Faktoren blieb die Differenzierung aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erhöhung des Serumgehaltes im Differenzierungsmedium um 10% die endotheliale Differenzierung der Vorläuferzellen hemmte.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bodenbeschaffenheit des Kulturbehältnisses einen Einfluss auf die Differenzierung hat. Die Zellen wurden bisher auf kunststoffhaltigen Böden kultiviert. Es wäre bedeutend zu wissen, ob das Kultivieren der Zellen auf einem glashaltigen Boden indirekt das Differenzierungsmedium in seiner Wirkung unterstützen könnte.

2.3 Anderweitige Optimierung des Differenzierungsverhaltens der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen

2.3.1 Die Bodenbeschaffenheit des Kulturbehältnisses.

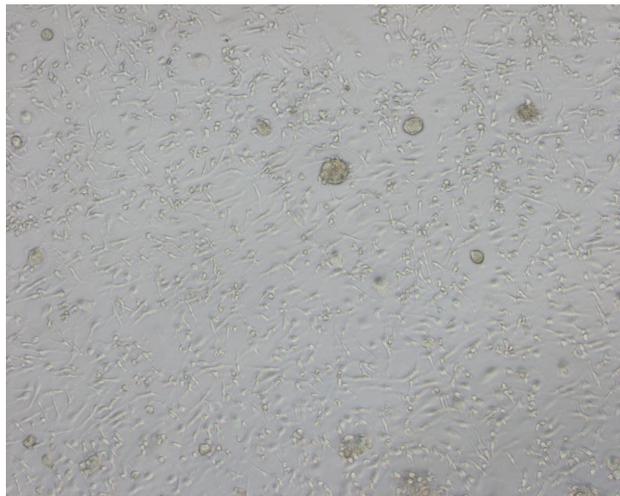
Die bisherigen Versuche wurden in 96er-Well-Platten durchgeführt, die aus Kunststoff bestanden. Die Wachstumsfläche pro Well beträgt $0,36\text{cm}^2$. Es sollte versucht werden, die CD133 positiven Stammzellen nach vier Wochen Expansion in den sogenannten CultureSlides (BD Falcon) mit acht Kammern zur Differenzierung auszusäen. Diese Gefäße bestehen aus einem Glas-Objektträger mit fixiertem Kammer-Aufsatz aus Kunststoff. Die Wachstumsfläche pro Kammer beträgt $0,69\text{cm}^2$. Jede Kammer wurde mit FN vorbeschichtet.

Für dieses Experiment wurden die Differenzierungsmedien: EBM-1 +VEGF +Ang-1, EBM-1 +VEGF +Ang-2, EBM-1 +VEGF und LBMCM +VEGF verwendet. Im Vergleich dazu wurde das gleiche Experiment mit einer 96-Well-Platte als Kulturgefäß durchgeführt.

Bei den ChamberSlides waren nach wenigen Tagen differenzierte Zellen bei allen EBM-1-haltigen Medien anzutreffen. Die Zellen in EBM-1 +VEGF +Ang-1 differenzierten mäßig im Vergleich zu den in EBM-1 +VEGF aufgenommenen Zellen. Beiletzterer Kombination waren viel mehr differenzierte Zellen anzutreffen, und dies ließ sich bis zum Versuchabschluss nach vier Wochen immer noch beobachten. Das

Differenzierungsmedium aus LBMCM und VEGF hatte wenig Effekt auf die ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen.

A



B

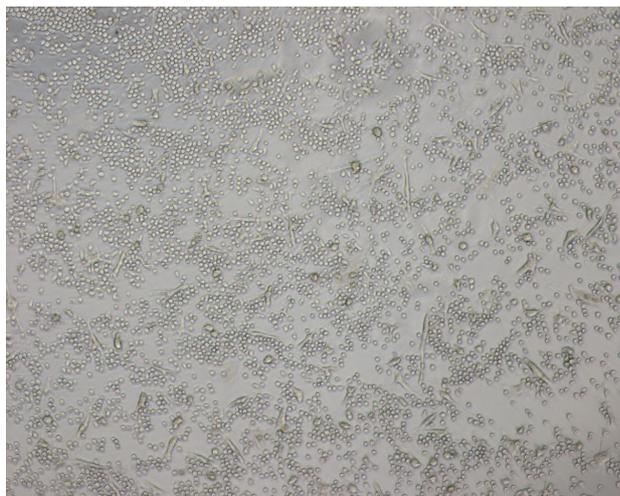


Abbildung 14: Endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen im Medium EBM-1 +VEGF im ChamberSlide (A) und in der kunststoffhaltigen Platte (B) (10 x Vergrößerung). Die Aufnahme erfolgte 4 Wochen nach Ansetzen der Experimente. Es zeigt sich eine deutlich stärkere endotheliale Differenzierung in der Abbildung A.

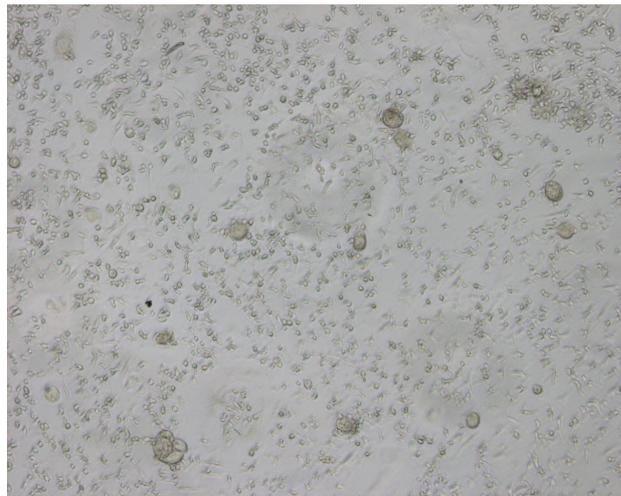
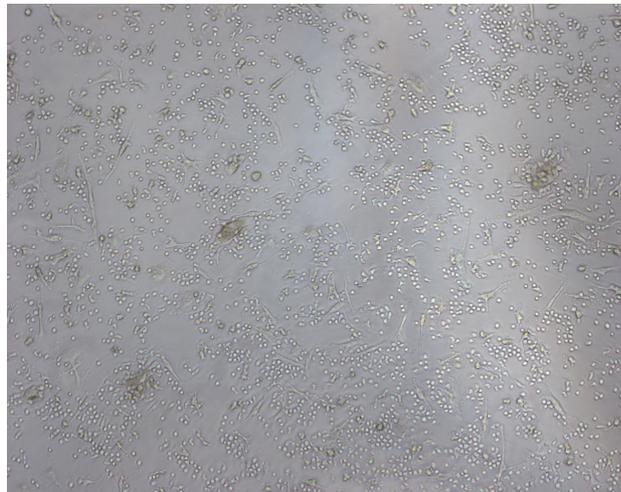
A**B**

Abbildung 15: Endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen im Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 im ChamberSlide (A) und in der kunststoffhaltigen Platte (B) (10 x Vergrößerung). 4 Wochen nach Aufnahme im Differenzierungsmedium waren noch zahlreiche morphologisch undifferenzierte Zellen im Chamber Slide zu sehen. In der Multi-Well-Platte war der Differenzierungsvorgang fortgeschrittener.

Die Zellen in den ChamberSlide ließen sich zum größten Teil nicht mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes ablösen. Von den Zellen, die sich ablösen ließen, ging die Mehrheit zu Grunde, weshalb keine zuverlässigen Zellzahlen ermittelt werden konnten. Beschränkt man sich auf dem qualitativen Vergleich der Kulturgefäße untereinander, so lässt sich insgesamt sagen, dass viel mehr Endothelzellen in den ChamberSlides als in den Kunststoff-Platten anzutreffen waren. Bei den ChamberSlides war das Medium bestehend aus EBM-1 und VEGF am besten, während LBMCM +VEGF die endotheliale Differenzierung der Zellen kaum induzierte. Bei den 96-Well-Platten konnte das Differenzierungsmedium EBM-1 +VEGF +Ang-1 die endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen am stärksten induzieren.

2.3.2 Differenzierung der Zellen aus den Medienüberständen

Beim regelmäßigen Mediumwechsel wird in etwa die Hälfte des Mediumvolumens, der sogenannte Überstand, verworfen und es wird frisches Medium zugegeben. Der Überstand enthält morphologisch undifferenzierte Zellen. Die Frage war, ob durch Wiederaufnahmen dieser Zellen im Differenzierungsmedium weitere Endothelzellen entstehen können, was langfristig eine hohe Ausbeute an Endothelzellen mit sich bringen könnte. Im folgenden Abschnitt wird auf diese Möglichkeiten der Optimierung des Differenzierungsprozesses der ex-vivo CD133 positiven Stammzellen eingegangen. Dazu wurden die CD133 positiven Stammzellen im Anschluss auf die 4-wöchige Expansion in den folgenden Differenzierungsmedien aufgenommen: LBMCM +VEGF, EBM-1 +VEGF, EBM-1 +VEGF +Ang-1 und EBM-1 +VEGF +Ang-2. Die Kultur erfolgte in mit FN vorbeschichteten Wells von 96-Well-Platten.

Für unseren Ansatz wurde aus jedem Well der gesamte Mediumüberstand abgenommen. Es wurde ausgiebig nachgespült. Dann erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Kammer. Anschließend wurden die Zellen in den entsprechenden Differenzierungsmedien aufgenommen und wieder ausplattiert. 3 Wochen nach diesem neuen Ansatz wurde die Endothelzellzahl mit dem Raster in Form eines Kreischnittes bestimmt. Bei den nach 2 Wochen Differenzierung aus den Überständen abgenommenen Zellen bewirkte das Differenzierungsmedium LBMCM +VEGF anfangs die Proliferation der Zellen. Die Differenzierung der Zellen setzte erst nach ca. zweieinhalb Wochen ein und somit ergab sich eine geringe Ausbeute an

endothelialen Zellen. Bei den EBM-1-haltigen Medien waren schon ein paar Tage nach Aufnahme in den Differenzierungsmedien endotheliale Zellen vorhanden. Der stärkste Differenzierungseffekt war dem Differenzierungsmedium EBM-1 +VEGF +Ang-1 zuzuschreiben, das bewirkte, dass sich insgesamt 9,19% der wiederausgesäten Zellen aus dem Überstand differenzierten. Diese Prozentzahl bezieht sich auf die Anzahl der abgeernteten Zellen aus dem Mediumüberstand bezogen. Dies gilt auch für die weiteren Zahlen, die in diesem Abschnitt aufgeführt sind.

Bei den nach drei Wochen Differenzierung abgenommenen Zellen aus den Überständen bewirkten die EBM-1-haltigen Differenzierungsmedien nach wenigen Tagen die endotheliale Differenzierung der Zellen. Von allen 3 Differenzierungsmedien war EBM-1 +VEGF +Ang-2 mit einer Differenzierungsquote von 42,04% am effizientesten. Die Kombination von LBMCM mit VEGF bewirkte anfangs die Proliferation der Zellen. Nach 1 Woche waren die ersten Endothelzellen anzutreffen, wobei die Differenzierungsquote mit 18,54% am niedrigsten war.

Zur Veranschaulichung sind die Zahlen in den folgenden Abbildungen dargestellt.

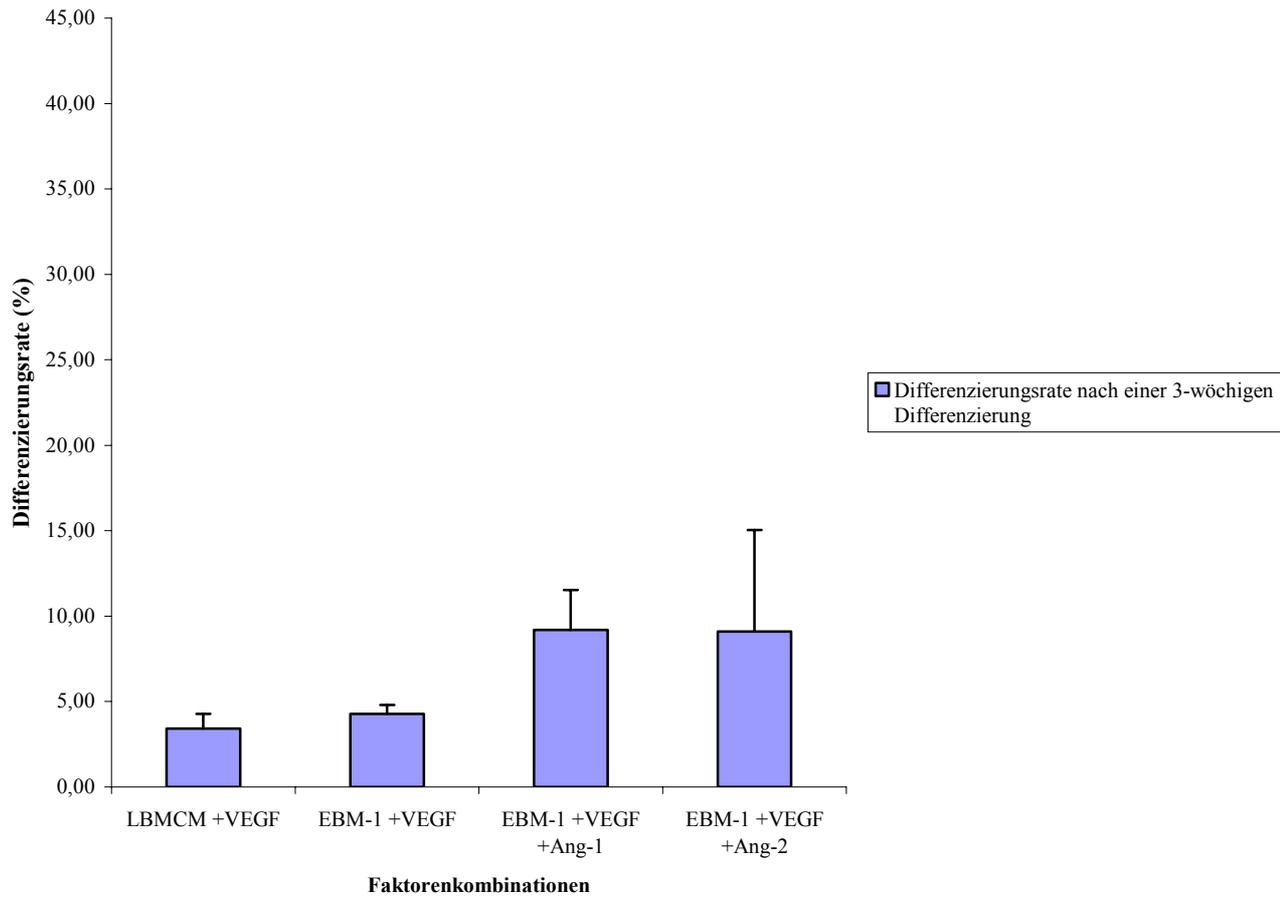


Abbildung 16: Differenzierungspotential der sechs Wochen alten Zellen aus den Überständen der Differenzierungsmedien (n=2). Das Differenzierungsmedium EBM-1 +VEGF +Ang-1 war der beste Induktor der endothelialen Differenzierung der Zellen mit einer Differenzierungsquote von 9,2%. Bei EBM-1 +VEGF +Ang-2 differenzierten sich 9,1%, bei EBM-1 +VEGF 4,3% und bei LBMCM +VEGF 3,4%

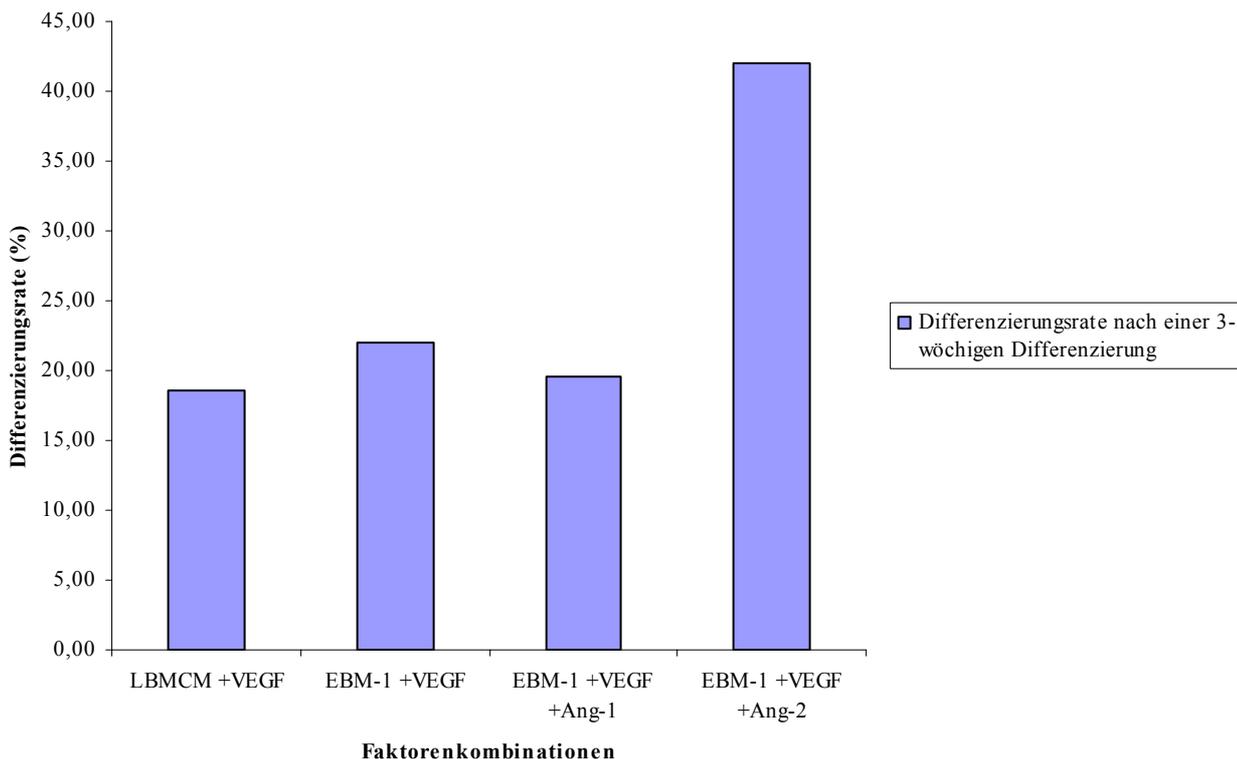


Abbildung 17: Differenzierungspotential der sieben Wochen alten Zellen aus den Überständen der Differenzierungsmedien (n=3). Das Differenzierungsmedium EBM-1 +VEGF +Ang-2 hatte mit einer Differenzierungsquote von 42,04% den besten Differenzierungseffekt. Bei EBM-1 +VEGF differenzierten sich 22,03%, bei EBM-1 +VEGF +Ang-1 19,62% und bei LBMCM +VEGF 18,54% der Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellen im Überstand sich endothelial ausdifferenzieren können. Bei den nach zwei Wochen abgenommenen Zellen war das Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 am besten. Bei den Zellen aus dem Überstand, die 1 Woche später abgenommen wurden, induzierte das Medium EBM-1 +VEGF +Ang-2 deren endotheliale Differenzierung am besten. Die Kombination von LBMCM mit VEGF hatte hauptsächlich einen proliferativen Effekt. Beim Betrachten beider Populationen zeigte sich, dass der beste Differenzierungseffekt bei den nach 3 Wochen Differenzierung abgenommenen Zellen erreicht wurde. Diese Zellen stellen eine weitere Quelle für Endothelzellen dar.

Im zweiten Abschnitt der Aufführung der Ergebnisse wurde gezeigt, dass von allen untersuchten Differenzierungsmedien dasjenige bestehend aus EBM-1, VEGF und Ang-1 die endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen am stärksten induzierte. Die Versuche, dieses Medium weiterhin bezüglich seines Differenzierungseffekts zu optimieren, waren erfolglos. Es

wurde außerdem versucht, die ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen auf glashaltigem Boden zu differenzieren. Zwar beschränkten sich die Untersuchungen auf zwei Patienten, aber es zeigte sich, dass sich viel mehr Zellen ausdifferenzierten als auf kunststoffhaltigem Boden, vor allem unter dem Einfluss von EBM-1 +VEGF. Eine weitere Möglichkeit, die Ausbeute an Endothelzellen zu erhöhen, boten die in den Überständen der Differenzierungsmedien enthaltenen Zellen. Sie vermochten sich weiterhin endothelial zu differenzieren. Insbesondere die nach einem dreiwöchigen Differenzierungsansatz abgenommenen Zellen zeigten eine starke endotheliale Differenzierung mittels EBM-1 +VEGF +Ang-2.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit humanen, ex-vivo expandierten CD133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen gearbeitet. Es wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass es weitere Zellarten gibt, die die Eigenschaft besitzen, sich endothelial auszdifferenzieren: die CD14 positiven monozytären Zellen und die mononukleären Zellen aus Blutprodukten. Es stellte sich die Frage, ob das entwickelte und untersuchte Differenzierungsmedium EBM-1 +VEGF +Ang-1 eine ebenso hohe Differenzierungsrate bei diesen Zellarten induzieren könnte. Es wäre vor allem bedeutend zu wissen, ob diese Zellarten sich besser differenzieren als die ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen. In dem kommenden Abschnitt werden diese Aspekte untersucht.

3. Untersuchung des Differenzierungsverhaltens der CD14 positiven Monozyten und der mononukleären Zellen aus Buffy Coat

3.1 Beurteilung der Zellen am Umkehrmikroskop und Quantifizierung der differenzierten Zellen

Die monozytären, CD14 positiven Zellen und die mononukleären Zellen (MNCs) wurden unmittelbar nach ihrer Aufreinigung differenziert. Dazu wurden sie à 5×10^5 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte in den verschiedenen Differenzierungsmedien aufgenommen. Zum Vergleich wurden vier Wochen ex-vivo expandierte CD133

positive Stammzellen benutzt. Die Experimente beschränkten sich auf zwei Differenzierungsmedien: LBMCM + VEGF und EBM-1 + VEGF + Ang-1.

Im Rahmen dieses Versuches wurden die frischen CD133 positiven Stammzellen mituntersucht, da es nach wie vor wichtig ist, zu wissen, wie hoch deren Differenzierungspotential ist, und ob das Medium EBM-1 + VEGF + Ang-1 ihre endotheliale Differenzierung besser als LBMCM + VEGF anregt. Die Auswertung erfolgt qualitativ durch regelmäßiges Protokollieren der Beobachtungen, sowie quantitativ mit dem Raster in Form eines Kreisabschnittes.

Ca. drei Tage nach Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen waren die ersten Endothelzellen bei EBM-1 + VEGF + Ang-1 anzutreffen: nach drei Wochen im Differenzierungsmedium hatten sich 1,2% der Zellen ausdifferenziert. Das LBMCM + VEGF entfaltete seine Wirkung nach ca. 1 Woche, aber erreichte mit 0,7% eine niedrigere Differenzierungsquote als EBM-1 + VEGF + Ang-1. Bei den frischen hämatopoetischen Stammzellen starb anfangs ein Teil der Zellen ab, so dass die Differenzierung zu einem späteren Zeitpunkt einsetzte. Die in LBMCM + VEGF aufgenommenen Zellen differenzierten sich zu 0,1%, während sich bei EBM-1 + VEGF + Ang-1 0,8% der Zellen differenzierten.

Nach ein paar Tagen in den Differenzierungsmedien entstanden die ersten endothelialen Zellen aus den MNCs. Die differenzierten Zellen waren morphologisch schmaler und länglicher als die aus den hämatopoetischen Stammzellen entstandenen endothelialen Zellen. EBM-1 + VEGF + Ang-1 war mit einer Differenzierungsquote von 1,6% dem Differenzierungsmedium aus LBMCM mit VEGF überlegen. Das LBMCM bewirkte eine Differenzierungsquote von 1%. Besonders auffällig bei den MNCs war die Tatsache, dass die Wells voll waren von kleinen, rundlichen Zellen waren, die Monozyten ähnelten.

Die höchste Differenzierungsrate zeigten die monozytären, CD14 positiven Zellen. Ein paar Tage nach Ansetzen der Experimente differenzierten sie sich aus. Die differenzierten Zellen waren Nervenzellen morphologisch ähnlich: aus dem fast rundlichen Zellkörpern schienen mehrere Ausläufer zu entspringen. Beim Abschluss des Versuches waren nur noch wenige runde Zellen vorhanden. Das EBM-1 + VEGF + Ang-1 hatte mit einer Differenzierungsquote von 2,1% den besten Effekt, gefolgt von LBMCM + VEGF mit 0,8%.

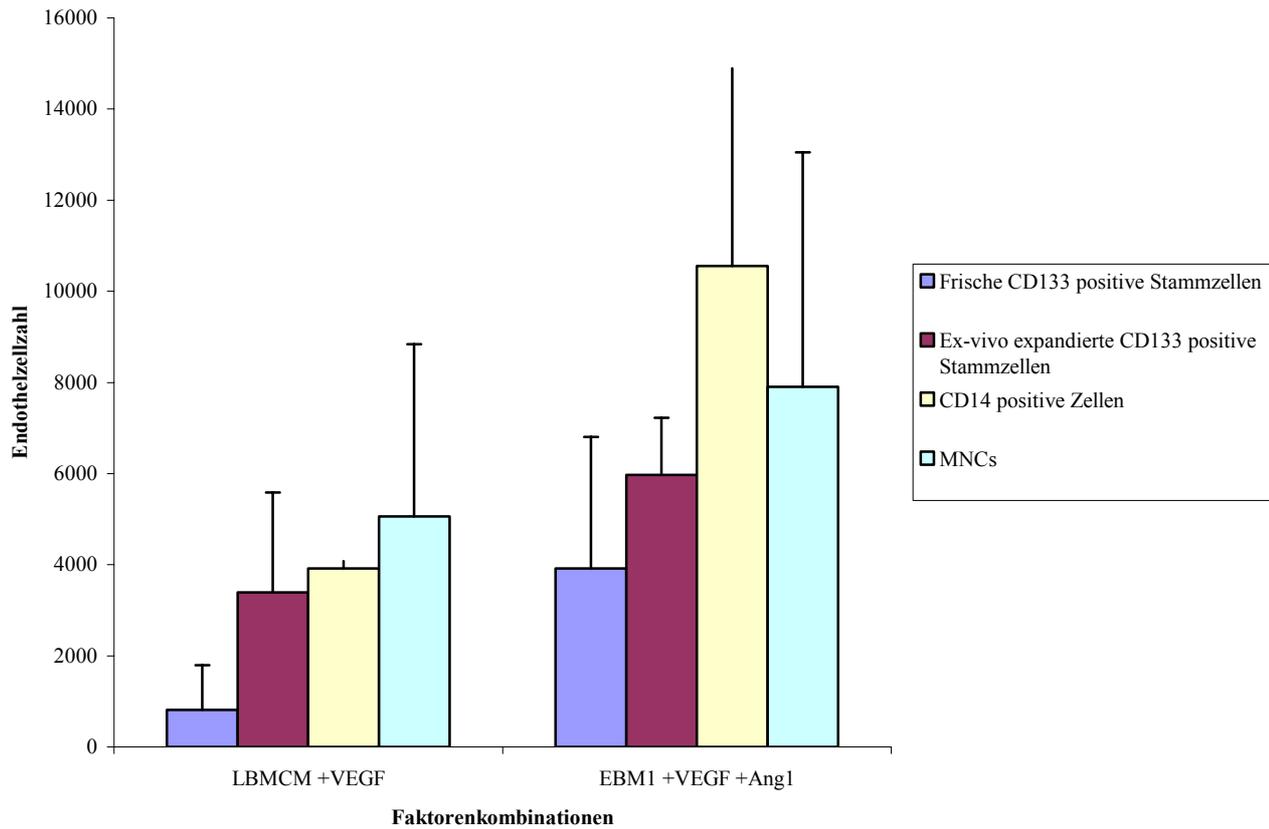


Abbildung 18: Vergleich des Differenzierungsverhaltens der frischen CD 133+ Stammzellen, der ex-vivo expandierten CD 133+ Stammzellen, der CD 14+ Zellen und der mononukleären Stammzellen mit den den Differenzierungsmedien LBMCM +VEGF und EBM-1 +VEGF +Ang-1 (n=2). Nach drei Wochen in Kultur zeigte sich bei allen Zellpopulationen ein besseres Differenzierungsverhalten unter EBM-1 +VEGF +Ang-1. Die monozytären, CD 14+ Zellen zeigten eine höhere Differenzierungsquote als die bisher untersuchten expandierten hämatopoetischen Stammzellen.

A



B



C



Abbildung 19: Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen (A), MNCs (B) und CD14 positiven Zellen im Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1(C) (10 X Vergrößerung). Bei den MNCs waren bis zum Versuchabschluss kleine runde Zellen zu sehen.

Die frischen hämatopoetischen, CD133 positiven Stammzellen unterschieden sich von den anderen Zellarten dadurch, dass sie sich am wenigsten differenzierten. Es war dennoch zu sehen, dass das Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 eine bessere Wirkung auf diese Zellen hatte als LBMCM +VEGF.

Bei den MNCs waren insgesamt viel mehr differenzierte Zellen zu sehen als bei den frischen und den ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen. Die aus den MNCs entstandenen endothelialen Zellen zeigten eine längliche und schmalere Zellmorphologie.

Von allen Zellarten differenzierten sich die CD14 Zellen am stärksten in dem Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 aus.

3.2 Charakterisierungen der differenzierten Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung

Endothelzellen definieren sich durch die Expression bestimmter Oberflächenantigene wie z.B. von-Willebrand-Faktor (vWF) und VE-Cadherin. Deshalb sollte versucht werden, morphologisch endothelial differenzierte Zellen aus den ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen und den CD 14 positiven Zellen bezüglich der Expression dieser Marker zu untersuchen. Dazu wurden Zytospins angefertigt, und die

Zellen wurden mit Antikörpern inkubiert, die gegen typische Endothelmarker gerichtet waren. Aufgrund der geringeren Menge an Zellen und ihrer Empfindlichkeit konnten die Ansätze mit frischen CD133 positiven Stammzellen nicht auf Zytospins überführt und dementsprechend nicht markiert werden. HUVECs dienten als Positivkontrolle: sie zeigten eine hohe Expression von vWF mit 65,2% und VE-Cadherin mit 72%

Die ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen, die sich in LBMCM +VEGF differenziert hatten, exprimierten vWF zu 50%, und VE-Cadherin hingegen kaum. Bei EBM-1 +VEGF +Ang-1 waren sie für beide Marker positiv: vWF wurde zu 76,3% und VE-Cadherin zu 45,8% exprimiert.

Die CD14 positiven Zellen, die sich im LBMCM +VEGF differenziert hatten, exprimierten vWF zu 67%. Nur 8% dieser Zellen waren für VE-Cadherin positiv. Unter EBM-1 +VEGF +Ang-1 exprimierten 55,6% der Zellen vWF und 32,3% VE-Cadherin. Diese Ergebnisse sind zum Überblick in folgenden Tabellen aufgeführt.

Tab.17 : Expressionsrate von vWF und VE-Cadherin in dem Differenzierungsmedium mit VEGF

Zellpopulationen	vWF	VE-Cadherin
HUVECs	65,2%	72%
Ex-vivo expandierte CD133+ Zellen	50%	-/-
CD14+ Zellen	67%	8%

Tab.18 : Expression von vWF und VE-Cadherin in dem Medium bestehend aus EBM-1 mit VEGF und Ang-1

Zellpopulationen	vWF	VE-Cadherin
HUVECs	65,2%	72%
Ex-vivo expandierte CD133+ Zellen	76,3%	45,8%
CD14+ Zellen	55,6	32,3%

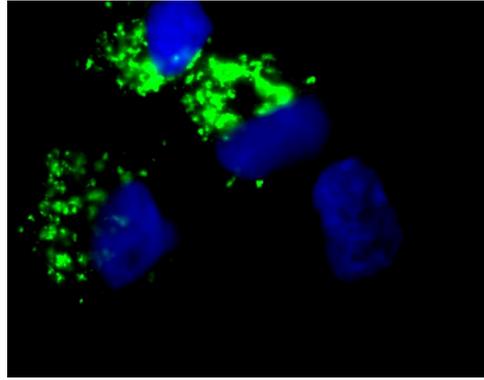


Abbildung 20: Darstellung von Zellen, die vWF exprimieren (100 x Vergrößerung).

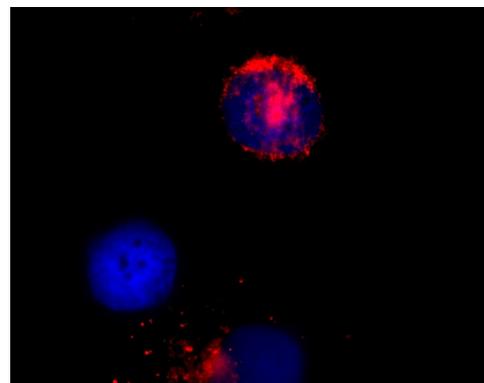


Abbildung 21: Darstellung von Zellen, die VE-Cadherin exprimieren (100 x Vergrößerung)

E Diskussion

Endothelzellen sind flache Zellen, die die Innenfläche von Blut- und Lymphgefäßen auskleiden (Rohen, Lütjen-Drecoll, 1999). Eine Eigenschaft von Endothelzellen ist ihre Kontraktionsfähigkeit. Dies ist auf die Intermediär- und Aktinfilamente in ihrem Zytoplasma zurückzuführen (Junqueira, Carneiro, 2004; Welsch, 2005). Endothelzellen exprimieren zahlreiche Proteine, unter anderen vWF, ein Transportprotein für Faktor VIII, der in den Gerinnungsprozess involviert ist (Ingram et al, 2004). Neben vWF wird ein Zell-Zell- Adhäsionsmolekül gebildet, das VE-Cadherin (Esser et al., 1998). Cadherine sind eine Familie integraler Membranproteine. E-cadherine sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle für die Aufrechterhaltung eines epithelialen Zellverbundes (Schiebler, 2005).

Durch bestimmte angiogene Faktoren regen die Tumorzellen benachbarte, nicht maligne Endothelzellen zur Proliferation und Migration an (Folkman et al., 1987; Pepper et al., 1997). Das invasive Wachstum und die Metastasierung beim humanen kolorektalen Karzinom beruht auf der Tumorangiose, so dass ein Hauptprinzip der Therapie in der Suppression dieses Prozesses besteht (Rmali et al, 2007). Eine andere medizinische Anwendung stellt die autologe Transplantation von EPCs bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit und ischämischer Herzerkrankung dar. Die EPCs induzierten über die Vaskulogenese die Revaskularisierung der betroffenen Gewebe, ohne signifikante Nebenwirkungen zu haben (Tatsumi et al., 2006).

Basierend auf diesem Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit ein die endotheliale Ausdifferenzierung von ex-vivo expandierten hämatopoetischen, CD133 positiven, Stammzellen induzierendes Medium entwickelt. Die in diesem Medium entstandenen Zellen wurden mittels eines von der Arbeitsgruppe angefertigten Rasters quantifiziert und bezüglich der typischen Endothelzellmarker vWF und VE-Cadherin immunhistochemisch charakterisiert.

Da die Untersuchung der verschiedenen Differenzierungsmedien eine hohe Ausbeute von CD133 positiven Stammzellen erforderte, beschlossen wir die immunmagnetischen isolierten Stammzellen zu expandieren. Butzal et al. verwendeten im Rahmen ihrer Experimente ein Expansionsmedium, das mit FLT3L, SCGF und VEGF supplementiert war (Butzal et al., 2004). Wir vermehrten die Zellen in demselben Medium und es zeigte sich, dass die 4 Wochen lang expandierten Zellen für die Durchführung der Versuche am geeignetesten waren.

In unserer Arbeitsgruppe wurde ebenfalls das von Fernandez und seiner Arbeitsgruppe beschriebene Differenzierungsmedium verwendet. Das beschriebene Medium war lediglich mit VEGF supplementiert und konnte die endotheliale Transdifferenzierung von CD14 positiven, monozytären Zellen induzieren (Fernandez Pujol et al., 2000). Dieses Medium wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe zur Differenzierung frischer und ex-vivo expandierter CD133 positiver Stammzellen erfolgreich verwendet. In der vorliegenden Arbeit diente dieses Medium als Kontrolle, um die Effizienz des neu entwickelten Differenzierungsmediums zu belegen.

Die initiale Zelldichte erwies sich als wichtig für die Differenzierung der Zellen. Es zeigte sich, dass eine initial eingesäte Zellzahl von 5×10^5 pro Well einer 96er-Well-Platte zu den meisten differenzierten Zellen führte.

Zur Quantifizierung der differenzierten Zellen entwickelten wir zwei Methoden:

Das Raster in Form eines Quadrats erwies sich in der Auszählung als zu approximativ. Da die meisten Zellen in dem Zentrum des Wells anzutreffen waren, lieferte es keine für das Well repräsentativen Zahlen. Das neu entwickelte Raster in Form eines Kreisabschnittes (Winkel: 20 Grad) wurde dem anderen Raster gegenüber gestellt.

Es gibt in der gegenwärtig vorliegenden Literatur keine Arbeit, welche eine ähnliche Quantifizierungsmethode für die aus ex-vivo entstandenen Endothelzellen beschreibt. Nur Sun et al. entwickelten ein vergleichbares Quantifizierungssystem, um die von bFGF und VEGF getriggerten gefäßähnlichen Strukturen von humanen mikrovaskulären Endothelzellen zu quantifizieren. Hierbei wurde ein Kreis in Abschnitte unterteilt, die jeweils einem Winkel von 10 Grad entsprachen, wobei die aufgetragenen Geraden graduiert waren. Sie suchten sich sechs Abschnitte pro Well einer 24er-Well-Platte aus und fotografierten sie, um die tubulären, gefäßartigen Strukturen in jedem Kreisabschnitt zu messen. Der angiogene Effekt ergab sich aus der Summe der Messungen in allen 36 Abschnitten (Sun et al., 2004).

Um die Endothelzellzahl einschätzen zu können, war es wichtig, dass die Zellen am Zeitpunkt der Quantifizierung ein hohes Maß an Vitalität aufwiesen. Unsere Versuche zeigten, dass sich die Zellen bis 4 Wochen nach Ansetzen des Differenzierungsversuches ausdifferenzierten, aber dass sie zunehmend seneszent wurden. Dies deutete darauf hin, dass die Quantifizierung der endothelialen Differenzierung vor diesem Zeitpunkt günstiger wäre. Unsere Kurve zeigte anhand der Steigung, dass dies ca. drei Wochen nach Beginn des Differenzierungsversuches durchzuführen war, weil die Zellen an diesem Zeitpunkt vital waren und sich am

schnellsten und am stärksten ausdifferenzierten. Dies ließ sich trotz der interindividuellen Schwankung am Umkehrmikroskop wiederholt beobachten. Zur Zeit liegt keine vergleichbare Studie vor, die diese Aussage stützt oder ihr widerspricht.

Wir führten Experimente mit dem Grundmedium EGM-2 durch, das nach Zusatz von FBS, Pen/Strep und Ampho B als EBM-1 bezeichnet wurde. Die Gegenüberstellung von EBM-1 mit dem herkömmlichen Differenzierungsmedium mit VEGF zeigte die deutliche Überlegenheit des neu entwickelten Mediums.

Wir supplementierten das neue Medium mit zahlreichen Zytokinen, wobei sich die Kombination mit VEGF und Ang-1 sowohl qualitativ am Umkehrmikroskop als auch quantitativ wiederholt als die effektivste erwies. Es zeigte sich ferner eine deutliche Überlegenheit dieses Mediums gegenüber dem herkömmlichen Medium mit VEGF als Zytokin. Dies ließ sich mit dem T-Test statistisch belegen ($p < 0,05$). Bisher ist keine Veröffentlichung bekannt, die beide Medien zu den in dieser Arbeit beschriebenen Rahmenbedingungen hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit vergleicht.

Das Differenzierungsmedium bestehend aus EBM-1, VEGF, Ang-1 und SCF erreichte ähnliche Werte wie die Kombination ohne SCF. Allerdings war der Unterschied zum Kontrollemedium LBMCM +VEGF mit einem p-Wert von 0,08 nicht statistisch signifikant.

Zwecks weiterer Optimierung des Differenzierungsmediums mit VEGF und Ang-1 setzten wir das Konzept der sequentiellen Supplementierung ein, nach einer gewissen Differenzierungszeit zusätzlich supplementiert wurden, um den angiogenen Effekt zu steigern. Dieses Vorgehen zeigte aber keinen zusätzlichen Effekt. In einigen Fällen gab es sogar in einigen Fällen einen Rückgang der endothelialen Differenzierung. Ferner erzielte das Medium bestehend aus EBM-1 supplementiert mit VEGF und Ang-1, das in diesem Versuch als Kontrolle diente, nach wie vor den höchsten Differenzierungseffekt.

Das Supplementieren von EBM-1 mit einem doppelten Serumgehalt zeigte ebenfalls kein besseres Ergebnis, sondern führte sogar zu einem deutlichen Rückgang der Differenzierungsrate.

Mit der Frage, ob die Bodenbeschaffenheit des Kulturbedältnisses einen weiteren, für die Differenzierung der Zellen bedeutenden Parameter darstellen könnte, säten wir die vier Wochen ex-vivo expandierten CD133 + Zellen in den gläsernen ChamberSlides aus. Das Medium bestehend aus EBM-1 mit VEGF und Ang-1 erreichte eine bessere

Differenzierung der Zellen auf den Plastikböden der Multi-Well-Platte. Das EBM-1 Medium mit VEGF allein supplementiert erwies sich dagegen in den Chamber Slides, dem gleichen Medium mit Ang-1 als zusätzliches Zytokin überlegen. Insofern ließ sich eine Überlegenheit des Glasbodens gegenüber den Plastikplatten, die mit Fibronectin beschichtet waren, nicht beweisen. Ein weiteres Konzept zur Steigerung des Differenzierungsverhaltens der ex-vivo expandierten CD133 + Stammzellen bestand darin, die im Mediumüberstand enthaltenen Zellen nach einem Zeitraum von zwei bzw. drei Wochen im Differenzierungsmedium abzunehmen und erneut auszusäen, mit der Überlegung, dass sie sich auf diese Weise doch noch aufdifferenzieren konnten. Wir führten dieses Experiment für jeden Zeitpunkt je zweimal durch. Die Quantifizierung erfolgte nach drei Wochen mit dem Raster in Form eines Kreisausschnitts. Die nach drei Wochen im Differenzierungsmedium wieder ausgesäten Zellen differenzierten sich insgesamt stärker aus als die eine Woche früher abgenommenen Zellen. Die im Rahmen dieser Versuche erreichten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass dieses Konzept, systematisch umgesetzt, zu einer Steigerung Ausbeute an Endothelzellen führen könnte.

Für alle im Rahmen der Optimierung des EBM-1 mit VEGF und Ang-1 ergab sich kein statistisch signifikanter p-Wert, obwohl die Versuche mindestens zweimal durchgeführt wurden. Dies könnte an der interindividuellen Streuung des Differenzierungsverhaltens der Zellen liegen. Zur Durchführung unserer Versuche verwendeten wir Blutproben von sowohl gesunden Probanden als auch Patienten, was eine nicht unbedeutende Rolle für die Ergebnisse spielen könnte.

In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten, die weitere Quellen für Endothelzellen beschreiben: Shintani et al. waren der Auffassung, dass aus dem peripheren Blut isolierte mononukleäre Zellen sich in Endothelzellen differenzieren konnten (Shintani et al., 2001). In der Literatur wird beschrieben, dass CD14 + Zellen endotheliale Progenitorzellen darstellen (Fernandez et al., 2000; Rehman et al., 2003; Rogmanani et al., 2006). Auf diese Angaben stützend isolierten wir die jeweiligen Zellpopulationen und brachten sie in die Differenzierungsmedien ein. Dazu nahmen wir die frischen und ex-vivo expandierten CD133+ Stammzellen zum Vergleich und als Kontrolle. Das Medium EBM-1 mit VEGF und Ang-1 erwies sich als effizienter als das herkömmliche Medium bei allen Populationen und es zeigte sich, dass die CD14 + Population sich am stärksten endothelial ausdifferenzierte.

Die morphologisch differenzierten Zellen aus den ex-vivo expandierten CD133 + Stammzellen, CD14 + Zellen und mononukleären Zellen wurden immunhistochemisch angefärbt, wobei HUVECs dienten als Kontrolle.

Bei den ex-vivo expandierten Stammzellen, die in EBM-1 +VEGF +Ang-1 eingebracht worden waren, exprimierten 76,3% der Zellen vWF und 45,8% davon VE-Cadherin. Diese Zahlen decken sich nicht ganz mit denen, die im Rahmen einer Promotionsarbeit in unserer Arbeitsgruppe erhalten wurden: dabei waren 97% der Zellen für vWF positiv, und 36% für VE-Cadherin. Während die Zellen, die sich im herkömmlichen Medium differenziert hatten, vWF zu 50% und VE-Cadherin kaum exprimierten, wurde früher in unserer Arbeitsgruppe eine Expressionsrate deutlich höher als 99% bestimmt (Selektion, ex-vivo Expansion und Analyse der Differenzierungskapazität humaner CD 133 positiver Stammzellen aus dem peripheren Blut, vorgelegt von Frau Dr. rer. Nat. Dr. med. S. Loges, Hamburg 2004).

Schmeisser et al. färbten differenzierte CD14+ Zellen an, die in einem Differenzierungsmedium mit 20% FBS, bFGF, VEGF und IGF-1 eingebracht worden waren, und sie exprimierten vWF zu 94,2% und VE-Cadherin zu 89,7% (Schmeisser A. et al., 2001). Fernandez et al. färbten ebenso CD14 + Zellen an, die sich allerdings in dem herkömmlichen Medium mit VEGF differenziert hatten: Sie notierten (ohne Zahlangabe) eine deutliche Expression beider Marker (Fernandez Pujol et al., 2000). In Rahmen dieser Arbeit exprimierten 67% der Zellen in diesem Medium vWF und lediglich 8% der Zellen VE-Cadherin. In dem neu entwickelten Medium exprimierten 55,6% der Zellen vWF und 32,8% von ihnen VE-cadherin.

Eine mögliche Erklärung für diese starke Streuung der Expressionsrate könnte die zur Verfügung stehende Anzahl an Zellen darstellen, die in keiner der hier aufgeführten Literaturodaten nachzuvollziehen war. Außerdem ist die Ermittlung dieser Zahl sehr vom Untersucher abhängig, was eine bedeutende Fehler- bzw. Streuungsquelle darstellt. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die hier angegebenen Arbeitsgruppen Reagenzien von verschiedenen Firmen benutzt haben könnten. Trotzdem lässt sich sagen, dass die Zellen aufgrund der Expression von endothelialen Markern Endothelzellen entsprechen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die endotheliale Differenzierung von CD133 positiven Stammzellen optimiert werden konnte. Von den von uns entwickelten Konzepten um unser Ziel zu erreichen, erwies sich die Option der Supplementierung des Differenzierungsmediums als am erfolgreichsten. Das neue Grundmedium, von

unserer Arbeitsgruppe als EBM-1 bezeichnet, wurde mit verschiedenen Faktoren beschickt. Mit den Zytokinen VEGF und Ang-1 supplementiert bewirkte es eine Differenzierungsrate von bis zu 2,3%, gegenüber dem herkömmlichen Medium LBMCM mit VEGF, dessen Differenzierungsrate lediglich 0,9% betrug. Die endotheliale Differenzierung der CD133 positiven Stammzellen ließ sich unter diesem Medium um den Faktor 2,5 steigern.

Das von unserer Arbeitsgruppe eingeführte Medium führte zu einer höheren Ausbeute an Endothelzellen. Dadurch kann es in der Zukunft möglich werden, dass klinisch relevante Mengen an therapeutisch einsetzbaren autologen Endothelzellen für Patienten bereitgestellt werden können.

F Zusammenfassung

Gefäßerkrankungen beruhen in den meisten Fällen pathophysiologisch auf arteriosklerotischen Veränderungen. Diese Vorgänge, bei denen Zellen absterben, führen letztendlich zur Minderdurchblutung und im schlimmsten Fall zur Nekrose der zu versorgenden Organe. Zur Therapie stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: darunter ist in den letzten Jahren der Konzept der Transplantation von Endothel- und Endothelprogenitorzellenerforscht worden. In diesem Sinne sollten in der vorliegenden Arbeit zuvor ex-vivo expandierte CD 133 positive Stammzellen endothelial differenziert werden. Es sollte eine möglichst hohe Ausbeute an Endothelzellen erreicht werden, dass Patienten sowohl als Donor für Endothelprogenitorzellen als auch als Empfänger der infolge Differenzierung entstandenen Endothelzellen fungieren. Auf diese Weise könnte das mit der allogenen Transplantation verbundene Problem der immunologischen Abstoßungsreaktion umgangen werden, wodurch immer mehr Patienten geholfen werden könnte.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Endothelzellen abzuernten, wurden die immunmagnetisch aufgetrennten CD 133 positiven Stammzellen 4 Wochen lang in einem Expansionsmedium kultiviert. Sie wurden anschließend in verschiedenen von uns zusammengesetzten Differenzierungsmedien aufgenommen. Unter Verwendung eines Umkehrmikroskops konnten wir den Differenzierungsvorgang verfolgen, der sich schon ab dem dritten Tag nach Beginn des Experiments in Gang setzte. Er konnte außerdem mit Hilfe eines von unserer Arbeitsgruppe angefertigten Rasters in Form eines Kreisabschnittes quantifiziert werden. Die Kombination des Mediums EBM-1 mit VEGF und Ang-1 erwies sich mit einer Differenzierungsrate von 2,3% als effizienter als das herkömmliche Differenzierungsmedium bestehend aus LBMCM und VEGF mit lediglich 0,9% Differenzierung.

Um die Differenzierungseffizienz des neu entwickelten Differenzierungsmediums weiterhin zu steigern, verdoppelten wir dessen Serumgehalt. Mit derselben Überlegung beschlossen wir beim Ansatz der verschiedenen Medien die zugehörigen Zytokine sequentiell zuzugeben. Beide Methoden brachten keine nennenswerten Ergebnisse mit sich.

Wir verglichen das bisher untersuchte Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 Stammzellen auf plastikhaltigem mit dem auf glashaltigem Boden. Qualitativ ließ sich eine etwas stärkere Differenzierung der Zellen auf glashaltigem

Boden nachweisen, wobei zu bedenken war, dass die Kulturfläche der ChamberSlides fast doppelt so hoch ist wie die der Plastikplatten. Mit der Überlegung, dass die in den Medienüberständen enthaltenen Zellen als potenzielle Endothelprogenitorzellen fungieren könnten, säten wir sie erneut aus. Dies wurde insgesamt zweimal durchgeführt: nach einer zwei- und dreiwöchigen Verweildauer in den Überständen der Differenzierungsmedien. Es zeigte sich, dass die Zellen, die vor Entnahme 3 Wochen lang im Mediumüberstand enthalten waren, am effizientesten waren. Hier erreichte die Kombination des Mediums EBM-1 mit VEGF und Ang-2 eine Differenzierungsrate 42,04%, gefolgt von EBM-1 mit VEGF und Ang-1 mit 19,62%. Zellen in Medienüberständen können sich nach erneutem Aussäen differenzieren und stellen eine weitere Quelle für Endothelzellen dar.

MNCs, CD14 positive, frische und ex-vivo expandierte CD 133 positive Stammzellen wurden bezüglich ihres Differenzierungsverhaltens untereinander verglichen. Es zeigte sich bei allen Zellpopulationen die deutliche Überlegenheit des neu entwickelten Mediums gegenüber dem herkömmlichen Medium. Die CD 14 positiven Zellen differenzierten sich in dem neu entwickelten Medium zu 2,1% aus, die ex-vivo expandierten CD 133 positiven Stammzellen dagegen nur zu 1,6%. Die entstandenen Endothelzellen konnten bezüglich der Expression der Endothelzellmarker vWF und VE-Cadherin untersucht werden.

Wir konnten in Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Medium entwickeln, dass eine endotheliale Differenzierung von ex-vivo expandierten Zellen von bis zu 2,3% ermöglicht und somit dem herkömmlichen Medium deutlich überlegen ist. Zur medizinischen Anwendung sollte allerdings gezielt versucht werden, die Differenzierungseffizienz dieses Mediums weiter zu steigern, um dem durchschnittlichen Bedarf decken zu können.

G Literaturverzeichnis

Arbiser JL, Larsson H, Claesson-Welsh L, Bai X, LaMontagne K, Weiss SW, Soker S, Flynn E, Brown LF. (2000): Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo. *Am J Pathol.* 156(4):1469-76.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275(5302):964-7.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M et al. (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 85(3):221-8

Asahara T, Isner JM. (2002): Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 11(2):171-8.

Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. (1997): Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* 18(1):26-45.

Björndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, Zhou Z, Jackson D, Hansen AJ, Cao Y. (2005): Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(43):15593-8.

Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, Tolla-Le Port C, Leboeuf M, Charbord P, Bikfalvi A, Uzan G. (2004): Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood.* 103(7):2577-84.

Butzal M, Loges S, Schweizer M, Fischer U, Gehling UM, Hossfeld DK, Fiedler W. (2004): Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res.* 300(1):65-71.

Cai W, Rook SL, Jiang ZY, Takahara N, Aiello LP. (2000): Mechanisms of hepatocyte growth factor-induced retinal endothelial cell migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41(7):1885-93.

Cao R, Bjorndahl MA, Gallego MI, Chen S, Religa P, Hansen AJ, Cao Y. (2006): Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood.* 107(9):3531-6.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertszenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 380(6573):435-9.

Carmeliet P. (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat Med,* 9,6, 653-660.

Carmeliet P. (2005): Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 438(7070):932-6.

Chen PP, Lin YC, Wu KC, Yen JH, Ou TT, Wu CC, Liu HW, Tsai WC. (2006): Activation of endothelial cells by antiphospholipid antibodies--a possible mechanism triggering thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Kaohsiung J Med Sci.* 22(10):484-90.

Chen W, Antonenko S, Sederstrom J et al. (2004): Thrombopoietin cooperates with Flt3-Ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from hematopoietic progenitors. *Blood* 103, 2547-2553.

Chisalita SI, Nitert MD, Arnqvist HJ. (2006): Characterisation of receptors for IGF-I and insulin; evidence for hybrid insulin/IGF-I receptor in human coronary artery endothelial cells.

Growth Horm IGF Res. 16(4):258-66.

Cho ML, Ju JH, Kim HR, Oh HJ, Kang CM, Jhun JY, Lee SY, Park MK, Min JK, Park SH, Lee SH, Kim HY. (2007): Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of

angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett.* 108(2):121-8.

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou J C, Keller G(1998): A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 125(4):725-32.

Choi JS, Kim KB, Han W, Kim DS, Park JS, Lee JJ, Lee DS. (2006): Efficacy of therapeutic angiogenesis by intramyocardial injection of pCK-VEGF165 in pigs. *Ann Thorac Surg.* 82(2):679-86.

Christou H, Yoshida A, Arthur V, Morita T, Kourembanas S. (1998): Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18(6):768-76.

Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J, Choi K. (2002): Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development.* 129(23):5511-20.

Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ, Dvorak HF.(1996): Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res.* 56(1):172-81.

Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. (2005): Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature.* 438(7070):937-45.

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. (1996): Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 87(7):1161-9.

Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP, Jain RK. (1998): Increased microvascular density and

enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol.* 111(1):1-6.

Dexter TM, (1979): Haematopoiesis in long-term bone marrow cultures. A review. *Acta Haematol.* 62(5-6):299-305

Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* 8(16):1897-909.

Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR. (1995): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 107(1-3):233-5.

Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. (1998): Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 13):1853-65.

Faloon P, Arentson E, Kazarov A, Deng CX, Porcher C, Orkin S, Choi K. (2000): Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development.* 127(9):1931-41.

Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML. et al. (2000): Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation.* 65(5):287-300.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 380(6573):439-42.

Folkman J. (1987): What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur J Cancer Clin Oncol.* 23(4):361-3.

Folkman J, Shing Y. (1992): Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267(16):10931-4.

Folkman J (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1(1):27-31.

Gale NW, Yancopoulos GD (1999): Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 13(9):1055-66.

Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J et al. (2002): Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell.* 3(3):411-23.

Gallagher KA, Goldstein LJ, Thom SR, Velazquez OC. (2006): Hyperbaric oxygen and bone marrow-derived endothelial progenitor cells in diabetic wound healing. *Vascular.* 14(6):328-37.

Garlanda C, Dejana E. (1997): Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(7):1193-202.

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M et al. (2000): In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 95(10):3106-12.

Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. (2002): VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature.* 417(6892):954-8.

Gerritsen ME, Tomlinson JE, Zlot C, Ziman M, Hwang S. (2003): Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 140(4):595-610.

Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. (1998): Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest.* 78(11):1385-94.

Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD (2003): Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* 93(11):1023-5.

Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kahler CM, Grunewald K, Stockhammer G et al. (2000): Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet.* 355(9216):1688-91.

Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S. (2003): Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 996:141-51.

Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. (2002): Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 8(8):841-9.

Hayashi T, Abe K, Suzuki H, Itoyama Y. (1997): Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 28(10):2039-44.

Hellstrom A, Carlsson B, Niklasson A, Segnestam K, Boguszewski M, de Lacerda L, Savage M, Svensson E, Smith L, Weinberger D, Albertsson Wikland K, Laron Z. (2002): IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(7):3413-6.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. (1999): New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 18(38):5356-62. Review.

Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M. (2004): VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J.* 18(10):1111-3.

Hristov M, Erl W, Weber PC (2003): Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(7):1185-9.

Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB.(2004): Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(2):288-93.

Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K et al. (2004): Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood.* 2004 Nov 1;104(9):2752-60.

Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA. (1996): Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet.*13(2):189-95.

Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S (2000): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit.* 6(5):1047-52.

Josko J, Knefel K. (2003): The role of vascular endothelial growth factor in cerebral oedema formation. *Folia Neuropathol.*41(3):161-6.

Junqueira L C, Carneiro J, Kelley R O. (2004): Histologie. Springer-Verlag GmbH & Co. KG.

Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. (2005): Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J.* 24(16):2885-95.

Kanemitsu N, Tambara K, Premaratne GU, Kimura Y, Tomita S, Kawamura T, Hasegawa K, Tabata Y, Komeda M. (2006): Insulin-like growth factor-1 enhances the efficacy of myoblast transplantation with its multiple functions in the chronic myocardial infarction rat model. *J Heart Lung Transplant*. 25(10):1253-62.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. (2004): Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins.

Nat Immunol. 5(1):74-80.

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. (1995): Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*. 55(23):5687-92.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. (1993): Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.

Nature. 362(6423):841-4.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. (1992): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 258(5089):1798-801.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. (2001): Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 7(4):430-6.

LaRue AC, Lansford R, Drake CJ. (2003): Circulating blood island-derived cells contribute to vasculogenesis in the embryo proper. *Dev Biol*. 262(1):162-72.

Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Contreres JO, Boval B, Kraus-Berthier L, Tobelem G. (2004): Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovasc Res.* 62(1):176-84.

Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY, Kim JH, Oh JL, Lee GM, Koh GY.(2004): Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J.*18(11):1200-8.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. (2004): Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 350(7):672-8

Li A, Dubey S, Varney ML, Singh RK. (2002): Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMP production in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res.*64(3):476-81.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. (2003): IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 170(6):3369-76.

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. (2000): Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 105(1):71-7

Lisovsky, M., Braun, S. E., Ge. ,Y. Et al , HLu, LSavchenko, VGLyman S D (1996): Flt3-Ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia* .10 (6), 1012-8.

Loges S, Fehse B, Brockmann M A, Lamszus K, Butzal M, Guckenbiehl Met al. (2004): Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Dev.* 13(3):229-42.

Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I. (2004): Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(26):9833-8.

Losordo DW, MD, Dimmeler S, PhD (2004): Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for ischemic Disease. *Circulation* 109,2692-2697.

Losordo DW, Dimmeler S. (2004): Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation.*109(22):2692-7.

Lund EL, Hog A, Olsen MW, Hansen LT, Engelholm SA, Kristjansen PE. (2004): Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma. *Int J Cancer.* 108(6):833-8.

Luppi P, Deloia JA. (2006): Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin Immunol.* 118(2-3):268-75.

Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. (2002): Vascular progenitors: from biology to treatment.

Trends Cardiovasc Med. 12(2):88-96.

Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ (1994): Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol.* 68(1):84-92.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C et al. (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 277(5322):55-60.

Makin AJ, Chung NA, Silverman SH, Lip GY. (2003): Vascular endothelial growth factor and tissue factor in patients with established peripheral artery disease: a link between angiogenesis and thrombogenesis? *Clin Sci (Lond).* 104(4):397-404.

Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ et al. (2001): Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med.* 7(2):199-205.

McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. (1994): Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* 8(4):345-51.

McCord AM, Resto-Ruiz SI, Anderson BE. (2006): Autocrine role for interleukin-8 in *Bartonella henselae*-induced angiogenesis. *Infect Immun.* 74(9):5185-90.

Merkulova-Rainon T, England P, Ding S, Demerens C, Tobelem G. (2003): The N-terminal domain of hepatocyte growth factor inhibits the angiogenic behavior of endothelial cells independently from binding to the c-met receptor. *J Biol Chem.* 278(39):37400-8.

Mikkola HK, Orkin SH. (2002): The search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res.* 11(1):9-17.

Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. (2002): Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci.* 115(Pt 1):175-83.

Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. (2006): Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 2006;17(5-6):279-90.

Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, Kay GF. (2003): Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 48(9):2660-9.

Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T. (2002): Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 106(9):1133-9.

Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. (2000): Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 105(11):1527-36

Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown L F, Manseau EJ et al. (2002): VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 67:227-37.

Nakayama T, Yoshizaki A, Kawahara N, Ohtsuru A, Wen CY, Fukuda E, Nakashima M, Sekine I. (2004): Expression of Tie-1 and 2 receptors, and angiopoietin-1, 2 and 4 in gastric carcinoma; immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors. *Histopathology*. 44(3):232-9.

Nakayama T, Hatachi G, Wen CY, Yoshizaki A, Yamazumi K, Niino D, Sekine I. (2005): Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World J Gastroenterol*. 11(7):964-9.

Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K (1999): Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol*. 10(6):528-35.

Olsen MW, Ley CD, Junker N, Hansen AJ, Lund EL, Kristjansen PE. (2006): Angiopoietin-4 inhibits angiogenesis and reduces interstitial fluid pressure. *Neoplasia*. 8(5):364-72.

Ott I, Keller U, Knoedler M, Gotze KS, Doss K, Fischer P, Urlbauer K, Debus G, von Bubnoff N, Rudelius M, Schomig A, Peschel C, Oostendorp RA. (2005): Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *FASEB J*. 19(8):992-4.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M et al. (2000): Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 95(3):952-8.

Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Muller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. (2002): Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 100(9):3203-8.

Pepper MS (1997): Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17(4):605-19.

Pousa ID, Gisbert JP, Mate J. (2006): Vascular development in inflammatory bowel disease
Gastroenterol Hepatol. 29(7):414-21

Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. (1995): The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J*. 14(23):5884-91.

Rad FH, Le Buanec H, Paturance S, Larcier P, Genne P, Ryffel B, Bensussan A, Bizzini B, Gallo RC, Zagury D, Uzan G. (2007): VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(8):2837-42.

Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. (2002): Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*.13(1):61-7.

Rafii S, Lyden D. (2003): Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 9(6):702-12.

Raida M, Heymann AC, Gunther C, Niederwieser D. (2006): Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*.18(4):735-9.

Rajashekhar G, Willuweit A, Patterson CE, Sun P, Hilbig A, Breier G, Helisch A, Clauss M. (2006): Continuous endothelial cell activation increases angiogenesis: evidence for the direct role of endothelium linking angiogenesis and inflammation. *J Vasc Res.* 43(2):193-204.

Rehman J, Li J, Orschell CM., March KL (2003): Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 107(8):1164-9.

Reuter P. (2004): Springer Lexikon Medizin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2004

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. (2002): Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 109(3):337-46.

Roberts WG, Palade GE. (1995): Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* 108 (Pt 6):2369-79.

Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. (2007): Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 9(1):3-14.

Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F et al. (2005): CD14+CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res.* 97(4):314-22.

Romagnani P, Lasagni L, Romagnani S. (2006): Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 6(3):193-202.

Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E (2004): Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med.* 8(4):509-18.

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 376(6535):70-4.

Scheufler KM, Dreves J, van Velthoven V, Reusch P, Klisch J, Augustin HG, Zentner J, Marme D. (2003): Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23(1):99-110.

Schmeisser A, Garlachs CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. (2001): Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res*. 2001 Feb 16;49(3):671-80.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF., Breitman ML, Schuh AC (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376(6535):62-6.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. (1998): Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 92(2):362-

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T. (2001): Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. 103(6):897-903.

Shmelkov SV, Meeus S, Moussazadeh N, Kermani P, Rashbaum WK, Rabbany SY, Hanson MA, Lane WJ, St Clair R, Walsh KA, Dias S, Jacobson JT, Hempstead BL, Edelberg JM, Rafii S. (2005): Cytokine preconditioning promotes codifferentiation of human fetal liver CD133+ stem cells into angiomyogenic tissue. *Circulation*. 111(9):1175-83.

Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM. (1994): Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med.*179(5):1409-15.

Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR. (1999): Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med.* 5(12):1390-5.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. (2001): VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 7(2):186-91.

Stratmann A, Risau W, Plate KH. (1998): Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol.*153(5):1459-66.

Sun XT, Ding YT, Yan XG, Wu LY, Li Q, Cheng N, Qiu YD, Zhang MY.(2004): Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an in vitro quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system. *World J Gastroenterol.* 10(17):2524-8.

Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. (2004): Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24(10):1146-52.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC., Davis S et al. (1996): Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 87(7):1171-80.

Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald D M, Zhou H, Oldmixon E H et al. (1998): Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 282(5388):468-71.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. (1999): Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 5(4):434-8.

Takahashi H, Shibuya M (2005): The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 109(3):227-41.

Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, Suda T. (2000): A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell.* 102(2):199-209.

Tatsumi T, Matsubara H. (2006): [Therapeutic angiogenesis for peripheral arterial disease and ischemic heart disease by autologous bone marrow cells implantation]. *Nippon Rinsho.* 64(11):2126-34.

Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. (2001): Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res.* 49(3):659-70.

Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. (2002): Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer.* 98(1):14-8.

Uccini S, Ruco LP, Monardo F, Stoppacciaro A, Dejana E, La Parola IL, Cerimele D, Baroni CD. (1994): Co-expression of endothelial cell and macrophage antigens in Kaposi's sarcoma cells. *J Pathol.* 173(1):23-31.

Ueno T, Nakamura T, Torimura T, Sata M. (2006): Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol.* 39(1):16-21.

Ushiro S, Ono M, Izumi H, Kohno K, Taniguchi N, Higashiyama S, Kuwano M. (1996): Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: p91 activation

induction of plasminogen activator/inhibitor, and tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells. *Jpn J Cancer Res.* 87(1):68-77.

Valenzuela DM, Griffiths JA., Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H et al. (1999): Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5):1904-9.

Veikkola, T., Jussila, L., Makinen, T., Karpanen, T., Jeltsch, M., Petrova, T. V. et al. (2001): Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 20(6):1223-31.

Veikkola T, Alitalo K. (2002): Dual role of Ang2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Dev Cell.* 3(3):302-4.

Welsch U (2005): *Sobotta Lehrbuch Histologie.* Urban & Fischer

White CW, Wolf SJ, Korones DN, Sondheimer HM, Tosi MF, Yu A. (1991): Treatment of childhood angiomatic diseases with recombinant interferon alfa-2a. *J Pediatr.* 118(1):59-66.

Wojta J, Kaun C, Breuss JM, Koshelnick Y, Beckmann R, Hattey E, Mildner M, Weninger W, Nakamura T, Tschachler E, Binder BR. (1999): Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human keratinocytes and the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells. *Lab Invest.* 79(4):427-38.

Xu F, Severinghaus JW.(1998): Rat brain VEGF expression in alveolar hypoxia: possible role in high-altitude cerebral edema. *J Appl Physiol.* 85(1):53-7.

Xu Y, Liu YJ, Yu Q. (2004): Angiopoietin-3 inhibits pulmonary metastasis by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 64(17):6119-26.

Xu Y, Liu YJ, Yu Q. (2004): Angiopoietin-3 is tethered on the cell surface via heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 279(39):41179-88. Epub 2004 Jul 27.

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. (1993): flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. 118(2):489-98

Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. (2003): Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res*. 93(7):664-73.

Yoon YS, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park JS, Gwon HC, Kirchmair R, Bahlman F, Walter D, Curry C, Hanley A, Isner JM, Losordo DW. (2005): Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation*. 2005 111(16):2073-85.

Yoon YS, Lee N, Scadova H. (2005): Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biol Cell*. 97(4):253-63.

Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. (2005): Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 115(2):326-38.

Zagzag D, Hooper A, Friedlander DR, Chan W, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Grumet M. (1999): In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp Neurol*. 159(2):391-400.

H Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. W. Fiedler, für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die permanente Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie die finanzielle Unterstützung.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Dr. med. S. Loges für die außergewöhnliche, engmaschige Betreuung. Sie hat mich mit dem Projekt vertraut gemacht und mich mit Ratschlägen und Anregungen unterstützt.

Für die Zusammenarbeit und die unaufhörliche Hilfsbereitschaft bedanke ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe und dem gesamten Personal des Pavillons 29. Insbesondere gilt mein Dank hier Frau Jasmin Otten, Herrn Alexander Schultze und Frau Viktoria Wischnewsky für ihre tatkräftige Hilfe und ihre bereichernde Anregungen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei PD Dr. med. K. Lamszus aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des UKE. Sie stellte ihr Fluoreszenz -Umkehrmikroskop zur Verfügung.

Ich möchte hier meinen Dank Herrn Philipp Kunkelausdrücken, der jederzeit dazu bereit war, mir den Zugang zu den Räumlichkeiten der Klinik und Poloklinik für Neurochirurgie des UKE zu gewähren, damit ich die Zellen fotografieren konnte.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen Mitarbeitern der Blutbank und der KMT für die freundliche Bereitstellung von Blutprodukten.

Besonderer Dank an meiner Familie, für die liebevolle Unterstützung während meines Medizinstudiums. Ich bedanke mich insbesondere bei meinem älteren Bruder, Herrn Yannick Jiongo, der mir beim Zusammenschreiben beiseite stand.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinem Freund, Herrn Fabrice Teuma, der mir stets beiseite stand, insbesondere für seine liebevollen und ermutigenden Worte, wenn Ich Tiefpunkte hatte.

I Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 06.10.2008

Estelle Jiongo

J Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Inhalt
Abbildung 1:	Aufnahme von Endothelzellen (10x)
Abbildung 2:	Die diversen Zellenpopulationen, aus denen EPCs isoliert werden können.
Abbildung 3:	Das Raster in Form eines Quadrats
Abbildung 4:	Das Raster in Form eines Kreisabschnittes
Abbildung 5:	Differenzierungseffekt von LBMCM +VEGF (A) und von EBM 1(B) auf die vier Wochen ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen (10 x Vergrößerung)
Abbildung 6:	Endotheliale Differenzierung von 7,14, 21 und 28 Tage ex-vivo expandierten CD 133 positiven Stammzellen
Abbildung 7:	Ermittelte Endothelzellzahlen mit dem Quadrat und mit dem Kreisabschnitt drei Wochen nach Aufnahme in den Differenzierungsmedien (n=2)
Abbildung 8:	Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Zellen über einem Zeitraum von 35 Tagen (n=3)
Abbildung 9:	Zusammenfassende Darstellung der Differenzierungseffizienz der ex-vivo expandierten CD 133 positiven, hämatopoetischen Stammzellen (n = 6)
Abbildung 10:	Vergleich der Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen unter der Kombination von EBM-1 mit VEGF und Ang-1 (B) und der Kombination von LBMCM mit VEGF (A) 14 Tage nach Aufnahme in den Differenzierungsmedien (10 x Vergrößerung)
Abbildung 11:	Differenzierungsquote der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen
Abbildung 12:	Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen unter der Wirkung von EBM-1 +VEGF +Ang-1 mit 10%FKS (A) und mit 20%FKS (B) (10x Vergrößerung)

- Abbildung 13: Effekt des Serumgehaltes des Differenzierungsmedium auf dem Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen (n=3)
- Abbildung 14: Endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen im Medium EBM-1 +VEGF im Chamber Slide (A) und in der kunststoffhaltigen Platte (B) (10x Vergrößerung)
- Abbildung 15: Endotheliale Differenzierung der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen im Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1 im Chamber Slide (A) und in der kunststoffhaltigen Platte (B) (10x Vergrößerung)
- Abbildung 16: Differenzierungspotential der 6 Wochen alten Zellen aus den Überständen der Differenzierungsmedien (n=2)
- Abbildung 17: Differenzierungspotential der sieben Wochen alten Zellen aus den Überständen der Differenzierungsmedien (n=3)
- Abbildung 18: Vergleich des Differenzierungsverhalten der frischen CD 133+ Stammzellen, der ex-vivo expandierten CD 133+ Stammzellen, der CD 14+ Zellen und der mononukleären Stammzellen unter den Differenzierungsmedien Supermedium +VEGF und EBM-1 +VEGF +Ang-1(n =2)
- Abbildung 19: Differenzierungsverhalten der ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen (A), MNCs (B) und CD14 positiven Zellen im Medium EBM-1 +VEGF +Ang-1(C) (10 x Vergrößerung)
- Abbildung 20: Darstellung von Zellen, die vWF exprimieren (100 x Vergrößerung)
- Abbildung 21: Darstellung von Zellen, die VE-Cadherin exprimieren (100 x Vergrößerung)

K Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Deutsche Bezeichnung	Englische Bezeichnung
ACD-A	Aqua-Citrat-Dextrose-A	
ACE		Angiotensin-Converting Enzyme
Ang-1 bis -4	Angiopietin-1 bis -4	
bFGF	Basaler Fibroblasten-Wachstumsfaktor	Basic Fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serum-Albumin	Bovine serum albumine
CD		Cluster of differentiation
CML	Chronische myeloische Leukämie	
d	Tag	day
DAPI	4'6-Diamidin-2'Phenylindol Dichlorid	
EBM-1-2		Endothelial basal medium 1 to 2
ECs	Endothelzellen	Endothelial cells
EDTA	Ethylendiamintetraazetat	Ethylene-diamine-tetraacetic-acid
EGF		Endothelial Growth Factor
EGM-2	EGM-2-Komplettmedium	Endothelial Cell Medium-2
ELCs		endothelial-like cells
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen	
FACS		Fluorescence activated cell sorting
FGF		Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescin-Isothiocyanat	
FKS	Foetales Kälberserum	
Flk-1		Fetal liver kinase 1
Flt-1		Fms-like tyrosine kinase 1
Flt-3-Ligand		Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
Flt-4		Fms-related tyrosine kinase 4
FN	Fibronektin	
G-CSF		Granulocyte colony stimulating factor
GFP		Green fluorescent protein
HC	Hydrokortison	Hydrocortisone
HGF		Hepatocyte growth factor
HSA	Humanes Serumalbumin	
HS	Pferdeserum	Horse serum
HSCs	Hämatopoetische Stammzellen	Hematopoietic stem cell
HUVECs	Endothelzellen der humanen	Human umbilical vein

	Nabelschnurvene	endothelial cells
IGF-1		Insulin like Growth Factor-1
IL-8	Interleukin 8	
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco-Medium	Iscove's Modified Dulbecco's Media
kDa		Kilodalton
KDR		Kinase insert domain
KM	Knochenmark	
KHK	Koronare Herzerkrankungen	
LBMCM		Long term Bone Marrow Culture Medium
LLC		Lewis Lungencarcinom
MACS-Puffer		Magnetic adsorption cell sorting
MNCs	Mononukleäre Zellen	Mononuclear cells
mVEGF Kinoid	murine keyhole limpet hemocyanin -VEGF	
n	Anzahl der untersuchten Ereignisse	
NRP-1 bis -2		Neuropilin1 to 2
OECs		Outgrowth endothelial cells
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit	
PB	Peripheres Blut	
PBS	Phosphatpuffer	Phosphate buffered saline
PIGF		Placenta growth factor
SCGF- β		Stem cell growth factor- β
SCs	Stammzellen	Stem cells
svVEGF		Snake venom VEGF
TF		Tissue Factor
TGF- β		Transforming growth factor- β
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf	
VE-Cadherin		Vascular Endothelial Cadherin
VEGF-A bis -E	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A bis E	Vascular endothelial growth factor A to E
VEGFR-1	VEGF-Rezeptoren 1 bis 3	VEGF receptors 1 to 3
vWF	Von-Willebrand-Faktor	

L Tabellenverzeichnis

Tabelle	Inhalt
Tabelle 1:	Verwendete Laborgeräte
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien und Medizinprodukte
Tabelle 4:	Verwendete Antikörper
Tabelle 5:	Übersicht über die verwendeten Faktoren und ihre Konzentrationen
Tabelle 6:	Übersicht über die zugesetzten Zytokine
Tabelle 7:	Übersicht über die verwendeten Faktoren und Kombinationen
Tabelle 8:	Übersicht über die verwendeten Faktorkombinationen
Tabelle 9:	Übersicht über die ausgesäten Zelldichten
Tabelle 10:	Übersicht der verwendeten Faktoren und Medien beim sequentiellen Ansatz
Tabelle 11:	Übersicht der Zelldichten und der verwendeten Medienzusammensetzungen
Tabelle 12:	Übersicht über die verwendeten Medien, Faktorkombinationen und Zelldichten
Tabelle 13:	Zusammenfassende Darstellung der unter dem Quadrat und dem Raster in Form eines Kreisabschnittes ermittelten Differenzierungsquoten und Signifikanzwerte
Tabelle 14:	Aufführung der verwendeten Kombinationreihen
Tabelle 15:	Systematische Darstellung der im Rahmen des sequentiellen Faktoreinzusatzes verwendeten Faktorkombinationen
Tabelle 16:	Aufführung der verwendeten Medien
Tabelle 17:	Expressionsrate von vWF und VE-Cadherin in dem Differenzierungsmedium mit VEGF
Tabelle 18:	Expression von vWF und VE-Cadherin in dem Medium bestehend aus EBM-1 mit VEGF und Ang-1

