

Aus der Medizinischen Klinik 1  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

---

**Endotheliale Ausreifung muriner embryonaler  
Stammzellen unter Einfluss einer VEGF-  
abhängigen Genaktivierung**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
**Torsten Seifert**  
aus Bielefeld

Lübeck 2009

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Peters

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Klinger

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.04.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

---

# **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das System der embryonalen Stammzellen	1
1.2 Nachahmung der Differenzierung in-vivo durch die Kultivierung von ES-Zellen in-vitro	2
1.3 Die Ausreifung von Endothelzellen während embryonaler Angio- und Vaskulogenese	4
1.4 VEGF und seine Funktion als Zytokin	8
1.5 Wichtige Transkriptionsfaktoren und Gene der mesenchymalen und endothelialen Differenzierung	12
1.6 Überlegungen zur klinischen Bedeutung	15
1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	16

---

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Material	18
2.1.1	<i>Reagenzien</i>	18
2.1.2	<i>häufig verwendete Puffer und Lösungen</i>	19
2.1.3	<i>Labormaterialien</i>	19
2.1.4	<i>Geräte</i>	20
2.1.5	<i>Biologisches Material</i>	21
2.1.6	<i>Zytokine</i>	22
2.1.7	<i>Antikörper</i>	22
2.1.8	<i>Enzyme, Inhibitoren</i>	22
2.1.9	<i>Kits</i>	23
2.1.10	<i>Oligonukleotide und Primer</i>	23
2.2	Methoden in der Zellkultur	25
2.2.1	<i>Allgemeines</i>	25
2.2.1	<i>Lösungen und Medien für die Zellkultur</i>	25
2.2.2	<i>Passagierung und Kryokonservierung der ES-Zellen</i>	26
2.2.3	<i>Kultivierung von embryonalen Stammzellen ( ES-Zellen ) in Form von Embryoid Bodies</i>	26
2.2.4	<i>Stimulation mit VEGF</i>	29
2.2.5	<i>Zellernte</i>	29
2.3	Zellbiologische Methoden	30
2.3.1	<i>Immunfluoreszenz-Färbung</i>	30
2.3.2	<i>Durchflusszytometrie</i>	31
2.3.2.1	<i>Grundlagen</i>	31
2.3.2.2	<i>Durchführung</i>	33
2.4	Immunologische Methoden	36
2.4.1	<i>ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</i>	36
2.4.1.1	<i>Grundlagen</i>	36
2.4.1.2	<i>Durchführung</i>	37

---

2.5	Molekularbiologische Methoden	37
2.5.1	<i>Untersuchte Genabschnitte</i>	37
2.5.2	<i>Isolierung zytoplasmatischer RNS aus Embryoid Bodies</i>	40
2.5.3	<i>Reverse Transkriptase – Reaktion</i>	40
2.5.4	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	42
2.5.5	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	42
2.5.5.1	<i>Grundlagen</i>	42
2.5.5.2	<i>Primer-Design</i>	43
2.5.5.3	<i>Semiquantitative Standard-PCR</i>	44
2.5.5.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte</i>	45
2.5.5.5	<i>Quantitative real time PCR (Taqman©)</i>	46
2.6	Statistik	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	Immunofluoreszenz-Färbungen zum Nachweis von CD31 im EB	51
3.2	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für murines VEGF	53
3.2.1	<i>Endogene Produktion von VEGF im System der ES-Zellen</i>	53
3.3	Durchflusszytometrische Untersuchung	54
3.3.1	<i>Identifikation der sogenannten „Low density“ Populationen</i>	54
3.3.2	<i>Einfluss von Trypsin und Kollagenase auf den Nachweis von CD31 auf Zellen des EB per Durchflusszytometrie</i>	55
3.3.3	<i>Frühe Zeitliche Entwicklung von endothelialen Oberflächenmarkern ausdifferenzierenden embryonalen Stammzellen</i>	55
3.3.4	<i>Einfluss der Konzentration des Wachstumsfaktors VEGF auf die Expression der Oberflächenmoleküle</i>	59

---

3.4	Molekularbiologische Untersuchung endothelspezifischer Genprodukte und Transkriptionsfaktoren in der PCR	60
3.4.1	<i>Expressionsnachweis mit Hilfe der semiquantitativen PCR</i>	60
3.4.2	<i>Quantitativer Vergleich der Genexpression mit Hilfe der Taqman-PCR</i>	62
3.4.2.1	<i>Darstellung unter Zuhilfenahme der Ratio aus der 'ΔCt-calculation'</i>	62
3.4.2.2	<i>Hochregulation der untersuchten Oberflächenmarker auf Genebene</i>	63
3.4.2.3	<i>Positiver VEGF-Einfluss auf weitere endothelspezifische Genprodukte</i>	64
3.4.2.4	<i>Kein eindeutiger Effekt einer Stimulation mit VEGF auf andere Gene der Stammzellregulation sowie mesenchymalen Differenzierung</i>	65
3.4.2.5	<i>Zusammenfassung</i>	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1	Überblick	70
4.2	Charakterisierung der Endothelentwicklung in E14 ES-Zell-Kulturen anhand von Antigenen der Zelloberfläche	70
4.3	Die Rolle des Wachstumsfaktors VEGF	76
4.3.1	<i>Eigenproduktion von VEGF im Embryoid Body</i>	77
4.3.2	<i>Effekte einer zusätzlichen supranormalen Stimulation mit VEGF</i>	78
4.4	Expression von Genen der Angio- und Vaskulogenese	80
4.5	Relation zur hämatopoetischen Differenzierung	85
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	86

---

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>102</b>
7.1    Daten der FACS-Analyse im Überblick	<b>102</b>
7.2    Daten der Taqman-PCR im Überblick	<b>105</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>110</b>
<b>9 Lebenslauf / Publikationen</b>	<b>111</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1	Entwicklung eines Embryoid Bodies (EB)	3
Abb. 1.2	Endotheliale Differenzierung	6
Abb. 1.3	VEGF und seine Rezeptoren	11
Abb. 2.1	Protokoll zur Differenzierung von embryonalen Stammzellen in vitro	28
Abb. 2.2	Darstellung der Messung in der FACS-Analyse in Form eines Dotplots	32
Abb. 2.3	Beispielhafte Darstellung zweier 4-Felder-Dotplots zur Abbildung der Ergebnisse der FACS-Analyse	33
Abb. 2.4	Beispielhafte Darstellung einer FACS-Messung mit zugehöriger Isotypenkontrolle	35
Abb. 3.1	Nachweis des CD31-Rezeptors mittels Immunofluoreszenz	52
Abb. 3.2	Endogene VEGF Sekretion während der ES-Zell-Differenzierung	53
Abb. 3.3 a-d	Dynamik der Oberflächenmarker in differenzierenden ES-Zellen und deren Beeinflussung durch zusätzliche VEGF-Stimulation (30ng/ml)	56
Abb. 3.4	Anteil der doppelt positiven CD31+/Flk-1+- Zellen	57
Abb. 3.5	Semiquantitative PCR beispielhaft für einzelne Primerkombinationen	61
Abb. 3.6	Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Genen endothelialer Oberflächenmarker in differenzierenden ES-Zelle	63
Abb. 3.7	Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression endothelspezifischer Genorte in differenzierenden ES-Zellen	65
Abb. 3.8	Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Genen der Homeobox-Gruppe und Epo in differenzierenden ES-Zellen	66
Abb. 3.9	Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Genen der Stammzell- und Zellzyklusregulation in differenzierenden ES-Zellen	67

---

Abb. 3.10	Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Hämatopoese-assoziierten Genen in differenzierenden ES-Zellen	68
-----------	---	----

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	Antikörper für die FACS Analyse	22
Tab. 2	Primerpaare für die Analyse der Genexpression per Taqman-PCR	23
Tab. 3	Medien für die Zellkultur	25
Tab. 4a	Schlüsselgene für die Entwicklung von Endothelzellen aus ES-Zellen	38
Tab. 4b	Gene mit Wirkungsschwerpunkt in Regulation von Hämatopoese und Stammzellzyklus	39
Tab. 5	Zusammenfassende Darstellung der Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Regulation einzelner Gene, die in differenzierten ES-Zellen exprimiert werden	69
Tab. 6	Übersicht der Messresultate der FACS-Analyse	102
Tab. 7a	Übersicht der Taqman-Ergebnisse, Hochregulation	105
Tab. 7b	Übersicht der Taqman-Ergebnisse, Runterregulation	107

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
cDNS	complementary DNS
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindole
DME	Dulbecco`s modified eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid Triphosphat
dsDNS	doppelsträngige DNS
DTT	1, 4 - Dithiothreitol
EB(s)	Embryoid Body/(ies)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Epo	Erythropoetin
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
evtl.	eventuell
FACScan	Fluorescence-Activated-Cell-Scanning
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Flk	Fetal liver kinase
FSC	Forward light scatter
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor
HKG	Housekeeping Gene
HSC	Hematopoetic Stem cell
Ig	Immunglobulin
IL	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
kDa	kiloDalton
LIF	Leukemia inhibitory factor
Min.	Minuten
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

---

NEA	Nicht-essentielle Aminosäure
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
RNS	Ribonukleinsäure
RNSguard	Ribonuklease Inhibitor
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Sek.	Sekunde(n)
sog.	sogenannte (er/es)
SSC	sideward light scatter
ssRNS	einzelsträngige RNS
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-DNS-Polymerase	Thermus aquaticus-DNS-Polymerase
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen/Units pro Minute
v.a.	vor allem
VE-Cadherin	Vascular Endothelial-Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.Zt.	zur Zeit

## 1 Einleitung

### 1.1 Das System der embryonalen Stammzellen

Die Forschung an murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) bildet bereits heute einen wichtigen Bestandteil der naturwissenschaftlichen Grundlagenforschung und erbringt zunehmend wichtige Erkenntnisse für die medizinische Forschung des 21. Jahrhunderts. Erstmals wurde die Isolation von ES-Zellen im Jahre 1981 beschrieben, gewonnen werden sie aus der inneren Zellmasse der Blastozyste der Maus (Evans und Kaufman 1981, Martin GR 1981).

ES-Zellen zeichnen sich bis heute insbesondere durch folgende herausragende Eigenschaften aus: Sie sind pluripotent und können sich in alle Gewebe- und Zelltypen des Organismus ausdifferenzieren. Sie bilden so eine homologe Ausgangspopulation, die in der Lage ist, Zellen der ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Linie auszubilden (Abb.1.1). Unter definierten Bedingungen, d.h. unter Zugabe von LIF (leukemia inhibitory factor), der die Differenzierung verhindert, lassen sich diese Zellen unter Erhaltung ihres pluripotenten Status praktisch uneingeschränkt vermehren. Definiert man die Kulturbedingungen neu und entfernt LIF aus dem Nährmedium, beginnen sich die ES-Zellen zu zystischen Strukturen zu entwickeln, die Embryoid Bodies (EBs) genannt werden. Embryonale Stammzellen sind im Gegensatz zur Heterogenität anderer „späterer“ Zelllinien, denen Stammzell-Eigenschaften zugeschrieben werden (z.B. HUVEC – human umbilical vein endothelial cells), sehr homogen, sie erlauben insbesondere die Analyse von frühen Entwicklungsschritten ohne den störenden Einfluss der fortschreitenden Genaktivierung bereits ausgereifter Zellen. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem „in-vivo-ähnlichen“ System (siehe Kapitel 1.3).

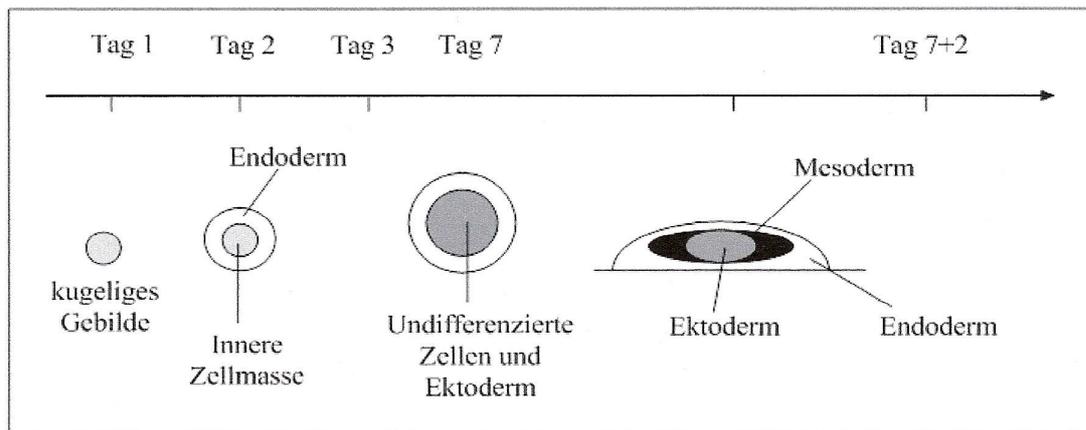
Infolge ihrer Pluripotenz und uneingeschränkte Vermehrbarkeit können ES-Zellen als geeignete Quelle zur Gewinnung gewebespezifischer Vorläuferzellen dienen. Voraussetzung dabei ist, die Differenzierung dieser Zellen in vitro vollständig nachzuvollziehen und schliesslich gezielt zu steuern. Die Zellkultur der ES-Zellen

bietet die Möglichkeit, frühe Vorläuferzellen zu kultivieren und ihre Entwicklung zu analysieren. Ausserdem erleichtern sie die Identifikation und Untersuchung von Genmutationen, die einen fundamentalen Einfluss auf die embryonale Entwicklung nehmen. In vivo ist dies kaum möglich, da ein mutationsbedingter frühzeitiger Tod des Embryos in den meisten Fällen nicht verhindert werden kann. (Keller GM 1995). So konnten beispielsweise Voss et al. 2000 aus embryonalen Stammzellen ein neues Gen (TNB) isolieren, dass im Knockout-Modell zu früher embryonaler Letalität durch Apoptose der inneren Zellmasse führt. Die in vitro-Zellkultur stellt nicht nur ein nützliches System zur Charakterisierung von Genexpression und -mutationen dar, sondern bietet auch die Möglichkeit der Erforschung des Einflusses von Zytokinen auf Gen- und Zellebene. Das Verständnis dieser Abläufe könnte für den späteren Einsatz so generierter Zellen und eine mögliche klinische und therapeutische Anwendung ähnlicher humaner Systeme eine wesentliche Rolle spielen.

## **1.2 Nachahmung der Differenzierung in-vivo durch die Kultivierung von ES-Zellen in-vitro**

Doetschman et al. konnten 1985 erstmal ein in-vitro Kulturmodell der Embryogenese der Maus beschreiben, das auf der Differenzierung von ES-Zellen basierte. Diese pluripotenten Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. Das von Doetschman genutzte Modell geht von der Hypothese aus, dass in diesem System ausgehend von undifferenzierten embryonalen Stammzellen die drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm gebildet werden. Diese Entwicklung wird bei Doetschman durch die Vorgabe einer definierten Zellzahl in einem sogenannten hängenden Tropfen eingeleitet. Bereits zu diesem sehr frühen Zeitpunkt kommt es zu einer Aggregation der Stammzellen (Embryoid Body – Abb.1.1). Der Kern dieses Aggregats ist dabei bereits nach einem Tag von einer endodermalen Zellschicht umgeben, die durch die parakrine Wirkung produzierter Zytokine signalvermittelnd die Entwicklung der undifferenzierten Zellen im Zentrum beeinflusst. Im weiteren Verlauf entwickelt sich das frühe Ektoderm und später zwischen Ekto- und Endoderm das frühe Mesoderm (Fleischmann und Hescheler 2004), strukturell vergleichbar mit einem 5 Tage alten Mausembryo. Diese

Zellkonglomerate entwickeln sich schliesslich weiter zu zystischen Embryoid Bodies (EBs), deren Aufbau am ehesten dem in vivo-Stadium des viszeralen Dottersackes an Tag 8 bis 10 vergleichbar ist.



**Abb 1.1. Entwicklung eines Embryoid Bodies (EB)**

Modifizierte Darstellung nach Fleischmann und Hescheler 2004. Dargestellt sind die drei Keimblätter Ektoderm, Endoderm und Mesoderm während der Entwicklung eines Embryoid Bodies über einen Zeitraum von 7 Tagen Zellkultur. Zu diesem Zeitpunkt ähnelt der entwickelte EB einem strukturell vergleichbaren 5 Tage alten Embryo.

Löst man diese Zellen aus der Form des hängenden Tropfens und bringt sie auf Zellkulturplatten, differenzieren die Zellaggregate wie beschrieben und bilden komplexe, multizelluläre Zellrasen. Deren endo-, ekto- und mesodermale Anteile können zum Beispiel glatte und quergestreifte Muskelzellen, Kardiomyozten, Adipozyten, Chondrozyten, neuronale Zellen sowie hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen (Schmitt et al. 1991; Weiss und Orkin 1996; Rohwedel et al. 2001 ) beinhalten.

In den neunziger Jahren widmeten sich zahlreiche Arbeitsgruppen dem Studium hämatopoetischer Entwicklung und Differenzierung im System muriner embryonaler Stammzellen (Schmitt et al. 1991, McClanahan et al. 1993, Uzan et al. 1996). Abgeleitet von diesem anfänglichen Schwerpunkt erfolgten in den folgenden Jahren vermehrt Untersuchungen anderer mesenchymaler Zelllinien, unter anderem der

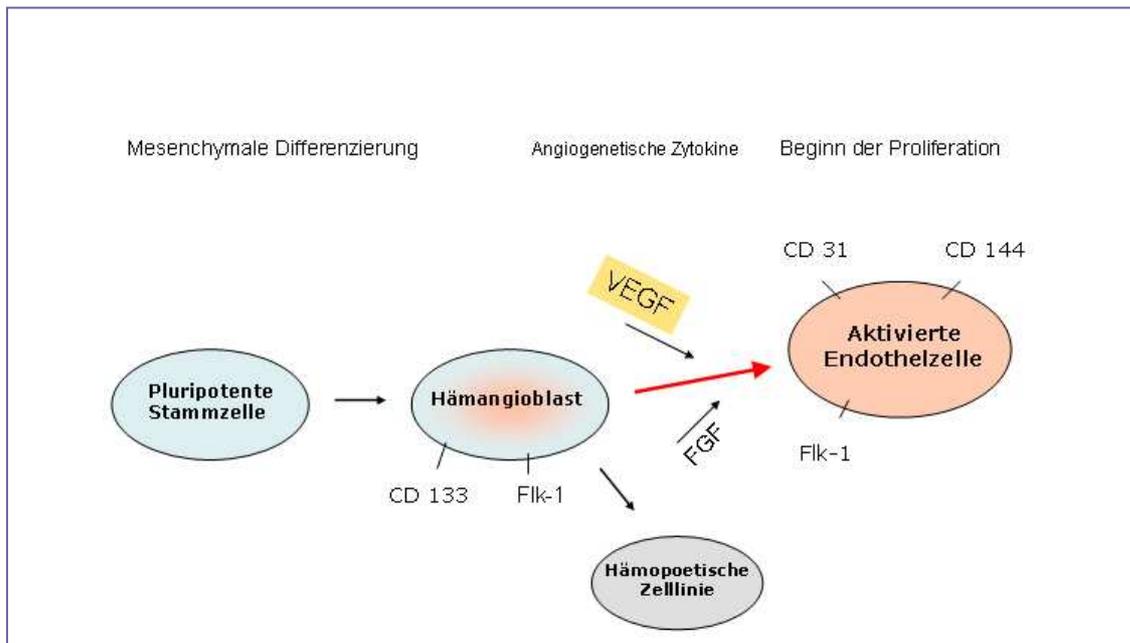
Entwicklung von Endothelzellen, die den Hämangioblasten als gemeinsamen Vorläufer mit der Hämatopoese aufweisen (Kennedy et al. 1997, Choi et al. 1998). Für die Hämatopoese konnte gezeigt werden, dass im System des Embryoid Body eine in-vivo ähnliche Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen stattfindet (Keller et al. 1999, Mc Clanahan et al. 1993). Das Modell eignet sich somit, um die Embryogenese sowie Auswirkungen durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren, aber auch den Effekt von Alterationen der Genexpression oder Genabschaltungen im Laufe der Differenzierung zu untersuchen (Filippi et al. 2000, Schuldiner et al. 2000). Wie bisherige Studien zeigen (Keller 2005, Vittet et al. 1996), kann diese Beobachtung auch für die Entwicklung endothelialer Zellen vorausgesetzt werden.

### **1.3 Die Ausreifung von Endothelzellen während embryonaler Angio- und Vaskulogenese**

Während der Embryogenese spielt die Ausbildung von Blutgefäßen eine entscheidende Rolle. Wenn von deren Wachstum und Entwicklung die Rede ist, werden im allgemeinen die Begriffe „Vaskulogenese“ und „Angiogenese“ unterschieden. Vaskulogenese beschreibt die Neuausbildung primitiver vaskulärer Strukturen. Diese entstehen dabei durch die Differenzierung von angioblastischen Stammzellen zu Endothelzellen. Angiogenese dagegen steht für die Aussprossung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen (Schmidt et al. 2007, Risau et al. 1988). Die lange vorherrschende zeitliche Limitation der Vaskulogenese auf die Embryogenese ist einem anderen Bild gewichen. Vielmehr tragen beide Prozesse, Vaskulogenese und Angiogenese, sowohl zum wachsenden embryonalen Gefäßnetz als auch zu adulten Wachstumsprozessen bei (Schmidt et al. 2007, Drake et al. 2003). Im adulten Organismus entsprechen der Funktion der embryonalen Angioblasten sogenannte zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPC), die zur Vaskulogenese z.B. im Rahmen der Tumorneovaskularisation fähig sind (Hristov et al. 2004). Daneben fungieren diese EPCs auch in der adulten Angiogenese (Doyle et al. 2006).

Im Ablauf der embryonalen Gewebeentwicklung steht die Differenzierung des Endothels an erster Stelle (Balconi et al. 2000). Nach Initiierung der Vaskulogenese am Tag 7 der Gestation entstehen bereits am Tag 7,5 sogenannte „Inseln der Blutbildung“ („Blood islands“) des extra-embryonalen Dottersackes (Choi et al. 1998, Metcalf and Moore 1971). Dabei werden die äusseren Schichten von proliferierenden Angioblasten gebildet, die aus Aggregaten mesodermaler Stammzellen entstanden sind. Nach Zusammenschluss zu primitiven Gefässplexus reifen diese schliesslich zu Blutgefässen aus. Das Innere der Blood islands beinhaltet überwiegend Zellen mit hämatopoetischem Charakter. In der Literatur wird von einigen Autoren bereits hier der Begriff des Hämangioblasten für sowohl innere als auch äussere Zellen der „blood islands“ eingeführt (Lamallice et al. 2007, Risau et al. 1988). Somit wird deutlich, dass die Ausreifung beider Zelltypen, der in dieser Arbeit untersuchten endothelialen Zellen wie der hämatopoetischen, eng miteinander verknüpft ist.

Endothelzellen stellen einen Zweig der mesothelialen Entwicklung dar. Wie Abbildung 1.2 verdeutlicht, weisen endotheliale und hämatopoetische Differenzierung, ausgehend von der pluripotenten Stammzelle bis zum Hämangioblasten, eine lange gemeinsame Entwicklungsstrecke auf. Den Ausgangspunkt bildet die pluripotente Stammzelle der Blastozyste (siehe Kap.1.2). Im Laufe ihrer weiteren Ausreifung entstehen in der Frühphase gemeinsame Progenitorzellen von endothelialer und hämatopoetischer Zelllinie. Die fortgeschrittenste gemeinsame Progenitorzelle und gleichzeitig auch den mutmasslichen Gabelpunkt in der bis dahin gemeinsamen Entwicklung dieser beiden Zelltypen bildet der sogenannte Hämangioblast (Kennedy et al. 2007, Baron 2003, Choi et al. 1998). Alle Vorläuferstufen sind durch ein charakteristisches Muster an Oberflächenmarkern gekennzeichnet. Dazu zählen unter anderem die Adhäsionsmoleküle CD31 und CD144, der Rezeptor Flk-1 und das Transmembranprotein CD133. Diese sollen im Weiteren genauer beschrieben werden.



**Abb.1.2. Endotheliale Differenzierung (in Teilen modifiziert nach Oettgen et al. 2001)**

Entsprechend der Abläufe im Embryoid Body zeigt die vorliegende Abbildung schematisch die Entwicklung von der initial pluripotenten Stammzelle über den Hämangioblast bis zur freien Endothelzelle. Exemplarisch sind die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmarker CD31, CD144 und Flk-1 im Stadium der Endothelzelle und CD133 für den Hämangioblast aufgeführt. Zytokine wie VEGF und FGF spielen eine wichtige Rolle während der entscheidenden Entwicklung zur Endothelzelle.

CD31 oder PECAM-1 ist als 130 kDa transmembranes Glykoprotein ein spezifischer Marker für endotheliale Progenitorzellen und wird in hoher Konzentration im gesamten Gefässendothelium exprimiert (Newman 1997, DeLisser 1997). Seine Erstbeschreibung erfolgte bereits 1985 durch van Mourik et al. sowie 1989 durch Muller et al. Das Adhäsionsmolekül wirkt unter anderem als Modulator der Migration von Endothelzellen, der Zell-Zell Adhäsion und der Angiogenese. CD31 wird während der Embryogenese nahezu exklusiv auf endothelialen Progenitorzellen exprimiert, Ausnahmen bilden vor allem in späteren Entwicklungsstadien andere Zellen des vaskulären Kompartiments, so z.B. Leukozyten und Blutplättchen mit geringer Oberflächendichte des Moleküls (Woodfin et al. 2007). Eine besonders grosse Nachweisbarkeit dieses Oberflächenmarkers wird für ein schmales Entwicklungsfenster beschrieben, in dem die Vaskulogenese maximal aktiviert ist (Drake et al. 2000). Neuere Studien vermuten in diesem Zusammenhang den

wechselnden Einfluss unterschiedlicher Isoformen des Moleküls im Laufe der Differenzierung (Li et al. 2005).

CD144 oder VE-Cadherin (140 kDa) gehört zur Familie der Cadherine, die Calcium-abhängige Adhäsionsmoleküle der Zelloberfläche umfasst. Lampugnani et al. beschrieben 1992 erstmals ein endothelspezifisches Protein an interzellulären Kontakten. CD144 wird exklusiv an Zell-Zell-Kontakten endothelialer Zellen exprimiert (Vittet et al. 1997), nach Oettgen et al. 2001 zeigt es deren Maturation an. In früheren Stadien, zum Beispiel auf den Angioblasten der sogenannten „blood islands“ (siehe oben), ist es noch nicht nachweisbar. Gegenstand aktueller Studien ist eine weitergehende Rolle des Moleküls in der Regulation der Gefäßpermeabilität sowie bei Aufbau und Umstrukturierung vaskulärer Strukturen, so auch durch Einflussnahme auf andere Regelkreise wie die VEGF-Signalwege (Vestweber 2008). CD144 bildet damit ein essentielles Molekül der embryonalen Gefässentwicklung.

Flk1, ein Oberflächerezeptor mit Tyrosin-Kinase-Aktivität (230 kDa), wurde erstmals 1991 von Matthews et al. auf hämatopoetischen Progenitorzellen beschrieben und benannt. Als Ligand fungiert das Zytokin VEGF, daher auch die Bezeichnung als VEGF-R2 (siehe auch Kap.1.5). Aktuell gilt Flk1 als Marker für mesodermale Progenitorzellen. So exprimieren ES-Zellen Flk-1 während ihrer Differenzierung früher als die zuvor beschriebenen Marker, auch im Stadium des sogenannten Hämangioblasten (Wagner 1980, Choi et al. 1998, Baron 2003). In diesem Stadium können die Zellen als vaskuläre Progenitorzellen dienen (Hirashima et al. 1999, Yamashita et al. 2000), neben dieser Fähigkeit haben sie auch das Potential zur hämatopoetischen Differenzierung (Kabrun et al. 1997). Kabrun et al. beschreiben 1997 nach anfänglich starker Aktivierung der hämato- und angiopoetischen Differenzierung eine deutliche Abnahme der Flk-1-Positivität. Eine spätere Persistenz von Flk-1+ Zellen z.B. im Endothelium der „blood islands“, gilt als spezifisch für endotheliale Zellen und wird mit einer Runterregulation von Flk-1 in hämatopoetischen Zellen im Laufe der Ausreifung erklärt (Chung et al. 2002). Dementsprechend führt ein Knockout des Flk-Gens zu einer schwerwiegenden Insuffizienz der Angiogenese (Shalaby et al. 1995, Carmeliet et al. 1996).

CD133 (auch Prominin-1 oder AC133) wurde erstmals 1997 von Yin et al. auf hämatopoetischen Progenitorzellen nachgewiesen. Es handelt sich um ein 115-120 kDa Transmembran-Glykoprotein, das von Stamm- und Vorläuferzellen während der mesenchymalen Differenzierung exprimiert wird. Das Molekül gilt als charakteristischer Marker für den sogenannten Hämangioblast, der den gemeinsamen Vorläufer von sowohl Angio- und Vaskulogenese als auch Hämatopoese bildet (Wagner 1980, Choi et al. 1998, Baron 2003). Übereinstimmend schreiben Gehling et al. 2000 der CD133-exprimierenden Zellpopulation das Potential zur hämatopoetischen und endothelialen Differenzierung zu. Im adulten Organismus wird CD133 auch von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPC) exprimiert, die im Zusammenspiel mit VEGF eine zentrale Rolle in der Neoangiogenese und während der Tumorvaskularisation spielen. (Stoelting et al. 2008, Peichev et al. 2000).

Die hochkomplizierten zellulären und molekularen Regulationsschritte von Vaskulo- und Angiogenese sind in umfassenden Review-Artikeln beschrieben worden (Jain 2003, Bikfalvi et al., 2002). So beschreibt Jain ausgehend von CD31+ Flk1+-Angioblasten die Prozesse der Zellmigration und Reifung im Zusammenspiel von Zellen und extrazellulärer Matrix (ECM). Der Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) vermittelt Signalwege, die im Mittelpunkt der Vaskulo- und Angiogenese stehen (siehe Kap. 1.4). Neben der Stabilisierung vaskulärer Netze ermöglicht VEGF durch Regulation der Gefäßpermeabilität die Kommunikation mit der ECM. Für physiologische Auf- und Umbauprozesse z.B. als Reaktion auf Hypoxie ist darüber hinaus ein enges Zusammenspiel mit anderen Proteinen und Botenstoffen wie z.B. NO-Synthetase oder Angiopoetin-2 erforderlich. Gerät das Gleichgewicht aus pro- und antiangiogenetischen Faktoren in Schieflage entstehen pathologische Strukturen wie z.B. beim Tumorwachstum (siehe Kap.1.4).

#### **1.4 VEGF und seine Funktion als Zytokin**

Das im vorangehenden Kapitel erwähnte VEGF gehört zur Familie der Zytokine. Diese sind Botenstoffe, die von einer Vielzahl unterschiedlichster Zellen gebildet

werden, um die Funktion anderer (endokrin, parakrin) oder der eigenen Zelle (autokrin) zu regulieren. Der Wirkmechanismus beruht auf spezifischen Rezeptoren der Zielzelle, deren Bindung eine entsprechende Signalkaskade in Gang setzen kann. Denkbar sind agonistische und antagonistische Wirkungen unterschiedlicher Zytokine.

VEGF ist ein Glykoprotein (45kDa), welches von einer Vielzahl von Zellen, besonders Plättchen und Tumorzellen, sezerniert wird, jedoch nicht von ausgereiften Endothelzellen. Unter den diversen Wachstumsfaktoren, die auf die Gefässwandformation während der späten Embryonalentwicklung bis ins Erwachsenenalter Einfluss nehmen, scheint VEGF eine besonders wichtige Rolle zu spielen (Ferrara 2001, Li et al. 2006) und die Differenzierung primitiver Stammzellen in die Endothelzelllinie zu induzieren. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte VEGF-A ist in einer Sequenz von 165 Aminosäuren (VEGF-A<sub>165</sub>) die als erste beschriebene und für die Endothelentwicklung wichtigste Unterform. Als weitere Vertreter sind VEGF-B, VEGF-C/D und VEGF-E zu nennen. Shibuya beschreibt 2006 in zwei Review-Artikeln das Zusammenspiel der VEGF-Subtypen als Liganden mit den bisher in der Literatur beschriebenen drei spezifischen Transmembran-Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität (siehe auch Abb.1.3). Diese Rezeptoren (VEGFR 1-3) sind strukturell äusserst ähnlich, weisen jedoch deutliche Funktionsunterschiede auf.

Der VEGF-Rezeptor-1 oder flt-1 (FMS-related tyrosine kinase) kommt membranständig und in gelöster Form vor (Abb.1.3). Während der Embryogenese wird ihm eine hemmende Rolle zugeschrieben. Knockout-Mäuse zeigen ein überschüssiges und unorganisiertes Gefässwachstum und sterben nach 8-9 Tagen (Fong et al. 1995). Es wird postuliert, dass VEGF-R1 hier freie VEGF-Moleküle bindet und somit deren proangiogene Wirkung blockiert. Auf molekularer Ebene wird diese Vermutung dadurch gestützt, dass der Rezeptor zwar eine hohe Affinität für VEGF-A aber eine bemerkenswert geringe Tyrosinkinase-Aktivität zeigt (Shibuya 2006). Im Laufe der Entwicklung wirkt VEGF-R1 jedoch positiv während der adulten Angiogenese und z.B. beim Tumorwachstum. Neben der Expression auf Endothelzellen wird flt-1 auch z.B. auf Monozyten exprimiert, wo er vermutlich die Zellmigration beeinflusst (Barleon et al. 1996).

Der VEGF-Rezeptor-2, auch als Flk-1 (fetal liver kinase) bezeichnet, ist der früheste Marker für Zellen, welche zur endothelialen Entwicklung prädestiniert sind (Kabrun et al. 1997, Yamashita et al. 2000) und wurde als wesentlicher Bestandteil der Betrachtungen der vorliegenden Arbeit bereits in Kapitel 1.3 erläutert. Seine wichtigste Funktion betrifft die VEGF-A vermittelte Differenzierung endothelialer Progenitorzellen und die Stimulation von embryonaler wie auch adulter Vaskulo- und Angiogenese. Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig (Shalaby et al. 1995). Um eine ausgewogene endotheliale Entwicklung zu gewährleisten, ist wie oben beschrieben eine Koordination von VEGF-R1 und VEGF-R2-Expression essentiell. Eine selektive Bindung an den Rezeptor Flk-1 zeigt lediglich VEGF-E (Abb.1.3). Dieses wurde als virales Protein beschrieben, das meist in Schafen und selten im Menschen pathologische Bedeutung durch angiogenetische Schäden erlangen kann (Ogawa et al. 1998). Die Bindung von VEGF-C/D im Rahmen der Lymphangiogenese bleibt nahezu ohne Bedeutung (Shibuya 2006), auch wenn einige Autoren eine im Vergleich zu VEGF-A geringe Beeinflussung der Angiogenese vermuten (Jia et al. 2004).

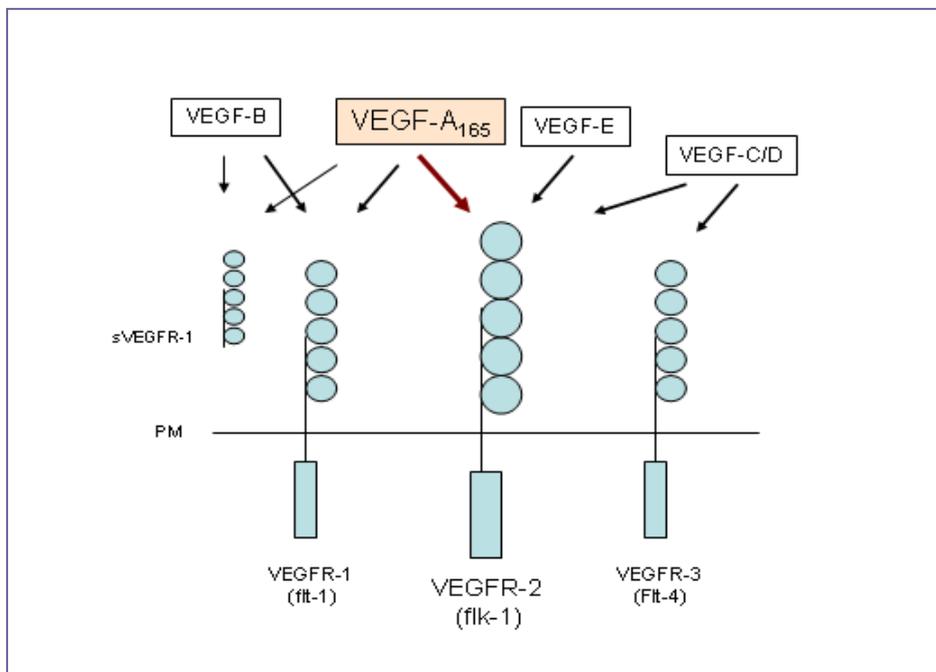
Die Expression von VEGF-R3 oder flt-4 ist weitgehend auf Lymphgefäßzellen und kleine Kapillaren beschränkt, eine rasch abnehmende Bedeutung ist auch für die frühe Embryogenese beschrieben (Shibuya 2006). Die Hochregulation des Rezeptors und das Zusammenspiel von VEGF-R3 und seinen Liganden VEGF-C/D sind entscheidend bei der Formation von Lymphgefäßen (Jain 2003).

Die VEGF-Rezeptor vermittelten Signalkaskaden sind an entscheidenden Entwicklungsprozessen der Vertebraten beteiligt: So beeinflussen sie die de novo Formation von Gefäßstrukturen (Vaskulogenese), deren Aussprossung ausgehend von bestehenden Blutgefäßen (Angiogenese) sowie die Bildung und Ausreifung von Blutzellen (Hämatopoese) (Shibuya 2006, Ferrara 2001). Bei seiner Erstbeschreibung noch als VPF (vascular permeability factor) bezeichnet (Senger et al. 1983), sorgt das Zytokin ausserdem für ein Gleichgewicht von endothelialer Proliferation und Gefäßdurchlässigkeit.

Auch im Rahmen der Tumervaskularisation sorgt die Aktivität von VEGF für das Einwandern von endothelialen Progenitorzellen (EPC) (Li et al. 2006). Dennoch

verläuft hier die Gefäßbildung chaotisch und mit abnormalen Strukturen. VEGF scheint hierzu durch ein Ungleichgewicht der oben beschriebenen Rezeptorwirkungen beizutragen (Jain 2003), wobei auch andere pro- und antiangiogene Faktoren wie FGF und Angiopoietin beteiligt sind.

Bei allen in diesem Kapitel beschriebenen Prozessen innerhalb der Gefäßmaturation findet auf molekularer Ebene eine Steuerung z.B. durch diverse Transkriptionsfaktoren statt. Deren Funktion ist essentiell für Einleitung und Ablauf der Signalkaskaden der Differenzierung.



**Abb. 1.3 VEGF und seine Rezeptoren (modifiziert nach Shibuya 2006)**

Schematische Darstellung der VEGF-Subtypen (VEGF A-E) und ihrer jeweiligen Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität (VEGF-R1-3). Dabei werden das Bindungsverhalten durch Pfeile zwischen Ligand und dem oder den bindenden Rezeptoren dargestellt. Der VEGF-R1 (auch flt-1) kann in membranständiger und als Einziger auch in gelöster Form (sVEGF-R1) vorliegen. Seine Interaktion mit VEGF-A zeichnet sich durch hohe Affinität aber geringe Tyrosinkinase-Aktivität aus. Es wird daher eine hemmende Wirkung auf Vaskulo- und Angiogenese durch die Molekülbindung vermutet. VEGF-E spielt vor allem für die Tumorgenese eine Rolle und wird hier nur zur Vollständigkeit dargestellt. Der in der vorliegenden Arbeit zentrale Rezeptor VEGF-R2 (auch flk-1) bindet VEGF-A und spielt damit eine zentrale Rolle für die Ausbildung endothelialer Strukturen. Selektiv bindet zusätzlich VEGF-E, das als virales Protein lediglich geringe pathogene Bedeutung vor allem bei Schafen hat. VEGF C/D wirken durch ihre Bindung an VEGF-R3 und auch VEGF-R2 hauptsächlich auf die Lymphangiogenese. PM = Plasmamembran.

## **1.5 Wichtige Transkriptionsfaktoren und Gene der mesenchymalen und endothelialen Differenzierung**

Jeder Schritt in der Selbsterneuerung und Differenzierung der Stamm- und Progenitorzellen wird von komplexen regulatorischen Mechanismen auf Gen- und Proteinebene begleitet. Diese können darüber hinaus je nach Zellzyklus und Umgebungsbedingungen, in denen die Zellen kultiviert werden, variieren. Vittet et al. beschrieben im Jahr 1996 erstmal die Möglichkeit zur Analyse der Rolle einzelner beteiligter Gene im System der embryonalen Stammzellen. In der Folge erlaubt besonders die Nutzung moderner Technologien wie z.B. Gen- und Protein-Arrays den Nachweis und die Beschreibung neuer Faktoren und Moleküle, die eine Rolle in diesem Prozess spielen.

Einige der Schlüssel-Regelkreise, von der Genregulation bis zum exprimierten Oberflächenmarker, sind vor allem im Bereich der Hämatopoese bis heute weitgehend beschrieben worden. Demgegenüber ist bisher bemerkenswert wenig über die Transkriptionsfaktoren und molekularen Mechanismen der endothelialen Differenzierung bekannt (Nikolova-Krstevski et al. 2008). Nur für einige wenige Gene wie z.B. SCL/Tal-1 (siehe unten) wurde eine nachgewiesene Verbindung zur embryonalen Vaskulogenese beschrieben (Visvader et al. 1998). Im Zuge der Entwicklung embryonaler Stammzellen zu Endothelzellen können jedoch neben Genabschnitten für die untersuchten Oberflächenmarker (siehe Kap.1.4.) weitere Gene eine Rolle spielen, die sich entsprechend ihrer Funktion wie folgt gruppieren lassen (siehe auch Kapitel 2.5.1 und Tabelle 4a,b).

ERG, FLI und EGR-1 gehören zu den Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie, die durch die DNS-bindende Ets-Domäne gekennzeichnet ist. Die Ets-Transkriptionsfaktoren umfassen eine Reihe von Molekülen mit unmittelbarem positiv oder negativ regulierendem Einfluss auf die Endothel-Differenzierung. Für ihre Wirkung ist nahezu immer eine synergistische Aktivität mehrerer Faktoren erforderlich. ERG (Ets-related gene) wird in Endothelzellen exprimiert, dabei wirkt das Molekül als wichtiger Regulator und beeinflusst eine Reihe weiterer Gene wie z.B. VE-Cadherin oder die VEGF-Rezeptoren. Eine Runterregulation des codierenden ERG-Gens ist mit reduzierter Expression anderer endothel-spezifischer Gene assoziiert (Lelièvre et

al. 2001, McLaughlin et al., 2001). FLI (Friend leukemia integration-site) wird als erster nukleärer Marker des Endotheliums beschrieben (Folpe et al. 2001, Rossi et al. 2004), andere Autoren sehen FLI jedoch bereits als ersten Marker der Hämangioblast-Formation (Sato 2001). Sato et al. beschreiben in der Folge den Tod von FLI-Knockout-Mäusen durch fehlende Gefäßstabilität in der Embryonalentwicklung. Mit EGR-1 (Early growth response-1) nimmt ein weiteres Gen Einfluss auf die frühe Angiogenese. Im Tierversuch führt eine Unterdrückung dieses Zinkfinger-Transkriptionsfaktors zur Unterdrückung von Angiogenese und Neovaskularisation, so auch durch die fehlende Expression proangiogener Faktoren wie FGF-2 (Khachigian 2004, Fahmy et al. 2003)

SCL/Tal-1 gehört als Transkriptionsfaktor zur Gruppe der basic helix-loop-helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren. Reguliert wird durch diesen die Ausbildung hämatopoetischer Vorläufer zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Lecuyer und Hoang 2004). SCL/Tal-1 ist essentiell für die Embryogenese, sein Transkriptionskomplex mit LMO2 nimmt eine Schlüsselrolle in der hämatopoetischen Entwicklung ein (Mikkola et al. 2003). Chung et al. 2002 beschreiben eine starke Expression als charakteristisch für das Stadium des Hämangioblasten, ebenfalls analog zu seinen Partnern GATA-2 und LMO-2, die zusammen als Transkriptionskomplex wirken (Lahlil et al. 2004). Wie oben erwähnt wurde für SCL/Tal-1 ergänzend während der späteren Embryogenese eine Funktion in der Ausbildung von Gefäßstrukturen beschrieben (Visvader et al. 1998, Nikolova-Krstevski et al. 2008). Mehrere Autoren beschreiben einen regulatorischen Einfluss dieses Transkriptionsfaktors in der Signalkaskade mesenchymaler und endothelialer Marker wie Flk-1 und VE-Cadherin (Kappel et al. 2000, Deleuze et al. 2007).

GATA-2 ist entscheidend für die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen. Sein Fehlen verursacht eine deutliche Abnahme hämatopoetischer Kolonien (Minegishi et al. 2003). Knockout-Mäuse ohne GATA-2-Gen sterben an schwerer Anämie (Ling et al. 2004). Einige Autoren beschreiben darüber hinaus auch eine regulierende Funktion des Transkriptionsfaktors GATA-2 für endothel-spezifische Gene wie z.B. PECAM-1 und Flk-1, auch als Komplex mit SCL/Tal-1 und LMO2 (Lugus et al. 2007, Chung et al. 2002, Gumina 1997). Das Protein LMO2 hat als DNS-bindender Komplexpartner eine wichtige Rolle während der Hämatopoese

(Mikkola et al. 2003). Yamada et al. 2000 beschreiben ausserdem eine Expression von LMO2 im vaskulären Endothelium und eine Kontrollfunktion während der embryonalen Angiogenese, LMO2 ist u.a. an der Regulation der VE-Cadherin-Expression beteiligt (Deleuze et al. 2007). LMO4 ist Mitglied derselben Genfamilie, hat jedoch eine eher geringere Bedeutung für die Hämatopoese (Tse et al. 2004).

Die Homeobox-Gene umfassen eine Vielzahl wichtiger Transkriptionsfaktoren in der Regulation der embryonalen Entwicklung (Holland et al. 1996). Das hier untersuchte HoxD3 greift in die Angiogenese ein, seine Aktivierung induziert z.B. die Migration von Endothelzellen und deren Adhäsion durch die gesteigerte Expression von Integrinen. (Boudreau et al. 1997, Boudreau und Varner 2004). Boudreau et al. schreiben ihm damit sogar eine Schlüsselrolle während der Angiogenese in vivo zu. Im adulten Organismus ist HoxD3 u.a. an der Wundheilung beteiligt (Uyeno et al. 2001). Die Expression von HoxB4 korreliert mit den Stadien der frühen hämatopoetischen Differenzierung (Helgasson et al. 1996, Kirito et al. 2003). Über einen verkürzten Stammzellzyklus und eine gesteigerten Zellteilungsaktivität der HSC ist HoxB4 ein entscheidender Faktor in der Regulation des hämatopoetischen Stammzellpools und reguliert Selbsterneuerung und Expansion (Sauvageau et al. 1995, Antonchuk et al. 2001). Einige Autoren beschrieben darüber hinaus eine Rolle von HoxB4 bei der Weiterentwicklung primitiver zu definitiven hämatopoetischen Stammzellen (Kyba et al. 2002).

Weitere Genprodukte sind vor allem an der hämatopoetischen Entwicklung beteiligt. Die Regulation des Transkriptionsfaktors PU.1 wirkt vielfältig auf den Ablauf der Hämatopoese. So ist der Einfluss von PU.1 u.a. essentiell für die Ausdifferenzierung pluripotenter Stammzellen in die myeloische Zellreihe (Kastner und Chan 2008). Der Level der PU.1.-Expression entscheiden im Verlauf über die finale Destination, z.B. die Ausbildung von Granulozyten oder Monozyten. (Dahl und Simon 2003). Ausserdem ist PU.1 nötig zur Aufrechterhaltung des Stammzellpools (Iwasaki et al. 2005). Erythropoetin (EPO) nimmt als Zytokin im Wesentlichen ab Tag 9 der Embryogenese Einfluss auf die definitive Erythropoese. Sein spezifischer Rezeptor wird jedoch zu einem geringeren Anteil auch auf nicht blutbildenden Zellen exprimiert (Jelkmann 2007, Wu et al. 1995). Parallel zu VEGF kann auch EPO durch äussere Einflüsse wie Hypoxie induziert werden. (Lin et al. 1996, Lee et al. 2001). Cyclin-D1

schliesslich ist ein Regulator des Zellzyklus und ist somit an Zellproliferation und Wachstum beteiligt. Seine Wirkung umfasst u.a. die Steuerung zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Als Induktor der Mitose bildet es ausserdem ein potentiell Protoonkogen (Tashiro et al. 2007, Bienvenu et al. 2005).

## **1.6 Überlegungen zur klinischen Bedeutung**

Vaskulo- und Angiogenese sind ebenso wie die beschriebenen Zytokine an physiologischen Abläufen, aber auch an unterschiedlichsten pathologischen Aberrationen beteiligt. Zahlreiche Studien beschäftigen sich bis heute mit dem Verständnis des endothelialen Transkriptionsprofils unter unterschiedlichsten Einflüssen wie z.B. Hypoxie, pH-Veränderung oder im Rahmen der Wundheilung. So entsteht beispielsweise während der Tumorgenese durch ein Ungleichgewicht der beteiligten Zytokine eine abnormale Vaskularisation (Jain 2003, siehe auch Kap.1.4). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass für die Tumorangio-genese grösstenteils endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark rekrutiert werden (Stoelting et al. 2008). Damit scheint therapeutisch eine Transplantation manipulierter Progenitorzellen des Knochenmarks denkbar. In einer anderen Studie beschreiben Stoelting et al. 2008 den Einfluss unterschiedlicher onkologischer Therapieschemata auf VEGF-Plasmakonzentration und EPC-Mobilisation. Hochdosis-Therapien führen hier zu einer nachfolgenden Überproduktion von VEGF mit EPC-Freisetzung. Bereits aktuell wird therapeutisch versucht, in diesen Prozess einzugreifen, z.B. wurde mit Bevacizumab (Avastin®) ein direkter Antikörper gegen VEGF entwickelt (Rad et al. 2007). Auch beim Diabetes mellitus führt eine Dysregulation von u.a. VEGF und PDGF zu einer überschüssenden Gefässneubildung wie im Rahmen der diabetischen Retinopathie (Simó et al. 2006). Ein klinischer Einsatz von VEGF analog zur Applikation hämatopoetischer Zytokine (z.B. G-CSF zur Stimulation der Granulopoese nach Chemotherapie) wäre z.B. bei der peripheren Verschlusskrankheit denkbar, dort resultierte ein isolierter Einsatz bisher in unreifen Gefässen und ausgeprägten Oedemen (Jain 2003), allerdings auch in einer Zunahme der zirkulierenden Endothelialen Progenitorzellen (Kalka et al. 2000).

## 1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Bild der molekularen Abläufe, die durch VEGF Einfluss eingeleitet werden, erscheint bisher fragmentär. Endotheliale Vorläufer-Populationen sind, soweit für deren Untersuchung verfügbar, höchst heterogen oder sind, besonders im Fall der pränatalen Vaskulogenese, nicht zu beschaffen. So entstammt der Grossteil der Informationen über die molekulare Regulation der Angiogenese aus Zellstudien wie denen der sogenannten "Human Umbilical Vein Endothelial Cells" (HUVEC), "Human Lung Microvascular Endothelial Cells" (LMEC) oder der "Human Aortic Endothelial Cells" (AoEC) (Furuhata et al. 2007). Diese umfassen jedoch Zellen unterschiedlicher Ausreifungsstadien und lassen zirkulierende endotheliale Progenitorzellen gänzlich unberücksichtigt. Die Untersuchung muriner embryonaler Stammzellen in vitro bietet ein weitgehend homogenes Modellsystem, das die Entstehung des frühen vaskulären Systems in vivo abbildet und so eine Studie der molekularen Abläufe während der Vaskulogenese ermöglicht. Auf den Oberflächen der EBs sind den "blood islands" ähnliche Formationen, d.h. hämatopoeitische Zellen umgeben von endothelialen Zellen und Gefätsstrukturen, nachgewiesen worden (Bautch et al. 1996, Tavian et al. 1999). Es wird daher vermutet, dass alle Faktoren zur Induktion der Vaskulogenese in diesem System vorhanden sein müssen.

Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchungen soll im in-vivo ähnlichen System der ES-Zellen ein Verständnis der Abläufe der frühen Differenzierung und dabei insbesondere der endothelialen Entwicklung gewonnen werden. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit ergeben sich daraus folgende Zielsetzungen:

- (1) Beschreibung der frühen Schritte der Vaskulogenese anhand des Expressionsverlaufs der Oberflächenmarker wie CD31, CD144, flk-1 und CD133
- (2) Bestimmung des Beginns eines Einflusses VEGF-abhängiger Regulationskreisläufe in der Einleitung der ersten Differenzierungsschritte zur Vaskulogenese

(3) Nachweis eines möglichen Effekt zusätzlicher Stimulation mit hohen VEGF-Leveln auf die Entwicklung von Endothelzellen und deren Progenitorzellen sowie die Aktivierung wichtiger spezifischer Gene.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Aceton	J.T.Baker, Griesheim
Agarose	Cambrex Bio Science, Belgien
Aqua Spüllösung	Deltaselect, Dreieich
Chloroform p.a.	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CYBR Green	Eurogentec, Köln
CYBR Safe™ DNS gel strain	Molecular Probes / Invitrogen, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNS ladder 100p, 1kbp	NE BioLabs, Frankfurt/Main
dNTP (Desoxyribonukleotide triphosphate)	Amersham Biosciences, UK
DTT (1,4-Dithiothreitol) 0,1M	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FKS (Foetales Kälberserum) Gold	PAA Laboratories, Cölbe
Gelatine (Zellkultur getestet)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutamin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
NEA (Nicht-essentielle Aminosäuren)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Nucleic Acid Sample Loading Buffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe
Nukleotide	Hybaid, Teddington, UK
PBS (Dulbeccos phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe

pd(N <sub>6</sub> )Primer	Metabion, Martinsried
RNS-Clean: TRIzol Reagent	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Vectashield-Einbettungsmedium mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, CA

### 2.1.2 häufig verwendete Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
PBS ("Dulbeccos Phosphate Buffered Saline")	135mM NaCl 3mM KCl 2mM Na <sub>2</sub> POH 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 500ml H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
50x TAE Puffer	2M Tris-HCl (pH 8,0) (hydroxymethyl- ammoniummethan) 1M Essigsäure 50mM EDTA	Bio-Rad, München Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FACScan Clean-Lösung		Becton Dickinson, Heidelberg
Gelatine-Lösung:	0,1% Gelatine in PBS	

### 2.1.3 Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller
Chamberslides	Nalge Nunc Int., Belgium
Einfrierröhrchen	Nalge Nunc Int., Belgium
Einmalfilter (Porengrösse 40µm)	BD Falcon, Heidelberg
FACS-Tubes (5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one, Essen

Gewebekulturschalen (6-Well- Platten)	Greiner bio-one, Essen
Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Messzylinder	Schott, Mainz
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Objektträger und Deckglässchen	Schütt, Menzel, Assistent
Petrischalen	BD Falcon, Heidelberg
Pipetten (2ml bis 50ml)	Greiner bio-one, Essen
Reaktionsgefäße (0,2ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber 25cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Nalge Nunc Int., Belgium

#### 2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
<i>Zellkultur</i>	
Brutschrank	Thermo Heraeus, Niederlande
Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Werkbank	Gelaide, Australien
<i>Mikroskopie</i>	
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Göttingen
Fluoreszenz-Mikroskop (Axioscope)	Carl Zeiss, Göttingen
Fotokamera	MetaSystems, Altlusheim
Fotosoftware CellCam	MetaSystems, Altlusheim
<i>Durchflusszytometrie</i>	
FACS-Gerät FC500	Beckman Coulter, Krefeld
<i>ELISA</i>	
Photometer	Dynex Technologies, Berlin
Photometer-Software Revelation©	Dynex Technologies, Berlin

*RNS Bestimmung*

Photometer

Eppendorf, Hamburg

*PCR*

Thermocycler PCR-Express

Hybaid, Teddington, UK

Taqman PCR (ABI Prism 7000)

Applied Biosystems, Foster City, CA

*Gel-Elektrophorese und Dokumentation*

Elektrophorese - Kammer

LKB Bromma, Schweden

Gel – Dokumentation

Vilber Lourmat, Eberhardzell

Spannungsverstärker

Amersham Pharmacia, Wien

*Zentrifugen*

Kühlzentrifuge 5417R

Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge

Heraeus Sepatech, Osterode

*Sonstige Geräte*

pH-Meter

Schott, Mainz

Vortex MS2 Minishaker

IKA Works, Staufen

Waage

Scaltec, Göttingen

Wasserbad

GFL, Burgwedel

**2.1.5 Biologisches Material****Oligonukleotid-Primer****Bezugsquelle**

Murine E14 - ES-Zellen

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von  
Dr.M.Müller, Med.Klinik II, Lübeck,  
seit 1999 Novartis, Basel

Feederzellen

Embryonale Fibroblasten Thromb-X,  
Leuven, Belgien

### 2.1.6 Zytokine

Zytokin	Hersteller
VEGF-A <sub>165</sub> murin (rekombinant)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ (bezogen über Tebu bio, Offenbach)
LIF ESGRO® (leukemia inhibitory factor)	Millipore Chemikon, Schwalbach

### 2.1.7 Antikörper

**Tab. 1: Antikörper für die FACS Analyse ( Rat-Anti Mouse, soweit nicht anders erwähnt )**

Antikörper	Farbstoff	Hersteller
CD 31 (PECAM)	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 31 (PECAM)	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 144 /VE-Cadherin)	unkonjugiert	Becton Dickinson, Heidelberg
FLK1 (VEGF-R2 LY-73)	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD133 (Prominin 1)	PE	EBioscience, San Diego, CA
Rat IgG2a (Isotype Control)	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Rat IgG2a (Isotype Control)	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
<u>Sekundäre Antikörper:</u>		
Goat-Anti Rat IgG	PE	Beckman Coulter, Krefeld

### 2.1.8 Enzyme, Inhibitoren

Enzyme und Inhibitoren	Hersteller
<u>Enzyme</u>	
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe

Kollagenase IV (aus Clostridium histolyticum)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase ( M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) )	Invitrogen, Karlsruhe
Taq (Thermus aquaticus) DNS-Polymerase	Amersham Biosciences, UK

#### Inhibitoren

Ribonuklease-Inhibitor (RNS-Guard)	Amersham Biosciences, UK
------------------------------------	--------------------------

### 2.1.9 Kits

Anwendungsgebiet	Zielmolekül	Hersteller
ELISA	murines VEGF	Ray Biotech, Norcross,GA

### 2.1.10 Oligonukleotide und Primer

Alle eingesetzten Nukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried im Reinheitsgrad HPLC und in lyophilisierter Form geliefert.

**Tab. 2: Primerpaare für die Analyse der Genexpression per Taqman-PCR**

Oligonukleotid-Primer	Primer Sequenzen (5'-3')
CD31=PECAM	Fwd TGC AGG AGT CCT TCT CCA CT Rev ACG GTT TGA TTC CAC TTT GC
CD144	Fwd ATT GAG ACA GAC CCC AAA CG Rev TTC TGG TTT TCT GGC AGC TT
Flk-1	Fwd ATG CAC GGC ATC TGG GAA TC Rev GCT ACT GTC CTG CAA GTT GCT GTC
ERG	Fwd CAG TAG CCG CCT TGC TAA TC Rev TGC ACC TTG GTC ATG ATG TT
EGR-1	Fwd GAC GAG TTA TCC CAG CCA AA Rev GGC AGA GGA AGA CGA TGA AG

---

FLI	Fwd CAA CCA GCC AGT GAG AGT CA Rev GCC GTT CTT CTC ATC CAT GT
HOX-D3	Fwd GTT ACC TGG AGC CTG AGA GC Rev GGC TGA TGA GGA GTG CTG TA
Cyclin D-1	Fwd GGC ACC TGG ATT GTT CTG TT Rev CAG CTT GCT AGG GAA CTT GG
Epo	Fwd GGA CAC CTA CTT GGT ATT GG Rev GAC GTT GTA GGC TGG AGT CC
GATA-2	Fwd ATG GGT GGA ACA TAC TCT TG Rev TCT CCA AAC AAA CAC TCT CC
HOX B4	Fwd TCA CAG AGC GAT TAC CTA CCC AGC Rev GGT AGA CGA CGG GCT CTT TGC
LMO2	Fwd GCT ACT TCC TGA AAG CCA TC Rev AGT CTC TCC TGC ACA ATT TC
LMO4	Fwd AGT CGA TTC CTG CAA GTG AG Rev TGA CCT CTC AGC AGA CCT TC
PU-1	Fwd GAG AAC CAC TTC ACA GAG CT Rev TAC AGG CGA ATC TTT TTC TT
SCL/TAL-1	Fwd TGC GTT TTA TTC GTT GTA TG Rev AAG CAG ATG AAC ACG AGC TA

## 2.2 Methoden in der Zellkultur

### 2.2.1 Allgemeines

Zur Verhinderung von Kontaminationen der ES-Zellen mit verschiedenen Mikroorganismen, insbesondere Pilzen, sind einige Vorsichtsmassnahmen einzuhalten, bei der Arbeit in der Zellkultur ist ständig auf steriles und sauberes Arbeiten zu achten. Alle Zelllinien werden bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Alle Arbeitsschritte (Zellen ausbringen, EBs setzen und spülen, Mediumwechsel, Stimulation und Ernte) erfolgen ausschliesslich unter der sterilen Werkbank. Sämtliche eingesetzte Kulturgefässe und Medien werden vom Hersteller in sterilem Zustand bezogen. Alle übrigen Geräte und Materialien, die mit den Zellen in Berührung kommen können, werden bei 2,2 bar (134°C) autoklaviert. Vor Arbeitsbeginn werden Arbeitsflächen und Materialien mit 70% Ethanol gereinigt.

### 2.2.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

**Tab. 3: Medien für die Zellkultur**

Medium	Komponente	Volumen	Endanteil
<u>ES-Medium</u> (für ES-Zellen)	DMEM	400 ml	80%
	FKS Gold weitere Zusätze*	100 ml	20%
<u>Einfrier-Medium</u>	DMEM		70%
	FKS Gold		20%
	DMSO		10%
	weitere Zusätze*		

\* Als weitere Zusätze werden den Medien je 5ml einer 100fachen Penicillin/Streptomycin-Lösung, einer 100fachen Lösung nicht essentieller

Aminosäuren, einer 100fachen Glutamin-Lösung und 0,1mM Endkonzentration  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben.

Bei Bedarf wird 1000 U/ml Leukemia Inhibitor Factor (LIF) zur Inhibierung der Differenzierung eingesetzt.

### **2.2.2 Passagierung und Kryokonservierung der ES-Zellen**

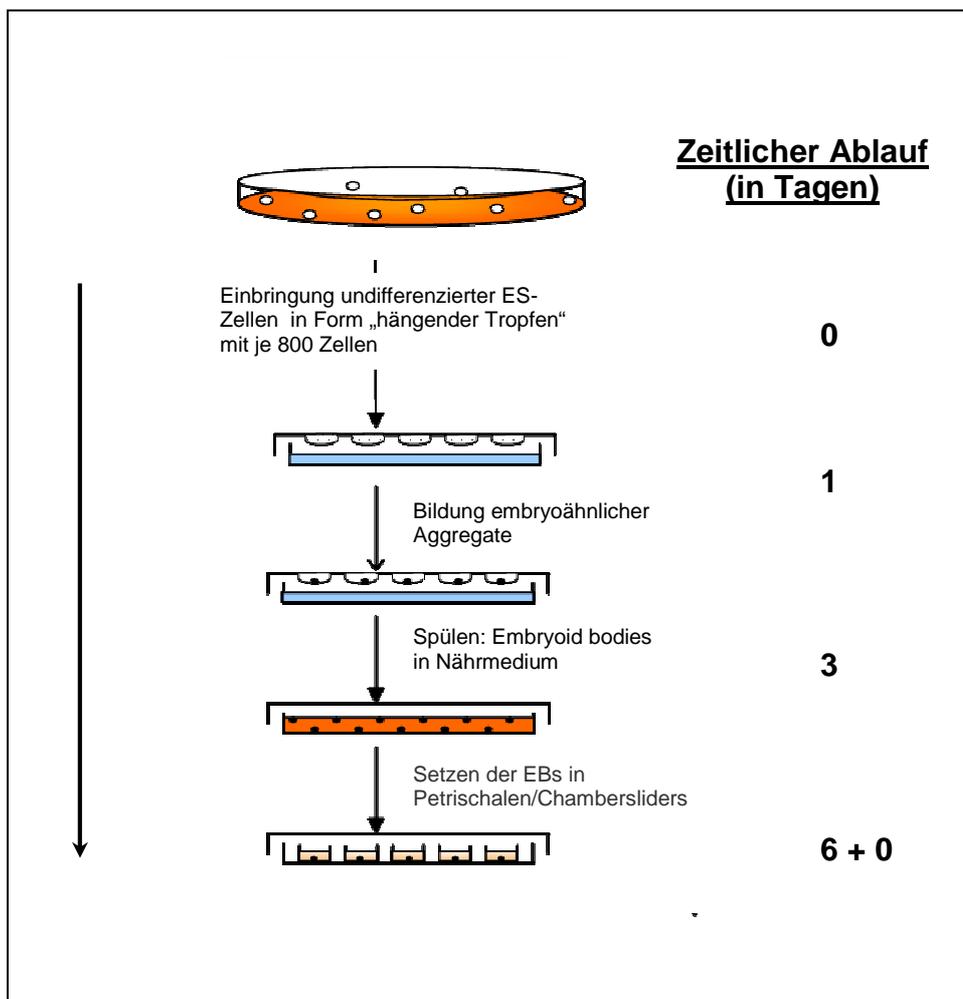
Zum Lösen der Zellen vom Boden einer Schale bzw. Kultivierungsflasche werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer einfach konzentrierten Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 5 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschliessend werden die gelösten Zellen in DMEM mit 20% FKS aufgenommen und bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in DMEM mit 20% FKS resuspendiert. Die Zellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Kryokonservierung werden die Zellen erneut bei 1000 rpm 5 Minuten bei RT zentrifugiert und mit Einfriermedium auf eine Zellzahl von 10<sup>7</sup>/ml eingestellt. Jeweils 1ml Zellsuspension wird in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff, zuvor werden die Zellen in Kryoboxen langsam auf -80°C eingefroren. Zur Kultivierung werden die Zellen unter Zugabe von 5 ml Kulturmedium aufgetaut, abzentrifugiert, in ES-Medium resuspendiert und in Gewebekulturschalen der gewünschten Grösse überführt.

### **2.2.3 Kultivierung von embryonalen Stammzellen ( ES-Zellen ) in Form von Embryoid Bodies**

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden (siehe Kapitel 1.1). In Anwesenheit von LIF (Leukemia inhibitory factor) im ES-Medium können sie ohne zeitliche Beschränkung in undifferenziertem Zustand kultiviert werden und proliferieren. Ein Rasen von Feederzellen trägt zur Produktion von LIF bei, weitere 1000 U/ml LIF

werden direkt dem Medium zugegeben. Um die Pluripotenz zu erhalten, sollten hohe Passagezahlen (>15) und zu hohe Zelldichte vermieden werden.

Durch Haltung ohne den Einfluss von LIF können ES-Zellen zu Embryoid Bodies (EB) ausdifferenzieren (Maltsev et al. 1994), der Ablauf dieser Entwicklung wird in Abb. 2.1 verdeutlicht. Für die Formation der EBs werden die proliferierenden undifferenzierten ES-Zellen nach 2 Tagen geerntet, auf eine Zellzahl von 800 Zellen/20 µl eingestellt und in einzelnen Tropfen a 20 µl am Deckel PBS-gefüllter Petrischalen als sogenannte „Hängende Tropfen“ gesetzt. Nach einer weiteren Kultivierung in dieser Form für 2 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> werden die EBs mit 15ml ES-Medium in bakteriologische Petrischalen gespült, wo sie so frei schwimmend für weitere drei Tage wachsen können. Schliesslich zeigen sich in Suspension kleine, makroskopisch sichtbare Zellkonglomerate. Diese werden nun beim sogenannten „Setzen“ in gelatinierte 6-Well-Platten oder Chamberslides für die spätere Immunfluoreszenzfärbungen überführt, je circa 8 EBs pro well. Dieser Tag wird als Tag 6+0 definiert, wobei die Zahl 6 für 6 Tage Vorkultur steht. Von diesem Zeitpunkt an sind die Zellen adhärent und können bis zu 30 Tage kultiviert werden. Die folgenden Zeitpunkte werden chronologisch jeweils mit Tag 6+“x“ bezeichnet, wobei “x“ die Tage in Kultur mit oder ohne VEGF-Substitution beschreibt (zum Beispiel 2 Tage Kultur +/- VEGF nach 6 Tagen Vorkultur an Tag 6+2). Ein Austausch des Kulturmediums mit oder ohne Zytokinzusatz erfolgt an jedem zweiten Tag. Die Kultivierung der ES-Zellen wird so über einen Gesamtzeitraum von 36 Tagen beobachtet.



### Abb. 2.1 Protokoll zur Differenzierung von embryonalen Stammzellen in vitro

Die undifferenzierten ES-Zellen liegen initial nach der Auftauphase in Suspension vor und proliferieren dort in Anwesenheit von LIF ohne zu differenzieren. An Tag 1 wird LIF entfernt und die Zellen zu je 800 Zellen/20  $\mu$ l in Form von „Hängenden Tropfen“ am Deckel PBS gefüllter Petrischalen aufgehängt. Innerhalb zwei Tagen entwickeln sich Aggregate, die Embryoid Bodies (EB). Nach Zusammenführung in Nährmedium lässt man diese drei Tage entwickeln, bevor sie schliesslich am Tag 6+0 in gelatinisierten Petrischalen oder in Chamberslidern als Ort ihrer weiteren Differenzierung gesetzt werden. Die Ernte erfolgt schliesslich nach 6+x Tagen.

### **2.2.4 Stimulation mit VEGF**

Um die Stimulation mit VEGF vorzubereiten, wurde eine Kultivierung von EBs durchgeführt, während der die Tolerierung unterschiedlicher Konzentrationen des Zytokins im Abstand von 2 Tagen mikroskopisch beurteilt wurde. Festgelegt wird daraufhin eine eingesetzte VEGF-Konzentration von 30 ng/ml, was Angaben in der Literatur vergleichbar ist. Die kontinuierliche Stimulation der EBs beginnt an Tag 6 der Zellkultur, an diesem Tag werden parallel ein stimulierter und ein unstimulierter Versuchsteil deklariert. Hierzu werden die EBs zu gleichen Teilen in 6-well-Platten bzw. Chamberslides verteilt und unter identischen Umgebungsbedingungen gehalten (siehe Kapitel 2.2). Den zu stimulierenden EBs wird bei jedem Mediumwechsel VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in der gewählten Konzentration zum Nährmedium zugesetzt. Die Zellen der Kontrollgruppe werden ohne den Zusatz von VEGF kultiviert.

### **2.2.5 Zellernte**

Die anschließende Differenzierung der EBs erfolgt über einen Zeitraum von 30 Tagen. Zu den definierten Zeitpunkten Tag 6+0 (noch in nicht-adhärenter Form), 6+2, 6+5, 6+10, 6+15, 6+20, 6+25 und 6+30 wird jeweils ein Teil der Zellen geerntet und der weiteren Charakterisierung per Durchflusszytometrie zugeführt oder für PCR (bei -80° C) oder Färbung (noch adhären auf Chamberslides, bei -20° C) gelagert (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.5.5).

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Immunofluoreszenz - Färbung

Prinzip:

Die auf den sogenannten Chamberslides kultivierten EBs werden in ihrer dreidimensionalen Struktur fixiert. Durch Inkubation mit entsprechenden Farbstoff-markierten Antikörpern kann sowohl die Dichte als auch das Verteilungsmuster der Zielantigene im Zellverband sichtbar gemacht und per Mikroskop analysiert werden. Verwendet werden wie hier fluoreszierende Farbstoffe ( FITC oder PE ) oder Peroxidase mit Biotin-Streptavidin-Reaktion. DAPI führt zu einer Gegenfärbung der Zellkerne.

Ablauf:

Die Chamberslides mit den adhären EBs werden zu jedem Zeitpunkt geerntet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zunächst lässt man sie für 20 Minuten bei Raumtemperatur auftauen. Zur Fixierung wird mit Aceton für 10 Minuten überschichtet. Es folgen drei Waschschrte mit PBS für je eine Minute. Die Inkubation mit dem FITC-markierten anti-CD31-Antikörper ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wird für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach weiteren drei Waschschrten mit PBS wie beschrieben, werden die Plastikkammern der Chamberslides entfernt, so dass die EBs auf Objektträgern zurückbleiben. Zum Eindeckeln wird Vectashield-Einbettungsmedium plus DAPI (Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid – Konzentration  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verwendet. Nach dem lichtgeschützten Lufttrocknen bei Raumtemperatur werden die Deckglässchen mit farblosem Nagellack abgedichtet. Die Aufbewahrung muss ebenfalls lichtgeschützt erfolgen. Zur Auswertung kommt ein Fluoreszenz-Mikroskop mit 50W Quecksilber-Lampe zum Einsatz, Bilder werden mit einem Fluoreszenz-Imaging System in vierzig- sowie hundertfacher Vergrößerung erzeugt.

## 2.3.2 Durchflusszytometrie

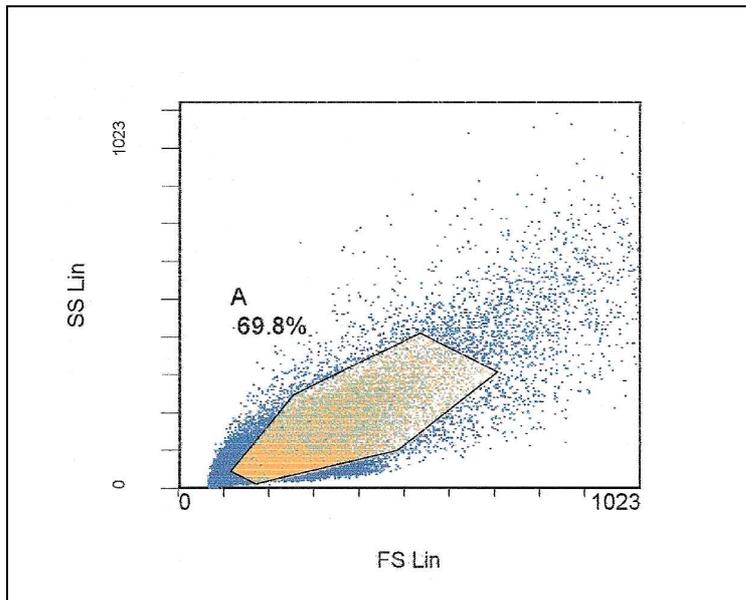
### 2.3.2.1 Grundlagen

Eine Markierung der Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern ermöglicht die Untersuchung der Expression von zellulären Oberflächenantigenen im Durchflusszytometer (FACS: Fluorescence Analyse Cell Sorting). Es wird nach Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität analysiert, das einfallende Licht wird in Vorwärtsrichtung (forward light scatter, FS) und im rechten Winkel zum einfallenden Licht (sideward light scatter, SS) gestreut. Um die Population von Interesse von anderen korpuskulären Bestandteilen und Zelldebris abgrenzen zu können, wird zunächst eine Dot-Plot-Graphik mit den Parametern FS auf der Abszisse und SS auf der Ordinate generiert. Der Parameter FS ermöglicht eine Abschätzung der relativen Zell- bzw. Partikelgröße, der SS-Wert gibt eine Abschätzung der Zellgranularität. Hier können durch das Setzen eines „Gates“ (engl. Schranke, Sperre) die zu untersuchenden Zellen selektiert werden. Nur die Zellen innerhalb dieses Gates werden mit Hilfe der verwendeten Software als Ausgangspopulation für alle weiteren Analysen berücksichtigt (Abb. 2.2).

Zur Analyse wird die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension durch Überdruck über eine Stahlkapillare in die Messküvette überführt. Hier werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit beschleunigt, so dass es zu einer Hintereinanderreihung der Zellen und Auflösung von kleineren Zellaggregaten kommt. Am Analysepunkt werden die Partikel mit einem Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm bestrahlt. Die Fluoreszenzen der markierten Antikörper müssen daher Anregungswellenlängen um 488nm aufweisen. Jeder Farbstoff besitzt darüber hinaus ein charakteristisches Emissionsspektrum, das die Differenzierung der Signale und damit der Zellpopulationen ermöglicht:

Fluorescein Isothiocyanat (FITC): Dieses Fluorochrom (Molekulargewicht 359 kDa) hat eine maximale Fluoreszenz-Emission von 520 nm.

R-Phycoerythrin (PE): Dieser Farbstoff (240 kDa) stammt aus einer roten Alge. Das Maximum der Emission liegt hier bei 578 nm. Damit ist es ideal für die Detektion sogenannter „Low-density populations“ mit niedriger Rezeptordichte auf der Zelloberfläche (<http://www.immunocytometry.com/antibody.html>).

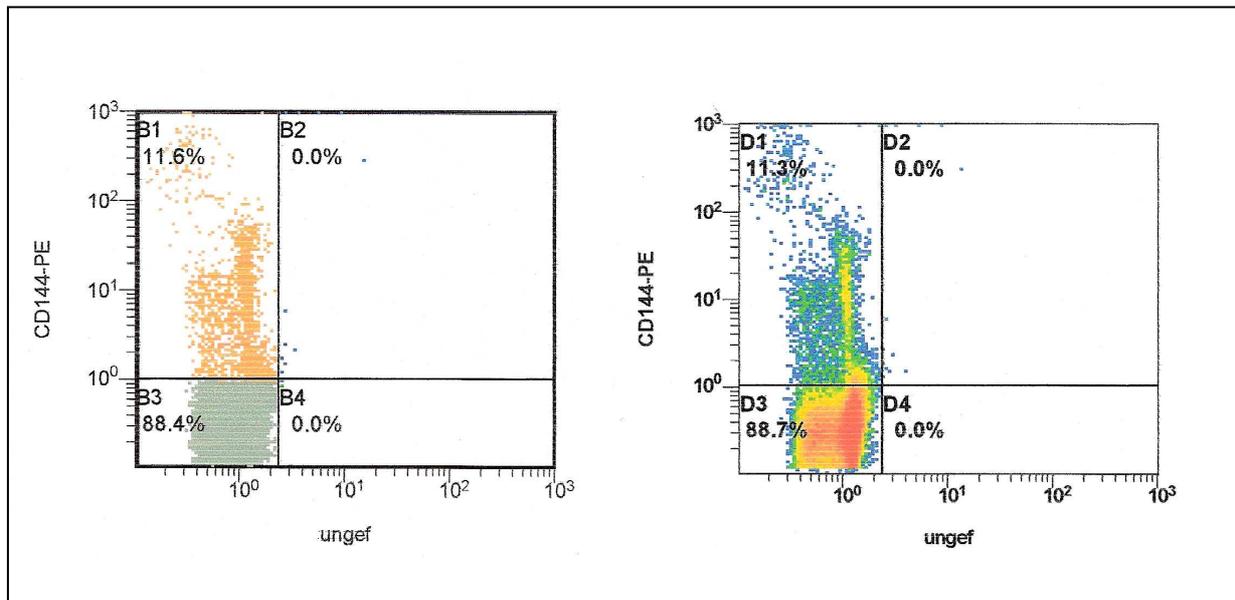


**Abb. 2.2: Darstellung der Messung in der FACS-Analyse in Form eines Dotplots**

Die gemessenen Zellen werden zunächst nach SS (sideward light scatter, misst die Zellgranularität) und FS (forward light scatter, schätzt die relative Zell- bzw. Partikelgröße) abgebildet. Das Eingrenzen in Form eines Gates („A“) ermöglicht eine Auswahl des Zellbereich, der für die weitere Darstellung (siehe unten) verwendet wird. Hiermit können zum Beispiel grosse Zellkonglomerate und Zelldebris von der Analyse ausgeschlossen werden.

Nach Festlegung der Gate-Einstellungen erfolgt die Ermittlung und Analyse der fluoreszenzpositiven Zellen. In verschiedenen Darstellungen lassen sich unterschiedliche Schwerpunkte der Auswertung setzen: Im Histogramm setzt die Intensität der Fluoreszenz für eine Farbe, d.h. einen Fluoreszenz-Farbstoff (X-Achse, logarithmisch) und die jeweilige Zellzahl (y-Achse) in Beziehung. Aus einem „Dot-Plot“ lässt sich auf einen Blick der Anteil einfach- und doppelt-positiver Zellen für ein oder zwei eingesetzte Farben ablesen. Im Verlauf der Versuchsplanung erweist sich die Darstellung im 4-Felder-Dotplot als am übersichtlichsten und damit am

aussagekräftigsten. Es erfolgt die parallele Darstellung eines Dotplots mit den Feldern zugeordneten farbigen Farbpunkten, wobei jeder Punkt einer Zelle entspricht, und eines sogenannten Density-Plots, in dem die Farbgebung die Dichte der Zellen am jeweiligen Punkt anzeigt (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Beispielhafte Darstellung zweier 4-Felder-Dotplots zur Abbildung der Ergebnisse der FACS-Analyse**

Die Ordinate stellt logarithmisch die Fluoreszenz für den Marker CD-144-PE dar, die Abszisse ist nicht besetzt (ungef = ungefärbt). Im linken Diagramm entspricht im Feld B3 jeder graue Punkt einer ungefärbten Zelle, im Feld B1 zeigen sich 11,6% der Zellen als rote Punkte und damit CD144- positiv. Der rechte Teil zeigt das Ergebnis derselben Messung korrespondierend als Density-plot, d.h. als Darstellung der Anzahl der Zellen an jedem Punkt des Diagramms. Rot steht für maximale Zelldichte, blau repräsentiert lediglich einzelne Zellen. Man erkennt hier zwei Maxima, d.h. zwei Konglomerate mit hoher Zelldichte, der Grossteil liegt im Feld D3 und ist damit ungefärbt, ein weiteres Konglomerat erkennt man weiter oben im Feld D1.

### 2.3.2.2 Durchführung

Auf der Oberfläche der Zellen im Embryoid Body (EB) sollen Moleküle nachgewiesen werden, deren Expression in der Literatur als hinweisend und/oder charakteristisch für die Entwicklung von Endothelzellen und deren Vorläufern angesehen wird. Dazu zählen CD31=PECAM1, CD144=VE-Cadherin, Flk1=VEGF-Rezeptor 2 und CD133

als ein Marker für den Hämangioblast, einem gemeinsamem Vorläufer endothelialer und hämatopoetischer Entwicklung (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.5)

Zur Messung der Fluoreszenz im FACS-Gerät ( Fluorescence Analysed Cell Sorting) nach Markierung mit entsprechenden Antikörpern müssen die ES-Zellen zunächst aus dem Embryoid Body gelöst und in Suspension gebracht werden. Da sie an Tag 6+0 noch in nicht-adhärenter Form vorliegen, wird hier der Inhalt von ca. 9 Petrischalen in Falcon-Röhrchen überführt und bei 1300 U/min 10 Minuten herunterzentrifugiert. Anschliessend wird mit PBS gespült und für 20 Minuten in Kollagenase IV (1mg/ml) bei 37°C inkubiert. Nach jeweils 10 Minuten erfolgt die Re-Suspension der Zellen.

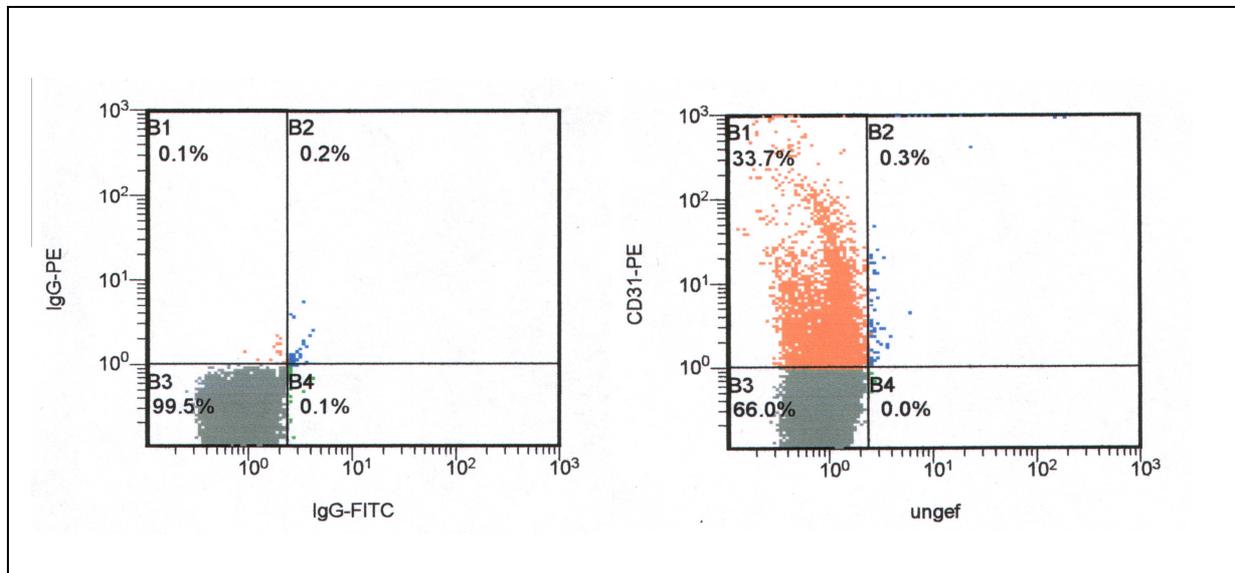
Zu den Zeitpunkten Tag 6+2 bis 6+30 haften die EBs bereits am Boden der 6 Well-Platten. Je 2 dieser Platten (VEGF-stimuliert und unstimuliert) werden mit PBS gewaschen und anschliessend mit je 10 ml Kollagenase IV (1mg/ml) bei 37°C inkubiert. Nach 5 Minuten werden die EBs mit Hilfe eines Cell Scrapers von der Unterlage gelöst und mit der Kollagenase in je ein 50 ml Falcon-Röhrchen für den VEGF-stimulierten und den unstimulierten Teil überführt. Diese inkubieren für weitere 55 Minuten bei 37°C und werden in dieser Zeit zwei- bis dreimal durch jeweils dreimaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml Pipette resuspendiert.

Anschliessend wird die Zellsuspension in beiden Fällen über einen 40 µm Filter gegeben, erneut 10 Minuten abzentrifugiert, dann in gekühlter PBS-Lösung (4°C) aufgenommen und suspendiert. Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, je maximal  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 1ml in braune Eppendorf-Cups aufgeteilt. Bei 4°C wird nun für 30 Minuten mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Für den jeweiligen Erntetag werden insgesamt 14 Messungen durchgeführt, je 7 mit unstimulierten bzw. VEGF-stimulierten Zellen. Die eingesetzten Antikörper sind:

1. Isotypenkontrolle FITC- und PE-markiert (jeweils  $10 \mu\text{l}/10^6$  Zellen)
2. CD31 - FITC (Konzentration  $2,5 \mu\text{g}/10^6$  Zellen)
3. CD31 - PE (Konzentration  $2 \mu\text{g}/10^6$  Zellen)
4. Flk1 - PE (Konzentration  $4 \mu\text{g}/10^6$  Zellen) und CD31 - FITC (siehe oben)
5. CD133 - PE (Konzentration  $1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen) und CD31 - FITC (siehe oben)

6. CD144 - unkonjugierter Primär-Antikörper (Konzentration  $1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen)
7. unmarkiert

Nach anschliessender Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500 U/min folgen drei Waschschriffe mit PBS, wobei das Pellet jeweils in 500  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert wird. Für Probe 6 und 7 wird danach für 20 Minuten mit dem Sekundär-Antikörper-PE markiert, Inkubation in einer Konzentration von  $1,5 \mu\text{g}/10^6$  Zellen bei  $4^\circ\text{C}$ . Weitere fünf Waschschriffe werden vorgenommen. Die übrigen Proben (d.h. 1-5) werden weitere zweimal, damit auch insgesamt fünfmal gewaschen. Schliesslich werden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  FACS-Isoton-Puffer aufgenommen und in FACS-Tubes transferiert. Die Messungen erfolgen mit einem Zweifarb-Protokoll im FC500 der Firma Beckman-Coulter unter Verwendung der zugehörigen Software. Als Ausgangspunkt dient die zuerst gemessene Isotypen-Kontrolle (Abb. 2.4). Die Ergebnisse der positiven Zellen werden in Prozent aus den Dotplots abgelesen.



**Abb. 2.4: Beispielhafte Darstellung einer FACS-Messung mit zugehöriger Isotypenkontrolle**

Im linken Diagramm stellt die Abszisse logarithmisch die Fluoreszenz für die FITC-markierte Isotypen-Kontrolle dar, die Ordinate für die Markierung PE. In der Isotypenkontrolle werden alle Zellen im Feld B3 abgebildet und sind demnach ungefärbt. Der Einsatz des PE-markierten Antikörpers für CD31 lässt im Feld B1 eine Population CD31-positiver Zellen zur Darstellung kommen.

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 ELISA ( Enzyme-Linked Immunosorbent Assay )

#### 2.4.1.1 Grundlagen

Der Begriff ELISA beschreibt eine Methode, *in vitro* die in der jeweiligen Probe vorhandenen löslichen Zytokine quantitativ nachzuweisen. Hierzu wird eine 96-well Mikrotiterplatte verwendet, deren Boden mit adhärennten Antikörpern beschichtet ist, die das jeweilige Zielantigen spezifisch binden. Nach Spülen verbleiben die gebundenen Moleküle und können durch Inkubation mit Biotin-markierten Antikörpern und Biotin-Streptavidin-Reaktion der photometrischen Analyse zugänglich gemacht werden.

#### 2.4.1.2 Durchführung

Die eingesetzten Proben für die ELISA- Analyse stammen aus dem Versuchsteil ohne zusätzliche Substitution von VEGF. Bei jedem Mediumwechsel wird das zu verwerfende alte Kulturmedium gesammelt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im ELISA werden die Proben auf ihren Gehalt an VEGF und damit eine mögliche VEGF-Eigenproduktion der ES-Zellen im Verlauf ihrer Differenzierung untersucht.

Der Ablauf unserer Analyse entspricht dem mitgelieferten Protokoll der Herstellerfirma Ray Biotech. Die Nachweisgrenze lag bei 2 pg/ml. Entsprechend der Instruktion des Herstellers wird zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe mit definierten VEGF-Konzentrationen erstellt. Eingesetzt werden jeweils 100  $\mu\text{l}$  jeder Probe, nach hohen Resultaten oberhalb des Messbereichs im ersten Durchlauf für Tag 6+26 und 6+28 werden diese Proben im weiteren zuvor 1:1 mit PBS-Lösung verdünnt. Die erste Inkubationsphase erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur. Nach vier Waschschritten mit der vorgehaltener Waschlösung wird der biotinmarkierter

Detektions-Antikörper für eine Stunde zugegeben und eine Biotin-Streptavidin-Reaktion eingeleitet, (Inkubation mit HRP-Streptavidin sowie TMB-Reagenz (Tetramethylbenzidin), unterbrochen jeweils von Waschschritten). Nach Beendigung der Reaktion mit der zugehörigen Stop-Lösung (2M schwefelige Säure) erfolgt die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und die quantitative Analyse in Bezug zur Standardmessreihe.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden**

Alle verwendeten Reagenzien und Proben werden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Alle Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, sämtliche Labormaterialien werden bei 2,2 bar (134°C) autoklaviert. Vor Arbeitsbeginn werden alle Materialien und Arbeitsflächen mit 70% EtOH gereinigt.

### **2.5.1 Untersuchte Genabschnitte**

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Transkriptionsfaktoren und Gene sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Untersucht wurden Faktoren und Gene aus folgenden Gruppen:

- a) - Schlüsselgene für die Entwicklung von Endothelzellen aus ESC
- b) - Homeobox-Gene
  - Erythropoetin
  - Genen der Stammzell- und Zellzyklus- Regulation
  - Gene assoziiert mit der Hämatopoese

**Tab. 4a: Schlüsselgene für die Entwicklung von Endothelzellen aus ESC**

Untersuchtes Gen	funktionelle Rolle des Genprodukts	Biologische Relevanz	Literatur-Referenz
<b>CD31</b> (PECAM1)	Transmembran-Adhäsionsmolekül	- im gesamten Gefäßendothelium exprimiert - Modulator der Migration von Endothelzellen, der Zell-Zell Adhäsion und der Angiogenese	Li et al. 2005, Redick and Bautch 1999, DeLisser et al. 1997
<b>Fik1</b> (KDR, VEGF-R2)	VEGF-Rezeptor 2	- Marker für mesenchymale und vaskuläre Vorläuferzellen, später spezifisch für Endothelzellen	Chung et al. 2002, Kabrun et al 1997, Vittet et al. 1996, Shalaby et al 1995
<b>CD144</b> (VE-Cadherin)	Adhäsionsmolekül	- strikt endothel-spezifisches Zell-Adhäsions-Molekül - essentiell als Regulator der embryonalen Gefäßbildung	Vestweber 2008, Zhang et al. 2005, Vittet et al. 1997
<b>ERG</b> (Endothel-related gene)	Transkriptionsfaktor der Ets-Familie	- wichtiger Modulator der Endothelzell-Differenzierung - induziert andere Schlüsselmoleküle wie z.B. VE-Cadherin und VEGF-Rezeptoren	Lelievre et al. 2002, McLaughlin et al. 2001, Sato 2001
<b>FLI</b> (Friend leukemia integration-site)	DNS bindender - nukleärer Transkriptionsfaktor (Ets-Familie)	- erster nukleärer Marker des Endotheliums - zeigt Hämangioblast-Formation an - reguliert Gefäßstabilität	Folpe et al. 2001, Sato 2001, Lelievre et al. 2002, Rossi et al. 2004
<b>EGR1</b> (Early growth response-1)	Zinkfinger-Transkriptionsfaktor (Ets-Familie)	- initiales, frühes Gen in der Angiogenese - entscheidende Rolle für mikrovaskuläres Endothel-Wachstum und Neovaskularisation - induziert das proangiogene FGF-2	Fahrny et al 2003, Khachigian et al. 2004
<b>HoxD3</b>	Homeobox Gen	- wichtige Rolle als Induktor der Angiogenese , reguliert z.B. Integrin-Expression und adulte Wundheilung	Boudreau et al. 2004, Uyeno et al. 2001, Boudreau et al. 1997
<b>HoxB4</b>	Homeobox Gen	- steuert Erneuerung und Expansion des Stammzellpools - wirkt in der Weiterentwicklung zur definitiven hämatopoetischen Stammzelle	Nikolova-Krstevski et al. 2008, Bjornsson et al. 2003, Kyba et al. 2002, Antonchuk et al.2001, Helgasson et al 1996, Sauvageau et al 1995

**Tab. 4b: Gene mit Wirkungsschwerpunkt in Regulation von Hämatopoese und Stammzellzyklus**

Untersuchtes Gen	funktionelle Rolle des Genprodukts	Biologische Relevanz	Literatur-Referenz
<b>SCL/Tal-1</b>	basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essentiell für die frühe Hämatopoese</li> <li>- Transkriptionskomplexe mit LMO2 und GATA2</li> <li>- zusätzlich auch Rolle in der embryonalen Angiogenese, reguliert endotheliale Marker</li> <li>- starke Expression im Hämangioblasten</li> </ul>	Nikolova-Krstevski et al. 2008, Deleuze et al 2007, Lecuyer und Hoang 2004; Mikkola et al 2003, Chung et al. 2002 ; Porcher et al. 1996
<b>GATA2</b>	Transkriptionsfaktor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- entscheidend für Fortbestehen und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen und Progenitoren</li> <li>- Transkriptionskomplexe mit LMO2 und SCL</li> <li>- reguliert auch endothel-spezifische Gene</li> </ul>	Nikolova-Krstevski et al. 2008, Ling et al. 2004, Minegishi et al 2003, Gumina 1997
<b>LMO2</b>	Transkriptionsfaktor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schlüsselrolle während Hämatopoese</li> <li>- Expression auch im Endothelium</li> <li>- regulative Rolle in embryonaler Angiogenese, Vaskulogenese nicht beeinflusst</li> <li>- Transkriptionskomplexe mit SCL und GATA2</li> </ul>	Deleuze 2007, Mikkola et al 2003; Yamada et al. 2000
<b>LMO4</b>	Transkriptionsfaktor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ähnliche, jedoch im Vergleich zu LMO2 geringere Bedeutung für Hämatopoese</li> </ul>	Tse et al. 2004, Kenny et al. 1998
<b>Epo</b>	Zytokin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proliferation und Differenzierung während primitiver und definitiver Erythropoese</li> <li>- induzierbar durch Hypoxie</li> <li>- Expression des Epo-Rezeptors auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen</li> </ul>	Jelkmann 2007, Lee et al. 2001, Lin et al. 1996, Wu et al 1995
<b>Pu1</b>	Transkriptionsfaktor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vielfältiger Einfluss mit Schwerpunkt auf die Differenzierung zur myeloischen Zellreihe</li> <li>- Konzentration entscheidend für finale Destination</li> </ul>	Kastner und Chan 2008, Iwasaki et al. 2005, Dahl und Simon 2003
<b>Cyclin D1</b>	Regulator des Zellzyklus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- steuert zahlreiche Transkriptionsfaktoren</li> <li>- induziert Mitose (Protoonkogen?)</li> </ul>	Tashiro et al 2007, Bienvenu et al. 2005

### 2.5.2 Isolierung zytoplasmatischer RNS aus Embryoid Bodies

Der Isolierung der RNS geht zunächst die Lysierung der Zellen und Inaktivierung der RNAsen voraus. Die für die PCR-Analyse vorgesehenen Zellen werden tiefgefroren bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Gewinnung der zytoplasmatischen RNS werden die Proben zunächst auf Trockeneis gelagert, unter Zugabe von 2 ml RNS-Clean aufgetaut und homogenisiert. Nach Aufteilung in zwei 2 ml Eppendorfcups werden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Chloroform p.a. zugegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 14000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der resultierende wässrige Überstand, der die RNS enthält, wird in neue 2 ml Eppendorfgefäße transferiert, der Rest verworfen. Zu dieser wässrigen Phase werden jeweils 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 14000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$  wird der Überstand dekantiert. Das Pellet wird mit je 500  $\mu\text{l}$  70% Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (10 Minuten bei 10000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird gründlich bei Raumtemperatur getrocknet. Die Aufnahme erfolgt in 20  $\mu\text{l}$  RNS-freiem  $\text{H}_2\text{O}$ . Der RNS-Gehalt wird anschliessend photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.5.4). Die Aufbewahrungstemperatur für die RNS-Proben beträgt minus  $80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.3 Reverse Transkriptase – Reaktion

In der Reverse-Transkriptase-Reaktion erfolgt die Synthese von cDNS (komplementäre DNS) anhand einzelsträngiger RNS-Matrizen. Die gewonnene cDNS dient im weiteren als Template für die PCR. Die Gesamt-RNS wird entsprechend der photometrischen Messwerte auf eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{g}$  auf 10  $\mu\text{l}$  Volumen eingestellt, welches in PCR Cups vorgelegt wird. Daraus resultiert beispielhaft das folgende Pipettierschema:

---

<u>Gemessener RNS-Gehalt</u>	<u>RNS + H<sub>2</sub>O (Gesamtvolumen 10μl)</u>
665 ng/μl	1,50 μl RNS + 8,50 μl H <sub>2</sub> O
397 ng/μl	2,52 μl RNS + 7,48 μl H <sub>2</sub> O

Diese Proben eingestellter RNS werden zunächst für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen zu denaturieren und anschliessend auf Eis abgekühlt. Es folgt die Inkubation zur Synthese für 1 Stunde bei 37°C unter Zusammenführung mit folgendem Ansatz:

#### Standard-RT-PCR-Mix je Probe

4 μl	5fach Puffer
2 μl	0,1 M DTT
1 μl	RNS-Guard (10U/μl)
1 μl	dNTP-Mix (4nM)
1 μl	pd(N <sub>6</sub> )Primer 50μM
1 μl	Reverse Transkriptase (M-MLV-Transkriptase, 200U/μl)

Bei mehr als einer PCR-Probe werden grundsätzlich sogenannte Master-Mixe hergestellt, bestehend aus den oben genannten Komponenten ohne RNS. Dieser wird hier dann zu der vorgelegten RNS pipettiert. Nach Ablauf der Reaktion wird diese durch Erhitzen bei 95°C für 5 Minuten gestopp t. Nach dem Abkühlen auf Eis werden die cDNS-Proben bei -20°C gelagert und für die weitere PCR-Analyse bereitgehalten.

## 2.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der RNS und DNS nach Isolation bzw. Reverse Transkriptase – Reaktion werden spektralphotometrisch bestimmt. Die Proben werden hierbei in einer Verdünnung von je 2  $\mu\text{l}$  der Probe mit 98  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt. Das Absorptionsmaximum für einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren hat sein Maximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure errechnet sich aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, der Verdünnung und einem für RNS respektive DNS spezifischen Multiplikationsfaktor. So entspricht eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 40 ng/ $\mu\text{l}$  ssRNS bzw. 50 ng/ $\mu\text{l}$  dsDNS (Sambrook et al., 1989)

$$c_{(\text{RNS})} [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} (\text{RNS}) \times 40 \times \text{Verdünnung}$$

$$c_{(\text{DNS})} [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} (\text{DNS}) \times 50 \times \text{Verdünnung}$$

## 2.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.5.5.1 Grundlagen

Die PCR ist ein in-vitro Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung einzelner DNS-Sequenzen. Dabei beruht die DNS-Amplifikation auf der zyklischen Wiederholung folgender drei Schritte, die bei unterschiedlichen Temperaturen ihr Reaktionsoptimum besitzen:

1. Denaturierung: Die komplementären DNS-Stränge werden durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge aufgespalten.

2. Primer-Annealing: Die Primer, zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide, bestehend aus in der Regel 20-30 Nukleotiden, lagern sich an die Einzelstränge an. Sie dienen im Folgenden als Starter für die Neusynthese des jeweils komplementären DNS-Stranges. Dieser Reaktionsschritt findet bei einer Temperatur zwischen 50 und 60°C statt, die entsprechend der Primärlänge und dessen G/C-Gehalts variiert werden muss.
3. Primer-Extension: Mit Hilfe einer DNS-Polymerase werden die DNS-Stränge in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Das Temperaturoptimum für die verwendete thermostabile Taq-Polymerase liegt bei 70 bis 75°C. Auf diese Weise wird während eines Zyklus eine vollständige Kopie und damit Verdopplung der Menge an Template-DNS erreicht. (Mülhardt 2003, Sambrook et al. 1989)

Da jeder Zyklus theoretisch zu einer Verdopplung des gewünschten Genabschnittes führt, wäre eine exponentielle Amplifikation des DNS-Abschnittes zu erwarten. Es hat sich jedoch gezeigt, dass nach spätestens 40 Zyklen ein sogenannter „Plateau-Effekt“ eintritt. Als Ursachen werden eine Aktivitätsminderung der Taq-Polymerase, Primer-Annealing und eine zunehmende Ineffizienz des Denaturierungsschrittes durch Anreicherung amplifizierter DNS angenommen. Man geht daher von  $10^5$  bis  $10^7$  Kopien statt der theoretischen  $10^9$  nach 30 Zyklen aus.

### 2.5.5.2 Primer-Design

Zur Generierung der Primer für die PCR-Reaktion wird das Computerprogramm Primer 3 (Copyright Whitehead Institute for Biomedical Research) genutzt. Die durch das Programm vorgeschlagenen Primer werden nach folgenden Regeln überprüft: Dabei sollte die Länge der Primer zwischen 20 und 30 Basen liegen. Es wird darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur für beide Primer eines Primerpaares möglichst nah beieinander lag. Die Annealingtemperatur ( $T_{an}$ ), die kleiner als die optimale Synthesetemperatur der thermostabilen DNS (70°-74°C) sein sollte, lässt sich nach folgender Formel berechnen (Suggs et al. 1981):

$$T_{an} = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2$$

Die durch PCR zu generierenden DNS-Fragmente sollten 300 bp bis 1 kbp lang sein. Die verwendeten Primer zeigt die Tabelle 2 (siehe Kapitel 2.1.7).

### 2.5.5.3 Semiquantitative Standard-PCR

Die semiquantitative PCR ergibt einen ersten Nachweis der Expression der untersuchten Genabschnitte und gibt erste Hinweise, deren DNS- oder indirekt RNS-Konzentrationen abzuschätzen. Hierbei werden als Standard das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen 18s eingesetzt. Man nimmt dessen Expression als Konstante an, auf die man die Menge des spezifischen Produkts beziehen kann. Die PCR-Reaktionen erfolgen in einem programmierbaren Thermocycler.

Zur DNS-Amplifizierung wird für alle Versuchszeitpunkte die gleiche Ausgangskonzentration an DNS eingesetzt. Je 2 µl DNS-Probe werden zu folgendem Standard-PCR-Mix gegeben:

#### Standard-PCR-Mix:

0,2 µl Oligonukleotid-Primer Fwd  
0,2 µl Oligonukleotid-Primer Rev  
1,0 µl 10x PCR-Puffer  
1,0 µl dNTP-Mix (xxmM)  
0,2 µl 18s-Haushaltsgen-Primer  
0,1 µl Taq-DNS-Polymerase  
mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl ergänzen

In einer ersten Versuchsreihe wird bestimmt, wie viele PCR-Zyklen durchgeführt werden können, bis das PCR-Fragment die logarithmische Amplifikationsphase verlässt. So kann die bestmögliche Intensität der amplifizierten DNS-Fragmente erreicht werden. Die Annealing-Temperatur wird etwa 2°C unter der geschätzten Schmelztemperatur der Primer gewählt. Das mit dem ersten Primerpaar amplifizierte

Haushaltsgen sollte in allen Reaktionen die gleiche Bandenintensität aufweisen, die Menge des eingesetzten Zell-Lysates wird daran angepasst.

Das Standard-PCR-Programm läuft mit folgenden Reaktionsparametern ab:

1.	Denaturierung		93°C	3 min.
2.	Temperaturzyklus (30-36 Zyklen*)	- Denaturierung	93°C	55 se k.
		- Primer-Annealing	z.B. 59°C	55 sek.
		- Synthese	72°C	60 sek.
3.	Terminale Verlängerung		72°C	10 min.
4.	Kühlung			

\* Anzahl der Zyklen:      30 für FLI-1, EGR1  
                                      32 für CD144, PECAM, FLk-1  
                                      34 für ERG (bei 60°C)

#### 2.5.5.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte

Prinzip:

Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgt in einem 2 % w/v Agarosegel, die anschliessende Sichtbarmachung unter Nutzung der UV-Fluoreszenz von Ethidiumbromid (0,1 µg pro Gel). 10 µl Probe werden mit 2 µl Ladepuffer versetzt, aufgetragen und bei 10 V/cm<sup>2</sup> getrennt. Zur Grössenbestimmung werden definierte DNS-Grössenmarker (enzymatisch geschnittene Phagen-DNS 100 bp und 1 kbp) neben den Proben eingesetzt.

Durchführung:

Die Gelkammer wird mit Autoklavierband abgedichtet und die Kämme eingelegt, die später die Geltaschen freihalten. Im Becherglas werden 5 g Agarose abgewogen, mit TBE-Puffer auf 250 g aufgefüllt und im Mikrowellenherd erhitzt. Nach dem Abkühlen unter Rühren für ca. 15 Minuten wird 1µl/ml Ethidiumbromid zugeben und gut

vermischt. Anschliessend wird die Agarose-Lösung luftblasenfrei in die Gelkammer eingefüllt und ca. 45 Minuten aushärten gelassen. Dann können Autoklavierband und Käbme entfernt werden. Die Gelkammer wird in die Elektrophoresekammer eingelegt und diese mit TBE-Puffer aufgefüllt.

DNS-Proben und Standard-Marker werden in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung wird durch Anlegen einer 100mV Spannung gestartet und für ca. 1 Stunde laufen gelassen. Die Banden im Gel werden unter einer 366 nm UV-Lampe sichtbar gemacht und abfotografiert.

### **2.5.5.5 Quantitative real time PCR (Taqman©)**

Grundlagen:

Eine der exaktesten Methoden zur relativen Quantifizierung der Genexpression in einem einzigen Reaktionsansatz stellt die Realtime PCR mit der Taqman-PCR-Technologie dar. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CYBR-Green, der in die DNS interkaliert, wird es möglich, die Amplifikation unmittelbar mit der quantitativen Detektion zu kombinieren. Um doppelsträngige PCR-Produkte nachzuweisen, nutzt man die Tatsache, dass die Fluoreszenz von CYBR-Green mit der Menge an DNS-Doppelsträngen zunimmt. Diese Fluoreszenz-Emission wird im Taqman-Verfahren nach jedem Zyklus bestimmt. Deren Intensität hängt dabei von der initial vorhandenen Kopienzahl der Zielsequenz ab. Je mehr Kopien vorhanden sind, desto früher wird ein Anstieg der Fluoreszenzintensität messbar, so dass dadurch eine quantitative Bestimmung der Ausgangszahl an Zielgen-Kopien in der Probe möglich ist. In der real-time PCR wird aktuell nicht mehr primär mit DNS-Mengen oder Konzentrationen gearbeitet, vielmehr werden als Messwert für die Quantifizierung der Ausgangsmenge die sogenannten Ct oder CP (=Crossing Point) Werte herangezogen. Diese beschreiben die Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein als konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Damit befindet sich am Zeitpunkt Ct in allen Proben eine identische Menge an neu synthetisierter DNS. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer relativen Quantifizierungsstrategie. Für die Bestimmung der Expression eines Gens wird nicht die absolute Kopienzahl oder

Konzentration bestimmt, stattdessen wird die Expression des zu untersuchenden Gens in jeder Probe auf ein zweites, ubiquitär homogen exprimiertes Gen bezogen. Dieses sogenannte „Housekeeping“-Gen (HKG) – hier  $\beta$ -Aktin – dient zur Normalisierung verschiedener Proben. Deren Vorteil liegt in einer geringeren Varianz der Expressionsergebnisse. Abweichungen durch Gewebe- und Matrixeffekt, unterschiedliche RNS-Extraktionseffizienz oder Ungenauigkeiten in der RT-PCR innerhalb einer experimentellen Probe beeinflussen gleichermassen untersuchtes Gen und HKG, so dass sich diese Effekte während der folgenden Berechnung aufheben. Die mathematische Kalkulation der Expression erfolgt durch die sogenannte  $\Delta$ Ct Methode. Danach ergibt sich der relative Expressionsunterschied (Ratio) zweier Proben - hier stimuliert versus unstimuliert - aus folgender arithmetischen Formel (Mülhardt 2003, Klebsattel 2004):

$$\text{Ratio}_{\text{(Runterregulation des Gens)}} = 2^{-(\Delta\text{Ct.1} - \Delta\text{Ct.2})}$$

$$\text{Ratio}_{\text{(Hochregulation des Gens)}} = 2^{-(\Delta\text{Ct.2} - \Delta\text{Ct.1})}$$

$\Delta$ Ct.1: Differenz der Ct-Werte von Zielgen und internem Standard aus unstimulierter cDNS-Probe

$\Delta$ Ct.2: Differenz der Ct-Werte von Zielgen und internem Standard aus VEGF-stimulierter cDNS-Probe

Durchführung:

Die Auswahl der Primersequenzen erfolgt wie in Kapitel 2.5.4.2 beschrieben. Um die optimalen PCR-Bedingungen für das zu untersuchende Gen zu definieren, werden die spezifischen Primer zuvor in unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Eingesetzt wird schliesslich die Konzentration, aus der der geringste Ct-Wert resultiert. Zur Definition des Ct-Wertes jeder einzelnen cDNS-Probe unter Verwendung des HKG  $\beta$ -Aktin erfolgt durch Austestung von drei verschiedenen Verdünnungsstufen (mit 0,5  $\mu$ l, 1,0  $\mu$ l und 2,0  $\mu$ l cDNS). Das Pipettierschema für die Einstellung der cDNS-Konzentration in 96-well-Platten ergibt sich wie folgt:

12,875 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
2,5 $\mu$ l	10x PCR-Puffer
1,75 $\mu$ l	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1,0 $\mu$ l	5 mM dNTP`s
1,0 $\mu$ l	$\beta$ -actin
0,75 $\mu$ l	CYBR Green
0,125 $\mu$ l	Polymerase

Bei mehr als einem Ansatz wird auch hier ein sogenannter Master-Mix erstellt. Zu 20  $\mu$ l Mastermix werden die jeweiligen DNS-Proben in der zuvor ermittelten Konzentration und in einem Endvolumen von 5  $\mu$ l zugegeben. Die zuvor bestimmte cDNS-Konzentration wird im Verlauf für ein Paar von je zwei Primerkombinationen (zum Beispiel PECAM und CD144) genutzt, dabei wird auf ähnliche Ct-Werte geachtet. Zu jedem Paar wird zusätzlich für jeden Zeitpunkt ein Ansatz mit  $\beta$ -Aktin pipettiert und so der Wert für das Housekeeping-Gen ermittelt. Um den Messfehler gering zu halten, erfolgt eine Doppelbestimmung, d.h. zwei Messungen für jeden Zeitpunkt und Primer, verwendet wird jeweils der Mittelwert. Die Proben werden in folgendem Schema für die kompetitive RT-PCR eingesetzt:

5,0 $\mu$ l	Probe
12,875 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
2,5 $\mu$ l	10x PCR-Puffer
1,75 $\mu$ l	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1,0 $\mu$ l	5 mM dNTP`s
0,5 $\mu$ l	Forward Primer

---

0,5 µl	Reverse Primer
0,75 µl	CYBR Green
0,125 µl	Polymerase

Bei der Reaktion wird eine Hot-start-Polymerase verwendet, die zu Beginn durch eine 10minütige Erhitzung auf 95°C aktiviert wird. Die Analyse der Schmelzkurven hat sich als valide Methode zur Kontrolle der PCR-Produkte bewährt, so dass auf regelhafte Gelkontrollen verzichtet werden kann. Die 96-well Mikrotiterplatten werden in dem ABI Prism™ 7000 Detection System analysiert. Im zugehörigen Thermocycler durchlaufen die Proben folgenden Zyklus:

<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit (sek.)</u>	
Real time - Reaktion	50°C	120	
Denaturierung / Aktivierung	95°C	600	
Denaturierung	95°C	15	} 40x
Annealing / Elongation	60°C	60	

## 2.6. Statistik

Die Daten der Durchflusszytomterie werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei bis fünf Experimenten (je nach Zellqualität) zusammengefasst und in einer Varianzanalyse für wiederholte Messung derselben Variable analysiert. Wir nutzen den Student's t-Test, um zu bestimmen, ob sich die Mittelwerte der beiden Gruppen (stimuliert und ohne Zugabe von VEGF) signifikant unterscheiden. P-Werte  $<0,05$  werden als signifikant angesehen.

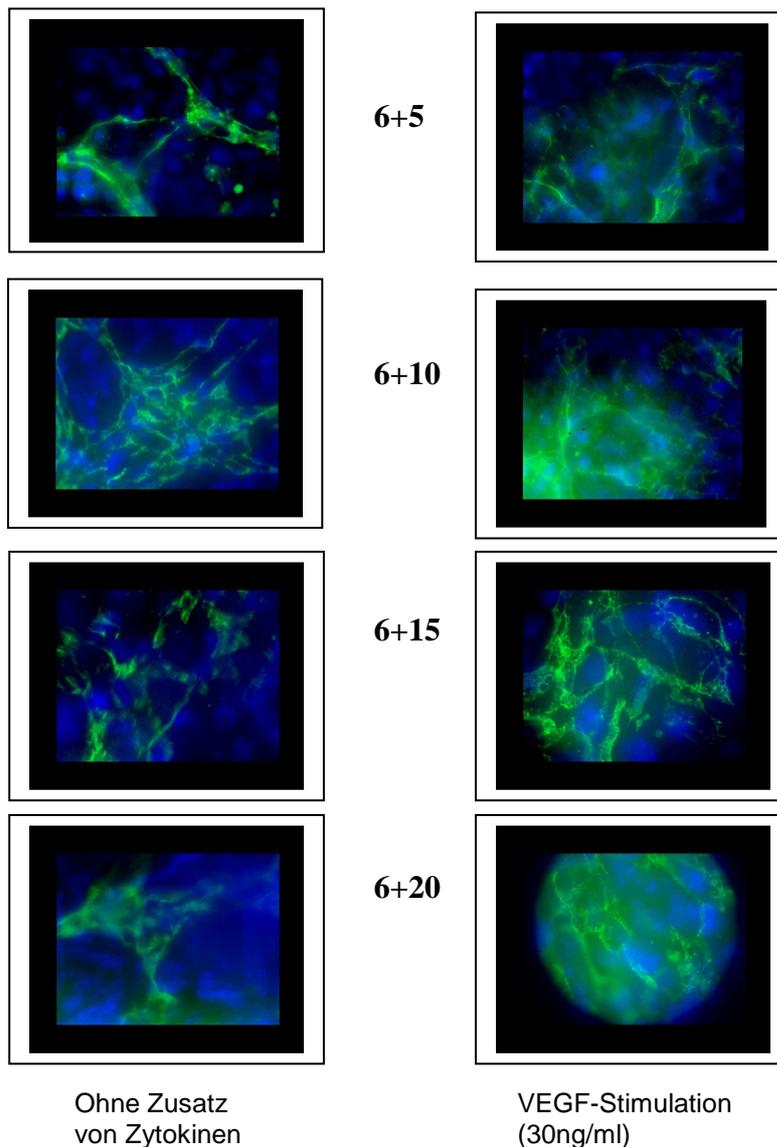
Die Daten der Taqman-PCR werden im Hinblick auf durch VEGF-Stimulation bedingte Unterschiede in der Genexpression mit Hilfe der sogenannten 'ΔCt-calculation' analysiert (Mülhardt 2003, Klebsattel 2004). Zusammenfassend repräsentiert die resultierende "Ratio" die relative Differenz der Expression des Gen von Interesse im Vergleich zum Kontrollgen. Es wird der Mittelwert aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis drei Messungen gebildet. Eine mittlere Ratio von mehr als 1,5 Punkten ist erforderlich, um eine Hoch- bzw. Runterregulation nachzuweisen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunofluoreszenz- Färbungen zum Nachweis von CD31 im EB

Um CD31-positive Strukturen per Fluoreszenz-Färbung nachzuweisen, werden die ES-Zellen adhärent auf sogenannten Chamberslides kultiviert. Für eine Versuchshälfte wird dabei dem Nährmedium VEGF (30 ng/ml) zugegeben. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt lässt das Fluoreszenz-Muster innerhalb der EBs einen deutlichen strukturellen Unterschied zwischen mit zusätzlichem VEGF stimulierten und unstimulierten Zellen erkennen. Beide zeigen früh, bereits an Tag 6+5, eindeutig CD31-positive gefässähnliche tubuläre Strukturen. Im Laufe der Entwicklung bis Tag 6+20 lässt sich eine kontinuierliche Ausbreitung dieser inselähnlichen Netzwerke beobachten. So kommt es zum einen im Rahmen der fortlaufenden Differenzierung zu einer kontinuierlichen Proliferation dieser vaskulären Strukturen, zum anderen lässt besonders die zusätzliche Stimulation mit VEGF deren Morphologie deutlich detaillierter und feingliedriger erscheinen. Die VEGF-simulierten Zellen zeigen im Vergleich eine klarere Organisation und eine dichtere Verknüpfung der ausgebildeten Netzwerke.

Aus technischen Gründen zeigen die Fotos der Abbildung jeweils nur kleine Ausschnitte der dreidimensionalen Struktur des EBs. Auch wenn es nicht möglich ist, den Einfluss von VEGF mit dieser Methode zu quantifizieren, lässt der gewonnene Eindruck doch Rückschlüsse auf die gesamte Ausdehnung im EB zu.

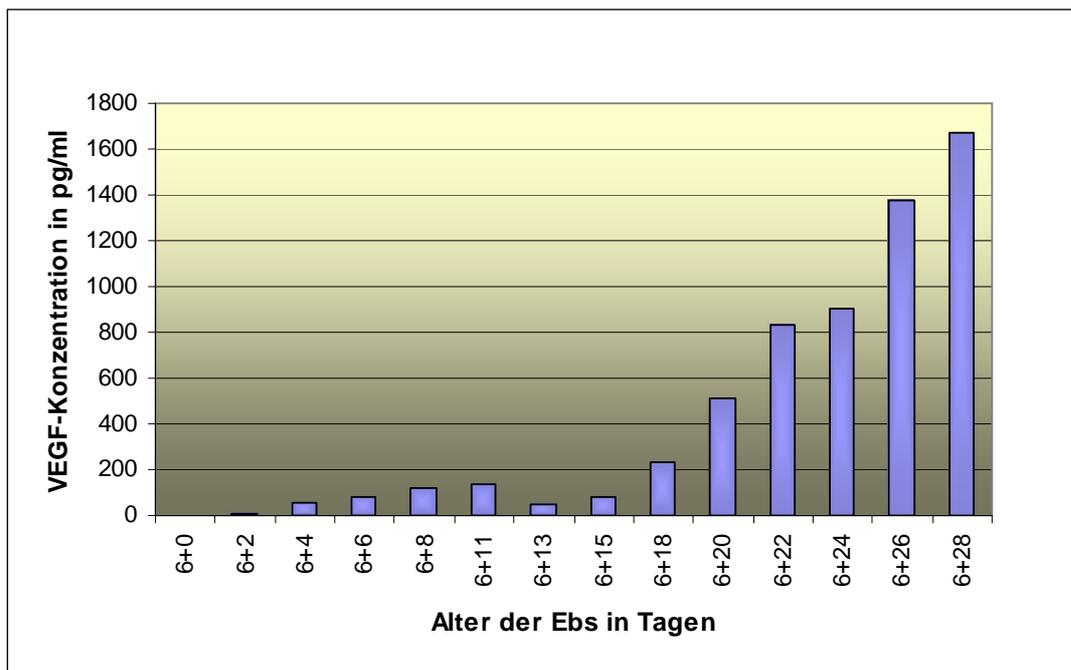
**Abb. 3.1: Nachweis des CD31-Rezeptors mittels Immunofluoreszenz**

Die Reihe mikroskopischer Fotos stellt CD31-positive Strukturen FITC-fluoreszierend dar. Blau erscheinen die mit DAPI gegengefärbten Zellkerne. Dabei zeigt die linke Spalte EBs, die in Wachstumsmedium ohne zusätzliche VEGF-Zugabe differenzieren. Auf der rechten Seite sind die Resultate für die mit VEGF (30ng/ml) stimulierte EBs zu sehen. Die Bilder korrespondierender Zeitpunkte stehen jeweils als Paare nebeneinander. Die Zeitpunkte werden mit 6+x bezeichnet, wobei die Zellen zuvor 6 Tage in Vorkultur unter kontrollierten Differenzierungsbedingungen (ohne LIF, ohne Zytokingabe) gehalten werden. Im Laufe der Entwicklung lässt sich ein positiver Einfluss von VEGF auf die Morphologie der gefässähnlichen Strukturen innerhalb der differenzierenden ES-Zellen vermuten. Die zusätzliche Gabe führt zu grossflächigeren tubulären Mustern und exakterer und differenzierterer Anordnung. Die dargestellten Ausschnitte entsprechen einer vierzigfachen Vergrösserung.

## 3.2 ELISA ( Enzyme Linked Immunosorbent Assay ) für murines VEGF

### 3.2.1 Endogene Produktion von VEGF im System der ES-Zellen

Zur Durchführung des ELISA wird das Kulturmedium der ohne VEGF-Zusatz differenzierenden EBs eingesetzt, das bei jedem Mediumwechsel, d.h. alle 2 Tage, gesammelt wird. Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, produzieren embryonale Stammzellen im Verlauf ihrer frühen Entwicklung endogenes VEGF. Es kann von Tag 6+2 an kontinuierlich nachgewiesen werden. Auffallend ist die fehlende VEGF Produktion zu Beginn an Tag 6+0, so dass die Expression endothelialer Oberflächenmarker der Nachweisbarkeit von VEGF vorausgeht.



**Abb. 3.2: Endogene VEGF Sekretion während der ES-Zell-Differenzierung**

Die Zellen werden für 6 Tage nach Entfernung von LIF vorkultiviert und differenzieren danach für weitere 28 Tage (6+28). Im Kulturmedium vorhandenes VEGF wird jeden zweiten Tag nach Mediumwechsel im ELISA gemessen. Hierbei muss es sich um endogen produziertes VEGF handeln, da den verwendeten ES-Zellen keine weiteren Zytokine zugesetzt werden. Die Säulen repräsentieren die Konzentration von VEGF in den Mediumproben in pg/ml (Ordinate) für jeden Zeitpunkt (Abszisse). Gezeigt werden Mittelwerte aus zwei durchgeführten Untersuchungsreihen.

Beginnend mit Tag 6+2 beschreibt die VEGF Kurve einen zweigipfeligen Verlauf. Um Tag 6+10 zeigt sich ein erstes Maximum noch auf geringem Niveau um 135 pg/ml. Nach kurzem Abfall steigen die VEGF Konzentrationen von Tag 6+18 dann erneut, diesmal exponentiell an. Innerhalb von 10 Tagen bis zum Tag 6+28, dem Endpunkt unserer Analyse, erreicht die Eigenproduktion von VEGF im Embryoid Body einen Wert von knapp 1700 pg/ml. Die gemessenen Werte können in einer zweiten Untersuchungsreihe bestätigt werden.

### **3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung**

#### **3.3.1 Identifikation der sogenannten „Low density“ Populationen**

Für die Bestimmung der Expression von CD31 entsprechen die hier dargestellten Zahlen den Messwerten für einen PE-konjugierten Anti-CD31-Antikörper. In parallel durchgeführten Untersuchungen mit einem FITC-markierten Antikörper zeigten sich in der FACS-Messung zum Teil erheblich geringere Anteile positiver Zellen. Hier vermuten wir das Vorliegen von so genannten „low density populations“ (siehe 2.3.2.1) mit relativ geringer Oberflächendichte für CD31, die durch die geringere Sensitivität des Messgerätes für die Erkennung des FITC-Antikörpers nicht nachgewiesen werden können. Dabei sind die Antikörper gegen das identische Epitop gerichtet und binden in beiden Fällen in gleicher Menge und Dichte. Der Unterschied ergibt sich lediglich aus der unterschiedlichen Sensitivität der Analyse des FACS-Gerätes für die Erkennung der beiden Farbstoffe. Trotzdem sind diese in der FITC-Markierung nicht erfassten Zellen in der Auswertung ebenso als positiv für CD31 anzusehen und werden entsprechend der für die PE-Konjugation gemessenen Resultate eingeordnet

### **3.3.2 Einfluss von Trypsin und Kollagenase auf den Nachweis von CD31 auf Zellen des EB per Durchflusszytometrie**

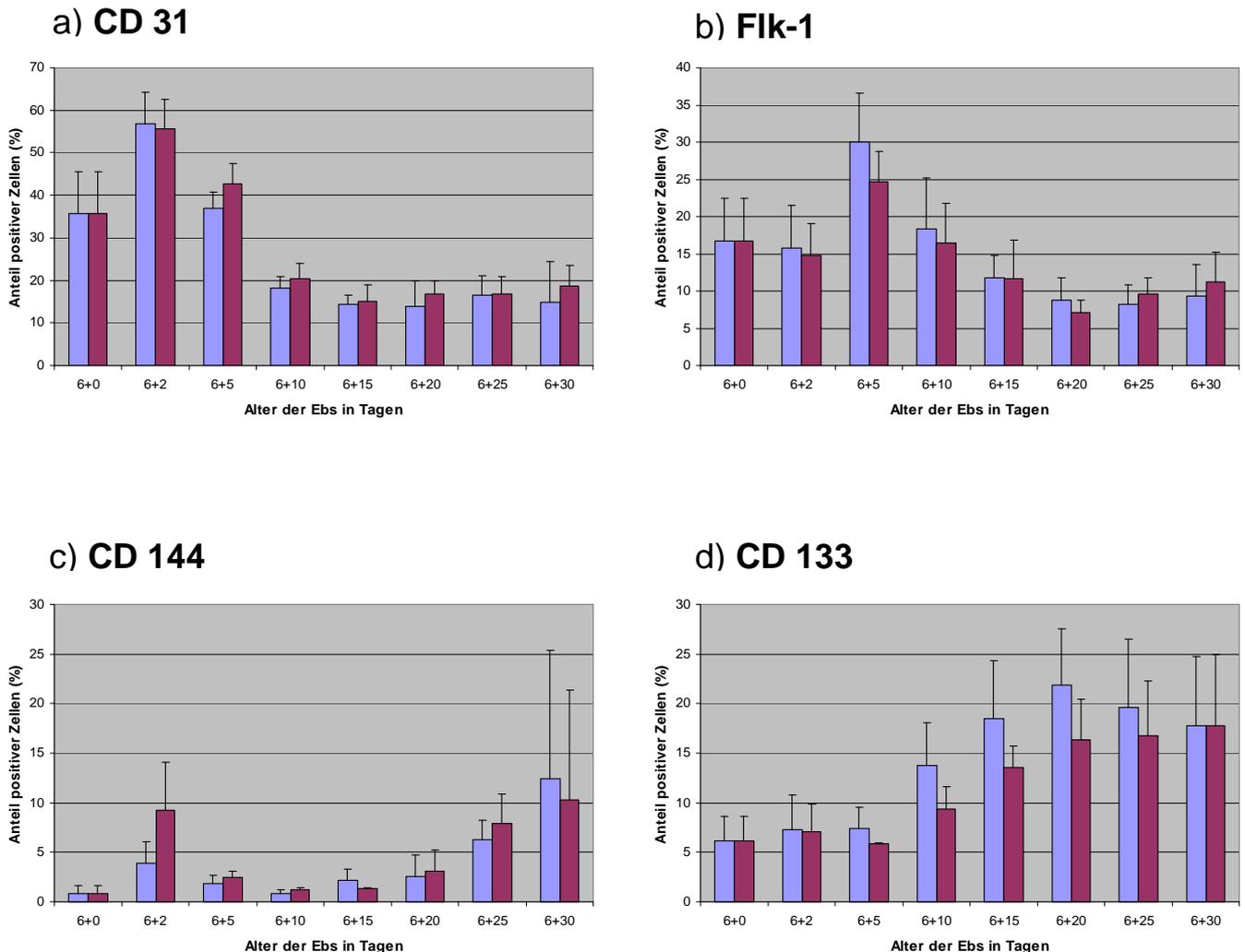
Die bisher in der Arbeitsgruppe etablierte Methode zur Herstellung einer Einzelzellsuspension für die Durchflusszytometrie sah die Lösung der Zellverbindungen mit Hilfe von Trypsin (1:10) und Kollagenase IV im Verhältnis 1:2 vor. Nachdem die ersten Messungen unter diesem Protokoll erstaunlich niedrige Resultate hervorbrachten, konnten wir im direkten Vergleich mit einem Einsatz von Kollagenase IV allein nachweisen, dass Trypsin die Oberflächenstruktur von CD31 auch unter kurzer Einwirkzeit grossteils degeneriert und so eine Messung unmöglich macht (Daten nicht gezeigt). Vor diesem Hintergrund wurde eine entsprechende Anpassung des Protokolls vorgenommen, das identisch für alle Messungen blieb. Die hier vorgestellten Resultate entsprechen damit einer Bestimmung unter schonender Zelllösung mit lediglich Kollagenase (Protokoll siehe Kapitel 2.3.2.2).

### **3.3.3 Frühe zeitliche Entwicklung von endothelialen Oberflächenmarkern in ausdifferenzierenden embryonalen Stammzellen**

In der durchflusszytometrischen Analyse ist bereits am Tag 6+0 (6 Tage Vorkultur, 0 Tage +/- VEGF, siehe auch Kap.2.2.3) ein hoher Anteil von Zellen mit endothelialen Markern nachweisbar. Im Überblick findet man für die Endothelzellmarker CD31, CD144 und Flk1 ein frühes Maximum, das für alle nahezu übereinstimmend zwischen Tag 6+2 und Tag 6+5 liegt (Abbildung 3.3).

Besonders für CD31 (PECAM 1) zeigt sich schon am Tag 6+0 ein Anteil von 35 % positiver Zellen an der Gesamtzellzahl im EB (Abb.3.3a). Die Expression von CD31 als dem Standardmarker für endotheliale Differenzierung (siehe Kapitel 1.3) steigert sich zu Höchstwerten an Tag 6+2 und an Tag 6+5. Zu späteren Zeitpunkten sinkt die Nachweisbarkeit von CD31 und stabilisiert sich auf einem konstanten Niveau um 15 %. Die stetige Zunahme der Gesamtzellzahl im Laufe der Entwicklung des EB erfolgt damit ohne eine korrelierende Zunahme des Anteils CD31-exprimierender Zellen.

Für Flk-1, den Oberflächenrezeptor für VEGF, zeigt sich ebenso wie zuvor für CD31 beschrieben ein frühes Hoch an Tag 6+5 (Abb.3.3b). Im Verlauf stabilisiert sich die Expression von Flk-1 auf niedrigerem, stabilem Level bis zum Ende des Beobachtungszeitraums.



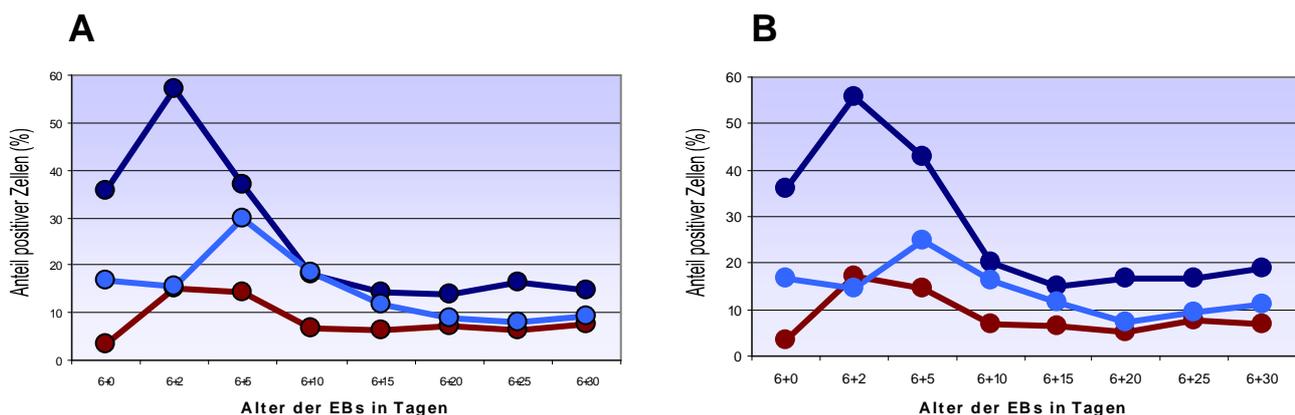
**Abb. 3.3 a-d: Dynamik der Oberflächenmarker in differenzierenden ES-Zellen und deren Beeinflussung durch zusätzliche VEGF-Stimulation (30ng/ml)**

Die Graphen zeigen den prozentualen Anteil positiver Zellen für CD31(a), Flk-1(b), CD144(c) bzw. CD133(d). Analysiert wurden in jeder Messung 50000 Zellen nach 6 Tagen Vorkultur in Medium in Abwesenheit von LIF (Tag 6) und anschliessend weiterer 2 (Tag 6+2), 5 (Tag 6+5), 10 (Tag 6+10), 15 (Tag 6+15), 20 (Tag 6+20), 25 (Tag 6+25) oder 30 (Tag 6+30) Tage in Kultur. Innerhalb der dargestellten Säulenpaare steht ■ für die Resultate für differenzierte ES-Zellen ohne zusätzliche VEGF-Stimulation. Mit ■ dargestellt sind die Anteile positiver Zellen für den jeweiligen Marker in

Medium unter VEGF-Supplementation (30 ng/ml). Die gezeigten Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) aus 3 bis 5 Experimenten.

Endotheliale Vorläuferzellen sind vom ersten Messzeitpunkt 6+0 an vorhanden, am grössten ist hier der Anteil der CD31-positiven Zellen. Für CD31, Flk-1 und CD144 zeigt sich jeweils ein frühes Maximum an Tag 6+2 bzw. 6+5. Im Laufe der Entwicklung erreichen CD31 und Flk1 ein kontinuierliches Niveau, CD 144 scheint erneut anzusteigen. Die CD133-Expression zeigt erst von Tag 6+10 an ein konstant hohes Level.

Desweiteren werden Messungen zur Doppelexpression von flk1 und CD31 durchgeführt (Abbildung 3.4). Berücksichtigt man zusätzlich die mit dem eingesetzten CD31-FITC-Antikörper nicht darstellbare Low-density population (siehe Kapitel 3.3.1) innerhalb der doppelt positiven Zellen, ist für mehrere Zeitpunkte von einer Koexpression von CD31 auf nahezu allen Flk1-positiven Zellen auszugehen, dies gilt für Tag 6+2 als auch ab Tag 6+15. An Tag 6+0 sowie an Tag 6+5 bis 6+15 überschreitet die Flk-1-Expression die Anzahl doppelt positiver Zellen. Somit ergibt sich beispielsweise für Tag 6+5 ein definitiver Anteil Flk1+CD31+ endothelialer Progenitorzellen von 30 %, die CD31-Expression liegt unstimuliert knapp unter 40 % und enthält noch undifferenziertere frühere Vorläufer oder teils Zellen mit hämatopoetischer oder thrombopoetischer Destination.



**Abb.3.4: Anteil der doppelt positiven CD31+/Flk-1+ Zellen**

Gezeigt werden die prozentualen Anteile positiver Zellen in der FACS-Analyse von 50000 Zellen, deren Auswertung zu den Erntezeitpunkten 6+0 bis 6+30 erfolgte. Dabei verdeutlicht die Abbildung den zeitliche Verlauf der Doppelexpression von CD31 und Flk-1 ■ und damit die Entwicklung endothelialer Zellen, der an Tag 6+2 ein Maximum erfährt. Analog zu Abbildung 3.3. zeigen

Liniendiagramme die Resultate der Einzelexpression von CD31 ■ und Flk-1 ■. Abb. 3.4 A zeigt die Entwicklung für unstimuliert differenzierende Zellen, in Abb. 3.4 B sind die unter VEGF-Stimulation stehenden Zellen dargestellt, wobei sich für beide Gruppen in der Betrachtung der Doppelexpression nahezu deckungsgleiche Verläufe ergeben.

Am Zeitpunkt der maximalen Doppelexpression sind alle flk1+ positiven Zellen (hellblaue Linie) auch positiv für CD31 und entsprechen damit definitiven Endothelvorläuferzellen. Vorher an Tag 6+0 sowie im Zeitraum zwischen 6+5 und 6+15 zeigt ein Teil der Flk1-positiven Zellen keine Simultanexpression von CD31, diese Zellen haben damit als mesenchymale Vorläuferzellen noch die Möglichkeit in andere Richtungen zu differenzieren. Zu späteren Zeitpunkten exprimieren wiederum nahezu alle Flk-1+ Zellen auch CD31. Die Expression von CD31 (dunkelblaue Linie) liegt vor allem zu Beginn der Untersuchung deutlich über den Werten für Flk-1+ und doppeltpositive Zellen.

Die Fraktionen der CD144-positiven Zellen im EB stellt Abb. 3.3c zusammenfassend dar. Dieser Indikator für endotheliale Ausreifung der Stammzellen (siehe Kapitel 1.3) ist initial nur auf sehr geringem Niveau nachweisbar und ergibt ein frühes Maximum an Tag 6+2. Nach vorübergehend niedrigeren Werten entwickelt sich ein zweiter Anstieg nach Tag 6+25, der sich an Tag 6+30, dem letzten untersuchten Zeitpunkt fortsetzt. Zu einigen Messzeitpunkten zeigen sich hohe Standardabweichungen, besonders für CD144 an Tag 6+30. Dieser hohe Standardfehler begründet sich am ehesten im biologischen System der Embryoid Bodies, das den in vivo-Verhältnissen sehr nahe kommt und daher immer anfällig für Abweichungen ist. Zudem steht für den CD144-Nachweis in murinen Zellen nur ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper zur Verfügung, der möglicherweise eine zusätzliche Abweichung bedingt.

CD133 wird von einigen Autoren als früher Marker für endotheliale Progenitorzellen (EPC) angesehen, andere sehen CD133 als Marker des Hämangioblasten, der gemeinsamen Vorläuferzelle von Angiogenese und Hämatopoese (vergleiche auch Kapitel 1.3). Wie Abb. 3.3d zeigt, kommen CD133-positive Zellen zu allen Zeitpunkten vor. Unsere Messung zeigt im Verlauf zwei Phasen der Expression. Bis Tag 6+5 liegt die Expression von CD133 relativ niedrig, nach einem Anstieg ergibt sich von Tag 6+10 bis zum Ende des Untersuchungszeitraums ein konstant hohes Niveau, das ein kontinuierliches Angebot an CD133-positiven Zellen anzeigt.

### 3.3.4 Einfluss der Konzentration des Wachstumsfaktors VEGF auf die Expression der Oberflächenmoleküle

Positive Zellen für alle Oberflächenmarker können von Tag 6+0 an nachgewiesen werden. Bereits an Tag 6+0 findet sich eine deutliche Expression von endothelialen Oberflächenmarkern. Diese ist unabhängig vom Wachstumsfaktor VEGF, da zu diesem frühen Zeitpunkt kein endogenes VEGF nachweisbar ist und noch kein zusätzliches VEGF substituiert wurde. Im Verlauf der Differenzierung zeigen sich unter Zugabe von VEGF in hoher Konzentration (30ng/ml), die mehr als der 20fachen maximalen endogenen Konzentration entspricht, ubiquitär identische oder nur minimal veränderte Zahlen und keine deutliche Zunahme der endothelialen Progenitorzellen.

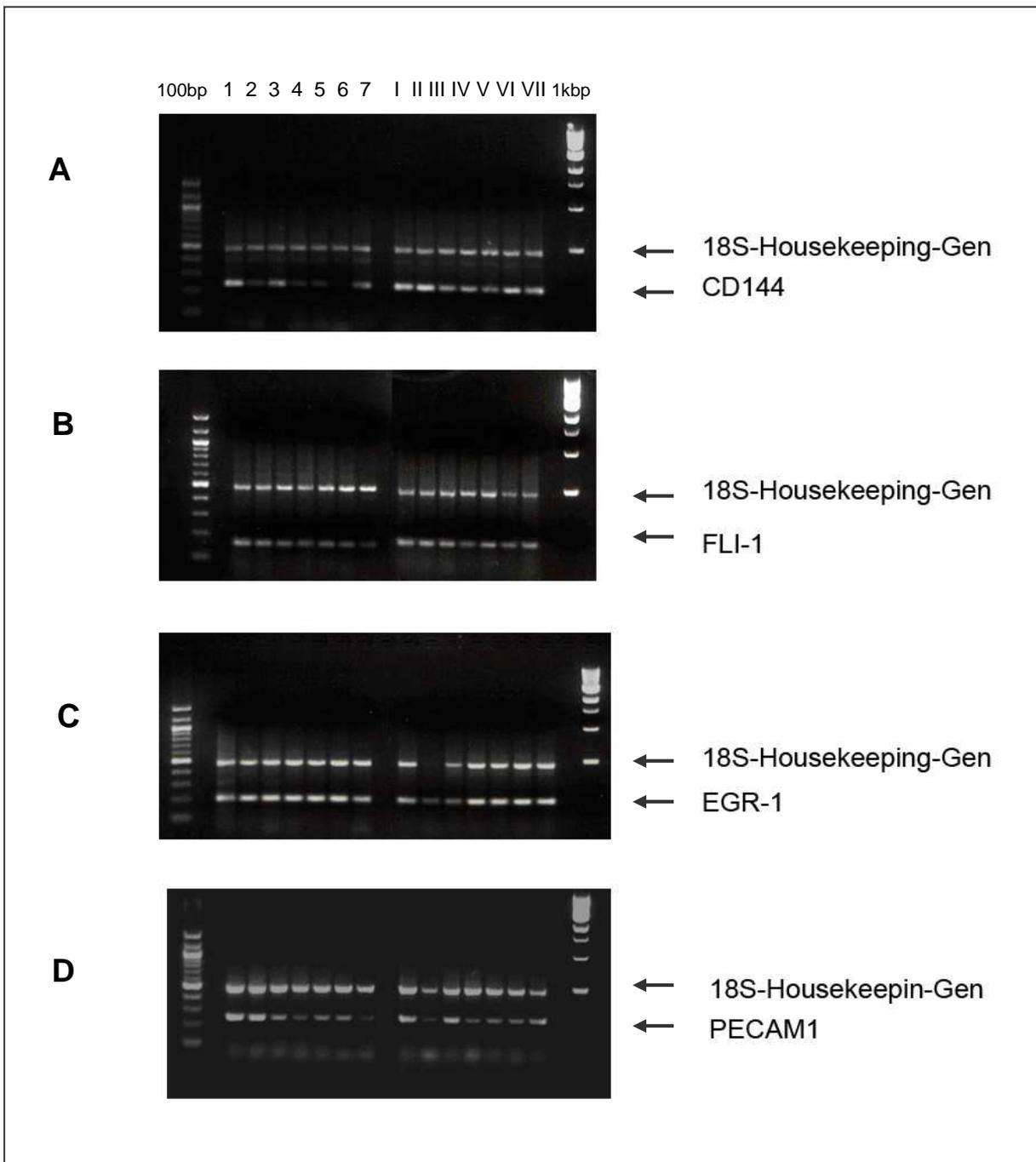
Wie in Abb. 3.3a dargestellt, zeigen die Daten für CD31 zum Zeitpunkt des Maximums an Tag 6+2 für beide Versuchsgruppen keine signifikante Differenz. Es ist kein Einfluss der seit 2 Tagen bestehenden Substitution mit VEGF nachweisbar. Die weiteren Messpunkte scheinen durchgehend leicht erhöhte Prozentzahlen unter VEGF Stimulation aufzuweisen, jedoch ergeben auch diese keine statistische Relevanz ( $p > 0,05$ ). Die Anzahl der den VEGF-Rezeptor Flk1 exprimierenden Zellen scheint von Tag 6+2 bis 6+20 unter hoher Konzentration seines Substrates geringfügig abzunehmen (Abb. 3.3b). Am deutlichsten ist diese Tendenz zum Zeitpunkt des Maximums der Flk1-Positivität an Tag 6+5, das Ergebnis liegt jedoch auch hier unter dem Signifikanzlevel ( $p = 0,20$ ). Spätere Messungen nach Tag 6+25 zeigen wiederum eher eine leichte, nicht signifikante Mehrexpression des Rezeptors. Wie Abb. 3.3c zeigt, erfährt CD144 als einziger Marker den graphischen Eindruck einer relativ deutlichen Steigerung der Expression am Tag seines Maximums 6+2. Diese liegt jedoch mit  $p = 0,09$  ebenfalls knapp unter dem Signifikanzniveau. Dagegen ergibt sich singulär für Tag 6+10 eine statistisch relevante Mehrexpression unter VEGF ( $p = 0,049$ ), auch wenn diese in der graphischen Darstellung aufgrund des insgesamt niedrigen Niveaus massstabsbedingt kaum darstellbar ist. Gegen Ende des Untersuchungszeitraums macht die oben erklärte hohe Standardabweichung eine genaue Aussage schwierig. CD133 lässt, insbesondere mit Beginn der zweiten Plateauphase von Tag 6+10 an, eher eine Reduktion seiner Expression unter zusätzlichem VEGF erkennen (Abb. 3.3d), auch wenn dieser Unterschied statistisch

keine Signifikanz erreicht. Schlussfolgernd führt eine VEGF-Substitution von 30ng/ml im Vergleich zu basalen Leveln von 1,6 ng/ml nicht zu der vermuteten deutlichen Zunahme der Fraktion an Endothelzellen und deren Progenitoren im System der differenzierten ES-Zellen.

### **3.4 Molekularbiologische Untersuchung endothelspezifischer Genprodukte und Transkriptionsfaktoren in der PCR**

#### **3.4.1 Expressionsnachweis mit Hilfe der semiquantitativen PCR**

Für einen ersten Nachweis der Expression der zu untersuchenden Genprodukte wird die semiquantitative PCR eingesetzt. Die Durchführung erfolgt nach dem unter 2.4.2.2. beschriebenen Ablaufprotokoll. Die analysierten Gene entsprechen denen für die spätere Realtime-PCR (Taqman) und sind in Tabelle 4a und 4b aufgelistet. Eine Beurteilung der Expression kann mit dieser Methode nur durch den subjektiven visuellen Vergleich der resultierenden Banden im Agarosegel erfolgen. Als Referenz dient hier das Housekeeping-Gen (18S), dessen Bandenstärke konstant ist. Entscheidend für die im folgenden beschriebenen weiteren Analysen ist, dass für jedes Gen eine erfolgreiche Expression nachgewiesen werden kann. Die nachfolgende Abbildung 3.5 zeigt Beispiele für die semiquantitative PCR.



**Abb. 3.5: Semiquantitative PCR beispielhaft für einzelne Primerkombinationen**

Fotographische Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte auf 2 % Agarose-Gel nach der semiquantitativen PCR. Gezeigt werden beispielhaft 4 der untersuchten Genloci, jeweils gemeinsam mit dem Housekeeping Gen 18S (488bp) als Referenz und den Standardmarkern 100 bp und 1kbp. Abbildung A zeigt die Banden für CD144, die linke Bildhälfte 1-7 steht für den Versuchsteil ohne VEGF-Substitution entsprechend der untersuchten Zeitpunkte (von links Tag 6+5 bis rechts Tag 6+30), im rechten Teil des Gels ist korrespondierend der Versuchsteil mit VEGF-Gabe dargestellt (I-VII). In Abbildung B werden parallel die Ergebnisse für den Genlocus FLI-1 dargestellt, in Abbildung C für EGR-1 und in Abbildung D für PECAM1.

### 3.4.2 Quantitativer Vergleich der Genexpression mit Hilfe der Taqman-PCR

#### 3.4.2.1 Darstellung unter Zuhilfenahme der Ratio aus der $\Delta\text{Ct}$ -calculation'

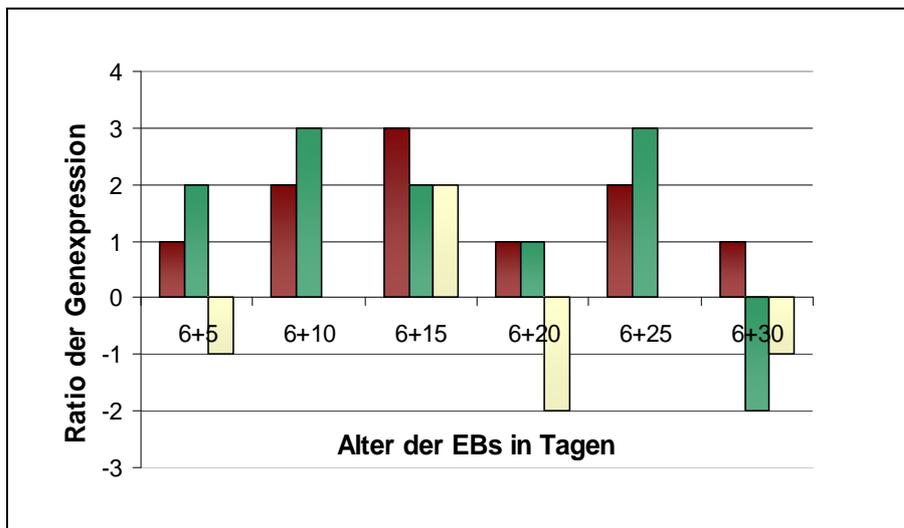
Die Durchführung der Realtime-PCR erfolgt wie in Kapitel 2.5.5.5 beschrieben, die Berechnung der resultierenden Ratio nach der dort beschriebenen Formel. Berücksichtigt werden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten, wobei jeweils drei Messungen pro Gen durchgeführt werden. Für die graphische Darstellung wird eine frei gewählte Einordnung der Mittelwerte der bestimmten Ratio wie folgt gewählt:

Wert der Ratio des Gens	Zugeordneter Wert für die Hoch- bzw. Runterregulation
<b>Hochregulation</b>	
größer 7,01	4
5,01-7,00	3
3,01-5,00	2
1,51-3,00	1
<b>Runterregulation</b>	
größer 5,01	-3
3,01-5,00	-2
1,51-3,00	-1

Mit der Methode der Taqman-PCR werden nicht wie zuvor absolute Zahlen oder Prozentsätze verglichen, sondern lediglich zwei verschiedene Aktivierungsstadien auf Genebene für verschiedene Primer in Beziehung gesetzt. In diesem Fall erfolgt ein Vergleich eingesetzter RNS von stimulierten ES-Zellen mit RNS von ES-Zellen ohne substituiertes VEGF. So lassen sich Rückschlüsse auf den Effekt der Substitution auf Genebene ziehen. Es ist eine Aussage über Hoch- beziehungsweise Runterregulation und deren relative Aktivierungsstärke möglich.

### 3.4.2.2 Hochregulation der untersuchten Oberflächenmarker auf Genebene

Die Resultate der Taqman – PCR sind in Abb.3.6-3.10. und Tabelle 3 zusammengefasst. Dabei ergibt sich für die zuvor untersuchten Marker CD31, CD144 und Flk1 auf Genebene eine fast durchgehende Hochregulation durch VEGF. Entsprechend der Darstellung in Abb.3.6 zeigt sich für CD31 der kontinuierlichste Effekt unter Substitution des Zytokins. Dessen Hochregulation steigert sich zunächst bis zum Maximum an Tag 6+15, erscheint danach etwas geringer bis zum zweiten, etwas niedrigeren Peak an Tag 6+20. Zum Ende des Untersuchungszeitraums ist der Effekt nicht mehr ganz so stark, aber noch deutlich nachweisbar.



**Abb. 3.6: Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Genen endothelialer Oberflächenmarker in differenzierenden ES-Zellen**

Dargestellt sind die Resultate der real-time PCR für die Gene endothelialer Oberflächenmarker, wie zuvor im FACScan untersucht. Es zeigen sich Phasen deutlicher Hochregulation von PECAM und CD144, Flk-1 reagiert weniger ausgeprägt und wechselt zwischen Anstieg und Abnahme der Expression. (■ CD31; ■ CD144; ■ Flk-1)

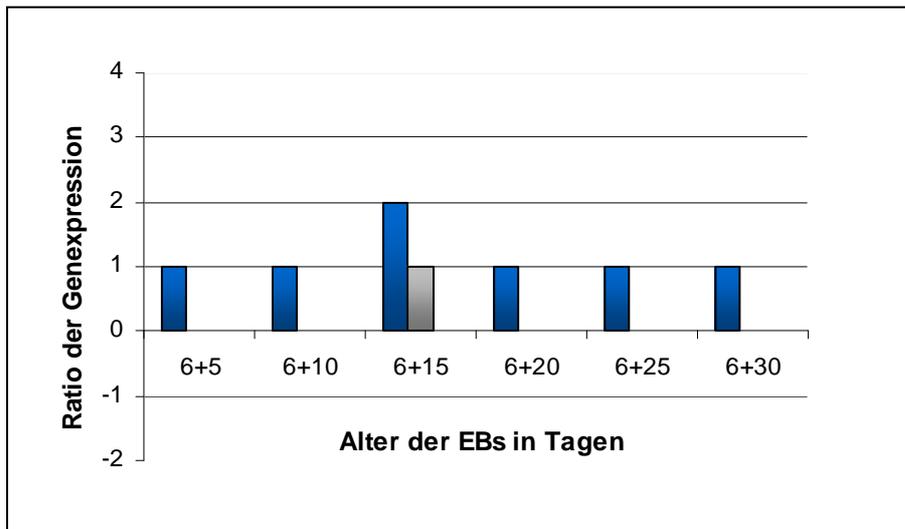
Die Balken repräsentieren die freigewählte Graduation entsprechend der Ratio-Werte im Vergleich von VEGF-stimulierten Zellen und solchen ohne zusätzliche Zytokingabe. Gezeigt werden Resultate für die verschiedenen Erntezeitpunkte während der Differenzierung (6+5 bis 6+30). Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten, jedes mit einer Anzahl von drei Messungen pro Gen.

CD 144 folgt zunächst demselben zweigipfeligen Verlauf, das erste Maximum erfolgt etwas früher an Tag 6+10, das zweite etwas ausgeprägter als für CD31 an Tag 6+25. Anschliessend zeigt sich jedoch hier auf Genebene ein abrupt einsetzender gegensätzlicher Effekt mit einer deutlichen Runterregulation von CD144 unter VEGF-Einfluss zum Ende des Beobachtungszeitraums.

Flk-1 wird als VEGF-Rezeptor eher vermindert exprimiert. Diese Beobachtung entspricht dem bereits auf Oberflächenmolekül-Ebene auszumachenden Effekt, wonach zusätzliches VEGF eher zu einer Minderexpression seines Rezeptors führt. Auf Genebene zeigt sich diese Entwicklung besonders initial an Tag 6+5 sowie stärker ausgeprägt an Tag 6+20 und verläuft damit nicht vollständig parallel zur Entwicklung der Rezeptoroberfläche. An Tag 6+15 findet vielmehr sogar eine intermittierende Hochregulation statt.

### **3.4.2.3 Positiver VEGF-Einfluss auf weitere endothelspezifische Genprodukte**

Unter den Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf Vaskulo- und Angiogenese spielen die Mitglieder der Ets-Familie eine führende Rolle (vergleiche Kapitel 1.5). Wie Abb. 3.7 zeigt, entwickelt sich die Expression des Genortes ERG (Endothelial related gene) parallel zu der der beschriebenen Oberflächenmoleküle. VEGF bewirkt hier eine relativ gleichmässige Hochregulation mit einem leichten Schwerpunkt an Tag 6+15. FLI1 hingegen zeigt sich nahezu unverändert, einzig ist eine geringe Hochregulation an Tag 6+15, zeitgleich zum Maximum von ERG, zu sehen. Ein weiteres Mitglied der Ets-Transkriptionsfaktor-Familie, EGR-1, verbleibt unter VEGF-Stimulation unbeeinflusst.



**Abb. 3.7: Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression endothelspezifischer Genorte in differenzierenden ES-Zellen**

Dargestellt sind, analog zu 3.6, die Daten der Taqman-PCR für die Genexpression endothelspezifischer Transkriptionsfaktoren (■ ERG; ■ FLI1; ■ EGR-1). ERG zeigt dabei eine anhaltende Hochregulation unter VEGF-Stimulation. FLI reagiert lediglich an Tag 6+15 positiv, während die Expression von EGR-1 gänzlich unverändert verbleibt.

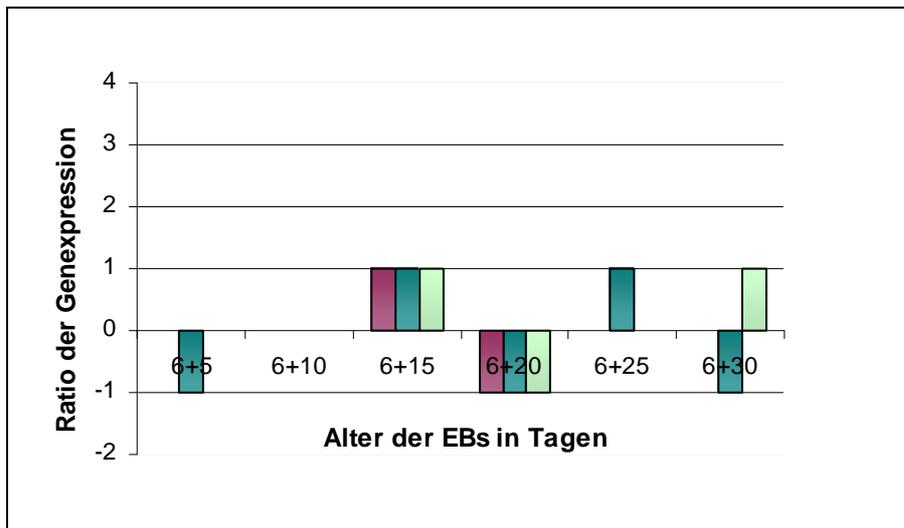
Die Balken repräsentieren die freigewählte Graduation entsprechend der Ratio-Werte im Vergleich von VEGF-stimulierten Zellen und solchen ohne zusätzliche Zytokingabe. Gezeigt werden Resultate für die verschiedenen Erntezeitpunkte während der Differenzierung (6+5 bis 6+30). Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten, jedes mit einer Anzahl von drei Messungen pro Gen.

#### 3.4.2.4 Kein einheitlicher Effekt einer Stimulation mit VEGF auf andere Gene der Stammzellregulation sowie mesenchymalen Differenzierung

Die untersuchten Gene der Hox-Gruppe zeigen ein ungleichmässiges Verhalten unter VEGF-Gabe, wie in Abb. 3.8 verdeutlicht. Innerhalb des heterogenen Expressionsmusters wird HoxD3 initial unter VEGF-Gabe leicht supprimiert und schwankt nach Tag 6+15 zwischen geringer Hoch- und Runterregulation. Der verwandte Transkriptionsfaktor HoxB4 reagiert zunächst nicht auf VEGF-Stimulation und zeigt lediglich an Tag 6+15 und 6+30 eine leichte Hochregulation, während seine Expression im dazwischenliegenden Intervall an Tag 6+20 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht runterreguliert wird.

Wechselwirkungen von VEGF-Stimulation mit der Genexpression des Hormon Epo sind kaum zu erkennen. Auf Genebene findet abgesehen von einer leichten

Runterregulation an Tag 6+20 keine Veränderungen unter gesteigerter VEGF Konzentration statt (Abb. 3.8).



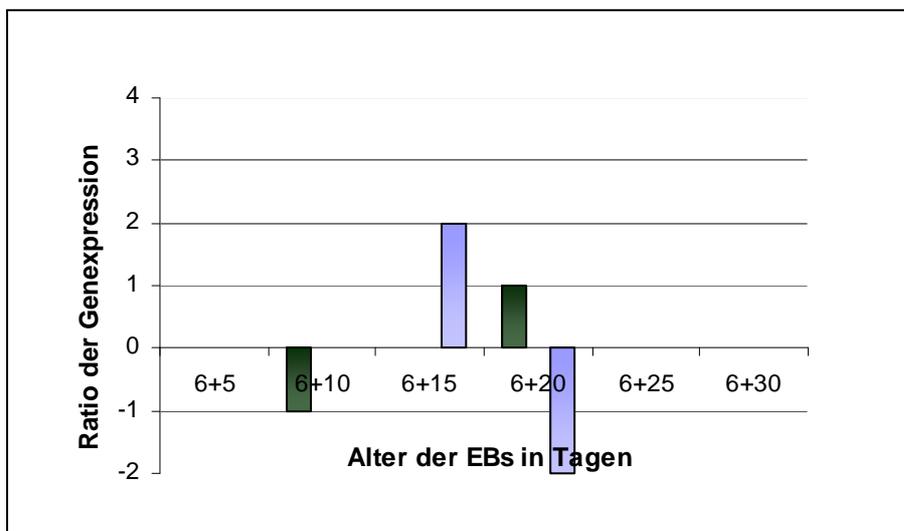
**Abb. 3.8: Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Genen der Homeobox-Gruppe und Epo in differenzierenden ES-Zellen**

Dargestellt sind die Daten der Taqman-PCR für die Genexpression der Homeobox-Gene (■ HoxD3; ■ HoxB4) sowie von Erythropoetin (■ Epo). Die Gene der Hox-Familie zeigen ein heterogenes Expressionsmuster mit Schwankungen zwischen leichter Hoch- und Runterregulation. Epo zeigt sich abgesehen von Tag 6+20 nicht durch VEGF-Stimulation beeinflussbar.

Die Balken repräsentieren die freigewählte Graduation entsprechend der Ratio-Werte im Vergleich von VEGF-stimulierten ES-Zellen und solchen ohne zusätzliche Zytokingabe. Gezeigt werden Resultate für die verschiedenen Erntezeitpunkte während der Differenzierung (6+5 bis 6+30). Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten, jedes mit einer Anzahl von drei Messungen pro Gen.

Wie in Abb. 3.9 und 3.10 dargestellt, zeigen sich SCL/Tal-1 und sein Co-Faktor LMO2 in ihre Funktion während der embryonalen Entwicklung weitgehend unbeeinflusst von der Stimulation mit VEGF. Ebenso lässt sich erkennen, dass auch die Expression anderer Gene, die mit der myeloiden Ausreifung (PU.1, GATA-2, und LMO4) oder der Regulation des Zellzyklus (Cyclin D1) assoziiert sind, durch VEGF-Gabe nicht nennenswert verändert wird (Abb. 3.9-3.10). Die Untersuchung dieser Faktoren erfolgt in Anlehnung an frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Dissertation Fiedler 2006). Geringere Variationen zeigen sich für die genannten Gene nach Tag 6+15. Im Detail wurden SCL/Tal1, GATA-2 am Tag 6+15

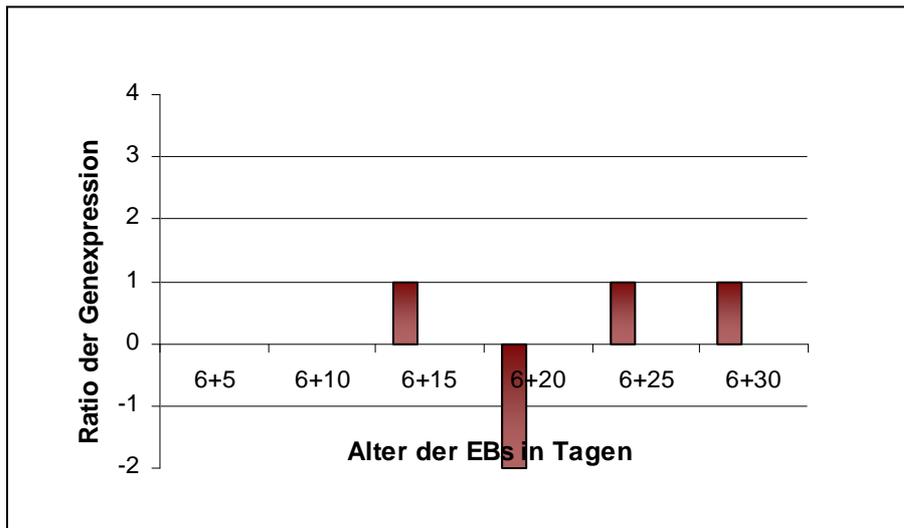
hochreguliert, dies geschieht damit parallel zu FLI1 und ERG, die in Abb.3.7 dargestellt sind. Die Expression von PU.1 bleibt von Tag 6+15 bis 6+20 gesteigert, während die Expression sowohl von SCL/Tal1 als auch GATA-2 an Tag 6+20 wieder abnimmt. GATA-2 wird an Tag 6+25 wieder geringfügig hochreguliert. LMO2, LMO4 und Cyclin D1 zeigen keinerlei Effekt der VEGF-Stimulation.



**Abb. 3.9: Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Genen der Stammzell- und Zellzyklusregulation in differenzierenden ES-Zellen**

Dargestellt sind die Daten der Taqman-PCR für die Expression von Genen der Stammzell- und Zellzyklus- Regulation (■ PU.1; ■ CyclinD1; ■ SCL/Tal1). Diese zeigen sich über weite Strecken unbeeinflusst durch VEGF-Gabe. Die bestehenden Veränderungen an Tag 6+15 und 6+20 lassen keine eindeutige Entwicklung schlussfolgern.

Die Balken repräsentieren die freigewählte Graduation entsprechend der Ratio-Werte im Vergleich von VEGF-stimulierten ES-Zellen und solchen ohne zusätzliche Zytokingabe. Gezeigt werden Resultate für die verschiedenen Erntezeitpunkte während der Differenzierung (6+5 bis 6+30). Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten, jedes mit einer Anzahl von drei Messungen pro Gen.



**Abb. 3.10: Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Expression von Hämatopoese-assoziierten Genen in differenzierenden ES-Zellen**

Dargestellt sind die Daten der Taqman-PCR für die Expression hämatopoese-assoziiierter Gene (■ GATA2; ■ LMO2; ■ LMO4). GATA2 zeigt ein heterogenes und nicht konklusives Verhalten unter VEGF-Substitution. Die Gene der LMO-Gruppe lassen keinerlei Expressionsabweichung unter VEGF erkennen.

Die Balken repräsentieren die freigewählte Graduation entsprechend der Ratio-Werte im Vergleich von VEGF-stimulierten ES-Zellen und solchen ohne zusätzliche Zytokingabe. Gezeigt werden Resultate für die verschiedenen Erntezeitpunkte während der Differenzierung (6+5 bis 6+30). Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten, jedes mit einer Anzahl von drei Messungen pro Gen.

### 3.4.2.5 Zusammenfassung

Ausgehend von den vorgestellten Daten ist es schwierig, die Signifikanz der VEGF-modulierten Genexpression im Bezug auf endotheliale Differenzierung zu interpretieren. Sicher ist, dass sich eine Reihe von genetischen Signalwegen mit Beteiligung endothelialer Marker oder Transkriptionsfaktoren (PECAM, CD144, FLK1, ERG) durch VEGF-Stimulation aktivieren lassen. Diese Beobachtung lässt auf eine wichtige Rolle VEGF-abhängiger Signalkaskaden in der frühen Vaskulogenese schließen. Mit Blick auf die übrigen Daten erscheint die geringfügige, parallele Hochregulation von FLI1, SCL/Tal1 und GATA-2 an Tag 6+15 von Bedeutung, für SCL/Tal1 und GATA-2 wird diese von einer unmittelbaren Runterregulation an Tag 6+20 gefolgt. Alle anderen untersuchten Genorte scheinen unabhängig von einer VEGF-Stimulation reguliert zu sein.

**Tab. 5: Zusammenfassende Darstellung der Effekte einer VEGF-Stimulation (30ng/ml) auf die Regulation einzelner Gene, die in differenzierten ES-Zellen exprimiert werden**

Die Tabelle präsentiert die Resultate der quantitativen Taqman PCR. Die eingesetzte cDNS wurde in der RT-PCR aus RNS gewonnen, die zuvor aus ES-Zellen nach 6 Tagen Vorkultur und weiteren 5 (6+5) bis 30 (6+30) Tagen Differenzierung in Kultur mit oder ohne zusätzliches VEGF extrahiert wurde. Die gewählten Symbole zeigen die quantitative Veränderung der Genexpression unter VEGF Supplementation im Vergleich zu unstimulierten Zellproben (vergleiche auch Kap. 2.2.4 und 2.5.5.5). Die aufwärts gerichteten Pfeilspitzen stehen für (▲) leicht (▲▲), mittelgradig (▲▲▲) und starke Hochregulation, entgegengerichtet für (▼) leicht, (▼▼) mittelgradig und (▼▼▼) starke Runterregulation, ein Ring (o) zeigt keine erkennbare Regulation des jeweiligen Gens an.

Tag	6+5	6+10	6+15	6+20	6+25	6+30
Genlocus						
CD31 = PECAM	▲	▲▲	▲▲▲	▲	▲▲	▲
CD144	▲▲	▲▲▲	▲▲	▲	▲▲▲	▼▼
Flk-1	▼	o	▲▲	▼▼	o	o
ERG	▲	▲	▲▲	▲	▲	▲
FLI1	o	o	▲	o	o	o
EGR-1	o	o	o	o	o	o
Epo	o	o	o	▼	o	o
HOXD3	▼	o	▲	▼	▲	▼
HOXB4	o	o	▲	▼	o	▲
PU.1	o	o	▲	▲	o	o
SCL/ TAL-1	o	o	▲▲	▼▼	o	o
Cyclin D1	o	o	o	o	o	o
GATA-2	o	o	▲	▼▼	▲	▲
LMO2	o	o	o	o	o	o
LMO4	o	o	o	o	o	o

## 4 Diskussion

### 4.1 Überblick

Murine embryonale Stammzellen der Zelllinie E14 (ES-Zellen) erhalten ihren pluripotenten Status während der Kultur in Präsenz von „Leukemia Inhibitory Factor“ (LIF). Wenn LIF entfernt wird, differenzieren diese Zellen aus und bilden nach einer Kultivierung von 6 Tagen in sogenannten Hängenden Tropfen Zysten-ähnliche Formationen, die Embryoid Bodies (EBs) genannt werden. In diesem System werden die Geschehnisse wiedergespiegelt, die an der Ausbildung des frühen vaskulären Systems in vivo beteiligt sind (Vittet et al. 1996, Desbaillets et al. 2000, Hirashima et al. 1999, Wang et al. 1992). Ziel dieser Arbeit ist es, die Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Endothelzellen und den Einfluss von VEGF in diesem System zu beschreiben. Endotheliale Oberflächenmarker wie CD31, Flk-1, CD144 oder CD133 werden unabhängig vom Vorhandensein von VEGF bereits an Tag 6 exprimiert. Erst nach acht Tagen Differenzierung kann erstmals endogen in den EBs produziertes VEGF nachgewiesen werden. Unter VEGF-Stimulation findet eine Hoch- und Runterregulation von Genen der angiopoietischen Entwicklung statt. Die Aktivierung dieser Signalpfade führt im vorliegenden System nicht zu erkennbaren Variationen im Ablauf der angiopoietischen Ausdifferenzierung. Wie der Verlauf der Oberflächenmarker in Abb.3.3 zeigt, können die Level endothelialer Zellen in EBs innerhalb einer 30-tägigen Differenzierungs-Kultur durch zusätzliche Substitution von VEGF (30ng/ml) nicht signifikant gesteigert werden.

### 4.2 Charakterisierung der Endothelentwicklung in E14 ES-Zell-Kulturen anhand von Antigenen der Zelloberfläche

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, lassen sich Marker der Zelloberfläche wie CD31 und Flk-1, ein Rezeptor für VEGF, auf einem signifikanten Anteil von EBs direkt nach der Vorkultur nachweisen. Eine frühe Expression von CD31 auf Zellen des Embryoid

Bodies impliziert eine endotheliale Destination. So wird übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (Li et al. 2005; Vittet et al. 1996) CD31 bereits an Tag 6+0 von den EBs exprimiert, gefolgt von einem frühen Maximum an Tag 6+2. Dies kann als Hinweis auf eine starke Neigung des embryonalen Gewebes gewertet werden, Verbindung zur uterinen Gefäßversorgung zu erlangen und somit die Versorgung mit Nährstoffen zu sichern. In einem schmalen Entwicklungsfenster wird eine maximale Aktivierung der Vaskulogenese benötigt. Bemerkenswert ist, dass diese CD31 und Flk1-positiven Zellen bereits in Abwesenheit von VEGF nachweisbar sind (Abb. 3.2). Es stellt sich die Frage nach einer Unabhängigkeit der frühen hämangiopoetischen Entwicklung vom Einfluss des klassischen Gefäß-Wachstumsfaktors VEGF. Erst die Expression des VEGF Rezeptors Flk-1 leitet den Beginn des VEGF-Einflusses ein (Abb. 3.3b). Dessen vermehrtes Vorkommen mag in diesem Zusammenhang eine Hochregulation auf Genebene als Reaktion auf einen vermehrten Bedarf reflektieren (Vittet et al. 1996, Li et al. 2006), dessen Initiation abhängig von weiteren zu bestimmenden Faktoren ist. Von hier an treibt VEGF die endotheliale Zelldifferenzierung voran (Yamashita et al. 2000).

Es gibt einige Arbeiten, die lediglich CD31 als charakteristischen Marker für Endothelzellen verwenden (Levenberg et al. 2002, Schlaeger et al. 1995). Das Einsetzen der Expression von CD31 wird teilweise zeitlich erst nach dem Stadium des Angioblasten beschrieben (Drake et al., 2000). Hingegen sprechen Woodfin et al. 2007 dem endothelialen Adhäsionsmolekül zwar eine wichtige Rolle während der Angiogenese zu, beschreibt aber im Verlauf der Entwicklung auch eine Expression auf anderen Zellen des vaskulären Kompartiments. Auch andere Autoren bezweifeln das Ausreichen einer Untersuchung von lediglich CD31 zur Definition der Endothelzellentwicklung und Vaskulogenese (Li et al. 2005, Redick and Bautch 1999). Durch den Nachweis multipler Marker sei ein genaueres Abbild der Reifungsprozesse der Vaskulogenese möglich. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit weitere Oberflächenmarker zur Charakterisierung eingesetzt. Neben CD31 werden ergänzend Flk-1 und CD144 zur Analyse der endothelialen Entwicklung analysiert. Als wichtigste Beobachtung fallen für beide Marker äquivalente Differenzierungsmuster auf, die zu allen Zeitpunkten und unter allen Kulturbedingungen mit dem Expressionsverlauf für CD31 korrelieren (Abbildung 3.3.). Somit werden einerseits die Daten der vorliegenden Charakterisierung weiter

gestützt, andererseits ergeben sich wichtige ergänzende Informationen, wie im Folgenden genauer erläutert wird.

Parallel zum Nachweis von CD31 zeigt auch Flk1 als Rezeptor für VEGF einen ähnlichen Verlauf mit frühem Gipfel der Expression. Auch die steigende Expression von Flk-1 entspricht einer rapiden Proliferation endothelialer und hämatopoetischer Populationen zu diesen frühen Zeitpunkten (Vittet et al. 1996). Beobachtet lässt sich eine kleinere, statistisch nicht Signifikanzniveau erreichende Abnahme der Flk-1 Expression unter zusätzlicher VEGF Substitution (Abb. 3.3.c, siehe auch Kap. 4.4). Die Analyse von Coexpression der verschiedenen Marker zeigt, dass zum Zeitpunkt des Maximums der endothelialen Differenzierung (Tag 6+2) 100 Prozent aller Flk1-positiven Zellen auch CD31 exprimieren, dasselbe gilt im Laufe der Entwicklung ab Tag 6+15 (Abb. 3.4). Dies steht in vermeintlichem Widerspruch zu bisher publizierten Daten. In der Literatur wird Flk-1 bisher als Marker früher (prä-CD31) mesodermaler Stammzellen (Hirashima et al. 1999) bzw. des Angioblasten (Drake et al. 2000) definiert. Andererseits wird Flk-1 ausserdem eine entscheidende Rolle während der endothelialen Differenzierung zugeschrieben (Magnusson et al. 2004, Carmeliet et al. 1996). Nach Kennedy et al. 2007 wird Flk-1 erstmalig auf koloniebildenden Hämangioblasten nachgewiesen, die die weitere vaskuläre und hämatopoetische Entwicklung bestimmen. Flk-/- Zellen können durchaus zu endothelialen bzw. hämatopoetischen Zellen ausreifen, es findet sich im Embryo zunächst eine normale Anzahl hämatopoetischer Progenitorzellen (Kyba und Dailey 2003), diesen fehlt jedoch das Signal zur Zirkulation (Schuh et al. 1999). Daher sind Flk-1 Knockout-Mäuse bei fehlerhafter Blutbildung nicht lebensfähig (Shalaby et al. 1995). Eine wichtige Funktion der VEGF-vermittelten Flk-1-Stimulation liegt demnach in der Mobilisation und Verteilung der Zellen während der Embryogenese. Im Zusammenhang der hier vorgestellten Daten besteht bereits zu frühen Zeitpunkten eine enge Verknüpfung von Flk-1 und CD31-Expression, die die Entwicklung dieser endothelspezifischen Marker parallel ablaufen lässt. Endothelzellen ohne Flk1-Expression spielen im in-vivo ähnlichen System keine Rolle.

Repräsentiert also der beschriebene Pool an CD31 und Flk-1 positiven Zellen innerhalb der ES-Zellen die definitiven Endothel-Progenitorzellen? Kennedy et al. 2007 beschreiben ab Tag 5 der Entwicklung eine Zunahme dieser charakteristischen

Zellen mit Potential zur endothelialen Differenzierung. Auch Magnusson et al. 2004 beschreiben einen parallelen Verlauf der Expression beider Marker mit Maximum an Tag 8, der in der vorliegenden Untersuchung Tag 6+2 entspräche. Im Überblick lässt sich an dieser Stelle vermuten, dass sich die Entwicklung der LIF-kultivierten Zellen in Richtung CD31-Positivität weitgehend VEGF-unabhängig zeigt, dies verdeutlicht der Vergleich der vorliegenden Daten in Abb. 3.1 sowie Abb. 3.3a. Erst die Hochregulation des Rezeptors Flk-1 auf der Zelloberfläche wie in Abb. 3.3b dargestellt steht für einen entscheidenden Entwicklungsschritt hin zu VEGF-Abhängigkeit der weiteren Reifung und damit endothelialen Differenzierung. Entsprechend gilt eine spätere Persistenz von Flk-1+ Zellen z.B. im Endothelium der „blood islands“ als spezifisch für endotheliale Zellen und wird mit einer Runterregulation von Flk-1 in hämatopoetischen Zellen im Laufe der Ausreifung erklärt (Chung et al. 2002). Auf der anderen Seite stehen die initialen CD31+Flk1- und Flk+CD31- Zellen (Abb. 3.4). Diese scheinen demnach für ein definiertes Zeitfenster noch das Potential zu besitzen, zu einem Teil von der endothelialen Ausrichtung abzuweichen und in alternative Richtungen wie zum Beispiel innerhalb der hämatopoetischen Zelllinie auszudifferenzieren (Kennedy et al. 2007). Hier, zeitlich nach der Zwischenstufe des Hämangioblast, gewinnen auch andere Moleküle entscheidenden Einfluss, so z.B. SCL für die Differenzierung in Richtung der hämatopoetischen Zellreihe (Kyba und Dailey 2003). Nach Tag 10-12 der ES-Zell-Entwicklung schliesslich (entspricht in etwa Tag 6+5) erscheint persistierende flk-1-Positivität als charakteristisch für Endothelzellen (Kabrun et al. 1997). Ergänzend diskutieren Li et al. 2005 die Rolle von alternativem RNS-Splicing in der Oberflächenexpression von CD31. So sollen demnach in undifferenzierten Progenitoren, späteren Endothelzellen und dem geringen Anteil CD31+ Zellen mit z.B. thrombopoetischer Destination unterschiedliche CD31-Isoformen vorliegen. Im Hinblick darauf vermuten wir, dass die späteren niedrigeren Level nach Tag 6+15 (Abb.3.3) zu einem grossen Anteil die definitive endotheliale Isoform des CD31-positiven und damit auch Flk1-positiven Phänotyps repräsentieren.

CD144 (VE-Cadherin) wird exklusiv und kontinuierlich auf Endothelzellen exprimiert (Dejana et al. 2008, Vittet et al. 1997). Übereinstimmend sprechen Vittet et al. 1996 und Zhang et al. 2005 von CD144 als einem Marker der endothelialen Zellreifung, somit ist ein Vorkommen für primitive Vorläuferzellen nicht zu erwarten. In der

Vaskulogenese von Knockout-Mäusen für VE-Cadherin finden sich Ansammlungen CD31-positiver Zellen, die jedoch nicht zur Ausbildung retikulärer Netzwerke fähig sind (Crosby et al. 2005). Demnach fungiert CD144 als Molekül des Zellkontakts beim Aufbau vaskulärer Netzwerke (Gory et al. 1999), so dass sich auf eine entscheidende Rolle von CD144 erst unmittelbar vor Abschluss der endothelialen Differenzierung schliessen lässt. Seine Funktion als Moleküls des Zellkontakts wird von Zytokinen wie VEGF reguliert (Dejana et al. 2008). Unterschiedliche Angaben finden sich bezüglich des zeitlichen Bezugs zur Expression von CD31. Während nach einigen Autoren CD144 im Ablauf der Differenzierung nach CD31 nachweisbar ist (Vittet et al. 1996), zeigen Hirashima et al. 1999 eine zeitgleiche Expression beider Oberflächenmarker. Wie in Abb. 3.3 dargestellt, findet sich in der vorliegenden Arbeit eine Expression von CD31 und CD144 zu allen untersuchten Zeitpunkten. Das parallel zu CD 31 bestehende frühe Maximum könnte mit der Formation der Plazenta in vivo im Zusammenhang stehen, die einen grossen Bedarf an Endothelzellen hervorruft. Magnusson et al. 2004 beschreiben vergleichbar diesen Punkt maximaler Expression, wenn auch leicht zeitversetzt an Tag 16 (=6+10). CD144 und damit reifende Endothelzellen sind, wenn auch wie zu erwarten auf niedrigerem Niveau, klar und kontinuierlich im System des Embryoid Bodies nachweisbar (Abb. 3.3c). Somit bestätigen die präsentierten Daten die Ergebnisse von Vittet et al. 1996, die bereits früh ausgereifte Endothelzellen nachweisen. Ein Überblick der gesamten bisher publizierten Daten ergibt jedoch widersprüchliche Erkenntnisse. So beschreiben beispielsweise Zhang et al., 2005 in ihrer Studie eine fast vollständig fehlende Nachweisbarkeit von CD144 und Flk1 im EB nach Tag 6+2 der Entwicklung. Sie vermuten einen Mangel von Wachstumsfaktoren im Vergleich zur parallel untersuchten Differenzierung auf OP9-Feederzellen mit höherem Anteil der obigen Marker. Beschrieben wird die Verwendung eines der vorliegenden Arbeit identischen Nährmediums. Nachdem die hier gezeigten Daten die Eigenproduktion von VEGF nachgewiesen haben (Abb. 3.2) und somit darüber hinaus die weitere Bereitstellung anderer benötigter Zytokine wahrscheinlich erscheint, muss diese Annahme neu hinterfragt werden. Die Ursachen derartiger widersprüchlicher Ergebnisse bleiben unklar und erfordern weitere Diskussion und Abklärung. Zu erwarten wäre darüber hinaus allerdings ein Fehlen von CD144-Positivität in einer Analyse der Zellen in Präkultur, d.h. vor Tag 6+0, was den Gegenstand weiterer Untersuchungen darstellt.

Leider ergeben sich bedingt durch den Versuchsablauf zunehmend hohe Standardabweichungen für die CD144-Expression zu späteren Zeitpunkten. Ein zweiter Anstieg der Nachweisbarkeit nach Tag 6+25 erscheint daher nur spekulativ, zumal hierzu keine unterstützenden Literaturangaben auffindbar sind. Denkbar wäre durchaus ein erneut gesteigerter Bedarf an ausgereiften Endothelzellen im weiteren Fortschreiten der Embryogenese im Rahmen der weiteren Differenzierung und konsekutiv z.B. der Organogenese.

Zusätzlich lassen sich im untersuchten System hohe Anteile an CD133-positiven Zellen nachweisen. Dieser Marker steht für die Entwicklung des sogenannten Hämangioblasten, als gemeinsame Vorläuferzelle für Hämatopoese und Vaskulogenese (Baron 2003, Choi et al. 1998). Die CD133-Antigen-Expression steigt im Verlauf an späteren Differenzierungszeitpunkten an (Abb. 3.3d) und repräsentiert so den kontinuierlich gegebenen zellulären Vorrat an hämangiopoetischen Vorläufern. Diese Daten korrelieren damit, dass der sich entwickelnde Organismus für sein weiteres Wachstum und Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen auf ein funktionierendes Gefäßsystem und hämatopoetische Zellen zum Nährstofftransport angewiesen ist. Ersteres wird durch eine kontinuierlich aktive Vaskulo- und später Angiogenese gewährleistet und auch letzteres basiert durch den gemeinsamen Vorläufer auf eine ausreichende Bereitstellung von hämangioblastischen Progenitorzellen. Die andauernde Nachweisbarkeit dieser Zellen kann in Bezug zu Beobachtungen an humanen Zellpopulationen gesetzt werden, die zirkulierende CD133-positive endotheliale Progenitoren beschreiben. Im adulten Organismus sind diese sogenannten endothelialen Progenitorzellen (EPC) zu Vaskulogenese und Angiogenese befähigt (Peichev et al. 2000). Allerdings lässt sich die Stimulierbarkeit dieser Zellfraktion durch VEGF (Stoelting et al. 2008) im System des EB nicht nachvollziehen. Die in Abbildung 3.3d graphisch geringer erscheinende Expression von CD133 unter VEGF-Stimulation bleibt ohne statistische Relevanz ( $p=0,12$ ). Von besonderem Interesse für weitere Untersuchungen wird auch hier das Verhalten des Stammzellpools vor Tag 6+0, also vor Beginn des Beobachtungszeitraums dieser Arbeit sein. Möglicherweise findet sich auch hier ein Maximum für CD133 positive Zellen, das den von uns beobachteten frühen Anstieg endothelialer Marker einleitet. Für die auf Tag 6+30 folgende Periode vermuten wir

dagegen eher wie beschrieben eine stetige Entwicklung, die die weitere Angiogenese gewährleistet.

Die Daten der vorliegenden Arbeit bekräftigen, dass sich das in-vitro System der embryonalen Stammzellen der Zelllinie E14 auf die Abläufe der frühen Embryogenese in vivo zwanglos übertragen lässt. Die hohen Level an CD31, CD144 und Flk1 exprimierenden, endothelialen Zellen während der frühen Vaskulogenese spiegeln einen hohen Bedarf an Gefäßversorgung und -formation im Bereich der entstehenden Plazenta wieder. Dies beinhaltet den zeitlichen Ablauf und das Hervorbringen der benötigten Progenitorzellen. Die Bereitstellung des Zytokins VEGF erfolgt recht früh, möglicherweise im Rahmen der Fähigkeit zur Produktion weiterer essentieller Zytokine.

#### **4.3 Die Rolle des Wachstumsfaktors VEGF**

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des Zytokins VEGF als wichtigen Wachstumsfaktor im System der ES-Zellen. Beschrieben werden der zeitliche Verlauf seiner Bereitstellung und die Auswirkungen einer zusätzlichen Substitution. Für die embryonale Vaskulogenese und auch Angiogenese ist die Signaltransduktion über das Zytokin VEGF und seine Rezeptoren essentiell (Ng et al. 2004, Ferrara et al. 2003, Cross et al. 2001, Poole et al. 2001). So ist für murine Embryos, denen die Expression von VEGF und seines Rezeptor Flk-1 fehlt, eine Bildung von Blutgefäßen unmöglich (Shalaby et al. 1995). Die Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen lassen auf die zentrale Rolle von VEGF während der embryonalen Entwicklung schließen. So beschreiben Kennedy et al. 2007 einen fatalen Effekt für eine Kultivierung embryonaler Stammzellen in Abwesenheit von VEGF. Die Studie von Drake et al. 2000 schildert das Ausbleiben von Gefäßneubildungen nach einer Unterbrechung der VEGF Signalwege, d.h. auch wenn vorhanden kann das Zytokin hier seine Rolle in der Differenzierung nicht ausfüllen. In der späteren Entwicklung ist auch die Angiogenese des Erwachsenen bekanntermaßen weitestgehend von VEGF abhängig (Kastner et al. 2007, Ferrara et al. 2003, Hromas et al. 1993). In diesem Zusammenhang ist auch die Neovaskularisation in der Tumorgenese zu

nennen, wobei VEGF unter anderem auf die Mobilisation zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC) wirkt (Li et al. 2006, Ribatti 2004). In neueren Studien ist das Zytokin diesbezüglich Mittelpunkt unterschiedlicher Therapieversuche, zum Beispiel durch die Entwicklung spezifischer Antikörper wie Bevacizumab (Rad et al. 2007). Einige Autoren verwenden in ihrem Versuchsaufbau serumfreies Medium, um einen Einfluss womöglich darin enthaltener Zytokine auszuschliessen (Kennedy et al. 2007). Diese Hypothese kann mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit widerlegt werden (siehe hierzu auch Abbildung 3.2). Es zeigt sich, dass zu Beginn der Differenzierung keine nachweisbaren Mengen des Wachstumsfaktors im Nährmedium vorhanden sind. Nicht gänzlich auszuschliessen ist lediglich eine minime Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 2 pg/ml. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren jedoch vielmehr, dass in dieser Form als EBs kultivierte ES-Zellen bereits signifikante Anteile von Endothelzellen enthalten, auch ohne dass im Kulturmediumüberstand VEGF nachgewiesen werden kann. Der Beginn der endothelialen Differenzierung erscheint damit VEGF-unabhängig zu sein, dessen Einfluss muss somit im Verlauf an Bedeutung gewinnen.

#### **4.3.1 Eigenproduktion von VEGF im Embryoid Body**

Die vorliegenden Daten zeigen zum ersten Mal eine endogene Produktion von VEGF als Wachstumsfaktor zu sehr frühen Entwicklungszeitpunkten im System der embryonalen Stammzellen, beginnend bereits an Tag 2 nach Bildung der EBs (Tag 6+2). Die endotheliale Differenzierung ist während der Ausdifferenzierung des EB stark aktiviert. Neben den bereits an Tag 6+2 nachweisbaren signifikanten Spiegeln an endogenem VEGF im Überstand des Nährmediums werden gleichzeitig VEGF-Rezeptoren (Flk-1) auf der Oberfläche der EB exprimiert.

Folglich scheinen VEGF-abhängige Signalwege ab diesem Zeitpunkt eine immer grössere Bedeutung auf die embryonale Ausreifung zur erlangen. Übereinstimmend ist eine entscheidende Bedeutung von VEGF in der Regulation endothelialer Differenzierung für spätere Entwicklungsstufen des Embryos beschrieben (Poole et al. 2001), VEGF-induzierte Signalkaskaden regulieren die endotheliale

Differenzierung späterer embryonaler Stadien. Argraves et al. 2002 beschreiben die Auswirkungen nach Applikation von VEGF-Antagonisten; sie schlussfolgern ein Zeitfenster des Einflusses VEGF-induzierten Kaskaden auf die Vaskulogenese. Innerhalb dieses Fensters scheint sich entsprechend unseren Beobachtungen bezüglich der Expression der Oberflächenmarker (siehe Kapitel 3.3.3) ein Maximum während der frühen aktiven Neovaskularisation zu zeigen. Im Einklang mit den Daten von Gerber et al. 1999 hält der Effekt von VEGF hält in abnehmender Form zumindest über die folgenden vier Wochen an. Im Verlauf ist das Zytokin für die Aufrechterhaltung einmal bestehender Gefäße nicht von Bedeutung (Argraves et al. 2002). Der Beginn des VEGF-Einflusses wird von Argraves et al. 2002 für Tag 7,5 im postkoitalem prävasculären Mesoderm postuliert. Gehen wir bei den Blastozysten und damit den Ausgangszellen der vorliegenden Studie von einem Alter von ca. 4 Tagen aus, dürfte der Zeitpunkt „Tag 7,5“ hier ungefähr Tag 4 entsprechen. In unserer Untersuchung liegt der Beginn des VEGF Einflusses etwas später, nämlich wie oben beschrieben an Tag 6+2. Dies entspricht eher der Beobachtung von Drake et al. 2000, demnach wird kein VEGF für die Entwicklung von Angioblasten aus dem Mesoderm benötigt. Somit wird der exakte Beginn in der Literatur kontrovers diskutiert. Denkbar ist bei Argraves et al. auch eine weitere Abweichung, da die Beobachtungen soweit ersichtlich auf rein morphologische Betrachtungen beruhen. Möglicherweise findet sich hier jedoch auch ein Hinweis für den Einfluss nicht nachgewiesener Mikrotiter des Zytokins VEGF zu frühen Zeitpunkten.

#### **4.3.2 Effekte einer zusätzlichen supranormalen Stimulation mit VEGF**

Die Substitution mit VEGF führt zu keiner messbaren Alteration der endothelialen Zellfraktionen, wie Abb. 3.3 belegt. Weder die vereinzelt tendenzielle Mehrexpression von CD31 und CD144 noch die transiente Abnahme der Flk-1-Expression erreichen Signifikanzniveau. Demgegenüber lassen sich gemäss Abb. 3.1 dennoch Veränderungen in der morphologischen Erscheinung sowie beim Gefäss-Arrangement in den EB beobachten. Es ist schwierig, diese von mehreren Untersuchern bestätigten Unterschiede zu quantifizieren, es können mit diesen Daten jedoch die Ergebnisse anderer Autoren, wie im Folgenden beschrieben,

bestätigt werden. So werden in der Literatur verbesserte Migrationsmuster in VEGF-stimulierten Endothelzellen gezeigt (Hirashima et al. 1999). Esser et al. 1998 beschreiben den Einfluss von VEGF auf Zellmigration und Gefäßpermeabilität, somit bewirkt das Zytokin eine Induktion vermehrter Gefäßaus sprossung in der Angiogenese (Feraud et al. 2001, Magnusson et al. 2004). Andere Autoren beschreiben entsprechend positive Effekte auf die Formation gut vernetzter tubulärer Strukturen und damit embryonaler Gefäße (Ng et al. 2004, Yang et al. 1999). Die fehlenden Daten über Tag 6+20 hinaus lassen sich mit technischen Problemen in der Färbung der immer komplexer werdenden Strukturen des EB erklären. Die dreidimensionale Struktur verhindert zu späteren Zeitpunkten eine optimale Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes. Auch andere Studien beschreiben eine ähnliche Problematik (Magnusson et al. 2004). Zusammenfassend stellen die auf zellmorphologischer Ebene festgestellten VEGF-Einflüsse gleichwohl einen wichtigen Teil der vorliegenden Arbeit dar und bilden den Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen zum Effekt des Zytokins auf Oberflächen- sowie Genebene.

Innerhalb des untersuchten Zeitraums im Rahmen dieser Arbeit scheinen die VEGF Level in den Mediumüberständen hoch genug, um eine Aufrechterhaltung der endothelialen Differenzierung durch dieses Zytokin zu ermöglichen. Da jedoch eine weitere Zugabe von VEGF überraschenderweise nicht imstande ist, den Anteil endothelialer Zellen am Gesamtvolumen zu erhöhen, ist es wahrscheinlich, dass das System mit den vorliegenden endogenen Zytokinspiegeln gesättigt und maximal aktiviert ist. Während die Arbeit von Esser et al. 1998 einen unveränderten endothelialen Zellanteil unter VEGF-Einfluss bestätigen, erzielen andere Studien einen Anstieg der Zellfraktion mit Expression endothelialer Oberflächenmarker durch den Einsatz einer Mischung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin, IL-6 und FGF2 (Fibroblast Growth Factor) oder FGF2 alleine im Mäusemodell (Vittet et al. 1996, Poole et al. 2001) sowie beim Rhesusaffen (Kaufman et al. 2004). Möglich sind bei einem Zytokin-Cocktail jedoch auch adverse Effekte einzelner Komponenten, die zum Beispiel nicht-endotheliale Zellen inhibieren und so deren Anteil reduzieren könnten. Poole et al. 2001 postulieren, dass es einen weiteren wichtigen Wachstumsfaktors gibt, der Einfluss auf die Expression von CD31 und damit auf die initiale Einleitung der angiopoetischen Zelldifferenzierung nimmt. Auch in dieser Arbeit deuten die Ergebnisse auf die Präsenz anderer modulierender

Faktoren in späteren EB Stadien hin. Explizit beschrieben wurden derartige Regulatoren bisher jedoch nicht, so dass deren genauere Untersuchung und Bestimmung eine wichtige weiterführende Aufgabe darstellt.

Der genaue Mechanismus eines Einflusses von VEGF auf die Neovaskularisation ist bisher nicht abschliessend geklärt. Diskutiert wird die Regulation der Expression von Cadherinen (Argraves et al. 2002). Für das endothel-spezifische VE-Cadherin (=CD144) scheint diese Vermutung den Resultaten unserer Untersuchungen, nämlich der fehlenden Stimulierbarkeit von CD144 auf Ebene des Oberflächenmoleküls durch VEGF-Gabe, zu widersprechen. Jedoch ist demgegenüber für andere Cadherine wie  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  eine Induktion durch VEGF beschrieben worden (Senger et al. 1997). Auch die Funktion von CD144 ist nachweisbar durch VEGF beeinflussbar (Dejana et al. 2008). Insgesamt scheint also eine Beeinflussung der Funktion der bestehenden Cadherin-Moleküle in der Zell-Zell-Adhäsion und damit auch Zell-Matrix-Interaktion durch VEGF wahrscheinlich, dies wird in ähnlicher Form durch das morphologische Bild der vorliegenden immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit unterstützt (siehe hierzu Abb. 3.1). Allerdings steht diesem funktionellen Effekt die fehlende quantitative Vermehrung der endothelialen Zellfraktion gegenüber.

#### **4.4 Expression von Genen der Angio- und Vaskulogenese**

Im Zusammenhang der hier präsentierten Ergebnisse liegt das Hauptaugenmerk auf einer Auswahl von Genprodukten und Proteinen, die entscheidend an Entwicklungsschritten der Endothelzell-Differenzierung beteiligt sind oder die mit der Stimulation durch VEGF assoziiert sein könnten (Abb. 3.6 - 3.10). Im Gegensatz zu den Oberflächenmarkern führt zusätzliche VEGF-Gabe zu nachweisbaren Veränderungen auf Genebene, besonders zu einer gesteigerten Expression von endothelspezifischen Genabschnitten für Produkte wie CD31, CD144 und ERG (Tabelle 4, Abb. 3.6.). Augenscheinlich haben diese jedoch keinen Einfluss auf die Ausreifung weiterer Endothelzellen. Im Vergleich des molekulargenetischen Teils der Untersuchung mit der Analyse der Oberflächenmarker stellt sich die Frage nach

einer Erklärung für die nachgewiesene fehlende Übertragung der offensichtlich stattfindenden Einflüsse von zusätzlichem VEGF auf Genebene auf die Oberflächenmorphologie der Zellen. Denkbar ist, dass zum Beispiel weitere noch zu definierende Zytokine oder Mediatoren fehlen, um das Zusammenwirken der Promotoren in der Signalkaskade zu ermöglichen.

Die Ergebnisse unserer Studie bezüglich der Expression von Genen liefern keine absoluten Zahlen, spiegeln aber das Verhältnis einer Aktivierbarkeit unter zusätzlicher Substitution von VEGF im Vergleich zum Verlauf ohne Stimulation dar. Wie in den Abbildungen 3.6 bis 3.10 dargestellt, zeigt die Analyse von RNS aus den Embryoid Bodies in der RT-PCR in erster Linie eine deutliche Variation in der Expression spezifischer Gene unter VEGF-Substitution auf, während allerdings, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, der Anteil der Fraktion endothelialer Zellen unbeeinflusst bleibt. Wichtige, mit der endothelialen Entwicklung assoziierte Gene wie CD31, CD144 oder ERG (endothel-related gene) werden hochreguliert. Dabei zeigen die Oberflächenmarker CD31 und auch CD144 über den nahezu gesamten Untersuchungszeitraum eine deutlich vermehrte Expression ihrer Genprodukte unter VEGF-Einfluss. Währenddessen führt, wie auch bereits auf Ebene der Oberflächenexpression, VEGF Stimulation zu einer zeitweiligen Runterregulation des Gens für seinen Rezeptor Flk-1, ohne dass die geringe Abnahme der Flk-1 Expression statistisch Signifikanzniveau erreicht (Abb.3.3.c, Abb.3.6). Möglicherweise spielt hier die Herunterregulation des VEGF-Rezeptors als Reaktion auf das relative Überangebot an Liganden eine Rolle. Eine entsprechend empfindliche Regulation der Flk1-Expression, die zu einer Abnahme unter VEGF-Zugabe führt, wurde für Endothelzellen der bovinen Aorta beschrieben (Duval et al. 2003). Auch für HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)-Zellen konnte nach initialer, nur Minuten andauernder Induktion eine Runterregulation des Rezeptors Flk-1 nachgewiesen werden (Esser et al. 1998). Die Entwicklung auf Genebene in der vorliegenden Arbeit unterstützt diese Hypothese zumindest teilweise, so ist besonders an Tag 6+20, einem eher späteren Zeitpunkten der Entwicklung, sowie an Tag 6+5 und 6+30 eine VEGF-induzierte Minderexpression zu erkennen. Trotzdem ist auch an anderen untersuchten Tagen durchaus ein Einfluss auf die Regulation an anderer Stelle im Verlauf der komplexen Signalkaskade von

der Expression des Gens bis zum schliesslichen Auftauchen des Moleküls an der Oberfläche denkbar.

Nahezu alle anderen untersuchten Gene (Tab. 4) verbleiben weitgehend unverändert unter VEGF-Zusatz. Erstaunlich mag vor allem das Verhalten der Mitglieder der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren unter VEGF-Substitution erscheinen, wie in Abb. 3.7 dargestellt. Diesen Molekülen werden in der Literatur wichtige Rollen in der endothelialen Entwicklung und Angiogenese zugeschrieben (Fahmy et al. 2003, Sato et al. 2001, Lelièvre et al. 2001). Einzig die Genexpression von ERG als Mitglied dieser Familie lässt sich wie oben beschrieben signifikant steigern und bestätigt somit die in der Literatur beschriebene Rolle des Transkriptionsfaktors in der Gefässentwicklung. So wirken durch ERG eingeleitete Signalwege positiv auf die Ausbildung tubulärer Strukturen im Laufe der Angiogenese (McLaughlin et al. 2001). Dieser Effekt, der sich in den vorliegenden Fluoreszenzfärbungen wiederfindet (Kap. 3.1, Abb. 3.1), scheint damit direkt VEGF-abhängig zu sein. Die aktuelle Arbeit von Birdsey et al. 2008 beschreibt eine unmittelbare Verknüpfung mit CD144 als endothelspezifischem Oberflächenmarker (siehe auch Kap. 4.2). Demnach bindet ERG als Transkriptionsfaktor unmittelbar an den CD144-Promoter und wirkt so als positiver Regulator auf CD144. Dies wird in der vorliegenden Arbeit durch die weitgehend parallele Expression beider Marker bestätigt (Abb. 3.6 und 3.7). FLI1 und EGR-1 als weitere Mitglieder der Ets-Familie bleiben in Anwesenheit supranormaler VEGF-Level in ihrer Expression fast durchgängig unbeeinflusst. EGR-1 ist entscheidend für Neovaskularisation und Tumorigenese (Fahmy et al. 2003) Es zeigen sich Hinweise für eine Unabhängigkeit seiner Signalwege von solchen, die durch VEGF induziert werden (Khachigian et al. 2004). FLI1 wird als erster endothelialer Marker z.B. in vaskulären Tumoren beschrieben (Folpe et al. 2001). In unseren Daten zeigt es lediglich an Tag 6+15 eine kurze Hochregulation unter VEGF. In der Embryonalentwicklung beschreiben andere Autoren FLI1 auch als Indikator für die Formation des Hämangioblasten (Sato et al. 2001). Trotzdem bilden auch Mäuse, in denen die FLI1-Signalwege unterbrochen sind, eine normale Angio- und Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung aus (Pham et al. 2007). Schlussfolgernd wird eine überlappende Funktion mehrerer Ets-Transkriptionsfaktoren postuliert. In der endothelialen Differenzierung zeigen sich die beschriebenen Effekte einer VEGF-Stimulation, ohne dass hierfür eine

Mehrexpression von FLI und ERG-1 essentiell wäre. Durchaus denkbar wäre jedoch, dass hier ein möglicher Grund für die fehlende Uebertragung dieser Effekte auf die Ebene der Oberflächenmoleküle zu suchen ist. Auch ist ein Einfluss weiterer, hier nicht untersuchter Ets-Mitglieder zu vermuten (Sato et al. 2001). Möglicherweise ist im Rahmen der Tumorangio-genese im adulten Organismus jedoch ein Zusammenspiel von VEGF mit den beschriebenen Faktoren möglich.

SCL/Tal1 und seine Co-Faktoren LMO2 und GATA2 zeigen sich weitgehend unbeeinflusst von der Stimulation mit VEGF (Abb. 3.9-3.10). Sie bestätigen ihre eher in der Hämatopoese angesiedelte Funktion (Mikkola et al. 2003, Minegishi et al. 2003). So verläuft die durch diese Marker vermittelte Ausbildung hämatopoetischer Vorläuferzellen und Kolonien, wie zu erwarten, VEGF-unabhängig. Laut Chung et al. 2002 findet eine starke Expression des Transkriptionskomplexes der drei Marker im Stadium des Hämangioplasten statt, Lugus et al. bestätigen 2007 den Einfluss von GATA-2 in der Induktion des Hämangioplasten. Zusammen mit den im vorherigen Absatz beschriebenen Erkenntnissen zu FLI1 fällt auf, dass SCL/Tal1, GATA-2 und FLI isoliert an Tag 6+15 hochreguliert werden. Am selben Tag ist auf Oberflächenebene ein Anstieg für CD133 als Hämangioplast-Marker zu verzeichnen (siehe Kap. 3.3.3, Abb. 3.3). Möglicherweise besteht hier ein kurzes Zeitfenster eines VEGF-Einflusses, über alle übrigen Zeitpunkte ist die Hämangioplastformation jedoch nicht durch zusätzliches VEGF stimulierbar. Neuere Untersuchungen zeigen für SCL/Tal1 und LMO2 unter anderem auch eine Beteiligung an der Gefässentwicklung in der embryonalen Angiogenese (Deleuze et al. 2007, Yamada et al. 2000). In den vorliegenden Daten finden sich diesbezüglich keine Hinweise auf eine Induzierbarkeit durch VEGF. Auch der für den Transkriptionskomplex beschriebene regulierende Einfluss auf z.B. CD144 (Nikolova-Krstevski et al. 2008, Chung et al. 2002) scheint gemäss der vorliegenden Arbeit unabhängig von VEGF-Einfluss zu sein.

Die zuletzt vermehrt unter Beobachtung stehende Homeobox-Genfamilie, hier insbesondere HoxD3 und HoxB4, bleibt ebenfalls weitgehend unbeeinflusst durch VEGF-Stimulation (Abb. 3.8). Gerade HoxD3 ist als Induktor an der Angiogenese beteiligt, Boudreau et al. 1997 beschreiben seine Induzierbarkeit durch bFGF als angiogenem Zytokin. Im Gegensatz dazu lässt sich anhand der erhobenen Daten

keine positive Auswirkung einer VEGF-Gabe nachweisen. Gemäss einer späteren Arbeit von Boudreau und Varner 2004 steigert der Einfluss von HoxD3 die Expression von Integrinen. Auch dieser Effekt lässt sich in der vorliegenden Arbeit für die untersuchten Adhäsionsmoleküle CD31(PECAM1) und CD144(VE-Cadherin) nicht nachvollziehen. Somit bestätigt sich die Schlussfolgerung von Boudreau und Varner 2004, dass die Integrin-Induktion durch HoxD3 während der Angiogenese VEGF-unabhängig verläuft. HoxB4 wirkt wie bekannt während früher Hämatopoese und Stammzellexpansion (Sauvageau et al. 1995, Antonchuk et al. 2001), ein Einfluss von VEGF auf Zellteilung und Proliferation ist nicht zu erwarten. Dies gilt ebenso für die von Kyba et al. 2002 beschriebene Rolle in der Ausreifung hämatopoetischer Vorläuferzellen.

Die weiteren untersuchten Genloci PU.1, EPO und Cyclin D1 (Abb. 3.8, 3.9) zeigen sich in ihrem Expressionsmuster ebenfalls nicht durch VEGF stimulierbar. Der Entscheid über die Zelldestination innerhalb der hämatopoetischen Zelllinie durch PU.1 während der Stammzelldifferenzierung ist VEGF-unabhängig und wird durch andere Zytokine reguliert (Kastner 2008, Mclvor et al. 2003). EPO wurde bisher vor allem als Regulator der Erythropoese beschrieben (LL). Wie der Review von Jelkmann 2007 beschreibt, zeigt eine Expression seines Rezeptors auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen jedoch eine weiterführende Funktion als Wachstumsfaktor an. Eine Beeinflussung der Wirkung von EPO durch Zytokine wurde z.B. für inflammatorische Prozesse beschrieben (La Ferla et al. 2002). Demgegenüber zeigt sich die Bereitstellung von EPO in der vorliegenden Arbeit unabhängig von VEGF, seine Regulierbarkeit durch Hypoxie (Jelkmann 2007) scheint nicht mit dem vergleichbaren Effekt für VEGF verknüpft. Eine Veränderung von Cyclin D1 unter VEGF-Stimulation und damit ein Einfluss auf den Zellzyklus ist nicht zu erkennen.

Die von zusätzlichem VEGF ausgelösten Muster der Genexpression treffen weitgehend genau die im Rahmen dieser Arbeit erwarteten Resultate betreffend deren Rolle in der endothelialen Differenzierung, auch wenn eine genaue Interpretation dieser Resultate teilweise spekulativ bleiben muss. Die vorliegenden Daten stützen die Annahme, dass endotheliale Zellregulation durch das endogen bereitgestellte VEGF nicht maximal stimuliert wird. Vielmehr kann ein supranormaler Level des Zytokins auf Ebene der Genexpression sehr wohl spezifische Alterationen

auslösen. Warum jedoch kommt dieser Effekt nicht auf Ebene der Oberflächenmoleküle zum Tragen? Es lässt sich mutmassen, dass hierbei für die quantitative Regulation der endothelialen Differenzierung intrinsische Regulatoren auf Einzelzell-Ebene verantwortlich sein könnten. Eine weitere denkbare Erklärung ist die Abhängigkeit von der Aktivität anderer, bisher undefinierter Zytokine, die in dem hier verwandten System fehlen bzw. für eine entsprechende Aktivität ebenfalls einer Substitution bedürfen. Der finale Effekt und Einfluss hoher Level an VEGF ist dadurch auf die Induktion qualitativer Veränderungen in der Gefätsstruktur innerhalb des EB beschränkt (Kap.3.1, Abb.3.1). Während spätere ES-Zellen eindeutig auf die Stimulation durch hämatopoetische Zytokine reagieren (Fiedler, submitted for publication), scheinen endotheliale Zellen in ihrer Entwicklung zumindest in Bezug auf den wichtigen Wachstumsfaktor VEGF unabhängig von Zytokineinfluss von aussen zu sein. Untersuchungen zu weiteren Zytokinen sind aktuell Bestandteil weiterer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe. Ein ähnlicher Versuchsablauf wäre zum Beispiel zur Untersuchung der Auswirkungen einer Stimulation mit FGF (Fibroblast Growth Factor) oder Erythropoetin denkbar. Erythropoetin beispielsweise wird als essentiell für eine Ausreifung zu späteren Zeitpunkten nach Tag 12 angesehen (Kennedy et al. 2007). In einigen Studien werden auch pharmakologischen Wirkstoffen wie den Statinen pro-angiogenetische Eigenschaften zugeschrieben (Llevadot et al. 2001)

#### **4.5 Relation zur hämatopoetischen Differenzierung**

Widergespiegelt in dem hier untersuchten System der differenzierten embryonalen Stammzellen scheint die Entwicklung der endothelialen Zellreihe dem Erscheinen hämatopoetischer Zellen und deren Progenitoren voranzugehen. Insbesondere gelingt in der FACS-Analyse der Nachweis relevanter hämatopoetischer Oberflächenmarker erstmals ab Tag 6+10 (Fiedler, Middeke, persönliche Mitteilung). Dies gilt unabhängig von einer durchgeführten Zytokinstimulation mit beispielsweise G-CSF, IL-3, IL-6 oder SCF. Demgegenüber zeigen sich wie oben beschrieben endotheliale Progenitoren bereits zu Beginn des vorliegenden Untersuchungsablaufs, dieser ist im zeitlichen Verlauf sowie der technischen

Durchführung vergleichbar und unterscheidet sich lediglich bezüglich der verwendeten Zytokine. Die ebenfalls initial nachgewiesenen Hämangioblasten als gemeinsame Vorstufe beider Differenzierungslinien scheinen also zunächst nahezu ausschliesslich in Richtung Vaskulogenese gelenkt zu werden, womöglich durch den Einfluss weiterer noch nicht bestimmter Zytokine. An Tag 6+10 ist das Maximum in der Nachweisbarkeit endothelialer Oberflächenmarker bereits vorüber. Es zeigt sich nun jedoch eine vermehrte Nachweisbarkeit CD133-positiver Hämangioblasten, die womöglich die hämatopoetische Entwicklung anzeigen, welche erst im weiteren Verlauf vermehrt an Bedeutung gewinnt. Eine mögliche Rolle von VEGF in der Hämangioblastentwicklung an Tag 6+15, wie in den Untersuchungen zur Genexpression angedeutet (siehe Kapitel 4.4) verbleibt spekulativ.

#### **4.6 Schlussfolgerung und Ausblick**

Der gesamte Pool der embryonalen Stammzellen ist durch zusätzliche Gabe von VEGF nicht entscheidend zu beeinflussen. Resümierend zeigt ein signifikanter Anteil vorkultivierter ES-Zellen der Linie E14 einen endothelialen Phänotyp, auch ohne jede messbare Anwesenheit von VEGF im Nährmedium. Die Stimulation mit supranormalen VEGF-Leveln führt zu einer Aktivierung von Genen mit Impact auf Vaskulo- und Angiogenese (CD31, CD144, ERG) und zu qualitativen Änderungen in der beobachteten Gefässstruktur. Dennoch lassen sich innerhalb von 30 Tagen Differenzierung in der effektiven endothelialen Zellfraktion innerhalb des EB keine signifikanten Unterschiede nachweisen. In weiteren Studien sollte daher der Einfluss zusätzlicher vaskuläre Wachstumsfaktoren und Wirkstoffen bestimmt werden, die in diesen frühesten Stadien der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen könnten. Ausserdem sind das mögliche Vorliegen und der mögliche Einfluss von ultra-niedrigen Leveln an VEGF in LIF-kultivierten ES-Zellen und deren Nährmedium zu analysieren. Kann dies ausgeschlossen werden, wäre eine Unabhängigkeit der endothelialen Differenzierung von VEGF definitiv.

Wir haben für diese Studie Gene ausgewählt, die an Zelladhäsion und Transkription in endothelialen Signalkaskaden beteiligt sind. Die Auswahl wurde ausgerichtet an

einer gründlichen Analyse der bestehenden Literatur und ist in gewisser Weise spekulativ in Hinsicht auf neue Ablaufmuster, die als Ziel für pharmakologische oder gentherapeutische Interventionen dienen könnten. Wie im Review von Keller 2005 beschrieben, bestehen im Wesentlichen drei Einsatzbereiche des EB-Modells. Neben dem Verständnis von Entwicklungsabläufen, z.B. durch Gen-knockout-Versuche, und möglichen Anwendungsstudien von Medikamenten, bildet die Gewinnung aufgereinigter Zellen zur Zellersatztherapie ein wichtiges Forschungsziel, auch wenn hier noch einige Hindernisse wie im Bereich der Immunkompatibilität zu überwinden sein werden. Klinische Einsatzmöglichkeiten setzen ausserdem die Übertragung der im murinen Experiment gewonnenen Kenntnisse auf humane Stammzellmodelle (Levenberg 2002) oder eine Anwendung auf aus humanen Blutproben gewonnene zirkulierende Endotheliale Progenitorzellen voraus. Vor deren Umsetzung sind noch zahlreiche Schwierigkeiten zu überwinden. Diese betreffen neben der deutlich anspruchsvolleren Kultivierung humaner ES-Zellen im Vergleich zum Mausmodell (Moon et al. 2006) nicht zuletzt auch ethische Fragen im Rahmen der Bereitstellung der Stammzellen. Kennedy et al. 2007 beschreiben die Isolation humaner Endothelzellen aus humanen embryonalen Stammzellen nach in vitro-Kultur und sprechen von eindrucklichen Übereinstimmungen dieser endothelialen Zellen mit gewonnenen embryonalen Hämangioblasten. Eine solche Isolation ist Voraussetzung für einen perspektivischen therapeutischen Einsatz. Denkbar wären im Hinblick auf die endotheliale Entwicklung Versuche der Wachstumsinhibition von Tumoren, da diese auf die Rekrutierung vaskulärer Progenitoren angewiesen sind (Rafii et al. 2002). Nach Stoelting et al. 2008 stammt ein Grossteil dieser Zellen aus dem Knochenmark. De Palma et al. 2003 beschreiben erste Studien zur Transplantation genetisch modifizierter ES-Zellen. Desweiteren scheint eine Einflussnahme auf die Revaskularisation bei Ischämie möglich (Machens et al. 2003). Zum Beispiel werden im Rahmen des sogenannten „Tissue Engineering“ endotheliale Zellen eingesetzt, um die Ausbildung vaskulärer Netzwerke zu induzieren (Shen et al. 2003, McCloskey et al. 2005). Leider ist die Lebensdauer solcher Strukturen bisher meist nur von kurzer Dauer (Jain 2003). Das komplexe Zusammenspiel der beteiligten Zellen und Moleküle macht auch hier weitere Anstrengungen zur Verbesserung notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Murine Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bieten ein einzigartiges in-vivo-ähnliches System, um die frühe endotheliale Differenzierung und damit die Anfänge von Vaskulogenese (de novo Aussprossung von Gefässen) und Angiogenese (Ausbau bestehender Gefässnetze) zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit beschreibt das Expressionsmuster endothelspezifischer Oberflächenmarker (CD31, CD144, Flk-1, CD133) für ES-Zellen des Stammes E14 sowie die Effekte einer additiven Substitution mit VEGF (vascular endothelial growth factor). Ausserdem erfolgt eine Analyse der Regulation spezifischer Gene unter VEGF-Gabe mittels quantitativer RT-PCR. Nach Entfernung des Leukemia inhibitory factors (LIF) werden die undifferenzierten Zellen 6 Tage in Präkultur gehalten, im Anschluss differenzieren sie über 30 Tage als Embryoid Body (EB) in Kulturmedium mit oder ohne zugesetztes VEGF. Die Auswertung erfolgt zu festgesetzten Zeitpunkten (6+2 - 6+30). In der ELISA-Analyse können ab Tag 6+2 endogene VEGF-Level gemessen werden, die im Verlauf kontinuierlich ansteigen. Bemerkenswert ist, dass vor diesem zweiten Tag der substituierten ES-Zellkultur keine endogene VEGF-Produktion nachweisbar ist. Dennoch zeigen sich bereits unmittelbar nach der Präkultur deutliche Level der endothelialen Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie, so sind 36% der Zellen positiv für CD31. Im Folgenden beschreiben die untersuchten endothelialen Marker CD31, CD144 und Flk-1 charakteristische Verläufe mit frühen Maxima an Tag 6+2 bzw. 6+5. Die Expression von CD 133 als Marker der gemeinsamen Vorläuferzelle von Hämatopoese und endothelialer Entwicklung zeigt ab Tag 6+10 ein kontinuierliches Level, das den beständigen Vorrat dieser sogenannten Hämangioblasten verdeutlichen kann.

Substituiert man zusätzliches VEGF, resultiert in der durchgeführten Fluoreszenzfärbung eine verbesserte Ordnung der tubulären Netzstrukturen im EB. Im Gegensatz zum fehlenden signifikanten Einfluss einer VEGF-Stimulation auf die Antigenexpression auf Oberflächenebene, lässt sich auf Genebene die vermehrte Aktivierung endothelassoziierter Gene wie CD31, CD144 und ERG (Endothel related gene) nachweisen. Desweiteren tritt unter hohen Leveln des Zytokins ausserdem eine temporäre Runterregulation des VEGF-Rezeptors flk-1 auf, möglicherweise als Reaktion auf das Überangebot.

---

Zusammenfassend erscheint die frühe endotheliale Differenzierung über VEGF-unabhängige Signalwege abzulaufen. Im Verlauf sorgt mit Einsetzen der Zytokinabhängigkeit ab Tag 6+2 die endogene Bereitstellung für eine maximale Stimulation der Endothelentwicklung. Gemessen an der Expression der Oberflächenmarker führt eine VEGF-Substitution nicht zu messbaren Veränderungen der Endothelzellfraktion im EB. Somit wirkt sich die dennoch nachweisbare Hochregulation endothelspezifischer Genorte nicht entsprechend auf die Ausbildung endothelialer Zellen aus, hier lässt sich der fehlende Einfluss weiterer Zytokine oder anderer Signalwege vermuten. Unabhängig davon bleibt der positive Einfluss von VEGF auf die Morphologie der gefässähnlichen Strukturen im EB.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK (2001), HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation, *Exp.Hematol.* 29: 1125-1134
2. Argraves WS, Larue AC, Fleming PA, Drake CJ (2002), VEGF signaling is required for the assembly but not the maintenance of embryonic blood vessels, *Dev.Dyn.* 225: 298-304
3. Bach TL, Barsigian C, Chalupowicz DG, Busler D, Yaen CH, Grant DS, Martinez J (1998), VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels, *Exp.Cell Res.* 238: 324-334
4. Balconi G, Spagnuolo R, Dejana E (2000), Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: A tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20: 1443-1451
5. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996), Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1, *Blood* 87: 3336-3343
6. Baron MH (2001), Molecular regulation of embryonic hematopoiesis and vascular development: a novel pathway, *J.Hematother.Stem Cell Res.* 10: 587-594
7. Baron MH (2003), Embryonic origins of mammalian hematopoiesis, *Exp.Hematol.* 31: 1160-1169
8. Bautch VL, Stanford WL, Rapoport R, Russell S, Byrum RS, Futch TA (1996), Blood island formation in attached cultures of murine embryonic stem cells, *Dev.Dyn.* 205: 1-12
9. Bienvenu F, Barre B, Giraud S, Avril S, Coqueret O (2005), Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1, *Mol.Biol.Cell* 16: 1850-1858
10. Bikfalvi A, Bicknell R (2002), Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting, *Trends Pharmacol.Sci.* 23: 576-582
11. Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnun K, Haskard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM (2008), Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin, *Blood* 111: 3498-3506
12. Bjornsson JM, Larsson N, Brun AC, Magnusson M, Andersson E, Lundstrom P, Larsson J, Repetowska E, Ehinger M, Humphries RK, Karlsson S (2003), Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4, *Mol.Cell Biol.* 23: 3872-3883
13. Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresch DA (1997), Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3, *J.Cell Biol.* 139: 257-264
14. Boudreau NJ, Varner JA (2004), The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis, *J.Biol.Chem.* 279: 4862-4868

15. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek 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: 435-439
16. Choi K (1998), Hemangioblast development and regulation, *Biochem.Cell Biol.* 76: 947-956
17. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G (1998), A common precursor for hematopoietic and endothelial cells, *Development* 125: 725-732
18. 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: 5511-5520
19. Crosby CV, Fleming PA, Argraves WS, Corada M, Zanetta L, Dejana E, Drake CJ (2005), VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly, *Blood* 105: 2771-2776
20. Cross MJ, Claesson-Welsh L (2001), FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition, *Trends Pharmacol.Sci.* 22: 201-207
21. Dahl R, Simon MC (2003), The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation, *Blood Cells Mol.Dis.* 31: 229-233
22. De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L (2003), Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells, *Nat.Med.* 9: 789-795
23. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008), The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability, *J.Cell Sci.* 121: 2115-2122
24. Deleuze V, Chalhoub E, El Hajj R, Dohet C, Le Clech M, Couraud PO, Huber P, Mathieu D (2007), TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells, *Mol.Cell Biol.* 27: 2687-2697
25. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM (1997), Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis, *Am.J.Pathol.* 151: 671-677
26. Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M (2000), Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis, *Exp.Physiol* 85: 645-651
27. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985), The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium, *J.Embryol.Exp.Morphol.* 87: 27-45
28. Doyle B, Metharom P, Caplice NM (2006), Endothelial progenitor cells, *Endothelium* 13: 403-410
29. Drake CJ, LaRue A, Ferrara N, Little CD (2000), VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis, *Dev.Biol.* 224: 178-188

30. Drake CJ, Fleming PA (2000), Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo, *Blood* 95: 1671-1679
31. Drake CJ (2003), Embryonic and adult vasculogenesis, *Birth Defects Res.C.Embryo.Today* 69: 73-82
32. Duval M, Bedard-Goulet S, Delisle C, Gratton JP (2003), Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells, *J.Biol.Chem.* 278: 20091-20097
33. 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): 1853-1865
34. Evans MJ, Kaufman MH (1981), Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* 292: 154-156
35. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM (2003), Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth, *Nat.Med.* 9: 1026-1032
36. Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V (2003), Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation, *Development* 130: 4217-4227
37. Feraud O, Cao Y, Vittet D (2001), Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis, *Lab Invest* 81: 1669-1681
38. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003), The biology of VEGF and its receptors, *Nat.Med.* 9: 669-676
39. Fiedler A. (2006) Hämatopoetische Genexpression in murinen embryonalen Stammzellen unter Einfluss von Zytokinen. Dissertation, Lübeck
40. Filippi MD, Porteu F, Le Pesteur F, Rameau P, Nogueira MM, Debili N, Vainchenker W, de Sauvage FJ, Kupperschmitt AD, Sainteny F (2000), Embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells: A model to study the function of various regions of the intracytoplasmic domain of cytokine receptors in vitro, *Exp.Hematol.* 28: 1363-1372
41. Fleischmann K und Hescheler J (2004): Stammzellen und ihr potentieller Einsatz für therapeutische Zwecke. *BioFokus* 68: 1-12, <http://www.forschung-leben.ch/download/BioFokus68.pdf> ( Tag des Zugriffs: 26.02.2009)
42. Folpe AL, Chand EM, Goldblum JR, Weiss SW (2001), Expression of Fli-1, a nuclear transcription factor, distinguishes vascular neoplasms from potential mimics, *Am.J.Surg.Pathol.* 25: 1061-1066
43. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995), Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium, *Nature* 376: 66-70

44. Furuhata S, Ando K, Oki M, Aoki K, Ohnishi S, Aoyagi K, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Ohnami S (2007), Gene expression profiles of endothelial progenitor cells by oligonucleotide microarray analysis, *Mol.Cell Biochem.* 298: 125-138
45. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK and Fiedler W (2000), In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells, *Blood* 95(10): 3106–3112
46. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N (1999), VEGF is required for growth and survival in neonatal mice, *Development* 126: 1149-1159
47. Gory-Faure S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P (1999), Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis, *Development* 126: 2093-2102
48. Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejana E, Dalmon J, Huber P (1999), The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice, *Blood* 93: 184-192
49. Gumina RJ, Kirschbaum NE, Piotrowski K, Newman PJ (1997), Characterization of the human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 promoter: identification of a GATA-2 binding element required for optimal transcriptional activity, *Blood* 89: 1260-1269
50. Helgason CD, Sauvageau G, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK (1996), Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated in vitro, *Blood* 87: 2740-2749
51. Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, Matsuyoshi N, Nishikawa S (1999), Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis, *Blood* 93: 1253-1263
52. Holland PW, Garcia-Fernandez J (1996), Hox genes and chordate evolution, *Dev.Biol.* 173: 382-395
53. Hristov M, Weber C (2004), Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance, *J.Cell Mol.Med.* 8: 498-508
54. Hromas R, Orazi A, Neiman RS, Maki R, Van Beveran C, Moore J, Klemsz M (1993), Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1, *Blood* 82: 2998-3004
55. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T, Fenyus ML, Elf S, Chan S, Kastner P, Huettner CS, Murray R, Tenen DG, Akashi K (2005), Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation, *Blood* 106: 1590-1600
56. <http://www.immunocytometry.com/antibody.html> (Tag des Zugriffs: 26.2.2009)
57. Jain RK (2003), Molecular regulation of vessel maturation, *Nat.Med.* 9: 685-693

58. Jelkmann W (2007), Erythropoietin after a century of research: younger than ever, *Eur.J.Haematol.* 78: 183-205
59. Jia H, Bagherzadeh A, Bicknell R, Duchon MR, Liu D, Zachary I (2004), Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells, *J.Biol.Chem.* 279: 36148-36157
60. Kabrun N, Buhning HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G (1997), Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors, *Development* 124: 2039-2048
61. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T (2000), Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects, *Circ.Res.* 86: 1198-1202
62. Kappel A, Schlaeger TM, Flamme I, Orkin SH, Risau W, Breier G (2000), Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development, *Blood* 96: 3078-3085
63. Kastner P, Chan S (2007), PU.1: A crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia, *Int.J.Biochem.Cell Biol.*
64. Kaufman DS, Lewis RL, Hanson ET, Auerbach R, Plendl J, Thomson JA (2004), Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells, *Blood* 103: 1325-1332
65. Keller G, Lacaud G, Robertson S (1999), Development of the hematopoietic system in the mouse, *Exp.Hematol.* 27: 777-787
66. Keller G (2005), Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine, *Genes Dev.* 19: 1129-1155
67. Keller GM (1995), In vitro differentiation of embryonic stem cells, *Curr.Opin.Cell Biol.* 7: 862-869
68. Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, Keller G (1997), A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis, *Nature* 386: 488-493
69. Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, Schwantz S, Keller G (2007), Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures, *Blood* 109: 2679-2687
70. Kenny DA, Jurata LW, Saga Y, Gill GN (1998), Identification and characterization of LMO4, an LMO gene with a novel pattern of expression during embryogenesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 11257-11262
71. Khachigian LM (2004), Early growth response-1: blocking angiogenesis by shooting the messenger, *Cell Cycle* 3: 10-11
72. Kirito K, Fox N, Kaushansky K (2003), Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells, *Blood* 102: 3172-3178

73. Klebsattel M. (2004), Blütenspezifische Modifikation der Carotinoidbiosynthese in *Tagetes erecta*. Dissertation, Halle-Wittenberg.
74. Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ (2002), HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors, *Cell* 109: 29-37
75. Kyba M, Daley GQ (2003), Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny, *Exp.Hematol.* 31: 994-1006
76. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T (2002), Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB, *FASEB J.* 16: 1811-1813
77. Lahlil R, Lecuyer E, Herblot S, Hoang T (2004), SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression, *Mol.Cell Biol.* 24: 1439-1452
78. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J (2007), Endothelial cell migration during angiogenesis, *Circ.Res.* 100: 782-794
79. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E (1992), A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts, *J.Cell Biol.* 118: 1511-1522
80. Lecuyer E, Hoang T (2004), SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia, *Exp.Hematol.* 32: 11-24
81. Lee R, Kertesz N, Joseph SB, Jegalian A, Wu H (2001), Erythropoietin (Epo) and EpoR expression and 2 waves of erythropoiesis, *Blood* 98: 1408-1415
82. Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandebunder B (2001), The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis, *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 33: 391-407
83. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R (2002), Endothelial cells derived from human embryonic stem cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 4391-4396
84. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP (2006), VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization, *FASEB J.* 20: 1495-1497
85. Li ZJ, Wang ZZ, Zheng YZ, Xu B, Yang RC, Scadden DT, Han ZC (2005), Kinetic expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) during embryonic stem cell differentiation, *J.Cell Biochem.* 95: 559-570
86. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F (1996), Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis, *Genes Dev.* 10: 154-164
87. Ling KW, Ottersbach K, van Hamburg JP, Oziemlak A, Tsai FY, Orkin SH, Ploemacher R, Hendriks RW, Dzierzak E (2004), GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells, *J.Exp.Med.* 200: 871-882

88. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T (2001), HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells, *J.Clin.Invest* 108: 399-405
89. Lugus JJ, Chung YS, Mills JC, Kim SI, Grass J, Kyba M, Doherty JM, Bresnick EH, Choi K (2007), GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation, *Development* 134: 393-405
90. Machens HG, Salehi J, Weich H, Munch S, Siemers F, Krapohl BD, Herter KH, Kruger S, Reichert B, Berger A, Vogt P, Mailander P (2003), Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 (sFLT-1) in a rat flap model, *J.Surg.Res.* 111: 136-142
91. Magnusson P, Rolny C, Jakobsson L, Wikner C, Wu Y, Hicklin DJ, Claesson-Welsh L (2004), Deregulation of Flk-1/vascular endothelial growth factor receptor-2 in fibroblast growth factor receptor-1-deficient vascular stem cell development, *J.Cell Sci.* 117: 1513-1523
92. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J (1994), Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents, *Circ.Res.* 75: 233-244
93. Martin GR (1981), Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78: 7634-7638
94. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR (1991), A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88: 9026-9030
95. McClanahan T, Dalrymple S, Barkett M, Lee F (1993), Hematopoietic growth factor receptor genes as markers of lineage commitment during in vitro development of hematopoietic cells, *Blood* 81: 2903-2915
96. McCloskey KE, Gilroy ME, Nerem RM (2005), Use of embryonic stem cell-derived endothelial cells as a cell source to generate vessel structures in vitro, *Tissue Eng* 11: 497-505
97. Mclvor Z, Hein S, Fiegler H, Schroeder T, Stocking C, Just U, Cross M (2003), Transient expression of PU.1 commits multipotent progenitors to a myeloid fate whereas continued expression favors macrophage over granulocyte differentiation, *Exp.Hematol.* 31: 39-47
98. McLaughlin F, Ludbrook VJ, Cox J, von C, I, Brown S, Randi AM (2001), Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation, *Blood* 98: 3332-3339
99. Metcalf D, Moore AS, Shortman K (1971), Adherence column and buoyant density separation of bone marrow stem cells and more differentiated cells, *J.Cell Physiol* 78: 441-450
100. Mikkola HK, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y, Orkin SH (2003), Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and

- multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene, *Nature* 421: 547-551
101. Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, Pan X, Fujimoto T, Takahashi S, Hara T, Miyajima A, Nishikawa S, Yamamoto M (2003), Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos, *Blood* 102: 896-905
  102. Moon SY, Park YB, Kim DS, Oh SK, Kim DW (2006), Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications, *Mol. Ther.* 13: 5-14
  103. Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa H, Miyatake H, Akatsuka A, Itoh J, Yahata T, Ando K, Kato S, Hotta T (2003), In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells, *Exp.Hematol.* 31: 1323-1330
  104. Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA (1989), A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions, *J.Exp.Med.* 170: 399-414
  105. Mülhardt C. (2003): Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Vierte Auflage, 73-105. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
  106. Newman PJ (1997), The biology of PECAM-1, *J.Clin.Invest* 100: S25-S29
  107. Ng YS, Ramsauer M, Loureiro RM, D'Amore PA (2004), Identification of genes involved in VEGF-mediated vascular morphogenesis using embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies, *Lab Invest* 84: 1209-1218
  108. Nikolova-Krstevski V, Bhasin M, Otu HH, Libermann T, Oettgen P (2008), Gene expression analysis of embryonic stem cells expressing VE-cadherin (CD144) during endothelial differentiation, *BMC.Genomics* 9: 240
  109. Nishikawa SI (2001), A complex linkage in the developmental pathway of endothelial and hematopoietic cells, *Curr.Opin.Cell Biol.* 13: 673-678
  110. Oettgen P (2001), Transcriptional regulation of vascular development, *Circ.Res.* 89: 380-388
  111. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M (1998), A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain, *J.Biol.Chem.* 273: 31273-31282
  112. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000), Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors, *Blood* 95: 952-958
  113. Pham VN, Lawson ND, Mugford JW, Dye L, Castranova D, Lo B, Weinstein BM (2007), Combinatorial function of ETS transcription factors in the developing vasculature, *Dev.Biol.* 303: 772-783
  114. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM (2001), The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development, *Dev.Dyn.* 220: 1-17

115. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH (1996), The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages, *Cell* 86: 47-57
116. 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: 2837-2842
117. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B (2002), Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?, *Nat.Rev.Cancer* 2: 826-835
118. Redick SD, Bautch VL (1999), Developmental platelet endothelial cell adhesion molecule expression suggests multiple roles for a vascular adhesion molecule, *Am.J.Pathol.* 154: 1137-1147
119. Ribatti D (2004), The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis, *J.Cell Mol.Med.* 8: 294-300
120. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T (1988), Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies, *Development* 102: 471-478
121. Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM (2001), Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects, *Toxicol.In Vitro* 15: 741-753
122. Rossi S, Orvieto E, Furlanetto A, Laurino L, Ninfo V, Dei Tos AP (2004), Utility of the immunohistochemical detection of FLI-1 expression in round cell and vascular neoplasm using a monoclonal antibody, *Mod.Pathol.* 17: 547-552
123. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): Molecular cloning. A Laboratory Manual, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour
124. Sato Y, Teruyama K, Nakano T, Oda N, Abe M, Tanaka K, Iwasaka-Yagi C (2001), Role of transcription factors in angiogenesis: Ets-1 promotes angiogenesis as well as endothelial apoptosis, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 947: 117-123
125. Sato Y (2001), Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis, *Cell Struct.Funct.* 26: 19-24
126. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM, Humphries RK (1995), Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo, *Genes Dev.* 9: 1753-1765
127. Schlaeger TM, Qin Y, Fujiwara Y, Magram J, Sato TN (1995), Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice, *Development* 121: 1089-1098
128. Schmidt A, Brixius K, Bloch W (2007), Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis, *Circ.Res.* 101: 125-136
129. Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR (1991), Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression, *Genes Dev.* 5: 728-740

130. Schuh AC, Faloon P, Hu QL, Bhimani M, Choi K (1999), In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 2159-2164
131. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000), Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 11307-11312
132. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983), Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* 219: 983-985
133. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M (1997), Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 13612-13617
134. 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: 62-66
135. Shen G, Tsung HC, Wu CF, Liu XY, Wang XY, Liu W, Cui L, Cao YL (2003), Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells, *Cell Res.* 13: 335-341
136. Shibuya M (2006), Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E, *Endothelium* 13: 63-69
137. Shibuya M (2006), Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis, *J.Biochem.Mol.Biol.* 39: 469-478
138. Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006), Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Exp.Cell Res.* 312: 549-560
139. Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C (2006), Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy, *Curr.Diabetes Rev.* 2: 71-98
140. Stoelting S, Heinze G, Wagner T, Peters SO (2008), High levels of bone marrow derived endothelial cells in murine WEHI and JC tumors, *Anticancer Res.* Mar-Apr 28(2A):771-7
141. Stoelting S, Trefzer T, Kisro J, Steinke A, Wagner T, Peters SO (2008), Low-dose oral metronomic chemotherapy prevents mobilization of endothelial progenitor cells into the blood of cancer patients, *In Vivo* Nov-Dec; 22(6): 831-6
142. Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981), Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78: 6613-6617
143. Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M (2007), Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression, *Cancer Sci.* 98: 629-635
144. Tavian M, Hallais MF, Peault B (1999), Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo, *Development* 126: 793-803

145. Tse E, Smith AJ, Hunt S, Lavenir I, Forster A, Warren AJ, Grutz G, Foroni L, Carlton MB, Colledge WH, Boehm T, Rabbitts TH (2004), Null mutation of the Lmo4 gene or a combined null mutation of the Lmo1/Lmo3 genes causes perinatal lethality, and Lmo4 controls neural tube development in mice, *Mol.Cell Biol.* 24: 2063-2073
146. Uyeno LA, Newman-Keagle JA, Cheung I, Hunt TK, Young DM, Boudreau N (2001), Hox D3 expression in normal and impaired wound healing, *J.Surg.Res.* 100: 46-56
147. Uzan G, Prandini MH, Rosa JP, Berthier R (1996), Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells: an in vitro model to study gene regulation during megakaryocytopoiesis, *Stem Cells* 14 Suppl 1: 194-199
148. van Mourik JA, Leeksa OC, Reinders JH, de Groot PG, Zandbergen-Spaargaren J (1985), Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa, *J.Biol.Chem.* 260: 11300-11306
149. Vestweber D (2008), VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 28: 223-232
150. Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH (1998), Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development, *Genes Dev.* 12: 473-479
151. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E (1996), Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps, *Blood* 88: 3424-3431
152. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P (1997), Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 6273-6278
153. Voss AK, Thomas T, Petrou P, Anastassiadis K, Scholer H, Gruss P (2000), Taube nuss is a novel gene essential for the survival of pluripotent cells of early mouse embryos, *Development* 127: 5449-5461
154. Wagner RC, Casley-Smith JR (1981), Review. Endothelial vesicles, *Microvasc.Res.* 21: 267-298
155. Wang R, Clark R, Bautch VL (1992), Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development, *Development* 114: 303-316
156. Weiss MJ, Orkin SH (1996), In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems, *J.Clin.Invest* 97: 591-595
157. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S (2007), PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27: 2514-2523
158. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995), Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor, *Cell* 83: 59-67
159. Yamada Y, Pannell R, Forster A, Rabbitts TH (2000), The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 320-324

- 
160. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S (2000), Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors, *Nature* 408: 92-96
  161. Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA, Gerritsen ME (1999), Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels, *Am.J.Pathol.* 155: 887-895
  162. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997), AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells, *Blood* 90: 5002-5012
  163. Zhang WJ, Park C, Arentson E, Choi K (2005), Modulation of hematopoietic and endothelial cell differentiation from mouse embryonic stem cells by different culture conditions, *Blood* 105: 111-114

## 7 Anhang

### 7.1 Daten der FACS-Analyse im Überblick

**Tab. 6: Übersicht der Messresultate der FACS-Analyse**

Nach 6 Tagen Vorkultur ohne Stimulation werden Messungen zu den Erntezeitpunkten 6+0 bis 6+30 durchgeführt. Von Tag 6+0 beginnend wird für eine Versuchshälfte dem Nährmedium VEGF (30ng/ml) zugesetzt (siehe auch Kap. 2.2). Für jeden untersuchten Oberflächenmarker sind übereinander für jeden Erntezeitpunkt oben Mittelwert und Standardabweichung für unstimulierte EBs, unten diejenigen für die mit VEGF stimulierten EBs dargestellt. Ausserdem sind die Anzahl der Messungen und der resultierende p-Wert angegeben, Angabe der Messwerte bis 3 Stellen hinter dem Komma.

Marker (Fluoreszenz)	Alter EB (Tage)	6	6+2	6+5	6+10	6+15	6+20	6+25	6+30
CD 31 (FITC)	Messungen (n)	5	4	4	4	4	4	4	5
	Mittelwert unstimuliert	12,24	19,95	9,18	6,68	5,33	5,28	7,8	6,78
	Standardabw. unstimuliert	3,603	5,545	0,822	1,466	1,300	2,202	3,129	3,534
	Messungen (n)	5	4	4	4	4	3	3	3
	Mittelwert VEGF- Stimulation	12,24	23,45	13,95	8,05	5,86	6,87	8,03	9,33
	Standardabw. VEGF- Stimulation	3,603	8,025	1,845	2,464	1,839	1,692	2,401	2,701
	p-Wert	-	0,5	<b>0,003</b>	0,374	0,643	0,348	0,919	0,45

Marker (Fluoreszenz)	Alter EB (Tage)	6	6+2	6+5	6+10	6+15	6+20	6+25	6+30
CD 31 (PE)	Messungen (n)	4	4	4	4	4	5	5	5
	Mittelwert unstimuliert	35,8	56,88	36,95	18,15	14,33	13,96	16,52	14,88
	Standardabw. unstimuliert	9,811	7,256	3,728	2,651	2,297	5,836	4,456	9,576

	Messungen (n)	4	5	5	4	4	4	3	3
	<b>Mittelwert</b> VEGF- Stimulation	35,8	55,58	42,76	20,28	15,03	16,83	16,67	18,8
	<b>Standardabw.</b> VEGF- Stimulation	9,812	7,051	4,655	3,724	3,844	3,148	4,225	4,678
	<b>p-Wert</b>	-	0,84	0,247	0,388	0,765	0,41	0,965	0,54

<b>Marker</b> (Fluoreszenz)	<b>Alter EB</b> (Tage)	<b>6</b>	<b>6+2</b>	<b>6+5</b>	<b>6+10</b>	<b>6+15</b>	<b>6+20</b>	<b>6+25</b>	<b>6+30</b>
<b>Flk-1</b> (PE)	Messungen (n)	5	4	5	3	4	5	4	5
	<b>Mittelwert</b> unstimuliert	16,66	15,7	30	18,33	11,8	8,76	8,18	9,28
	<b>Standardabw.</b> unstimuliert	5,868	5,795	6,515	6,852	2,945	2,996	2,613	4,265
	Messungen (n)	5	5	4	4	4	4	4	3
	<b>Mittelwert</b> VEGF- Stimulation	16,66	14,76	24,73	16,5	11,7	7,1	9,6	11,23
	<b>Standardabw.</b> VEGF- Stimulation	5,868	4,335	4,065	5,244	5,210	1,639	2,202	4,002
	<b>p-Wert</b>	-	0,788	0,203	0,703	0,974	0,356	0,436	0,546

<b>Marker</b> (Fluoreszenz)	<b>Alter EB</b> (Tage)	<b>6</b>	<b>6+2</b>	<b>6+5</b>	<b>6+10</b>	<b>6+15</b>	<b>6+20</b>	<b>6+25</b>	<b>6+30</b>
<b>CD 133</b> (PE)	Messungen (n)	4	4	5	4	4	4	4	5
	<b>Mittelwert</b> unstimuliert	6,13	7,3	7,38	13,75	18,48	21,93	19,6	17,82
	<b>Standardabw.</b> unstimuliert	2,547	3,524	2,135	4,375	5,833	5,617	6,897	6,966

	Messungen (n)	4	4	4	4	4	4	3	4
	<b>Mittelwert</b> VEGF- Stimulation	6,13	7,05	5,85	9,35	13,58	16,35	16,7	17,83
	<b>Standardabw.</b> VEGF- Stimulation	2,547	2,863	0,129	2,255	2,122	4,083	5,546	7,093
	<b>p-Wert</b>	-	0,916	0,201	0,124	0,165	0,159	0,578	0,999

<b>Marker</b> (Fluoreszenz)	<b>Alter EB</b> (Tage)	<b>6</b>	<b>6+2</b>	<b>6+5</b>	<b>6+10</b>	<b>6+15</b>	<b>6+20</b>	<b>6+25</b>	<b>6+30</b>
<b>CD 144</b> <b>(PE)</b>	Messungen (n)	4	4	5	5	4	4	4	3
	<b>Mittelwert</b> unstimuliert	6,13	7,3	7,38	13,75	18,48	21,93	19,6	17,82
	<b>Standardabw.</b> unstimuliert	0,854	2,089	0,838	0,344	1,098	2,156	1,949	12,92
	Messungen (n)	4	4	5	4	2	3	3	3
	<b>Mittelwert</b> VEGF- Stimulation	0,83	9,25	2,5	1,28	1,3	3,13	7,87	10,3
	<b>Standardabw.</b> VEGF- Stimulation	0,854	4,868	0,596	0,126	0,141	2,120	3,002	11,08
	<b>p-Wert</b>	-	0,091	0,189	<b>0,049</b>	0,429	0,758	0,423	0,841

## 7.2 Daten der Taqman-PCR im Überblick

**Tab. 7a: Übersicht der Taqman-Ergebnisse, Hochregulation**

Nach 6 Tagen Vorkultur ohne Stimulation werden Messungen zu den Erntezeitpunkten 6+0 bis 6+30 durchgeführt. Von Tag 6+0 beginnend wird für eine Versuchshälfte dem Nährmedium VEGF (30ng/ml) zugesetzt (siehe auch Kap. 2.2). Dargestellt sind Anzahl der durchgeführten Messungen, die Mittelwerte, bestimmt nach der sogenannte  $\Delta C_t$  Methode (siehe Kap. 2.5.5.5), Standardabweichung und der Wert der Hochregulation nach Definition (siehe Kap. 3.4.2.1). Die Zahlenwerte sind bis 3 Stellen hinter dem Komma angegeben.

Primer	Alter EB (Tage)	6+5	6+10	6+15	6+20	6+25	6+30
<b>CD 31</b>	Messungen (n)	8	8	8	8	8	8
	Mittelwert	2,331	4,004	6,075	1,785	3,217	1,714
	Standardabweichung	1,097	2,830	4,396	1,133	4,172	1,767
	<i>Wert Hochregulation</i>	1	2	3	1	2	1
<b>CD 144</b>	Messungen (n)	8	8	8	8	8	7
	Mittelwert	4,471	5,578	4,853	1,842	6,131	1,253
	Standardabweichung	3,794	3,914	2,242	1,394	10,126	1,537
	<i>Wert Hochregulation</i>	2	3	2	1	3	0
<b>Fik-1</b>	Messungen (n)	6	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,006	1,196	3,698	0,602	1,361	1,248
	Standardabweichung	0,525	0,631	2,713	0,463	0,469	0,880
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	2	0	0	0
<b>ERG</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	2,173	2,776	3,989	1,605	2,617	1,641
	Standardabweichung	0,955	1,409	2,404	1,110	2,747	1,528
	<i>Wert Hochregulation</i>	1	1	2	1	1	1
<b>FLI1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	0,972	1,240	1,645	0,818	1,321	0,846
	Standardabweichung	0,125	0,257	0,462	0,265	0,617	0,306
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	1	0	0	0
<b>EGR-1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	0,806	0,909	0,963	0,983	1,132	1,306
	Standardabweichung	0,120	0,225	0,216	0,262	0,456	0,106
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	0	0	0	0

<b>HoxD3</b>	Messungen (n)	6	6	6	6	6	6
	Mittelwert	0,707	1,000	2,508	0,754	1,553	0,969
	Standardabweichung	0,389	0,379	2,335	0,492	0,914	0,782
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	1	0	1	0
<b>HoxB4</b>	Messungen (n)	6	5	6	6	6	6
	Mittelwert	1,009	1,285	3,235	0,620	0,908	1,558
	Standardabweichung	0,368	0,326	1,972	0,573	0,425	1,248
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	1	0	0	1
<b>Epo</b>	Messungen (n)	6	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,248	1,066	1,769	0,685	0,966	1,077
	Standardabweichung	1,394	0,398	1,185	0,545	0,335	0,558
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	1	0	0	0
<b>PU1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,481	0,713	0,861	1,972	1,212	1,081
	Standardabweichung	0,887	0,324	0,208	1,940	0,610	0,487
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	0	1	0	0
<b>Cyclin D1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	6	7
	Mittelwert	0,886	0,949	1,056	1,154	0,842	0,976
	Standardabweichung	0,243	0,241	0,331	0,631	0,233	0,417
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	0	0	0	0
<b>SCL/ Tal1</b>	Messungen (n)	5	6	6	6	6	6
	Mittelwert	1,221	1,422	3,660	0,316	1,367	1,448
	Standardabweichung	0,416	0,666	2,263	0,125	0,511	0,667
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	2	0	0	0
<b>GATA2</b>	Messungen (n)	7	7	7	6	7	6
	Mittelwert	0,969	0,923	2,044	0,923	1,663	2,085
	Standardabweichung	0,602	0,473	1,257	0,698	0,344	0,801
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	1	0	1	1
<b>LMO2</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,292	1,084	1,128	1,007	0,990	0,803
	Standardabweichung	0,535	0,359	0,340	0,396	0,576	0,126
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	0	0	0	0
<b>LMO4</b>	Messungen (n)	6	6	6	6	6	6
	Mittelwert	0,886	0,868	0,969	1,189	0,683	0,991

	Standardabweichung	0,238	0,258	0,197	0,458	0,304	0,316
	<i>Wert Hochregulation</i>	0	0	0	0	0	0

**Tab. 7b: Übersicht der Taqman-Ergebnisse, Runterregulation**

Nach 6 Tagen Vorkultur ohne Stimulation werden Messungen zu den Erntezeitpunkten 6+0 bis 6+30 durchgeführt. Von Tag 6+0 beginnend wird für eine Versuchshälfte dem Nährmedium VEGF (30ng/ml) zugesetzt (siehe auch Kap. 2.2). Dargestellt sind Anzahl der durchgeführten Messungen, die Mittelwerte, bestimmt nach der sogenannte  $\Delta C_t$  Methode (siehe Kap. 2.5.5.5), Standardabweichung und der Wert der Runterregulation nach Definition (siehe Kap. 3.4.2.1). Die Zahlenwerte sind bis 3 Stellen hinter dem Komma angegeben.

Primer	Alter EB (Tage)	6+5	6+10	6+15	6+20	6+25	6+30
<b>CD 31</b>	Messungen (n)	8	8	8	8	7	7
	Mittelwert	0,533	0,360	0,234	0,919	1,350	1,277
	Standardabweichung	0,285	0,231	0,135	0,760	1,590	1,309
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	0	0	0
<b>CD 144</b>	Messungen (n)	8	8	8	8	7	8
	Mittelwert	0,417	0,293	0,243	0,851	1,347	4,742
	Standardabweichung	0,340	0,201	0,098	0,541	1,648	5,602
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	0	0	-2
<b>Fik-1</b>	Messungen (n)	8	8	8	8	8	7
	Mittelwert	1,674	0,929	1,181	3,346	0,896	1,629
	Standardabweichung	1,254	0,517	2,113	2,895	0,525	1,979
	<i>Wert Runterregulation</i>	-1	0	0	-2	0	-1
<b>ERG</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	0,644	0,468	0,377	0,928	1,034	1,032
	Standardabweichung	0,512	0,287	0,304	0,550	1,011	0,569
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	0	0	0
<b>FLI1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,044	0,856	0,665	1,322	1,047	1,332
	Standardabweichung	0,134	0,280	0,248	0,389	0,812	0,516
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	0	0	0
<b>EGR-1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,267	1,162	1,082	1,081	1,028	0,770

	Standardabweichung	0,215	0,295	0,228	0,283	0,453	0,064
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	0	0	0
<b>HoxD3</b>	Messungen (n)	6	6	6	6	6	6
	Mittelwert	1,903	1,142	1,440	2,977	1,051	2,002
	Standardabweichung	1,248	0,491	2,224	3,107	0,870	2,055
	<i>Wert Runterregulation</i>	-1	0	0	-1	0	-1
<b>HoxB4</b>	Messungen (n)	6	6	6	6	6	6
	Mittelwert	1,101	0,686	0,463	2,523	1,313	1,013
	Standardabweichung	0,381	0,361	0,291	1,428	0,580	0,671
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	-1	0	0
<b>Epo</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,416	1,119	1,389	2,642	1,135	0,884
	Standardabweichung	0,831	0,615	1,785	2,118	0,350	0,318
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	-1	0	0
<b>PU1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,010	1,559	1,202	1,492	1,494	1,358
	Standardabweichung	0,863	0,910	0,449	1,617	0,717	1,032
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	-1	0	0	0	0
<b>Cyclin D1</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	1,223	1,160	1,022	1,069	1,282	1,206
	Standardabweichung	0,423	0,495	0,285	0,452	0,419	0,515
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	0	0	0
<b>SCL/ Tal1</b>	Messungen (n)	5	6	6	6	6	6
	Mittelwert	0,908	0,800	0,542	3,195	0,877	0,837
	Standardabweichung	0,331	0,261	0,345	0,881	0,510	0,385
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	-2	0	0
<b>GATA2</b>	Messungen (n)	7	7	7	6	7	6
	Mittelwert	1,489	1,345	0,930	3,875	0,622	0,613
	Standardabweichung	1,046	0,645	1,022	6,226	0,117	0,443
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	-2	0	0
<b>LMO2</b>	Messungen (n)	7	7	7	7	7	7
	Mittelwert	0,856	1,074	0,966	1,110	1,413	1,360
	Standardabweichung	0,238	0,570	0,329	0,362	0,885	0,283
	<i>Wert Runterregulation</i>	0	0	0	0	0	0



## 8 Danksagungen

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. S. O. Peters für die Überlassung des Themas und Unterstützung dieser Arbeit. Seine positive Art hat mir das ein oder andere Mal die nötige Motivation vermittelt. Besonders danke ich für die gemeinsamen Anstrengungen bei der Veröffentlichung und Posterpräsentation.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Th. Wagner bedanken, in dessen Abteilung ich diese Arbeit anfertigen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. S. Stölting, die diese Arbeit von Beginn an begleitet hat und entscheidend für ihre erfolgreiche Beendigung war. Sie stand mir jederzeit mit Geduld und Rat für alle meine offenen Fragen und Probleme hilfreich zur Seite, sei es persönlich in Lübeck oder später per email aus der Ferne. Mit ihrer herzlichen Art war sie jederzeit eine wertvolle Unterstützung, als Mittelpunkt des Teams hat sie es immer wieder geschafft, für positive Stimmung zu sorgen, im Arbeitsalltag und auch mit dem einen oder anderen Teamessen. Insbesondere bin ich für das reibungslose Zusammenspiel beim Lesen und Korrigieren dieser Arbeit mit vielen ihrer Ideen und hilfreichen Vorschlägen dankbar, dank ihrer ein oder anderen Extrastunde oder geopferten Zugfahrt konnte ich das Ziel im Auge behalten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau C. Kauderer, die mir die Methodik der Zellkultur nähergebracht hat. Unsere Zusammenarbeit im Laboralltag und ihre immer bereitwillige Hilfe bei unzähligen mehr oder weniger erfolgreichen Abläufen und Versuchen waren ideal. Frau H. Albrecht danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der real-time-PCR und die Hilfe bei der semiquantitativen PCR. Frau B. Weitzner hat mir viele wichtige Tipps während der Messungen der FACS-Analyse gegeben. Insgesamt bin ich während der Zusammenarbeit im Labor der Hämatologie immer auf Verständnis und Hilfsbereitschaft gestossen.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mich unterstützt und motiviert haben und auf den einen oder anderen Besuch verzichten mussten, wenn mal wieder Zellen versorgt werden mussten. Meine Freunde in Lübeck haben mir immer Rückhalt gegeben, mich im Erfahrungsaustausch motiviert und mich nicht zuletzt per Telefon vom Labor mit der Aussenwelt verbunden. Meiner Freundin Stéphanie danke ich zum Schluss, da sie mich in der letzten, der langen Korrekturphase häufiger mal mit dem PC teilen musste und stets liebevoll Verständnis für meine Feierabendaktivitäten aufgebracht hat.



## Publikation

Seifert T, Stoelting S, Wagner T, Peters SO (2008):

“Vasculogeneic maturation of E14 embryonic stem cells with evidence of early vascular endothelial growth factor independency”

Differentiation 76(8):857-67

## Kongressbeitrag/Poster

*35th Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology, September 2006, Minneapolis, USA*

Seifert T, Fiedler A, Middeke M, Vettters K, Wagner T, Stoelting S, Peters SO:

“Growth factor independent transient upregulation of early endothelial progenitors in murine embryonic E14 stem cells”

.

.