

Aus der Sektion Medizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

In-vitro Charakterisierung des endothelialen
Differenzierungspotentials von CD133-positiven Zellen aus
Stammzellapheresat und Knochenmark

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Medizin

vorgelegt von
Piotr Kuta
aus Krakau

Lübeck 2013

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Thomas Wagner
Prof. Dr. rer. nat. Horst Pagel

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.11.2013
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.11.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Gefäßneubildung.....	1
1.1.2 Angiogenese.....	1
1.1.3 Vaskulogenese.....	2
1.2. Gefäßbildung im Tumor.....	2
1.2.1 „Angiogenetic Switch“.....	3
1.3. Endotheliale Vorläuferzellen.....	5
1.3.1 Mobilisierung von EPCs.....	7
1.3.2 In vitro Identifizierung von EPCs.....	8
1.4 Fragestellung.....	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Reagenzien und Kits.....	11
2.1.2 Puffer/Lösungen.....	11
2.1.3 Zellkulturmedien.....	12
2.1.4 Enzyme, Wachstumsfaktoren und Farbstoffe.....	13
2.1.5 Antikörper.....	14
2.1.6 Oligonukleotide.....	14
2.1.7 Labormaterialien.....	15
2.1.8 Geräte	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Gewinnung von Stammzellen.....	16
2.2.1.1 Gewinnung von Stammzellen aus Stammzellapheresatena aus peripheren Blut.....	16
2.2.1.2 Gewinnung von Stammzellen aus dem Knochenmark.....	16
2.2.2 Immunmagnetische Selektion.....	17
2.2.2.1 Isolierung CD133+ Zellen aus Stammzellapheresaten bzw. Knochenmark.....	18
2.2.3 Zellkultur.....	19
2.2.3.1 Kultivierung von Stammzellen.....	19

2.2.3.2 Kryokonservierung und Passagierung von Zellen.....	20
2.2.4 Colony-Forming-Units-Assay.....	20
2.2.4.1 Colony Forming Units – Endothelial Cells (CFU-EC).....	20
2.2.5 Zellbiologische Methoden.....	21
2.2.5.1 Durchflusszytometrie – FACScan: Fluorescence Activated Cell Analyser.....	21
2.2.5.2 Oberflächenmarkierung.....	22
2.2.5.3 Messung der CD133 positiven Zellpopulationen.....	23
2.2.6 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.6.1 RNS-Isolierung.....	25
2.2.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.2.6.3 Reverse Transkription.....	25
2.2.6.4 PCR.....	26
2.2.6.5 Primer Design.....	27
2.2.6.6 Taqman-PCR.....	27
2.2.6.7 Taqman-PCR der RNS.....	28
2.2.7. Biometrie.....	29
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Quantitative Auswertung der Zellzahl von SA- und BM-Zellen in Expansionskultur.....	30
3.2 Morphologische Auswertung der beiden Zellpopulationen in Differenzierungskultur.....	32
3.3 Durchflusszytometrischer Nachweis von EPC-spezifischen Oberflächenantigenen im zeitlichen Verlauf.....	34
3.3.1 Antigenexpression von CD133-positiven BM- bzw. SA-Zellen an Tag 0 und 14.....	35
3.3.2.1 Gegenüberstellung der Antigenexpression von CD133+ BM- Zellen und CD133+ SA-Zellen an Tag 0 und 14.....	37
3.3.3 Antigenexpression von CD133+ BM- und SA-Zellen an Tag 0, 2, 4 und 6.....	38
3.3.4 Gegenüberstellung der Antigenexpression von CD133+ BM- Zellen und CD133+ SA-Zellen an Tag 0, 2, 4 und 6.....	40
3.4 Nachweis wichtiger Transkriptionsfaktoren.....	41
3.4.1 Untersuchung der Expression spezifischer Gene der Vaskulogenese und Hämatopoese im zeitlichen Verlauf mit Hilfe der Taqman-PCR.....	41
3.4.1.1 Maximale Hochregulation von EGR durch beide Zellpopulationen.....	43

3.4.1.2 Leichte Runterregulation von Pecam in beiden Zellpopulationen.....	44
3.4.1.3 Zunehmende Hochregulation von HoxD3 in SA-Zellen.....	44
3.4.1.4 Unterschiedlich starke Hochregulation von Prominin in beiden Zellpopulationen.....	45
3.4.1.5 FLT1 erfährt nur in BM-Zellen Hochregulation.....	46
3.4.1.6 Unregelmäßige Hochregulation von CD45 in beiden Zellpopulationen.....	46
3.4.1.7 Exklusive Hochregulation von VEGFR2 in BM-Zellen.....	47
3.4.1.9 Bis Tag 8 Hochregulation von vWF in beiden Zellpopulationen.....	48
3.4.2 Zusammenfassung der Genregulation.....	48
4 Diskussion.....	50
5 Zusammenfassung.....	62
Literaturverzeichnis.....	64
Anhang A Daten FACS-Analyse.....	74
Anhang B Daten Taqman-PCR.....	78
Anhang C Danksagung.....	82
Anhang D Lebenslauf.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: In der Literatur diskutierte Funktionen vaskulärer Stammzellen in soliden Tumoren.....	4
Abb. 2: Zusammenfassung des in der Literatur diskutierten Ursprungs von endothelialen Vorläuferzellen.....	7
Abb. 3: Schematische Darstellung der immunmagnetischen Selektion mit Hilfe des MACS-Säulensystems.....	18
Abb. 4: Exemplarische Darstellung ausgewählter Histogramme des von uns verwendeten Messprotokolls.....	24
Abb. 5: Wachstumskurve von CD133+ BM-Zellen und CD133+ SA-Zellen.	31
Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Vorläufer-Zellkolonien hämatopoetischer Zellreihen	33
Abb. 7 A,B,C,D: Antigenexpression von CD133+ BM-Zellen bzw. SA-Zellen zu beiden Messzeitpunkten Tag 0 und 14.....	36
Abb. 8 A,B: Antigenexpression von CD133+ BM- bzw. SA- Zellen einander gegenübergestellt an Tag 0 und 14.....	37
Abb. 9 A,B,C,D: Antigenexpression von CD133+ BM- bzw. SA-Zellen zu den Messzeitpunkten Tag 0, 2, 4 und 6.....	39
Abb. 10 A,B: Antigenexpression von CD133+ BM- bzw. SA-Zellen einander gegenübergestellt an Tag 0, 2, 4 und 6	40
Abb. 11: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für EGR.....	43
Abb. 12: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für Pecam.....	44
Abb. 13: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für HoxD3.....	45
Abb. 14: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für Prominin.....	45
Abb. 15: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für FLT1.....	46
Abb. 16: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für CD45.....	47
Abb. 17: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für VEGFR2.....	47
Abb. 18: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für vWF	48
Abb. 19: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in CD133+ SA-Zellen und BM-Zellen für EGR, VWF, Pecam, Prominin, HoxD3, FLT1, VEGFR2, CD45 und KDR.....	49

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Schema zur Antikörpermarkierung der Zellen.....	23
Tab. 2: Übersicht der für die FACS-Analyse verwendeten Antigene.....	34
Tab. 3: Übersicht der in der Taqman untersuchten Transkriptionsfaktoren bzw. Gene.....	41
Tab. 4: Einordnung der errechneten Ratio zum frei gewählten Expressionswert	43
Tab. 5: FACS-Messungen von CD133+ BM-Zellen an Tag 0 und 14	72
Tab. 6: FACS-Messungen CD133+ SA-Zellen an Tag 0 und 14.....	73
Tab. 7: FACS-Messungen von CD133+ BM-Zellen an Tag 0, 2, 4, 6.....	74
Tab. 8: FACS-Messungen CD133+SA-Zellen an Tag 0,2,4,6.....	76
Tab. 9: Hochregulation der Genexpression von CD133+ SA-Zellen.....	78
Tab. 10: Runterregulation der Genexpression von CD133+ SA-Zellen.....	79
Tab. 11: Hochregulation der Genexpression von CD133+ BM-Zellen.....	80
Tab. 12: Runterregulation der Genexpression von CD133+ BM-Zellen.....	81

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
BM	Bone Marrow
CD	Cluster of Differentiation
CEC	Circulating Endothelial Cell
CFC	Colony-Forming-Cells
CFU	Colony Forming Units
Cp	Crossing Point
CXCR4	Chemokine Receptor
C	Cytosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelial Cell
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acide
EGF	Epidermal Growth Factor
EGR	Early Growth Response
EPC	Endothelial Progenitor Cells
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblasten Growth Factor
FGFR	Fibroblasten Growth Factor Receptor
FITC	Fluorescein α -Isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
FS	Forward Scatter
GADPH	Glycerinaldehyd 3 Phosphat Dedhydrogenase
G-CSF	Granulozyten Colony Stimulating Factor
G	Guanin
HKG	Housekeeping Gen
Hox	Homeobox
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
Min.	Minute
MMP	Matrix Metalloprotease
MOMC	Monocyte Makrophagen Multipotential Progenitor Cell
OD	Optische Dichte

VII

PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Phycoerythrin Cyanine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethansulfonfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SA	Stammzellapheresat
SCF	Stemm Cell Factor
SCGF	Stem Cell Growth Factor
SDF	Stromal Derived Factor
SS	Side Scatter
Tab.	Tabelle
T	Thymin
VE	Vascular Endothelial
VEGFR	Vascular Endothelial Factor
vWF	von Willebrand Factor

1 Einleitung

1.1 Gefäßneubildung

Von grundlegender Bedeutung für das Wachstum und Bestehen von biologischem Gewebe sind Blutgefäße. Zu den ersten ausgereiften und funktionsfähigen Organsystemen des menschlichen Organismus gehört das Gefäßsystem des Blutes. Das Blut versorgt Organe und Gewebe mit für das Wachstum wichtigen Nährstoffen und Botenstoffen und ermöglicht gleichzeitig den Abtransport von Kataboliten. Für die Bildung neuer Gefäße werden in der Literatur zwei Entstehungsmechanismen beschrieben: die Angiogenese und die Vaskulogenese.

1.1.2 Angiogenese

Bis zum Nachweis der *de novo* Synthese von primitiven Gefäßplexus aus endothelialen Vorläuferzellen wurde die Fähigkeit, neue Gefäße im adulten Organismus auszubilden, der Angiogenese zugeschrieben. Die Angiogenese setzt ein bestehendes Gefäßsystem voraus. Aus diesem Gefäßsystem können durch Sprossung (sprouting angiogenesis) bzw. Intussuszeption (non-sprouting) neue Gefäße entstehen [Risau W., 1997].

Die Bindung angiogeneseinduzierender Faktoren an Rezeptoren von Endothelzellen führt zur chemotaktischen Proliferation und Migration von zirkulierenden Endothelzellen bzw. deren Vorläuferzellen in das umgebende Bindegewebe. Durch die Ausbildung eines mit Endothelzellen ausgekleideten Lumens wird die Sprossung eingeleitet und ein neues Blutgefäß gebildet [Urbich & Dimmeler 2004]. Das Prinzip der Intussuszeption basiert auf der Teilung bestehender Gefäße durch interkapilläre Stützpfiler. Auf der Basis der Stützpfiler setzt die Teilung des bestehenden Gefäßes ein. Die Teilung des Gefäßes und die daraus resultierende Ausbildung zweier neuer Gefäße führt schließlich zur Vergrößerung des Gefäßbettes [Burri et al. 2004].

1.1.3 Vaskulogenese

Unter Vaskulogenese versteht man die *de novo* Synthese eines primitiven Gefäßplexus aus endothelialen Vorläuferzellen. Im Rahmen der Embryogenese entstehen im extraembryonalen Dottersack durch Bildung und Verschmelzung von Blutinseln die ersten, primitiven Gefäßplexus. Diese für die Vaskulogenese verantwortlichen Blutinseln bestehen aus Zellaggregaten des Mesoderms. Während im Zentrum der Blutinseln sich hämatopoetische Vorläuferzellen befinden, finden sich in der angrenzenden Peripherie endotheliale Vorläuferzellen, die so genannten Angioblasten. Die enge Beziehung beider Vorläuferzellen legt die Entstehung aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem bi-potenten Hämangioblasten, nahe [Risau & Flamme 1992]. Bis Asahara et al. 1997 den Nachweis für die Vaskulogenese im adulten Organismus erbrachte, wurde diese Fähigkeit nur dem embryonalen Organismus zugesprochen. Die *in vitro* Charakterisierung der endothelialen Vorläuferzelle und ihre Fähigkeit im Tierversuch neue, primitive Gefäßbetten zu bilden, analog zur Vaskulogenese des Embryos, veränderte das wissenschaftliche Verständnis der postnatalen Gefäßbildung. Gleichzeitig eröffnete sie neue Wege, Tumore in ihrer Entstehung und ihrem Wachstum zu studieren und zu verstehen, was die Grundlage für die Entwicklung neuer und effektiverer Therapieansätze bildete.

1.2 Gefäßbildung im Tumor

Nicht nur physiologisches, sondern auch pathologisches Gewebe bedarf zum Bestehen und Wachstum eines funktionsfähigen Gefäßsystems. Erst die Bildung von Gefäßen ermöglicht eine Versorgung von Nähr- und Botenstoffen sowie den Abtransports ihrer Metaboliten und somit ein Wachstum über die Grenzen der Diffusion hinaus. Der Ausbildung eines Gefäßsystems kommt eine Schlüsselrolle in dem Wachstum von Tumoren und in der Bildung von Metastasen zu.

1.2.1 „Angiogenetic Switch“

An der Gefäßbildung im pathologischen Gewebe sind proangiogene und angiostatische Zytokine gleichermaßen beteiligt wie im physiologischen Gewebe. Ihr Zusammenspiel reguliert die Gefäßneubildung. Eine Verschiebung des Gleichgewichts im Gewebe zu Gunsten der rekrutierenden angiogenetischen Agonisten führt zur Bildung von Gefäßen und wird als „Angiogenetic Switch“ bezeichnet. Zu den wichtigsten proangiogenen Faktoren zählen das VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor), FGF (Fibroblasten Growth Factor), sowie Angiopoetin [Tahergobari & Khazaei 2012]. Tumorzellen stimulieren durch die vermehrte Synthese proangiogener Zytokine die Mobilisation und Migration von unterschiedlichen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins Tumorbett. Gleichzeitig werden über eine Ligand-Rezeptor-Bindung die proangiogenen Eigenschaften der rekrutierten Vorläuferzellen aktiviert. Sie gewährleisten über verschiedene Mechanismen sowohl die Proliferation und Stabilisierung von Endothelzellen als auch die Modulation des Tumorstromas. Beide Prozesse sind essenzielle Bestandteile der Tumor-neoangiogenese.

Auf der Grundlage der 1997 veröffentlichten Studie durch Asahara et al. erbrachten Lyden et al. erstmalig 2001 den Nachweis der Beteiligung endothelialer Vorläuferzellen am Wachstum und an der Ausbreitung von Tumoren [Lyden et al. 2001]. Im englischsprachigen Raum werden endotheliale Vorläuferzellen mit *Endothelial Progenitor Cells* übersetzt und mit EPCs abgekürzt. Weil in der Literatur die englischsprachige Abkürzung dominiert, werden im Folgenden ebenfalls endotheliale Vorläuferzellen mit EPCs abgekürzt. Weitere Studien bestätigten in Tierversuchen die Beteiligung von EPCs an der Gefäßbildung in Tumoren [Nolan et al., 2007], an der Regulierung des Tumorwachstums [Lyden et al., 2001] und an der Bildung von Metastasen [Gao et al., 2009]. Die Beteiligung von EPCs an der Tumorgefäßbildung wird bis heute kontrovers diskutiert. Göthert et al. wiesen 2004 in ihren Tierversuchen keine bzw. nur ein geringes Maß an EPCs in Tumorgefäßen nach. Indem sie genetisch markierte Knochenmarkszellen in Mäuse transplantierten und in den Versuchstieren das Wachstum eines soliden Tumors induzierten, wollten sie die Herkunft des Tumorgefäßendothels ermitteln. Durch die ausbleibende Färbung des transplantierten Gens in den Endothelzellen

des Tumors kamen sie zu dem Schluss, dass Endothelzellen nicht unmittelbar aus Stammzellen des Knochenmarks differenzieren bzw. rekrutiert werden. Obwohl der Beweis für eine unmittelbare Differenzierung von Vorläuferzellen in Gefäßendothelzellen des Tumors fehlte, wurde eine perivaskuläre Rekrutierung von Vorläuferzellen in die nähere Umgebung von Tumorgefäßen beobachtet [Purhonen et al., 2008]. Einigen Autoren erscheint deshalb eine Beteiligung am „Angiogenetic Switch“ durch parakrine Sekretion proangiogener Faktoren wahrscheinlicher als durch die direkte Differenzierung von EPCs in Endothelzellen [Gao et Mittal, 2009]. Abb. 1 zeigt die Beteiligung verschiedener Zellpopulationen an der Bildung von Gefäßen in soliden Tumoren.

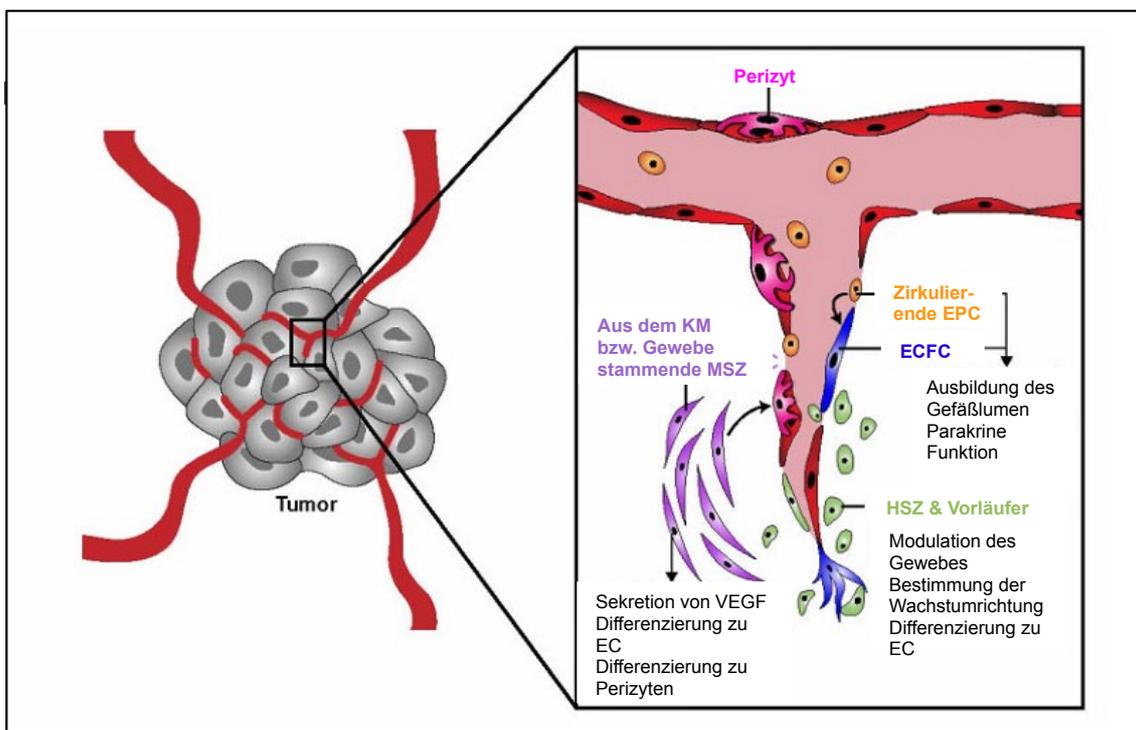


Abb. 1: In der Literatur diskutierte Funktionen vaskulärer Stammzellen in soliden Tumoren

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) mit Ursprung im Knochenmark (KM) oder im umgebenden Gewebe stellen einen wichtigen Ausgangspunkt für die Synthese von VEGF dar. Gleichzeitig differenzieren MSZ zu Perizyten, die den Strukturaufbau der neu entstehenden Gefäße unterstützen. Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) beteiligen sich durch die Synthese Tumorstroma-modulierender und Endothelzell-stabilisierender Faktoren MMP-9 und VEGF an der Neoangiogenese. Über die parakrine Sekretion von Zytokinen wirken HSZ und MSZ auf die Wachstumsrichtung und Anastomosierung der proliferierenden Zellen. Endothelial Progenitor Cells besitzen neben der Fähigkeit sich zu Endothelial Colony-forming Cell (ECFC) zu differenzieren, die Möglichkeit der parakrinen Aktivierung benachbarter, ausgereifter Endothelzellen bzw. rekrutierter HSZ. Alle drei Zellreihen sind über unterschiedliche Mechanismen an der Bildung neuer Gefäße im Tumor beteiligt. Während EPCs und MSZ das Lumen und das Lumen auskleidende Zellen bilden, bestimmen HSZ die Sprossung und Anastomosierung. [Modifizierte Abbildung nach Melero-Martin et al. 2010]

1.3 Endotheliale Vorläuferzellen

In der Literatur werden endotheliale Vorläuferzellen klassischerweise als aus dem Knochenmark rekrutierte Vorläuferzellen beschrieben, mit der Fähigkeit sich in die neu entstehende Gefäßwand einzubinden, dort zu proliferieren und zur Endothelzelle zu differenzieren [Patenaude et al., 2010].

Fortschritte in der aktuellen Genforschung erbrachten den Nachweis, dass sich adulte, hämatopoetische Stammzellen (HSZ) aus aortalen, endothelialen Stammzellen des Embryos entwickeln [Zovein et al., 2008]. Die aus dem hämogenetischen Endothel entstandenen HSZ wandern während der weiteren Entwicklung des Fötus in die Leber. Postnatal wird die Hämatopoese im adulten Organismus vom Knochenmark übernommen. Aufgrund der engen embryonalen Beziehung zwischen der endothelialen und hämatopoetischen Zellreihe wird im adulten Organismus das Knochenmark als Ursprungsort der EPCs angenommen. In der aktuellen Literatur repräsentieren drei Zellreihen, die im Knochenmark gebildet werden, Vorläufer von EPCs: HSZ/Hämangioblast, myeloische Zellen und mesenchymale Stammzellen.

Aufgrund des gemeinsamen embryonalen Ursprungs endothelialer und hämatopoetischer Zellen isolierten Asahara et al. 1997 potentielle EPCs nach einem gemeinsamen Oberflächenantigen. Das Antigen CD34 wird sowohl auf Oberflächen früher Vorläuferzellen der Hämatopoese als auch von ausgereiften Endothelzellen exprimiert. Neben dem Marker CD34 wurde das für Endothelzellen typische Oberflächenantigen VEGFR-2 zur Identifizierung von EPCs verwendet. In Tierversuchen ist es gelungen, die Bildung neuer Gefäße im Rahmen von Geweberegeneration nach Injektion mit CD34/VEGFR-2 positiv angereicherten Zellen nachzuweisen. Für eine weitere Charakterisierung von EPCs wurde in zahlreichen Studien die Expression von Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR), CD38, c-kit, CD31, CXCR4, vWF, Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin), Angiopoetin receptor (Tie2/TEK) und CD133 untersucht. Peichev et al. bedienten sich 2000 in ihren Studien des Oberflächenantigens CD133 zur Diskriminierung zwischen CD34/VEGFR-2 positiven EPCs und CD34/VEGFR-2 positiven, zirkulierenden endothelialen Zellen (CECs). Die Stimulation mit VEGF führte bei frühen HSZ mit dem Marker CD133 zur Zunahme endothelspezifischer

Oberflächenantigene wie z.B. VEGFR2 oder VE-Cadherin und zum Verlust des Oberflächenantigens CD133. Gehling et al. wollten 2001 durch die *in vitro* Differenzierung aus CD133 positiven Zellen zu endothelialen Zellen den Beweis für die Existenz eines Hämangioblasten erbringen. Mit dem Nachweis des Oberflächenantigens CD133 auf hämatopoetischen Stammzellen verloren EPCs allerdings ihre Exklusivität für den Marker. HSZ, EPCs und ECs teilen eine Vielzahl von Oberflächenantigenen und erschweren die *phänotypische* Differenzierung. Folglich beschreibt der Begriff „EPCs“ eine Gruppe von Zellen in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung, die vom primitiven Hämangioblasten bis zur ausgereiften Endothelzelle reicht.

In *in vivo* und in *in vitro* Versuchen konnte demonstriert werden, dass sowohl myeloische Zellen als auch mesenchymale Stammzellen endotheliale Eigenschaften besitzen und an der Tumorgefäßbildung beteiligt sind [Kuwana et al., 2006; Conejo-Garcia et al., 2005; Davani et al., 2003]. Doch neben dem Knochenmark und den in ihm gebildeten Vorläuferzellen werden auch andere Organe als Ursprungsort von EPCs diskutiert [Patenaude et al., 2010]. Ergün et al. vermuteten in ihrer 2009 veröffentlichten Studie, dass Vorläufer endothelialer Zellen sich bis zu ihrer Rekrutierung in der so genannten „vaskulogenen Zone“ zwischen Muskelschicht und Adventitia in einem Ruhezustand aufhalten. Weitere Studien wiesen in Organen wie Niere, Leber, Darm und Herz ebenfalls Vorläuferzellen, mit der Fähigkeit sich an der Gefäßneubildung zu beteiligen, nach [Bruno et al., 2006]. Abb. 2 zeigt in einer Übersicht die unterschiedlichen Zellreihen und Organsysteme, aus denen sich EPCs entwickeln können.

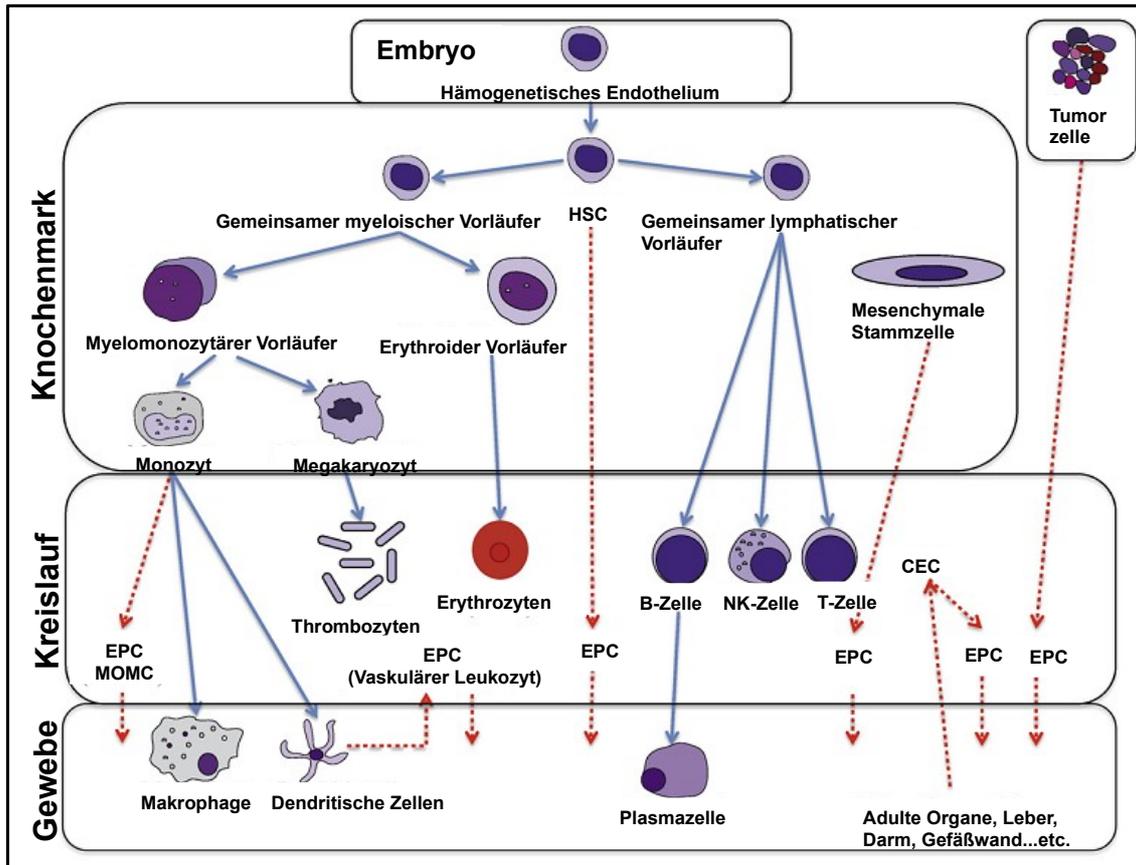


Abb. 2: Zusammenfassung des in der Literatur diskutierten Ursprungs von endothelialen Vorläuferzellen

Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen aus hämogenetischen Endothelium während der Embryogenese. Im adulten Organismus findet die Hämatopoese im Knochenmark statt. Im Knochenmark differenziert die HSC (Hematopoietic Stem Cells) in Zellen der myeloischen und lymphatischen Zellreihe. Es wird angenommen, dass sich EPCs aus HSCs, Monozyten bzw. Makrophagen oder dendritischen Zellen entwickeln, die entweder als MOMCs (Monocyte-derived Multipotential Progenitor Cells) bezeichnet werden oder vaskuläre Leukozyten. Tumoren rekrutieren mesenchymale Stammzellen, die zu ECs differenzieren. Organe wie Leber, Darm, Blutgefäßwände bilden CECs (Circulating Endothelial Cells), die eine weitere Quelle von EPCs darstellen. Außerdem wird behauptet, dass Tumorzellen zu Endothelzellen differenzieren und endothelspezifische Eigenschaften aufweisen. [A. Patenaude et al. 2010]

1.3.1 Mobilisierung von EPCs

Gewebeschäden und Tumoren führen zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie VEGF, FGF, GM-SCF und Osteopoetin in den Blutkreislauf. Die freigesetzten Zytokine induzieren die Mobilisierung von im Knochenmark befindlichen Stammzellen [Li Calzi et al., 2010]. Die umgebenden Zellen des Knochenmarks kontrollieren über chemotaktische Interaktionen das Verhalten der

Stamm- und Vorläuferzellen. Es ist möglich, das Knochenmark anatomisch als auch physiologisch in verschiedene Zonen zu unterteilen. In der endostealen Region bilden Osteoblasten zusammen mit anderen mesenchymalen Stromazellen, wie Retikulozyten und Adipozyten, die „Osteoblasten Nische“. In ihr verweilen die undifferenzierten Stammzellen in einem Ruhezustand. Die Regulierung des Ruhezustandes erfolgt zum einen über Adhäsionsmoleküle wie Tie2, Angiopoetin-1 oder β -Intergrin, zum anderen durch humorale Faktoren wie Stromal-derived Factor 1 (SDF-1). Im Kern des Knochenmarks sind Endothelzellen der Sinusoiden an der Bildung der „Vaskulären Nische“ beteiligt. Nach Rekrutierung der undifferenzierten Stammzellen aus der osteoblastischen in die vaskuläre Nische beginnt die Differenzierung und Proliferation der Zellen. Das proteolytische Enzym MMP9 steuert über unterschiedliche Mechanismen die Migration der Stammzelle aus der osteoblastischen Nische, ihre Proliferation in der vaskulären Nische und schließlich ihre Mobilisation aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf [Chantrain et al. 2008].

1.3.2 In vitro Identifizierung von EPCs

Seit der Erstbeschreibung durch Asahara 1997 versuchen zahlreiche Autoren in *in vivo* und *in vitro* Experimenten endotheliale Vorläuferzellen zu charakterisieren und zu isolieren. Zu den üblichen Zellmaterialien zur Gewinnung von EPCs gehören das periphere Blut, Stammzellapheresate, Knochenmark und Nabelschnurblut. In der Mehrzahl der Studien überwiegen zur *in vitro* Identifizierung endothelialer Vorläuferzellen drei Verfahren:

1. Kultivierung mononukleärer Zellen aus Blut. Die Zellen werden auf mit Fibronektin beschichteten Zellkulturplatten in Kultur gebracht. Nach Zytokinstimulierung werden nicht-adhärenente Zellen verworfen. Die verbliebenen Zellen repräsentieren EPCs mit endothel-spezifischen Eigenschaften.

2. Nachweis von EPCs durch Colony-Forming-Cell-Assays:

1. Colony Forming Unit (CFU) – Assay nach Hill

2. Endothel Colony Forming Cell – Assay

In beiden Assays wird nach Zytokinstimulierung die Bildung von Zellkolonien nachgewiesen. Die spezifische Morphologie der Kolonie unter dem Lichtmikroskop lässt Rückschlüsse auf die Zellreihenzugehörigkeit zu.

3. Phänotypische Identifizierung von EPCs über Antikörper-Antigen Bindung.

Aufgrund des gemeinsamen embryonalen Ursprungs endothelialer und hämatopoetischer Zellen werden zur Identifizierung und Isolierung von EPCs Oberflächenantigene beider Zellreihen miteinander kombiniert. Die Unterschiede in der phänotypischen Identifizierung und damit verbundenen Isolierung der EPCs führten zu Verwirrung in der Ergebnislage der einzelnen Studien. Aktuell besteht jedoch Einigkeit, dass zirkulierende EPCs sowohl Oberflächenantigene als auch Eigenschaften der hämatopoetischen und der endothelialen Zellreihe teilen [Barber und Iruela-Arispe, 2006].

1.4 Fragestellung

Obwohl die Durchflusszytometrie von vielen Autoren als Methode der Wahl zur Isolierung von EPCs verwendet wird, besteht bis heute keine einheitliche Definition des Phänotyps. So wurde das Oberflächenantigen CD133 in zahlreichen Studien verwendet, um frühe Formen von Stammzellen, insbesondere der hämatopoetischen Reihe, zu identifizieren [Yin et al., 1997]. Durch die Kombination von CD133 mit Oberflächenantigenen der endothelialen bzw. hämatopoetischen Reihe wurde versucht, frühe endotheliale Vorläuferzellen von späten Vorläuferzellen zu isolieren [Peichev et al., 2000; Gehling et al., 2000]. Der Einsatz von CD133 als Oberflächenantigen zur Isolierung von EPCs wird jedoch kontrovers diskutiert [Timmermans et al. 2007]. Ein besseres Verständnis des proangiogenen Potentials von CD133+ Zellen und der damit verbundenen

postnatalen Bildung von Blutgefäßen sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Gewebe kann neue Therapieansätze in der Klinik ermöglichen [INSTEM-Studie 2005]. Dafür untersuchten wir das *in vitro* Verhalten von CD133+ Zellen aus Stammzellapheresaten und Knochenmark in der *in vitro* Zellkultur mit folgenden Fragestellungen:

1. Welches Differenzierungspotential besitzen CD133+ Zellen in der Zellkultur?
2. Welche Oberflächenantigene werden im zeitlichen Verlauf exprimiert?
3. Welche proangiogene Faktoren werden auf Genebene im zeitlichen Verlauf hoch bzw. runter reguliert?

Nicht nur die fehlende Einheitlichkeit in der Phänotypisierung von EPCs führt zu einer unterschiedlichen Ergebnislage in der Literatur, sondern auch die Verwendung unterschiedlichen Probenmaterials erschwert die Vergleichbarkeit der Arbeiten untereinander. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der *in vitro* Charakterisierung von Stammzellapheresatzellen und Knochenmarkszellen gegenübergestellt, um zusätzlich Unterschiede im angiogenen bzw. vaskulogenen Potential zu identifizieren. Die Wahl der einen oder der anderen Zellpopulation könnte somit Einfluss auf die Wirkung einer Therapie haben und über ihren Erfolg bzw. Misserfolg in der Klinik entscheiden. Rowley et al. konnten 2001 in ihrer Studie zeigen, dass die Transplantation von allogenen Stammzellen, die aus peripheren Blut gewonnen wurden, gegenüber Stammzellen, die aus Knochenmark gewonnen wurden, zu einer schnelleren Rekonstitution des Knochenmarks führen. Die gleiche Beobachtung konnte die Arbeitsgruppe von Anasetti et al. in einer 2012 veröffentlichten Studie bestätigen. In der gleichen Studien konnten sie jedoch auch nachweisen, dass die allogene Transplantation von Stammzellen aus dem Knochenmark wiederum seltener zu chronischen Graft-versus-Host Erkrankungen führt [Anasetti et al. 2012]. Es stellt sich somit die Frage, ob die beiden Zellpopulationen ebenfalls eine unterschiedliche Wirkung auf die physiologische bzw. pathologische Vaskulogenese im adulten Organismus haben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Kits

Reagenz/Kit	Bezugsquelle
-------------	--------------

Magnetische Stammzellisolierung:

MACS CD133 MicroBead Kit	Mitenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<ul style="list-style-type: none"> • FCR-Blocking Reagent, human • CD 133 MicroBeads, human 	

Sonstige Reagenzien	Bezugsquelle
---------------------	--------------

Fibronektin	Millipore GmbH (Schwalbach)
FKS (Fetales Kälberserum) Gold	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Pferdeserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)
Isopropanolol	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid, cell culture tested)	Sigma
PMSF (Phenylmethansulfonfluorid)	Sigma

2.1.2 Puffer/Lösungen

Puffer und Lösungen	Bezugsquelle
---------------------	--------------

PBS (Phosphat Buffered Saline)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
--------------------------------	------------------------------

MACS (Blaupuffer für MACS):	Eigene Herstellung
-----------------------------	--------------------

- 500 ml PBS
- 2,5 g 0,5% Humanes Serum Albumin (20%)
- 2 mM ACD-A (Antikoagulant Citrate Dextrose Solution A)

RNS-Clean	Invitrogen (Karlsruhe)
-----------	------------------------

Aqua Spüllösung	Delta Select
VersaLyse	Beckman Coulter GmbH
Proteasen-Inhibitor Cocktail	Roche
CellLysis Puffer	Cell Signaling
FACScan Clean (Fluorescence-Activated-Cell-Scanning)	BD/Pharmingen (Heidelberg)

2.1.3 Zellkulturmedien

Medium	Bezugsquelle
IMDM (Iscoves Modified Dulbeccos Medium), L-Glutamin, 25nM Hepes	Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)
Methocult SF <ul style="list-style-type: none"> • Methylcellulose • Bovine Serum Albumin • rh Insuline • Human Transferrin • 2-Mercaptoethanol • L-glutamine • Iscove's MDM 	StemCell Technologies (Grenoble, Frankreich)
CryoSafe-Einfriermedium	C.C.Pro GmbH (Oberdorla)
Expansionsmedium <ul style="list-style-type: none"> • 10 ml IMDM (Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium) mit L-Glutamin, 25 mM Hepes. • 10 % FCS • 10 % Pferdeserum • 50 ng/ml VEGF, • 100 ng/ml FLT3 • 100 ng/ml SCGF-β; • 1μM/L Hydrocortison 	Eigene Herstellung

Differenzierungsmedium	Eigene Herstellung
<ul style="list-style-type: none"> • 3 ml MethoCult SF (Serumfreie Mathylcellulose Medium ohne Zytokine). • 30% FKS • 50 ng/ml VEGF, • 50 ng/ml FGF, • 100 ng/ml SCF, • 50 ng/ml IGF, • 20ng/ml IL3, • 50 ng/ml EGF • 2 units/ml Heparin 	

2.1.4 Enzyme, Wachstumsfaktoren und Farbstoffe

Enzym	Bezugsquelle
Taq-(<i>Thermus aquaticus</i>) DNS-Polymerase	Amersham Biosciences
Inhibitor	Bezugsquelle
Ribonuklease – Inhibitor (RNSguard)	Amersham Biosciences
Wachstumsfaktoren	Bezugsquelle
FLT-3 (FMS-like Tyrosin Kinase 3)	PeproTech GmbH (Hamburg)
Hydrokortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)
SCGF- β (Stem Cell Growth Factor Beta)	Pepro Tech GmbH (Hamburg)
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	Pepro Tech GmbH (Hamburg)
Farbstoffe	Bezugsquelle
SYBR-Green	Eurogentec

2.1.5 Antikörper

Primärer AK	Farbstoff	Bezugsquelle
CD133 MicroBeads CD34 CD133/2 CD45 von Willebrand Factor (sheep anti-Human)	PC7 PE FITC FITC	Mitenyi Biotec (Bergisch Gladbach) BD/Pharmingen (Heidelberg) Militenyi Biotech (Bergisch Gladbach) BD/Pharmingen (Heidelberg) The Binding Site Limited (Schwetzingen)
Isotypen Kontrolle (Maus IgG1)	FITC/PC7/PE	BD/Pharmingen (Heidelberg)

2.1.6 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von Metabion in der Purification HPLC und in lyophilisierter Form geliefert.

Bezeichnung	Oligonukleotide
EGR1 forward EGR1 reverse	5'-TGA CCG CAG AGT CTT TTC CT-3' 5'-TGG GTT GGT CAT GCT CAC TA-3'
vWF forward vWF reverse	5'-GTG ACG GTG AAT GGG AGA CT-3' 5'-GTC ATT GGC TCC GTT CTC AT-3'
Pecam forward Pecam reverse	5'-ATG ATG CCC AGT TTG AGG TC-3' 5'-ACG TCT TCA GTG GGG TTG TC-3'
Prominin1 forward Prominin1 reverse	5'-TTG TGG CAA ATC ACC AGG TA-3' 5'-TCA GAT CTG TGA ACG CCT TG-3'
HOX-D3 forward HOX-D3 reverse	5'-CAT AAA TCA GCC GCA AGG AT-3' 5'-TCC TAA GCT CGG CTG GAT AA-3'
FLT1 forward FLT1 reverse	5'-TTT GGA TGA GCA GTG TGA GC-3' 5'-CGG CAC GTA GGT GAT TTC TT-3'
VEGFR2 forward VEGFR2 reverse	5'-GTG ACC AAC ATG GAG TCG TG-3' 5'-TGC TTC ACA GAA GAC CAT GC-3'
CD45 forward CD45 reverse	5'-CCT ACC AGC CCA AAG TGT GT-3' 5'-GAC TTG GCA TCC CAT TGT CT-3'

2.1.7 Labormaterialien

Labormaterial	Bezugsquelle
Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
MACS-Säulen (MS/LS Columns)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf AG (Hamburg)
FACS-Tubes (5ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pasteurpipetten Glas (145mm)	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pre-Seperation-Filter (30µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Sterilpipetten (2ml bis 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkultur Microplatten (96 Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkultur Multiwellplastten (6, 12, 24 Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)

2.1.8 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
<i>Durchflusszytometrie</i>	
FACS-Gerät, Cytomics (FC500)	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Vortex MS2 Minishaker	IKA GmbH & Co. KG (Staufen)
<i>Zellkultur</i>	
Brutschrank	Hereaus Holding GmbH (Hanau)
Mikroskop Typ ID03	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht AG „Assistent“ (Sondenheim/Rhön)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
Sterilbank, Typ BSP 4A	Gelaire (Sydney, Australien)
Wasserbad, Typ 1003	GFL GmbH (Burgwedel)
Werkbank	Gelaire
<i>RNS-Bestimmung</i>	
Photometer	Eppendorf (Hamburg)

PCR

Thermocycler
Taqman-PCR

Thermo Hybaid (Ashford, England)
Prisma ABI 7000(Carlsbad Californien, USA)

Zentrifugen

Kühlzentrifuge
Zentrifuge

Eppendorf Centrifuge 5417 R (Hamburg)
Hereaus Sepatech Megafuge 1.0 (Hanau)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Stammzellen

2.2.1.1 Gewinnung von Stammzellen aus Stammzellapheresaten aus peripheren Blut

Die Transplantation von Stammzellapheresaten wird zur Rekonstitution der Hämatopoese des myeloablatierten Empfängerpatientens eingesetzt. Am Tag der Stammzelltransplantation wurden aus dem fast leeren Beutel des Transplantates mit Hilfe einer 10 ml Spritze und 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung die verbliebenen Zellen herausgelöst und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Das Falcon-Röhrchen wurde bei 1400 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet erneut in 10 ml 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert. Für die weitere Verarbeitung siehe Kap. 2.2.2.1. Bei den Zellen, die in dem Beutel nach der Transplantation verblieben sind, handelt es sich um einen Anteil, der weniger als 0,5% des Stammzelltransplantates ausmacht. Dieser Teil bleibt bei jeder Transplantation in einem Beutel zurück und kann dem Patienten nicht transplantiert werden. Die Verwendung von Stammzellapheresaten zu Forschungszwecken genehmigte die Ethikkommission der Universität zu Lübeck im Ethikantrag mit dem Aktenzeichen 07/188 vom Mai 2005.

2.2.1.2 Gewinnung von Stammzellen aus dem Knochenmark

Die Verwendung von Stammzellen aus dem Knochenmark zu Forschungszwecken

wurde im Rahmen des Ethikantrages der multizentrischen INSTEM-Studie [EudraCT-No.: 2005-004041-35] genehmigt. Gegenstand der Studie ist die Evaluierung der vermuteten synergistischen Wirkung einer autologen Stammzelltransplantation in Verbindung mit der Versorgung durch einen arteriellen Bypass und eine transmyokardiale Laser-Revaskularisation bei Myokardinfarkt. Dabei wird einem Infarktpatienten während der Bypass-Revaskularisation, nach Einleitung der Narkose, Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen. Zeitlich Parallel zur Bypass-Operation erfolgt die Aufreinigung von CD133+ Zellen aus dem Knochenmark in Stammzellpräparate, die anschließend dem Patienten reinfundiert werden. Das in dem Totvolumen der Infusionsspritzen enthaltene Blut wurde anschließend in 50 ml Falcon-Rörchen zusammen mit 5 ml PBS-Puffer und 2 mM EDTA überführt. Die anschließend gefilterte Zellsuspension wurde bei 1400 rpm für 35 Min. zentrifugiert. Das vom Überstand befreite Zellpellet wurde in einem weiteren Schritt in 5 ml PBS-Puffer und 2 mM EDTA erneut gelöst und bei 1400 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Für die weitere Verarbeitung siehe Kap. 2.2.2.1.

2.2.2 Immunmagnetische Selektion

Die Kopplung von magnetischen Partikeln an Oberflächenantigenen von Zellen ermöglicht eine magnetische Zelltrennung. Dazu werden die Zellen mit so genannten MicroBeads inkubiert. Bei MicroBeads handelt es sich um 50 nm große Magnetpartikel, die an bestimmte Antikörper gebunden sind und so eine Bindung an Oberflächenantigene von Zielzellen ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir MicroBeads, die gegen das Oberflächenantigen CD133 gerichtet sind. Mit Hilfe einer magnetischen Säule, in der sich ein starkes Magnetfeld befindet, können die für das Oberflächenantigen positiven Zielzellen schließlich isoliert werden. Die magnetisch markierten Zellen werden durch das stark magnetische Feld in der Säule gebunden und von den unmarkierten Zellen getrennt. Als Säulentyp verwendeten wir die in Kap. 2.1.7 beschriebenen MS bzw. LS Separation Columns. Sie besitzen ein Fassungsvermögen von 2×10^8 bzw. 20×10^8 Zellen und sind für maximal 1×10^7 bzw. 1×10^8 markierte Zielzellen ausgelegt. Abb. 3 zeigt schematisch das Prinzip der immunmagnetischen Selektion.

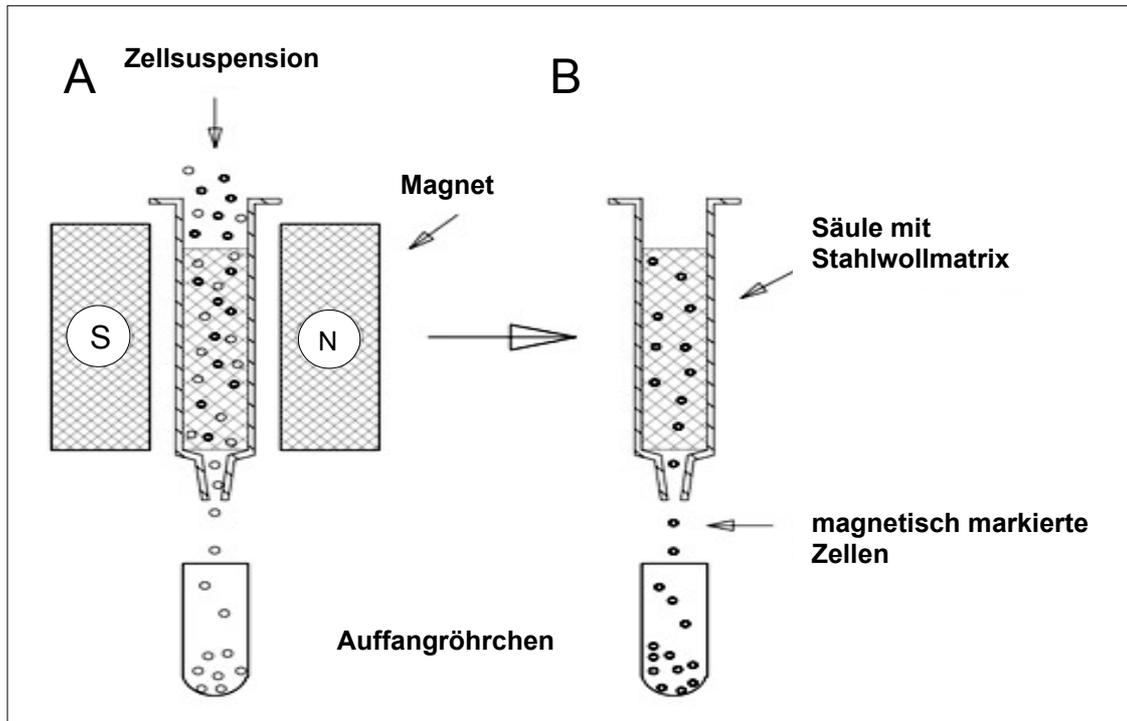


Abb. 3: Schematische Darstellung der immunmagnetischen Selektion mit Hilfe des MACS-Säulensystems

A zeigt eine heterogene Zellsuspension mit markierten und unmarkierten Zellen innerhalb einer Säule in einem magnetischen Feld. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Säule und werden in einem Röhrchen aufgefangen. Die markierten Zellen werden in der Säule gebunden. In B wird die Säule aus dem magnetischen Feld gelöst und die markierten Zellen in einem weiteren Schritt herausgelöst. [Modifizierte Abbildung nach Neukammer et al. 2011]

2.2.2.1 Isolierung CD133+ Zellen aus Stammzellapheresaten bzw. Knochenmark

Zur Isolation von CD133+ Zellen aus Stammzellapheresaten bzw. Knochenmark wurde das Mini Macs Säulen System zusammen mit dem CD133+ Vorläuferzellen Isolations Kit verwendet, siehe Kap.2.1.1.

Nachdem die Stammzellen aus den Materialproben gewonnen, siehe Kap. 2.2.1, in 1 ml MACS-Puffer gelöst und über einen Filter, siehe Kap. 2.1.7, gegeben wurden, folgte die Bestimmung der Zellzahl in der gelösten Zellprobe mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Die Zellprobe wurde anschließend bei 1400 rpm für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das entstandene Zellpellet wurde je 10^8 Zellen in 300µl MACS-Puffer gelöst und mit 100 µl FcR-Blocking-Reagenz sowie 100 µl CD133 MicroBeads vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei 4°C unter Lichtausschluss wurden die Proben bei 1400 rpm für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand abgetragen. Anschließend wurde die Zellprobe auf 2×10^8 Zellen in 1 ml MACS-Puffer eingestellt. Bevor die

gelöste Zellsuspension über das Säulensystem gegeben wurde, war die Säulen entsprechend ihrer Größe mit 500 µl MACS-Puffer bei MS Column System bzw. 3 ml MACS-Puffer bei LS Column System durchgespült worden.

Nachdem die Zellproben die Säulen durchlaufen haben, wurden sie ihrer Zellzahl entsprechend mit der gleichen Menge (500µl bzw. 3ml) MACS-Puffer dreimal durchgespült. Zum Herauslösen der in den Säulen gebundenen Zellen wurden die Säulen aus dem Magnetfeld genommen, mit Phosphat Buffered Saline (PBS) unter Verwendung des Stempels des dazugehörigen Column Systems kräftig durchgespült und in einem weiteren Gefäß aufgefangen. Für die weitere Verarbeitung siehe Kap. 2.2.5.2.

2.2.3 Zellkultur

Das Vermeiden von Kontaminationen der Zellpopulationen mit Pilzen, Bakterien, Viren und anderen Mikroorganismen setzt ein steriles Arbeiten voraus. Geräte, Medien und Puffer, die mit Zellen in Berührung kamen, wurden bei 2,2 bar (134°C) autoklaviert und gegebenenfalls steril filtriert. Die Aufarbeitung der Zelllinien und weitere Arbeitsschritte erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in Zellkulturplatten kultiviert.

2.2.3.1 Kultivierung von Stammzellen

Zur Kultivierung der wie unter Kap. 2.2.2.1 angereicherten Zellpopulation wurden Zellkulturplatten bei Raumtemperatur mit Fibronectin in einer Konzentration von 1 mg/ml beschichtet. Die angereicherten Zellpopulationen wurden in einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml in steril filtriertes Expansions-Medium, siehe Kap. 2.1.3, aufgenommen. Es folgten das Aussäen in Zellkulturplatten und die Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit einer Umverteilung der sich vermehrten Zellen auf die Vertiefungen der Zellkulturplatten. Die Kultivierung erfolgte für 8 bis 40 Tage.

2.2.3.2 Kryokonservierung und Passagierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die isolierten CD133+ Zellen in einer Konzentration von $2 - 4 \times 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium, siehe Kap. 2.1.3, aufgenommen. In Kryoboxen wurden die Zellen langsam auf -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert. Das Auftauen der Proben erfolgte bei Raumtemperatur. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension in Mediumlösung in einem Verhältnis von 1:10 resuspendiert, anschließend bei 1400 rpm für 10 Min. abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgetragen. Es folgte die erneute Resuspension des Zellpellets in Expansions-Medium, siehe Kap. 2.1.3.

2.2.4 Colony-Forming-Units-Assay

Zur Bestimmung des Differenzierungspotentials von pluripotenten Vorläuferzellen in hämatopoetische und endotheliale Zelllinien wurden koloniebildende Assays genutzt, die im englischsprachigen Raum als Colony Forming Units Assays bezeichnet und im Weiteren als CFU-Assays abgekürzt werden. Durch Stimulation von diversen Zytokinen, siehe Kap. 2.1.3, differenzieren so genannte Colony-Forming-Cells (CFC) im Medium des Assays zu Zellkolonien bzw. Zellansammlungen, den so genannten Colony Forming Units. An Hand der unterschiedlichen Morphologie der Zellkolonien bzw. Zellansammlungen lassen sich mit Hilfe eines einfachen Lichtmikroskopes die einzelnen Zelllinien der Hämatopoese bzw. der Vaskulogenese zuordnen und Rückschlüsse auf das Differenzierungspotential ziehen.

2.2.4.1 Colony Forming Units – Endothelial Cells (CFU-EC)

Nach der in Kap. 2.1.3 beschriebenen Aufarbeitung der Zellpopulationen erfolgte die Überführung der CD133+ Zellen in das Differenzierungsmedium. Für eine aussagekräftige Auswertung des Assays unter dem Lichtmikroskop ist eine

Konzentration von 5×10^4 Zellen/35mm² erforderlich. Dazu wurden 5×10^5 CD133+ Zellen in 1 ml IMDM Zellmedium, siehe Kap. 2.1.3, gelöst. Aus dieser Zellsuspension wurden 300 µl in jeweils 3 ml des CFU-EC-Medium, siehe Kap. 2.1.3, gelöst. Das beimpfte Medium wurde anschließend gleichmäßig auf drei Vertiefungen der 35 mm² Zellkulturplatten zu je 1,1 ml verteilt. Nach einem Zeitraum von 15 bzw. 21 Tagen bei 37°C, 5% CO₂-Anteil in der Luft und einer Luftfeuchtigkeit von über 95% erfolgte die morphologische Auswertung der Kolonien.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Durchflusszytometrie – FACScan: Fluorescence Activated Cell Analyser

Die Expression sowohl von zellulären Oberflächenantigenen als auch von intrazellulären Bestandteilen lässt sich durch die Immunfluoreszenz bestimmen. Im Durchflusszytometer, der im englischsprachigen Raum als Fluorescence Activated Cell Analyser beschrieben und im Folgenden mit FACScan abgekürzt wird, werden Zellen zum Nachweis von zellulären Oberflächenantigenen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und nach Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität analysiert. Über eine Stahlkapillare wird durch Überdruck die in einem Probenröhrchen enthaltene Zellsuspension in die Messküvette eingeführt. In der Messkammer kommt es durch die Beschleunigung der Trägerflüssigkeit zur Auftrennung der Zellaggregate und zur Hintereinanderreihung der Zellen. Die Fluoreszenzeigenschaft der an die Zellen gebundenen Antikörper erlaubt eine Differenzierung der einzelnen Zellen. Dazu wird das emittierte Fluoreszenzlicht mit unterschiedlichen Frequenzen in einem Wellenlängenbereich von 488nm bis 633nm durch Filtersysteme und Photomultiplier verstärkt und anschließend durch die CellQuest Software rechnerisch analysiert. Bei der zur Analyse benutzten Lichtquelle handelt es sich um einen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Die einzelnen Farbstoffe besitzen ein charakteristisches Emissionsspektrum und -maximum, sodass verschiedene Zellpopulationen mit Hilfe der emittierten Signale differenziert werden können. Um die frühen

Vorläuferzellen von anderen Bestandteilen abzugrenzen, wird eine so genannte dot-plot-grafik ermittelt. Die Grafik stellt die Parameter des Vorwärtsstreulichts (im Folgenden für engl. forward scatter mit FS abgekürzt) auf der Abszisse und die des Seitwärtsstreulichts (im Folgenden für engl. side scatter mit SS abgekürzt) auf der Ordinate dar. Das FS korreliert mit der Zellgröße und dem Brechungsindex, während das SS mit der Granularität der Zellen korreliert. Zellen und andere Partikel werden auf Grafiken als Punktwolken dargestellt. Die interessierende Zellpopulation wird in einem charakteristischen Wellenlängenbereich von FS/SS ermittelt. Die außerhalb dieses Wellenbereichs liegenden Punktwolken repräsentieren die den frühen Vorläuferzellen nicht zugehörigen Zellreihen. Für die weitere Berechnung der interessierenden Zellen wird die Ausgangszellpopulation in ein „gate“ (engl. für Schranke, Sperre) gesetzt und von anderen Zellen selektiert.

2.2.5.2 Oberflächenmarkierung

Für die durchflusszytometrische Messung wurden die aufgereinigten CD133+ Zellen, siehe Kap. 2.2.1, mit folgenden Antikörpern inkubiert: CD34-PC7, CD45-FITC bzw. vWF-FITC und CD133-PE. Das Pipettierschema ist der Tab. 1 zu entnehmen. Es folgte eine Inkubation unter Lichtausschluss für 20 Min. bei 4°C. Um die spezifische Fluoreszenz aufgrund der Antikörperbindung von der Eigenfluoreszenz der Zellen zu unterscheiden, wurde eine Isotypenkontrolle mitgeführt, d.h. im FACScan würde sich während der Messung mit der Isotypenkontrolle keine Antikörperfluoreszenz bzw. nur eine Eigenfluoreszenz der Zellen ermitteln lassen. Zur weiteren Aufarbeitung erfolgte die Behandlung der Zellen mit 1ml VersaLyse und einer erneuten Inkubation für 20 Min. unter Lichtausschluss.

Tab. 1: Schema zur Antikörpermarkierung der Zellen

Ansatz 1 Isotypenkontrolle	Ansatz 2 CD45	Ansatz 3 vWF
Volumen + 20µl IgG1-PC7 + 20µl IgG1-FITC + 25µl IgG1-PE	Volumen + 20µl CD34-PC7 + 20µl CD45-FITC + 25µl CD133-PE	Volumen + 20µl CD34-PC7 + 20µl vWF-FITC + 25µl CD133-PE
Alle Ansätze wurden gemischt und für 20 Min. inkubiert		
+ 1ml VeraLyse + 25µl Fixation	+ 1ml VeraLyse + 25µl Fixation	+ 1ml VeraLyse + 25µl Fixation
Alle Ansätze wurden gemischt und für 20 Min. inkubiert		

2.2.5.3 Messung der CD133 positiven Zellpopulationen

Für die Messung der in Kap. 2.2.1 aufgereinigten CD133+ Zellen verwendeten wir die in Tab. 1 zusammengefassten Antikörper. Mit Hilfe eines zuvor zugeschnittenen Messprotokolls wurden die Ergebnisse in Histogrammen, im Englischen als *plot* bezeichnet, festgehalten. In ihnen wurden die Parameter des Vorwärtsstreulichts (FS) gegen die des Seitwärtsstreulichts (SS) aufgetragen. Als Darstellungsform wählten wir Dichtehistogramme. In ihnen werden Punktwolken mit hohen Zellzahlen rot und mit abnehmender Zellzahl gelb, grün bzw. blau dargestellt. Im ersten Dichtehistogramm wurden alle gemessenen Zellen dargestellt und die interessierende Zellpopulation in einem Gate, siehe Kap. 2.2.5.1, erfasst. Die Zahl der mit einem oder mehreren Antikörpern markierten Zellen, siehe Kap. 2.2.5.2, wurde mit Hilfe von Gates in weiteren Dichtehistogrammen graphisch zusammengefasst. So konnte die relative Expression von bestimmten Antigenen der interessierenden Zellpopulation ermittelt werden. Eine vor jeder Messung durchgeführte Isotypenkontrolle markierte die Grenze zwischen negativen und positiven Populationen. Abb. 4 zeigt exemplarisch Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Messung in dem von uns verwendeten Messprotokoll.

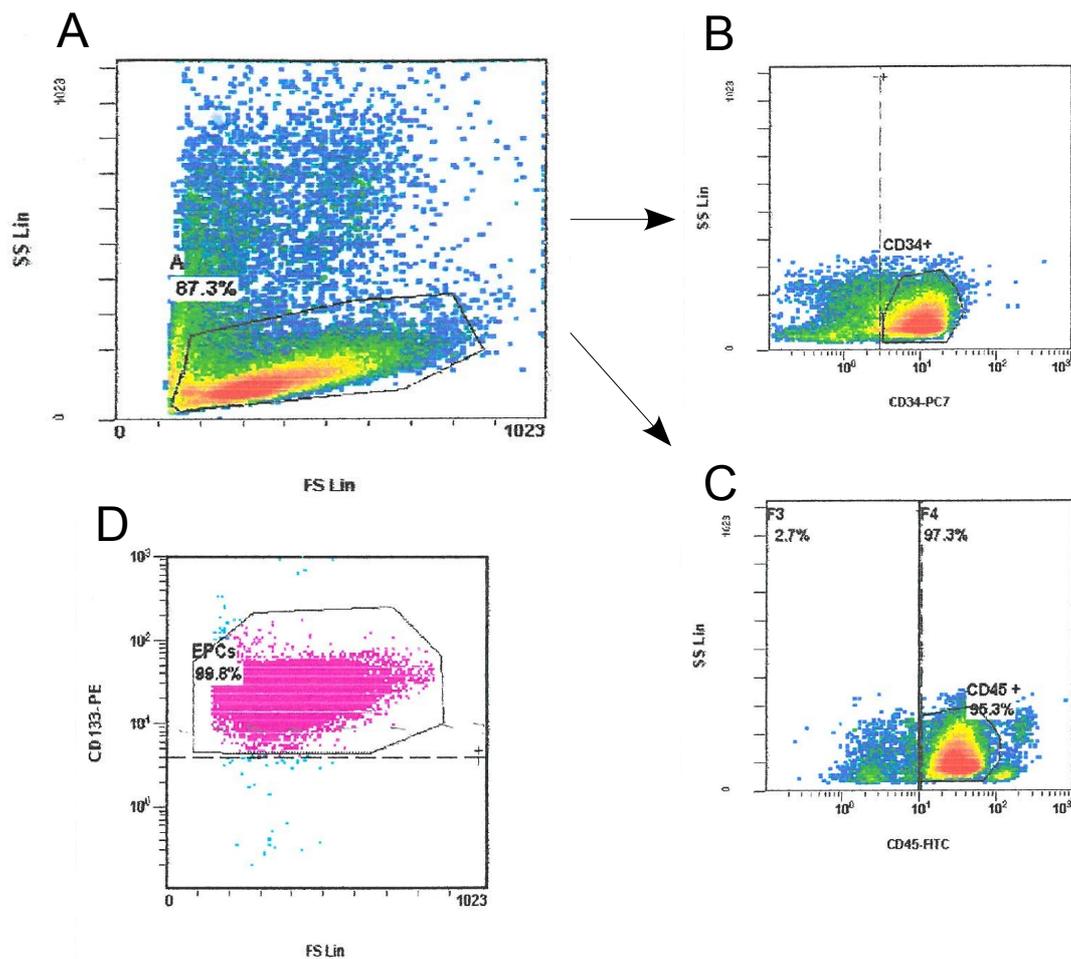


Abb. 4: Exemplarische Darstellung ausgewählter Histogramme des von uns verwendeten Messprotokolls

A stellt alle gemessenen Zellen im Dichtehistogramm mit den Parametern des Vorwärtsstreulichts (FS) auf der Abszisse und des Seitwärtsstreulichts (SS) auf der Ordinate dar und erfasst in dem mit A gekennzeichneten Gate die interessierende Zellpopulation. B zeigt die aus Gate A ermittelten CD34-PC7 positiven Zellen in einem gegen SS aufgetragenen Dichtehistogramm. C zeigt die aus Gate A ermittelten CD45-FITC positiven Zellen in einem gegen SS aufgetragenen Dichtehistogramm. D stellt die aus B und C ermittelten CD34+ und CD45+ Zellen im Histogramm FS gegen CD133-PE dar. Das mit EPCs gekennzeichnete Gate erfasst prozentual die Zellen an der interessierenden Zellpopulation, die alle drei Antigene exprimiert.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNS-Isolierung

Vor Isolierung von Ribonukleinsäure (RNS) ist es erforderlich, die interessierenden Zellen zu lysieren und die RNAsen zu inaktivieren.

Die interessierenden Zellen wurden mit 1,5 ml RNS-Clean homogenisiert und anschließend in ein neues Gefäß überführt. Es folgte die Gabe von 200 µl Chloroform und nach 5 Min. die Zentrifugation der Zellsuspension mit 14000 rpm für 15 Min. bei 4°C. Die flüssige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol für 15 Min. inkubiert. Erneut folgte eine Zentrifugation mit 14000 rpm für 15 Min. bei 4°C. Der Überstand wurde abgetragen und die sedimentierte RNS mit 70% Ethanol vermengt. Bei 4°C erfolgte die letzte Zentrifugation für 10 Min. mit 10000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert und die Eppendorfcups bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl RNase-freies, destilliertes Aqua aufgenommen. Die Bestimmung der RNS-Konzentration und der Ratio erfolgte photometrisch. Die Lagerung der RNS erfolgte bei -70°C.

2.2.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Absorptionsspektrum von doppel- und einzelsträngiger Nukleinsäure hat sein Maximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die optischen Dichte (OD) bei 260 nm, die Verdünnung und ein für die RNS spezifischer Multiplikationsfaktor ermöglichen die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration nach der Formel von Sambrook et al. 1989:

$$OD_{260}(\text{RNS}) \times 40 \times \text{Verdünnung} = c_{(\text{RNS})}[\mu\text{g/ml}]$$

Bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNS. Verunreinigungen von Nukleinsäuren stellen neben den Fällungsreagenzien vor allem zelluläre Proteine dar. Für Proteine liegt das Absorptionsspektrum bei 280 nm. Aus dem Quotienten der Extinktion bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm ergibt sich ein Parameter für die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Ein Quotient von 1,8 oder höher spricht für eine reine RNS.

2.2.6.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT-PCR) dient zur Herstellung von komplementärer

DNS (cDNS) und somit zum Nachweis spezifischer messenger RNS (mRNS). So wurde für die weitere Bearbeitung die Gesamt-RNS auf eine Konzentration von 1 µg RNS in 10 µl Volumen eingestellt:

RNS-Gehalt	RNS + H ₂ O in einem Gesamtvolumen von 10 µl
z.B. 837 ng/µl	1,20 µl + 8,80 µl H ₂ O
z.B. 248 ng/µl	4,03 µl + 5,97 µl H ₂ O

Die Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNS erforderte eine Erhöhung der Temperatur auf 65°C für 5 Min. Zur Erstrangsynthese der RNS folgte die Inkubation der RNS mit 10 µl RNS-PCR-Ansatz für 60 Min. bei 37°C.

RT-PCR-Ansatz:

4 µl	5x Puffer
2 µl	0,1M DTT
1 µl	RNS-Guard (10U/µl)
1 µl	4mM dNTP-Mix
1 µl	M-MLV-Transkriptase (50U/µl)
1 µl	pd(N6)-Primer

Eine Inaktivierung des Enzyms wurde durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C für 5 Min. erreicht. Anschließend wurde die cDNS bei -20°C gelagert.

2.2.6.4 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine effektive Methode zur selektiven Vervielfältigung von definierten Nukleinsäureabschnitten dar. Die PCR basiert auf drei aufeinanderfolgenden Schritten: die Denaturierung, das Annealing (engl. für Anlagerung des Primers) und die Elongation. Im Rahmen der Denaturierung wird die Template-DNS auf 93°C erhitzt und die beiden DNS-Stränge werden voneinander getrennt. Das anschließende Abkühlen auf 55°C führt zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNS,

dem Annealing. Die Taq-Polymerase dient der Verlängerung, der so genannten Elongation, des Primers, bis wieder eine doppelsträngige DNS vorliegt. Die optimale Enzymaktivität der Taq-Polymerase wird durch eine Erhöhung der Temperatur auf 72°C erreicht. Weil die Komplementierung der zu vervielfältigenden DNS an beiden Strängen stattfindet, verdoppelt sich nach einem Zyklus die Zahl der zu vervielfältigenden DNS-Stränge.

2.2.6.5 Primer Design

Die Länge der Primer lag zwischen 20 und 30 Basenpaaren. Für die Festlegung der Annealingtemperatur sollten die Schmelztemperaturen für die beiden Primer eines Primerpaares identisch sein oder nahe beieinander liegen. Berechnet wurde die Schmelztemperatur über die Basenlänge, die Konzentration und die Sequenz der Primer. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der Formel berechnet:

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

Die Annealingtemperatur sollte die optimale Synthesetemperatur der thermostabilen DNS nicht überschreiten. Die Länge der aus der PCR generierten DNS-Fragmente lag bei max. 700 Basenpaaren. Primer-Designs, die das Computerprogramm Primer 3 des Whitehead Institutes for Biomedical Research entworfen hatte, wurden überprüft und gegebenenfalls modifiziert.

2.2.6.6 Taqman-PCR

Die Echtzeit-PCR mit der Taqman-Technologie ist in der Molekularbiologie eine exakte Methode zur quantitativen Erfassung der Genexpression. Die Kombination der Amplifikation mit der zeitgleichen quantitativen Detektion ermöglicht die Durchführung der Messung in einem Reaktionsansatz. Die quantitative Detektion erfolgt über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Der Fluoreszenzfarbstoff wird in jedem vorhandenen und im Verlauf amplifizierten DNS-Strang interkaliert. Im Taqman wird die Intensität der emittierten Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist abhängig von der

Anfangskopienzahl der Zielsequenz. Eine hohe Anfangskopienzahl führt zu einem früheren Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die Emissionsintensität des Fluoreszenzfarbstoffes, die mit der Amplifikation der DNS-Stränge zunimmt, ermöglicht schließlich die quantitative Bestimmung der PCR-Produkte und damit des Zielgens. Zur Quantifizierung der Startmenge werden die Crossing Point Werte (Ct oder Cp) hinzugezogen. Ihr Wert entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die zum Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus notwendig sind. Dieses Fluoreszenzniveau repräsentiert folglich eine definierte Anzahl von PCR-Produkten. Zum Vergleich der Expression eines Gens in verschiedenen DNS-Proben wird eine Quantifizierungsstrategie angewandt. Bestimmt werden die Expression des zu untersuchenden Gens und die eines zweiten, ubiquitär homogen exprimierten Gens und zu einander ins Verhältnis gesetzt. Die so genannten Haushaltsgene (engl. „Housekeeping“, Abk. HKG) wie GAPDH und β -Aktin dienen zur Standardisierung verschiedener Proben. Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche Extraktionskoeffizienten und Fehler bei der RT-PCR innerhalb einer experimentellen Probe können zu einer Varianz in den Expressionsergebnissen des Zielgens führen. Die individuellen Probeneffekte betreffen Zielgen und HKG gleichermaßen. Die Verwendung von HKGs ermöglicht damit in den folgenden Berechnungen die Aufhebung der Expressionsunterschiede. Die mathematische Kalkulation der Expression erfolgt durch die dCt-Methoden aus den arithmetischen Formeln:

$$\text{Ratio}_{(\text{Runterregulation des Gens})} = 2^{*(\Delta\text{Ct}_1 - \Delta\text{Ct}_2)}$$

$$\text{Ratio}_{(\text{Hochregulation des Gens})} = 2^{*(\Delta\text{Ct}_2 - \Delta\text{Ct}_1)}$$

2.2.6.7 Taqman-PCR der RNS

Zur Durchführung der kompetitiven RT-PCR wurde ein Master-Mix verwendet. Der unter den Komponenten enthaltene Primer wurde nach der unter Kap. 2.2.6.5 beschriebenen Vorgehensweise hergestellt. Folgende Reagenzien wurde mit Hilfe einer Pipette in die Vertiefungen einer 96-Well Microtiterplatte überführt:

12,785 µl	H ₂ O
5,0 µl	Probe
2,5 µl	10x Puffer
1,750 µl	50mM MgCL ₂
1,0 µl	5mM dNTP's
0,5 µl	Forward Primer
0,5 µl	Reverse Primer
0,750 µl	SYBR Green
0,125 µl	Polymerase

Nach Verschluss der Platte mit einem optischen Deckel erfolgte die Analyse der Platte in ABI PRISM™ 7000 Detection System. Im Thermocycler durchliefen die Proben folgenden Zyklus:

Schritt	Temperatur	Zeit
RealTime-Reaktion	50 °C	2 Min.
Denaturierung/Aktivierung	95 °C	10 Min.
Denaturierung	95 °C	15 Sek.
Annealing/Elongation	60 °C	1 Min.

2.3 Biometrie

Alle erhobenen Daten wurden per Hand in das Computerprogramm OpenOffice.org Calc® eingetragen. Es folgte eine statistische Analyse mit Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Aufgrund des begrenzten Probenmaterials war es vereinzelt nicht möglich, eine entsprechende Zahl von Versuchsreihen durchzuführen, die eine weiterführende statistische Analyse ermöglichen würden. Hier erfolgte nur eine deskriptive Darstellungsform. Alle Darstellungsformen wurde in dem Bildbearbeitungsprogramm OpenOffice.org Draw® bearbeitet und gegebenenfalls mit zusätzlichen Inhalten ergänzt.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, das *in vitro* Verhalten von CD133+ SA-Zellen und CD133+ BM-Zellen zu untersuchen und einander gegenüberzustellen. Insbesondere die Expression vaskulogener bzw. angiogener Gene ermöglicht es, genauere Erkenntnisse über das Differenzierungspotential zu gewinnen. Dafür wurden Zellen aus den verschiedenen Probenmaterialien mit Hilfe des MACS-Systems isoliert und in eine Expansions- bzw. Differenzierungskultur überführt. So wurde z.B. zu verschiedenen Messzeitpunkten die absolute Zellzahl (siehe Kap. 3.1), das Differenzierungsverhalten morphologisch (siehe Kap. 3.2), die Antigenexpression im Durchflusszytometer (siehe Kap. 3.3) und die Genregulation mit dem Taqman-Verfahren (siehe Kap. 3.4) bestimmt.

3.1 Quantitative Auswertung der Zellzahl von SA- und BM-Zellen in Expansionskultur

In einem ersten Schritt wurde das Expansionsverhalten der CD133+ BM-Zellen und CD133+ SA-Zellen untersucht. Für die Ermittlung der Proliferation der CD133+ Zellpopulationen wurde eine Ausgangspopulation von $2,5 \times 10^5$ Zellen ermittelt und unter der in Kap. 2.2.3.1 beschriebenen Methode in Zellkultur gebracht. Das Wachstum wurde über 42 Tage beobachtet. Es wurden folgende Messzeitpunkte gewählt: Tag 0, Tag 6, Tag 12, Tag 18, Tag 21, Tag 35, Tag 42. In Abb.5 zeichnet sich der typische Verlauf einer Wachstumskurve ab. Beide Zellpopulationen durchlaufen initial eine Anlaufphase, in der ein langsames, lineares Wachstum beobachtet werden kann. Ab Tag 12 beginnt die exponentielle Phase. Beide Zellpopulationen weisen ein exponentielles Wachstum auf und erreichen an Tag 35 ihr Maximum. Zuletzt folgt die stationäre Phase, in der die Zellzahl stagniert und kein weiteres Wachstum beobachtet werden kann. Obwohl beide Zellpopulationen zu identischen Zeitpunkten die gleichen Wachstumsphasen durchlaufen, zeigen die CD133+ SA-Zellen eine höhere Wachstumsrate und erreichen eine doppelt so hohe Endzellzahl ($6,11 \times 10^6$) gegenüber CD133+ BM-Zellen ($3,02 \times 10^6$). So zeigen sowohl die exponentielle als auch die stationäre

Phase der CD133+ BM-Zellen ein wesentlich niedrigeres Niveau gegenüber CD133+ SA-Zellen. Im gesamten Verlauf konnte unter dem Lichtmikroskop kein Unterschied in der Morphologie beider Zellpopulationen beobachtet werden. Die Kultivierung der Zellen wurde nach 42 Tagen beendet.

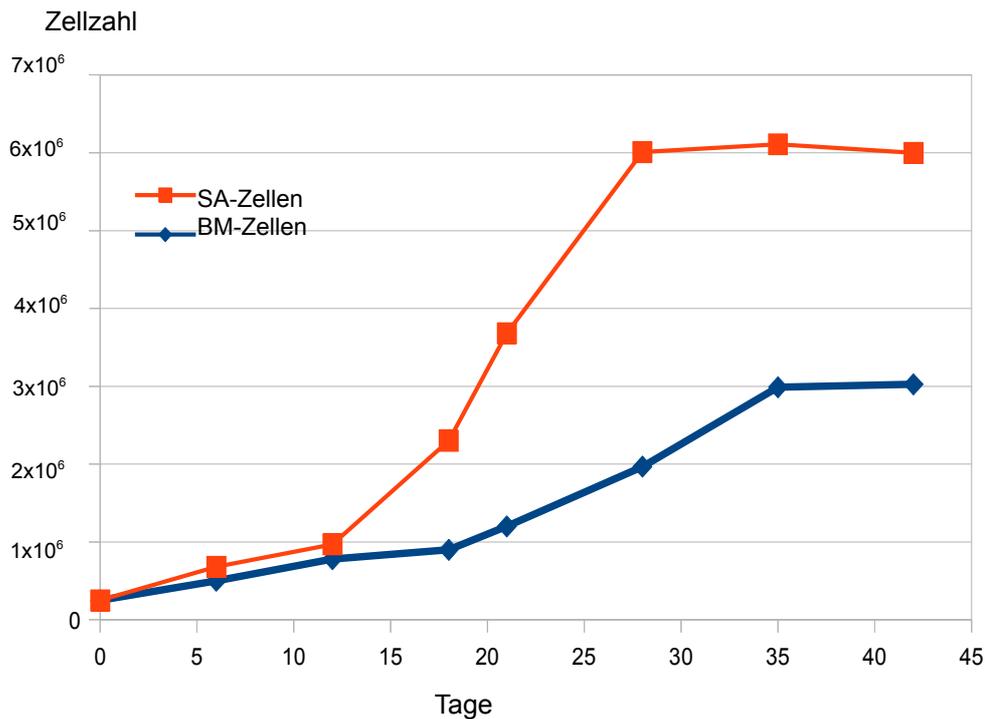


Abb. 5: Wachstumskurve von CD133+ BM-Zellen und CD133+ SA-Zellen

Der Wachstumsverlauf wurde über 42 Tage beobachtet. Die Ausgangszellzahl an Tag 0 beträgt für beide Zellpopulationen $2,5 \times 10^5$. Ab Tag 12 kann ein exponentielles Wachstum beider Zellpopulationen beobachtet werden. Ab Tag 35 eine Stagnation des Wachstums. Die Endzellzahl beträgt für CD133+ BM-Zellen $3,02 \times 10^6$ und für CD133+ SA-Zellen $6,0 \times 10^6$.

3.2 Morphologische Auswertung der beiden Zellpopulationen in Differenzierungskultur

Nach der unter Kap. 2.2.3.1 beschriebenen Methode wurden jeweils 3 Proben der angereicherten CD133+ BM- bzw. SA-Zellpopulationen in Differenzierungskultur gesetzt. Nach 15 Tagen erfolgte im Lichtmikroskop die morphologische Auswertung des Differenzierungspotentials der beiden Zellpopulationen. Die Auswertung der ausdifferenzierten Vorläuferkolonien erfolgte unter Berücksichtigung der Referenzbilder für hämatopoetische Vorläuferkolonien der Firma Cambrex Bio Science.

Aus beiden Zellpopulationen differenzierten Vorläufer-Kolonien der hämatopoetischen Reihe. In Abb.6 A+B werden Kolonien in Form von Zellkonglomeraten dargestellt. Die kleinen Zellen fügen sich zu eng einander liegenden, scharf begrenzten Zellhaufen. Diese Kolonien entsprechen Vorläufer-Kolonien der Erythropoese. In den von uns durchgeführten Versuchsreihen wurden die als Burst Forming Units (BFU-E) bezeichneten Kolonien sowohl von CD133+ SA-Zellen als auch CD133+ BM-Zellen gebildet. In Abb.6 C+D bilden beide Zellpopulationen Vorläufer-Kolonien der Granulopoese. In der Literatur als Colony Forming Units - Granulocyten Macrophagen (CFU-GM) definiert. Die Kolonien sind durch eine radiäre Anordnung charakterisiert. In ihr fügen sich größere Zellen in Form von Pflastersteinen zu einem Zellhaufen. Um den Zellhaufen verteilen sich radiär vereinzelt Satellitenzellen. Abb.6 E+F zeigen Colony Forming Units-Granulocyten, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte (CFU-GEMM). Es handelt sich um Vorläufer-Kolonien aller drei Zellreihen der Hämatopoese (Granulopoese, Erythropoese, Thrombopoese). Gleich den Kolonien der CFU-GM weisen die Zellhaufen eine radiäre Anordnung mit peripheren Satellitenzellen auf. Im Kern fügen sich sowohl kleinere als auch größere Zellen dichter aneinander als in CFU-GM. In unseren Versuchsreihen bildeten beide Zellreihen CFU-GEMM.

Es konnten keine CFU-Endothelial Progenitor Cells (CFU-EPC) nachgewiesen werden. In der Literatur werden diese Vorläufer-Kolonien als Zellhaufen in Form von Pflastersteinen mit dicht aneinander gefügtem Kern definiert. In der Peripherie finden sich im Gegensatz zu CFU-GM bzw. CFU-GEMM spindelförmige Satellitenzellen, die sich radiär zum Kern anordnen [Hill et al. 2003].

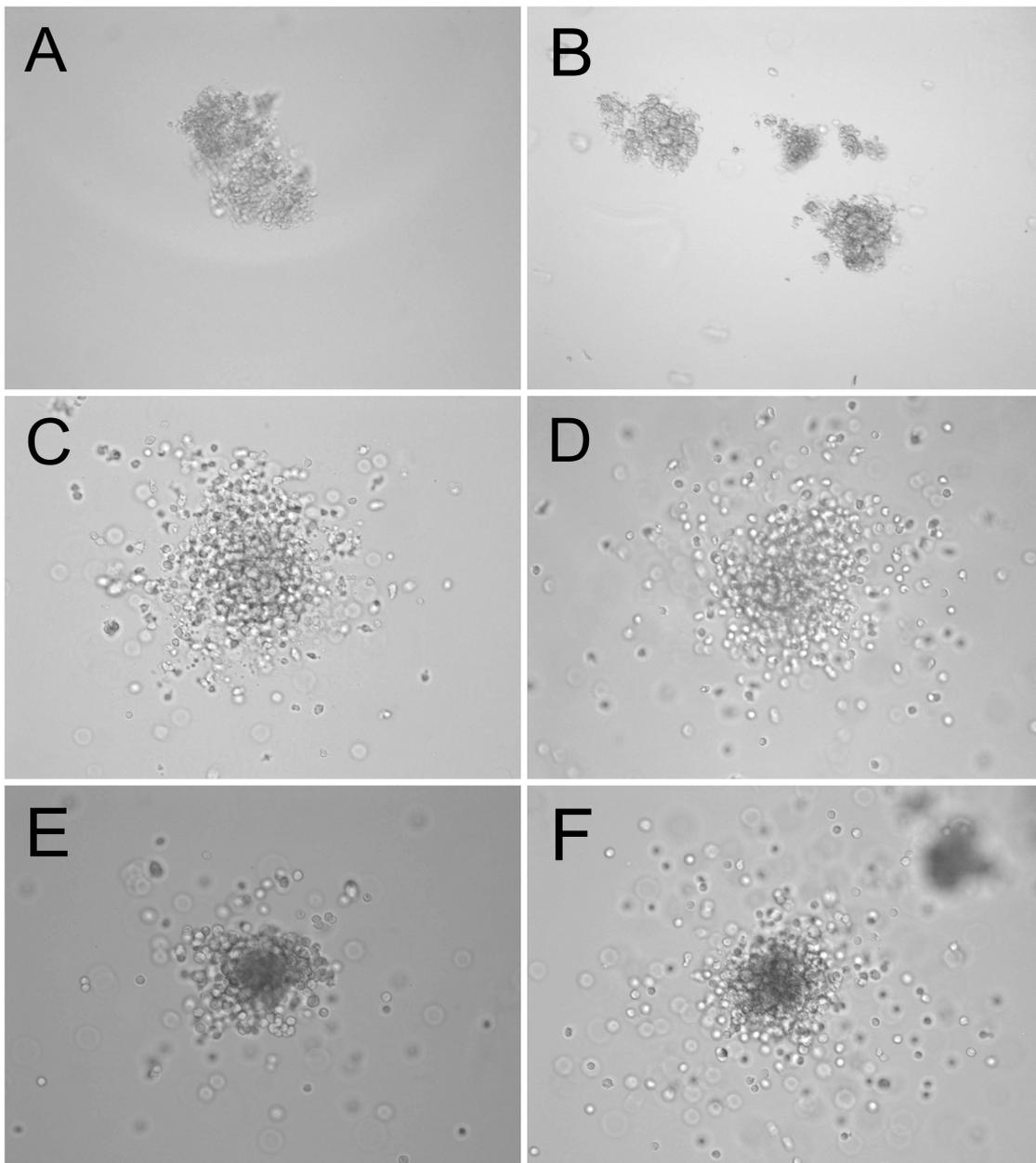


Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Vorläufer-Zellkolonien hämatopoetischer Zellreihen

Nach 15 Tagen in Differenzierungskultur zeigten sich sowohl bei den Zellpräparaten aus dem Knochenmark (Abb.6 A,C,E) als auch aus Stammzellapheresaten (Abb.6 B,D,F) BFU-E (Abb.6 A+B), CFU-GM (Abb.6 C+D) und CFU GEMM (Abb.6 E+F). Die Aufnahmen erfolgten mit einer Vergrößerung von 1:400. Zwischen BM-Zellen und SA-Zellen konnten keine Unterschiede in der Differenzierung nachgewiesen werden.

3.3 Durchflusszytometrischer Nachweis von EPC-spezifischen Oberflächenantigenen im zeitlichen Verlauf

In einem weiteren Schritt wurde die Expression von Oberflächenantigenen in der Zellkultur im zeitlichen Verlauf untersucht. Oberflächenantigene werden von Körperzellen exprimiert und weisen unterschiedliche Funktionen auf. Die Expression bestimmter Antigene ermöglicht es, die Zugehörigkeit zu einzelnen Zelllinien zu bestimmen. Mit Hilfe des FACScans wurde die Expression von Oberflächenantigenen der CD133+ SA-Zellen und CD133+ BM-Zellen untersucht. Ergänzend wurde die Antigenexpression beider Zellpopulationen einander gegenübergestellt. Die Oberflächenantigene, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Übersicht der für die FACS-Analyse verwendeten Antigene

Antigen	Eigenschaft	Biologische Funktion	Literatur-Referenz
CD34	Stammzellmarker	- Adhäsion - exprimiert auf hämatopoetischen Vorläuferzellen (auf Endothel von Kapillaren)	Kwon et al. 2010 Fina et al. 1990 Civin et al. 1984
CD133 (Prominin-1)	Stammzellmarker	- exprimiert auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, auf endothelialen Vorläuferzellen, auf Vorläuferzellen des Zentralnervensystems	Florek et al. 2005 Bidlingmaier et al. 2008 Peichev et al. 2000
CD45	Allgemeiner Leukozytenmarker	- exprimiert auf Zellen der hämatopoetischen Reihe (Erythropoese ausgeschlossen)	Basadonna et al. 1995 Dalchau et al. 1980
vWF	Adhäsionsmolekül	- wichtiges Plasmaprotein der Hämostase - synthetisiert durch Endothelzellen und Megakaryozyten - bindet an Matrixmoleküle des Subendothels und an das Glykoprotein I/IX von Thrombozyten.	De Luca et al. 2000 Kroll et al. 1996 Mohri et al. 1988

3.3.1 Antigenexpression von CD133-positiven BM- bzw. SA-Zellen an Tag 0 und 14

In den Abb.7 A,B,C,D wird die relative Antigenexpression im zeitlichen Verlauf von Zellen dargestellt, die aus Knochenmark bzw. Stammzellapheresat gewonnen und nach CD133 aufgereinigt wurden. Als Messzeitpunkte wurden der Tag der Aufreinigung (Tag 0) und 14 Tage nach Wachstum im Expansionsmedium (Tag 14) gewählt. Die Messung der Expression des Oberflächenantigens CD133 zum Zeitpunkt Tag 0 entspricht somit gleichzeitig der Reinheit der in Kap. 2.2.1 beschriebenen Aufarbeitung. Zur Bestimmung des relativen Anteils wurde die in Kap. 2.2.5.3 beschriebene Messung durchgeführt und anschließend der Mittelwert mit der Standardabweichung errechnet. Das Balkendiagramm stellt anteilig die Antigenexpression der Zellen sowohl zur Gesamtzellzahl als auch zueinander dar. Abb.7 A gibt Messungen mit BM-Zellen aus n=3 und den Oberflächenantigenen CD133, CD45 und CD34 wieder. Am Tag 0 weisen 55,83% der Zellen das Oberflächenantigen CD133 auf. Von den CD133+ Zellen weisen 97% den hämatopoetischen Marker CD45 auf. Damit liegt der Anteil an CD133+ und CD45+ Zellen bei 54,42%. 83% der CD133+ und CD45+ Zellen weisen zusätzlich den Stammzellmarker CD34 auf und machen 45,19% der Gesamtzellzahl aus. Nach 14 Tagen in der Expansionskultur ist der Anteil mit 59,64% an CD133+ und CD45+ Zellen fast gleich geblieben. Lediglich 5% der CD133+ und CD45+ Zellen weisen noch das Oberflächenantigen CD34 auf. Damit fällt der Anteil der CD133+, CD45+ und CD34+ Zellen an Tag 14 auf 3,24%.

Für die in Abb.7 B dargestellten Messungen an BM-Zellen wurde der Antikörper Anti-CD45 durch den Antikörper Anti-vWF ersetzt. Aufgrund des begrenzten Probenmaterials konnten nur zwei Versuchsreihen durchgeführt werden, sodass auf eine Berechnung der Standardabweichung verzichtet wurde. 99% der CD133+ Zellen weisen an Tag 0 ebenfalls den endothelialen Marker vWF auf. Von diesen CD133+/vWF+ Zellen weisen 82% das Oberflächenantigen CD34 auf. Dieser Anteil fällt ähnlich wie in Abb.7 A auf 3% ab. Damit weisen nach 14 Tagen in Expansionskultur nur noch 2,23% der Gesamtzellpopulation die Oberflächenantigene CD133, vWF und CD34 auf.

In Abb.7 C sind Messungen mit SA-Zellen aus n=5 und den Oberflächenantigenen CD133, CD45 und CD34 dargestellt. Der Anteil der CD133+ Zellen an der Gesamtzellzahl liegt zu Beginn bei 78,9 %. Von den CD133+ Zellen weisen 98%

das Antigen CD45 auf und 77% zusätzlich das Antigen CD34. Abb.7 D zeigt Messungen aus n=3, in denen Anti-CD45 gegen Anti-vWF ersetzt wurde. Hier ist konkordant zu Abb.7 B nach 14 Tagen ein deutlicher Abfall des Anteils der CD133+, vWF+ und CD34+ Zellen von initial 65,94% auf 2,51% hervorzuheben.

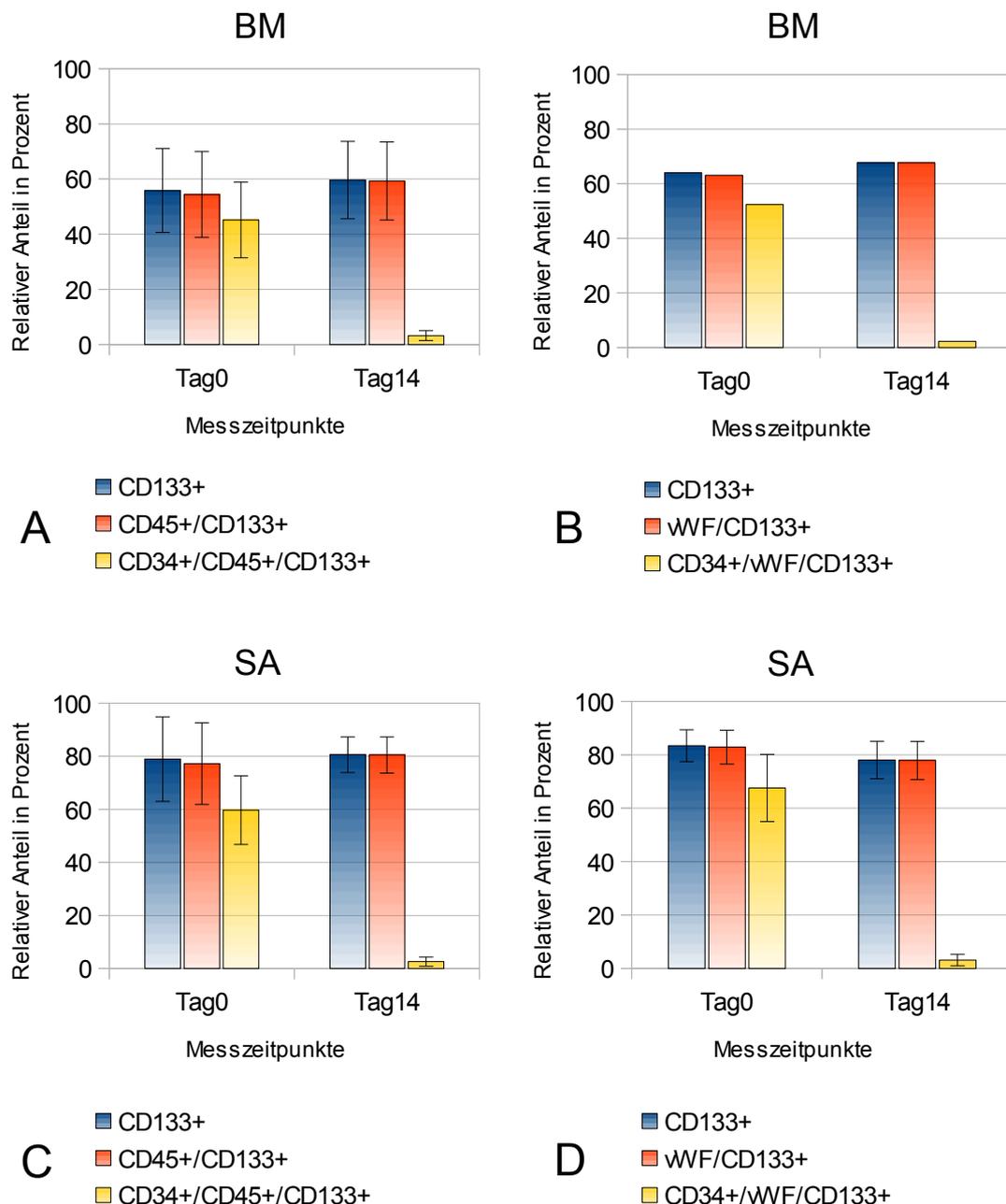


Abb. 7 A,B,C,D: Antigenexpression von CD133+ BM-Zellen bzw. SA-Zellen zu beiden Messzeitpunkten Tag 0 und 14

A zeigt den relativen Anteil der Expression der Oberflächenantigene CD133, CD45 und CD34 für BM-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl an Tag 0 und Tag 14. Der relative Anteil an BM-Zellen, die alle drei Oberflächenmarker koexprimieren, nimmt innerhalb des Messzeitraums deutlich ab, während die Expression von CD133 bzw. die Koexpression von CD133 und CD45 gleich bleibt. B zeigt die relativen Anteile für die Oberflächenmarker CD133, vWF und CD34. Hier kann das gleiche Expressionsverhalten wie in A beobachtet werden. C+D zeigen nahezu das gleiche Expressionsverhalten von A und B bei SA-Zellen.

3.3.2.1 Gegenüberstellung der Antigenexpression von CD133+ BM-Zellen und CD133+ SA-Zellen an Tag 0 und 14

In Abb.8 A+B werden die Messungen zwischen CD133+Zellen, die aus Knochenmark bzw. Stammzellapheresat isoliert wurden, einander gegenübergestellt. Dafür wurde die gleiche Darstellungsform wie in Abb.7 gewählt. In Abb.8 A weisen SA-Zellen mit 78,9% gegenüber BM-Zellen mit 55,83% einen deutlich höheren Anteil an CD133+ Zellen auf. Bei beiden Zellpopulationen exprimieren 98% der CD133+ Zellen den hämatopoetischen Marker CD45 bzw. zwischen 77% und 82% der CD133+/CD45+ Zellen den Stammzellmarker CD34. Obwohl der Anteil an CD133+ bzw. CD133+/CD45+ Zellen nach 14 Tagen in Expansionsmedium fast gleich bleibt, sinkt der Anteil an CD133+/CD45+ Zellen, die das Oberflächenantigen CD34 exprimieren, auf weniger als 3%. In Abb.8 B zeigt sich ein nahezu gleiches Verhalten der beiden Zellpopulation, die neben CD133 und CD34, den endothelialen Marker vWF exprimieren. Insgesamt lässt sich eine tendenziell niedrigere Expression hämatopoetischer und endothelialer Antigene bei BM-Zellen gegenüber SA-Zellen finden.

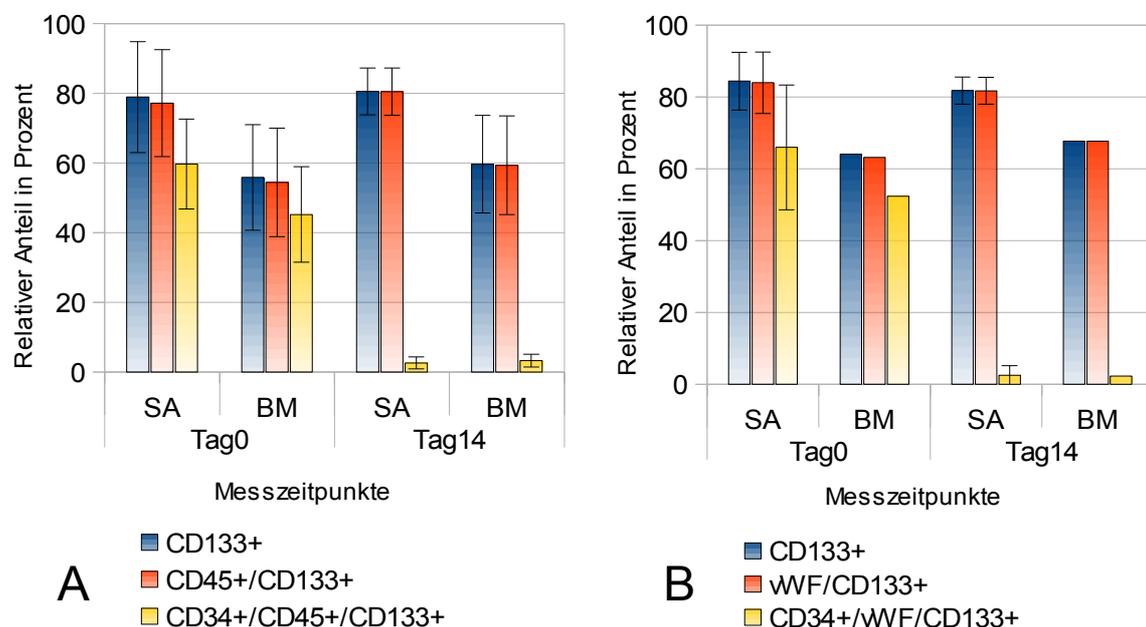


Abb. 8 A,B: Antigenexpression von CD133+ BM- bzw. SA- Zellen einander gegenübergestellt an Tag 0 und 14

A zeigt den relativen Anteil der Expression der Oberflächenantigene CD133, CD45 und CD34 für BM-Zellen und für SA -Zellen zu den beiden Messzeitpunkten Tag 0 und Tag 14. Der relative Anteil an BM-Zellen bzw. SA-Zellen, die alle drei Oberflächenmarker koexprimieren, nimmt innerhalb des Messzeitraums bei beiden Zellpopulationen kontinuierlich ab, während die Expression von CD133 bzw. die Koexpression von CD133 und CD45 gleich bleibt. Zusätzlich zeigt sich ein höheres Expressions- bzw. Koexpressionsniveau aller drei Oberflächenantigen bei SA-Zellen gegenüber BM-Zellen an Tag 0 und Tag 14. B zeigt die relativen Anteile für die Oberflächenmarker CD133, vWF und CD34. Hier kann das gleiche Expressionsverhalten wie in A beobachtet werden.

3.3.3 Antigenexpression von CD133+ BM- und SA-Zellen an Tag 0, 2, 4 und 6

In den Abb.9 A,B,C,D wird ebenfalls wie in Abb.7 + 8 die relative Antigenexpression im zeitlichen Verlauf von BM-Zellen und SA-Zellen, die nach CD133 aufgereinigt wurden, dargestellt. Um das Verhalten der CD133+ Zellen in Expansionskultur differenzierter zu analysieren, wurden in weiteren Versuchsreihen die Messintervalle verkürzt und als Messzeitpunkte Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6 gewählt. Aufgrund des begrenzten Probenmaterials und der intensivierten Messungen wurde der Messzeitraum auf 6 Tage nach Überführung in die Zellkultur reduziert.

Abb.9 A gibt Messungen von aufgereinigten BM-Zellen aus n=5 und der Expression der Oberflächenantigene CD133, CD45 und CD34 wieder. Zu allen Messzeitpunkten ist ein nahezu gleichbleibender Anteil (55%) von CD133 exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl zu beobachten. Die Daten deuten daraufhin, dass 5% aller CD133+ Zellen kein CD45 exprimieren. Der Anteil der CD34+/CD45+/CD133+ Zellen an der Gesamtzellzahl bleibt an Tag 2 gleich und nimmt ab Tag 4 kontinuierlich von initial 38,61% auf 9,38% ab. Exprimierten an Tag 0 noch 71% aller CD133+/CD45+ das Antigen CD34, gilt dies nur noch für 18% aller CD133+/CD45+ Zellen an Tag 6. Für die in Abb.9 B dargestellten Messungen aus n=5 mit BM-Zellen wurde der Antikörper Anti-CD45 gegen den Antikörper Anti-vWF ersetzt. Hier exprimieren nahezu 100% aller CD133+ Zellen den endothelialen Marker vWF. Die übrige Antigenexpression zeigt sich nahezu identisch.

In Abb.9 C sind Messungen mit SA-Zellen aus n=6 und den Oberflächenantigenen CD133, CD45 und CD34 dargestellt. Der Anteil der CD133+ bzw. CD133+/CD45+ Zellen an der Gesamtzellzahl fällt von 81,15% an Tag 0 auf 70,25% an Tag 6 ab. Weiterhin ist zu beobachten, dass der relative Anteil an CD34+/CD45+/ CD133+ Zellen an der Gesamtzellzahl zu allen Messzeitpunkten kontinuierlich von initial 61,61% auf 21,25% abnimmt. Zu Anfang der Messreihe exprimieren 76% aller CD133+/CD45+ Zellen das Oberflächenantigen CD34, am Ende nur noch 30%. Weil an Tag 2 der relative Anteil der CD34+/CD45+/C133+ SA-Zellen an der Gesamtzellzahl langsamer als der relative Anteil der CD133+ SA-Zellen an der Gesamtzellzahl abnimmt, nimmt der relative Anteil der CD133+/CD45+Zellen, die zusätzlich das Antigen CD34 exprimieren, an Tag 2 im Vergleich zu Tag 0 sogar

zu. So exprimieren an Tag 0 76% aller CD133+/CD45+ Zellen den Stammzellmarker CD34. An Tag 2 steigt dieser Anteil auf bis zu 86%. Abb.9 D zeigt Messungen aus n=5, in denen das Anti-CD45 gegen Anti-vWF ersetzt wurde. Die Antigenexpression von vWF verhält sich konkordant zur Abb.9 B.

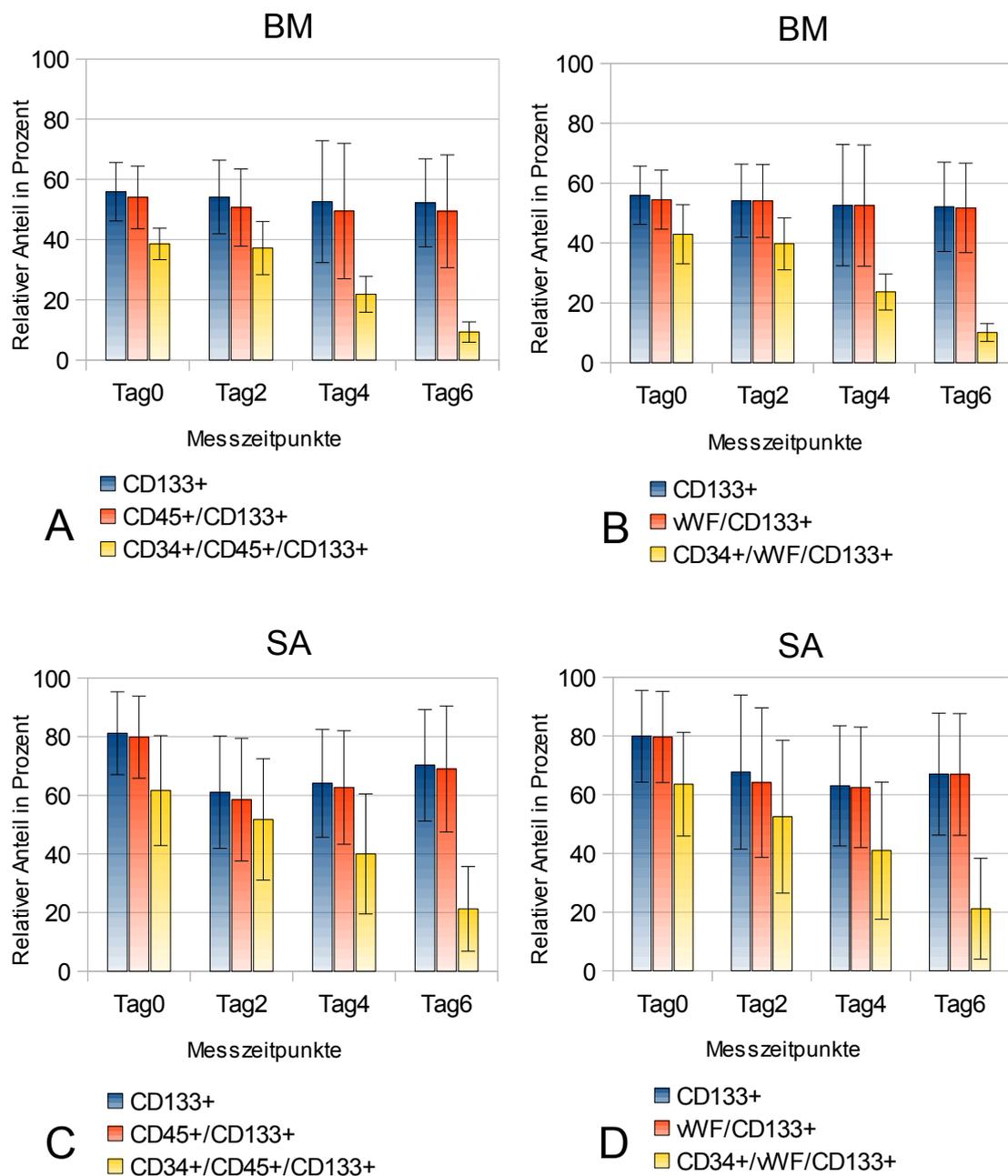


Abb. 9 A,B,C,D: Antigenexpression von CD133+ BM- bzw. SA-Zellen zu den Messzeitpunkten Tag 0, 2, 4 und 6

A zeigt den relativen Anteil der Expression der Oberflächenantigene CD133, CD45 und CD34 für BM-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl an Tag 0, Tag 2, Tag 4 und Tag 6. Der relative Anteil an BM-Zellen, die alle drei Oberflächenmarker koexpressieren, nimmt innerhalb des Messzeitraums kontinuierlich ab, während die Expression von CD133 bzw. die Koexpression von CD133 und CD45 gleich bleibt. B zeigt die relativen Anteile für die Oberflächenmarker CD133, vWF und CD34. Hier kann das gleiche Expressionsverhalten wie in A beobachtet werden. C+D zeigen das gleiche Expressionsverhalten von A und B bei SA-Zellen.

3.3.4 Gegenüberstellung der Antigenexpression von CD133+ BM-Zellen und CD133+ SA-Zellen an Tag 0, 2, 4 und 6

In Abb.10 A+B werden die Messungen zwischen den beiden Zellpopulationen miteinander verglichen. Dafür wurde die gleiche Darstellungsform wie in Abb.7 gewählt. Abb.10 A zeigt, dass der Anteil der CD133+ SA-Zellen mit über 80% deutlich über dem Anteil der BM-Zellen (55%) liegt. Zwar nimmt der Anteil der CD34+/CD45+/CD133+ Zellen an der Gesamtzellzahl bei den SA-Zellen im Gegensatz zu BM-Zellen schon ab Tag 2 ab. Der relative Anteil der CD133+ SA-Zellen bzw. der CD133+/CD45+-Zellen, die zusätzlich den Stammzellmarker CD34 exprimieren, nimmt jedoch im Vergleich zu Tag 0 zu. 70% der CD133+ BM-Zellen bzw. CD133+/CD45+ BM-Zellen exprimieren sowohl an Tag 0 als auch an Tag 2 das Oberflächenantigen CD34. In Abb.10 B zeigt sich ein nahezu identisches Verhalten der beiden Zellpopulationen, die neben CD133 und CD34 den endothelialen Marker vWF exprimieren.

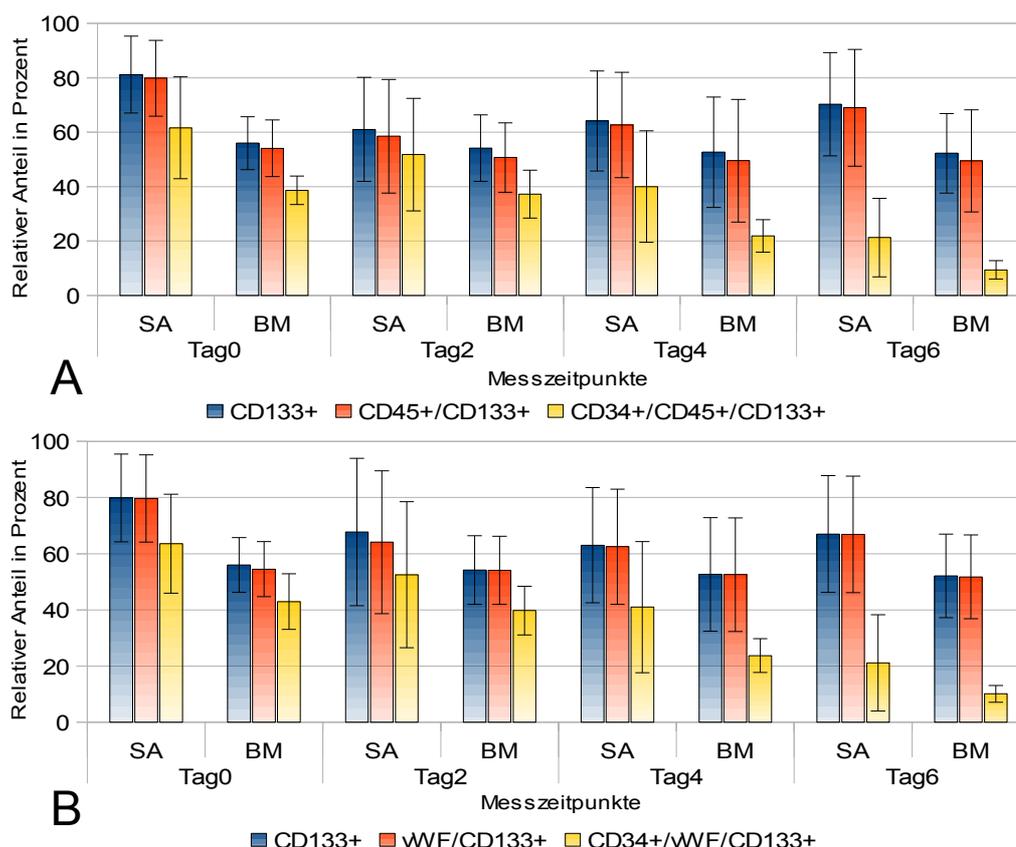


Abb. 10 A,B: Antigenexpression von CD133+ BM- bzw. SA-Zellen einander gegenübergestellt an Tag 0, 2, 4 und 6

Der relative Anteil an BM-Zellen bzw. SA-Zellen, die alle drei Oberflächenmarker koexprimieren, nimmt innerhalb des Messzeitraums bei beiden Zellpopulationen kontinuierlich ab, während die Expression von CD133 bzw. die Koexpression von CD133 und CD45 gleich bleibt. Zusätzlich zeigt sich zu allen Messzeitpunkten ein höheres Expressions- bzw. Koexpressionsniveau aller drei Oberflächenantigenen bei SA-Zellen gegenüber BM-Zellen. B zeigt das gleiche Expressionsverhalten für die Oberflächenmarker CD133, vWF und CD34.

3.4 Nachweis wichtiger Transkriptionsfaktoren

3.4.1 Untersuchung der Expression spezifischer Gene der Vaskulogenese und Hämatopoese im zeitlichen Verlauf mit Hilfe der Taqman-PCR

Für den Nachweis von Transkriptionsfaktoren bzw. deren Gene, die spezifisch in der Vaskulogenese bzw. Hämatopoese exprimiert werden, wurde die Taqman-PCR eingesetzt. In der unter Kap. 2.2.6 beschriebenen Vorgehensweise wurde die Hoch- bzw. Runterregulation bestimmter Transkriptionsfaktoren analysiert. Tab. 3 zeigt eine Übersicht der für die Taqman-PCR verwendeten Transkriptionsfaktoren bzw. Gene.

Tab. 3: Übersicht der in der Taqman untersuchten Transkriptionsfaktoren bzw. Gene

Gen	Eigenschaft	Biologische Relevanz	Literatur-Referenz
PECAM1 (CD 31)	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
Fik1 (KDR, VEGF-R2)	Vascular Endothelial Growth Receptor 2	- Marker für mesenchymale und vaskuläre Vorläufer, später spezifisch für Endothelzellen -verantwortlich für die Entwicklung von Blutgefäßen - wichtige Rolle in der Hämostase	Chung et al. 2002, Kabrun et al. 1997, Vittet et al. 1996, Shalaby et al. 1995
EGR1 (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	Fahmy et al. 2003, Khachigian et al. 2004

HOXD3	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
Prominin1 (CD133)	Stammzellmarker	- exprimiert auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, auf endothelialen Vorläuferzellen, auf Vorläuferzellen des Zentralnervensystems	Florek et al. 2005 Bidlingmaier et al. 2008 Peichev et al. 2000 Yin et al. 1997
vWF	Adhäsionsmolekül	- wichtiges Plasmaprotein der Hämostase - synthetisiert durch Endothelzellen und Megakaryozyten - bindet an Matrixmoleküle des Subendothels und an das Glykoprotein I/IX von Thrombozyten.	De Luca et al. 2000 Kroll et al. 1996 Ruggeri and Zimmermann 1988
CD45	Allgemeiner Leukozytenmarker	- exprimiert auf Zellen der hämatopoetischen Reihe (Erythropoese ausgeschlossen)	Poppema et al. 1995 Dalchau et al. 1980
FLT1 (VEGF-R1)	Vascular Endothelial Growth Receptor 1	- Marker für mesenchymale und vaskuläre Vorläufer, später spezifisch für Endothelzellen -verantwortlich für die embryonale Entwicklung von Blutgefäßen	Iwaguro et al. 2002 Vajkoczy et al. 1999

Als Housekeepinggen wurde das β -Aktin gewählt. Die Ratio wurde nach der in Kap. 2.2.6.6 beschriebenen Formel berechnet. Die Beurteilung der Expression erfolgte über einen berechneten Mittelwert aus $n=3$. Der Mittelwert wurde entsprechend einer frei gewählten Einordnung einer errechneten Ratio zugeordnet. Die Regulation der Expression eines Transkriptionsfaktors bzw. dessen Gens wird über die in Tab. 4 gewählte Zuordnung ausgewertet. Auf eine Darstellung der Standardabweichung in den Graphen wurde verzichtet. Dies ermöglichte eine übersichtlichere Darstellungsform. Der Vollständigkeit halber wurden die errechneten Werte mit Mittelwerten und Standardabweichungen

tabellarisch im Anhang B festgehalten. Eine Hochregulation der Genexpression wird mit einem positiven Wert und die Runterregulation mit einem negativen Wert ausgedrückt.

Tab. 4: Einordnung der errechneten Ratio zum frei gewählten Expressionswert

Wert der Ratio des Gens	Frei gewählte Werte für die Expression
2,01 – 4,0	0,5
4,01 – 6,0	1,0
6,01 – 8,0	1,5
8,01 – 10,0	2,0
10,01 – 12,0	2,5
12,01 – 14,0	3,0
14,01 – 16,0	3,5
16,01 – 18,0	4,0
18,01 – 20,0	4,5
≥20,01	5,0

3.4.1.1 Maximale Hochregulation von EGR durch beide Zellpopulationen

In Abb.11 zeigt sich, dass zu allen Messzeitpunkten EGR sowohl bei aufgearbeiteten SA-Zellen als auch bei BM-Zellen massiv hoch reguliert wird. Dies gilt für die von uns frei gewählten und ab einer Ratio von über 20 limitierten Werte. SA-Zellen und BM-Zellen zeigen keinen Unterschied in der Expressionsregulation von EGR.

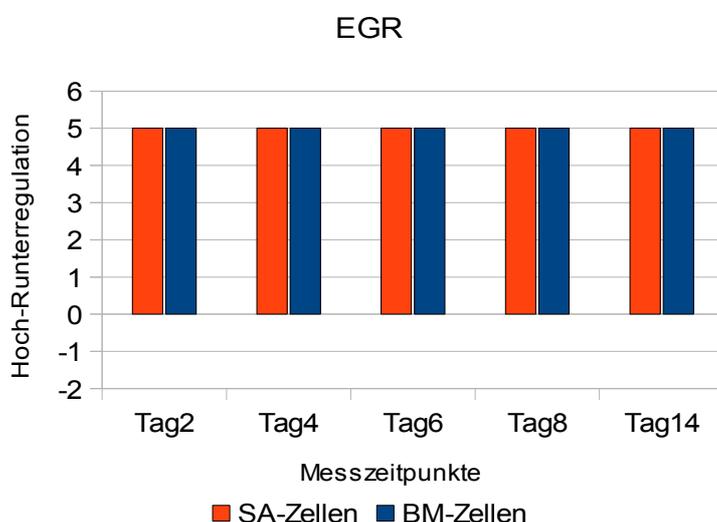


Abb. 11: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für EGR

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. Zu allen Messzeitpunkten wird EGR sowohl in SA-Zellen als auch in BM-Zellen maximal hoch reguliert.

3.4.1.2 Leichte Runterregulation von *Pecam* in beiden Zellpopulationen

Außer an Tag 2, wo eine leichte Hochregulation von *Pecam* bei SA-Zellen beobachtet werden kann, weisen die SA-Zellen und BM-Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Hochregulation des Gens auf. Das Gen erfährt an Tag 14 sowohl durch SA-Zellen als auch durch BM-Zellen eine leichte Runterregulation, die sich in ihrer Intensität gleichen. Somit lassen sich keine wesentlichen Unterschiede in der Expression von *Pecam* zwischen SA- und BM-Zellen in Abb. 12 nachweisen.

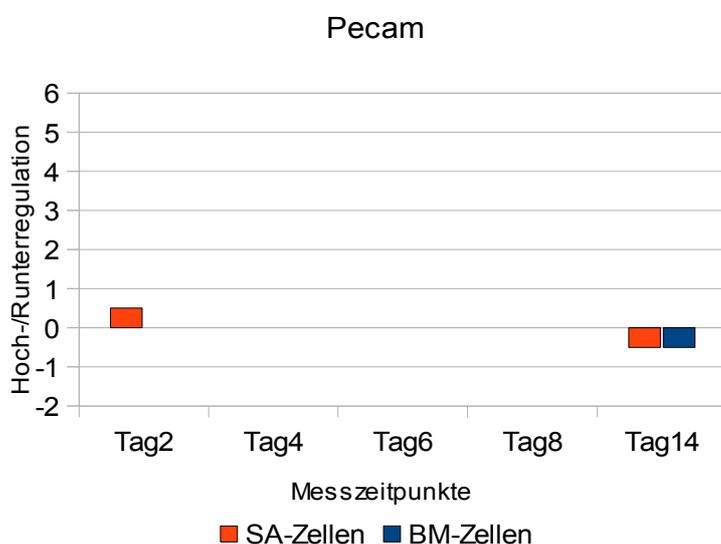


Abb. 12: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für *Pecam*

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. An Tag 14 kann eine minimale Runterregulation von *Pecam* in beiden Zellpopulationen beobachtet werden.

3.4.1.3 Zunehmende Hochregulation von *HoxD3* in SA-Zellen

Abb. 13 zeigt, dass bereits ab dem zweiten Tag das angiogeneseinduzierende Gen *HoxD3* in SA-Zellen zunehmend hoch reguliert wird. An Tag 14 erreichen SA-Zellen ihr Maximum in der Genregulation von *HoxD3*. BM-Zellen weisen im zeitlichen Verlauf eine deutlich niedrigere Hochregulation des Gens auf. Bis auf Tag 4 wird *HoxD3* kontinuierlich auf dem gleichen Niveau durch BM-Zellen exprimiert. Die Graphik zeigt, dass SA-Zellen das Gen *HoxD3* wesentlich stärker exprimieren als BM-Zellen.

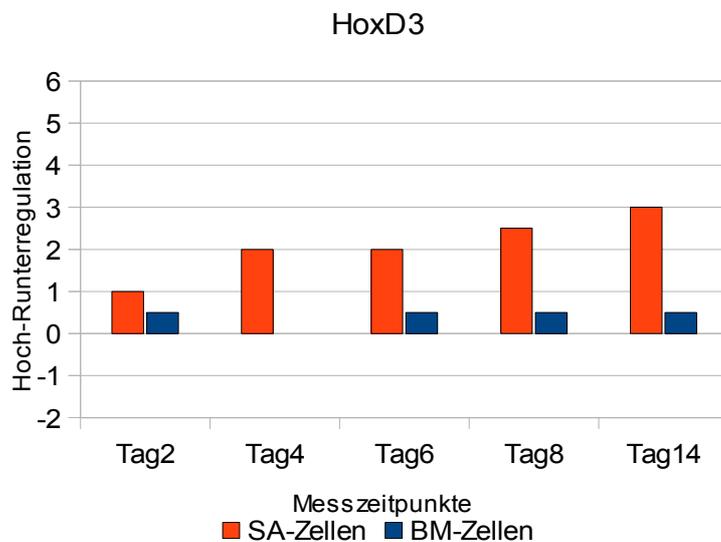


Abb. 13: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für HoxD3

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. Es zeigt sich, dass HoxD3 durch SA-Zellen gegenüber BM-Zellen wesentlich stärker hoch reguliert wird.

3.4.1.4 Unterschiedlich starke Hochregulation von Prominin in beiden Zellpopulationen

Prominin wird durch beide Zellpopulationen mit unterschiedlicher Intensität exprimiert. BM-Zellen beginnen die Hochregulation an Tag 2 und erreichen ihr Maximum an Tag 6 und 8. An Tag 14 nimmt die Hochregulation ab. SA-Zellen beginnen zwar die Hochregulation der Genexpression ebenfalls an Tag 2, jedoch gegenüber den BM-Zellen mit einem niedrigeren Ausgangswert. Prominin wird durch SA-Zellen bis auf Tag 4 kontinuierlich exprimiert. An Tag 8 zeigen SA-Zellen eine maximale Hochregulation. Die Abb. 14 lässt erkennen, dass Prominin stärker durch BM-Zellen exprimiert wird als durch SA-Zellen.

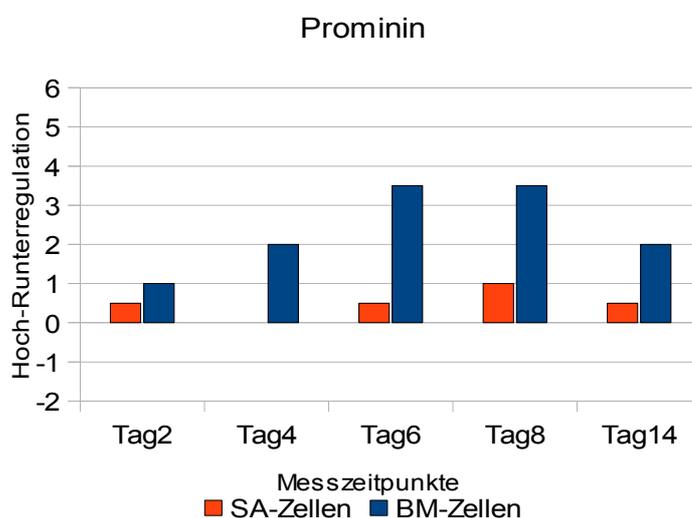


Abb. 14: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für Prominin

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. Die Graphik lässt erkennen, dass Prominin zu allen Messzeitpunkten stärker durch BM-Zellen exprimiert wird als durch SA-Zellen.

3.4.1.5 FLT1 erfährt nur in BM-Zellen eine Hochregulation

BM-Zellen zeigen im zeitlichen Verlauf eine langsam steigende Hochregulation der Genexpression von FLT1. Initial wird FLT1 an Tag 2 minimal hoch reguliert. Die maximale Genexpression erreichen BM-Zellen an Tag 8. An Tag 8 wird FLT1 durch SA-Zellen minimal runterreguliert. An den anderen Messzeitpunkten kann keine Veränderung in der Genexpression durch SA-Zellen beobachtet werden. Hier zeigt sich ein wesentlicher Unterschied in der Genregulation von BM-Zellen gegenüber SA-Zellen im zeitlichen Verlauf.

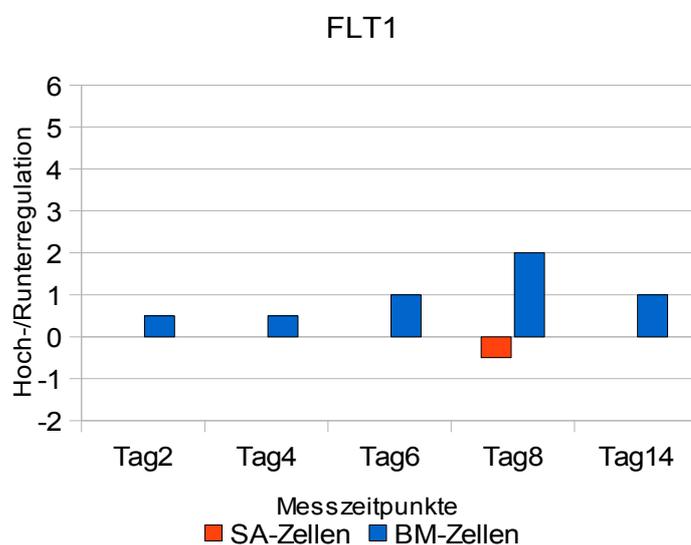


Abb. 15: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für FLT1

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. BM-Zellen zeigen im zeitlichen Verlauf eine langsam steigende Hochregulation der Genexpression von FLT1. SA-Zellen zeigen lediglich an Tag 8 eine minimale Runterregulation.

3.4.1.6 Unregelmäßige Hochregulation von CD45 in beiden Zellpopulationen

Abb. 16 stellt die Expression für das CD45 codierende Gen dar. CD45 wird im zeitlichen Verlauf von beiden Zellpopulationen minimal hoch reguliert. An Tag 8 erreichen die aufgearbeiteten BM-Zellen ihre maximale Genexpression. An Tag 8 und Tag 2 zeigen die SA-Zellen keine Veränderungen in der Genregulation. Ein Ausreißer in der maximalen Genexpression kann durch die SA-Zellen an Tag 6 beobachtet werden. Während BM-Zellen eine weitestgehende gleichmäßige Hochregulation des für CD45 codierenden Gens aufweisen, wird das Gen von SA-Zellen zu verschiedenen Messzeitpunkten unterschiedlich stark exprimiert.

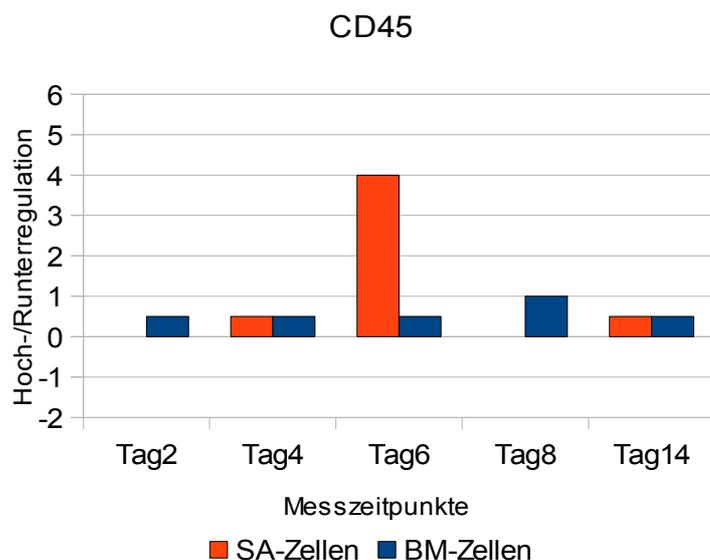


Abb. 16: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für CD45

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. Während BM-Zellen eine weitestgehend gleichmäßige Hochregulation des für CD45 codierenden Gens aufweisen, zeigen SA-Zellen eine unterschiedliche Hochregulation.

3.4.1.7 Exklusive Hochregulation von VEGFR2 in BM-Zellen

VEGFR2 wird in BM-Zellen im zeitlichen Verlauf bis Tag 8 zunehmend hoch reguliert. Nach 2 bzw. 4 Tagen in der Expansionskultur zeigen BM-Zellen eine erste minimale Hochregulation, die schon nach 6 Tagen um das Doppelte ansteigt. Die Hochregulation nimmt, nachdem sie an Tag 8 ihr Maximum erreicht hat, an Tag 14 wieder um die Hälfte ab. SA-Zellen zeigen in Abb. 17 zu keinem Messzeitpunkt eine Hoch- bzw. Runterregulation in der Genexpression von VEGFR2.

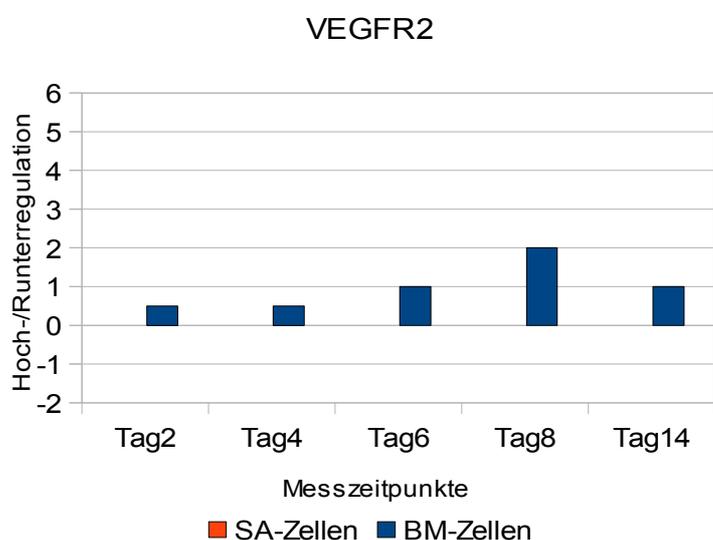


Abb. 17: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für VEGFR2

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. VEGFR2 zeigt für BM-Zellen eine kontinuierlich steigende Hochregulation, während SA-Zellen das codierende Gen zu keinem Zeitpunkt hoch bzw. runter regulieren.

3.4.1.9 Bis Tag 8 Hochregulation von vWF in beiden Zellpopulationen

In Abb. 18 zeigt sich, dass nach zwei bzw. vier Tagen in Expansionskultur nur SA-Zellen eine minimale Hochregulation aufweisen. Erst nach zwei weiteren Tagen beginnt die Hochregulation für den vWF in BM-Zellen. An Tag 8 wird vWF durch beide Zellpopulationen hoch reguliert. BM-Zellen exprimieren das Gen stärker als SA-Zellen. Zum Zeitpunkt der letzten Messung erfährt vWF weder eine Hoch- noch eine Runterregulation durch beide Zellpopulationen.

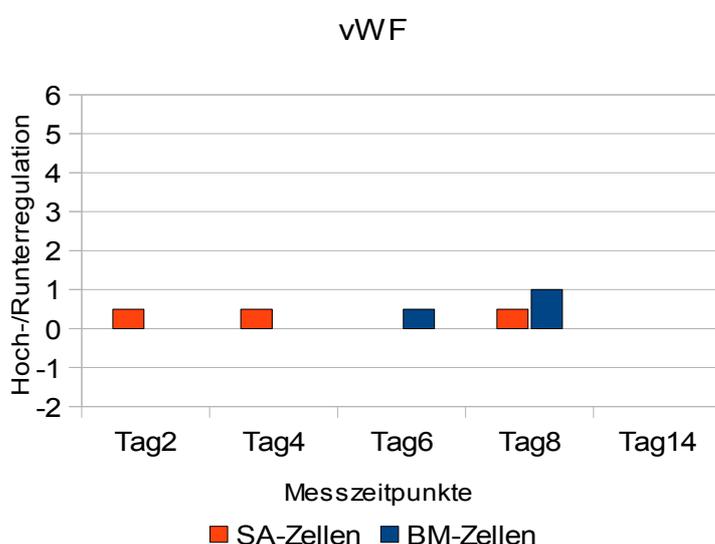


Abb. 18: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in SA-Zellen und BM-Zellen für vWF

Als Messzeitpunkte wählten wir Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wählten wir die in Tab. 4 definierten Werte. Das für den vWF codierende Gen erfährt bis Tag 8 eine leichte Hochregulation durch beide Zellpopulationen.

3.4.2 Zusammenfassung der Genregulation

Abb. 19 gibt eine Zusammenfassung der in Balkendiagrammen einzeln dargestellten Expression von Transkriptionsfaktoren und Genen wieder. Dafür wurde, wie in den vorausgegangenen Diagrammen, das Balkendiagramm als Darstellungsform gewählt. Die Taqman-PCR erlaubt es, die Expression von Genen der Hämatopoese und Vaskulogenese bzw. Angiogenese im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Für diese codierenden Gene weisen beide Zellpopulationen im Wesentlichen eine Hochregulationen auf. Eine minimale Runterregulation durch beide Zellreihen kann lediglich für Pecam nach 14 Tagen in der mit Zytokinen angereicherten Expansionskultur beobachtet werden und nimmt damit eine Sonderstellung ein.

CD133+ BM-Zellen weisen im zeitlichen Verlauf eine stärkere Genregulation auf als SA-Zellen. Bestimmte Gene wie FLT1, Prominin und VEGFR2 werden fast ausschließlich durch BM-Zellen hoch reguliert und erreichen in der Regel ihr Maximum an Tag 8. Andere Gene wie KDR, vWF, CD45 werden durch beide Zellreihe unregelmäßig auf niedrigem Niveau hoch reguliert. Aber auch hier deuten die Daten darauf hin, dass BM-Zellen an Tag 8 diese Gene stärker als SA-Zellen exprimieren. Nur das Gen HoxD3 wird schon ab dem Messzeitpunkt Tag 2 durch SA-Zellen stärker als durch BM-Zellen hoch reguliert. Die Hochregulation von HoxD3 durch SA-Zellen nimmt gegenüber BM-Zellen sogar im zeitlichen Verlauf bis einschließlich Tag 14 kontinuierlich zu. Eine Besonderheit nimmt EGR ein. EGR wird durch beide Zellpopulationen zu allen Messzeitpunkten maximal hoch reguliert.

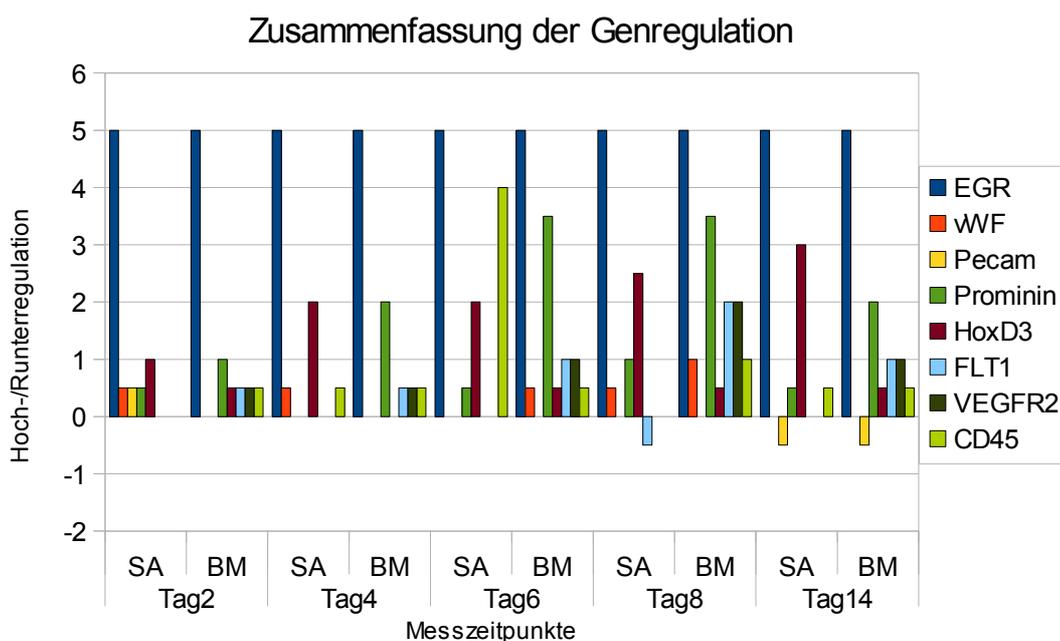


Abb. 19: Gegenüberstellung der Expressionsregulation in CD133+ SA-Zellen und BM-Zellen für EGR, VWF, Pecam, Prominin, HoxD3, FLT1, VEGFR2, CD45

Als Messzeitpunkte wurden Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 14 gewählt. Nach mathematischer Ermittlung der Ratio erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Für die graphische Darstellung der Hoch- bzw. Runterregulation wurden die in Tab. 4 definierten Werte gewählt. Mit Ausnahme von Pecam werden die von uns untersuchten Gene durch beide Zellpopulationen hoch reguliert. Bestimmte Gene wie Prominin, FLT1, VEGFR2 werden deutlich stärker in BM-Zellen exprimiert als in SA-Zellen. Es zeigt sich, dass BM-Zellen, insbesondere an Tag 8, eine stärkere Genexpression gegenüber SA-Zellen aufweisen. Lediglich das HoxD3 erfährt durch SA-Zellen eine stärkere Expression.

4 Diskussion

Seit Asahara et al. 1997 den Nachweis der für die *de novo* Synthese von primitiven Gefäßplexus verantwortlichen Vorläuferzellen erbrachte, beschäftigen sich unabhängige Forschungsgruppen mit der *in vitro* bzw. *in vivo* Identifizierung von endothelialen Vorläuferzellen. Zur durchflusszytometrischen Phänotypisierung von EPCs verwendeten die verschiedenen Arbeitsgruppen Oberflächenmarker der hämatopoetischen und der endothelialen Reihe. Mit der Entwicklung des Antikörpers AC133 konnten Yin et al. 1997 einen neuen Marker auf der Oberfläche von frühen Vorläuferzellen, insbesondere der hämatopoetischen Zellreihe, identifizieren. Neben dem möglichen Einsatz von CD133+ Zellen in der Therapie zur Regeneration von kardialen bzw. neuronalen Gewebeschäden [Stamm et al. 2003], sind die isolierten Vorläuferzellen insbesondere in der Therapie von hämatologischen und soliden Tumoren von Interesse. In klinischen Pilotstudien wurden Stammzellen, die über das Antigen CD133 isoliert wurden, zur Knochenmarktransplantation nach Hochdosis-Chemotherapie erfolgreich eingesetzt [Koehl et al. 2002, Lang et al. 2004, Bitan et al. 2005]. Ob diese Therapieform der länger etablierten Therapie mit nicht selektiv aufgereinigten Stammzellen bzw. Knochenmark überlegen ist, bleibt offen. Peichev et al. führten schließlich 2000 als eine der ersten Arbeitsgruppen das Oberflächenantigen CD133 zur Differenzierung von frühen EPCs und zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (engl. Circulating Endothelial Progenitors, CEP), die sich in einem fortgeschritteneren Differenzierungsstadium befinden, ein. Obwohl CD133 in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Stammzellforschung getreten ist, bleiben noch viele Fragen zu seiner Funktion offen. Das Glykoprotein CD133 konnte nicht nur auf primitiven Vorläuferzellen hämatopoetischen, endothelialen und neuronalen Gewebes nachgewiesen werden, sondern auch auf ausdifferenzierten Endothelzellen von Blutgefäßen, die gesundes als auch malignes Gewebe versorgen. Aus dem Grund wird CD133 eine proliferative und regenerative Eigenschaft zugesprochen [Bauer et al. 2008]. Damit kommt dem Oberflächenantigen CD133 eine besondere Bedeutung in der Identifizierung von EPCs und in der Stammzelltherapie zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es CD133+ Zellen, die wir mit Hilfe des MACS-

Systems aus Knochenmark und aus Stammzellapheresaten isolierten, *in vitro* auf ihre Gen- und Proteinexpression zu charakterisieren und eventuelle Unterschiede zu identifizieren. In einem Großteil der Veröffentlichungen werden EPCs aus den üblichen Ressourcen von Stammzellen, wie dem Knochenmark, Nabelschnurblut und Stammzellapheresaten, isoliert und hinsichtlich ihres Verhaltens *in vivo* und *in vitro* untersucht. Nur wenige davon gehen auf eventuelle Unterschiede des Probenmaterials ein.

Wie unter Kap. 2.2.3 beschrieben, kultivierten wir die aufgereinigten Zellen mit den proangiogenen Faktoren und Stammzellwachstumsfaktoren VEGF, FLT3, SCGF- β und Hydrocortison. In dem Zellmedium konnten wir im zeitlichen Verlauf unter der Zytokinstimulation eine Zunahme der Zellzahl beobachten. Die Zunahme der Zellzahl gilt als wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von Stammzellen. Loges et al. beobachteten 2004 in ihrer Arbeit ein exponentielles Wachstum von EPCs, die aus Stammzellapheresaten gewonnen wurden, mit einer Verdopplung der Zellzahl nach sechs Tagen in der Zellkultur und einem Ende des Zellwachstums nach 31 Tagen. In Abb.5 lässt sich bei beiden Zellpopulationen nach sechs Tagen eine exponentielle Wachstumsphase beobachten, die allerdings auf einem unterschiedlich hohen Niveau stattfindet. So kann bei SA-Zellen eine deutlich höhere Zunahme der Zellzahl gegenüber BM-Zellen beobachtet werden. Konkordant dazu tritt eine Stagnation des Wachstums bei SA-Zellen früher als bei BM-Zellen ein. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde die Wirkung von Stammzellapheresat- gegenüber Knochenmarktransplantationen auf das Blutbild untersucht. Dazu wurden Patienten, die eine Hochdosis-Chemotherapie erhalten haben und denen anschließend entweder Stammzellpräparate aus dem peripheren Blut oder Knochenmark transplantiert wurden, auf die Zahl der im Blut zirkulierenden hämatopoetischen Zellen, die Dauer bis zur Normalisierung des Blutbildes, die Nebenwirkungen sowie die 5-Jahres-Überlebensrate untersucht. Es konnte eine schnellere Regeneration des Knochenmarks verbunden mit einer höheren Zahl von im Blut zirkulierenden, hämatopoetischen Vorläuferzellen, bei Patienten nach Transplantation mit Stammzellapheresaten gegenüber Patienten, die Präparate aus dem Knochenmark erhalten haben, nachgewiesen werden [Rowley et al. 2001]. Unsere Beobachtungen, dass SA-Zellen gegenüber BM-Zellen ein schnelleres Wachstum im zeitlichen Verlauf aufweisen, korrelieren mit der oben beschriebenen Studie. Zu erklären wäre das unterschiedliche

Wachstumsverhalten *in vitro* und *in vivo* durch die unterschiedliche Gewinnung des Probenmaterials. Um CD34+ Stammzellen aus dem peripheren Blut von Patienten durch das Aphereseverfahren zu gewinnen, werden die Stammzellen durch die subkutane Injektion mit G-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert. G-CSF wird vom Körper unter anderem im Rahmen von Entzündungen gebildet, um die Proliferation und die Mobilisation von Granulozyten und ihrer hämatopoetischen Vorläuferzellen zu stimulieren. Somit wird in Stammzellen, noch bevor sie in Apheresepräparaten gesammelt werden, eine Signalkaskade aktiviert [Avalos 1996]. Die genauen Mechanismen, die mit den Signalkaskaden und mit der Mobilisation aus dem Knochenmark verbunden sind, bleiben noch unklar [Hoggatt et Pelus 2011]. Ursächlich für das unterschiedliche Wachstumsverhalten könnte ein Wechsel der Zellzyklusphasen sein. So würde eine Aktivierung der Mitose durch das G-CSF zur Proliferation der SA-Zellen und einem schnelleren Wachstum gegenüber BM-Zellen führen.

Um das endotheliale Differenzierungspotential der isolierten Zellen zu beurteilen, wurden Colony Forming Units (CFU) eingesetzt. Durch die Morphologie der gebildeten Kolonien lässt sich die Zugehörigkeit der Vorläuferzellen ermitteln, siehe Abb. 6. Das kommerzielle CFC-Medium der Firma MethoCult wurde um verschiedene Wachstumsfaktoren ergänzt. Dazu gehören Wachstumsfaktoren der Vaskulogenese, wie das VEGF, als auch Zytokine, wie das SCF, die für die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen von Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe lassen darauf schließen, dass CD133+ Zellen, die sowohl aus Stammzellapheresat bzw. aus Knochenmark isoliert wurden, in gleicher Weise Kolonien der Erythropoese als auch der Granulo- bzw. Thrombopoese bilden. Kolonien der endothelialen Reihe konnten weder bei CD133+ SA-Zellen noch bei CD133+ BM-Zellen nachgewiesen werden. Eine Beobachtung, die sich in der Arbeit von Gehling et al. 2000 wiederfindet. Es bleibt offen, ob isolierte CD133+ Zellen in endotheliale Vorläuferzellen bzw. direkt in Endothelzellen differenzieren können. Obwohl es sich bei CFU-EPCs in der EPC-Forschung um eine etablierte Methode zur Quantifizierung von endothelialen Vorläuferzellen handelt, wird ihre Aussagekraft in der Literatur kontrovers diskutiert. George et al. haben 2006 eine fehlende Korrelation zwischen der Anzahl der *in vitro* gebildeten EPC-Kolonien und der immunhistochemisch quantitativ bestimmten endothelialen Vorläuferzellen im Probenmaterial

nachgewiesen. Zu dem gleichen Schluss kommen Tura et al. 2007, indem sie Stammzellen aus den typischen Stammzellreservoirs (Knochenmark, Nabelschnurblut und Stammzellapheresate) auf ihre Fähigkeit, CFU-EPCs zu bilden, miteinander verglichen. Damit besteht in der Literatur eine Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen zur Bestimmung des Differenzierungspotentials von EPCs. Labortechnisch ist es in *in vitro* Modellen nur begrenzt möglich, die gleichen Versuchsbedingungen zu schaffen wie in *in vivo* Modellen. Zwar sind die äußeren Einflussgrößen *in vitro* kontrollierbarer, die Ergebnisse sind dadurch allerdings eingeschränkt aussagekräftig. Es bedarf weiterer Untersuchungen und differenzierterer *in vitro* Modelle, um das endotheliale Potential von EPCs zu analysieren und zu quantifizieren. Es bleibt offen, ob durch fehlenden Nachweis von CFU-EPCs CD133+ Zellen die Fähigkeit abgesprochen werden kann, zu Endothelzellen zu differenzieren. Ähnlich ihrem Wachstumsverhalten, siehe Kap. 3.1, besteht die Möglichkeit, dass CD133+ Zellen erst im weiteren Verlauf ihr vollständiges endotheliales Potential entfalten. So schlussfolgern Shantsila et al. in ihrer Arbeit von 2007, dass es sich bei der Durchflusszytometrie um die geeignetere Methode zur quantitativen Bestimmung und Analyse von EPCs handelt.

Durch die Analyse der Expression von Oberflächenantigenen im zeitlichen Verlauf, siehe Kap. 3.3, können weitere Erkenntnisse über das *in vitro* Verhalten von EPCs und ihr vaskulogenes bzw. angiogenes Potential erlangt werden. Zur Phänotypisierung von EPCs wird die Expression von bestimmten Oberflächenmarkern mit Hilfe der Durchflusszytometrie verwendet. Ausgehend von der Vorstellung einer gemeinsamen Ursprungszelle, dem Hämangioblasten, siehe Kap. 1.3, wird in der Literatur von einer Vielzahl von Autoren die Koexpression von CD34 und CD133 zur Identifizierung dieser frühen Vorläuferzelle verwendet. Zur genaueren Diskriminierung wird im Rahmen von durchflusszytometrischen Untersuchungen eine Vielzahl von Antikörpern gegen Oberflächenantigene der endothelialen und hämatopoetischen Reihe eingesetzt. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde in dieser Arbeit die Antigenexpression von CD133, CD34, CD45 und vWF bestimmt. Durch das FACS-Verfahren ist es möglich gewesen, die Koexpression von CD133, CD45 und CD34 sowie von CD133, vWF und CD34 im zeitlichen Verlauf zu beobachten.

In den in Abb. 8 und Abb. 10 zusammengefassten Ergebnissen der

Durchflusszytometrie zeigt sich zwischen den beiden Zellpopulationen ein Unterschied in der initialen Expression von CD133 und der Koexpression von CD34. In den isolierten SA-Zellen kann gegenüber den isolierten BM-Zellen eine wesentlich höhere CD133 Antigenexpression und eine kurzfristig zunehmende Koexpression von CD34 ermittelt werden. Der höhere Anteil an CD133+ Zellen in den isolierten SA-Zellen kann durch die Gewinnung des Probenmaterials von Stammzellapheresaten erklärt werden. Die in Abb. 8 und Abb. 10 gezeigten Daten deuten darauf hin, dass das Aphereseverfahren zu einer Vorselektion von CD34+Zellen und zu einem höheren Anteil an hämatopoetischen Stammzellen im Probenmaterial führt. Dass hämatopoetische Vorläuferzellen ebenfalls das Antigen CD133 exprimieren, konnten Yin et al. schon 1997 nachweisen. Matsumoto et al. bezifferten in ihrer Studie von 2000 den Anteil der CD133+ Zellen innerhalb einer CD34+ Zellpopulation auf 41 bis 90 Prozent. Bei den CD34+ Zellpopulationen handelte es sich um Stammzellpräparate, die aus dem peripheren Blut gewonnen wurden. Das könnte die unterschiedliche Expression von CD133 bzw. Koexpression von CD133 und CD34 bei SA-Zellen und BM-Zellen erklären. Das vor der Apherese dem Spenderpatienten injizierte G-SCF führt neben der Mobilisation von CD34+Zellen auch zu deren Proliferation. Die noch vor der Zellisolierung aktivierte Signalkaskade der Stammzellen könnte in der Zellkultur die Proliferation der CD34+ Zellen und ihre Antigenexpression beeinflussen.

In der ersten Versuchsreihe wurden als Messzeitpunkte der Tag der Isolierung der CD133+ Zellen (Tag 0) und 14 Tage nach ihrer Überführung ins Expansionsmedium (Tag 14) gewählt. Die in Abb. 7 dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutlich abnehmende Expression des Markers CD34. Die Expression von CD133 und die Koexpression von CD45 bzw. vWF bleiben nahezu gleich. Um das Expressionsverhalten der CD133+ Zellen in der Expansionskultur differenzierter zu betrachten, wurden, wie in Kap. 3.3.3 beschrieben, in einer zweiten Versuchsreihe kürzere Messintervalle gewählt. Die in Abb. 9 dargestellten Ergebnisse stehen in Korrelation zu den Daten von Gehling et al. 2000, die ebenfalls zeigen konnten, dass über den Messzeitraum die Expression des Oberflächenantigens CD34 bei den untersuchten Stammzellen kontinuierlich abnimmt und der endotheliale Marker vWF eine hohe Koexpression aufweist. Loges et al. beobachteten 2004 zwar eine langsamere, jedoch ebenfalls kontinuierliche Abnahme der Expression von CD133. Unsere Ergebnisse lassen

annehmen, dass die Tochterzellen der ursprünglichen CD133+/CD45+/CD34+ bzw. CD133+/vWF/CD34+ Zellen im Rahmen ihrer Proliferation und Differenzierung das Antigen CD34 nicht mehr an ihrer Oberfläche exprimieren. Eine andere Ursache für die abnehmende Expression von CD34 könnte darin liegen, dass in dem mit Zytokinen angereicherten Zellmedium nur der geringe Anteil an CD133+/CD45+/CD34- bzw. CD133+/vWF/CD34- zur Zellteilung befähigt ist. Eine genaue Zuordnung lässt sich aus den Messergebnissen nicht erheben.

Zur differenzierteren Phänotypisierung von EPCs bedienten wir uns des endothelialen Markers vWF und des hämatopoetischen Markers CD45. Beim vWF handelt es sich um ein Protein der Hämostase, das von Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet wird. In der Immunhistochemie dient er als Marker zur Identifizierung beider Zelllinien. Nach intrazellulärer Synthese werden die vWF-Multimere in Organellen der Zelloberfläche, den so genannten Weibel-Padel-Körperchen, von Endothelzellen gespeichert [J. Sadler 1991]. In vielen Arbeitsgruppen gilt vWF als wichtiger Differenzierungsmarker von EPCs und ausdifferenzierten Endothelzellen [Gehling et al. 2000, Bailey 2004, Janic et al. 2010]. Zum Beispiel fand die Arbeitsgruppe von Gehling et al. 2000 in ihren Versuchen eine 99%ige vWF-Expression von CD133+ Zellen nach 14 Tagen in Zellkultur. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Ergebnissen überein. Nahezu alle CD133+ Zellen aus Knochenmark und Stammzellapheresat exprimieren zu den von uns gewählten Messzeitpunkten das Antigen vWF, siehe Abb. 7 und Abb. 9. Obwohl vWF in der Regel auf ausdifferenzierten Endothelzellen nachzuweisen ist, zeigen unsere Ergebnisse, dass CD133+ Zellen, noch bevor sie in die Zellkultur überführt werden, das Antigen vWF exprimieren. Es stellt sich nun die Frage, ob vWF als Oberflächenantigen geeignet ist, EPCs von ausdifferenzierten Endothelzellen zu unterscheiden. Vielen Arbeitsgruppen, einschließlich der von Gehling et al., fehlt die initiale Bestimmung des Antigens vWF [Loges et al. 2004]. Häufig wird der vWF nach Überführung und Kultivierung im Differenzierungsmedium bestimmt, um das endotheliale Differenzierungspotential der isolierten Zellen zu beweisen. In den in Kap. 3.2 dargestellten Ergebnissen konnte CD133+ Zellen ein eindeutig hämatopoetisches Differenzierungspotential nachgewiesen werden, sodass vermutet werden kann, dass hämatopoetische Stammzellen in der Lage sind, das Antigen vWF ebenfalls zu exprimieren. Wir konnten zeigen, dass eine gleichbleibende Expression von vWF bei

hämatopoetischen Vorläuferzellen in der weiteren Differenzierung den Marker als Unterscheidungsmerkmal für EPCs fragwürdig erscheinen lässt.

Beim CD45 handelt sich um eine transmembranäre Protein Tyrosin Phosphatase. Weil gänzlich alle Leukozyten das Oberflächenantigen CD45 exprimieren, wird es auch in der Literatur als Common Leukocyte Antigen bezeichnet [Saito & Streuli 1991]. Unter anderem wird es dazu genutzt hämatopoetische Stammzellen von mesenchymalen Stammzellen zu unterscheiden [Carvalho et al. 2011]. In der Literatur wird CD45 zur Phänotypisierung von EPCs kontrovers diskutiert und eingesetzt. Shaw et al. verwendeten 2005 in Tierversuchen die Koexpression des Antigens CD45 zur Identifizierung von EPCs in Tumorgewebe. In einer klinischen Verlaufsstudie von Infarktpatienten nutzten Numaguchi et al. 2006 die Koexpression des Leukozytenantigens ebenfalls zur Identifizierung von EPCs. In neueren Studien konnte *in vitro* kein endotheliales Differenzierungspotential bei Vorläuferzellen nachgewiesen werden, die das Oberflächenantigen CD45 exprimierten [Timmermans et al. 2007, Ingram et al. 2007]. Aufgrund des hohen Anteils der Antigenexpression von CD45 bei den CD34+ und/oder CD133+ Vorläuferzellen kommt die Arbeitsgruppe um Ingram zu dem Schluss, dass die von Asahra et al. und späteren Arbeiten verwendete Phänotypisierung an Hand der üblichen Oberflächenantigene (CD34+, CD133+, VEGFR2 etc.) nicht zur Identifizierung und damit zur Isolierung von endothelialen Vorläuferzellen ausreicht. Timmermans et al. bestätigen in ihrer Arbeit diese Ergebnisse und empfehlen, das Oberflächenantigen CD45 als immunhistochemischen Marker zur Negativ-Selektion zu verwenden und damit den geringen Anteil an endothelialen CD34+/CD45- Vorläuferzellen von den übrigen hämatopoetischen Vorläuferzellen zu isolieren. Der hohe Anteil der CD45 Antigenexpression (zwischen 97% und 99%) im zeitlichen Verlauf durch CD133+ Zellen kann in Kap. 3.4 beobachtet werden. Die Tatsache, dass die von uns isolierten Zellen sowohl aus Knochenmark als auch Stammzellapheresaten in der Differenzierungskultur keine typischen endothelialen Vorläuferkolonien, sondern Vorläuferzellen der hämatopoetischen Reihe bilden, siehe Kap. 3.2, unterstützt die Schlussfolgerung der Arbeitsgruppe von Ingram et al. sowie von Timmermans et al. aus dem Jahr 2007. Trotzdem bleibt die These provokant und widerspricht der grundlegenden Idee einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem Hämangioblasten.

Wie in Kap. 1.3 beschrieben, besteht bis heute keine einheitliche Phäno-

typisierung durch Oberflächenantigene. Die simultane Messung der Antigenexpression wird durch die limitierte Kombinationsmöglichkeit von Oberflächenantigenen methodisch eingeschränkt. Um ein differenzierteres Bild von endothelialen Vorläuferzellen zu bekommen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression im zeitlichen Verlauf durch die Taqman-PCR untersucht. Diese Methode ermöglicht es schon mit geringsten Probenmengen, siehe Kap. 2.2.6, die Hoch- bzw. Runterregulation verschiedener Gene im zeitlichen Verlauf zu bestimmen. In ihrer 2006 veröffentlichten Arbeit erstellten Jaatinen et al. ein Genprofil für CD133+ Zellen. Sie verglichen die Genregulation CD133+ Zellen mit CD133- Zellen aus Nabelschnurblut. Dabei entdeckten sie, dass insbesondere Gene, die für den Zellstoffwechsel, die Zellentwicklung, die Zell-Zellkommunikation und die Zellproliferation codieren, in CD133+ Zellen hoch reguliert wurden. Folgearbeiten bestätigen, dass EPCs, die ebenfalls durch das Oberflächenantigen CD133+ definiert wurden, insbesondere Gene mit den oben genannten Eigenschaften von Stamm- bzw. Vorläuferzellen exprimieren [Jgreja et al. 2008]. Allerdings handelte es sich um Vorläuferzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden. Eine Gegenüberstellung der 2008 veröffentlichten Ergebnisse von Igreja et al. mit der vorliegenden Arbeit ist daher aufgrund des unterschiedlichen Probenmaterials nur beschränkt möglich.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf Angiogenese bzw. Vaskulogenese induzierende Transkripte, siehe Tab. 3, gelegt. Im Wesentlichen kann eine Hochregulation aller untersuchten Gene, mit Ausnahme des PECAM, im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

Ein Angiogenese induzierendes Gen, das HoxD3, wird von beiden Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf hoch reguliert, siehe Abb. 12. Transkriptionsfaktoren der Hox-Familie, insbesondere das HoxD3, spielen eine wichtige Rolle in der Bildung des Blutgefäßsystems beim Embryo und Erwachsenen. Sie wirken regulatorisch auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen [Boudreau et al. 2004]. Bahrami et al. konnten in ihrer 2011 veröffentlichten Arbeit eine frühe Zunahme der Expression von HoxD3 bei embryonalen Stammzellen in ihrer Differenzierung zu Endothelzellen nachweisen. Mit der Hochregulation markierte die Arbeitsgruppe ein aktives, proangiogenes Stadium der Zellen. Die in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse bestätigen eine Zunahme des angiogenen Potentials im zeitlichen Verlauf und deuten auf eine

Differenzierung der kultivierten Zellen. Die stärkere Hochregulation des HoxD3 in CD133+ SA-Zellen gegenüber BM-Zellen könnte auf ein differenzierteres Stadium der Zellen hindeuten und wäre durch das beschriebene präselektive Aphereseverfahren erklärbar. Ein differenzierteres und proliferierendes Stadium würde wiederum zu dem in Abb. 5 dargestellten Wachstumsverhalten in Zellkultur führen.

Beim Early Growth Response (EGR) handelt es sich um ein frühes Gen der Angiogenese [Fahmy et al. 2003, Khachigian et al. 2004]. Seine kontinuierliche Hochregulation sowohl bei SA-Zellen als auch bei BM-Zellen zeigt das blutgefäßbildende Potential der CD133+ Zellen in der Zellkultur. Die im zeitlichen Verlauf kontinuierliche Expression eines frühen Gens der Angiogenese, siehe. Abb. 11, lässt eine Differenzierung der CD133+ Zellen im zeitlichen Verlauf annehmen. Interessant scheint die Hochregulation weiterer Angiogenese induzierender Transkripte. Die beiden Gene FLT1 und KDR, die für Rezeptoren des Vascular endothelial Growth Factors kodieren und eine wichtige Rolle in der postnatalen de-novo Synthese von Gefäßen spielen, werden fast ausschließlich von BM-Zellen hoch reguliert und erreichen ihr relatives Expressionsmaximum an Tag 8. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD133+BM-Zellen ein größeres gefäßbildendes Potential aufweisen als CD133+ SA-Zellen. Die temporäre Genexpression von KDR bzw. FLT-1 in der Differenzierung von EPCs aus Nabelschnurblut konnte ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Igreja 2008 nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen. Zum einen lässt sich ein Stadium der Differenzierung bestimmen, in dem EPCs eine maximale angiogene bzw. vaskulogene Potenz bilden. Zum anderen scheint es einen Unterschied auf Genebene im *in vitro* Verhalten zwischen CD133+ BM-Zellen und CD133+ SA-Zellen zu geben. Die ausbleibende Expression essentieller Gene der Gefäßbildung durch SA-Zellen zeigt, dass sich die Zellpopulation zum Zeitpunkt ihrer Isolierung in einem fortgeschritteneren Stadium ihrer Differenzierung bzw. in einer anderen Zellreihenlinie befindet. Eine Schlussfolgerung, die durch die vergleichsweise geringe Hochregulation des Prominin durch CD133+ SA-Zellen, dem eine zellerneuernde Funktion zugesprochen wird, gestützt wird. Die Mobilisation aus dem Knochenmark durch die subkutane Gabe von GCS-F kann im Patienten eine Differenzierung der Stammzellen vor ihrer Gewinnung induzieren. Das

Knochenmark stellt ein besonderes Milieu für Stammzellen dar und reguliert ihren Verbleib, ihre Proliferation, ihre Differenzierung und schließlich ihre Mobilisation ins Knochenmark. Dabei wandert die hämatopoetische Stammzelle durch Zytokinstimulation aus der endostealen Zone in die zentrale vaskuläre Zone des Knochenmarks, die über Sinusoide mit dem Blutkreislauf verbunden ist [Chantrain et al. 2008]. Damit enthalten Aphereseprodukte eine vorselektierte Zellpopulation von differenzierteren hämatopoetischen Stammzellen bzw. Vorläuferzellen gegenüber aus dem Knochenmark direkt isolierten Zellen. Dies wiederum könnte das unterschiedliche Verhalten im Zellwachstum, siehe Kap. 3.1, in der Expression von Oberflächenantigenen, siehe Kap. 3.2, und in der Regulation von Genen, siehe Kap. 3.3, zwischen SA-Zellen und BM-Zellen erklären. Inwieweit eine Vorselektion bei BM-Zellen durch das ischämische Ereignis und die damit verbundene Freisetzung von vaskulogenen Zytokinen, wie z.B. das VEGF, im Knochenmark stattgefunden hat, bedarf weiterer Studien mit gesunden Kontrollgruppen. Beschrieben ist, dass Patienten nach ischämischen Ereignissen in der Vergangenheit gegenüber herzgesunden Patienten höhere Level an VEGF im Blut aufweisen [Ogawa et al. 2000].

Beide Zellpopulationen exprimieren im zeitlichen Verlauf unregelmäßig auf niedrigem Niveau Transkripte, die in der Regel von ausdifferenzierten Endothelzellen (vWF) oder Leukozyten (CD45), gebildet werden, siehe Abb. 17 und 18. Eine vergleichsweise niedrige Hochregulation der beiden Transkripte, lässt auf ein unreifes Stadium der Zellen schließen. Jaatinen et al. konnten in ihrer Arbeit zur Ermittlung des Genprofils von CD133+ Zellen eine Runterregulation des CD45 codierenden Gens nachweisen und schlossen auf ein frühes Stadium der Stammzellen in der Hämatopoese. Weil die Genregulation im zeitlichen Verlauf zum Zeitpunkt der Isolierung (Tag 0) aus dem Probenmaterial einander gegenübergestellt wird, scheint eine relativ niedrige Hochregulation des Gens nicht widersprüchlich, sondern weist auf eine ebenfalls hämatopoetische Differenzierung der untersuchten Vorläuferzellen hin.

Die in Abb. 19 zusammengefassten Ergebnisse der Taqman-PCR zeigen eine mögliche endotheliale Differenzierung in der Zellkultur. Zumindest kann eine Hochregulation von angiogenese- bzw. vaskulogeneseinduzierenden Genen im zeitlichen Verlauf beobachtet und damit ein gefäßbildendes Potential der aus Knochenmark und Stammzellapheresat isolierten CD133+ Zellen nachgewiesen

werden. Diese Beobachtung stützt die Annahme einer gemeinsamen hämatopoetischen und endothelialen Funktion. Dies widerspricht jedoch der Arbeit von Timmermans et al. 2007. In ihr wollen die Autoren mit dem fehlenden Nachweis von VEGFR-2 Proteinen bzw. ihren codierenden Transkripten auf Vorläuferzellen, die das Oberflächenantigen CD45 koexprimieren, bewiesen haben, dass es sich bei CD133+ Zellen um keine direkten Vorläuferzellen von Endothelzellen handelt. Wie kommt es zu den unterschiedlichen und teils widersprüchlichen Ergebnissen in der Literatur?

Zum einen tragen die unterschiedlichen Methoden und das unterschiedliche Probenmaterial gleich wohl zu unterschiedlichen Ergebnissen bei. Als Reservoirs für EPCs dienen peripheres Blut, Nabelschnurblut, Knochenmark oder Stammzellapheresat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass sich CD133+ Zellen aus Knochenmark bzw. Stammzellapheresat in ihrer Expression von Oberflächenantigenen im zeitlichen Verlauf überwiegend gleichen. Die Untersuchungen zur Genregulation zeigen jedoch, dass für die Vaskulogenese relevante Transkripte nur von CD133+ BM-Zellen kontinuierlich hoch reguliert werden und sich beide Zellpopulationen somit in ihrer Genexpression unterscheiden. Unterschiede in der Genregulation konnten schon Steidl et al. 2002 für hämatopoetische Stammzellen in Zellpräparaten nachweisen, die aus Knochenmark bzw. aus mobilisierten, peripheren Blut gewonnen wurden. Sie konnten eine deutlich stärkere Hochregulation von Zellzyklus aktivierenden und regulierenden Genen bei BM-Zellen gegenüber den im Blut zirkulierenden Stammzellen messen. Daraus schlussfolgerten sie ein aktiveres Stadium von Stammzellen im Knochenmark gegenüber frei zirkulierenden Stammzellen. Auf ein aktiveres Stadium von BM-Zellen gegenüber mobilisierten, frei zirkulierenden SA-Zellen weisen die Ergebnisse der Genregulation dieser Arbeit ebenfalls hin. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, ob dieses unterschiedliche *in vitro* Verhalten Auswirkungen auf das *in vivo* Verhalten, z.B. in Tiermodellen, hat. Ein Unterschied könnte Einfluss auf die Ergebnisse klinischer Studien nehmen, in denen EPCs zur therapeutischen Zwecken eingesetzt werden bzw. wurden. Der Einsatz von EPCs, die direkt aus Knochenmark gewonnen werden, könnte zu größeren Erfolgen in der Therapie kardialer bzw. neuronaler Ischämiepatienten führen gegenüber dem Einsatz von Vorläuferzellen aus leichter zugänglichen Quellen, wie dem peripheren Blut bzw. Stammzellapheresaten.

Zum anderen fehlt bis heute in der Literatur eine einheitliche immunhistochemische Phänotypisierung der Endothelialen Vorläuferzelle, siehe Kap. 1.3. Das führt zu einer mangelnden Vergleichbarkeit der veröffentlichten Arbeiten. Unsere Ergebnisse zeigen, dass CD133+ Vorläuferzellen zum Zeitpunkt ihrer Isolierung neben dem Stammzellmarker CD34 sowohl Oberflächenmarker ausdifferenzierter Endothelzellen als auch ausdifferenzierter Leukozyten aufweisen, siehe Kap. 3.3. Ihr Vermögen alle Vorläuferkolonien der hämatopoetischen Reihe und ihr Unvermögen Kolonien endothelialer Vorläuferkolonien in der Differenzierungskultur zu bilden, lassen Zweifel an einer direkten Differenzierung zu Endothelzellen aufkommen. Eine Wirkung als proangiogene hämatopoetische Stammzellen über parakrine Mechanismen scheint wahrscheinlich und erklärt die Hochregulation proangiogener Gene wie dem EGR, HoxD3, KDR, FLT1 in der Taqman-PCR. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit den aktueller Studien überein, in denen EPCs eine parakrine Wirkung auf die Gefäßbildung zugesprochen wird [Estes et al. 2010; Yoder et al. 2011]. Gleichzeitig deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Phänotyp von EPCs nur eingeschränkt Aussagen über das vaskulogene Potential von EPCs zulässt und die Isolierung von EPCs über Oberflächenantigene limitiert ist. Nicht nur klinische Studien in der Kardiologie bzw. der Neurologie könnten von dem richtigen Einsatz von EPCs profitieren. Ein besseres Verständnis von EPCs kann zu neuen Therapieansätzen in der Onkologie führen. Durch Inhibition von Vaskulogenese induzierender Zytokine mit Hilfe von Antikörpern, wie dem Bevacizumab, werden erste Erfolge in der Therapie von malignen Tumoren verzeichnet. Die Gentherapie stellt einen vielversprechenden, neuen Therapieansatz auf vielen Gebieten der Medizin dar. Eine Manipulation von EPCs auf Genebene bietet eine weitere Möglichkeit zur Hemmung bzw. Induktion der Angiogenese durch Vektorviren, die in der Lage sind, selektive Zielgene auszuschalten [Stockschlaeder et al. 2010]. Dafür bedarf es jedoch weiterer Erkenntnisse der Stammzellphysiologie. Diese Arbeit bietet einen Beitrag zu diesem dynamischen Forschungsfeld.

5 Zusammenfassung

Bis Asahara et al. in ihrer Arbeit von 1997 den Nachweis der *de novo* Gefäßbildung im adulten Organismus erbrachten, wurde angenommen, dass sich neue Gefäße nur aus bestehenden Gefäßen im Rahmen der Angiogenese entwickeln. Die an der Vaskulogenese beteiligten Vorläuferzellen wurden als so genannte EPCs identifiziert. Ihnen wird die Fähigkeit zugesprochen, durch Differenzierung in Endothelzellen primitive Gefäßstrukturen im Gewebe zu bilden und diese mit für den Wachstum wichtigen Nährstoffen zu versorgen. Diese Erkenntnis ermöglichte es, neue Behandlungsmöglichkeiten in der Therapie von Herzinfarkten, Schlaganfällen und sogar Tumoren zu entwickeln. Bis heute besteht jedoch keine einheitliche Definition von EPCs. Ausgehend von einer gemeinsamen Ursprungszelle, dem Hämangioblasten, wurden zur Isolierung gemeinsame Oberflächenantigene von hämatopoetischen und endothelialen Zellen verwendet. Eine besondere Rolle in der Identifizierung und schließlich Isolierung von EPCs wurde dem Marker CD133 beigemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde das *in vitro* Verhalten von CD133+ SA- und BM-Zellen untersucht und einander gegenübergestellt. Dazu wurden CD133+ Zellen zum einen aus Stammzellapheresaten zum anderen aus Knochenmark isoliert und anschließend in Zellkulturen überführt. Zur Bestimmung des angiogenen bzw. vaskulogenen Potentials von CD133+ Zellen wurden CFU-EPCs durchgeführt. Es folgten Messungen der Expression von Oberflächenantigenen im Durchflusszytometer sowie der Genregulation mit Hilfe der Taqman-PCR. Die ausbleibende Bildung von CFU-EPCs im Differenzierungsmedium sowie die konstante Expression des hämatopoetischen Markers CD45 machen eine direkte Differenzierung von CD133+ Zellen in Endothelzellen unwahrscheinlich. Die Hochregulation von proangiogenen bzw. vaskulogenen Transkriptionsfaktoren legen daher eine parakrine Wirkung von CD133+Zellen, wie sie in neueren Studien veröffentlicht wurde, nahe. Obwohl sich beide Zellpopulationen nahezu in ihrem Phänotyp gleichen, waren deutliche Unterschiede im Genotyp zu erkennen. Insbesondere die Expression gefäß-induzierender Transkriptionsfaktoren war in BM-Zellen stärker hoch reguliert als in SA-Zellen, was auf eine stärkere proangiogene Wirkung von BM-Zellen hinweist. Sollte sich diese Beobachtung in *in vivo*

Modellen bestätigen, könnte die Wahl des Zellmaterials zur Behandlung von Infarkt- bzw. Insultpatienten eine wichtige Rolle spielen und über ihren Therapieerfolg entscheiden.

Literaturverzeichnis

1. Anasetti C., Logan B., Lee S., Waller E., Weisdorf D., Wingard J., Cutler C., Westervelt P., Woolfrey A., Couban S., Ehninger G., Johnston L., Maziarz R., Pulsipher M., Porter D., Mineishi S., McCarty J., Khan S., Anderlini P., Bensinger W., Leitman S., Rowley S., Bredeson C., Carter S., Horowitz M.: Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors; *New England Journal Medicine* 367: 1487-96 (2012)
2. Asahara T. , Murohara T., Sullivan A ., Silver M., Zee R van d. , Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J M.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis; *Science* 275: 964- 967 (1997)
3. Avalos B.: Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor; *Blood* 88: 761-77 (1996)
4. Bahrami S., Veiseh M., Dunn A., Boudreau N.: Temporal changes in Hox gene expression accompany endothelial cell differentiation of embryonic stem cells; *Cell Adh Migr* 5:133-41 (2011)
5. Bailey A., Jiang s., Afentoulis M., Baumann C., Schroeder D., Susan B. Olson S., Wong M., Fleming W.,: Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells; *Blood* 103: 13-19 (2004)
6. Barber C., Iruela-Arispe M.: The ever-elusive endothelial progenitor cell: identities, functions and clinical implications; *Pediatric Research* 59: 26-32 (2006)
7. Basadonna G., Auersvald L., Khuong C., Zheng X., Kashio N., Zekzer D., Minozzo M., Qian H., Visser L., Diepstra A., Lazarovits A., Poppema S., Strom T., Rothstein D.: Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 3821-6 (1998)
8. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biology* 30: 1-12 (2011)
9. Bauer N, Fonseca A., Florek M., Freund D., Jaszai J., Bornhäuser M., Fargeas C., Corbeil D.: New Insights into the Cell Biology of Hematopoietic Progenitors by Studying Prominin-1 (CD133); *Cells Tissues Organs* 188: 127–131 (2008)
10. Bidlingmaier S., Zhu X., Liu B.: The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells; *Journal of molaculare medicine* 86: 1025-32 (2008)

11. Bitan M, Shapira MY, Resnick IB, Zilberman I, Miron S, Samuel S, Ackerstein A, Elad S, Israel S, Amar A, Fibach E, Or R, Slavin S.: Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133+-purified stem cells. *Experimental Hematology* 33: 713-718 (2005)
12. Boudreau N., Varner J.: The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis; *Journal of Biological Chemistry* 279: 4862-8 (2004)
13. Boudreau N., Andrews C., Srebrow A., Ravanpay A., Cheresh D.: Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. *The Journal of Cell Biology* 139: 257-64 (1997)
14. Bruno S., Bussolati B, Grange C., Collino F., Granziano M., Ferrando U., Camussi G.: CD133+ Renal Progenitor Cells Contribute to Tumor Angiogenesis; *The American Journal of Pathology* 169: 2223-2235 (2006)
15. Burri, P., Hlushchuk R., Djonov V.: Intussusceptive Angiogenesis: Its Emergence, Its Characteristics, and Its Significance; *Developmental Dynamics* 231: 474–488 (2004)
16. Carvalho M., Teixeira F., Reis R., Sousa N., Salgado A. Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine; *Current Stem Cell Research and Therapy* 6: 221-8 (2011)
17. Case J., Mead L., Bessler W., Prater D., White H., Saadatzaheh M. Bhavsar J., Yoder M., Haneline L., Ingram D.: Human CD34+, CD133+ VEGFR-2+, cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors; *Experimental Hematology* 35: 1109–1118 (2007)
18. Chantrain C., Feron O., Marbaix E., DeClerck Y.: Bone Marrow Microenvironment and Tumor Progression; *Cancer Microenvironment* 1: 23–35 (2008)
19. Chung Y., Zhang W., Arentson E., Kingsley P., Palis J., Choi K.: Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression; *Development* 129: 5511-20 (2002)
20. Civin C., Strauss L., Brovall C., Fackler M., Schwartz J., Shaper J.: Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells; *Journal of Immunology* 133: 157-65 (1984)
21. Conejo-Garcia J., Buckanovich R., Benencia F., Courreges M., Rubin S., Carroll R., Coukos G.: Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization; *Blood* 105: 679-681 (2005)

22. Dalchau R., Kirkley J., Fabre J.: Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *European Journal of Immunology* 10: 737-44 (1980)

23. Davani S., Marandin A., Mersin M., Royer B., Kantelip B., Hervé P., Etievent J., Kantelip JP.: Mesenchymal Progenitor Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Rat Cellular Cardiomyoplasty Model; *Circulation* 108: 253-258 (2003)

24. De Luca M., Facey D., Favalaro E., Hertzberg M., Whisstock J., McNally T., Andrews R., Berndt M.: Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain: analysis with monoclonal antibodies reveals distinct binding sites involved in recognition of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and ristocetin-dependent activation; *Blood* 95: 164-72 (2000)

25. Ergün S., Hohn H., Kilic N., Singer B., Tilki D.: Endothelial and hematopoietic progenitor cells (EPCs and HPCs): hand in hand fate determining partners for cancer cells; *Stem Cell Review* 4: 169-77 (2008)

26. Estes M., Mund J., Ingram D., Case J.: Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood; *Current Protocols in Cytometry* 9: 1-11 (2010)

27. Fahmy R., Dass C., Sun L., Chesterman C., Khachigian L.: Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth; *Nature Medicine* 9: 1026-32 (2003)

28. Fina L., Molgaard H., Robertson D., Bradley N., Monaghan P., Delia D., Sutherland D., Baker M., Greaves M.: Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells; *Blood* 75: 2417-26 (1990)

29. Florek M., Haase M., Marzesco A., Freund D., Ehninger G., Huttner W., Corbeil D.: Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer; *Cell Tissue Research* 319: 15-26 (2005)

30. Gao D., Nolan D., McDonell K., Vahdat L., Benezra R., Altorki N., Mittal V.: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression; *Biochimica et Biophysica Acta* 1796: 33-40 (2009)

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

32. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells; *Tissue Engineering* 12: 331-335 (2006)
33. Göthert J., Gustin S., van Eekelen J., Schmidt U., Hall M., Jane S., Green A., Göttgens B., Izon D., Begley C.: Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium; *Blood* 104: 1769-77 (2004)
34. Hill J., Zalos G., Halcox J., Schenke W., Waclawiw M., Quyyumi A., Finkel T.: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk; *New England Journal of Medicine* 348: 593-600 (2003)
35. Hoggatt J., Pelus L.: Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment; *Stem Cell Research and Therapy* 2: 13 (2011)
36. Igreja C, Fragoso R, Caiado F, Clode N, Henriques A, Camargo L, Reis EM, Dias S. Detailed molecular characterization of cord blood-derived endothelial progenitors; *Experimental Hematology* 36: 193-203 (2008)
37. Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka C., Murasawa S., Masuda H., Hayashi S., Silver M., Li T., Isner J., Asahara T.: Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration; *Circulation* 105: 732-8 (2002)
38. Jaatinen T., Hemmoranta H., Hautaniemi S., Niemi J., Nicorici D., Laine J., Yli-Harja O., Partanen J.: Global gene expression profile of human cord blood-derived CD133+ cells; *Stem Cells* 24: 631-641 (2006)
39. Janic B., Arbab A.: The role and therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization; *Scientific World Journal*: 1088-99 (2010)
40. Kabrun N, Bühring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G.: Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors; *Development*. 124: 2039-48 (1997)
41. Khachigian LM.: Early growth response-1: blocking angiogenesis by shooting the messenger; *Cell Cycle* 3: 10-11 (2004)
42. Koehl U., Zimmermann S., Esser R., Sörensen J., Grüttner HP., Duchscherer M., Seifried E., Klingebiel T., Schwabe D.: Autologous transplantation of CD133 selected hematopoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed leukemia; *Bone Marrow Transplant* 29: 927-30 (2002)
43. Kopp HG., Ramos C., Rafii S.: Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue; *Current Opinion in Hematology* 13: 175–181 (2006)

44. Kroll M., Hellums J., McIntire L., Schafer A., Moake J.: Platelets and shear stress; *Blood* 88: 1525-41 (1996)
45. Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H., Satoh T., Kawakami Y., Ikeda Y.: Endothelial Differentiation Potential of Human Monocyte-Derived Multipotential Cells; *Stem Cells* 24: 2733–2743 (2006)
46. Kwon O., Miller S., Li N, Khan A., Kadry Z., Uemura T.: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells and endothelial cells may contribute to endothelial repair in the kidney immediately after ischemia-reperfusion; *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 58: 687-94 (2010)
47. Lang P., Bader P., Schumm M., Feuchtinger T., Einsele H., Führer M., Weinstock C., Handgretinger R., Kuci S., Martin D., Niethammer D., Greil J.: Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors; *British Journal of Haematology* 124: 72-79 (2004)
48. Li ZJ, Wang ZZ, Zheng YZ, Xu B, Yang RC, Scadden DT, Han ZC.: Kinetic expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) during embryonic stem cell differentiation; *Journal of Cellular Biochemistry* 95: 559-70 (2005)
49. Li Calzi S., Neu M., Shaw L., Kielczewski J., Moldovan N., Grant M.: EPCs and pathological angiogenesis: When good cells go bad; *Microvascular Research* 79: 207–216 (2010)
50. Loges S., Fehse B., Brockmann M., Lamszus K., Butzal M., Guckenbiehl M., Schuch G., Ergün S., Fischer U., Zander A., Hossfeld D., Fiedler W., Gehling U.: Identification of the Adult Human Hemangioblast; *Stem Cells And Development* 13: 229–242 (2004)
51. Lyden D., Hattori K, Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chadburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N., Crystal R., Moore M., Hajar K., Manova K., Benezra K., Rafii Z.: Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth; *Nature Medicine* 7: 1194-1201 (2001)
52. Matsumoto K., Yasui K., Yamashita N., Horie Y., Yamada T., Tani Y., Shibata H., Nakano T.: In Vitro Proliferation Potential of AC133 Positive Cells in Peripheral Blood; *Stem Cells* 18: 196-203 (2000)
53. Melero-Martin J., Dudley A.: Vascular Stem Cells and Tumor Angiogenesis; *Stem Cells* 29: 163-168 (2011)
54. Mohri H., Fujimura Y., Shima M., Yoshioka A., Houghten R., Ruggeri Z., Zimmerman T.: Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib; *The Journal of Biological Chemistry* 263: 17901-4 (1988)

55. Nolan D., Ciarrocchi A., Mellick A.: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization; *Genes Development* 21: 1546-1558 (2007)
56. Numaguchi Y., Sonne T., Okumura K., Ishii M., Morita Y., Kubota ., Yokouchi K., Imai h., Harada M., Osanai H., Kondo T., Murohara T.,: The Impact of the Capability of Circulating Progenitor Cell to Differentiate on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction; *Circulation* 1: 114–119 (2006)
57. Ogawa H., Suefuji H., Soejima H., Nishiyama K., Misumi K., Takazoe K., Miyamoto S., Kajiwara I., Sumida H., Sakamoto T., Yoshimara M., Kugiyama K., Yasue H., Matsuo K.: Increased blood vascular endothelial growth factor levels in patients with acute myocardial infarction; *Cardiology* 93: 93-99 (2000)
58. Patenaude A., Parker J., Karsan A.,: Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization; *Microvascular Research* 79: 217–223 (2010)
59. Peichev M., Naiyer A., Pereira D., Zhu Z., Lane W., Williams W., Oz M., Hicklin D., Witte L., Moore M., Rafii S.: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ identifies a population of functional endothelial precursors identifies a population of functional endothelial precursors; *Blood* 95: 952-958 (2000)
60. Purhonen S., Palm J., Rossi D., Kaskenpää N., Rajantie I., Ylä-Hertuala S., Alitalo K., Weissmann I., Salven P.: Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth; *PNAS* 105: 6620-6625 (2008)
61. Redick S., Bautch V.: Developmental platelet endothelial cell adhesion molecule expression suggests multiple roles for a vascular adhesion molecule; *American Journal of Pathology* 54: 1137-47 (1999)
62. Richardson M. et Yoder M.: Endothelial progenitor cells: Quo Vadis? ; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50: 266–272 (2011)
63. Risau W.: Mechanisms of Angiogenesis; *Nature* 386: 671-674 (1997)
64. Risau W. et Flamme I.: Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro; *Development* 116: 435-439 (1992)
65. Rowley S., Donaldson G., Lilleby K., Bensinger W., Appelbaum F.: Experiences of donors enrolled in a randomized study of allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation; *Blood* 97: 2541-8 (2001)
66. Sadler J.: von Willibrand Factor; *The Journal of Biological Chemistry* 266: 22777-22780 (1991)

67. Saito H. et Streuli M.: Molecular Characterization of Protein Tyrosine Phosphatases; *Cell Growth and Differentiation* 2: 59-65 (1991)
68. Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989)
69. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T., Gertsenstein M., Wu X., Breitman M., Schuh A.: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice; *Nature* 376: 62-6 (1995)
70. Shantsila E., Watson T., Tse HF., Lip GY.: Endothelial colony forming units: are they a reliable marker of endothelial progenitor cell numbers?; *Annals of Medicine* 39: 474-479 (2007)
71. Shaw. JP., Basch R., Shamamiam P.: Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45; *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 32: 168–175 (2004)
72. Shmelkov S., St.Clair R., Lyden D., Rafii S.: AC133/CD133/Prominin-1; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 715–719 (2005)
73. Stamm C., Westphal B., Kleine HD., Petzsch M., Kittner C., Klinge H., Schümichen C., Nienaber CA., Freund M., Steinhoff G.: Autologous bonemarrow stemcell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361: 45-46 (2003)
74. Steidl U., Kronenwett R., Rohr U., Fenk R., Kliszewski S., Maercker C., Neubert P., Aivado M., Koch J., Modlich O., Bojar H., Gattermann N., Haas R.: Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells; *Blood* 99: 2037-44 (2002)
75. Stockschlaeder M., Shardakova O., Weber K., Stoldt V., Fehse B., Giers G., Scharf R.: Highly efficient lentiviral transduction of phenotypically and genotypically characterized endothelial progenitor cells from adult peripheral blood; *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 21: 464–473 (2010)
76. Tahergorabi Z., Khazaei M.: Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms. *International Journal of Preventive Medicine* 3: 827-38 (2012)
77. Timmermans F., Hauwermeiren F. van, Smedt M. de, Raedt R., Plasschaert F., Buyzere M., Gillebert T., Plum J., Vandekerckhove B.: Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133+ or CD45+ Hematopeotic Precursors; *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 27: 1572-1579 (2007)

78. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, Humphries K, Sauvageau G. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99: 121-129 (2002)
79. Tura O., Barclay GR., Roddie H., Davies J., Turner M.: Absence of a relationship between immunophenotypic and colony enumeration analysis of endothelial progenitor cells in clinical haematopoietic cell sources; *Journal of Translational Medicine* 37: 1-10 (2007)
80. Urbich C., Dimmeler S.: Endothelial progenitor cells functional characterization; *Trends Cardiovascular Medicine* 14: 318-22 (2004)
81. Uyeno L., Newman-Keagle J., Cheung I., Hunt T., Young D., Boudreau N.: Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *Journal of Surgical Research* 100: 46-56 (2001)
82. Vajkoczy P., Menger M., Vollmar B., Schilling L., Schmiedek P., Hirth K., Ullrich A., Fong T.: Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy; *Neoplasia* 1: 31-41 (1999)
83. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E.: Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps; *Blood* 88: 3424-31 (1996)
84. Yin AH., Miraglia S., Zanjani ED., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary AG., Olweus J., Kearney J., Buck DW.: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells; *Blood* 90: 5002-5012 (1997)
85. Yoder M.C.: Defining human endothelial progenitor cells; *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7: 49-52 (2009)
86. Zocchi M. et Poggi A.: PECAM-1, Apoptosis and CD34+ Precursors; *Leukemia & Lymphoma* 45: 2205-221 (2004)
87. Zovein AC., Hofmann JJ., Lynch M., French WJ., Turlo KA., Yang Y., Becker MS., Zanetta L., Dejana E., Gasson JC., Tallquist MD., Iruela-Arispe ML.: Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells; *Cell Stem Cell* 3: 625-636 (2008)

Anhang A Daten FACS-Analyse

Tab. 5: FACS-Messungen von CD133+ BM-Zellen an Tag 0 und 14

CD133+ BM vom 07/02/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	39,35	37,62	31,37
14	43,55	43,07	5,3

CD133+ BM vom 04/05/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	58,87	57,33	45,47
14	66,17	65,84	2,57

CD133+ BM vom 22/04/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	69,27	68,3	58,74
14	69,21	69,07	1,86

Mittelwert CD133+ BM vom 07/02/2009, 04/05/2009, 22/04/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
Tag0	55,83	54,42	45,19
Tag14	59,64	59,33	3,24

STABW CD133+ BM vom 07/02/2009, 04/05/2009, 22/04/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	15,19	15,55	13,69
14	14,02	14,17	1,82

CD133+ BM vom 04/05/2009_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
Tag0	58,87	58,22	46,17
Tag14	66,17	66,17	2,58

CD133+ BM vom 22/04/2009_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	69,27	68,02	58,5
14	69,21	69,14	1,87

Mittelwert CD133* BM vom 04/05/2009, 22/04/2009_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
Tag0	64,07	63,12	52,34
Tag14	67,69	67,66	2,23

Tab. 6: FACS-Messungen CD133+ SA-Zellen an Tag 0 und 14

CD133+ SA vom 07/02/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	92,07	90,97	57,13
14	88,46	88,37	2,21

CD133+ SA vom 18/04/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	52,26	51,48	42,84
14	80,22	80,13	1,44

CD133+ SA vom 02/06/2008_PAT.A_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	81,39	79,03	69,55
14	70,54	70,19	4,28

CD133+ SA vom 02/06/2008_PAT.B_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	90,08	86,57	75,23
14	84,45	84,45	4,39

CD133+ SA vom 23/04/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	78,69	77,9	53,67
14	79,11	79,1	0,63

Mittelwert CD133+ SA vom 07/02, 18/04, 02/06/PAT.A+B, 23/04_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
Tag0	78,9	77,19	59,68
Tag14	80,56	80,45	2,59

STABW CD133+ SA vom 07/02, 18/04, 02/06/PAT.A+B, 23/04_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	15,92	15,35	12,9
14	6,71	6,82	1,69

CD133+SA vom 02/06/2008 PAT.A_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	81,39	80,58	70,91
14	70,54	70,19	4,28

CD133+ SA vom 02/06/2008_PAT.B_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	90,08	89,99	78,2
14	84,45	84,36	4,39

CD133+ SA vom 23/04/2008_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	78,69	77,9	53,67
14	79,11	79,03	0,63

Mittelwert CD133+ SA vom 02/06/PAT.B, 23/04_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
Tag0	83,39	82,82	67,59
Tag14	78,03	77,86	3,1

STABW CD133+ SA vom 02/06/PAT.B, 23/04_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	5,95	6,35	12,6
14	7,02	7,16	2,14

Tab. 7: FACS-Messungen von CD133+ BM-Zellen an Tag 0, 2, 4, 6

CD133+ BM vom 22/07/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	51,94	49,03	32,65
2	41,19	39,13	36,28
4	38,27	35,86	21,87
6	29,96	19,23	6,31

CD133+ BM vom 16/01/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	57	55,46	41,71
2	53,54	51,29	38,73
4	64,65	63,48	31,61
6	69,18	68,84	10,46

CD133+ BM vom 04/05/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	58,87	57,33	45,47
2	52,75	45,89	37,17
4	36,6	31,15	18,28
6	50,34	49,58	6,94

CD133+ BM vom 22/04/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	69,27	68,3	38,74
2	74,22	72,21	49,39
4	82,62	82,45	16
6	60,42	60,18	8,49

CD133+ BM vom 13/03/2009_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	42,73	40,16	34,5
2	49,08	44,86	24,54
4	41,06	34,57	21,67
6	51,34	49,44	14,68

Mittelwert CD133+ BM vom 22/07, 16/01, 04/05, 22/04, 13/03_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	55,96	54,06	38,61
2	54,16	50,68	37,22
4	52,64	49,5	21,89
6	52,25	49,45	9,38

STABW CD133+ BM vom 22/07, 16/01, 04/05, 22/04, 13/03_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	9,72	10,42	5,22
2	12,24	12,79	8,83
4	20,25	22,51	5,96
6	14,62	18,74	3,37

CD133+ BM vom 22/07/2008_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	51,94	51,88	34,55
2	41,19	41,19	38,19
4	38,27	38,27	23,35
6	29,26	29,03	9,52

CD133+ BM vom 16/01/2009_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	57	53,35	40,12
2	53,54	53,54	40,42
4	64,56	64,65	32,19
6	69,18	69,18	10,52

CD133+ BM vom 04/05/2009_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	58,87	58,22	46,17
2	52,75	52,7	42,68
4	36,6	36,23	21,27
6	50,34	50,24	7,03

CD133+ BM vom 22/04/2009_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	69,27	68,02	58,5
2	74,22	73,99	50,61
4	82,62	82,38	15,79
6	60,42	60,06	8,47

CD133+ BM vom 22/04/2009_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	42,73	40,98	35,2
2	49,08	48,89	26,74
4	41,06	41,01	25,72
6	51,34	50,16	14,9

Mittelwert CD133+ BM vom 22/07, 16/01, 04/05, 22/04, 13/03_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	55,96	54,49	42,91
2	54,16	54,06	39,73
4	52,62	52,51	23,66
6	52,11	51,73	10,09

STABW CD133+ BM vom 22/07, 16/01, 04/05, 22/04, 13/03_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	9,72	9,84	9,88
2	12,24	12,16	8,64
4	20,24	20,25	6,02
6	14,89	14,95	2,98

Tab. 8: FACS-Messungen CD133+SA-Zellen an Tag 0,2,4,6

CD133+ SA vom 18/11/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	95,72	95,33	86,18
2	56,74	56,63	54,53
4	69,76	69,41	47,89
6	81,14	80,98	22,11

CD133+ SA vom 06/08/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	55,07	54,3	35,35
2	35,15	28,65	23,21
4	38,63	35,15	28,23
6	36,86	29,91	15,25

CD133+ SA vom 02/06/2008_PAT.B_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	90,08	86,57	75,23
2	79,42	78,79	76,03
4	91,02	90,84	75,3
6	93,14	93,04	30,15

CD133+ SA vom 02/06/2008_PAT.A_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	81,39	79,03	69,55
2	70,01	67,83	59,9
4	63,66	59,46	43,29
6	65,95	65,62	44,75

CD133+ SA vom 23/04/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	78,69	77,9	53,67
2	81,36	79,4	66,22
4	72,14	71,85	18,54
6	75,54	75,47	8,53

CD133+ SA vom 07/11/2008_CD34+/CD45+/CD133+

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	85,92	85,67	49,69
2	43,49	39,71	30,54
4	49,25	49,2	26,67
6	68,86	68,72	6,73

Mittelwert CD133+ SA vom 18/11, 06/08, 02/06_PAT.A+B, 23/04, 07/11_CD34+/CD45+/CD1

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	81,15	79,8	61,61
2	61,03	58,5	51,74
4	64,08	62,65	39,99
6	70,25	68,96	21,25

STABW CD133+ SA vom 18/11, 06/08, 02/06_PAT.A+B, 23/04, 07/11_CD34+/CD45+/CD133

TAG	CD133+	CD45+/CD133+	CD34+/CD45+/CD133+
0	14,15	13,97	18,69
2	19,12	20,9	20,68
4	18,39	19,35	20,47
6	19	21,46	14,43

CD133+ SA vom 18/11/2008_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	95,72	95,52	86,35
2	56,74	56,69	54,59
4	69,76	69,76	48,13
6	81,14	81,06	22,13

CD133+ SA vom 06/08/2008_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	55,07	55,07	35,85
2	35,15	35,08	28,42
4	38,63	38,63	31,02
6	35,86	35,86	18,29

CD133+ SA vom 02/06/2008_PAT.B_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	90,08	89,99	78,2
2	79,42	79,42	76,64
4	91,02	91,02	75,45
6	93,14	93,14	30,18

CD133+ SA vom 23/04/2008_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	78,69	77,9	53,67
2	81,36	63,7	53,13
4	72,14	71,78	18,52
6	75,54	75,39	8,52

CD133+ SA vom 07/11/2008_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	85,92	85,58	49,64
2	43,49	41,06	31,57
4	49,25	48,91	26,51
6	68,86	68,86	6,75

Mittelwert CD133+ SA vom 18/11, 06/08, 02/06_PAT.B, 23/04, 07/11_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	79,89	79,62	63,52
2	67,72	64,09	52,48
4	63,01	62,45	40,94
6	66,99	66,87	21,13

STABW CD133+ SA vom 18/11, 06/08, 02/06_PAT.A+B, 23/04, 07/11_CD34+/vWF/CD133+

TAG	CD133+	vWF/CD133+	CD34+/vWF/CD133+
0	15,64	15,54	17,64
2	26,23	25,44	26,03
4	20,5	20,5	23,38
6	20,76	20,75	17,15

Anhang B Daten Taqman-PCR

Tab. 9: Hochregulation der Genexpression von CD133+ SA-Zellen

<i>EGR</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	29,04	13,83	18,13	23,43	1,27
17.03.2009	7,84	11,55	8,82	8,46	3,84
23.03.2009	308,69	151,17	347,29	160,9	170,07
17.07.2009	326,29	266,87	286,03	109,9	304,44
Mittelwert	167,97	110,86	165,07	75,67	119,91
STABW	173,02	122,80	176,86	72,30	146,19

<i>vWF</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,53	0,5	0,91	2,11	1,44
17.03.2009	1,28	2,14	3,39		8
23.03.2009	0,82	3,29	2,97	0,89	0,51
17.07.2009	3,81	2,14	0,96	1,16	7,36
Mittelwert	1,61	2,02	2,06	1,39	4,33
STABW	1,50	1,15	1,31	0,64	3,90

<i>Pecam</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,49	0,39	0,41	0,81	0,21
17.03.2009	0,82	1,17	0,36	0,57	0,2
23.03.2009	5,06	4,38		0,84	1,05
17.07.2009	4,89	2,13	1,85	2,19	6,82
Mittelwert	2,82	2,02	0,87	1,10	2,07
STABW	2,50	1,73	0,85	0,74	3,19

<i>Prominin</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,47	0,41	0,56	1,51	1,67
17.03.2009	0,59	2,5	1,99	2,97	3,51
23.03.2009					
17.07.2009	6,41	2,28	5,03	8,28	
Mittelwert	2,49	1,73	2,53	4,25	2,59
STABW	3,40	1,15	2,28	3,56	1,30

<i>HoxD3</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	7,06	3,73	2,95	10,85	4,14
17.03.2009					
23.03.2009	2,46	6,87	0,7	2,35	2,01
17.07.2009	6,02	15,67	24,08	24,59	24,59
Mittelwert	5,18	8,76	9,24	12,60	10,25
STABW	2,41	6,19	12,90	11,22	12,47

<i>Flt1</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008					1,47
17.03.2009	0,74	1,27	1,78	3,73	1,45
23.03.2009	0,19	0,91	2,5	0,23	0,26
17.07.2009	0,84	0,72	0,23	0,23	0,47
Mittelwert	0,59	0,97	1,50	1,40	0,91
STABW	0,35	0,28	1,16	2,02	0,64

<i>VEGFR2</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008					
17.03.2009	0,38	0,6	1,55	1,24	1,27
23.03.2009	0,19	1,07		2,75	2,1
17.07.2009	1,29	1,29	1,52	1,52	1,01
Mittelwert	0,62	0,99	1,54	1,84	1,46
STABW	0,59	0,35	0,02	0,80	0,57

<i>CD45</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008			37,27	14,32	3,78
17.03.2009	1,58	1,84	4,89	5,1	9
23.03.2009	0,18	1,65	25,46	2,13	2,19
17.07.2009	0,66	1,62	1,96	1,22	0,71
Mittelwert	0,81	1,70	17,40	5,69	3,92
STABW	0,71	0,12	16,88	5,99	3,61

Tab. 10: Runterregulation der Genexpression von CD133+ SA-Zellen

EGR	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,03	0,07	0,06	0,04	0,79
17.03.2009	0,13	0,09	0,11	0,12	0,26
23.03.2009	0	0,01	0	0,01	0,01
17.07.2009	0	0	0	0,01	0
Mittelwert	0,04	0,04	0,04	0,05	0,27
STABW	0,06	0,04	0,05	0,05	0,37

vWF	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	1,88	2	1,1	0,47	0,69
17.03.2009	0,78	0,47	0,3	0,12	0,13
23.03.2009	1,17	0,3	0,34	1,13	1,97
17.07.2009	0,26	0,47	1,04	0,86	0,14
Mittelwert	1,02	0,81	0,70	0,65	0,73
STABW	0,68	0,80	0,43	0,44	0,87

Pecam	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	2	2,55	2,45	1,24	4,76
17.03.2009	1,22	0,85	2,81	1,77	5,03
23.03.2009	0,2	0,23	0,08	1,2	0,95
17.07.2009	0,2	0,47	0,54	0,46	0,15
Mittelwert	0,91	1,03	1,47	1,17	2,72
STABW	0,87	1,05	1,36	0,54	2,53

Prominin	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	2,14	2,43	1,79	0,66	0,6
17.03.2009	1,71	0,4	0,5	0,34	0,29
23.03.2009	0,25	0,11	0,03	0,2	0,04
17.07.2009	0,16	0,44	0,2	0,12	0,01
Mittelwert	1,07	0,85	0,63	0,33	0,24
STABW	1,01	1,07	0,80	0,24	0,27

HoxD3	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,14	0,27	0,34	0,09	0,24
17.03.2009	1,57	2,73	3,58	0,78	1,02
23.03.2009	0,41	0,15	1,43	0,43	0,5
17.07.2009	0,17	0,06	0,04	0,04	0,04
Mittelwert	0,57	0,80	1,35	0,34	0,45
STABW	0,68	1,29	1,60	0,34	0,42

Fit1	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,12	0,09	0,07	0,18	0,68
17.03.2009	1,35	0,79	0,56	0,27	0,69
23.03.2009		1,1	0,4	4,29	3,84
17.07.2009	1,2	1,39	4,35	4,35	2,14
Mittelwert	0,89	0,84	1,35	2,27	1,84
STABW	0,67	0,56	2,01	2,36	1,50

VEGFR2	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,13	0,05	0,02	0,11	0,11
17.03.2009	2,64	1,66	0,65	0,81	0,78
23.03.2009		0,93	0,03	0,36	0,47
17.07.2009	0,77	0,77	0,66	0,66	0,99
Mittelwert	1,18	0,85	0,34	0,49	0,59
STABW	1,30	0,66	0,36	0,31	0,38

CD45	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
20.11.2008	0,11	0,08	0,03	0,07	0,26
17.03.2009	0,63	0,54	0,2	0,2	0,11
23.03.2009		0,61	0,04	0,47	0,46
17.07.2009	1,53	0,62	0,51	0,82	1,4
Mittelwert	0,76	0,46	0,20	0,39	0,56
STABW	0,72	0,26	0,22	0,33	0,58

Tab. 11: Hochregulation der Genexpression von CD133+ BM-Zellen

<i>EGR</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	72	44,02	15,89	44,32	48,5
16.01.2009	284,05	430,54	36,25	131,6	37,53
13.03.2009	97,68	106,15	152,22	367,09	16,56
Mittelwert	151,24	193,57	68,12	181,00	34,20
Stabw	115,73	207,56	73,54	166,96	16,23

<i>vWF</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	1,7	1,69	2,1	2,51	0,89
16.01.2009	0,65	1,6	0,85	3,89	1,73
13.03.2009	0,37	0,69	5,17	3,92	2,28
Mittelwert	0,91	1,33	2,71	3,44	1,63
Stabw	0,70	0,55	2,22	0,81	0,70

<i>Pecam</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	1,93	0,66	1,37	1,09	1,39
16.01.2009	1,6	1,96	0,64	0,44	0,33
13.03.2009	0,44	1,09	0,68	0,99	0,31
Mittelwert	1,32	1,24	0,90	0,84	0,68
Stabw	0,78	0,66	0,41	0,35	0,62

<i>Prominin</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	7,94	7,73	20,39	13,36	2,97
16.01.2009	4,44	17,75	10,48	14,22	13,27
13.03.2009	1,6	4,44	16,22	20,68	10,85
Mittelwert	4,66	9,97	15,70	16,09	9,03
Stabw	3,18	6,93	4,98	4,00	5,39

<i>HoxD3</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	3,89	1,39	1,08	2,17	0,58
16.01.2009	1,05	1,47	0,1	3,05	1,3
13.03.2009	1,27	0,3	5,94	1,16	0,85
Mittelwert	2,07	1,05	2,37	2,13	0,91
Stabw	1,58	0,65	3,13	0,95	0,36

<i>Fit1</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	1,18	0,13	0,46	1,07	0,5
16.01.2009	1,58	3,94	1,13	6,68	3,01
13.03.2009	3,43	3,48	11	16,34	11,63
Mittelwert	2,06	2,52	4,20	8,03	5,05
Stabw	1,20	2,08	5,90	7,72	5,84

<i>VEGFR2</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	5,21	3,68	5,17	1,84	0,64
16.01.2009	1,48	2,97	2,25	12,3	3,36
13.03.2009	2,07	2,51	12,64	5,5	4,11
Mittelwert	2,92	3,05	6,69	6,55	2,70
Stabw	2,01	0,59	5,36	5,31	1,83

<i>CD45</i>	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	2,83	4,41	2,99	2,27	0,62
16.01.2009	0,96	3,01	1,05	5,94	3,66
13.03.2009	2,04	2,81		7,84	6,96
Mittelwert	1,94	3,41	2,02	5,35	3,75
Stabw	0,94	0,87	1,37	2,83	3,17

Tab. 12: Runterregulation der Genexpression von CD133+ BM-Zellen

EGR	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,01	0,02	0,06	0,02	0,02
16.01.2009	0	0	0,03	0,01	0,03
13.03.2009	0,01	0,01	0,01	0	0,06
Mittelwert	0,01	0,01	0,03	0,01	0,04
Stabw	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02

vWF	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,58	0,59	0,48	0,4	1,13
16.01.2009	1,55	0,62	1,17	0,26	0,58
13.03.2009	2,68	1,44	0,19	0,26	0,44
Mittelwert	1,60	0,88	0,61	0,31	0,72
Stabw	1,05	0,48	0,50	0,08	0,36

Pecam	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,52	1,52	0,73	0,91	0,72
16.01.2009	0,62	0,51	1,57	2,3	2,99
13.03.2009	2,3	0,92	1,47	1,01	3,23
Mittelwert	1,15	0,98	1,26	1,41	2,31
Stabw	1,00	0,51	0,46	0,78	1,39

Prominin	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,13	0,13	0,05	0,07	0,34
16.01.2009	0,23	0,06	0,1	0,07	0,08
13.03.2009	0,62	0,23	0,06	0,05	0,09
Mittelwert	0,33	0,14	0,07	0,06	0,17
Stabw	0,26	0,09	0,03	0,01	0,15

HoxD3	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,26	0,72	0,93	0,46	1,73
16.01.2009	0,95	0,68	10,41	0,33	0,77
13.03.2009	1,27	0,3	5,94	1,16	0,85
Mittelwert	0,83	0,57	5,76	0,65	1,12
Stabw	0,52	0,23	4,74	0,45	0,53

Flt1	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,85		2,17	0,93	1,99
16.01.2009	0,63	0,34	0,44	0,08	0,3
13.03.2009	0,29	0,29	0,09	0,06	0,09
Mittelwert	0,59	0,32	0,90	0,36	0,79
Stabw	0,28	0,04	1,11	0,50	1,04

VEGFR2	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,19	0,27	0,19	0,54	1,56
16.01.2009	0,67	0,34	0,44	0,08	0,3
13.03.2009	0,48	0,4	0,08	0,18	0,24
Mittelwert	0,58	0,37	0,26	0,13	0,27
Stabw	0,24	0,07	0,18	0,24	0,75

CD45	Tag2	Tag4	Tag6	Tag8	Tag14
01.11.2008	0,35	0,23	0,33	0,44	1,6
16.01.2009	1,04	0,33	0,95	0,17	0,27
13.03.2009	0,49	0,36	0,04	0,13	0,14
Mittelwert	0,63	0,31	0,44	0,25	0,67
Stabw	0,36	0,07	0,46	0,17	0,81

Anhang C Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. T. Wagner für die Überlassung des Themas, die freundliche Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. S. Stöltzing bedanken. Mit ihrem freundlichen Wesen und ihrer geduldigen Art hat sie mich und diese Arbeit vom ersten Tag an begleitet und für die Forschung begeistert. Für Fragen und Probleme fand sie die richtigen Worte und Ratschläge. Bedanken möchte ich mich auch für die kontinuierliche Durchsicht des Manuskripts und den Antrieb zum Fertigstellen der Doktorarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau H. Albrecht und bei Frau C. Kauderer bedanken. Die Zusammenarbeit im Labor hat mir große Freude bereitet und die Unterstützung in der Methodik war mir eine große Hilfe.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die während des Studiums und der Doktorarbeit stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Anhang D Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Piotr Kuta
Geburtsdatum: 03.05.1985
Geburtsort: Krakau
Staatsangehörigkeit: deutsch, polnisch
Familienstand: ledig



Schulbildung:

1991 – 1995: Anna-Siemsen-Grundschule
1995 – 2004: Katharineum zu Lübeck (Gymnasium)
2004: Abitur

Hochschulstudium:

2004 - 2010: Studium der Humanmedizin an der
Universität zu Lübeck
2006: 1. Abschnitt der ärztlichen Approbation
2010: 2. Abschnitt der ärztlichen Approbation

Beruflicher Werdegang:

2011: Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für
Kinder und Jugendmedizin in der
Cnopf'schen Kinderklinik in Nürnberg

Promotion:

Experimentelle Durchführung von 2007 - 2010 zum Thema „In-vitro Charakterisierung des endothelialen Differenzierungspotential CD133-positiven Zellen aus Stammzellapheresat und Knochenmark“, unter Betreuung von Frau Dr. rer. nat. S. Stölting, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Medizinische Klinik I.