

Interaktion von endothelialer und myeloid-hämatopoetischer
Differenzierung in *Embryoid Bodies* abgeleitet von murinen
embryonalen Stammzellen



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

von Dipl.-Chem. Madeleine Richter, geb. Hannig
geboren am 25.08.1979 in Osterburg

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Maria Wartenberg
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Regine Heller
3. Gutachter: Frau Prof. Dr. Anna Wobus

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.11.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	vii
1. Einleitung	1
1.1 Vaskulo-/Angiogenese und Hämatopoese während der Embryonalentwicklung der Maus	1
1.1.1 Vaskulogenese und Angiogenese während der Embryogenese	1
1.1.2 Entwicklung der hämatopoetischen Zellen während der Embryogenese	4
1.1.3 Spezifische Marker von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen	6
1.1.4 Transkriptionelle Regulation der endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung	9
1.2 Funktion der Endothelzellen und der hämatopoetischen Zellen	10
1.2.1 Endothelzellen in Interaktion mit hämatopoetischen Zellen	10
1.2.2 Die Funktion der Leukozyten in der Immunabwehr	12
1.2.2.1 Das Immunsystem	12
1.2.2.2 Die Antigenerkennung durch das unspezifische Immunsystem	13
1.2.2.3 Phagozytose von Pathogenen	14
1.3 Das <i>In-vitro</i> -Modellsystem <i>Embryoid Body</i>	17
2. Zielstellung	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Geräte	20
3.1.2 Software	21
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.4 Chemikalien	22
3.1.5 Medien/Medienzusätze	23
3.1.6 Stimulanzien/Inhibitoren/Polymermaterialien	24
3.1.6.1 Lipopolysaccharide	24
3.1.6.2 Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (M-CSF)	24
3.1.6.3 SU5416	25
3.1.6.4 FITC-gekoppelte <i>Escherichia coli</i>	25
3.1.6.5 Bioabbaubare Polymermaterialien	25
3.1.7 Zelllinien	25
3.1.7.1 CGR8	25
3.1.7.2 4T1	26
3.1.8 Reagenzien für die magnetische Zellseparation	26
3.1.9 Reagenzien für Immunfluoreszenz-Untersuchungen	27
3.1.10 Reagenzien für die Molekularbiologie	28
3.2 Methoden	30
3.2.1 Zellkultur	30
3.2.1.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen der Zelllinie CGR8	30
3.2.1.2 Generierung von <i>Embryoid Bodies</i>	30
3.2.1.3 Inkubation der <i>Embryoid Bodies</i> mit Stimulanzien und Inhibitoren	30
3.2.1.4 Kultivierung der murinen Tumorzelllinie 4T1	31
3.2.1.5 Generierung von Konfrontationskulturen in hängenden Tropfen	32
3.2.2 Magnetische Zellseparation (MACS)	32
3.2.3 Immunfluoreszenz	33
3.2.4 Bestimmung des zellulären Redox-Status	33

3.2.5	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	33
3.2.6	Durchflusszytometrische Untersuchungen	34
3.2.7	Nachweis der Genexpression	35
3.2.7.1	Isolierung der RNA	35
3.2.7.2	Herstellung der cDNA	35
3.2.7.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
3.2.7.4	<i>real time</i> PCR	36
3.3	Statistische Analyse	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	Vorstellung des <i>In-vitro</i> -Modellsystems	37
4.1.1	Vaskulo-/Angiogenese	37
4.1.2	Differenzierung von Leukozyten	38
4.1.3	Differenzierung von Erythrozyten	41
4.2	Regulation der endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung	42
4.2.1	Differenzierung flk-1-positiver Progenitorzellen	42
4.2.2	Expression endothelialer Marker in isolierten flk-1-positiven Zellen	43
4.2.3	Runx1-mRNA-Expression während der EB-Entwicklung	44
4.2.4	Expression von Runx1 in isolierten flk-1-positiven Zellen	45
4.2.5	Expression hämatopoetischer und endothelialer Marker sowie von Runx1 in isolierten CD45-positiven Leukozyten	46
4.3	Inhibierung der Angiogenese und Leukozytendifferenzierung	47
4.4	Konfrontation von <i>Embryoid Bodies</i> mit Tumorsphäroiden	49
4.4.1	Migration der Tumorzellen in den Konfrontationskulturen	49
4.4.2	Tumorinduzierte Angiogenese	50
4.4.3	Tumorinduzierte Leukozytendifferenzierung	51
4.5	Funktionalität der Leukozyten <i>in vitro</i>	52
4.5.1	Reaktion der <i>Embryoid Bodies</i> auf M-CSF	52
4.5.2	Reaktion der <i>Embryoid Bodies</i> auf Lipopolysaccharide	54
4.5.3	Funktionalität der aus <i>Embryoid Bodies</i> isolierten Leukozyten	55
4.6	Reaktion der <i>Embryoid Bodies</i> auf verschiedene Polymermaterialien	58
4.6.1	Einfluss von Polymermaterialien auf die Angiogenese in EBs	58
4.6.2	Einfluss von Polymermaterialien auf die Leukozytendifferenzierung in EBs	59
4.6.3	Einfluss von Polymermaterialien auf die M-CSF-Genexpression	61
4.6.4	Einfluss von Polymermaterialien auf die MCP-1-Genexpression	62
5.	Diskussion	63
5.1	Differenzierung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen	63
5.2	Regulation der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen	66
5.3	Inhibierung der Angiogenese und Leukozytendifferenzierung	69
5.4	Tumor-induzierte Angiogenese und Leukozytendifferenzierung	70
5.5	Funktionalität der differenzierenden Leukozyten in EBs	74
5.6	Reaktion der EBs auf verschiedene Polymermaterialien	77
5.7	Schlussfolgerung	80
6.	Literaturverzeichnis	83
7.	Appendix	I
7.1	Danksagung	I
7.2	Lebenslauf	II
7.3	Publikationen und Posterbeiträge	III
7.4	Eidesstattliche Erklärung	IV

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Entwicklung der Dottersackblutinseln im murinen Embryo. 1

Abb. 1-2: Vaskulogenese und Angiogenese in der Embryonalentwicklung. 3

Abb. 1-3: Orte der Hämatopoese während der embryonalen Entwicklung. 5

Abb. 1-4: Transmigration von Leukozyten durch das Endothelium. 11

Abb. 1-5: Antigenerkennung und -bindung auf der Zellmembran am Beispiel von LPS. 14

Abb. 1-6: Mögliche Orte der Lokalisation und Aktivität der Nox2 in Neutrophilen. 15

Abb. 4-1: mRNA-Expression von PECAM-1 und VE-Cadherin während der
EB-Entwicklung. 38

Abb. 4-2: PECAM-1-Immunfluoreszenz während der EB-Entwicklung. 38

Abb. 4-3: mRNA-Expression von CD45, CD68, CD16, Mac-1 während der
EB-Entwicklung. 39

Abb. 4-4: Immunfluoreszenz von CD45 während der EB-Entwicklung. 40

Abb. 4-5: Immunfluoreszenz von PECAM-1 und CD68 während der EB-Entwicklung. 40

Abb. 4-6: Immunfluoreszenz von Neutrophil-Antigen während der EB-Entwicklung. 41

Abb. 4-7: mRNA-Expression von β H-Globin und β major-Globin während der
EB-Entwicklung. 41

Abb. 4-8: Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl flk-1-positiver Zellen in EBs. 42

Abb. 4-9: Graphische Darstellung der Anzahl der flk-1-positiven Zellen in EBs
verschiedenen Alters. 43

Abb. 4-10: mRNA-Expression von PECAM-1 und VE-Cadherin in isolierten
flk-1-positiven Zellen. 44

Abb. 4-11: Runx1-mRNA-Expression während der EB-Entwicklung. 45

Abb. 4-12: Runx1-mRNA-Expression in flk-1-positiven Zellen. 45

Abb. 4-13: mRNA-Expression von CD45, Runx1, flk-1 und PECAM-1 in
CD45-positiven Zellen. 46

Abb. 4-14: Einfluss des VEGF-Rezeptor-Inhibitors SU5416 auf die Angiogenese in EBs. ... 47

Abb. 4-15: Einfluss von SU5416 auf die Leukozytendifferenzierung in EBs. 48

Abb. 4-16: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz von CD45, CD68 und
Neutrophil-Antigen in SU5416-inkubierten EBs. 49

Abb. 4-17: Migration von Tumorzellen in den EB. 50

Abb. 4-18: Tumorinduzierte Angiogenese ausgehend vom EB in Richtung MTS. 50

Abb. 4-19: Invasion von Leukozyten ausgehend vom EB in Richtung MTS. 51

Abb. 4-20: Quantitative Auswertung der Leukozyteninvasion ausgehend vom EB
in Richtung MTS. 52

Abb. 4-21: mRNA-Expression der Rezeptoren koloniestimulierender Faktoren während
der EB-Entwicklung. 53

Abb. 4-22: CD68-Immunfluoreszenz in M-CSF-stimulierten EBs. 54

Abb. 4-23: mRNA-Expression von CD14, Mac-1 und CD68 in LPS-stimulierten EBs. 54

Abb. 4-24: CD14-Immunfluoreszenz in isolierten LPS-inkubierten CD45-positiven Zellen. 55

Abb. 4-25: Intrazelluläre ROS-Generierung in isolierten LPS-inkubierten
CD45-positiven Zellen. 56

Abb. 4-26: Nox2-Immunfluoreszenz in isolierten LPS-inkubierten CD45-positiven Zellen. . 57

Abb. 4-27: Immunfluoreszenz von FITC-markierten *E. coli*-Partikeln in isolierten
CD45-positiven Zellen. 57

Abb. 4-28: Einfluss verschiedener Polymermaterialien auf die Angiogenese. 58

Abb. 4-29: Quantitative Auswertung der Angiogenese in mit Polymermaterialien
kultivierten EBs. 59

Abb. 4-30: Einfluss verschiedener Polymermaterialien auf die Leukozytendifferenzierung. . 60

Abb. 4-31: Quantitative Auswertung der Leukozytendifferenzierung in mit Polymermaterialien kultivierten EBs.....	60
Abb. 4-32: M-CSF-mRNA-Expression nach Kultivierung der EBs mit verschiedenen Polymermaterialien.....	61
Abb. 4-33: MCP-1-mRNA-Expression nach Kultivierung der EBs mit verschiedenen Polymermaterialien.....	62

Abkürzungsverzeichnis

AGM	Aorta-Gonad-Mesonephros
AML1	<i>acute myeloid leukemia 1</i>
ANS	1-Anillino-8-naphthalensulfonat
APCs	<i>antigen presenting cells</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BALB/c	im Labor gezüchteter Stamm der Hausmaus
bp	Basenpaar
Cbf	<i>core binding factor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMFDA	5-Chloromethylfluoresceindiacetat
DCF	Dichlorofluorescein
DCs	<i>dendritic cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	<i>Embryoid Body</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECs	<i>endothelial cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESC	<i>embryonic stem cells</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fetales bovines Serum
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
flk-1	<i>fetal liver kinase-1</i>
flt-1	<i>fms-related tyrosine kinase-1</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
GMEM	<i>Glasgow minimum essential medium</i>
HCs	<i>hematopoietic cells</i>
HSCs	<i>hematopoietic stem cells</i>
HUVECs	<i>human vascular endothelial cells</i>
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin

JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LSM	<i>laser scanning microscopy</i>
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MCP-1	<i>macrophage chemotactic protein 1</i>
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor-2</i>
MHC I/II	<i>major histocompatibility complex I/II</i>
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTS	multizellulärer Tumorsphäroid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NEA	<i>non essential amino acids</i>
Nox	NADPH-Oxidase
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS-Triton
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
Runx1	<i>runt-related transcription factor-1</i>
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
Scl	<i>stem cell leukemia gene</i>
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial cadherin</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Zusammenfassung

Murine embryonale Stammzellen (ESCs) können in Abwesenheit von *leukemia inhibitory factor* (LIF), spontan in *Embryoid Bodies* (EBs) zu Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren, somit auch zu Zelltypen mesodermalen Ursprungs wie Endothelzellen (ECs) und hämatopoetischen Zellen (HCs). Der EB ist ein *In-vitro*-Modell, mit Hilfe dessen die Regulation verschiedener Differenzierungswege untersucht werden kann. Er wird zur Testung von Chemikalien hinsichtlich ihrer Embryotoxizität angewandt. Viele publizierte Ergebnisse, die an EBs gewonnen wurden, nutzten EBs ausgehend von murinen ESCs der Zelllinie CCE, die im undifferenzierten Stadium auf *feederlayer* (Fibroblasten) kultiviert wird. Durch die Nutzung von *feederlayer* entsteht bei der Generierung von EBs eine Mischkultur aus Fibroblasten und embryonalen Stammzellen. Ergebnisse, die mit diesen Zellen gewonnen werden, können daher nicht allein auf die embryonalen Stammzellen zurückgeführt werden sondern müssen ebenfalls den Einfluss der Fibroblasten berücksichtigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie CGR8 genutzt, die allein durch die Gabe von LIF ohne *feederlayer* auskommt. Das *In-vitro*-System EB bestehend aus Zellen der Zelllinie CGR8 wurde zunächst hinsichtlich seiner endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung charakterisiert. Dabei zeigte sich ein bestimmtes zeitliches Muster der verschiedenen Differenzierungen, wonach sich Endothelzellen ab Tag 5 im EB entwickeln. Die Genexpression der verschiedenen Globine (Marker für Erythrozyten) lässt auf beginnende erythrozytäre Differenzierung ab Tag 7 schließen. Erste Leukozyten wurden im EB durch die Genexpression von CD45 ab Tag 8 und durch CD45-Immunfluoreszenz ab Tag 10 beobachtet. Dabei ließen sich durch CD68-Immunfluoreszenz Monozyten/Makrophagen von Neutrophilen, die Neutrophil-Antigen-Immunfluoreszenz zeigten, unterscheiden.

Der VEGF-Rezeptor flk-1 wird in der Literatur als Schlüsselmolekül der Regulierung mesodermaler Differenzierung beschrieben. Eine maximale Anzahl flk-1-positiver Zellen wurde zwischen Tag 5 und 7 in EBs beobachtet, wobei die Genexpression von PECAM-1 und VE-Cadherin in flk-1-positiven Zellen erhöht war, was für einen endothelialen Phänotyp dieser Zellen spricht. Des Weiteren wird der Transkriptionsfaktor Runx1 in der Literatur als molekularer Schalter zwischen der endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung beschrieben. Die Genexpression von Runx1 wurde in EBs an Tag 4 hochreguliert und von Tag 5 bis 6 und später nochmals von Tag 12 bis 13 maximal exprimiert. In flk-1-negativen Zellen zeigte sich eine zweifach höhere Runx1-Genexpression als in flk-1-positiven Zellen. Das gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass die Hochregulation von Runx1 eine Herunterregulation von flk-1 bewirkt und damit die hämatopoetische Differenzierung

ausgehend von flk-1-positiven Progenitorzellen einleitet wie schon andere Arbeitsgruppen vorschlugen. CD45-positive Zellen zeigten eine stark hochregulierte Runx1-Genexpression, was für eine anhaltende Funktion von Runx1 in Leukozyten spricht.

Die Inhibierung von flk-1 durch SU5416 zeigte eine fehlende Entwicklung von vaskulären PECAM-1-positiven Strukturen sowie eine verminderte Leukozytenzahl in EBs, was wiederum bestätigt, dass flk-1-positive Zellen Progenitoren für endotheliale und hämatopoetische Differenzierung darstellen.

Es wurde festgestellt, dass Tumorzellen einen Einfluss auf die endotheliale und hämatopoetische Differenzierung ausüben. In Konfrontationskulturen zwischen EBs und multizellulären Tumorsphäroiden (MTS) wurde eine Vaskularisierung des Tumorgewebes innerhalb von vier Tagen beobachtet. Außerdem zeigte sich eine erhöhte Leukozytenzahl schon nach zweitägiger Konfrontation von EBs mit MTS.

Aufgrunddessen wurde untersucht, ob die im EB differenzierenden Leukozyten trotz ihres embryonalen Status Funktionalität besitzen. Zum einen wurde die Reaktion der EBs auf hämatopoetische Wachstumsfaktoren untersucht, wobei sich eine erhöhte Monozyten/Makrophagen-Differenzierung als Antwort auf die Inkubation der EBs mit Makrophagenkoloniestimulierendem Faktor (M-CSF) zeigte. Zum anderen wurden EBs und die in EBs differenzierenden Leukozyten mit bakteriellen Komponenten inkubiert und ihre immunologische Reaktion ausgewertet. EBs, die mit Lipopolysacchariden (LPS) kultiviert wurden, zeigten eine konzentrationsabhängige Erhöhung der CD14- und Mac-1-Genexpression. Aus EBs separierte CD45-positive Leukozyten zeigten eine unveränderte CD14- sowie Nox2-Expression nach Inkubation mit LPS, jedoch wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in den mit LPS-inkubierten CD45-positiven Leukozyten erhöht. Außerdem zeigten die separierten Leukozyten Phagozytose-Aktivität, was durch Aufnahme von FITC-gekoppelten inaktivierten *E. coli* gezeigt wurde.

EBs werden seit dem im Jahr 2000 validierten und anerkannten *embryonic stem cell test* (EST) zur Einschätzung des embryotoxischen Potentials von Chemikalien genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der EB auch zur Feststellung der Eignung von Polymermaterialien als *Scaffold*-Material im *Tissue Engineering* eingesetzt werden kann. Diese Untersuchungen zeigten, dass der EB durchaus eine wertvolle erste Bewertung von Polymeren liefern kann. Es sind jedoch weiterführende Experimente notwendig, um eine Etablierung des EBs zur Einschätzung von Polymeren als *Scaffolds* zu erreichen.

Summary

Murine embryonic stem cell (ESC) derived embryoid bodies (EB) spontaneously differentiate into cell types of all three germ layers. Thus, mesodermal cells like endothelial and hematopoietic cells were found in EBs. The EB is a suitable *in vitro* model to understand the regulation of differentiations or to analyze the embryotoxic potential of various chemicals. Many published data about differentiation in EBs were generated using murine ESCs cultivated on feederlayer which gives an unpure population of fibroblasts and ESCs in the EB. This is problematic because results generated in these EBs have to be discussed regarding the influence of the fibroblasts. In this study, the embryonic stem cell line CGR8 cultivated without feederlayer was used.

This descriptive dissertation first characterized the differentiation of endothelial and myeloid hematopoietic cells in EBs derived from CGR8 ESCs. Thereby, a certain age-dependent pattern of differentiation was observed. The endothelial cells developed beginning at day 5 followed by the differentiation of erythrocytes initiated at day 7 (shown by the gene expression of the immature β H-globin). The first leukocytes were detected in the EBs by the gene expression of CD45 at day 8 and by CD45 immunofluorescence at day 10. Monocytes/macrophages and neutrophils could be distinguished by immunofluorescence of CD68 (marker for macrophages) and neutrophil antigen (marker for neutrophils).

The VEGF receptor flk-1 was described in literature as a key molecule regulating mesodermal differentiation. The maximum amount of flk-1 positive cells was observed from day 5 to 7. The gene expression of PECAM-1 and VE-cadherin was increased in flk-1 positive cells so that these cells showed an endothelial phenotype. Furthermore, Runx1 is seen as a transcription factor regulating the transition from an endothelial to a hematopoietic cell. The gene expression of Runx1 was upregulated in 4-days-old EBs and maximal expressed in EBs from day 5 to 6 and 12 to 13. Flk-1 negative cells showed an increased Runx1 gene expression, so it seems that an upregulation of Runx1 results in a downregulation of flk-1. This initiates the differentiation of hematopoietic cells from flk-1 positive progenitors. The Runx1 expression was high in CD45 positive cells so that Runx1 has possible functions in mature leukocytes.

The inhibition of flk-1 through SU5416 resulted in an impaired development of PECAM-1 positive vascular structures and in a reduced leukocyte number in EBs indicating that flk-1 positive cells are progenitors of both, endothelial and hematopoietic cells.

In confrontation cultures between EBs and multicellular tumor spheroids (MTS), vascularisation of the tumor tissue was observed within 4 days. The amount of leukocytes was strongly upregulated in confrontation cultures compared to EBs alone.

The functionality of the embryonic hematopoietic cells was examined by incubation of EBs with lipopolysaccharides (LPS) which induced an upregulation of CD14 and Mac-1 in a concentration-dependent manner. Then, CD45 positive cells were separated out of EBs and the expression of CD14 and NADPH oxidase 2 (Nox2) as well as the production of reactive oxygen species were analyzed. Besides, CD45 positive leukocytes showed phagocytic activity as shown by uptake of FITC-labelled inactivated *E. coli* particles. Hence, the differentiating leukocytes in EBs are functional.

Since 2000, the EB is a validated and accepted *in vitro* model to study the embryotoxic potential of substances. In this dissertation, it was examined whether the EB could be used to test the applicability of polymers as scaffold materials in tissue engineering. Parameters for the evaluation were the influence of the tested polymer materials on the angiogenesis, the monocyte/macrophage differentiation and the M-CSF and MCP-1 gene expression. These experiments showed that the EB is a suitable *in vitro* model to give a hint whether a polymer material could be utilized as scaffold material but more effort has to be done to establish the EB for such a decision procedure.

1. Einleitung

1.1 Vaskulo-/Angiogenese und Hämatopoese während der Embryonalentwicklung der Maus

1.1.1 Vaskulogenese und Angiogenese während der Embryogenese

Das embryonale Wachstum und die Differenzierung der Maus hängen vom Metabolit- und Sauerstofftransport durch das frühe Gefäßsystem ab. Die Morphogenese des Embryos wird durch hämodynamische Kräfte des schlagenden Herzens beeinflusst (Risau und Flamme, 1995). Das kardiovaskuläre System ist eines der ersten Organe, die sich im Embryo entwickeln. Es entsteht durch die Proliferation und Migration von Angioblastenvorläuferzellen sowie deren Differenzierung in Endothelzellen (ECs). Bereits 1961 wurde durch Christiansen und Bacon gezeigt, dass die ersten ECs, die im gastrulierenden Embryo entstehen, sich aus dem lateralen und posterioren Mesoderm im Dottersack bilden. Der murine Dottersack ist ein zweischichtiges Organ, welches sich aus extraembryonalen mesodermalen Zellen und angrenzenden viszeralen endodermalen Zellen zusammensetzt. Die embryonale Entwicklung ist abhängig von der Funktionstüchtigkeit des Dottersacks, da die endodermale Schicht maternale Makromoleküle transportiert und metabolisiert, Serumproteine synthetisiert und sich aus der mesodermalen Schicht die ersten Blutinseln bilden (Jollie, 1990). Das viszerale Endoderm dient als Quelle induktiver Signale, die wichtig für die Bildung von hämatopoetischen Zellen und endothelialer Netzwerke im Dottersack sind (Belaoussoff et al., 1998).

Extraembryonale Angioblastenvorläuferzellen migrieren in den Dottersack und bilden dort Zellkonglomerate, die um den embryonalen Tag E7.0-7.5 im viszeralen Dottersack beobachtet

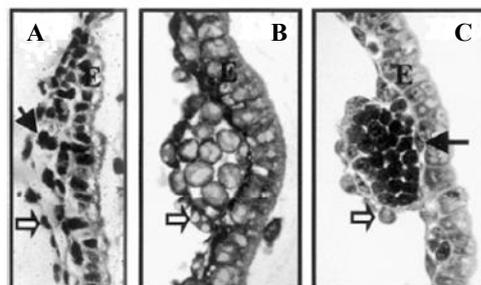


Abb. 1-1: Entwicklung der Dottersackblutinseln im murinen Embryo.

Die Blutinseln bilden sich zwischen den Zellschichten der endodermalen Zellen (E) und mesodermalen Zellen (weißer Pfeil) des Dottersacks aus undifferenzierten extraembryonalen mesodermalen Zellen (Bild A, schwarzer Pfeil). Die inneren Blutzellen werden von einer äußeren endothelialen Schicht umgeben (Bild C, schwarzer Pfeil; Palis und Yoder, 2001).

werden (Haar und Ackerman, 1971). Zwischen Tag E8.0 und E9.0 nehmen die äußeren Zellen der Blutinseln (Angioblasten) eine Spindelform an und differenzieren zu ECs (Risau und Flamme, 1995), wie in Abb. 1-1 gezeigt wird. Kurz nachdem die extraembryonalen mesodermalen Zellen erscheinen, werden die ersten intraembryonalen Angioblasten beobachtet (Risau und Flamme, 1995). Durch Fusion der Angioblasten bildet sich ein einfaches Kreislaufsystem, das sich aus dem primitiven Herzen, den dorsalen und ventralen Aorten und dem primären vaskulären Plexus im Dottersack zusammensetzt (Drake und Fleming, 2000). Dieser erste Prozess der *De-novo*-Entstehung von Blutgefäßen wird Vaskulogenese genannt und setzt sich aus den folgenden Schritten zusammen (Risau und Flamme, 1995, Drake, 2003):

- 1) Bildung von Blutinseln
- 2) Entstehung von Angioblasten aus den äußeren Zellen der Blutinseln
- 3) Aggregation der Angioblasten
- 4) Elongation der Angioblasten in schnurartige Strukturen
- 5) Organisation von isolierten vaskulären Segmenten in ein kapillares Netzwerk
- 6) Endothelialisierung und Lumenbildung.

Die wichtigsten vaskulogenen und angiogenen Prozesse im murinen Embryo ereignen sich zwischen den embryonalen Tagen E8.0 und E10.0, während deren sich das frühe Gefäßsystem in ein komplexes feinstrukturiertes, dreidimensionales Herz-Kreislaufsystem entwickelt (Walls et al., 2008). Die aus den Blutinseln differenzierenden Endothelzellen bilden den kapillaren Plexus (Abb. 1-2), der die beginnende Zirkulation einleitet. Innerhalb des Embryos entstehen zahlreiche Kapillaren und vier Hauptgefäße. Bei diesen handelt es sich um die gepaarten dorsalen und ventralen Aorten, die später in der Entwicklung zu jeweils einer dorsalen und einer ventralen Aorta fusionieren. Sobald das Herz schlägt und dadurch ein Blutfluss entsteht, wird der kapillare Plexus des Dottersacks rapide zu Arterien und Venen umgestaltet. Ein funktionelles Kreislaufsystem wird etabliert, durch welches die inneren Zellen der Blutinseln, die zu hämatopoetischen Zellen differenzieren, transportiert werden. Dieser Blutfluss ist für das Überleben des Embryos essenziell. Das arterielle Blut, das vom Herzen kommt, wird durch die dorsale Aorta gepumpt und durchläuft den Dottersack durch die Dottersackarterie. Um zum Herzen zurückzukehren, fließt das Blut durch die periphere Sinusvene sowie den anterioren venösen Plexus. Das Blut kann aber auch direkt zum Herzen zurückfließen. Visuelle Beobachtungen zeigen, dass in diesem Stadium arterielles und venöses Blut durch denselben vaskulären Kanal fließen (Eichmann et al., 2005). Während der Bildung der großen Dottersackarterie aus dem primären kapillaren Plexus werden nicht alle

Kapillaren in diese Röhre integriert und einige kleine Seitenkapillaren werden durch Perfusion reguliert abgekoppelt. Der wachsende Fluss im Hauptgefäß führt zu einer Durchmesserverkleinerung und Blockierung des Lumens der Seitenkapillaren. Diese abgekoppelten Gefäße werden zu den embryonalen Venen der Sekundärzirkulation umgestaltet, die dorsal und parallel zu den Arterien entstehen. Die abgekoppelten Seitenkapillaren wachsen dorsal und perpendikulär zu den Arterien aus, um den Kreislauf zu schließen (Eichmann et al., 2005).

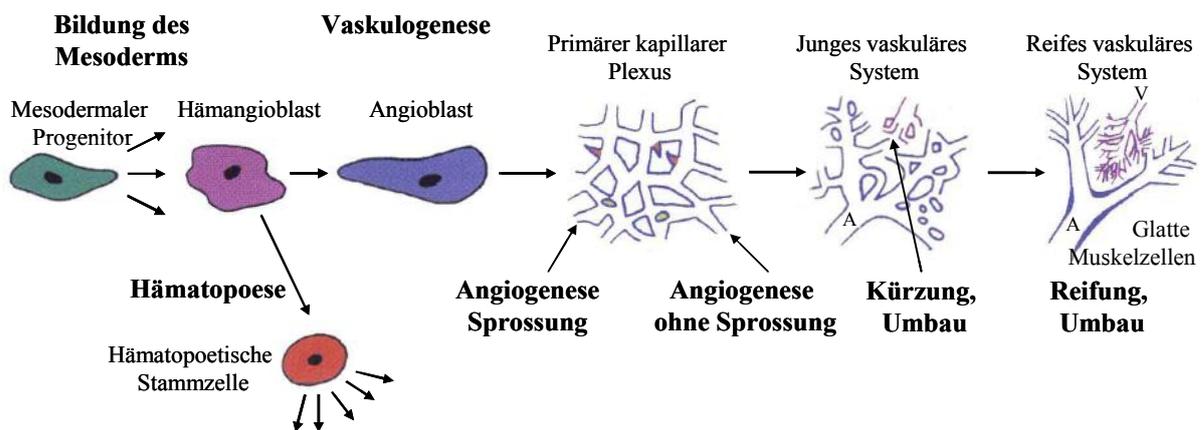


Abb. 1-2: Vaskulogenese und Angiogenese in der Embryonalentwicklung. Umbau und Reifungsprozesse des vaskulären Systems sind abhängig vom Gewebe- oder Organkontext. A: Arteriole, V: Venole. Die reifen vaskulären Gefäße werden von glatten Muskelzellen und Perizyten umgeben (modifiziert nach Risau, 1997).

Es werden zwei Prozesse der *De-novo*-Blutgefäßbildung unterschieden: die Vaskulogenese ohne Hämatopoese und die Hämatopoese-gekoppelte Vaskulogenese (Risau und Flamme, 1995, Drake, 2003). Der erstgenannte Prozess wird meist mit der intraembryonalen, der letztgenannte eher mit der Blutgefäßbildung in extraembryonalen Regionen in Verbindung gebracht, obwohl sich die Vaskulogenese ohne Hämatopoese bis in extraembryonale Regionen ausbreitet und die mit der Hämatopoese assoziierte Vaskulogenese intraembryonal als Teil der epikardialen Koronarblutgefäßbildung stattfindet (Drake und Fleming, 2000).

Während sich der primäre vaskuläre Plexus herausbildet, sind frühe Zeichen seiner Umgestaltung, besonders innerhalb des Embryos, sichtbar. Diese Netzwerkumgestaltung bedeutet eine Neuordnung der vaskulären Segmente ohne messbare Expansion (Patan, 1998). Die vaskuläre Fusion reduziert die Zahl der Segmente und längere Gefäße können entstehen. Diese Prozesse führen zur Transformation in einen sekundären Plexus, der komplexer strukturiert ist als der primäre. Die weitere Expansion des primären und sekundären vaskulären Plexus wird durch Angiogenese erreicht, welche neue Gefäße ausgehend von bestehenden bildet (Risau, 1997). Durch die beginnende Angiogenese entsteht

ein komplexes Netzwerk aus Endothelzellen mit unterschiedlichen Durchmessern, Längen und Identitäten (Walls et al., 2008). Der Umgestaltungsprozess wird durch genetische Faktoren und hämodynamische Kräfte reguliert (Lucitti et al., 2007).

Die extraembryonalen vaskulären Gefäße des murinen Embryos lassen sich in umbilikale und Dottersackgefäße einteilen. Erstere verbinden den Embryo mit der föto-maternalen Schnittstelle in der Plazenta, während letztere den Embryo mit dem Dottersack verbinden (Walls et al., 2008). Die Dottersackarterie verbindet den Dottersack mit der Anschlussstelle der gepaarten dorsalen Aorta am posterioren Ende des Embryos an Tag E8.5. Nach der Drehung verlässt die Dottersackarterie den Embryo posterior zum sich entwickelnden Herzen und fusioniert mit der Dorsalaorta an Tag E10.5 (Garcia-Porrero et al., 1995, Wood et al., 1997). Die umbilikale Arterie wird durch Vaskulogenese in der Allantois an Tag E7.5 initiiert (Inman und Downs, 2007) und stellt einen Ort der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen dar (de Bruijn et al., 2000). Sie fusioniert mit der gepaarten Dorsalaorta (Inman und Downs, 2007) und bleibt während der gesamten embryonalen Stadien ein extraembryonales Gefäß (Walls et al., 2008). Ungefähr an Tag E9.0-9.5 beginnt der föto-maternale Blutfluss und der Embryo wird von der Plazenta abhängig (Mu und Adamson, 2006).

1.1.2 Entwicklung der hämatopoetischen Zellen während der Embryogenese

Morphologisch charakteristische primitive hämatopoetische Zellen (HCs) werden zuerst in den Blutinseln des Dottersacks an Tag E7.5 (Haar und Ackerman, 1971) der murinen Embryonalentwicklung beobachtet. Diese bestehen aus Gruppen von großen kernhaltigen basophilen Zellen, die von einer Schicht Endothelzellen (Angioblasten) umgeben sind (Haar und Ackerman, 1971). Der Terminus „primitive Hämatopoese“ behandelt die ersten im Dottersack entstehenden erythroiden Progenitoren während der Terminus „definitive Hämatopoese“ auf alle Blutzellen außer den primitiven Erythroiden angewandt wird (Keller et al., 1999). Diese primitiven Erythroblasten des Dottersacks sind große Zellen mit dem 5- bis 10-fachen Volumen von adulten Erythrozyten (Kingsley et al., 2004). Das endotheliale Netzwerk des Dottersacks fusioniert um vaskuläre Kanäle zu bilden und sobald das Herz (ca. an Tag E8.5) zu schlagen beginnt, zirkulieren die primitiven Erythroblasten durch den gesamten Embryo. Diese sind unentbehrlich für das Überleben des Embryos bis die Leber die ersten zirkulierenden definitiven Erythrozyten an Tag E12.0 generiert (Copp, 1995). Die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen findet während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Organen statt, die in Abb. 1-3 dargestellt sind. Neben den primitiven

erythroiden Zellen wurden auch definitive erythroide Zellen und Makrophagenkolonien im Dottersack nachgewiesen (Palis et al., 2001). Es wurden aber auch andere myeloide Progenitoren, z. B. Mastzellen und Granulozyten/Makrophagen-koloniebildende Zellen, aus dem Dottersack eines späteren Stadiums kultiviert (Palis et al., 1999). Neben dem Dottersack gibt es einen zweiten, intraembryonalen Ort der *De-novo*-Entstehung von multipotenten hämatopoetischen Zellen im murinen Embryo, bekannt als Aorta-Gonaden-Mesonephros-(AGM)-Region (Godin et al., 1995, Medvinsky et al., 1993). Diese Region enthält an Tag E10.5-11.5 HCs, die in verschiedene Zelltypen differenzieren (Medvinsky und Dzierzak, 1996).

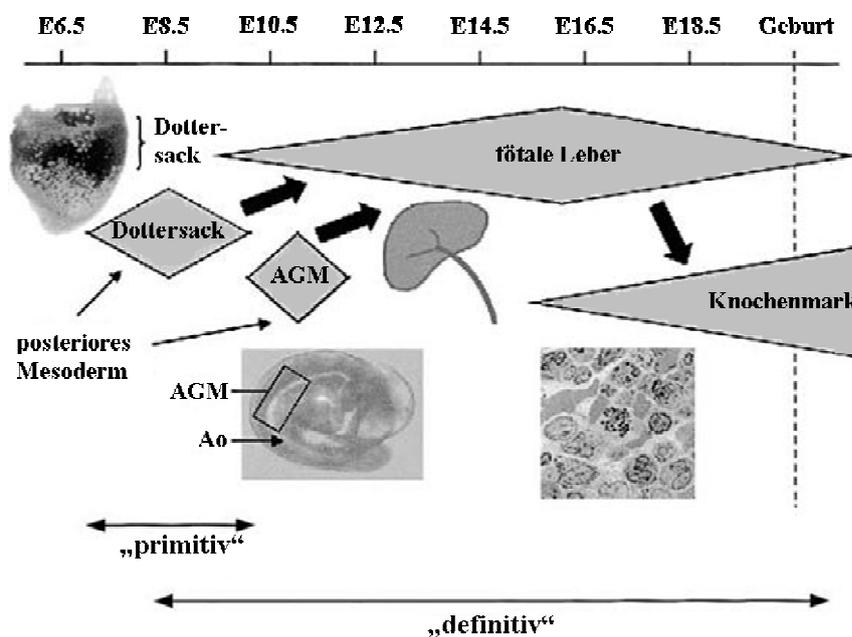


Abb. 1-3: Orte der Hämatopoese während der embryonalen Entwicklung.

Die frühesten hämatopoetischen (primitiven) Zellen entstehen im Dottersack. Die primitive Hämatopoese beinhaltet nur erythroide Progenitoren. Definitive hämatopoetische Stammzellen mit dem Potenzial in alle hämatopoetischen Zelltypen zu differenzieren, bilden sich in der AGM-Region sowie im Dottersack und migrieren in die fötale Leber, wo sie sich der terminalen Differenzierung unterziehen. Die fötale Leber bleibt das wichtigste hämatopoetische Organ bis zur Zeit der Geburt, zu der das Knochenmark die Funktion der fötalen Leber übernimmt (Baron, 2003).

Nach Erscheinen der primitiven hämatopoetischen Zellen im Dottersack wird die Leberanlage, die sich an Tag E9.0 bildet, an Tag E10.0 von hämatopoetischen Zellen besiedelt. Die noch kernhaltigen primitiven Erythroblasten migrieren aus dem Dottersack und durchlaufen in der fötalen Leber Reifephasen, in denen sich aus Proerythroblasten, welche an Tag E8.5 sichtbar werden, an Tag E11.5 polychromatophile Erythroblasten entwickeln (Kingsley et al., 2004). Zwischen Tag E11.5 und E12.5 befinden sich die ersten kernlosen Erythrozyten im Kreislaufsystem. Diese definitiven Erythrozyten aus der fötalen Leber

entwickeln sich ab Tag E14.5 zur vorherrschenden Erythrozytenpopulation (Kingsley et al., 2004). Die Leber wird somit zum prinzipiellen fötalen hämatopoetischen Organ.

Ab Tag E10.5 werden der fötale Thymus sowie ab Tag E12.5 die fötale Milz von hämatopoetischen Progenitoren besiedelt (Godin et al., 1999). Vor diesem Zeitpunkt wird die lymphoide Differenzierung nicht initiiert. Aus der fötalen Leber übersiedeln hämatopoetische Progenitoren ca. an Tag E15.0 in das Knochenmark (Delassus und Cumano, 1996, Zanjani et al., 1993). Kurz nach der Geburt an Tag E19.0-21.0 wird das Knochenmark zum hauptsächlichen Ort der Produktion von hämatopoetischen Stammzellen für die gesamte Lebenszeit der Maus.

HSCs besitzen sowohl die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern als auch in alle hämatopoetischen Zelltypen zu differenzieren. Daher können sie Mäuse, deren Hämatopoese z. B. durch Verstrahlung gestört ist, neu besiedeln und für kurze oder lange Zeit heilen. Murine hämatopoetische Progenitoren, die aus dem Dottersack an Tag E11.0 isoliert werden, können in die verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen nach *In-utero*-Transplantation in murinen Embryos differenzieren (Ohmura et al., 2001). Werden sie in verstrahlte Mäuse, deren Blutbildung aufgrund radioaktiver Strahlung gestört ist, oder in immundefiziente Mäuse transplantiert, differenzieren sie zu reifen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (Palacios und Imhof, 1993, Paige et al., 1979), Phagozyten (Moore und Metcalf, 1970) und erythroiden Zellen (Toles et al., 1989). HSCs, die an Tag E10.0 in der AGM-Region des Embryos identifiziert wurden, haben ebenfalls die Fähigkeit zur Langzeitbesiedelung verstrahlter Mäuse (Muller et al., 1994, Medvinsky und Dzierzak, 1996).

1.1.3 Spezifische Marker von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen

Die zeitlich als auch räumlich nahe Verbindung der Vaskulogenese mit der Entwicklung von hämatopoetischen Zellen führte zu der Hypothese, dass sich die beiden Zelltypen ausgehend von einem gemeinsamen Progenitor, dem Hämangioblast, entwickeln. Dieser gemeinsame Vorläufer wurde in *Embryoid Bodies* (EBs) identifiziert, die sich von murinen embryonalen Stammzellen (ESC) ableiten (Kennedy et al., 1997). Neben ihrer gemeinsamen Entwicklung in den mesodermalen Blutinseln, exprimieren hämatopoetische und endotheliale Vorläuferzellen eine Reihe von Genen gleichermaßen, z. B. *fetal liver kinase* (flk)-1 (Millauer et al., 1993), CD34 (Young et al., 1995), *stem cell leukemia gene* (Scl) (Elefanty et al., 1999), *fms-related tyrosine kinase* (flt-1) (Fong et al., 1996), GATA-2 (Orkin, 1992), *runt-related transcription factor* (Runx1, syn. Cbfa2) (North et al., 1999) und *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1 (Albelda et al., 1990). Von allen aufgeführten Genen

verursacht nur eine Mutation im *flk-1*-Gen die völlige Abwesenheit von hämatopoetischen und endothelialen Zelltypen *in vivo* (Shalaby et al., 1995).

Die vorliegende Arbeit nutzt verschiedene Marker zur Identifizierung von Endothelzellen, Erythrozyten und Leukozyten. So wurden die Expressionen von PECAM-1 und *vascular endothelial* (VE)-Cadherin, welche für Endothelzellen charakteristisch sind, untersucht. CD45 (pan-Leukozyten-Antigen), CD68 (Makrosialin), Neutrophil-Antigen, CD16 (Fc γ -Rezeptor III) und Mac-1 wurden für die Identifizierung von Leukozyten herangezogen. β H-Globin und β *major*-Globin dienten als Marker für die erythroide Differenzierung. Des Weiteren wurde die Expression von *flk-1* und *Runx1* für Aussagen zur Regulation der Hämatopoese analysiert.

Flk-1, der *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Rezeptor 2, spielt im Embryo eine Schlüsselrolle bei der Regulation der vaskulären und hämatopoetischen Entwicklung. Im murinen Embryo wird die *flk-1*-Expression in den Blutinseln des Dottersacks erstmals an Tag E7.0 detektiert (Yamaguchi et al., 1993). Drake und Fleming (2000) zeigen, dass Angioblasten der frühen Blutinseln an Tag E7.0 *flk-1*-positiv sind, in den inneren Zellen der Blutinseln jedoch keine *flk-1*-Expression stattfindet. Flk-1-defiziente murine Embryos entwickeln keine Blutgefäße oder Blutinseln im Dottersack und sterben an Tag E8.5-9.5 (Shalaby et al., 1995).

PECAM-1 (CD31), ein Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie, das vorwiegend auf der Oberfläche von Endothelzellen, aber auch auf zirkulierenden Thrombozyten, Monozyten und Neutrophilen exprimiert wird, ist ein Hauptbestandteil der endothelialen interzellulären Kontakte (Albelda et al., 1990, Muller et al., 1993), bei denen mehr als 10^6 PECAM-1-Moleküle konzentriert vorliegen (Newman, 1994). Die Expression von PECAM-1 wird in murinen Embryos ab Tag E7.8 in Angioblasten beobachtet, an Tag E8.3 sind die cranialen und caudalen Regionen der Aorta PECAM-1-positiv (Drake und Fleming, 2000). Eine starke PECAM-1-Expression ist assoziiert mit Gefäßsegmenten, die ein definiertes Volumen aufweisen, während Gefäße des primären vaskulären Plexus eine weniger starke Expression zeigen (Drake und Fleming, 2000). PECAM-1 spielt eine entscheidende Rolle in der Adhäsionskaskade, die zur Extravasation von Leukozyten während inflammatorischer Prozesse führt. Muller et al. (1993) zeigen *in vitro*, dass Monozyten oder Neutrophile, die mit Antikörpern spezifisch gegen PECAM-1 vorinkubiert wurden, ihre Migration durch die endotheliale Zellschicht einstellen. Das deutet darauf hin, dass PECAM-1-Moleküle sowohl auf der Endothelzell- als auch auf der Leukozytenoberfläche am Transmigrationsprozess mitwirken.

VE-Cadherin (CD144) ist ein Mitglied der großen Familie der Transmembranadhäsionsproteine genannt Cadherine. Es ist endothelzellspezifisch und spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Organisation der *adherence junctions* (Dejana, 1996). Im Embryo wird VE-Cadherin ab Tag E8.0 während der vaskulären Entwicklung exprimiert, wobei es aber auf längere Gefäße beschränkt ist und auf der dorsalen Aorta identifiziert wird (Drake und Fleming, 2000).

CD45 ist eine rezeptorartige Protein-Tyrosin-Phosphatase, die verstärkt auf der Zelloberfläche aller kernhaltigen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Die Expression von CD45 wird mit zunehmender zellulärer Reifung hochreguliert (Hermiston et al., 2003). CD45 wird stark reguliert, zeigt komplexe Muster in der Isoform-Expression (Hermiston et al., 2003) und spielt eine zentrale Rolle in der Antigen-Rezeptor-Signaltransduktion (Holmes, 2006). In humanen und murinen Individuen resultiert die Dysfunktion von CD45 in einem schweren kombinierten Immundefizienz-(SCID)-Phänotyp (Kung et al., 2000, Byth et al., 1996). Studien, in denen *antisense*-Oligonukleotide oder monoklonale Antikörper gegen CD45 eingesetzt wurden, zeigten eine Beteiligung von CD45 bei dem phagozytären *respiratory burst*, der Chemotaxis von Neutrophilen sowie proliferativen Antworten auf *granulocyte/macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und Interleukin (IL)-3 (Hermiston et al., 2003).

CD68 (Makrosialin) ist ein glykosyliertes 87-115 kDa Transmembranprotein, welches hauptsächlich auf Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie exprimiert wird (Rabinowitz und Gordon, 1991). In Makrophagen ist CD68 vorwiegend in Lysosomen und Endosomen lokalisiert und erneuert sich ständig auf der Zelloberfläche (Kurushima et al., 2000). Die genaue Funktion von CD68 ist noch nicht bekannt, es wird jedoch als Mitglied der lysosomal/endosomal-assoziierten membranständigen Glykoprotein-Familie sowie der *Scavenger*-Rezeptor-Familie beschrieben, die eine Reihe von anionischen Makromolekülen einschließlich des oxidierten *low density lipoprotein*, apoptotische Zellen und Oberflächenantigene von Mikroorganismen erkennen (Ramprasad et al., 1995). Da CD68 vorwiegend in Endosomen exprimiert wird, wurde ihm eine Rolle in der Phagozytose, Antigenpräsentation und Protektion von Membranbestandteilen gegenüber Produkten der lysosomalen Hydrolasen zugeschrieben (Wong et al., 2005).

CD16, der Fc γ III-Rezeptor, wird auf der Zelloberfläche von myeloiden aber auch lymphoiden Leukozyten exprimiert und ist mitverantwortlich für die zelluläre Zytotoxizität der CD16-exprimierenden Effektorzellen nach Bindung von CD16-Molekülen an IgG-Molekülen auf den sensibilisierten Zielzellen (Lynch, 2000).

Mac-1 ist ein Komplementrezeptor bestehend aus CD11b und CD18 auf der Zelloberfläche von Neutrophilen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen (Arnaout, 1990). Dieser Rezeptor erkennt und bindet Moleküle, die auf der Oberfläche von invadierenden Bakterien exprimiert werden (Petty und Todd, 1996). Die Bindung solcher Moleküle bewirkt Phagozytose und Zerstörung der invadierenden Zelle. Mac-1 spielt als Integrin eine Rolle bei der zellulären Adhäsion und Zell-Zell-Interaktionen einer Reihe von Zelltypen wie zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Springer, 1990).

1.1.4 Transkriptionelle Regulation der endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung

Einige der Transkriptionsfaktoren, die für die frühe Entwicklung von Endothelzellen wichtig sind, spielen ebenfalls eine große Rolle für die hämatopoetische Differenzierung, z. B. Scl, ein Mitglied der Helix-loop-helix-Familie, das für die Differenzierung in ECs sowie HCs essenziell ist (Bloor et al., 2002). Es wird ab Tag E6.5 in extraembryonalen Regionen und intraembryonal ab Tag E7.0 in Angioblasten und hämatopoetischen Progenitoren exprimiert, wobei die Scl-Expression mit zunehmender Reifung der ECs in diesen herunterreguliert und gleichzeitig in hämatopoetischen Progenitoren hochreguliert wird (Drake und Fleming, 2000). Murine Embryos mit einer Nullmutation von Scl sterben an Tag E10.0 an einer Anämie, da keine primitiven hämatopoetischen Zellen gebildet werden. Dasselbe Ergebnis zeigten auch Studien an Zebrafischen (Patterson et al., 2005), wobei zudem festgestellt wurde, dass Scl nicht an der initialen Spezifizierung von ECs beteiligt ist. Normalerweise findet Vaskulogenese im frühen Dottersack statt, aber Dottergefäße entwickeln sich nicht in murinen Scl-defizienten Embryos (Robb et al., 1995, Visvader et al., 1998).

Der Transkriptionsfaktor GATA-2 ist ebenfalls ein wichtiger Regulator von hämatopoetischen sowie endothelialen Genen. GATA-2 ist der am häufigsten exprimierte Faktor der GATA-Transkriptionsfamilie in Endothelzellen (Lee et al., 1991). Weiterhin zeigen Experimente an ESCs die Bedeutung von GATA-2 in der Entwicklung von flk-1⁺/Scl⁺ hämangioblastenartigen Zellen und der Induktion von endothelspezifischen Genen (Lugus et al., 2007).

Für den erythroiden Transkriptionsfaktor GATA-1 wurden Bindestellen in allen erythroid-spezifischen Genen gefunden, z. B. in Globin-Genen (Orkin, 1992). Durch *knockout*-Studien wurde gezeigt, dass GATA-1 eine essenzielle Rolle in der erythroiden Entwicklung spielt. ESCs mit einer GATA-1-Nullmutation bilden keine reifen erythroiden Zellen in chimären Mäusen, obwohl sie in Leukozyten und andere Gewebe differenzieren können (Pevny et al., 1991). Auch *In-vitro*-Studien zeigen durch GATA-1-*knockout* eine Inhibierung der primitiven

Erythropoese, wie sie im Dottersack stattfindet (Weiss et al., 1994). Im Gegensatz dazu entwickeln sich aus ESC mit GATA-1-Nullmutation *in vitro* definitive erythroide Kolonien, die sich jedoch im Stadium des Proerythroblasten nicht weiterentwickeln und sterben (Weiss et al., 1994). Fujiwara et al. (1996) zeigen, dass GATA-1-defiziente Mäuse schwerwiegende Veränderungen der primitiven Hämatopoese aufweisen. Auch zeigen GATA-2^{-/-}-Mäuse Defekte in der primitiven Erythropoese und sterben an schwerer Anämie (Tsai et al., 1994). Einige Transkriptionsfaktoren regulieren die definitive Hämatopoese, haben jedoch keinen Einfluss auf die primitive Blutentstehung. Runx1 (syn. Cbfa2) und Cbfb kodieren zwei Untereinheiten des *Core binding factor*, der für die definitive Hämatopoese notwendig ist. Nullmutationen dieser Gene verhindern die definitive, jedoch nicht die primitive Hämatopoese (Okuda et al., 1996). Embryos mit Runx1-Nullmutation enthalten keine definitiven hämatopoetischen Progenitoren in der fötalen Leber oder im zirkulierenden Blut. Runx1 wird im Endothelium der Aorta, des Dottersacks und in den umbilikalischen Arterien sowie in intraarteriellen hämatopoetischen Zellclustern exprimiert und ist erforderlich für die Bildung dieser Zellkonglomerate (North et al., 1999).

1.2 Funktion der Endothelzellen und der hämatopoetischen Zellen

1.2.1 Endothelzellen in Interaktion mit hämatopoetischen Zellen

Das Endothelium ist für vaskuläre Hämostase verantwortlich. Es reguliert den Vasotonus und den Blutfluss. Zusätzlich spielt es eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, der physiologischen und pathophysiologischen Angiogenese sowie der lokalen Abwehr von Pathogenen (Aird, 2005). In inflammatorischen Prozessen ist die Transmigration von Leukozyten durch das Endothelium ein entscheidendes Ereignis (Abb. 1-4A). Die Migration von Leukozyten aus dem vaskulären Lumen in das entzündete Gewebe ist essenziell für die unspezifische und die adaptive Immunantwort (Dejana, 2004). Der Prozess der Leukozytentransmigration wird durch die Generierung von inflammatorischen Mediatoren – Chemokine und Cytokine – sowie die Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen auf den ECs initiiert. Die Transmigration von Leukozyten durch das Endothelium kann auf dem parazellulären oder transzellulären Weg erfolgen. Der transzelluläre Weg definiert die Passage der Leukozyten durch das endotheliale Zytoplasma, wahrscheinlich durch das vesikuläre oder kanalikuläre System. Dieser Weg wurde morphologisch im Detail durch Feng et al. (1998) *in vivo* und durch Carman et al. (2007) *in vitro* beschrieben, jedoch ist über involvierte molekulare Strukturen wenig bekannt. Folgen die Leukozyten dem parazellulären

Weg, durchqueren sie das Endothelium durch die Grenze zweier benachbarter Endothelzellen, was als Diapedese bezeichnet wird. Dieser Prozess verläuft sehr schnell und eine schnelle Wiederherstellung der Zell-Zell-Kontakte beugt einer erhöhten Permeabilität des Endotheliums vor. Adhäsionsmoleküle, die an diesem Prozess beteiligt sind, sind u. a. PECAM-1, *junctional adhesion molecules* (JAM) JAM-A, JAM-C und CD99 (Dejana, 2004, Woodfin et al., 2007). In Monozyten und Neutrophilen, die durch das Endothelium transmigrieren, wurde ebenfalls PECAM-1-Expression detektiert (Muller et al., 1993). Die Migration wird u. a. durch homophile PECAM-1-Interaktionen auf den endothelialen Zell-Zell-Kontakten gewährleistet. Während der leukozytären Migration (Abb. 1-4B) wird VE-Cadherin transient von den endothelialen Zell-Zell-Kontakten entfernt (Allport et al., 1997), während PECAM-1 und JAMs auf der endothelialen Zell-Zell-Verbindung konzentriert werden (Dejana, 2004).

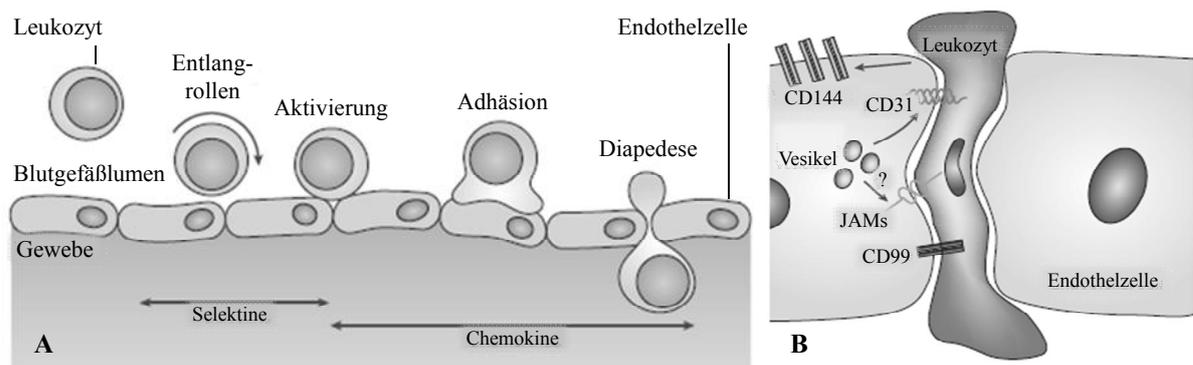


Abb. 1-4: Transmigration von Leukozyten durch das Endothelium. A) Adhäsionskaskade vom Entlangrollen eines Leukozyten auf dem Lumen des endothelialen Gefäßes bis zur Diapedese. Selektine interagieren schwach mit den Glykoproteinen auf den Endothelzellen, was zum Entlangrollen der Leukozyten auf der endothelialen Gefäßwand führt. Die Expression und Sekretion von Chemokinen durch Endothelzellen aktiviert den Leukozyten, was die Adhäsion und anschließende Diapedese bewirkt (Kinashi 2005). B) Während ihrer Transmigration durch die *Junctions* der endothelialen Gefäßwand exprimieren Leukozyten verschiedene junctionale Proteine wie z. B. VE-Cadherin und PECAM-1, JAMs und CD99 (Dejana, 2004).

PECAM-1 ist konstitutiv in Vesikeln enthalten, die in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert sind, und wird kontinuierlich aus diesem Zellkompartiment zur endothelialen Oberfläche transportiert. Transmigrieren Leukozyten, wird PECAM-1 dem Endothelium präsentiert, konzentriert sich um den migrierenden Leukozyten und stellt somit eine homophile Interaktion mit PECAM-1 auf der Leukozytenmembran her (Su et al., 2002). JAM-A nimmt durch Bildung eines transienten Rings, durch den die Leukozyten tunneln können, ebenfalls an der Diapedese teil. CD99, das auf der Membran von Leukozyten und an interendothelialen Kontakten exprimiert wird, ist in diesen Prozess involviert und seine Blockade führt *in vitro* zum Abbruch der Migration von Monozyten (Schenkel et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Proteine auf den endothelialen Zell-Zell-Kontakten eine homophile Interaktion mit identischen Proteinen auf Leukozyten eingehen, die dann eine Passage der Leukozyten durch die endotheliale Schicht ermöglichen.

Eine unverhältnismäßige Leukozytenakkumulation im Gewebe kann an einer Reihe von pathologischen Bedingungen mitwirken. Somit kann das Endothelium zu Krankheitsentstehung und -verlauf beisteuern, z. B. bei Tumorentstehung (Ruoslahti, 2002), Infektion (Dejana, 2004), Sepsis (Aird, 2003) und Atherosklerose (Bonetti et al., 2003).

1.2.2 Die Funktion der Leukozyten in der Immunabwehr

1.2.2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem von Säugetieren hat die Aufgabe, die Integrität der Wirtspezies gegen eine Vielzahl von infektiösen Organismen wie Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen und vielzelligen Parasiten aufrechtzuerhalten. Es muss folglich körperfremde von körpereigenen Zellen unterscheiden. Um diese Aufgabe zu gewährleisten, hat sich im Laufe der Evolution ein komplexes System gebildet, das aus dem unspezifischen (myeloide Leukozyten) und dem adaptiven Immunsystem (lymphoide Leukozyten) besteht, wobei beide miteinander kooperieren. Die Zellen des unspezifischen Immunsystems erkennen körperfremde Strukturen über keimbahnkodierte Rezeptoren (Gordon, 2002, Janeway und Medzhitov, 2002), während das adaptive Immunsystem über somatische Rekombinationen der T- und B-Lymphozytenrezeptoren eine hohe Diversität von antigenspezifischen Effektorzellen erreicht (Brack et al., 1978), welche nach Antigenkontakt spezifisch expandieren und die spezifische Immunantwort vermitteln. Die Haut und die Schleimhäute bilden eine erste Barriere gegen Mikroorganismen. Haben Pathogene diese Barriere überwunden, stellt der erste Schritt der Immunabwehr die Erkennung der Pathogene dar. Diese erfolgt über eine begrenzte Anzahl an Rezeptoren, den sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs), welche die *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen (Medzhitov und Janeway, 2000, Medzhitov, 2001). Um die körpereigenen Zellen von Pathogenen unterscheiden zu können, gibt es die *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I Moleküle sowie Moleküle des Komplementsystems (Austen und Fearon, 1979). Nach der Erkennung eindringender Pathogene werden Zellen des adaptiven Immunsystems durch die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (z. B. MHC-II) aktiviert. Dadurch wird eine schnelle klonale Expansion der antigenspezifischen T- und B-Lymphozyten ermöglicht. Die Verbindung zwischen unspezifischem und adaptivem Immunsystem stellen die Antigen-präsentierenden

Zellen (APCs; dendritische Zellen) dar, die prozessierte Antigenpeptide in Verbindung mit MHC-II oder anderen kostimulierenden Molekülen den Effektorzellen des adaptiven Immunsystems präsentieren. APCs prozessieren und präsentieren körperfremde und auch körpereigene Antigene. Durch Hochregulation kostimulierender Moleküle auf den APCs nach vorheriger Stimulation der PRRs durch die entsprechenden PAMPs erfolgt eine antigenspezifische Stimulation des adaptiven Immunsystems (Medzhitov und Janeway, 2002).

1.2.2.2 Die Antigenerkennung durch das unspezifische Immunsystem

Die keimbahnkodierten PRRs spielen für die Erkennung der PAMPs auf den Zellwänden eindringender Pathogene eine zentrale Rolle. Es gibt membranständige PRRs (z. B. Komplementrezeptoren, *Scavenger*-Rezeptoren, *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), CD14) und lösliche PRRs (z. B. Mannose-bindendes Lektin (MBL), Komplement, LPS-bindendes Protein (LBP), sCD14). Da eine relativ geringe Anzahl an PRRs der gesamten Vielfalt an mikrobiellen Organismen gegenübersteht, eignen sich als Zielmoleküle nur Strukturen, die hochkonserviert sind und nur von Mikroorganismen exprimiert werden. Am Aufbau der mikrobiellen Zellwand beteiligte Moleküle sind aufgrund ihrer essentiellen Funktion hochkonserviert und Variationen innerhalb dieser Moleküle sind sehr selten. Außerdem werden sie konstitutiv exprimiert, was eine sichere Erkennung der Pathogene gewährleistet. Diese Moleküle beinhalten Mannane in der Hefezellwand, formylierte Peptide in Bakterien, Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäure auf der Oberfläche von gramnegativen und grampositiven Bakterien. Weitere mögliche Liganden der PRRs sind z. B. hypomethylierte bakterielle DNA (Bauer et al., 2001), einzelsträngige virale RNA (Heil et al., 2004) und doppelsträngige virale RNA (Alexopoulou et al., 2001). Da diese Strukturen auch in Säugetieren auftreten, setzt eine Erkennung als PAMP die Lokalisation dieser Strukturen in gewissen Zellkompartimenten voraus, in denen die entsprechenden Wirtsmoleküle in der Regel nicht vorkommen.

Das LPS der gramnegativen Bakterien ist das am intensivsten untersuchte PAMP. Es besteht aus dem hoch konservierten Lipid A, welches das immunstimulatorische Prinzip des LPS darstellt (Beutler und Rietschel, 2003), einem semikonservierten Kernbereich und einer variablen speziesspezifischen Zuckerkette. CD14 und das LPS-bindende Protein (LBP) wurden als LPS-bindende Proteine erkannt (Abb. 1-5). CD14 kommt als Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-verankertes Membranprotein auf myeloiden, epithelialen und endothelialen Zellen vor (Wright et al., 1990), aber auch als löslicher Rezeptor im Serum (Ziegler-Heitbrock und Ulevitch, 1993). LBP ist ein Serumprotein, welches die Bindung von

LPS an membranständiges sowie lösliches CD14 katalysiert und dadurch die Sensitivität gegenüber LPS um mehrere Potenzen erhöht (Schumann et al., 1990). Ein weiterer PRR im Serum ist MD-2, der von verschiedenen Zelltypen exprimiert wird. Für die Signaltransduktion innerhalb der LPS-erkennenden Zellen ist die Bindung von CD14/MD-2 an den TLR-4 notwendig (Shimazu et al., 1999).

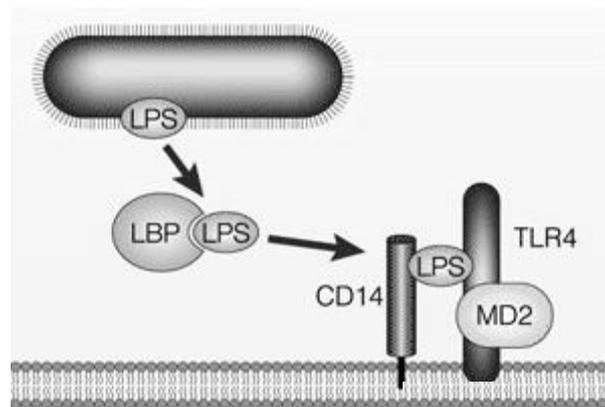


Abb. 1-5: Antigenerkennung und -bindung auf der Zelloberfläche am Beispiel von LPS. LPS bildet einen Komplex mit LBP, das an CD14 auf der Zelloberfläche bindet. Dadurch bildet sich ein Komplex mit TLR4 und MD-2. Auf der zyttoplasmatischen Seite der Membran wird eine Signalkaskade aktiviert, die in transkriptioneller Aktivierung von inflammatorischen Genen resultiert (modifiziert nach Finlay und Hancock, 2004).

Durch Bindung der PAMPs an diese Rezeptoren werden eine Vielzahl von Effektorzellen (Makrophagen, Neutrophile, natürliche Killerzellen) aktiviert. Pro-inflammatorische Zytokine wie z. B. IL-1, -6, -12, TNF- α , Interferon-(IFN)- γ und Chemokine wie z.B. IL-8 gewährleisten ein koordiniertes Zusammenspiel der verschiedenen Effektorzellen. Somit aktivieren IL-1 oder TNF- α das Endothel am Ort der Infektion und IL-8 lockt weitere Effektorzellen an. Anti-inflammatorische Zytokine wie z. B. IL-4 und IL-10 führen zu einer Limitierung der Entzündungsreaktion. Das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren ist wichtig, da eine überschießende Immunantwort im septischen Schock enden kann (Woltmann et al., 1998).

1.2.2.3 Phagozytose von Pathogenen

Phagozyten repräsentieren eine heterogene Gruppe von Zellen: Neutrophile, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs). Die primäre Funktion der meisten Phagozyten besteht darin, Pathogene zu zerstören. Neutrophile bewirken dies über ihren potenten *oxidative burst* (Segal und Coade, 1978), der eine Reihe von antimikrobiellen Substanzen einschließlich reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) sowie Proteasen und bioaktiven Peptiden generiert und den pH-

Wert der Umgebung für proteolytische enzymatische Aktivität erniedrigt (Borregaard und Cowland, 1997, Klebanoff, 2005). Während des *oxidative burst* fusionieren spezifische Granula, die Cytochrom b558 (Transmembrankomponente der Nox2, bestehend aus gp91^{phox} und p22^{phox}) enthalten, mit dem sich bildenden Phagosom (Segal und Jones, 1980). Diese Fusion geht mit der Aktivierung des Nox2-Komplexes einher, indem sich die zytosolischen Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} zum zentralen Transmembrankomplex zusammenlagern, wie in Abb. 1-6 dargestellt ist (Babior, 1999). Andere zytosolische Proteine, die niedermolekularen Guanosintriphosphatasen (GTPasen) Rac1/2, tragen zur optimalen Aktivierung der Nox2 bei (Bokoch und Diebold, 2002). Ist Nox2 auf der phagosomalen

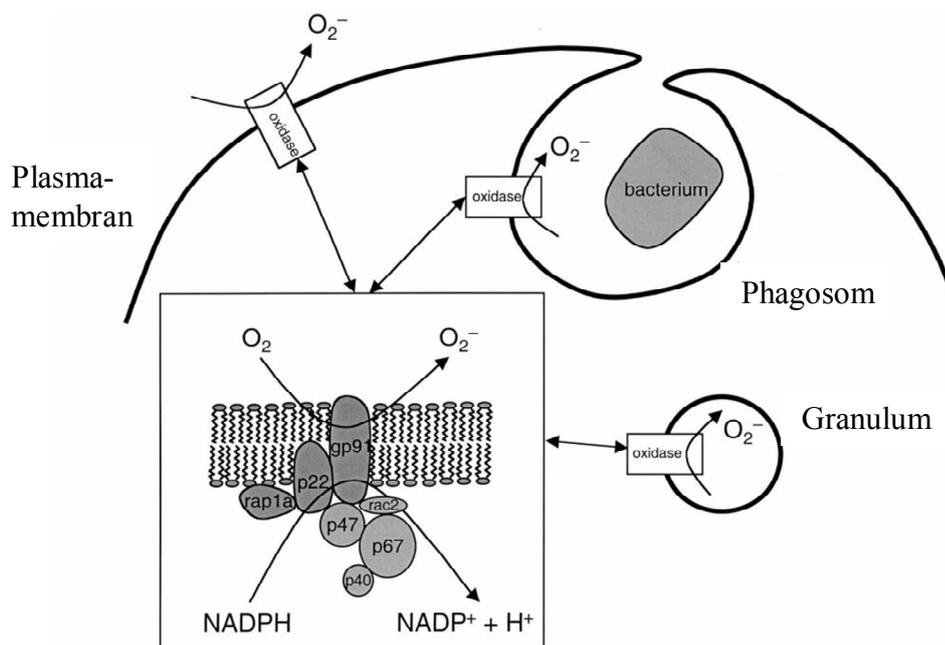


Abb. 1-6: Mögliche Orte der Lokalisation und Aktivität der Nox2 in Neutrophilen. Die Aktivierung der Zelle führt zu einer Translokalisierung der zytosolischen Faktoren (p47, p67, p40 und Rac2) an den Cytochrom b enthaltenden Membranen (nach Dahlgren und Karlsson, 1999).

Membran vollständig aktiviert, transferiert sie Elektronen aus dem Zytosol in das phagosomale Lumen, wo diese unter Sauerstoffverbrauch für die Generierung von Superoxidanionen benötigt werden (Segal und Coade, 1978). Die Myeloperoxidase (MPO), welche ebenfalls im Phagosom vorkommt, katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen in eine Reihe antimikrobieller Moleküle einschließlich hypochloriger Säure, Chlorine, Chloramine und Hydroxylradikale (Klebanoff, 2005). Die herausragende Rolle der Nox2 in der Degradation von Pathogenen zeigt sich in Patienten mit Mutationen in einigen der Untereinheiten des Nox2-Komplexes, die partielle oder sogar totale Inaktivierungen des Komplexes hervorrufen. Patienten, deren Neutrophile nicht in der Lage sind, Pathogene zu eliminieren, leiden an chronischer Granulomatose, einer Krankheit, die

durch schwere Infektionen besonders in der Kindheit charakterisiert ist und oft zum frühen Tod führt (Quie et al., 1967, Segal et al., 2000).

Makrophagen entwickeln eine potente lysosomale proteolytische Aktivität um Pathogene zu eliminieren (Delamarre et al., 2005). Nach der Einkapselung der Pathogene und dem Austausch von membranständigem und löslichem Material mit verschiedenen intrazellulären Kompartimenten reifen die Phagosomen zu Phagolysosomen heran. Währenddessen werden eine Reihe von lysosomalen Proteasen aktiviert, wodurch eine hochgradig degradative Umgebung entsteht, die Pathogene effizient unschädlich macht (Lukacs et al., 1990, Lukacs et al., 1991, Yates et al., 2007). Dabei besitzen Makrophagen keine azurophilen Granula oder sekretorischen Vesikel, aus denen Proteasen in die Phagosomen rekrutiert werden (Ryter, 1985). Diese sind in Neutrophilen enthalten. Infolgedessen unterscheidet sich die Phagosomenreifung in Makrophagen in Qualität und Kinetik von der in Neutrophilen. Obwohl Makrophagen ebenfalls intrazelluläre Vesikel mit den membranständigen und zytosolischen Komponenten der Nox2 besitzen, ist der *oxidative burst* in diesen Zellen viel schwächer ausgeprägt als in Neutrophilen (Savina und Amigorena, 2007), die mikrobizidale Aktivität der Makrophagen ist jedoch extrem hoch. Das ist darauf zurückzuführen, dass der Austausch von Membranbestandteilen zwischen Phagosom und intrazellulären Kompartimenten sehr zeitig während der Phagozytose, schon während des Einschlusses der Pathogene, erfolgt (Claus et al., 1998), wodurch das Phagosom die lysosomalen und endosomalen degradativen Enzyme schon von Beginn der Phagozytose an verwendet.

Nach der Phagozytose werden die verdauten Partikel in Neutrophilen und Makrophagen meist vollständig zerstört, wohingegen dendritische Zellen Strategien entwickelt haben, um verdaute Partikel auf ihrer Zelloberfläche den Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren. Sie zeigen ebenfalls eine sehr hohe phagozytäre Aktivität in peripheren Geweben sowie in den sekundären lymphoiden Organen, jedoch werden phagozytäre DCs als unreif angesehen. Sobald sie inflammatorischen Signalen oder TLR-Liganden begegnen, treten unreife DCs in den Reifeprozess ein. Während dieses Prozesses verringert sich ihre phagozytäre Kapazität aufgrund von Änderungen in der Rac1/2- und Cdc42-Aktivität (Nobes und Marsh, 2000), so dass sie die Proteolyse steuern können und Peptide bestehend aus mehr als zehn Aminosäuren erhalten (Honey und Rudensky, 2003), die für die Antigenpräsentation geeignet sind.

1.3 Das *In-vitro*-Modellsystem *Embryoid Body*

In der vorliegenden Arbeit wurde die endotheliale und hämatopoetische Differenzierung sowie die Funktion der differenzierenden Leukozyten in *Embryoid Bodies* (EBs) untersucht. EBs sind zelluläre Aggregate ausgehend von murinen ESCs, die aus der inneren Zellmasse einer 3,5-Tage alten Blastozyste entnommen werden. Folglich lassen sich *In-vitro*-Beobachtungen im EB durch Addition von 3,5 Tagen zum Alter der EBs mit *In-vivo*-Untersuchungen an murinen Embryos vergleichen. Die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in murinen ESCs wird durch die Kultivierung auf *feederlayer* oder in Anwesenheit von *leukemia inhibitory factor* (LIF; Smith et al., 1988, Williams et al., 1988) erreicht. Sobald die Differenzierung in den EBs begonnen hat, entwickeln sich spontan Zelltypen aller drei Keimblätter. Zunächst bildet sich eine äußere Hülle von endodermartigen Zellen im EB. Innerhalb weniger Tage bildet sich eine ektodermale Randzone, und anschließend differenzieren mesodermale Zellen im EB (Wobus und Boheler, 2005). Die temporale Expression von gewebespezifischen Genen und Proteinen in EBs während der Differenzierung zeigt, dass frühe Prozesse der *In-vivo*-Entwicklung in Ektoderm, Mesoderm und Endoderm *in vitro* rekapituliert werden (Leahy et al., 1999). Für die Generierung von EBs wurden verschiedene Protokolle etabliert: a) die Methode des hängenden Tropfens (Wobus et al., 1997), b) Massenkultur in der Petrischale (Doetschman et al., 1985) und Suspensionskultur in der Spinnerflasche (Wartenberg et al., 1998) und c) die Kultivierung in Methylzellulose (Wiles und Keller, 1991). Im EB wird die Differenzierung einer Reihe von spezialisierten Zelltypen beobachtet, z. B. in Kardiomyozyten (Doetschman et al., 1985), hämatopoetische Zellen (Wiles und Keller, 1991), Endothelzellen (Risau et al., 1988), glatte Muskelzellen (Rohwedel et al., 1994), Skelettmuskelzellen (Doetschman et al., 1985), Chondrozyten (Kramer et al., 2000) und Neuronen (Wernig et al., 2002).

Die Nutzung von EBs ist eine vielversprechende Methode um zum Beispiel Embryotoxizität *in vitro* einzuschätzen. Der sogenannte *embryonic stem cell test* (EST) wurde entwickelt, um embryotoxische Effekte verschiedener Chemikalien zu untersuchen (Scholz et al., 1999). Dabei wurde als Endpunkt der Messung die Differenzierung von EBs aus murinen ESCs der Zelllinie D3 in Kardiomyozyten innerhalb von zehn Tagen sowie die Zytotoxizität in der murinen Fibroblastenzelllinie 3T3 herangezogen. Die Konzentration einer Substanz, bei der die Kardiomyozytendifferenzierung der EBs zu 50% inhibiert (ID50) und bei der eine 50%ige Zytotoxizität erreicht wird (IC50D3 und IC503T3), wurde aus konzentrationsabhängigen Kurven berechnet. Mit Hilfe der Diskriminanzanalyse wurde ein biostatistisches Vorhersagemodell entwickelt, bei dem die drei Variablen \lg_{IC50D3} , $\lg_{IC503T3}$ und die relative

Entfernung zwischen IC50T3 und ID50 zur Einteilung in 3 Klassen von Embryotoxizität (nicht, schwach und stark embryotoxisch) dienen (Scholz et al., 1999). Im Juni 2000 wurde der EST durch das Europäische Zentrum für Validierung und Alternative Methoden (ECVAM) validiert und anerkannt. Seither wird das Verfahren immer weiter verbessert. In einer Validierungsstudie wurden 20 Testchemikalien mit bekanntem embryotoxischen Potential unter Blindbedingungen in vier verschiedenen Laboratorien untersucht (Genschow et al., 2004). Durch Festag et al. (2007) wurde ein weiterer Parameter zur Embryotoxizität herangezogen: die Differenzierung in Endothelzellen, wodurch die ID50D3 hin zur ID50 (EC_{PECAM}, EC_{VE-Cadherin}, CMC) erweitert wurde. Stummann et al. (2008) führten weitere Endpunkte ein, um die Anwendbarkeit des EST und den Wert seiner Einschätzungen zu erhöhen. 2008 wurden humane ESC für den EST herangezogen, um Inter-Spezies-Variationen in Embryotoxizitäten verschiedener Chemikalien vermeiden zu können. Adler et al. (2008) etablierten Zytotoxizitätstests, die auf humanen ESCs und humanen Fibroblasten basieren. Des Weiteren führten sie die mRNA-Expression verschiedener Marker als Endpunkte ein: Oct-4 und hTert für undifferenzierte Zellen, Brachyury für Mesoderm-, AFP für Ektoderm- und Pax-6 für Endodermentwicklung sowie GATA-4 und Nkx2.5 für die frühe und TNNT2 für die späte kardiale Entwicklung. Stummann et al. (2009) beschreiben das Potential eines hESC-basierten Assays für die Detektion der Toxizität anhand der neuronalen Induktion in der Embryonalentwicklung.

2. Zielstellung

Der EB wird seit 1985 als *In-Vitro*-Modellsystem für verschiedene Untersuchungen herangezogen. Dabei entstanden viele Arbeiten unter Nutzung der murinen embryonalen Stammzelllinie CCE, die im undifferenzierten Stadium auf *feederlayer* kultiviert wurde. Dies verursachte eine Mischkultur von Fibroblasten und embryonalen Stammzellen bei der Generierung der EBs, so dass Ergebnisse, die mit diesen Zellen gewonnen wurden, nicht allein auf die embryonalen Stammzellen sondern auch auf die benutzten Fibroblasten zurückgeführt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie CGR8 genutzt, die allein durch die Gabe von LIF ohne *feederlayer* auskommt. Es handelt sich um eine deskriptive Arbeit, bei der folgende Fragestellungen geklärt werden sollten:

- 1) Das *In-vitro*-System „EB“ bestehend aus Zellen der Zelllinie CGR8 sollte hinsichtlich seiner endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung charakterisiert werden.
- 2) Anschließend galt es, Regulationsmechanismen dieser Differenzierungen ausgehend von flk-1-positiven Zellen im EB zu analysieren. Um die Regulationsmechanismen besser einschätzen zu können, wurde flk-1 inhibiert und die Differenzierung in endotheliale und hämatopoetische Zellen beobachtet.
- 3) Der Einfluss von Tumorzellen auf die Differenzierung von Endothelzellen wurde bereits durch Wartenberg et al. (2001) gezeigt. Hier sollte nun anhand von Konfrontationskulturen zwischen EBs und multizellulären Tumorsphäroiden eingeschätzt werden, inwieweit die Differenzierung von Leukozyten durch Tumorzellen beeinflusst wird.
- 4) Es war sehr interessant zu erfahren, ob die im EB differenzierenden Leukozyten schon ihre Funktionalität besitzen. Um dies zu beantworten, sollte die Reaktion von EBs auf hämatopoetische Wachstumsfaktoren sowie bakterielle Infektionen untersucht werden. Außerdem wurden Leukozyten aus dem EB isoliert und ihre Reaktion auf bakterielle Infektionen getestet.
- 5) EBs werden zurzeit als *In-vitro*-Modell zur Einstufung von Chemikalien hinsichtlich ihrer Embryotoxizität im validierten und anerkannten EST genutzt. In dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit des EBs zur Testung von Polymermaterialien als *Scaffold*-Material im *Tissue Engineering* untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Anbieter
Analysenwaage BP 610, BP221S	Sartorius AG, Göttingen
Elektrophoreseeinheit	VWR International GmbH, Darmstadt
FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Heizplatte HP 062	Labotect GmbH, Göttingen
Inkubator Hera Cell 240	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Zeiss AG, Jena
Laser Scanning Mikroskop LSM 510	Zeiss AG, Jena
Mastercycler® ep realplex	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler® Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Televal 31	Zeiss AG, Jena
Minizentrifuge Galaxy	VWR International GmbH, Darmstadt
Nanodrop	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ObserverZ1 mit ApoTome-Einheit	Zeiss AG, Jena
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Pipettboy Aku	Integra Biosciences GmbH, Fernberg, CH
Power supply	VWR International GmbH, Darmstadt
Spinnersystem IBS Cellspin	Integra Biosciences GmbH, Fernberg, CH
Spinnerflaschen	Integra Biosciences GmbH, Fernberg, CH
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischzentrifuge EBA 12	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Universalzentrifuge 30 RF	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Vortex MS1 Minishaker	IKA® Works Inc., Wilmington, NC
Wasserbad SUB36	Grant Instruments Ltd., Cambridge, GB
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2 Software

Software	Anbieter
AxioVision	Carl Zeiss AG, Jena
CellQuest Pro	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
EndNote	Thomson Reuters, San Francisco, USA
GraphPad InStat 3	GraphPad Software, San Diego, USA
LSM 510 Software	Carl Zeiss AG, Jena
Realplex	Eppendorf AG, Hamburg
SigmaPlot 10.0 für Windows	SPSS, München

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Anbieter
Bakterielle Petrischalen (60, 100 mm)	Greiner Bio-one AG, Frickenhausen
CapStrips	Eppendorf AG, Hamburg
Falconröhrchen (15, 50 ml)	BD Falcon GmbH, Heidelberg
Filtertips (10, 100, 1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Glasplättchen, d 12 mm	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Immersionsöl	Zeiss AG, Jena
Kryo sTM Einfrierröhrchen	Greiner Bio-one AG, Frickenhausen
MS-Säulen	Miltenyi GmbH, Bergisch Gladbach
MS-Magnet	Miltenyi GmbH, Bergisch Gladbach
Multiwellplatten 24-Well	Greiner Bio-one AG, Frickenhausen
PCR-Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
PreSeparation-Filter	Miltenyi GmbH, Bergisch Gladbach
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hildesheim
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-one AG, Frickenhausen
Sterilfilter (0,2 µm)	Sartorius AG, Göttingen
TwinTec PCR Platte 96	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen (T25, T75)	TPP AG, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-one AG, Frickenhausen

3.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Anbieter
Aceton	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Celltracker CMFDA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Collagenase II	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate	Sigma-Aldrich GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, München
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, München
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
FITC-gekoppelte <i>E. coli</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gelatine	Sigma-Aldrich GmbH, München
Glukose	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich GmbH, München
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
LPS	Sigma-Aldrich GmbH, München
M-CSF	Biozol GmbH, Eching
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, München
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
opsonisierendes Reagens	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SU5416	Sigma-Aldrich GmbH, München
Taurin	Sigma-Aldrich GmbH, München
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.5 Medien/Medienzusätze

Bezeichnung der Grundmedien und Zusätze	Anbieter
Basal ISCOVE	Biochrom AG, Berlin
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FBS (Fötale Rinderserum)	Sigma-Aldrich GmbH, München
GMEM (Glasgow Minimal Essential Medium)	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
LIF (ESGRO)	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin
nicht essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

CGR8-LIF-Medium

25 ml	GMEM
2,5 ml	hitzeinaktiviertes, filtriertes FBS
12,5 µl	β-Mercaptoethanol-Lösung (Stammlösung: 70,4 µl β-Mercaptoethanol in 10 ml PBS)
250 µl	L-Glutamin
250 µl	LIF, Endkonzentration 10 ³ U/ml

CGR8-Differenzierungsmedium

500 ml	basales ISCOVE Medium ohne L-Glutamin
100 ml	hitzeinaktiviertes, filtriertes FBS
0,5 ml	β-Mercaptoethanol-Lösung (Stammlösung: 70,4 µl β-Mercaptoethanol in 10 ml PBS)
6,25 ml	L-Glutamin
6,25 ml	NEA

CGR8-Einfriermedium

45 ml	CGR8-Differenzierungsmedium
5 ml	DMSO

4T1-Medium

500 ml	DMEM
50 ml	hitzeinaktiviertes, filtriertes FBS
6,25 ml	β -Mercaptoethanol-Lösung (Stammlösung: 140 μ l β -Mercaptoethanol auf 200 ml PBS)
6,25 ml	NEA
6,25 ml	L-Glutamin
6,25 ml	Natriumpyruvat
2,5 ml	Penicillin/Streptomycin

4T1-Einfriermedium

36 ml	4T1-Medium
10 ml	hitzeinaktiviertes, filtriertes FBS
4 ml	DMSO

3.1.6 Stimulanzen/Inhibitoren/Polymermaterialien

3.1.6.1 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) sind charakteristische Bestandteile der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien. Sie bestehen aus dem hydrophoben Lipid A, welches für die Toxizität des Moleküls verantwortlich ist, einer hydrophilen Polysaccharidkette und einer hydrophilen O-Antigenpolysaccharidseitenkette. LPS aktiviert Immunzellen über CD14 und *Toll-like-Rezeptor 4* (Chow et al., 1999) und wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eine zelluläre Immunantwort in EBs und aus ihnen separierten Leukozyten zu stimulieren. Dazu wurden 5 mg/ml LPS in sterilem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.1.6.2 Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (M-CSF)

M-CSF wird von Monozyten, Fibroblasten sowie Endothelzellen produziert und stimuliert die Bildung von Makrophagenkolonien (Metcalf, 1986), erhöht die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität durch Monozyten und Makrophagen (Mufson et al., 1989) und inhibiert Knochenresorption durch Osteoklasten (Hattersley et al., 1988). M-CSF wurde zu 0,1 mg/ml in sterilem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.1.6.3 SU5416

SU5416, eine synthetische Verbindung, ist ein potenter und selektiver flk-1-Inhibitor (Fong et al., 1999). Es wird jedoch auch ein inhibitorischer Effekt auf flt-1 beschrieben (Takamoto et al., 2001). SU5416 wurde mit einer Konzentration von 4 mM als Stammlösung in DMSO gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.6.4 FITC-gekoppelte *Escherichia coli*

FITC-gekoppelte, chemisch und hitzeinaktivierte *Escherichia coli* wurden benutzt, um zu untersuchen, ob die im EB differenzierenden Leukozyten zur Phagozytose fähig sind (Drevets und Campbell, 1991). Die Biopartikel wurden zu 20 mg/ml in sterilem PBS resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Oponisierendes Reagens wurde in 0,5 ml sterilem Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.6.5 Bioabbaubare Polymermaterialien

Die bioabbaubaren Polymermaterialien wurden von der Firma Innovent e. V. Jena hergestellt. Das Polymermaterial CLA58 besteht aus Caprolacton und L-Lactid. EP37 ist ein Polymer bestehend aus Caprolacton und L-Lactid, bei dem die Endgruppen methacryliert sind. Beide Polymere wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen (CLA58:EP37-80:20 und CLA58:EP37-50:50) bei Raumtemperatur vernetzt. Allen Polymeren wurde vor der Vernetzung der Fluoreszenzfarbstoff 1-Anillino-8-naphthalensulfonat (ANS) zugegeben.

3.1.7 **Zelllinien**

3.1.7.1 CGR8

Die Zelllinie CGR8 wurde bei *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) über Sigma-Aldrich GmbH bezogen. Diese Stammzellen wurden aus der inneren Zellmasse eines 3,5-Tage-alten männlichen Embryos (*Mus musculus*, Stamm 129) isoliert (Nichols et al., 1990). Diese pluripotenten Zellen haben die Fähigkeit, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Die Differenzierung der CGR8-Zellen wird durch *leukaemia inhibitory factor* (LIF) inhibiert (Smith et al., 1988, Williams et al., 1988). Zugabe von LIF erlaubt die Kultur der CGR8-Zellen ohne *feederlayer*.

3.1.7.2 4T1

Die Zelllinie 4T1 wurde bei *American Type Culture Collection* (ATCC) über LGC Promochem GmbH bezogen. Dabei handelt es sich um eine 6-Thioguanin-resistente Zelllinie, die aus dem 410.4 Tumor selektiert wird, ohne mutagene Behandlung (Aslakson und Miller, 1992). Werden 4T1-Zellen in BALB/c Mäuse injiziert, entwickeln sie spontan stark metastasierende Tumore, die in die Lunge, Leber, Lymphknoten und das Gehirn metastasieren können (Aslakson und Miller, 1992, Pulaski und Ostrand-Rosenberg, 1998). Der Primärtumor muss nicht entfernt werden, um Metastasenbildung zu induzieren. Das Tumorstadium und die Metastasenbildung von 4T1-Zellen in BALB/c-Mäusen ähneln dem humanen Brustkrebs (Pulaski und Ostrand-Rosenberg, 1998, Pulaski et al., 2000).

3.1.8 Reagenzien für die magnetische Zellseparation

Antikörper	Verdünnung	Anbieter
anti-Maus PE-gekoppelt flk-1	1:10	BD Pharmingen
anti-Maus <i>Magnetic-beads</i> -gekoppelt CD45	1:10	Miltenyi
Anti-PE <i>magnetic-beads</i>	1:10	Miltenyi

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
IK-Puffer	120 mM NaCl 5,4 mM KCl 10,2 mM MgSO ₄ · 6 H ₂ O 5 mM Na-Pyruvat 22,0 mM Glukose 20,0 mM Taurin 10,0 mM HEPES in destilliertem Wasser, pH 6,9
Dissoziationslösung	4 mg/ml Collagenase II in IK-Puffer
Puffer für die magnetische Zellseparation (MACS-Puffer)	0,5 mM FBS, 2 mM EDTA in PBS

3.1.9 Reagenzien für Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Primäre Antikörper	Verdünnung	Anbieter
Monoclonal Ratte anti-Maus PECAM-1	1:100	Chemicon
Monoclonal PE-gekoppelt anti-Maus flk-1	1:100	BD Pharmingen
Monoclonal Ratte anti-Maus CD45	1:100	Chemicon
Monoclonal Ratte anti-Maus CD68	1:200	Serotec
Monoclonal Ratte anti-Maus CD14	1:100	BD Pharmingen
Monoclonal Ratte anti-Maus Neutrophil-Antigen (Antigen nicht definiert)	1:100	Serotec
Polyclonal Ziege anti-Maus gp91-phox (Nox2)	1:100	Santa Cruz

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Anbieter
Ziege anti-Ratte Cy2-gekoppelt IgG	1:100	Chemicon
Ziege anti-Ratte Cy3-gekoppelt IgG	1:100	Chemicon
Ziege anti-Ratte Cy5-gekoppelt IgG	1:100	Chemicon
Kaninchen anti-Ziege Cy5-gekoppelt IgG	1:100	Chemicon

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Phosphatpufferlösung (PBS)	8,1 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in destilliertem Wasser, pH 7,4
Fixationslösung Methanol/Aceton	Methanol/Aceton 7:3
0,01 % PBST	0,01 % Triton X100-haltig PBS
10 % Milchlösung	10 % Milchpulver in 0,01 % PBST
4 % PFA-Lösung	4 % PFA-haltig PBS
Puffer für die Durchflusszytometrie (FACS-Puffer)	2 % FBS-haltig PBS

E1-Ca ²⁺ -Puffer	135 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,8 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 1,0 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 10 mM Glukose · H ₂ O 10 mM HEPES in destilliertem Wasser, pH 7,4
-----------------------------	---

3.1.10 Reagenzien für die Molekularbiologie

Reagenzien	Anbieter
Agarose	MoBiTec GmbH, Göttingen
DNase I, Amplification Grade, 100 U	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dNTP Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, München
JumpStart RED Taq Ready Mix	Sigma-Aldrich GmbH, München
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim
Quanti Fast SYBR [®] Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hildesheim
Random primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hildesheim
SuperScript II Reverse Transcriptase, 10.000 U	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Primer		
Name	Sequenz 5' → 3'	T _a [°C]
PECAM	<i>forward</i> CAGGTGTGCGAAATGCTCT <i>reverse</i> ATGGGTGCAGTTCCATTTTC	61
VE-Cadherin	<i>forward</i> GTCAGCTATAGGGACCTCTGTCAT <i>reverse</i> TCATTTCTTTTCACGATTTGG	61
βH-Globin	<i>forward</i> AGTCCCCATGGAGTCAAAGA <i>reverse</i> CTCAAGGAGACCTTTGCTCA	60
β _{major} -Globin	<i>forward</i> CTGACAGATGCTCTCTTGGG <i>reverse</i> CACAACCCAGAAACAGACA	61

CD45	<i>forward</i> TCACACAAAAGCAGATCGTC <i>reverse</i> GGTTTTAGGGCCATTAGTTTCA	59
CD68	<i>forward</i> TAAAGAGGGCTTGGGGCATA <i>reverse</i> CTCGGGCTCTGATGTAGGTC	61
CD16	<i>forward</i> GAGTGATTTCTGACTGGCTGCT <i>reverse</i> TGGAAGAATGAGATCCTGTTCA	61
Mac-1	<i>forward</i> ACCTCTAATGGTCCCTTGCTG <i>reverse</i> TGGTTGTGTTGATGAAGGTGA	61
c-fms	<i>forward</i> CACCGATAGGTGTGATGAAGC <i>reverse</i> GCAGCTGGCTCTGAATGAT	61
AIC2B	<i>forward</i> CTAAATGTCATGGGGCACAGAT <i>reverse</i> ACTGCATCCTTTGTGGCTCT	61
G-CSF-R	<i>forward</i> CCCCAGAAGTCTGGAGAGC <i>reverse</i> ATCTTTGCCTGTTGGTCCAG	61
M-CSF	<i>forward</i> CCCATATTGCGACACCGAA <i>reverse</i> AAGCAGTTACTGAGCAACGGG	62
flk-1	<i>forward</i> TTCTGTTCTGTTGGCCCTTT <i>reverse</i> GTGGACCAAATGCCTGACTC	61
Runx1	<i>forward</i> CAATCGGCTTGTGTGATGC <i>reverse</i> TTCATCGTTGCCTGCCATGAC	61
Polymerase 2a	<i>forward</i> GACAAAAGTGGCTCCTCTGC <i>reverse</i> GCTTGCCCTCTACATTCTGC	60

Die Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich GmbH bezogen und zu 100 pmol/μl in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die Größe der PCR-Produkte betrug zwischen 100 bis 150 bp. Die Temperaturangaben hinter den Primersequenzen entsprechen den Annealing-Temperaturen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Einzelzellen, Sphäroide und EBs wurden im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

3.2.1.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen der Zelllinie CGR8

ESCs der Zelllinie CGR8 wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Ein Zellaliquot wurde in 37 °C warmem CGR8-Differenzierungsmedium (3.1.5) aufgenommen, 4 Minuten bei 800 g zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes in 5 ml LIF-haltigem Medium (3.1.5) auf Gelatine-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät. Bei 75 % Konfluenz wurden die Stammzellen mit 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung enzymatisch dissoziiert und vereinzelt. Ein Sechstel der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel.

Um die undifferenzierten embryonalen Stammzellen einzufrieren, wurde wie folgt vorgegangen: Die dissoziierten Zellen wurden in 10 ml CGR8-Differenzierungsmedium aufgenommen, 4 Minuten bei 800 g zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in je 1 ml CGR8-Einfriermedium (3.1.5) pro Zellaliquot resuspendiert. Die Zellen wurden für einen Tag bei -80 °C gelagert und anschließend im Stickstofftank (bei -169 °C) aufbewahrt.

3.2.1.2 Generierung von *Embryoid Bodies*

EBs wurden durch Dissoziation der undifferenzierten Zellen und Überführung von $1 \cdot 10^7$ Zellen in eine Spinnerflasche mit 125 ml CGR8-Differenzierungsmedium (3.1.5), die auf einer Röhreinheit des Cellspin-Systems bei 22,5 Umdrehungen pro Minute und einem Drehrichtungswechsel nach 1440° im Inkubator kultiviert wurde, generiert. Der Tag, an dem die Spinnerflasche angesetzt wurde, wurde als Tag 0 gezählt. Die leicht geöffneten Seitendeckel ermöglichten einen konstanten Gasaustausch. Nach 24 Stunden wurden 125 ml CGR8-Differenzierungsmedium hinzugegeben. Es erfolgte täglich ein Mediumwechsel mit Entnahme von 80 ml Medium und Auffüllung mit frischem CGR8-Differenzierungsmedium.

3.2.1.3 Inkubation der *Embryoid Bodies* mit Stimulanzen und Inhibitoren

Aufgrund von Voruntersuchungen war bekannt, dass Leukozyten an Tag 10 mittels Immunfluoreszenz nachweisbar sind. Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die

Differenzierung von Leukozyten zu untersuchen, wurden die Zeitpunkte der Stimulationen vor diesem Zeitpunkt (Tag 10) gewählt.

M-CSF: EBs mit einem Alter von 8 Tagen wurden der Spinnerflasche entnommen und in bakteriologische Petrischalen überführt. Diesen Petrischalen wurde jeweils 5 ml Medium (für unbehandelte EBs) oder 5 ml Medium, in dem 250 ng/ml M-CSF enthalten war, zugegeben. Die EBs erhielten bis Tag 10 jeden Tag einen Mediumwechsel, in dem M-CSF für die inkubierten EBs enthalten war.

LPS: 9-Tage-alte EBs wurden der Spinnerflasche entnommen, in bakteriologische Petrischalen überführt und für einen Tag in 5 ml Medium (für unbehandelte EBs) oder 5 ml Medium, in dem FBS fehlte und jeweils 0,01 bis 100 ng/ml LPS enthalten war, kultiviert.

SU5416: EBs wurden in einem Alter von 4 Tagen auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen in 24-Well-Platten überführt und von Tag 6 bis 12 mit Medium (für unbehandelte EBs), Medium mit 0,1 % DMSO (um den Einfluss des Lösungsmittels der Substanz zu testen) oder Medium mit 4 μ M SU5416 kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden Tag. Dabei waren die Substanzen (DMSO, SU5416) für die inkubierten EBs im Medium enthalten.

3.2.1.4 Kultivierung der murinen Tumorzelllinie 4T1

Zellen der Zelllinie 4T1 wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Ein Zellaliquot wurde in 37 °C warmem 4T1-Medium (3.1.5) aufgenommen, 4 Minuten bei 800 g zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes in 5 ml 4T1-Medium auf Zellkulturflaschen ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung enzymatisch dissoziiert, vereinzelt und in 20 ml 4T1-Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel.

Zum Einfrieren der 4T1-Zellen wurde wie folgt vorgegangen: Die dissoziierten Zellen wurden in 10 ml 4T1-Medium aufgenommen, 4 Minuten bei 800 g zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in je 1 ml 4T1-Einfriermedium (3.1.5) pro Zellaliquot resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei -80 °C gelagert bevor sie im Stickstofftank (bei -169 °C) aufbewahrt wurden.

4T1-Einzelzellen wurden als Monolayer vermehrt und anschließend mit einer Lösung von 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung enzymatisch dissoziiert. Die Einzelzellen wurden in 125 ml 4T1-Medium (3.1.5) in eine Spinnerflasche eingesät um multizelluläre Tumorsphäroide (MTS) zu erzeugen. Am folgenden Tag wurde die Spinnerflasche auf 250 ml mit Medium aufgefüllt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, bei dem 80 ml Medium der Spinnerflasche entnommen und durch frisches 4T1-Medium ersetzt wurden. An den ersten

beiden Tagen wurde die Spinnerflasche bei 22,5 und danach bei 17,5 Umdrehungen pro Minute und einem Drehrichtungswechsel nach 1440°. Der Tag, an dem die Spinnerflasche angesetzt wurde, wurde als Tag 0 gezählt. Die leicht geöffneten Seitendeckel ermöglichten einen konstanten Gasaustausch.

3.2.1.5 Generierung von Konfrontationskulturen in hängenden Tropfen

Um in der Konfrontationskultur MTS und EBs voneinander unterscheiden zu können, wurden die MTS vor der Konfrontation mit den EBs mit dem Langzeitfarbstoff 5-Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (Wartenberg et al., 2001). Diese Markierung war 6 Tage lang in der Kultur nachweisbar. Ein 10-Tage-alter EB und ein 5- bis 7-Tage-alter MTS wurden in einem 35-µl-Tropfen in 50 % 4T1-Medium/50 % CGR8-Differenzierungsmedium auf dem Deckel einer 10-cm-Petrischale platziert. Der Deckel wurde umgedreht und auf die Petrischale gesetzt. Die Petrischale war mit 10 ml sterilem PBS gefüllt, um ein Verdunsten der Tropfen zu verhindern. Innerhalb von 24 Stunden adhärten EB und MTS im hängenden Tropfen und wurden anschließend auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen in 24-Well-Platten überführt. Nach jeweils 2, 4 und 6 Tagen wurden die Konfrontationskulturen fixiert und analysiert.

Für die Konfrontation von EBs mit Polymermaterialien wurde jeweils ein EB in 35 µl CGR8-Differenzierungsmedium mit Polymermaterial in einem hängenden Tropfen auf dem Deckel einer Petrischale konfrontiert und der Deckel auf eine mit 10 ml sterilem PBS gefüllte Petrischale gesetzt. Nach einem Tag wurden die Konfrontationskulturen auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen oder in Petrischalen überführt. Die Polymermaterialien wurden vor der Konfrontation für 30 Minuten mit 70 % Ethanol desinfiziert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und in CGR8-Differenzierungsmedium aufgenommen.

3.2.2 **Magnetische Zellseparation (MACS)**

EBs wurden unter 30-minütiger Einwirkung von Collagenase-II-Lösung (3.1.8) bei 37 °C dissoziiert. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 800 rpm wurde das Zellpellet in MACS-Puffer (3.1.8) resuspendiert und durch einen Filter (Miltenyi) gegeben. Die Einzelzellen wurden 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert, in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl anti-Maus *Magnetic-beads*-gekoppeltem CD45-Antikörper (3.1.8) 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Für die Separation von flk-1-positiven Zellen wurden die dissoziierten Zellen mit dem PE-gekoppelten flk-1-Antikörper 8 Minuten bei 4 °C und

anschließend mit dem anti-PE- *magnetic beads*-gekoppelten Antikörper 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Einzelzellen einmal mit MACS-Puffer bei 4 °C gewaschen. Die Separation der positiv markierten Zellen erfolgte über MS-Säulen (3.1.3).

Für Inkubationsversuche wurden die separierten Zellen auf Gelatine-beschichteten Glasplättchen in 24-Well-Platten mit CGR8-Differenzierungsmedium (3.1.5) ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert.

3.2.3 Immunfluoreszenz

Die EBs wurden mit eiskaltem Methanol/Aceton (7:3) eine Stunde bei -20 °C fixiert und anschließend dreimal mit 0,01 % PBST (3.1.9) gewaschen. Einzelzellen wurden 10 Minuten mit Methanol/Aceton fixiert. Unspezifische Bindungen wurden mit 10 % Milchlösung (3.1.9) für eine Stunde bei 4 °C geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (gelöst in 10 % Milchpulver in 0,01 % PBST) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurde dreimal mit 0,01 % PBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (gelöst in 10 % Milchlösung) für anderthalb Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 0,01 % PBST wurden die Proben bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.4 Bestimmung des zellulären Redox-Status

Die Änderung des Redoxstatus der CD45-positiven Zellen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCF-DA) gemessen. Der Farbstoff diffundiert in die Zellen und wird durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert. Das daraus resultierende 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) ist hydrophil und somit zellmembranimpermeabel. Durch freie Sauerstoffradikale in der Zelle wird H₂DCF zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Hempel et al., 1999) und kann durch Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden.

Die CD45-positiven Zellen wurden in einem 1:1 Gemisch aus E1-Ca²⁺-Puffer und CGR8-Differenzierungsmedium aufgenommen und mit 20 µM H₂DCF-DA bis zur Aufnahme der DCF-Fluoreszenz nach 5, 10 und 15 Minuten inkubiert.

3.2.5 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Die Proben wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (LSM 510), das mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 135) verbunden war, untersucht. Das LSM war mit jeweils einem Helium/Neon-Laser mit Anregungswellenlänge bei 543 nm (Anregung von

Cy3) und bei 633 nm (Anregung von Cy5) und einem Argonlaser mit Anregungswellenlänge 488 nm (Anregung von Cy2, DCF, FITC und CMFDA) sowie einer Diode für 405 nm (Anregung von ANS) ausgestattet. Die Emission wurde mit Hilfe von Bandpassfiltern BP 505-570 IR (Cy2, DCF, FITC und CMFDA), BP550-630 (Cy3) und Langpassfiltern LP 650 (Cy5) erfasst. Folgende Objektive wurden benutzt: 10x, numerische Apertur (NA) 0,30 sowie 20x NA 0,50; 40x NA 1,30 (Öl) und ein 63x NA 1,40 (Öl). Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde eine Probe mitgeführt, die nur mit sekundärem Antikörper inkubiert wurde. Die Lochblende wurde auf eine maximale Halbwertsbreite von 5 μm eingestellt. Die Fluoreszenz wurde von der Kappe des EBs bis zu einer Tiefe von 20 μm in Richtung der Äquatorialebene in Abständen von 5 μm in z-Richtung aufgenommen und alle optischen Schnitte wurden in einem Bild dargestellt und mit der Bildverarbeitungssoftware LSM 510 von Zeiss ausgewertet.

3.2.6 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Durchflusszytometrie liefert für jede Zelle Informationen bezüglich Größe, Granularität sowie Fluoreszenzintensität von Fluoreszenzfarbstoffen, mit denen die Zelle markiert wurde. EBs verschiedenen Alters wurden aus der Spinnerflasche entnommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit je 1 ml 37 °C warmer 4 mg/ml Collagenase II-Lösung (3.1.8) durch Titrieren dissoziiert. Nach vollständiger Dissoziation wurden die Zellen bei 300 g für 4 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit je 1 ml FACS-Puffer (3.1.9) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 4 Minuten bei 300 g wurden die Zellen mit je 1 ml 4%iger PFA-Lösung für 20 Minuten bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen, nochmals 4 Minuten bei 300 g zentrifugiert und mit PE-gekoppelter flk-1-Antikörper (1:200 in FACS-Puffer) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 500 μl FACS-Puffer zugegeben, 4 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und in 300 μl FACS-Puffer resuspendiert.

In jeder Probe wurden 50.000 Zellen mit dem FACSCalibur gemessen. Die PE-Fluoreszenz wurde mit dem Kanal für gelbrotes Licht (578 nm) ermittelt. Die Analyse erfolgte mittels CellQuest-Software. Die unspezifische Fluoreszenz wurde durch Zellen ohne Antikörper-Bindung kontrolliert. Die spezifische mittlere Fluoreszenz wurde durch Subtraktion der Autofluoreszenz von der mittleren Fluoreszenz des spezifischen Antikörpers bestimmt.

3.2.7 Nachweis der Genexpression

3.2.7.1 Isolierung der RNA

25 EBs (oder maximal 10^7 Einzelzellen) wurden mit 1 ml PBS gewaschen. Die RNA wurde nach der RNeasy-Methode von Qiagen wie im RNeasy Mini Handbook von Qiagen beschrieben isoliert. Die RNeasy-Methode kombiniert die selektive Bindung der RNA an silica-basierte Membranen mit der Mikrospinntechnologie. Ein spezielles hochkonzentriertes Puffersystem erlaubt die Bindung von bis zu 100 μg RNA, die länger als 200 Nucleotide ist, an die Silica-Membran. Proben werden zuerst in Anwesenheit eines hoch-denaturierenden Guanidinthiocyanat-haltigen Puffers, der RNasen sofort inaktiviert, lysiert und homogenisiert. Ethanol wird hinzugefügt um optimale Bindungskonditionen zu erreichen. Die Probe wird auf die RNeasy Mini Säule gegeben, wo die Gesamt-RNA an die Membran bindet und Verunreinigungen effizient gewaschen werden. Die so isolierte RNA wurde anschließend in 30 μl Nuclease-freiem Wasser eluiert.

Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte bei einer Absorption von 260 nm am NanoDrop-Gerät. Die Qualität der isolierten RNA wurde über den Quotienten $1,7 < A_{260}/A_{280} < 2,0$ bestimmt.

Die Integrität der isolierten mRNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde 1 μl Aliquot mit 5 μl Wasser und 1 μl Ladepuffer zusammengeführt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, welches Ethidiumbromid enthielt. Die Auftrennung erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 100 V und einer Laufzeit von einer Stunde. Die Intaktheit der RNA wurde anhand der Banden der ribosomalen RNA (18S- und 28S-Bande) unter UV-Licht kontrolliert.

3.2.7.2 Herstellung der cDNA

Zur Eliminierung von DNA in den RNA-Proben wurde 10 μl (entsprechen 2 μg) RNA mit 1 μl 10x Puffer und 1 μl DNase 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im anschließenden Annealing-Schritt wurden 1 μl EDTA, 1 μl random primer, 1 μl DNase zugefügt und für 5 Minuten bei 65 °C zur Reaktion gebracht. Danach wurde 4 μl 5x Puffer, 2 μl DTT, 1 μl RNase-freies Wasser hinzugegeben und weitere 2 Minuten bei 20 °C belassen. Nach Zugabe von 1 μl SuperScript II Reverse Transcriptase wurde 10 Minuten bei 25 °C, 50 Minuten bei 42 °C und 15 Minuten bei 70 °C inkubiert.

3.2.7.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für den Nachweis der CD14-, c-fms-, G-CSF- und AIC2B-mRNA wurde die PCR-Amplifikation in einem Gesamtvolumen von 20 µl (10 µl JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, 7 µl RNase-freies Wasser, 10 pM von jedem Primer, 1 µl cDNA) ausgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit 35 Zyklen, die initiale Denaturierung erfolgte für 2 Minuten bei 94 °C. Alle Zyklusschritte dauerten 30 Sekunden. Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer (3.1.10) gewählt, die Kettenverlängerung fand bei 72 °C und die Denaturierung bei 94 °C statt. Als Housekeeping-Gen wurde Polymerase II eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft.

3.2.7.4 real time PCR

Für den semi-quantitativen Nachweis verschiedener mRNA wurde SYBR® Green I benutzt. Es wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl in der PCR-Amplifikation (10 µl SYBR® Green I, 7 µl RNase-freies Wasser, 10 pM von jedem Primer, 1 µl cDNA-Probe) ausgeführt. Die Amplifikation wurde an einem Cycler Optical Module aufgezeichnet. Das folgende Temperatur-Programm wurde verwendet: initiale Denaturierung für 15 Minuten bei 93 °C, 40 Zyklen mit je 3 Schritten à 30 Sekunden: Denaturierung bei 93 °C, Annealing bei der jeweiligen Annealingtemperatur und Extension bei 72 °C, anschließend eine finale Extension für 10 Minuten bei 72 °C.

Die Fluoreszenz von SYBR® Green I wurde automatisch nach jedem Zyklus gemessen. Die C_T-Werte wurden bei der Messung automatisch ermittelt. Die relative Expression wurde nach Normalisierung der C_T-Werte der getesteten Gene im Vergleich zu den C_T-Werten der Housekeeping-Gene mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen, 2001 erhalten.

3.3 Statistische Analyse

Falls nicht anders angegeben, wurden die Daten (mindestens n = 3) in Text und Abbildungen als Mittelwert ± gepoolter Standardabweichung oder gepooltem Standardfehler ausgedrückt. Die Signifikanzen wurden mittels ungepaartem t-Test oder one-way-ANOVA mit der Statistik-Software GraphPad InStat3 ermittelt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Vorstellung des *In-vitro*-Modellsystems

4.1.1 Vaskulo-/Angiogenese

Um die endotheliale und hämatopoetische Differenzierung in EBs zeitlich zu charakterisieren wurde die Gen- sowie Proteinexpression endothelialer und hämatopoetischer Gene während der EB-Entwicklung untersucht. Dazu wurden EBs ausgehend von murinen embryonalen Stammzellen in der Spinnerflasche generiert und kultiviert. Von Tag 2 bis 16 wurden EBs aus der Spinnerflasche entnommen und hinsichtlich ihrer Expression endothelialer und hämatopoetischer Marker untersucht. Um die Ergebnisse der mRNA-Expression zu ergänzen, wurden EBs an Tag 4 aus der Suspensionskultur auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen überführt, an die sie innerhalb eines Tages adhärirten. An den folgenden Tagen wurden die angewachsenen EBs in Bezug auf ihre Differenzierung in Endothelzellen und Leukozyten mittels Immunfluoreszenz analysiert.

Wie in Abb. 4-1 dargestellt war die Expression des endothelzellspezifischen Antigens PECAM-1 in 2-Tage-alten EBs hoch. Bis Tag 5 sank die Expression auf 47 % gegenüber 100 % an Tag 2 ab. Das Maximum der PECAM-1-mRNA-Expression zeigte sich um Tag 8 der Differenzierung (146 %). Von Tag 10 bis 16 stieg die mRNA-Expression stetig an. Der zeitliche Verlauf der VE-Cadherin-mRNA-Expression ähnelte dem für PECAM-1 gezeigten Verlauf. VE-Cadherin wurde jedoch nicht in 2-Tage-alten EBs exprimiert, sondern erst ab einem EB-Alter von 5 bis 6 Tagen beobachtet. Auch hier zeigte sich ein Maximum um Tag 8. Nach einer Erniedrigung des VE-Cadherin-Levels an den Tagen 12 und 13 zeigte sich ein erneuter Anstieg an Tag 15.

Die Analyse der PECAM-1-Immunfluoreszenz in den EBs bestätigte das mRNA-Expressionsmuster (Abb. 4-2). An Tag 4 waren erste, sehr wenige Zellen in den EBs PECAM-1-positiv. Zwei Tage später ließ sich eine beginnende Organisation dieser Endothelzellen in gefäßartigen Netzwerken beobachten. Diese Organisation der PECAM-1-positiven Zellen nahm bis Tag 14 zu.

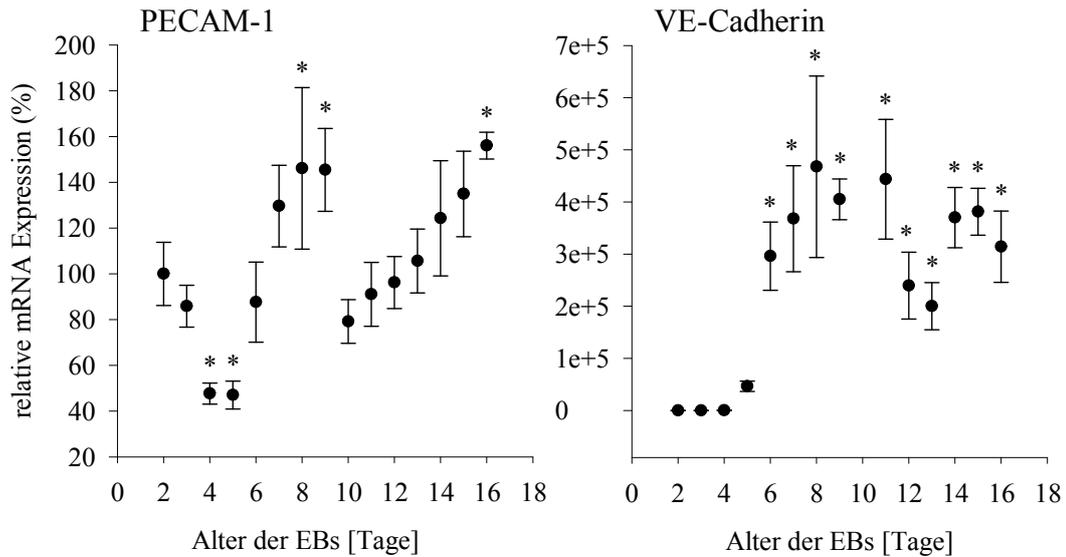


Abb. 4-1: mRNA-Expression von PECAM-1 und VE-Cadherin während der EB-Entwicklung. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Tag 2 (one-way ANOVA).

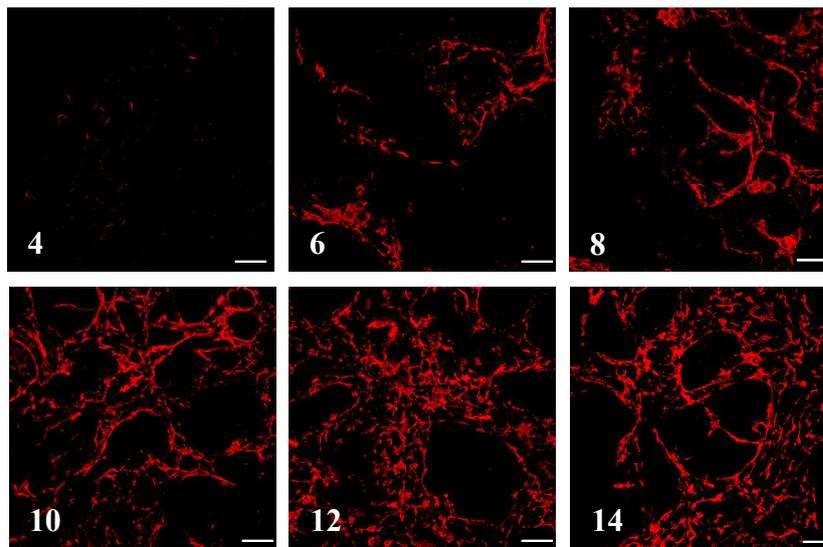


Abb. 4-2: PECAM-1-Immunfluoreszenz (rot) während der EB-Entwicklung. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zahlen geben das Alter der EBs in Tagen wieder, der Balken entspricht 50 μm .

4.1.2 Differenzierung von Leukozyten

Die Differenzierung von Leukozyten im EB wurde anhand der mRNA-Expression folgender Oberflächenmoleküle beobachtet: CD45, CD68, CD16 und Mac-1.

Die mRNA-Expression aller genannten Antigene (Abb. 4-3) zeigte von Tag 10 bis 16 Schwankungen, jedoch wurde prinzipiell eine Erhöhung der Genexpression aller hämatopoetischen Marker von Tag 8 an erfasst, was für den Beginn der Differenzierung hin

zu hämatopoetischen Zellen ab den Tagen 7-8 spricht. Wie Abb. 4-3 zeigt, erhöhte sich die CD45-mRNA-Expression ab Tag 8. Eine maximale CD45-mRNA-Expression wurde um Tag 11 bis 14 beobachtet, während die CD68-mRNA-Expression stetig hochreguliert wurde (100 % an Tag 2, 331 % an Tag 9 und 498 % an Tag 15). Die CD16-mRNA-Expression war an Tag 8 gegenüber Tag 2 schon deutlich erhöht, nach Tag 10 erfuhr diese eine leichte Herunterregulierung. Die Mac-1-mRNA-Expression stieg ab Tag 7 (479 % an Tag 7 gegenüber 100 % an Tag 2) und blieb von Tag 8 an über den gesamten Zeitraum der Untersuchung auf einem konstanten Level.

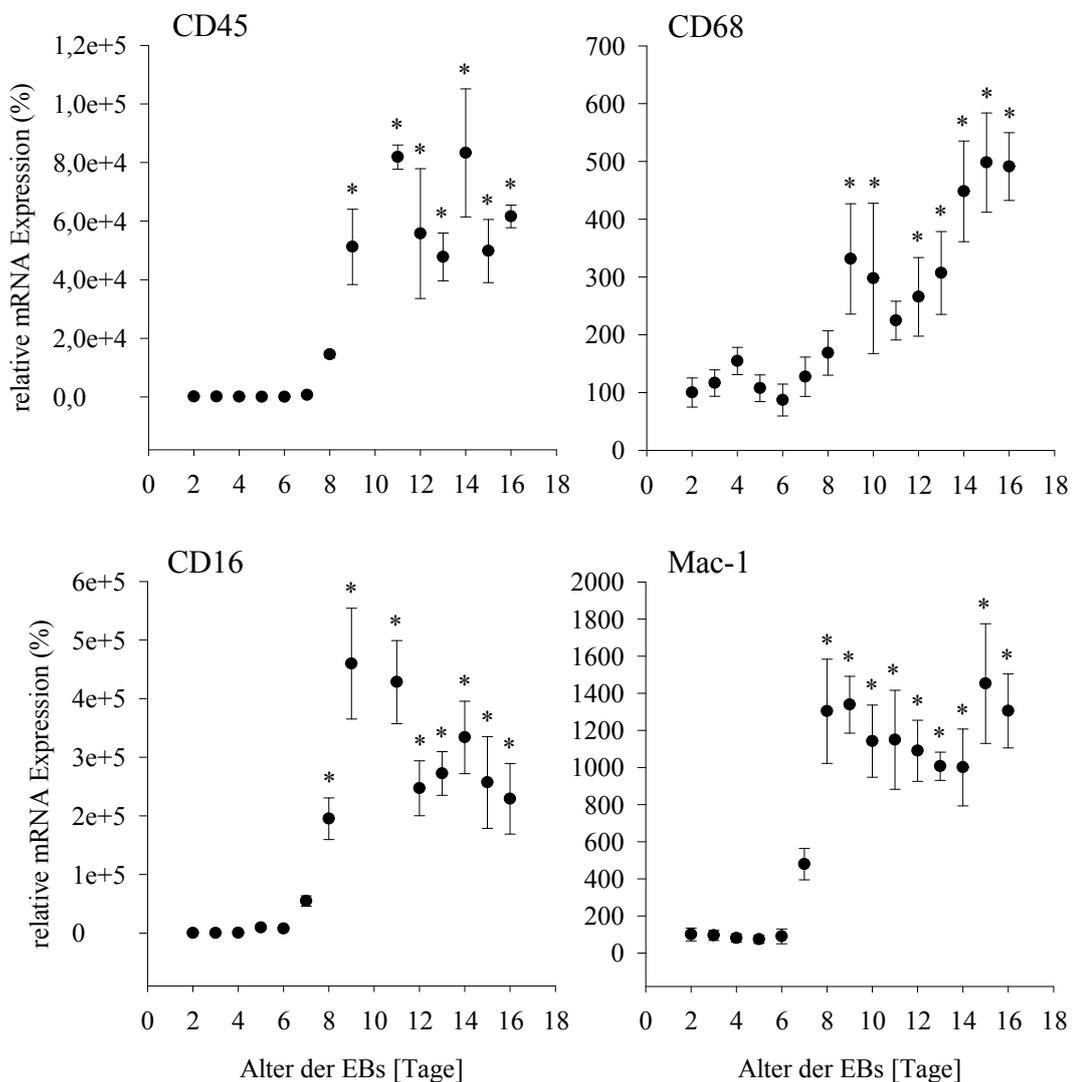


Abb. 4-3: mRNA-Expression von CD45, CD68, CD16, Mac-1 während der EB-Entwicklung. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, *p < 0,05 gegenüber Tag 2 (one-way ANOVA).

CD45, der allgemeine Leukozytenmarker, wurde auch durch Immunfluoreszenz von Tag 10 der EB-Differenzierung an beobachtet (Abb. 4-4), die Zahl der CD45-positiven Zellen stieg bis Tag 12 stark an und sank anschließend leicht.

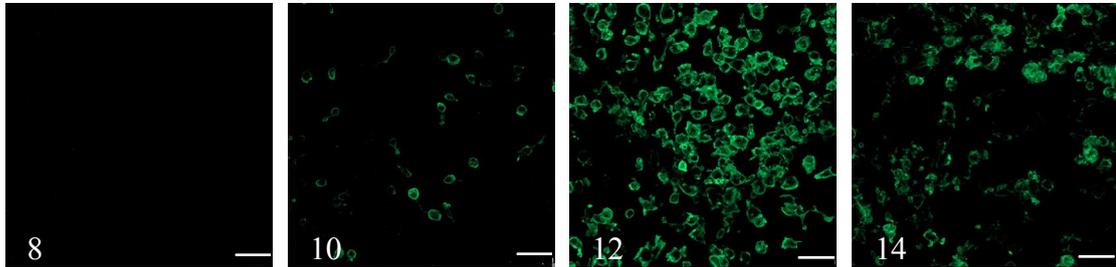


Abb. 4-4: Immunfluoreszenz von CD45 (grün) während der EB-Entwicklung. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zahlen geben das Alter der EBs in Tagen wieder, der Balken entspricht 50 μm .

CD68 (Makrosialin) wird auf Monozyten/Makrophagen exprimiert. Es wurde in der vorliegenden Arbeit als Marker für diesen Zelltyp genutzt. In Übereinstimmung mit den mRNA-Befunden, waren an Tag 8 keine CD68-positiven Zellen in den EBs zu beobachten. Diese wurden erst ab Tag 10 identifiziert, wie in Abb. 4-5 dargestellt ist. CD68-positive Zellen hielten sich vorrangig in räumlicher Nähe zu PECAM-1-positiven Gefäßstrukturen auf. Es wurden auch Zellen, die für PECAM-1 und CD68 doppelpositiv sind, beobachtet. Diese sind in Abb. 4-5 durch gelbe Pfeile gekennzeichnet.

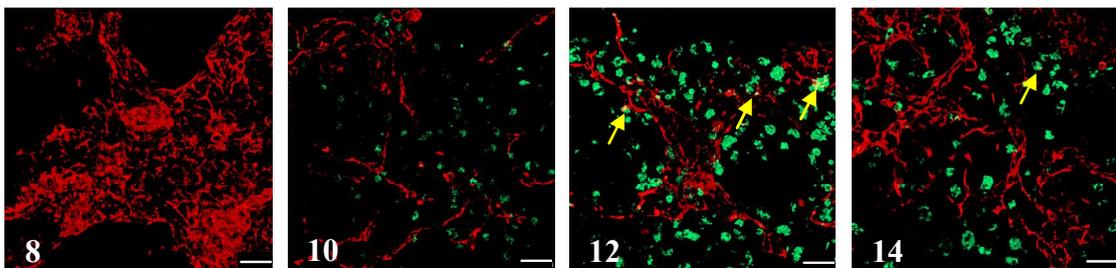


Abb. 4-5: Immunfluoreszenz von PECAM-1 (rot) und CD68 (grün) während der EB-Entwicklung. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zahlen geben das Alter der EBs in Tagen wieder, der Balken entspricht 50 μm . Die gelben Pfeile zeigen PECAM-1⁺/CD68⁺ doppelpositive Zellen.

Neutrophile Granulozyten, die durch die Neutrophil-Antigen-Expression charakterisiert sind, wurden ab Tag 10 der EB-Entwicklung beobachtet (Abb. 4-6). Die Zahl der Neutrophile erreichte an Tag 12 ein Maximum und nahm bis Tag 14 leicht ab.

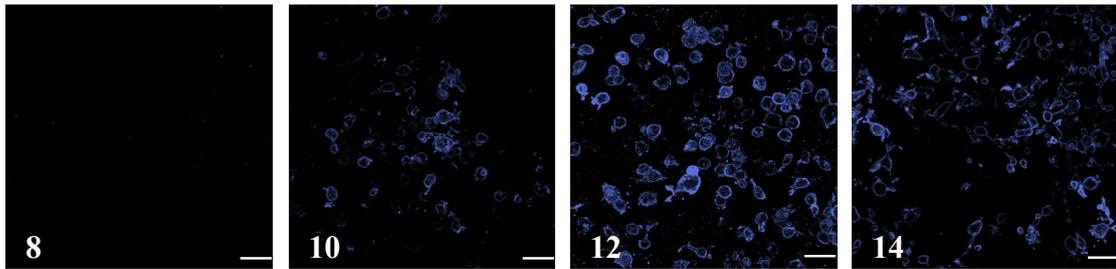


Abb. 4-6: Immunfluoreszenz von Neutrophil-Antigen (blau) während der EB-Entwicklung. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zahlen geben das Alter der EBs in Tagen wieder, der Balken entspricht 50 μm .

4.1.3 Differenzierung von Erythrozyten

Die Identifizierung von Erythrozyten erfolgte anhand der Genexpression der Globinketten, die im für erythroide Zellen charakteristischen Hämoglobin enthalten sind. Obwohl definitive Erythrozyten in der Maus $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - (β major-) und $\beta 2$ -Globin exprimieren, zeigen primitive erythroide Zellen ζ -, βH - und $\epsilon \gamma$ -Globin (Trimborn et al., 1999). Anhand der unterschiedlichen Globinexpressionen lassen sich die Reifestadien der differenzierenden erythroiden Zellen unterscheiden.

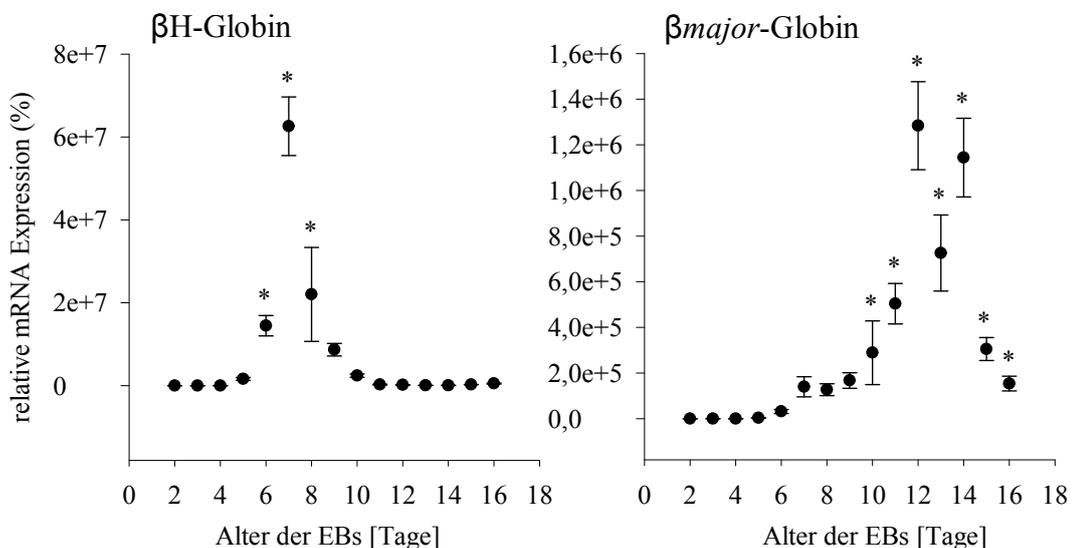


Abb. 4-7: mRNA-Expression von βH -Globin und β major-Globin während der EB-Entwicklung. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Tag 2 (one-way ANOVA).

Die mRNA-Expression von βH -Globin, das Globin der primitiven Erythrozyten, wurde an Tag 6 induziert ($2 \cdot 10^7$ % an Tag 6 gegenüber 100 % an Tag 2), zeigte an Tag 7 ein Maximum ($6 \cdot 10^7$ %) und sank an Tag 8 ($2 \cdot 10^7$ %) wieder ab (Abb. 4-7). An Tag 10 war das Expressionsniveau von Tag 2 wieder erreicht und blieb bis Tag 16 konstant auf diesem Level.

An Tag 7 der Differenzierung stieg die mRNA-Expression von β major-Globin, das Globin der definitiven Erythrozyten, an ($1 \cdot 10^5$ % an Tag 7 gegenüber 100 % an Tag 2) und blieb bis Tag 9 auf diesem Niveau. Die Expressionserhöhung war ab Tag 10 signifikant ($3 \cdot 10^5$ %). Maximale β major-Globin-mRNA-Expression wurde an Tag 12 ($13 \cdot 10^5$ %) und 14 ($11 \cdot 10^5$ %) detektiert.

4.2 Regulation der endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung

4.2.1 Differenzierung flk-1-positiver Progenitorzellen

VEGF spielt während der murinen Embryonalentwicklung eine sehr wichtige Rolle. Die Zellen, die einen VEGF-Rezeptor exprimieren, wurden als wichtige Progenitorzellen für Differenzierungen in weitere Zelltypen identifiziert. Flk-1, der VEGF-Rezeptor 2, wurde als ein Marker für frühe Progenitoren, die in Endothelzellen und hämatopoetische Zellen differenzieren, beschrieben (Fehling et al., 2003, Shalaby et al., 1997). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das Auftreten von flk-1-positiven Zellen während der EB-Entwicklung und die Expression endothelialer Gene in diesen Zellen analysiert.

Von Tag 2 an wurden jeden Tag EBs der Spinnerflasche entnommen und wie unter 3.2.6 beschrieben gehandhabt. In Abb. 4-8 sind die Histogramme der durchflusszytometrischen

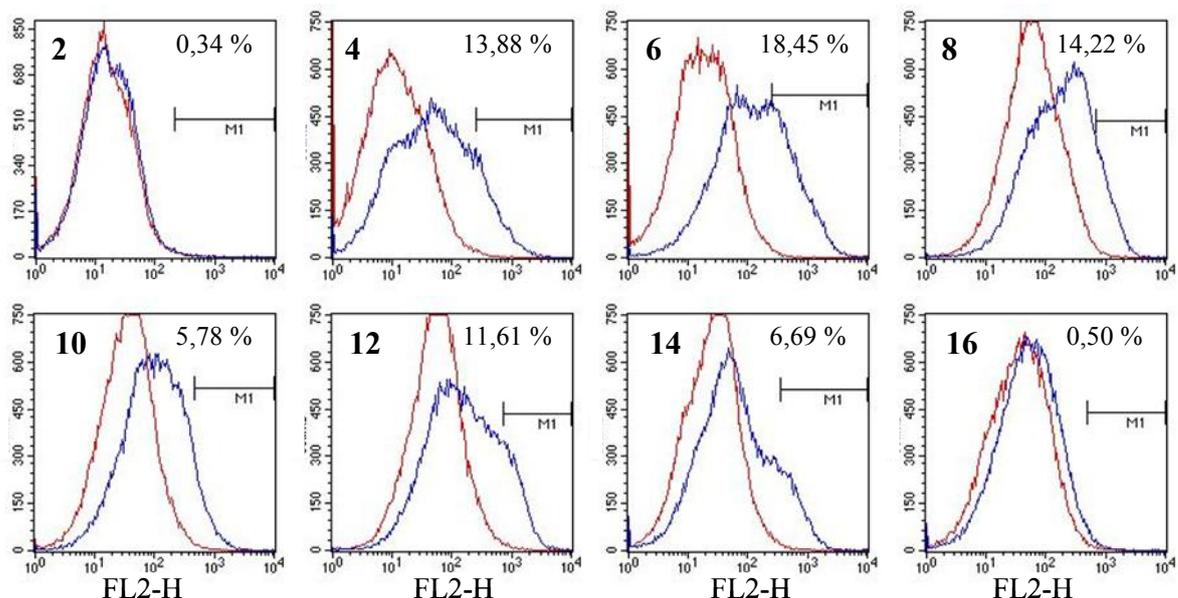


Abb. 4-8: Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl flk-1-positiver Zellen in EBs. Das Alter der EBs ist links und die prozentuale Anzahl der flk-1-positiven Zellen ist rechts in jedem Diagramm angegeben. Die Ordinate gibt die counts wieder, die Abszisse die Fluoreszenzintensität im Kanal FL2-H (Phycoerythrin).

Untersuchung dargestellt, Abb. 4-9 gibt die graphische Auftragung der aus den Histogrammen gewonnenen Daten wieder. Es wird ersichtlich, dass in 2-Tage-alten EBs kaum flk-1-positive Zellen vorhanden waren, in 3-Tage-alten EBs wurden hingegen schon 12 % gezählt. An Tag 6 erreichte die Anzahl der flk-1-positiven Zellen mit 18 % ihr erstes Maximum, Tag 10 zeigte ein Minimum mit 6 %. Ein zweites Maximum wurde an Tag 13 mit 14 % flk-1-positiver Zellen im EB beobachtet. Die Differenzierung von flk-1-positiven Zellen verlief folglich biphasisch, wie dies ebenfalls für die PECAM-1- und VE-Cadherin-Expression (Abb. 4-1) beobachtet wurde.

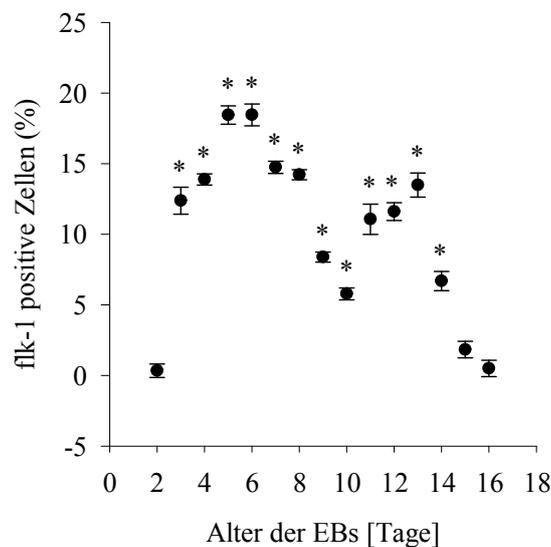


Abb. 4-9: Graphische Darstellung der Anzahl der flk-1-positiven Zellen in EBs verschiedenen Alters. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Tag 2 (one-way ANOVA).

4.2.2 Expression endothelialer Marker in isolierten flk-1-positiven Zellen

Im Zeitfenster der maximalen Anzahl flk-1-positiver Zellen (Tag 5) wurden diese aus den EBs mittels magnetischer Zellseparation (3.2.2) isoliert und der mRNA-Level endothel-spezifischer Antigene (VE-Cadherin, PECAM-1) bestimmt. In flk-1-positiven Zellen, die an Tag 5 aus EBs separiert wurden, zeigte sich eine signifikante Hochregulation der VE-Cadherin- (672 %) sowie der PECAM-1-mRNA-Expression (1132 %), wohingegen flk-1-negative Zellen eine Herunterregulation der Genexpression (39 % für VE-Cadherin und 56 % für PECAM-1) im Vergleich zur Kontrolle (100 % für VE-Cadherin und 100 % für PECAM-1) erfahren (Abb. 4-10).

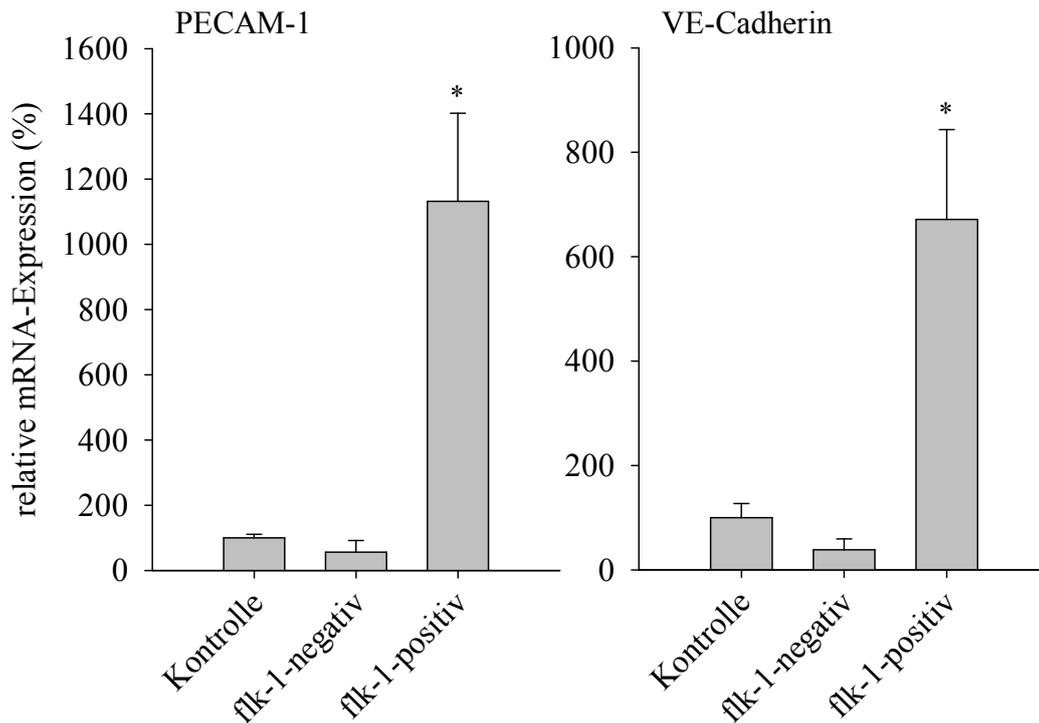


Abb. 4-10: mRNA-Expression von PECAM-1 und VE-Cadherin in isolierten flk-1-positiven Zellen. Dargestellt sind die Expressionen in dissoziierten EBs (Kontrolle), flk-1-negativen und -positiven Zellen, die aus 5-Tage-alten EBs separiert wurden. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber dissoziierten EBs (Kontrolle) (one-way ANOVA).

4.2.3 Runx1-mRNA-Expression während der EB-Entwicklung

Es wurde beschrieben, dass flk-1-positive Zellen endotheliale Gene exprimieren (Abb. 4-10) und somit einen endothelialen Phänotyp aufweisen. Hirai et al. (2003) beschrieben, dass ECs in HCs differenzieren können und dass in diesen Prozess der Transkriptionsfaktor Runx1 involviert ist. Er dient als molekularer Schalter, um flk-1 in der Differenzierung von ECs zu HCs herunterzuregulieren. Wie in Abb. 4-11 dargestellt, war die Runx1-mRNA-Expression während der EB-Entwicklung ab Tag 4 erhöht ($5 \cdot 10^3$ % gegenüber Tag 2 100 %). An Tag 5 erreichte die Runx1-mRNA-Expression ein erstes Maximum ($13 \cdot 10^3$ %). Von Tag 8 bis 11 wurde sie fast bis auf den Level von Tag 2 herunterreguliert um an Tag 13 ein zweites Maximum zu erreichen ($14 \cdot 10^3$ %). An Tag 14 wurde die Runx1-mRNA-Expression wieder herunterreguliert.

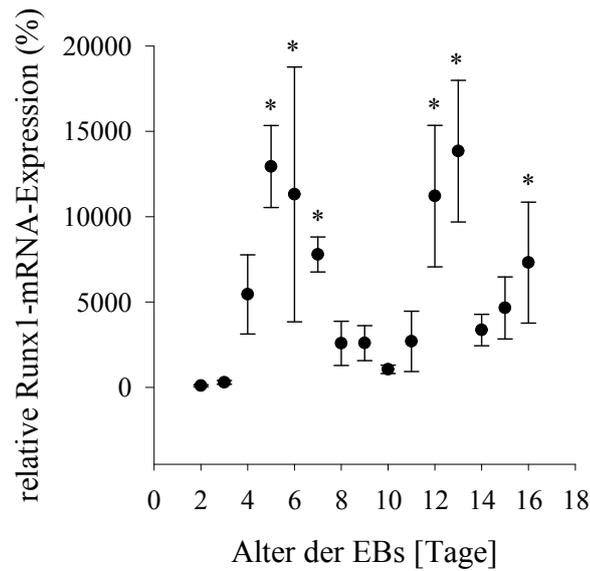


Abb. 4-11: Runx1-mRNA-Expression während der EB-Entwicklung. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Tag 2 (one-way ANOVA).

4.2.4 Expression von Runx1 in isolierten flk-1-positiven Zellen

Abb. 4-12 zeigt die Runx1-Genexpression in Kontroll-Zellen, flk-1-negativen sowie -positiven Zellen, die aus 5-Tage-alten EBs separiert wurden. In den flk-1-negativen Zellen

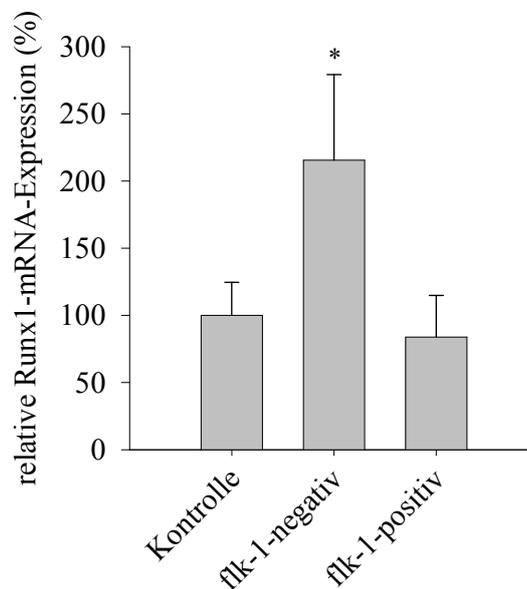


Abb. 4-12: Runx1-mRNA-Expression in flk-1-positiven Zellen. Dargestellt sind die Expressionen in dissoziierten EBs (Kontrolle), flk-1-negativen und -positiven Zellen, die aus 5-Tage-alten EBs separiert wurden. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber dissoziierten EBs (Kontrolle) (one-way ANOVA).

war der Runx1-mRNA-Level auf das Doppelte erhöht (216 % im Vergleich zu Kontrollzellen 100 %), während er in flk-1-positiven Zellen nahezu unbeeinflusst blieb (84 %).

4.2.5 Expression hämatopoetischer und endothelialer Marker sowie von Runx1 in isolierten CD45-positiven Leukozyten

Aus 12-Tage-alten EBs wurden CD45-positive Zellen mit Hilfe der magnetischen Separation (3.2.2) isoliert und deren mRNA hinsichtlich der CD45-, Runx1-, flk-1- und PECAM-1-

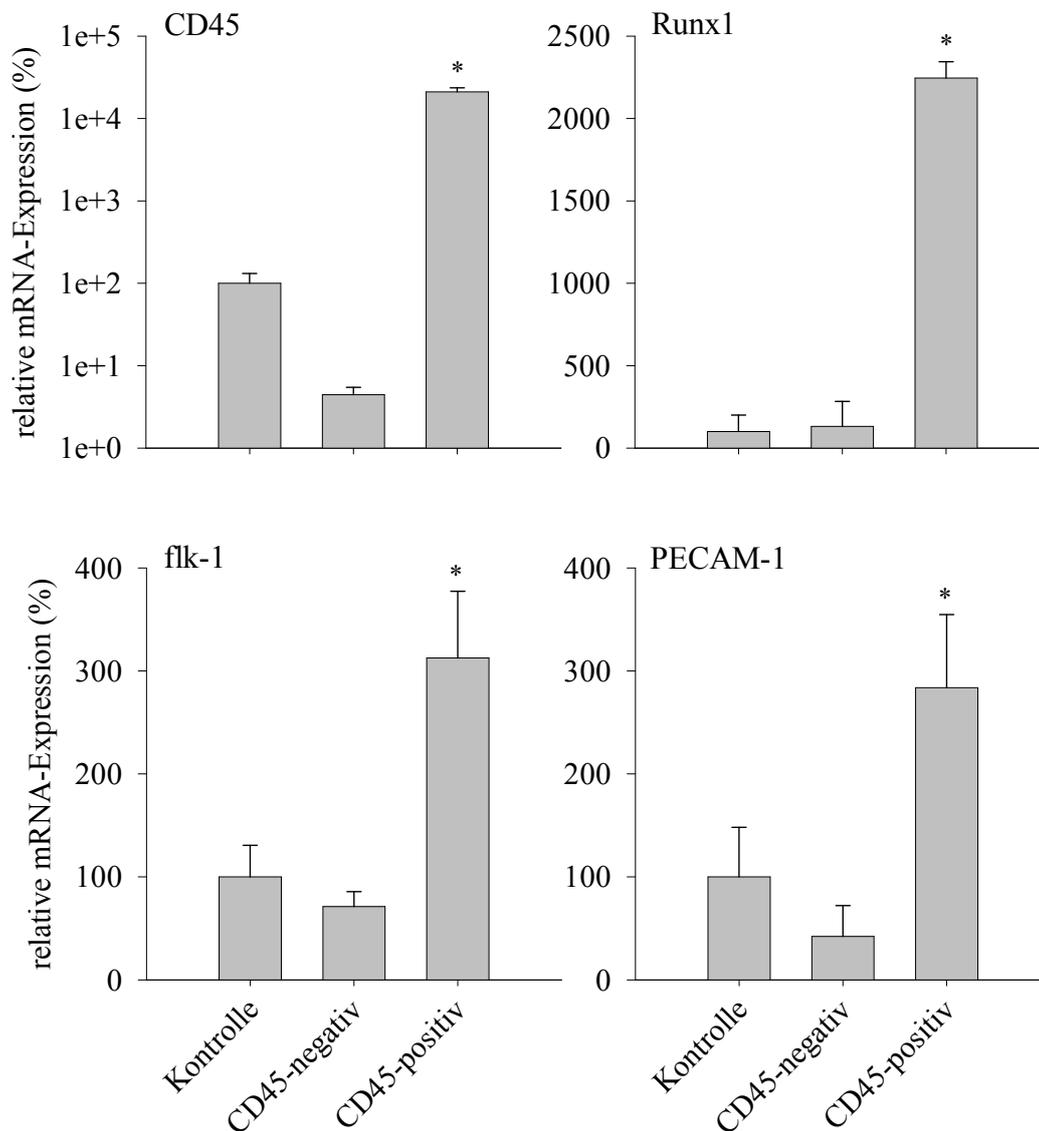


Abb. 4-13: mRNA-Expression von CD45, Runx1, flk-1 und PECAM-1 in CD45-positiven Zellen. Dargestellt sind die Expressionen in dissoziierten EBs (Kontrolle), CD45-negativen und -positiven Zellen, die aus 12-Tage-alten EBs separiert wurden. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, *p < 0,05 gegenüber dissoziierten EBs (Kontrolle) (one-way ANOVA).

Expression untersucht. Wie Abb. 4-13 zeigt, war die CD45-mRNA-Expression in CD45-positiven Zellen um das 200-fache gegenüber dissoziierten Zellen erhöht und in CD45-negativen Zellen bis auf 4 % herunterreguliert. Dies spricht für eine gute Reinheit der isolierten Zellen. Die Runx1-mRNA-Expression war in CD45-positiven Zellen um das 22-fache gegenüber dissoziierten EBs erhöht. Des Weiteren war die flk-1-mRNA-Expression in CD45-positiven Zellen auf das Dreifache (313 %) gegenüber dissoziierten EBs mit 100 % erhöht, wohingegen in der Negativfraktion eine leichte Herunterregulierung nachweisbar war (71 %). Auch die PECAM-1-Genexpression war in der Positivfraktion signifikant hochreguliert (284 % gegenüber dissoziierten EBs 100 %) und in der Negativfraktion erniedrigt (42 %).

4.3 Inhibierung der Angiogenese und Leukozytendifferenzierung

Um zu zeigen, dass flk-1 wichtige Funktionen in der embryonalen Differenzierung von flk-1-positiven Progenitorzellen in endotheliale und hämatopoetische Zellen ausübt, wurde während der EB-Entwicklung die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors durch SU5416 inhibiert und die Differenzierung von PECAM-1-positiven endothelialen Gefäßstrukturen sowie CD45-, CD68- und Neutrophil-Antigen-positiven Leukozyten untersucht. An Tag 6 wurden EBs der Spinnerflasche entnommen, auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen ausplattiert und von Tag 6 bis 12 mit 4 μ M SU5416 inkubiert. SU5416 wurde in DMSO gelöst appliziert, daher wurden jeweils EBs mitgeführt, die mit DMSO inkubiert wurden, um mögliche Artefakte dieses Lösungsmittels auf die Angiogenese und Leukozytendifferenzierung auszuschließen.

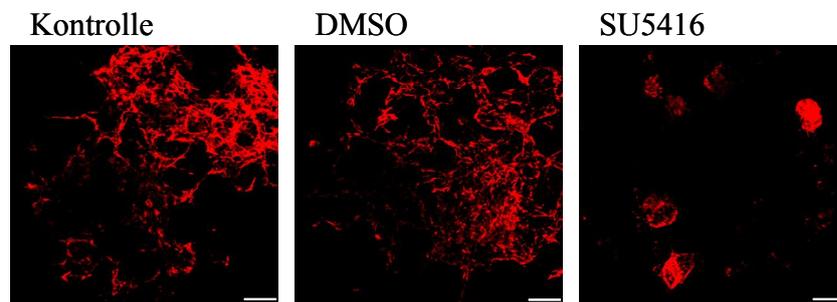


Abb. 4-14: Einfluss des VEGF-Rezeptor-Inhibitors SU5416 auf die Angiogenese in EBs. Immunhistochemische Analyse der PECAM-1-Expression (rot) in 12-Tage-alten EBs, die von Tag 6 an mit 4 μ M SU5416 inkubiert wurden. Kontroll-EBs wurden ohne SU5416 kultiviert. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen, der Balken entspricht 50 μ m.

Unbehandelte EBs zeigten ausgeprägte PECAM-1-positive kapillarartige Strukturen (Abb. 4-14). Die Gefäßbildung wurde in EBs, die mit DMSO inkubiert wurden, nicht beeinflusst. In

mit 4 μM SU5416 behandelten EBs wurde jegliche Gefäßbildung unterdrückt: PECAM-1-positive Cluster wurden beobachtet, jedoch wurde die Angiogenese ausgehend von PECAM-1-positiven Clustern inhibiert.

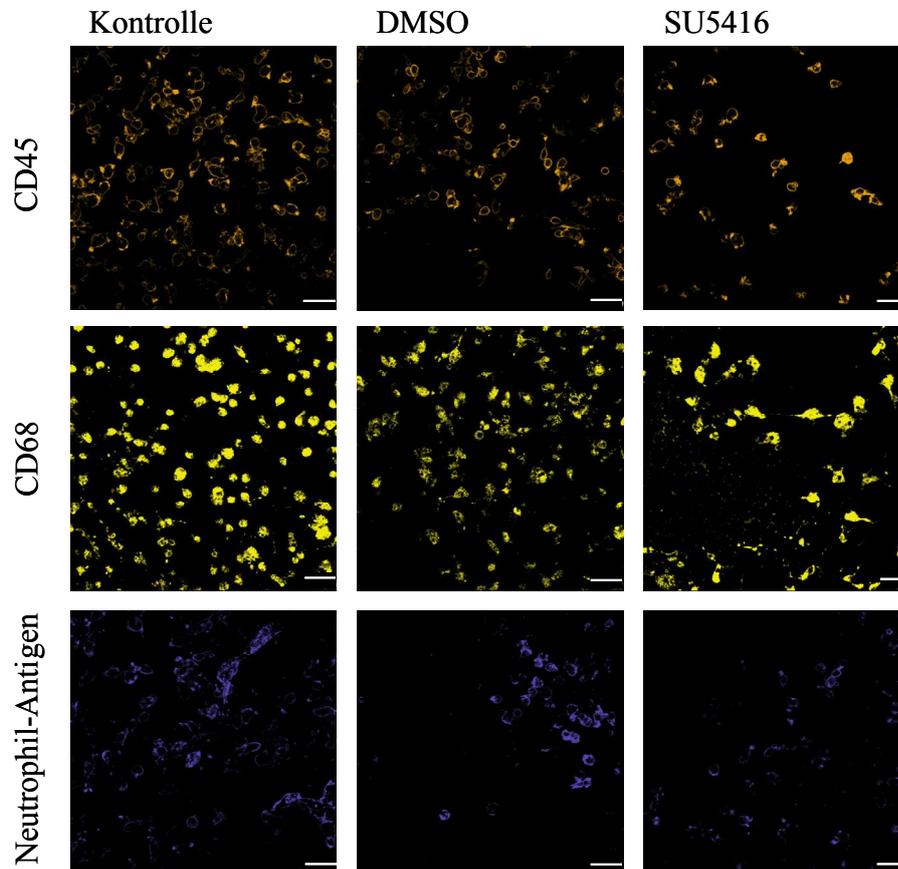


Abb. 4-15: Einfluss von SU5416 auf die Leukozytendifferenzierung in EBs. Immunhistochemische Analyse der Expression von CD45 (orange), CD68 (gelb) und Neutrophil-Antigen (violett); Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen, der Balken entspricht 50 μm .

Mit 4 μM SU5416 inkubierte EBs zeigten eine deutlich geringere Zahl an CD45-, CD68- oder Neutrophil-Antigen-positiven Zellen (Abb. 4-15), wohingegen die unbehandelten EBs die für ihr Alter typische Anzahl dieser Zellen enthielten. Zur quantitativen Auswertung der LSM-Aufnahmen wurden die relativen positiven Flächen ermittelt (Abb. 4-16). Kontroll-EBs zeigten eine relative CD45-positive Fläche von 100 %. DMSO zeigte keinen Einfluss (89 %). In mit SU5416 behandelten EBs war die CD45-positive Fläche signifikant herunterreguliert (17 %). Die relative CD68-positive Fläche betrug in Kontroll-EBs 100 %. Die Inkubation mit 4 μM SU5416 führte zur signifikanten Herunterregulierung der relativen CD68-positiven Fläche (41 %), wohingegen mit DMSO inkubierte EBs eine leichte Erhöhung des Wertes (121 %) zeigten. Neutrophil-Antigen wurde in mit SU5416 inkubierten EBs (34 %)

signifikant zu Kontroll-EBs (100 %) herunterreguliert. Die mit DMSO inkubierten EBs erfuhren ebenfalls eine Erniedrigung (64 %).

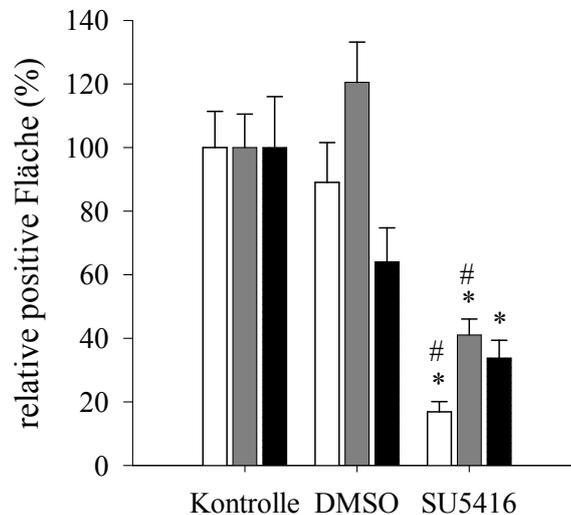


Abb. 4-16: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenz von CD45 (weiß), CD68 (grau) und Neutrophil-Antigen (schwarz) in SU5416-inkubierten EBs.

EBs wurden von Tag 6 bis 12 mit 4 μ M SU5416 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Kontroll-EBs und # $p < 0,05$ gegenüber mit DMSO inkubierten EBs (one-way ANOVA).

4.4 Konfrontation von *Embryoid Bodies* mit Tumorsphäroiden

4.4.1 Migration der Tumorzellen in den Konfrontationskulturen

Tumor-induzierte Angiogenese wurde sowohl *in vivo* (Grunstein et al., 1999) als auch *in vitro* (Wartenberg et al., 2001) beschrieben, wobei in den zitierten *In-vitro*-Versuchen die Konfrontationskultur zwischen EBs und multizellulären Tumorsphäroiden (MTS) genutzt wurde. Es stellte sich nun die Frage, ob auch Leukozyten wie *in vivo* beschrieben (Sica et al., 2006) an der Tumorprogression in Konfrontationskulturen beteiligt sind.

10-Tage-alte EBs wurden mit MTS der murinen Tumorzelllinie 4T1 in hängenden Tropfen konfrontiert. Um die EBs von den Tumorsphäroiden unterscheiden zu können, wurden die MTS vor der Konfrontation mit grünem Celltracker-Farbstoff markiert (3.2.1.5). An Tag 10+1 (ein Tag nach Generierung der Konfrontationskulturen) wurden die Konfrontationskulturen auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen ausplattiert und an Tag 10+2, 10+4 und 10+6 hinsichtlich einsetzender Angiogenese und Migration von Leukozyten mittels Immunfluoreszenz analysiert.

Bereits 24 Stunden nach Generierung von Konfrontationskulturen bestehend aus EBs und MTS ließ sich eine deutliche Migration der Tumorzellen ausgehend vom Tumorsphäroid in

den EB beobachten, wie Abb. 4-17 zeigt. Die Migration dieser Zellen nahm mit zunehmendem Alter der Konfrontationskultur zu.

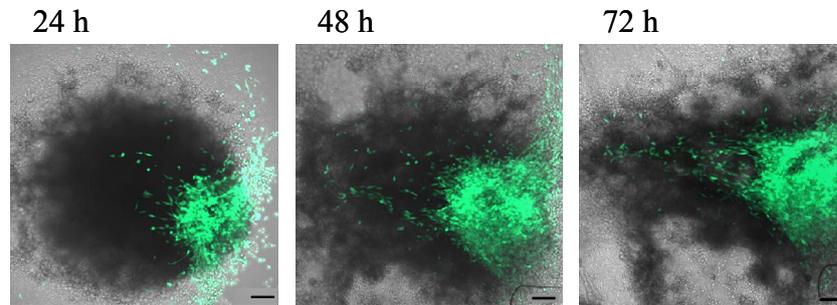


Abb. 4-17: Migration von Tumorzellen in den EB.

Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen von Konfrontationskulturen zwischen EBs und mit Celltracker-markierten MTS (grün). Die grün markierten Tumorzellen migrieren in den EB (dargestellt in grau). Das Alter der Konfrontationskulturen (in Stunden) ist über den Bildern wiedergegeben, der Balken entspricht 100 μm .

4.4.2 Tumorinduzierte Angiogenese

Zwei Tage nach Ansetzen der Konfrontationskulturen zwischen EBs und MTS war eine einsetzende Angiogenese in der Grenzregion zwischen EB und MTS zu beobachten (Abb. 4-18). Mit zunehmendem Alter der Konfrontationskulturen wuchsen mehr gefäßartige PECAM-1-positive Strukturen hin zum Tumorgewebe aus, so dass das Tumorgewebe vollständig vaskularisiert wurde.

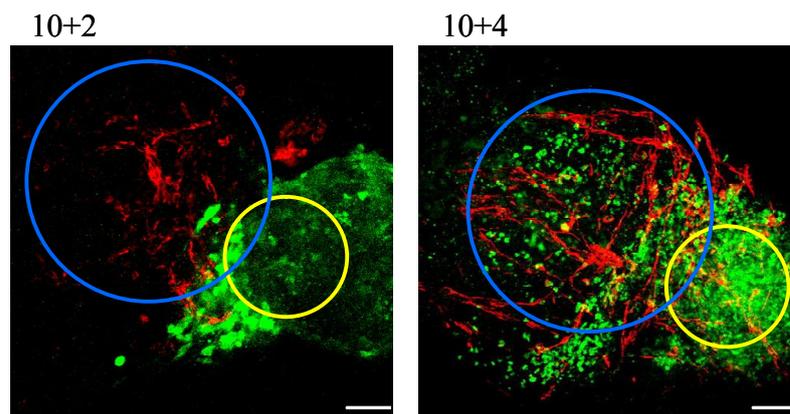


Abb. 4-18: Tumorinduzierte Angiogenese ausgehend vom EB in Richtung MTS.

Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen von Konfrontationskulturen zwischen EBs und mit Celltracker-markierten MTS. Rot: PECAM-1-positive Strukturen, grün: Tumorzellen. Der blaue Kreis zeigt den EB, der gelbe Kreis zeigt den MTS. An Tag 10+2 sind erste PECAM-positive Gefäßstrukturen an der Grenzfläche zum MTS (grün) sichtbar. An Tag 10+4 ist der MTS vollständig vaskularisiert. Das Alter der Konfrontationskulturen (in Tagen) ist über den Bildern wiedergegeben, der Balken entspricht 50 μm .

4.4.3 Tumorinduzierte Leukozytendifferenzierung

Während der Tumor-induzierten Angiogenese ließ sich eine Invasion von Leukozyten in das Tumorgewebe nachweisen (Abb. 4-19). Zwei Tage nach Generierung der Konfrontationskulturen wurde eine vermehrte Anzahl an CD45-positiven Zellen in der Grenzregion zwischen EB und MTS identifiziert. Weitere zwei Tage später invadierten CD45-positive Zellen vollständig in den Tumorsphäroid. Eine starke Invasion der CD68-positiven Zellen in das Tumorgewebe wurde schon an Tag 10+2 beobachtet, diese setzte sich an den Tagen 10+4 und 10+6 fort. Neutrophil-Antigen-positive Zellen migrierten ab Tag 10+2 in Richtung des Tumorgewebes, jedoch invadierten sie an den darauffolgenden Tagen nicht in das Tumorgewebe sondern umschlossen dieses.

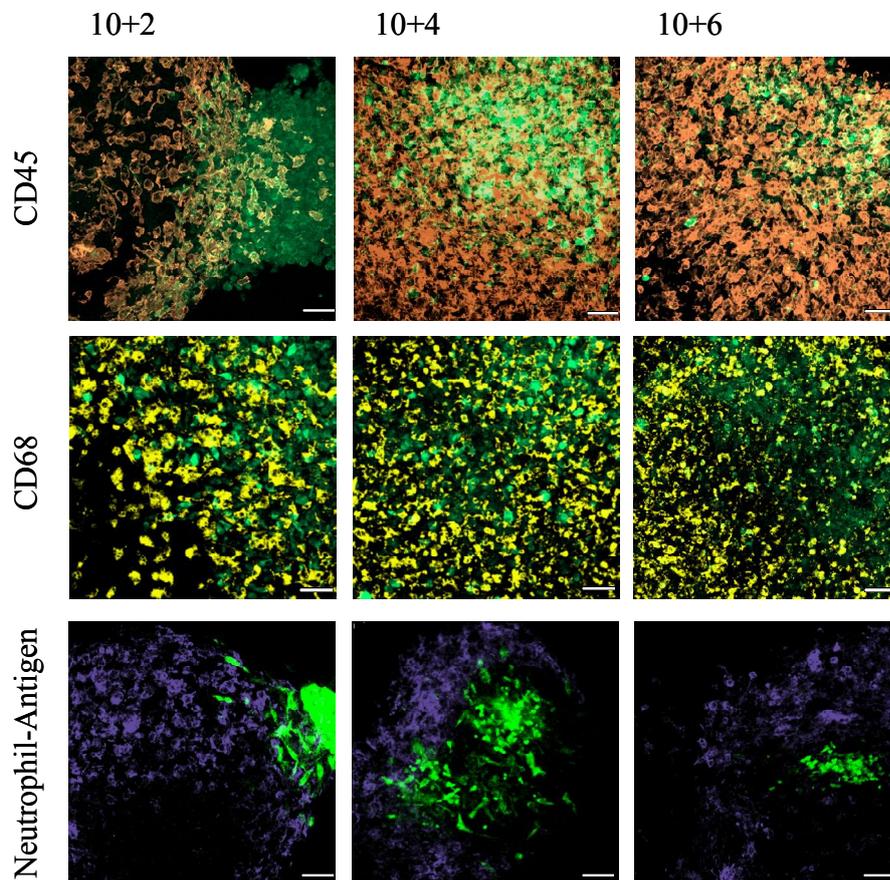


Abb. 4-19: Invasion von Leukozyten ausgehend vom EB in Richtung MTS. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen von Konfrontationskulturen zwischen EBs und mit Celltracker-markierten MTS. Immunfluoreszenz von CD45 (orange), CD68 (gelb) und Neutrophil-Antigen (violett). Die Bilder der Kontroll-EBs sind nicht dargestellt, gehen jedoch in die quantitative Auswertung (Abb. 4) ein. Das Alter der Konfrontationskulturen (in Tagen) ist über den Bildern wiedergegeben, der Balken entspricht 50 μm .

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Aufnahmen zeigt die erhöhte Anzahl CD45- und CD68-positiver Zellen in den Konfrontationskulturen unterschiedlichen

Alters verglichen mit EBs allein (Abb. 4-20). Die Anwesenheit des Tumorsphäroids förderte nicht nur die Migration von Leukozyten in Richtung Tumorgewebe, sondern auch deren vermehrte Differenzierung. In 2-Tage-alten Konfrontationskulturen zeigte sich eine fünffach höhere Anzahl an CD45-positiven Zellen verglichen mit EBs allein (451 % in der Konfrontationskultur gegenüber 100 % in Kontroll-EBs). In 4-Tage-alten Konfrontationskulturen erhöhte sich dieser Anteil auf das Zehnfache (1110 % in der Konfrontationskultur gegenüber 116 % in Kontroll-EBs) und in 6-Tage-alten Konfrontationskulturen auf das 20-fache (1198 % in der Konfrontationskultur gegenüber 67 % in Kontroll-EBs).

Die Fläche der CD68-positiven Zellen war in Konfrontationskulturen an Tag 10+2 gegenüber EBs allein dreifach (283 % in der Konfrontationskultur gegenüber 100 % in Kontroll-EBs) erhöht. An Tag 10+4 und 10+6 ergab sich eine vierfache Erhöhung (256 % in der Konfrontationskultur gegenüber 61 % in Kontroll-EBs an Tag 10+4 und 223 % in der Konfrontationskultur gegenüber 55 % in Kontroll-EBs) der CD68-positiven Fläche.

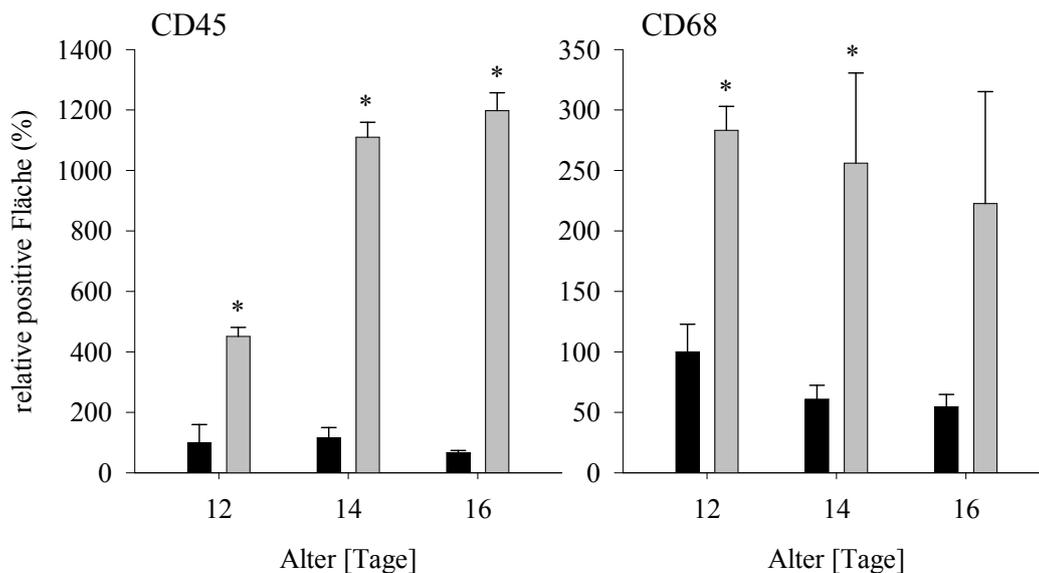


Abb. 4-20: Quantitative Auswertung der Leukozyteninvasion ausgehend vom EB in Richtung MTS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen der CD45- und CD68-positiven Fläche in Konfrontationskulturen zwischen EBs und MTS (grau) im Vergleich zu Kontroll-EBs (schwarz). * $p < 0,05$ gegenüber Kontroll-EBs (t-Test).

4.5 Funktionalität der Leukozyten *in vitro*

4.5.1 Reaktion der *Embryoid Bodies* auf M-CSF

Um die Funktionalität der im EB differenzierenden Leukozyten zu testen, wurde zum einen die Antwort der EBs auf Wachstumsfaktoren und zum anderen die Reaktion der EBs oder der

aus den EBs isolierten Leukozyten auf bakterielle Infektionen (Inkubation mit Lipopolysacchariden oder *E. coli*) untersucht.

Zur Bestimmung des günstigsten Zeitpunkts für die Stimulation der EBs mit Wachstumsfaktoren, die die hämatopoetische Differenzierung fördern, wurde die altersabhängige Expression der Rezeptoren für koloniestimulierende Faktoren analysiert. Es sind koloniestimulierende Faktoren für die Differenzierung in Monozyten/Makrophagen (M-CSF), Granulozyten (G-CSF) und Granulozyten/Monozyten/Makrophagen (GM-CSF) bekannt. Diese Faktoren sowie deren Rezeptoren spielen bei der Differenzierung von Leukozyten eine wichtige Rolle. Wie Abb. 4-21 zeigt, wurde die mRNA von *c-fms*, dem Rezeptor für *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), an Tag 7 sehr schwach und von Tag 8 an stärker exprimiert. AIC2B, ein gemeinsamer Rezeptor von *granulocyte and macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *interleukin* IL-3 und IL-5 wurde ab Tag 6 stark exprimiert, die mRNA-Expression nahm jedoch mit zunehmendem Alter der EBs wieder ab. Die mRNA des G-CSF-Rezeptors wurde ab Tag 6 exprimiert.

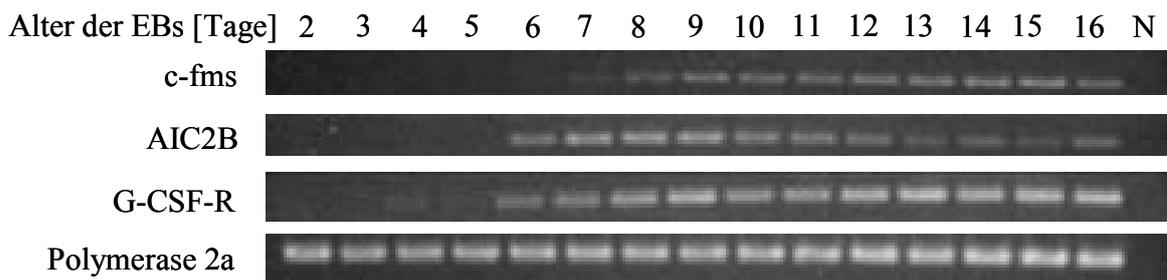


Abb. 4-21: mRNA-Expression der Rezeptoren koloniestimulierender Faktoren während der EB-Entwicklung. Repräsentative Aufnahmen von Agarosegelen aus drei unabhängigen Versuchen, N zeigt die Negativkontrolle.

Da *c-fms* an Tag 8 in den EBs exprimiert wird, wurden die EBs von Tag 8 bis Tag 10 mit 250 ng/ml M-CSF inkubiert. Anschließend wurde die CD68-Expression mittels Immunfluoreszenz analysiert, um Rückschlüsse auf die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen zu ziehen. Wie Abb. 4-22 zeigt, erhöhte sich in EBs, die mit M-CSF inkubiert wurden, die Anzahl der CD68-positiven Zellen an Tag 10. Die Auswertung der Immunfluoreszenz zeigt eine um das Dreifache erhöhte CD68-positive Fläche in mit M-CSF stimulierten EBs (292 %) gegenüber Kontroll-EBs (100 %).

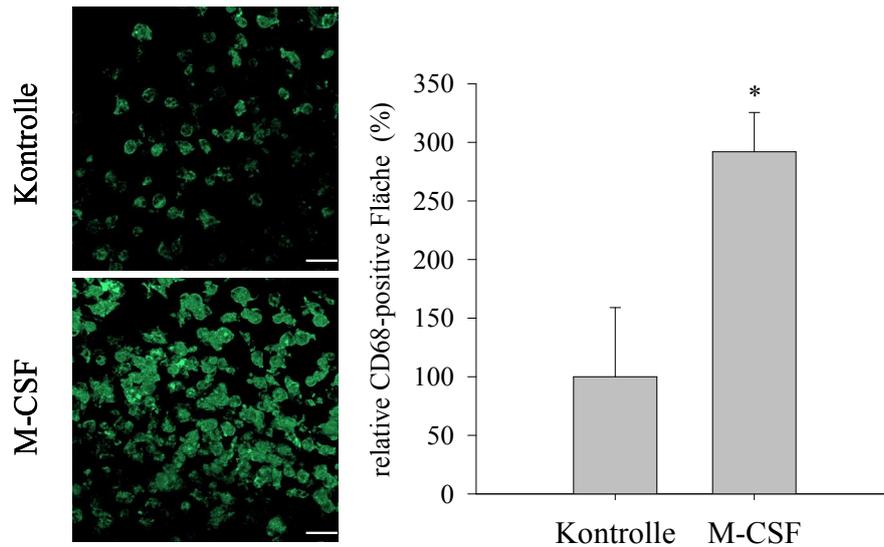


Abb. 4-22: CD68-Immunfluoreszenz in M-CSF-stimulierten EBs. EBs wurden von Tag 8 bis 10 mit 250 ng/ml M-CSF stimuliert. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen (links) und Mittelwert \pm Standardfehler der CD68-positiven Fläche (rechts). Der Balken entspricht 50 μ m. * $p < 0,05$ (t-Test).

4.5.2 Reaktion der *Embryoid Bodies* auf Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) sind Zellmembranbestandteile gramnegativer Bakterien und werden von reifen Leukozyten als Pathogene erkannt. Nach Inkubation der EBs mit LPS wurde untersucht, ob diese zur Erkennung von Pathogenen befähigt sind. Dazu wurden 9-Tage-alte EBs mit verschiedenen LPS-Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert und die

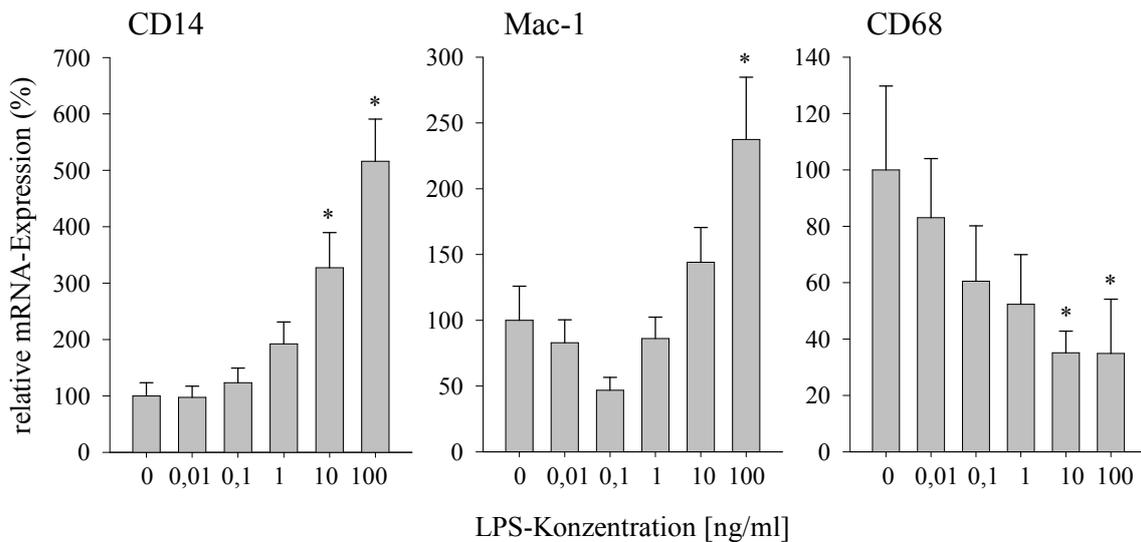


Abb. 4-23: mRNA-Expression von CD14, Mac-1 und CD68 in LPS-stimulierten EBs. 9-Tage-alte EBs wurden für 24 Stunden mit LPS in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Kontroll-EBs (one-way ANOVA).

mRNA-Expression des LPS-Rezeptors CD14, des Integrins Mac-1 und von CD68 analysiert. Abb. 4-23 zeigt, dass sich ab einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml eine Erhöhung der CD14-mRNA-Expression (192 % gegenüber 100 % in Kontroll-EBs) nachweisen ließ. Nach Inkubation der EBs mit 10 ng/ml LPS wurde die CD14-mRNA-Expression signifikant auf das Dreifache erhöht. Mit 100 ng/ml LPS erhöhte sich die mRNA-Expression von CD14 auf das Fünffache. Die mRNA-Expression des Integrins Mac-1 wurde durch Inkubation mit LPS in den EBs zunächst bis zu einer LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml herunterreguliert (47 % nach Inkubation mit 0,1 ng/ml LPS gegenüber 100 % in Kontroll-EBs). Ab einer LPS-Konzentration von 10 ng/ml erhöhte sich die Mac-1-mRNA-Expression (144 %) und zeigte in EBs, die mit 100 ng/ml LPS inkubiert wurden, eine bis zu 2,4-fache Erhöhung der mRNA-Expression. Anders verhielt es sich mit der CD68-mRNA-Expression. CD68 wurde in EBs, die mit LPS kultiviert wurden, stetig herunterreguliert. Nach Inkubation mit 10 und 100 ng/ml LPS zeigten die EBs eine signifikante Herunterregulierung der mRNA-Expression von CD68 (35 % nach 10 ng/ml LPS und 35 % nach 100 ng/ml LPS gegenüber 100 % in Kontroll-EBs).

4.5.3 Funktionalität der aus *Embryoid Bodies* isolierten Leukozyten

Des Weiteren wurden CD45-positive Leukozyten aus 12-Tage-alten EBs mittels magnetischer Zellseparation isoliert (3.2.2) und auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen ausplattiert. Einen

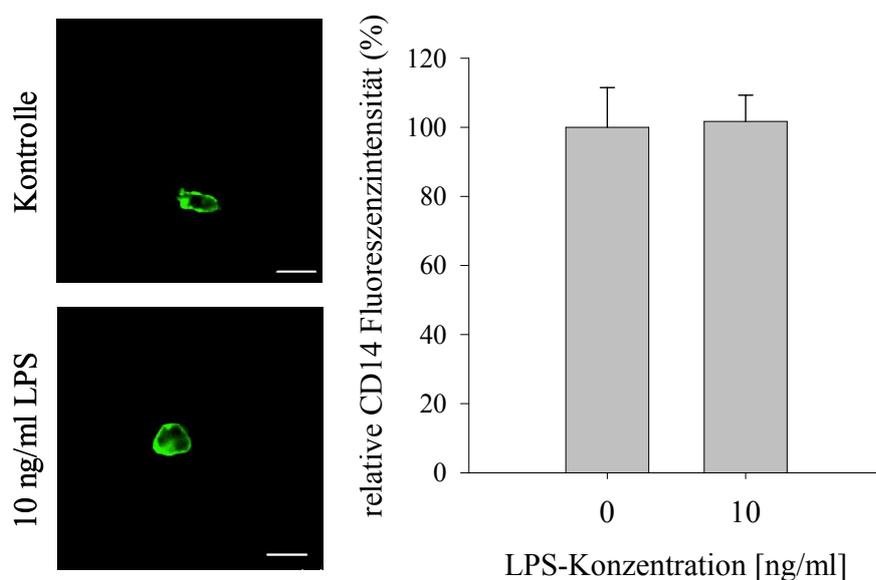


Abb. 4-24: CD14-Immunfluoreszenz in isolierten LPS-inkubierten CD45-positiven Zellen. CD45-positive Zellen wurden 20 Minuten mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 30 Zellen, der Balken entspricht 20 μ m. Graphische Auswertung der relativen CD14-Fluoreszenzintensität (%). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen, Signifikanztest (t-Test).

Tag später wurden sie hinsichtlich ihrer Reaktion auf LPS oder *E. coli* untersucht. Dazu wurden sie für 20 Minuten mit 10 ng/ml LPS inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass nur ein geringer Prozentsatz der isolierten CD45-positiven Leukozyten den LPS-Rezeptor CD14 exprimiert. Es konnte kein Anstieg der CD14-Expression in den CD45-positiven Leukozyten beobachtet werden (Abb. 4-24): Die mit LPS inkubierten Leukozyten zeigten eine relative Fluoreszenz von 102 % im Vergleich zur Kontrolle, in der eine relative Fluoreszenz von 100 % zu beobachten war.

Nach 20-minütiger Behandlung mit 10 ng/ml LPS wurden isolierte CD45-positive Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCF-DA) inkubiert. In Abb. 4-25 wird deutlich, dass in mit LPS-behandelten CD45-positiven Zellen der Level an freien Sauerstoffradikalen nach 15 Minuten signifikant höher lag (100 % nach 5 Minuten, 137 % nach 10 Minuten und 172 % nach 15 Minuten) als in den unbehandelten Zellen (100 % nach 5 Minuten, 108 % nach 10 Minuten und 102 % nach 15 Minuten).

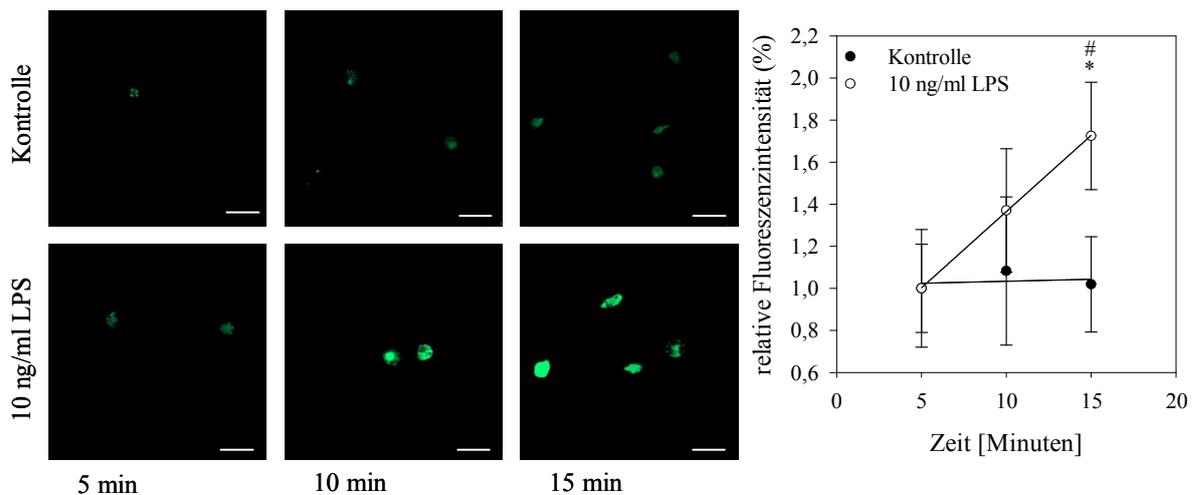


Abb. 4-25: Intrazelluläre ROS-Generierung in isolierten LPS-inkubierten CD45-positiven Zellen. CD45-positive Zellen wurden 20 Minuten mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der DCF-Fluoreszenz in CD45-positiven Zellen ohne LPS-Inkubation (Kontrolle) und der CD45-positiven Zellen nach LPS-Inkubation nach 5, 10 und 15 Minuten. Der Balken entspricht 20 µm. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 40-60 Zellen, * $p < 0,05$ (one-way ANOVA gegenüber dem jeweiligen Wert nach 5 Minuten), # $p < 0,05$ (t-Test: Wert der LPS-Inkubation gegenüber Kontroll-Level).

Isolierte CD45-positive Zellen wurden für 20 Minuten mit 10 ng/ml LPS inkubiert, anschließend fixiert und die Nox2-Expression mittels Immunfluoreszenz untersucht. Durch Abb. 4-26 wird deutlich, dass CD45-positive Leukozyten Nox2 exprimieren. In den mit LPS behandelten CD45-positiven Zellen blieb die Nox2-Expression unverändert (102 % in LPS-behandelten Leukozyten gegenüber 100 % in Kontroll-Leukozyten).

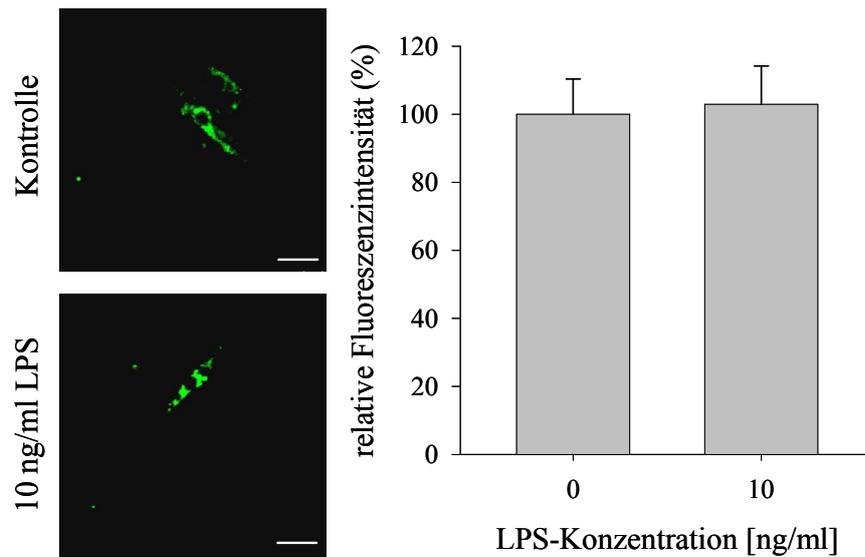


Abb. 4-26: Nox2-Immunfluoreszenz in isolierten LPS-inkubierten CD45-positiven Zellen. CD45-positive Zellen wurden 20 Minuten mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 30 Zellen. Der Balken entspricht 20 μm . Graphische Auswertung der relativen Nox2-Fluoreszenzintensität (%). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen, Signifikanztest (t-Test).

Die aus 12-Tage-alten EBs separierten CD45-positiven Zellen wurden für zwei Stunden mit chemisch- und hitzeinaktivierten FITC-markierten *E. coli*-Partikeln inkubiert, anschließend fixiert und die CD45-Immunfluoreszenz aufgenommen. Durch die LSM-Aufnahmen im Z-Stapel wird ersichtlich, dass *E. coli*-Partikel an CD45-positiven Zellen adhärten, wie Abb. 4-27A erkennen lässt. Abb. 4-27B zeigt, wie sich CD45-positive Vesikel abschnürten, die *E. coli*-Partikel enthielten. Des Weiteren wurden *E. coli*-Partikel gänzlich von CD45-positiven Zellen aufgenommen (Abb. 4-27C).

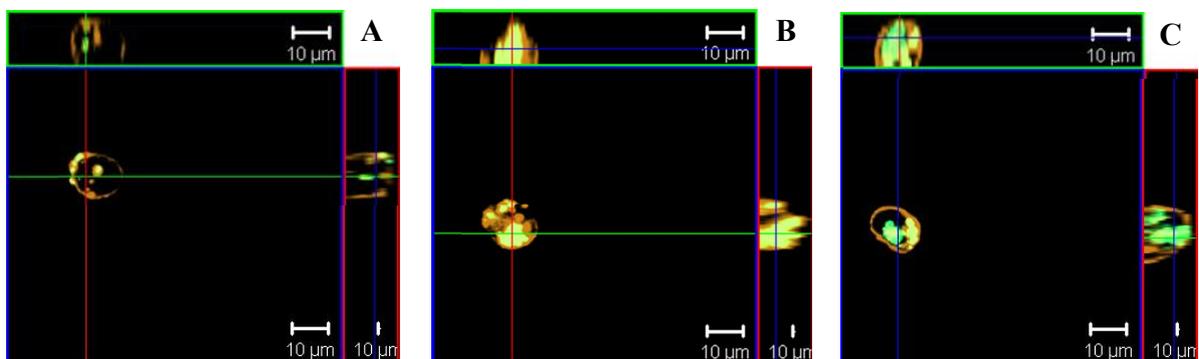


Abb. 4-27: Immunfluoreszenz von FITC-markierten *E. coli*-Partikeln (grün) in isolierten CD45-positiven Zellen. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen, der Balken entspricht 10 μm . A) Adhäsion von *E. coli*-Partikeln an der Zelloberfläche von CD45-positiven Zellen, B) Endocytose der *E. coli*-Partikel und C) vollständige Aufnahme der *E. coli*-Partikel durch CD45-positive Zellen.

4.6 Reaktion der *Embryoid Bodies* auf verschiedene Polymermaterialien

4.6.1 Einfluss von Polymermaterialien auf die Angiogenese in EBs

Eine Anwendung des EBs ist der EST (1.3), der 2000 als *In-vitro*-Test zur Einschätzung des embryotoxischen Potentials verschiedener Chemikalien validiert und anerkannt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der EB auch zur Testung verschiedener Polymermaterialien hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als *Scaffold*-Materialien im *Tissue Engineering* genutzt werden kann. Dazu wurden verschiedene bioabbaubare, mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1-Anillino-8-naphthalensulfonat (ANS) versetzte Polymermaterialien, bestehend aus Caprolacton und L-Lactid, eingesetzt. Die Messung des Einflusses der Polymere auf Angiogenese und Leukozytendifferenzierung in EBs diente als Parameter. 10-Tage-alte EBs wurden mit den verschiedenen Materialien in hängenden Tropfen konfrontiert und einen Tag später auf Gelatine-beschichtete Glasplättchen ausplattiert. An Tag 10+3 und 10+6 (3 und 6 Tage nach Generierung) wurden die Konfrontationskulturen hinsichtlich ihrer PECAM-1- und CD68-Immunfluoreszenz in den EBs untersucht. Die mRNA-Expression von M-CSF und des *macrophage chemotactic protein* (MCP-1), welches Makrophagen anlockt, wurde an vier verschiedenen Tagen in den Konfrontationskulturen analysiert.

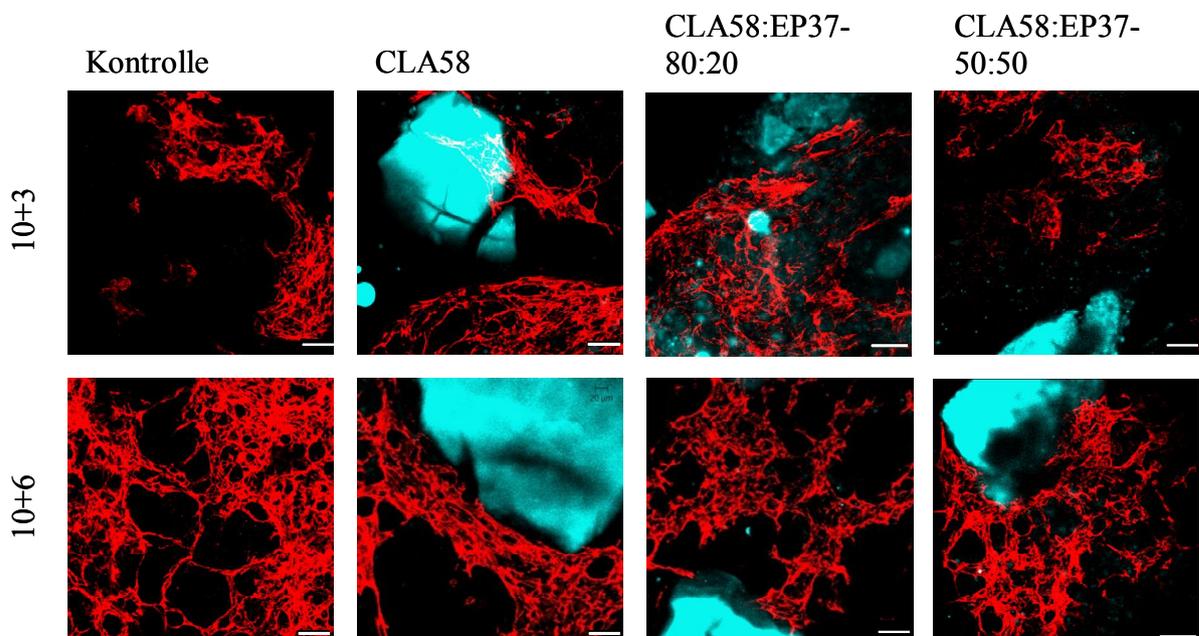


Abb. 4-28: Einfluss verschiedener Polymermaterialien auf die Angiogenese. CLA58 und EP37 sind aus Caprolacton und L-Lactid bestehende Polymere, wobei im EP37 die Endgruppen methacryliert sind. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Versuchen, der Balken entspricht 50 μm . Hellblau: ANS-haltiges Polymermaterial, rot: PECAM-1.

Abb. 4-28 zeigt die kapillaren PECAM-1-positiven Strukturen in Konfrontationskulturen zwischen EBs und verschiedenen Polymermaterialien. Die Differenzierung und Organisation der Endothelzellen nahm mit der Zeit in EBs, die nicht mit Polymermaterialien konfrontiert wurden, wie auch in den mit Materialien kultivierten EBs zu. Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Polymermaterialien von gefäßartigen Strukturen umgeben sind.

Die quantitative Auswertung der Aufnahmen (Abb. 4-29) bestätigt, dass sich die PECAM-1-positiven Flächen mit der Zeit in EBs allein aber auch in Konfrontation mit einem Material vergrößerten, jedoch existierte kein signifikanter Einfluss der eingesetzten Polymermaterialien auf die Angiogenese.

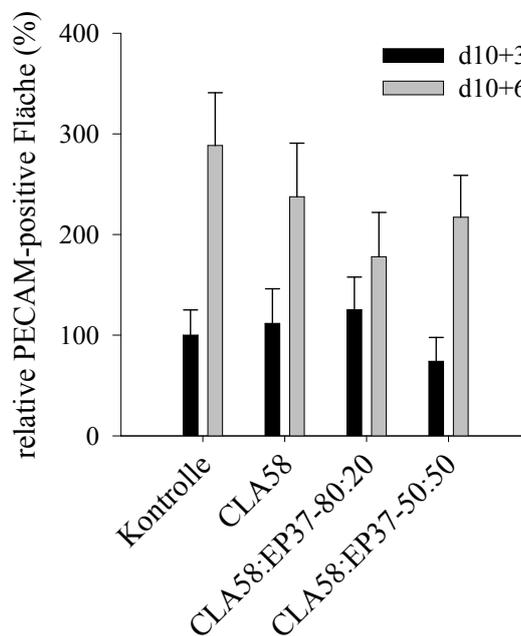


Abb. 4-29: Quantitative Auswertung der Angiogenese in mit Polymermaterialien kultivierten EBs. CLA58 und EP37 sind aus Caprolacton und L-Lactid bestehende Polymere, wobei im EP37 die Endgruppen methacryliert sind. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der PECAM-positiven Fläche in Konfrontationskulturen zwischen EBs und Polymermaterialien an Tag 10+3 (schwarz) und 10+6 (grau) aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegenüber Kontroll-EBs (one-way ANOVA) wurde nicht erreicht.

4.6.2 Einfluss von Polymermaterialien auf die Leukozytendifferenzierung in EBs

Die Kultivierung der EBs mit Polymermaterialien wirkte sich auf die Leukozytendifferenzierung aus. Abb. 4-30 zeigt CD68-positive Zellen in Kontroll-EBs und in räumlicher Nähe eines Polymermaterials. In Kontroll-EBs nahm die Zahl der CD68-positiven Fläche mit dem EB-Alter leicht zu. In den Konfrontationskulturen mit Polymermaterial wurden die CD68-positiven Zellen an Tag 10+3 verstärkt um die Polymermaterialien herum identifiziert. Die graphische Auswertung in Abb. 4-31 zeigt eine Herunterregulation der

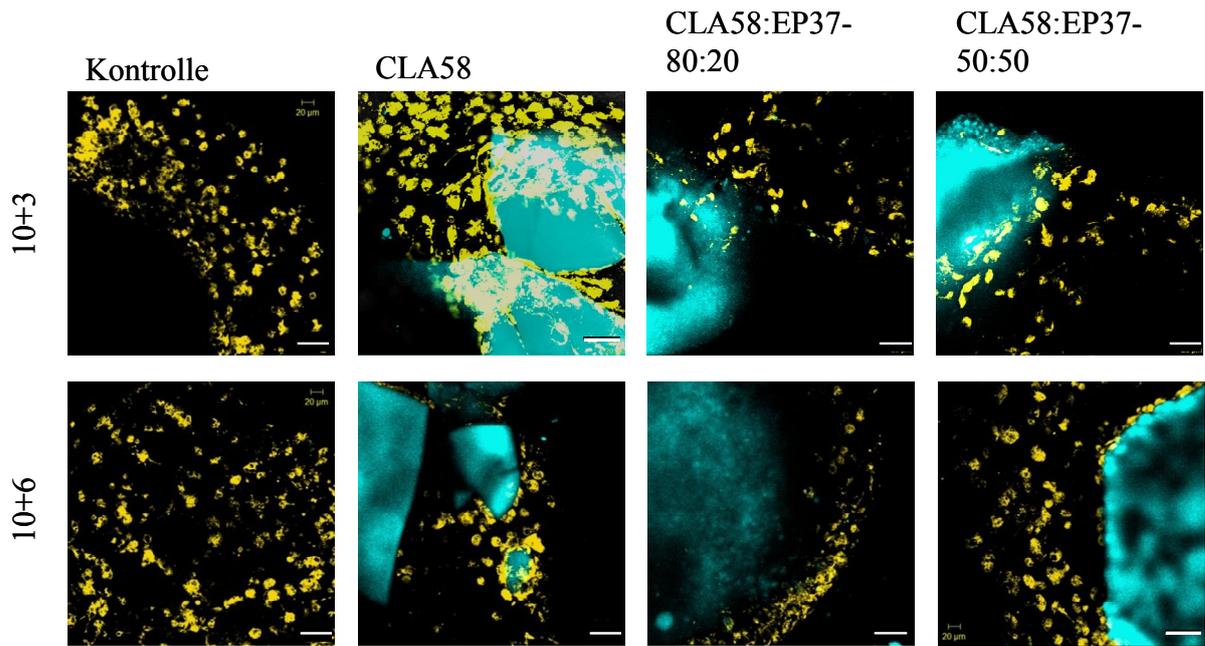


Abb. 4-30: Einfluss verschiedener Polymermaterialien auf die Leukozytendifferenzierung. CLA58 und EP37 sind aus Caprolacton und L-Lactid bestehende Polymere, wobei im EP37 die Endgruppen methacryliert sind. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Versuchen, der Balken entspricht 50 µm. Hellblau: Polymermaterial, gelb: CD68 positive Zellen.

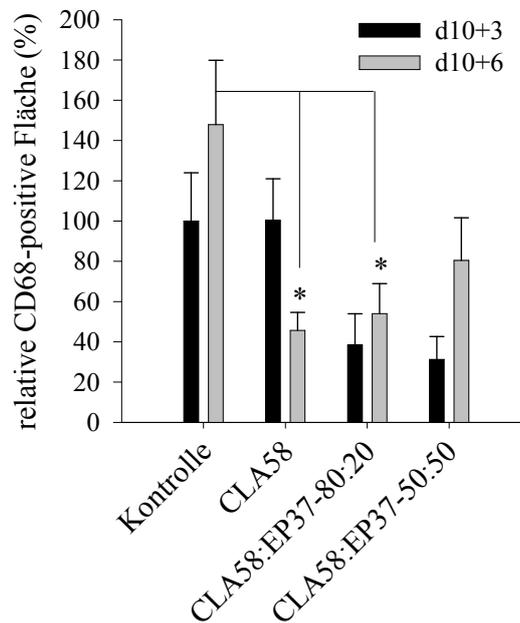


Abb. 4-31: Quantitative Auswertung der Leukozytendifferenzierung in mit Polymermaterialien kultivierten EBs. CLA58 und EP37 sind aus Caprolacton und L-Lactid bestehende Polymere, wobei im EP37 die Endgruppen methacryliert sind. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der CD68-positiven Fläche in Konfrontationskulturen zwischen EBs und Polymermaterialien an Tag 10+3 (schwarz) und 10+6 (grau) aus drei unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ gegenüber Kontroll-EBs (one-way ANOVA).

CD68-positiven Fläche in den Proben CLA58:EP37 80:20 und 50:50 gegenüber Kontroll-EBs an Tag 10+3 und 10+6. In diesen Proben (CLA58:EP37 80:20 und 50:50) waren an Tag 10+6 mehr CD68-positive Zellen in Polymermaterialnähe vorhanden als an Tag 10+3. Im

Gegensatz dazu wurde die Zahl der CD68-positiven Zellen in mit CLA58-inkubierten EBs gegenüber Kontroll-EBs an Tag 10+3 nicht verändert, jedoch an Tag 10+6 signifikant herunterreguliert.

4.6.3 Einfluss von Polymermaterialien auf die M-CSF-Genexpression

Um festzustellen, ob die eingesetzten Polymermaterialien einen Einfluss auf die Differenzierung von Leukozyten ausüben, wurde untersucht inwieweit sich die Genexpression des hämatopoetischen Wachstumsfaktors M-CSF durch die Wahl des Polymermaterials ändert. Wie Abb. 4-32 zeigt, erhöhte sich die M-CSF-mRNA-Expression in den EBs, die mit Polymermaterial inkubiert wurden, von Tag 10+2 bis 10+6 leicht. In mit CLA58:EP37-50:50 kultivierten EBs war eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression von M-CSF zu beobachten.

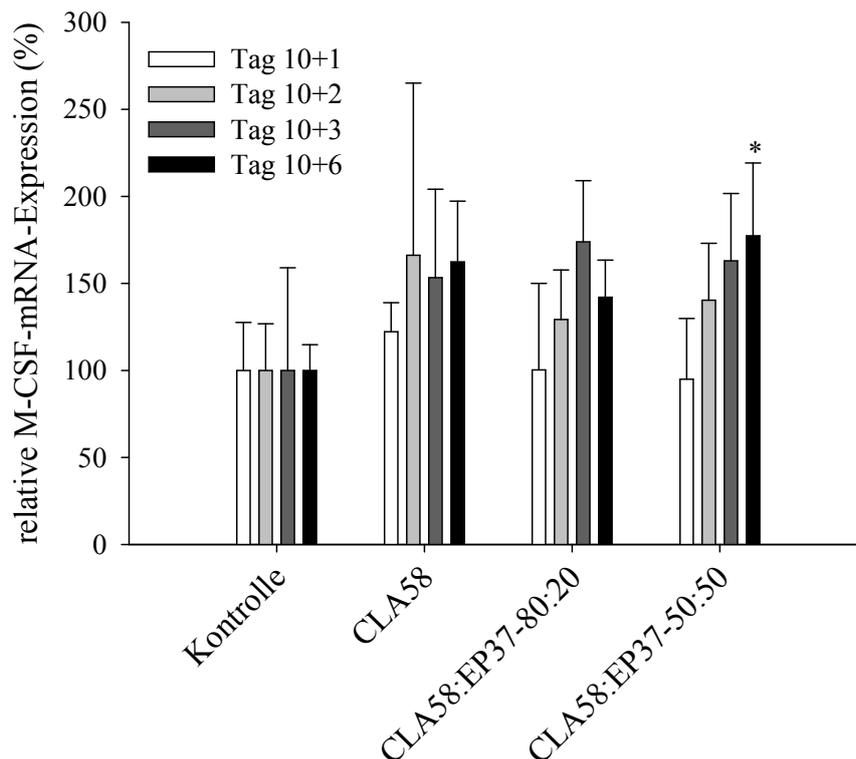


Abb. 4-32: M-CSF-mRNA-Expression nach Kultivierung der EBs mit verschiedenen Polymermaterialien. CLA58 und EP37 sind aus Caprolacton und L-Lactid bestehende Polymere, wobei im EP37 die Endgruppen methacryliert sind. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Kontroll-EBs (one-way ANOVA).

4.6.4 Einfluss von Polymermaterialien auf die MCP-1-Genexpression

MCP-1 ist ein Protein, welches Makrophagen entlang eines Gradienten zum Ort der höchsten MCP-1-Konzentration anlockt. Um festzustellen, ob die untersuchten Polymermaterialien die Migration von Leukozyten fördern, wurde MCP-1 als Marker genutzt. Abb. 4-33 zeigt eine starke Hochregulation der MCP-1-Genexpression in den mit Polymermaterialien inkubierten EBs. Bereits ein Tag nach Generierung der Konfrontationskulturen zwischen EBs und Polymermaterialien zeigte sich gegenüber Kontroll-EBs (100 %) in mit CLA58-inkubierten EBs eine vielfach hochregulierte MCP-1-Genexpression (885 %). An Tag 10+2 war der MCP-1-Level in diesen Proben noch stark hochreguliert (603 %). An den darauffolgenden Tagen nahm die Expression wieder ab. Auch in den mit CLA58:EP37-80:20-inkubierten EBs wurde eine erhöhte MCP-1-Expression an Tag 10+1 (529 %), 10+2 (516 %) und 10+3 (634 %) beobachtet. An Tag 10+6 sank die Expression von MCP-1 wieder ab. Die mit CLA58:EP37-50:50 inkubierten EBs zeigten eine Hochregulation der MCP-1-Genexpression an Tag 10+1 (410 %). An den darauffolgenden Tagen trat diese Hochregulation wieder etwas zurück (279 % an Tag 10+2).

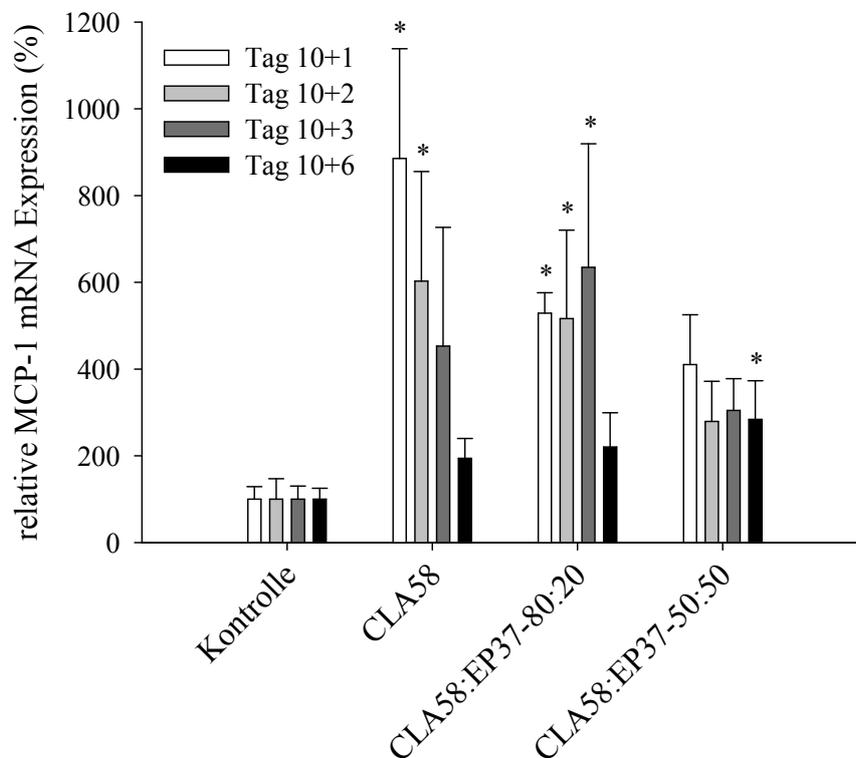


Abb. 4-33: MCP-1-mRNA-Expression nach Kultivierung der EBs mit verschiedenen Polymermaterialien. CLA58 und EP37 sind aus Caprolacton und L-Lactid bestehende Polymere, wobei im EP37 die Endgruppen methacryliert sind. Die Daten wurden mittels *real-time* PCR erhoben und auf die Expression des Haushaltsgenes Polymerase 2a normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$ gegenüber Kontroll-EBs (one-way ANOVA).

5. Diskussion

5.1 Differenzierung von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen

Die endotheliale und hämatopoetische Differenzierung *in vivo* finden in einem räumlich und zeitlich engem Zusammenhang statt (Moore und Metcalf, 1970, Coffin et al., 1991, Palis und Yoder, 2001). Erste Blutinseln werden im viszeralen Dottersack ab Tag E7.0-7.5 beobachtet. In diesen Blutinseln flachen die äußeren Zellen ab und differenzieren zu Endothelzellen (ECs), wohingegen die inneren Zellen zu hämatopoetischen Zellen (HC) differenzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden CGR8-EBs als Untersuchungsobjekt verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass in einem bestimmten Zeitfenster die Differenzierung von ECs und HCs *in vitro* stattfindet. Durch Addition von 3,5 Tagen zum Alter der EBs lassen sich *In-vitro*-Beobachtungen im EB mit *In-vivo*-Untersuchungen an murinen Embryos vergleichen. In den CGR8-EBs der vorliegenden Arbeit erfolgt eine Hochregulation der endothelialen Gene VE-Cadherin und PECAM-1 an Tag 5 und 6 (Abb. 4-1). Verglichen mit *In-vivo*-Versuchen bedeutet dies einen um circa 1,5 Tage späteren Beginn der Differenzierung, da eine erste PECAM-1-Expression im murinen Embryo an Tag E7.8 beobachtet wird (Drake und Fleming, 2000). Im EB der vorliegenden Studie wird maximale PECAM-1- sowie VE-Cadherin-Genexpression zwischen Tag 6 und Tag 10 erreicht, gefolgt von einem erneuten Anstieg nach Tag 10. In 4-Tage-alten EBs der Zelllinie CGR8 können erste PECAM-1-positive Zellen beobachtet werden, die sich mit zunehmendem Alter zu tubulären Netzwerken organisieren (Abb. 4-2). Dies entspricht dem Zeitfenster der *In-vivo*-Beobachtung. Die Entstehung tubulärer Netzwerke beruht auf der Aneinanderkettung von PECAM-1-positiven Zellen, da PECAM-1 ein Hauptbestandteil der interzellulären *junctions* von ECs ist (Muller et al., 1989). Die in den EBs entstehenden PECAM-1-positiven tubulären Netzwerke bilden Hohlräume, durch die 10 kDa große Dextrane transportiert werden können und die die Diffusion erleichtern (Wartenberg et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit ist die starke PECAM-1-Genexpression in der frühen Phase der EB-Entwicklung von Tag 2 bis 3 auffällig. Selbiges konnte in der VE-Cadherin-Genexpression nicht beobachtet werden. Vittet et al. (1996) diskutierten, dass die unerwartete Expression von PECAM-1 in undifferenzierten Zellen das Resultat einer unkontrollierten Differenzierung von ESCs in LIF-haltigem Medium sein könnte. Es wurde eine große Anzahl PECAM-1-positiver Zellen beim Wachstum von ESCs auf *feederlayer* beobachtet. Weiterhin induziert die Abwesenheit von LIF eine transiente Herunterregulation von PECAM-1. Eine weitere Erklärung ist, dass in der

Blastozyste Zellen existieren, die PECAM-1 exprimieren und bei der Isolation der ESCs aus der Blastozyste ebenfalls separiert werden (Vittet et al., 1996).

Den ersten Hinweis auf Hämatopoese liefern sich bildende Erythrozyten, die *in vivo* an Tag E7.5 in Blutinseln des Dottersacks beobachtet werden (Haar und Ackerman, 1971). In dieser Arbeit wurde die Differenzierung von Erythrozyten in EBs über die mRNA-Expression der Globine von primitiven und definitiven Erythrozyten identifiziert (Abb. 4-7). Von Tag 6 bis 8 wird β H-Globin, das Hämoglobin der primitiven Erythrozyten, in den EBs exprimiert während das Hämoglobin definitiver Erythrozyten β major-Globin von Tag 7 an, mit maximaler Expression von Tag 12 bis 14, in CGR8-EBs hochreguliert wird. Das Auftreten von primitiven Erythrozyten wurde bereits von Wiles und Keller (1991) durch die rote Farbe ihres Hämoglobins zwischen Tag 7 und 8 in EBs der Zelllinien CCE und D3 beobachtet, wobei die Expression des β H- und β major-Globins ab Tag 4 detektierbar war (Keller et al., 1993). Sie stellten keinen zeitlichen Unterschied in der mRNA-Expression beider Gene fest und ihre beobachteten Genexpressionen korrelierten mit dem morphologischen Auftreten von Erythrozyten *in vivo*. Morphologisch wurde die Erythropoese *in vitro* in den EBs der Zelllinien CCE und D3 (Wiles und Keller, 1991) jedoch drei Tage später als *in vivo* beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression des β H- aber auch β major-Globins in CGR8-EBs an Tag 6/7 hochreguliert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Wiles und Keller (1993) beginnt die Differenzierung zwei Tage später. Die ersten definitiven Erythrozyten werden an Tag E10.5 *in vivo* in der fötalen Leber beobachtet (Palis und Yoder, 2001), was Tag 7 in der EB-Entwicklung entspricht und damit mit den Ergebnissen der β major-Globin-mRNA-Expression in der hier vorliegenden Arbeit konform geht. Somit korreliert die *In-vitro*-Differenzierung von Erythrozyten im EB nicht mit der *in vivo* beobachteten primitiven Erythropoese in den Blutinseln des Dottersacks, sondern mit der definitiven Erythropoese in der fötalen Leber. Des Weiteren zeigt Abb. 4-7 eine starke Herunterregulation der β major-Globin-Genexpression nach Tag 14. Es ist jedoch bekannt, dass die adulten Erythrozyten in der Maus dieses Globin beinhalten. Eine Erklärung für diese plötzliche Herunterregulation wurde bislang noch nicht gefunden, jedoch zeigt dieses Ergebnis die Limitierung des *In-vitro*-Modells in den späten Stadien seiner Kultivierung.

Frühere Ergebnisse zur Differenzierung in Leukozyten *in vitro* wurden an EBs der Zelllinien CCE und D3 erarbeitet (Wiles und Keller, 1991). Um diese Differenzierung in CGR8-EBs zu beschreiben, wurden in der vorliegenden Studie folgende Antigene herangezogen: das pan-Leukozyten-Antigen CD45, das auf Monozyten/Makrophagen exprimierte CD68, der Fc γ -Rezeptor III CD16 und das Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). An Tag 7/8 erhöht sich die

Genexpression der untersuchten leukozytären Gene (Abb. 4-3). Dies ist mit der embryonalen Entwicklung von myeloiden Leukozyten, die ab Tag E10.5 in der AGM-Region und etwas später in der fötalen Leber beobachtet werden, vergleichbar (Medvinsky und Dzierzak, 1996). CD45 diente dazu, eine Aussage zur Leukozytendifferenzierung allgemein treffen zu können. Während ein Anstieg der Genexpression von CD45 und CD16 erst an Tag 9 auftritt, beginnt die Genexpression von Mac-1 bereits einen Tag früher. CD68 wird kontinuierlich hochreguliert. Die Genexpressionen der genannten hämatopoetischen Gene zeigen Schwankungen nach Tag 10. Es lässt sich jedoch prinzipiell sagen, dass die Differenzierung zu Leukozyten in EBs auf Genexpressionsebene an Tag 8 beginnt. In immunhistochemischen Analysen konnten erste Leukozyten an Tag 10 der EB-Entwicklung identifiziert werden (Abb. 4-4, 4-5, 4-6). Zur Identifizierung von Monozyten/Makrophagen wurde ein Antikörper gegen CD68 gewählt, während zur Unterscheidung von Neutrophilen von den erstgenannten Zelltypen Neutrophil-Antigen (Lieber et al., 2004) eingesetzt wurde. Alle drei ausgewählten Antikörper zeigen an Tag 10 noch eine geringe Anzahl positiver Zellen, die an Tag 12 ansteigt und anschließend wieder reduziert wird. Der Tag 10, an dem erste CD45-, CD68-, Neutrophil-Antigen-positive Zellen im EB beobachtet werden, entspricht Tag E13.5 *in vivo*. Damit zeigt sich eine Diskrepanz in der hämatopoetischen Differenzierung zwischen *In-vitro*-Modell und *In-vivo*-Beobachtungen von 3 Tagen, jedoch korrelieren die Genexpressionsdaten in CGR8-EBs mit der beobachteten hämatopoetischen Differenzierung *in vivo*, so dass der EB durchaus als ein gutes *In-vitro*-Modell zur Aufklärung von Regulationsmechanismen der hämatopoetischen Differenzierung dient. Durch Doppelfärbung der 8- bis 14-Tage-alten EBs konnte in dieser Arbeit außerdem ein räumlich enger Zusammenhang zwischen der Differenzierung von Leukozyten und bestehenden PECAM-1-positiven vaskulären Strukturen festgestellt werden, was mit den *In-vivo*-Beobachtungen korreliert (Abb. 4-5).

Während der Untersuchungen wurden dem Kultivierungsmedium bis auf die im Serum befindlichen keine weiteren Wachstumsfaktoren zugesetzt. Den EBs gelingt es durch Eigenproduktion entsprechender Wachstumsfaktoren das endotheliale und hämatopoetische System zu entwickeln (Schmitt et al., 1991, Keller et al., 1993). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine endotheliale sowie hämatopoetische Differenzierung in CGR8-EBs beobachtet wird und dass Subtypen der myeloiden Leukozyten (Monozyten/Makrophagen und Neutrophile) unterschieden werden können.

5.2 Regulation der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen

Anhand von durchflusszytometrischen Messungen an dissoziierten EBs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Zahl flk-1-positiver Zellen an Tag 3 der EB-Kultivierung hochreguliert wird (Abb. 4-8 und Abb. 4-9). Vittet et al. (1996) und Kabrun et al. (1997) beschreiben zwar eine Hochregulation der flk-1-mRNA-Expression an Tag 3, in ihrem Fall wurden in immunhistochemischen Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt aber noch keine EBs mit flk-1-positiven Zellen identifiziert. Allerdings konnten Nishikawa et al. (1998) in dissoziierten murinen Embryos an Tag E7.4-7.8 bereits eine hohe flk-1-positive Zellzahl beobachten. Dieses Alter entspricht dem Tag 3 in EB-Kulturen und deutet darauf hin, dass die Ergebnisse zur flk-1-Entwicklung in EBs mit denen im Embryo vergleichbar sind. Wie Abb. 4-8 und 4-9 zeigen, wurde eine maximale Anzahl an flk-1-positiven Zellen in CGR8-EBs von Tag 4 bis 8 und später nochmals von Tag 11 bis 13 beobachtet. Dabei zeigten sich 18 % flk-1-positive Zellen im ersten Maximum an Tag 6, während im zweiten Maximum an Tag 13 nur noch 14 % flk-1-positive Zellen detektiert wurden. Kabrun et al. (1997) beobachteten eine fast doppelt so hohe Anzahl an flk-1-positiven Zellen an Tag 4 und den folgenden Tagen der EB-Entwicklung, jedoch setzten sie verschiedene Wachstumsfaktoren (Interleukine, Erythropoetin, VEGF und koloniestimulierende Faktoren) zur Induzierung der hämatopoetischen Differenzierung ein. Faloon et al. (2000) beschäftigten sich mit der flk-1-Expression und der Bildung von Blastkolonien in EBs. Diese Blastkolonien repräsentieren den Hämangioblast *in vitro*, aus dem Progenitoren zu ECs sowie HCs differenzieren. Sie zeigen, dass nur aus flk-1-positiven Zellen Blastkolonien entstehen, während diese Entwicklung in flk-1-negativen Zellen nicht möglich ist. Durch *knockout*-Studien wurde gezeigt, dass murine flk-1^{-/-}-Embryos aufgrund der vollständigen Abwesenheit von embryonalen hämatopoetischen und endothelialen Zellen sterben (Shalaby et al., 1995). Zellen, denen flk-1 fehlt, sind unfähig, die korrekte Lokation für die Bildung von Blutinseln zu erreichen. Das lässt darauf schließen, dass flk-1 an der Migration von Zellen aus dem posterioren Primitivstreifen in den Dottersack und vermutlich in intraembryonale Orte der frühen Hämatopoese involviert ist (Shalaby et al., 1997). Weiterhin zeigen Shalaby et al. (1997), dass flk-1^{+/-}-EBs endotheliale Strukturen ausbilden, flk-1^{-/-}-EBs dazu jedoch nicht befähigt sind. Flk-1^{+/-}- und flk-1^{-/-}-EBs bilden hämoglobinhaltige Zellen. Das spricht für die These, dass die hämatopoetische Differenzierung durch flk-1-Mutation nicht vollständig blockiert wird, jedoch wurden in den genannten EBs nur erythroide Progenitoren gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Separation der flk-1-positiven Zellen der Tag 5 ausgewählt, da während der EB-Entwicklung an diesem Tag eine maximale Anzahl an flk-1-

positiven Zellen beobachtet wurde. Die Untersuchung der mRNA-Expression der isolierten Zellen zeigt eine deutlich hochregulierte Expression von PECAM-1 und VE-Cadherin (Abb. 4-10), was ein Beleg für die Ausbildung eines endothelialen Phänotyps ist. Dass flk-1-positive Zellen in ECs differenzieren können, wurde schon gezeigt (Choi et al., 1998, Fehling et al., 2003). Jedoch beobachteten Nishikawa et al. (1998), dass aus flk-1⁺/CD144⁺-Zellen, die aus dissoziierten Embryos gewonnen wurden, CD45⁺-Leukozyten und Ter119⁺-Erythrozyten differenzieren können. Werden flk-1⁺/CD144⁺-Zellen auf *feederlayer* der Zelllinie OP9 kultiviert, so differenzieren diese Zellen in HCs (Fraser et al., 2003). Die Differenzierung mesodermaler flk-1-positiver Zellen in HCs wird über verschiedene molekulare Schalter initiiert. So ist Scl für eine Differenzierung zu hämatopoetischen Zellen notwendig (Robertson et al., 2000). Des Weiteren diskutieren Naito et al. (2006), dass eine Wnt/ β -Catenin-Aktivierung in frühen EBs die kardiale Differenzierung fördert, wohingegen dieselbe Aktivierung in späten EBs die kardiale Differenzierung inhibiert und die endotheliale sowie hämatopoetische Differenzierung fördert.

Während der mesodermalen Entwicklung bleibt die frühe flk-1-Expression in ECs erhalten, wohingegen sie in anderen Zelltypen wie hämogenen ECs oder hämatopoetischen Progenitoren schnell herunterreguliert wird. Diese Herunterregulation wird als ein Marker für die hämatopoetische Differenzierungsrichtung angesehen (Kabrun et al., 1997). ECs zeigen einen sehr heterogenen Charakter. Hirai et al. (2003) beschreiben, dass flk-1 in ECs mit und ohne hämatopoetischen Charakter exprimiert wird. In ECs mit hämatopoetischem Charakter, die Runx1 exprimieren, wird flk-1 jedoch schnell herunterreguliert, wohingegen es auf Runx1-negativen ECs erhalten bleibt. Das führte zu der Annahme, dass Runx1 als molekularer Schalter dient, um flk-1 in der Differenzierung von ECs zu HCs herunterzuregulieren. Runx1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in embryonalen Regionen der *De-novo*-Generierung von HSCs und in allen hämatopoetischen Organen exprimiert wird (Hirai et al., 2005). Er scheint für die Differenzierung von definitiven hämatopoetischen Progenitoren eine Rolle zu spielen, da hämatopoetische Zellcluster in Runx1-*knockout*-Mäusen abwesend sind (Yokomizo et al., 2001). Die Hämatopoese wird durch Runx1 reguliert, indem es die Myelopoese durch Koordination der Expression von GM-CSF, M-CSF-Rezeptor, Myeloperoxidase und der neutrophilen Elastase reguliert (Otto et al., 2003, Li et al., 2005), wodurch bei Abwesenheit von Runx1 hämatopoetische Wachstumsfaktoren nicht zur Verfügung stehen. Des Weiteren sind aus Runx1-*knockout*-Embryos separierte ECs nicht in der Lage, auf OP9-*feederlayer* zu HCs zu differenzieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Differenzierung von HCs aus endothelialen Progenitorzellen einen wichtigen Weg der definitiven Hämatopoese

darstellt und ein Ereignis ist, das auch *in vivo* stattfindet. In der vorliegenden Arbeit ist die Runx1-mRNA-Expression in flk-1-negativen Zellen doppelt so hoch wie in flk-1-positiven (Abb. 4-12), was mit der Beobachtung von Hirai et al. (2003) konform geht. Diese stellten fest, dass ECs, die Runx1 exprimieren, flk-1 herunterregulieren und in der Lage sind in HCs zu differenzieren. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, wird Runx1 in EBs ab Tag 4 hochreguliert und zeigt von Tag 5 bis 6 und später nochmals von Tag 12 bis 13 eine maximale mRNA-Expression (Abb. 4-11). Die Herunterregulation der Runx1-mRNA-Expression an Tag 7 wurde auch von Hirai et al. (2005) beobachtet. Die später erneut hohe Runx1-Expression korreliert mit dem maximalen Auftreten der CD45-, CD68- und Neutrophil-Antigen-positiven Zellen an Tag 12 und könnte für die Aufrechterhaltung dieser myeloiden Leukozyten eine wichtige Rolle spielen. Dieser Punkt wird ebenfalls von North et al. (2002) diskutiert. Runx1 ist nicht nur für den Übergang von ECs in HCs essenziell, sondern auch um HCs in ihrem Differenzierungszustand zu halten. Wie Cai et al. (2000) herausfanden, spielt die Runx1-Dosis für die Entwicklung von hämatopoetischen Zellen im murinen Embryo sowie für die Migration dieser Zellen zwischen Dottersack und AGM-Region und deren Erhaltung eine Schlüsselrolle. In der vorliegenden Studie zeigt sich in CD45-positiven Leukozyten, die aus 12-Tage-alten EBs isoliert wurden, eine 22-fach höhere Runx1-Expression, was die Hypothese bestärkt, dass Runx1 für die Aufrechterhaltung der myeloiden Leukozyten eine Rolle spielt. Ichikawa et al. (2004) bestreiten, dass Runx1 für die Erhaltung der hämatopoetischen Zellen wichtig ist. Dieser Standpunkt wird ebenfalls von Chen et al. (2009) vertreten. Sie bestätigen, dass Runx1 für den Übergang von ECs zu hämatopoetischen Zellen essenziell ist, danach jedoch keine Rolle mehr spielt. Die hohe Expression von Runx1 in Leukozyten bleibt somit eine viel diskutierte aber noch nicht vollständig aufgeklärte Beobachtung. Weiterhin zeigen die aus 12-Tage-alten EBs isolierten CD45-positiven Leukozyten eine ca. vierfach höhere flk-1-mRNA-Expression als in den CD45-negativen Zellen (Abb. 4-13). Das zeigt, dass flk-1 in CD45-positiven Leukozyten nicht vollständig herunterreguliert wird wie von Kabrun et al. (1997) und Nishikawa et al. (1998) beschrieben wurde. Es wurde gezeigt, dass Leukozyten entlang eines VEGF-Gradienten migrieren können (Itokawa et al., 2002), wofür ein entsprechender Rezeptor auf der Zelloberfläche der Leukozyten notwendig ist. Da in Konfrontationskulturen eine starke Invasion der CD45-positiven Leukozyten in die Tumorregion beobachtet wurde (Abb. 4-19), ist davon auszugehen, dass die in EBs differenzierenden Leukozyten ebenfalls auf VEGF, das von den Tumorzellen sezerniert wird, reagieren. Es ist ebenso eine erhöhte PECAM-1-Expression in CD45-positiven Leukozyten detektierbar. PECAM-1 wird in Leukozyten

während der Diapedese exprimiert, um homophile Bindungen mit den interzellulären Verbindungen des Endotheliums eingehen zu können (Su et al., 2002). An Tag 10 zeigen sich in der EB-Kultur die ersten Leukozyten, mit einer maximalen Anzahl an Tag 12. Die Wechselwirkung mit den existierenden PECAM-1-positiven vaskulären Gefäßen sowie deren Umgestaltungsprozesse sind zu diesem frühen Zeitpunkt sehr hoch, so dass sich die hohe PECAM-1-Expression in Leukozyten an Tag 12 erklärt.

5.3 Inhibierung der Angiogenese und Leukozytendifferenzierung

VEGF ist ein zentraler Mediator der Tumorangiogenese (Ferrara, 1999). Er bindet an seine Tyrosinkinaserzeptoren flt-1 und flk-1, die hauptsächlich auf der Oberfläche von ECs exprimiert werden (de Vries et al., 1992). Hauptregulator der Angiogenese scheint die flk-1-vermittelte Signalübertragung zu sein (Millauer et al., 1993, Ortega et al., 1997). SU5416 ist ein von der Firma SUGEN Inc., South San Francisco, USA entwickelter niedermolekularer Inhibitor von flk-1 und flt-1 zur Behandlung von Tumoren. In präklinischen Studien zeigte SU5416 antiangiogene und antitumorale Eigenschaften (Stoepck et al., 2002). Phase I- und Phase II-Studien wurden zur Behandlung von Mammakarzinom (Stoepck et al., 2002), Kolonkarzinom (DePrimo et al., 2003, Hoff et al., 2006), Lungentumoren (Stoepck et al., 2002), Melanomen (Peterson et al., 2004), akuter myeloischer Leukämie (Fiedler et al., 2003, Giles et al., 2003) und Tumoren des Nervensystems (Kieran et al., 2009) durchgeführt.

Wie in der hier vorliegenden Studie gezeigt wird, übt SU5416 in EBs einen lang anhaltenden antiproliferativen Einfluss auf ECs aus (Abb. 4-14). Werden EBs von Tag 6 bis 12 mit SU5416 inkubiert, so wird eine fehlende Kapillarbildung ausgehend von existierenden PECAM-1-positiven Zellen beobachtet. Während in den mit SU5416-inkubierten EBs nur PECAM-1-positive Inseln ohne jegliche Gefäßbildung detektierbar sind, weisen Kontroll-EBs an Tag 12 sehr gut entwickelte PECAM-1-positive Netzwerke auf.

Auch in anderen Zelllinien wurde eine antiproliferative Wirkung von SU5416 auf Endothelzellen nachgewiesen. Mendel et al. (2000) zeigen eine Inhibierung der Proliferation von humanen vaskulären Endothelzellen (HUVECs) durch SU5416. Dabei wird durch Inkubation mit SU5416 weder die flk-1-Expression auf der Zelloberfläche noch die Affinität oder Zahl der funktionellen Bindestellen von flk-1 gegenüber VEGF beeinflusst. Die Unterdrückung der Proliferation von HUVECs durch SU5416 geht auf eine Inhibierung der Phosphorylierung von flk-1 und der VEGF-abhängigen Signaltransduktion via flk-1 zurück (Mendel et al., 2000). Fong et al. (1999) fanden heraus, dass SU5416 auch die VEGF-abhängige Phosphorylierung von flk-1 in flk-1-überexprimierenden NIH3T3-Fibroblasten

inhibiert. Außerdem weisen Studien an HUVECs (Mendel et al., 2000) als auch an einem Maus-Xenograft-Modell (Fong et al., 1999) auf lang anhaltende inhibitorische Wirkung von SU5416 hin. Dies ist durch die Anreicherung der Substanz in den Zielzellen mit fortbestehender Wirkung auch nach kurzer Exposition zu erklären. Itokawa et al. (2002) weisen nach, dass SU5416 in Konzentrationen von 0,5-5 μM nicht nur die Phosphorylierung der flk-1- sondern auch derflt-1-Rezeptortyrosinkinase in Antwort auf VEGF in flk-1-überexprimierenden NIH3T3-Zellen inhibiert. Außerdem wird die VEGF-spezifische Migration von HUVECs durch Inkubation mit SU5416 fast vollständig unterdrückt (Itokawa et al., 2002).

In dieser Arbeit zeigt sich durch Inkubation der EBs mit SU5416 eine signifikant geringere Zahl an CD45-, CD68- und Neutrophil-Antigen-positiven Leukozyten (Abb. 4-15, 4-16), was darauf hindeutet, dass SU5416 durch die Inhibierung der flk-1- undflt-1-Tyrosinkinaseaktivität in die Differenzierung von hämatopoetischen Progenitoren zu reifen Leukozyten eingreift. Es wurde bisher nicht auf eine durch SU5416 herunterregulierte Zahl an Leukozyten hingewiesen, jedoch zeigte die Firma SUGEN in ihren Studien, dass ca. 5 % der Patienten mit SU5416-Monotherapie eine Leukopenie entwickelten. Bei Patienten mit akuter myeloider Leukämie, eine Erkrankung die meist mit steigender Leukozytenzahl verbunden ist, wurde keine Reduktion der Leukozytenzahl durch Verabreichung von SU5416 beobachtet (Fiedler et al., 2003, Giles et al., 2003). Itokawa et al. (2002) zeigen *in vitro* eine Inhibierung der VEGF-induzierten Chemotaxis von humanen peripheren Blutmonozyten durch SU5416. Die Beobachtung der reduzierten Leukozytenzahl während der Inhibierung der VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität zeigt somit, dass flk-1 undflt-1 nicht nur bei Angiogenese-Prozessen eine wichtige Rolle spielen, sondern auch die Differenzierung von Leukozyten beeinflussen, was bisher von anderen Gruppen noch nicht untersucht wurde.

5.4 Tumor-induzierte Angiogenese und Leukozytendifferenzierung

VEGF ist ein Wachstumsfaktor, der auch in der Tumorprogression eine bedeutende Rolle spielt. Avaskuläre Tumore wachsen *in vivo* bis zu einer Größe von ca. 1-2 mm^3 (Rogers et al., 1998). Danach reicht die Diffusion für den Metabolit- und Sauerstofftransport nicht länger aus (Folkman, 1992, Richard et al., 1999). Der Sauerstoff- sowie pH-Gradient und die unzureichende Detoxifizierung resultieren in einer Wachstumsinhibierung und Entstehung von zentralen Nekrosen. Avaskuläre Tumore bleiben gewöhnlich für lange Zeit in diesem Stadium, bis sie durch Tumor-induzierte Angiogenese an die Wirtsvaskulatur angeschlossen werden. Tumor-induzierte Neovaskularisierung ist der erste Schritt für rapides

Tumorwachstum und Metastasenbildung (Grunstein et al., 1999). Der Übergang von einem nicht-angiogenen zu einem angiogenen Phänotyp wird durch die Produktion angiogener Stimuli wie z. B. VEGF reguliert (Grunstein et al., 1999), deren Expression durch die hypoxischen Regionen in den avaskulären Tumoren induziert wird (Richard et al., 1999).

Die Effekte der Wachstumsinhibierung und zentralen Nekrosen lassen sich *in vitro* am Modell von avaskulären MTS beobachten (Wartenberg et al., 2001). Als Konsequenz auf den reduzierten perizellulären Sauerstoffpartialdruck in avaskulären MTS erhöht sich der Level an Hypoxie-induzierbarem Faktor 1α und VEGF (Wartenberg et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang der Tumor-induzierten Angiogenese mit der Differenzierung von Leukozyten untersucht. Wie die Konfrontationskulturen zwischen EBs und MTS zeigen, migrieren Tumorzellen innerhalb kurzer Zeit in den EB (Abb. 4-17). Schon nach zweitägiger Konfrontation der EBs mit MTS wird die Angiogenese ausgehend vom EB hin zum Tumorgewebe initiiert und zwei Tage später erscheinen die MTS vollständig vaskularisiert (Abb. 4-18). Dies wurde ebenfalls von Wartenberg et al. (2003) beschrieben, die von murinen ESCs abgeleitete EBs mit MTS der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU145 konfrontierten. Sie untersuchten die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP1, MMP2 und MMP9 in EBs und beobachteten eine transiente Hochregulation der MMPs: nacheinander werden die MMP9-, MMP1- und MMP2-Level erhöht, wodurch die Tumor-induzierte Angiogenese ermöglicht wird (Wartenberg et al., 2003).

MMP-sezernierende Zellen, sind u. a. Monozyten/Makrophagen wie Anghelina et al. (2002) zeigen. In der vorliegenden Arbeit wird die Anwesenheit von Leukozyten ($CD45^+$) und Monozyten/Makrophagen ($CD68^+$) im Tumorsphäroid in den Konfrontationskulturen nachgewiesen (Abb. 4-19). Die Zahl dieser Zellen steigt in Konfrontation mit einem Tumorsphäroid im Vergleich zu Kontroll-EBs stark an (Abb. 4-20), was darauf hindeutet, dass das Tumorgewebe die Leukozytendifferenzierung und -migration fördert. Neutrophile werden ebenfalls in Konfrontationskulturen beobachtet, jedoch migrieren diese nicht in den Tumorsphäroid sondern umschließen ihn. Die in der hier vorgelegten Studie benutzte Tumorzelllinie 4T1 entstammt einem Mammakarzinom von BALB/c-Mäusen, der spontan metastasiert. Selbst nach Entfernen des primären Tumors sterben 95 % der BALB/c-Mäuse am metastasierenden 4T1-Tumor (Sinha et al., 2005). 4T1-Tumore produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, die myeloide Leukozyten in der Milz von Mäusen akkumulieren. Diese myeloiden Leukozyten verhindern die Aktivierung von T-Lymphozyten, was mit erhöhter Tumorbelastung einhergeht (Sinha et al., 2005). Kuang et al. (2007) beschreiben ebenfalls, dass Tumorzellen lösliche Faktoren sezernieren, die eine transiente Aktivierung von

rekrutierten Monozyten im peritumoralen Stroma hervorrufen und dadurch die Produktion einer signifikanten Zytokinmenge induzieren, die wiederum weitere Monozyten in das Tumorgewebe locken. Die Konfrontationskultur zwischen EBs und MTS stellt somit ein geeignetes *In-vitro*-Modell zur Untersuchung der Tumorprogression in Zusammenhang mit Leukozytendifferenzierung und -migration dar, denn die in der hier vorliegenden Studie beobachtete erhöhte Leukozytenzahl in den Konfrontationskulturen korreliert mit der erhöhten Leukozytenzahl in tumorbelasteten Mäusen.

Man unterscheidet bei den differenzierenden und in den MTS migrierenden Makrophagen zwei Phänotypen. Entweder bildet sich ein klassisch aktivierter Phänotyp (M1) aus, der auf das Tumorgewebe zytotoxisch wirkt oder es bildet sich der Phänotyp M2, der die Tumorprogression fördert. Beide Phänotypen werden in der Literatur diskutiert (Allavena et al., 2008, Schmid und Varner, 2007, Biswas et al., 2008). Makrophagen des M1-Phänotyps werden z. B. durch IFN γ , mikrobielle Stimuli (LPS) oder Zytokine induziert. Sie sind durch eine hohe Antigenpräsentation, hohe IL-12- und IL-23-Produktion und Aktivierung von T-Lymphozyten charakterisiert. Sie zeigen hohe Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen sowie Zellen, die Mikroorganismen verdaut haben und sezernieren große Mengen an Stickstoffmonoxid (NO), reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Tumornekrosefaktor (TNF). Sie produzieren außerdem proinflammatorische Zytokine und stimulieren die adaptive Immunantwort. Daher werden M1-Makrophagen als potente Effektorzellen zur Abwehr von Pathogenen und Tumorzellen angesehen. Im Gegensatz dazu werden die Makrophagen des M2-Phänotyps durch IL-4, IL-10, IL-13 oder Glukokortikoide induziert. Sie produzieren Arginase und ROS, was die T-Lymphozytenaktivierung inhibiert und den Tumor somit der Immunkontrolle entzieht. M2-Makrophagen zeigen kaum eine Neigung zur Antigenpräsentation, haben einen geringen Level an IL-12- sowie einen hohen Level an IL-10-Produktion und supprimieren die adaptive Immunantwort, aktivieren den Debris-Verdau, fördern die Wundheilung, Angiogenese und Gewebeneuordnung. Obwohl frühere Studien zeigen, dass stimulierte Makrophagen *in vitro* Tumorzellen zerstören können (M1-Phänotyp), sind Forscher heute weitgehend der Meinung, dass Tumor-assoziierte Makrophagen protumorale Eigenschaften (M2-Phänotyp) besitzen (Balkwill et al., 2005, Sica et al., 2006) und Tumore Chemokine für die Rekrutierung von Makrophagen sezernieren. So werden in Patienten und Versuchstieren mit Tumoren myeloide Leukozyten beobachtet, die das Immunsystem supprimieren (Almand et al., 2001, Gabrilovich et al., 2001). Diese myeloiden Zellen unterdrücken die Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten und inhibieren

dadurch die Immunantwort (Bronte et al., 2000). Die Akkumulation dieser Zellen in Milz und Blut von tumortragenden Individuen ist mit erhöhter Tumorbelastung assoziiert.

Jin et al. (2006) zeigen eine große Anzahl an Makrophagen in xenotransplantierten Tumorgeweben in Mäusen sowie deren VEGF-Sekretion, wodurch sie an der Tumor-induzierten Angiogenese beteiligt sind. Auch andere Gruppen zeigen, dass Monozyten/Makrophagen in Tumorgeweben angiogene Faktoren und proteolytische Enzyme produzieren und die Angiogenese in der Tumorumgebung modulieren (Kuwano et al., 2001). Die Makrophageninfiltration korreliert mit der Angiogenese oder Malignität in humanen Mammakarzinomen (Leek et al., 1996), humanen Gliomen (Nishie et al., 1999) und humanen Melanomen (Torisu et al., 2000).

Es ist weitreichend bekannt, dass Makrophagen sowohl *in vivo* (Crowther et al., 2001, Anghelina et al., 2002) als auch *in vitro* (Anghelina et al., 2004) in Matrigel migrieren. Anghelina et al. (2006) stellen fest, dass die Monozyten/Makrophagen-Migration in Matrigel entlang eines MCP-1-Gradienten verläuft und VEGF keinen Einfluss auf die Migration hat, obwohl dies von Itokawa et al. (2002) gegensätzlich diskutiert wird. Durch die Migration der Monozyten/Makrophagen im Matrigel entstehen Tunnel, durch die andere Zelltypen wandern können. Es wurden Monozyten/Makrophagen identifiziert, die große Vakuolen ausprägen und damit ein Lumen bilden, wobei angenommen wird, dass solche Monozyten/Makrophagen in Endothelzellen transdifferenzieren und das Gefäßlumen auskleiden (Anghelina et al., 2006, Yang et al., 2004). Jin et al. (2006) zeigen, dass die Migration der Makrophagen innerhalb des Tumors über Integrine, speziell $\alpha 4\beta 1$ vermittelt wird, so dass dessen Inhibierung die Akkumulation der Monozyten/Makrophagen und die Angiogenese im Tumor supprimiert. Studien, welche die funktionellen Aktivitäten der Monozyten/Makrophagen selektiv modulieren können, könnten eine neue Strategie zur Antitumorthherapie anbieten (Kuang et al., 2010).

In MTS invadierende Leukozyten fördern folglich die Tumor-induzierte Angiogenese u. a. durch die Sekretion von MMPs, die Wartenberg et al. (2003) in Konfrontationskulturen zwischen EBs und MTS nachwies. Die hier vorliegende Studie zeigt einen zeitlichen Zusammenhang zwischen tumor-induzierter Angiogenese und einer erhöhten Leukozytenzahl im MTS der Konfrontationskultur. Weiterhin ist in der vorliegenden Studie auffällig, dass CD45- und CD68-positive Leukozyten vollständig in den MTS invadieren während Neutrophil-Antigen-positive Neutrophile den MTS umschließen, jedoch nicht invadieren (Abb. 4-19). Eine CD68-positive Makrophageninfiltration in Lebertumoren wurde mit einer für den Patienten negativen Prognose in Korrelation gebracht (Budhu et al., 2006). Obwohl

Neutrophile Tumor-induzierte Angiogenese fördern und pro-tumoral wirken (Tazzyman et al., 2009), wurden sie bisher kaum in die Betrachtungen zur Tumorprogression einbezogen. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, kann die Konfrontations-kultur zwischen EBs und MTS genutzt werden, um *in vitro* die Wirkung der Neutrophilen im Tumorgewebe weiter aufzuklären.

5.5 Funktionalität der differenzierenden Leukozyten in EBs

Die Beobachtung der in den MTS invadierenden Leukozyten legt nahe, die im EB differenzierenden Leukozyten auf ihre Funktionalität hin zu untersuchen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, inwieweit sich die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen durch die Stimulation der EBs mit M-CSF fördern lässt. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, werden die Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren (c-fms, GM-CSF-R, AIC2B) ab Tag 6 bzw. 7 exprimiert, was bedeutet, dass die EBs ab dieser Zeit auf die korrespondierenden Faktoren antworten können. Keller et al. (1993) zeigen, dass M-CSF in Kombination mit IL-3 und IL-1 keinen Einfluss auf deren Differenzierung hat und die Zahl der Monozyten/Makrophagen durch die Kombination der genannten Wachstumsfaktoren sinkt. In dieser Arbeit wurde ein Anstieg der CD68⁺-Monozyten/Makrophagen auf das Dreifache an Tag 10 beobachtet, wenn die EBs von Tag 8 an mit M-CSF stimuliert wurden (Abb. 4-22). In den EB-Kulturen von Wiles und Keller (1991) zeigen 5-10 % der EBs ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren Makrophagen an Tag 12, dieser Anteil kann durch die Inkubation der EBs mit M-CSF auf ca. 20 % erhöht werden, wobei sich die Zahl der Makrophagen innerhalb der EBs erhöht. Auf die initiale Entwicklung des hämatopoetischen Systems haben Wachstumsfaktoren wie M-CSF, IL-3, GM-CSF keinen Einfluss, jedoch diskutieren Wiles und Keller (1991), dass nach Tag 10 Wachstumsfaktoren für die Reifung der differenzierenden Makrophagen notwendig sind. Diese Wachstumsfaktoren stammen jedoch vom EB selbst, der signifikante Mengen an mRNA von IL-3, Epo, M-CSF und G-CSF synthetisiert (Schmitt et al., 1991). Lieschke und Dunn (1995) konnten den Gehalt an Makrophagen von 30 % in Kontroll-EBs auf 50 % in mit M-CSF inkubierten EBs an Tag 10 erhöhen. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass CGR8-EBs auf M-CSF mit erhöhter Differenzierung von CD68-positiven Monozyten/Makrophagen reagieren, was mit Literaturangaben korreliert.

Bisher gibt es in der Literatur kaum Hinweise darauf, dass die im EB differenzierenden Leukozyten im Falle einer Inflammation Funktionalität besitzen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zum Verhalten der EBs aber auch der aus EBs isolierten Leukozyten auf Lipopolysaccharide (LPS) und *E. coli* durchgeführt. Um zu untersuchen, ob

im EB differenzierende Leukozyten immunologisch wirksam sind, wurden EBs mit LPS stimuliert und die mRNA-Expression von CD14, Mac-1 und CD68 als Parameter genutzt. Dabei ist eine konzentrationsabhängige Hochregulierung der CD14-mRNA nach eintägiger Inkubation der EBs mit LPS zu beobachten (Abb. 4-23). Murine Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 zeigen ebenfalls eine erhöhte CD14-Expression nach Stimulation mit 2,5 µg/ml LPS (Wang, Tai et al., 2008). Weiterhin weisen auch Peritonealmakrophagen der Maus eine erhöhte CD14-Expression nach Stimulation mit 0,5 µg/ml LPS auf (Zhou et al., 2009). Patel und Harrison (2008) beschreiben eine Hochregulierung von Mac-1 auf der Zelloberfläche von murinen Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 nach einer Stimulation mit 10 µg/ml LPS. Sie zeigen, dass der Großteil der Mac-1-Moleküle auf den Ausstülpungen der Zellmembran lokalisiert ist, die entstehen, wenn LPS-Moleküle auf der Zelloberfläche von Makrophagen adhären und phagozytiert werden wie Aderem und Underhill (1999) für die FcγR-vermittelte Phagozytose beschreiben. Die mRNA-Expression von Mac-1 wird in der hier vorliegenden Arbeit in den EBs ab einer Konzentration von 1 ng/ml LPS hochreguliert (Abb. 4-23), was dafür spricht, dass der EB sensibler auf LPS reagiert als RAW264.7-Zellen, die von verschiedenen Arbeitsgruppen mit LPS-Konzentration von mindestens 0,5 µg/ml inkubiert wurden. Die CD68-mRNA-Expression wird in CGR8-EBs mit zunehmender Konzentration an LPS herunterreguliert (Abb. 4-23). Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, da Wang, Tai et al. (2008) zeigen, dass neben der CD14- auch die CD68-Expression auf murinen Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 nach Stimulation mit LPS hochreguliert wird. Die stärkere Expression der CD14- und Mac-1-mRNA in mit LPS stimulierten EBs ist ein Zeichen für eine immunologische Reaktion, was ein Indiz für die Funktionalität der in EBs differenzierenden Leukozyten darstellt. Ähnliche Beobachtungen an Leukozyten, die in EBs differenzieren, wurden bisher nicht publiziert. Deshalb wurden die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Genexpressionen von CD14, Mac-1 und CD68 nach LPS-Stimulation mit denen in Zellen der Makrophagenzelllinie RAW264.7 verglichen. Jedoch stellt der EB ein sensibleres System hinsichtlich der Konzentration an LPS dar.

Aus den EBs isolierte CD45-positive Leukozyten wurden ebenfalls mit LPS inkubiert und die CD14-Expression auf der Zellmembran analysiert. Hier zeigt sich keine Veränderung der CD14-Expression auf der Zelloberfläche von CD45-positiven Leukozyten nach einer LPS-Stimulation (Abb. 4-24). Sandanger et al. (2009) erklären diese Tatsache dadurch, dass die Oberflächenexpression von CD14 auf Makrophagen sehr hoch ist und eine Veränderung durch die Inkubation mit LPS dadurch kaum wahrgenommen wird. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch beobachtet, dass nach einer 20-minütigen LPS-Inkubation CD45-positive

Leukozyten signifikant höhere Mengen an ROS produzieren (Abb. 4-25). In Mikrogliazellen führt eine 20-minütige Stimulation mit 0,5 µg/ml LPS zu einer Erhöhung der ROS-Produktion auf das 2,7-fache. Dieser Effekt kann durch die antioxidative Wirkung von Trolox wieder aufgehoben werden (Wang, Shen et al., 2008). Da die aus EBs isolierten Leukozyten mit einer geringeren Konzentration LPS (10 ng/ml) inkubiert wurden, konnte nur eine Erhöhung der ROS-Produktion um den Faktor 1,7 beobachtet werden. Aber auch in diesem Fall zeigt sich, dass die aus EBs isolierten Leukozyten sehr sensibel reagieren, da sie schon auf eine um den Faktor 50 geringere LPS-Konzentration reagieren. Die für Leukozyten beschriebene NADPH-Oxidase Nox2 (Segal und Coade, 1978, Babior, 1999) wird in den aus EBs isolierten CD45-positiven Leukozyten exprimiert (Abb. 4-23) und könnte als Quelle der entstehenden ROS dienen. In *knockout*-Mäusen, denen Nox2 fehlt, wird keine erhöhte ROS-Produktion nach LPS-Stimulation beobachtet (Clement et al., 2009). In der hier vorliegenden Arbeit wird keine höhere Nox2-Immunfluoreszenz in CD45-positiven Leukozyten, die mit LPS stimuliert wurden, festgestellt, obwohl in murinen Makrophagen der Zelllinie RAW264.7 durch Stimulation mit LPS eine erhöhte ROS-Produktion und Nox2-mRNA-Expression induziert wird (Kim, Lee et al., 2010).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in EBs differenzierenden Leukozyten Phagozytose-Aktivität besitzen. Werden CD45-positive Leukozyten mit FITC-konjugierten inaktivierten *E. coli* inkubiert, zeigen sie in Immunfluoreszenz-Untersuchungen eine Adhäsion dieser Partikel an der Zelloberfläche der Leukozyten (Abb. 4-27). Einstülpungen und Abschnürungen der Zellmembran, die zur Vesikelbildung mit enthaltenen *E.-coli*-Partikeln führen, sind ebenfalls sichtbar. *E.-coli*-Partikel werden aber auch ohne Vesikel im Zytosol der CD45-positiven Leukozyten beobachtet. Lindmark et al. (2004) stimulierten die Differenzierung von Leukozyten in EBs durch Zugabe von IL-3, M-CSF, Insulin und IL-1 β und inkubierten diese EBs mit FITC-gekoppelten *E. coli*. Sie weisen Phagozytose-Aktivität in F4/80-positiven Makrophagen innerhalb des EBs nach und zeigen, dass EB-abgeleitete Makrophagen ebenso zur Phagozytose von *E. coli* neigen wie Zellen muriner Monozyten/Makrophagenzelllinien. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass der EB auf Wachstumsfaktoren und auch LPS reagiert. Die in 12-Tage-alten EBs differenzierenden Leukozyten antworten auf bakterielle Infektionen (LPS- oder *E. coli*-Inkubation) mit erhöhter ROS-Produktion und Phagozytose-Aktivität. Diese in der Form bisher noch nicht publizierten Daten zeigen, dass der EB an Tag 12 immunologische Funktionalität besitzt.

5.6 Reaktion der EBs auf verschiedene Polymermaterialien

Auf dieser Erfahrung aufbauend wurde die Idee entwickelt, den EB als *In-vitro*-Modellsystem zur Testung von Polymermaterialien, die als *Scaffolds* im *Tissue Engineering* gedacht sind, einzusetzen. Es wurde untersucht, ob das *In-vitro*-Modell des EBs herangezogen werden kann, um Aussagen zur Verträglichkeit von bioabbaubaren Polymermaterialien als *Scaffolds* im *Tissue Engineering* zu treffen.

Das *Tissue Engineering* ist eine Technik, die das Potential hat, *De-novo*-Gewebe und Organe herzustellen mit der Zielstellung Limitierungen der konventionellen Behandlungen basierend auf Organtransplantationen und Biomaterialimplantationen zu überwinden (Langer und Vacanti, 1993). Dabei soll ein immunologisch toleranter artifizieller Gewebeersatz produziert werden, der mit dem Patienten wachsen kann, was zu permanenten Lösungen für ein geschädigtes Organ oder Gewebe ohne zusätzliche Therapien führen soll. Dies beinhaltet die *In-vitro*-Besiedlung von *Scaffolds*, auf denen die Zellen proliferieren, migrieren und durch Bildung einer extrazellulären Matrix, die für das jeweilige Gewebe notwendig ist, in spezifische Gewebe differenzieren sollen. Die Wahl des *Scaffolds* ist daher entscheidend, damit Zellen in der notwendigen Weise verfahren um Gewebe in der richtigen Form und Größe auszubilden. Heute werden verschiedene Anforderungen an solche *Scaffold*-Materialien gestellt (Hutmacher, 2001), z. B. 1) miteinander verbundene Poren, die eine Gewebeintegration sowie -vaskularisierung fördern, 2) kontrollierte Bioabbaubarkeit, 3) eine Oberflächenchemie, die zelluläre Adhäsion, Differenzierung und Proliferation ermöglicht, 4) adäquate mechanische Eigenschaften und Handhabbarkeit, 5) eine einfache Herstellung, 6) hohe Biokompatibilität sowie 7) geringe Immunreaktionen des Empfängers.

In der vorliegenden Arbeit wurden EBs mit Polymermaterialien bestehend aus Caprolacton und L-Lactid kultiviert. Polymere, die aus L-Lactid und Caprolacton zusammengesetzt sind, zeigen gute Biokompatibilität gegenüber verschiedenen Zelltypen sowie Bioabbaubarkeit. Aktuell werden solche Polymere zur Herstellung von Blutgefäßen (Chung et al., 2009, Kim, Chung et al., 2010), Knorpel- und Knochenregeneration (He et al., 2009, Idris et al., 2010) sowie für die Laparoskopie zum Verschluss des Bauches (Bertleff et al., 2009) getestet und angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedenen Polymermaterialien, die sich aus CLA58 und EP37 zusammensetzen, benutzt. Dabei ist CLA58 ein Polymer, das aus L-Lactid und Caprolacton besteht. EP37 ist ein Polymer bestehend aus L-Lactid und Caprolacton, bei dem die Endgruppen methacryliert sind. CLA58 und EP37 wurden in den Mischungsverhältnissen 80:20 und 50:50 vernetzt. Mit zunehmendem Methacrylatanteil

wurde eine stärkere Reaktion des EBs (höhere Monozyten/Makrophagenzahl oder höhere M-CSF- und MCP-1-Expression) erwartet.

Um die Zellen des EBs vom Polymermaterial abgrenzen und unterscheiden zu können, wurde den Materialien während der Synthese ANS zugesetzt. Dadurch fluoreszieren die Materialien, wenn sie bei 405 nm angeregt werden und können in Immunfluoreszenz-Untersuchungen gut herausgestellt werden. Parameter, die zur Testung der Polymermaterialien herangezogen wurden, waren 1) die Differenzierung von PECAM-1-positiven vaskulären Strukturen in räumlicher Nähe zum Polymermaterial, 2) die Differenzierung von CD68-positiven Monozyten/Makrophagen in räumlicher Nähe zum Polymermaterial und 3) die Genexpression von M-CSF, der die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen fördert und MCP-1, welches die Migration von Monozyten/Makrophagen entlang seines Gradienten bewirkt.

Es zeigte sich in den Untersuchungen, dass EBs an alle drei Polymermaterialien adhären und Zellen des EBs das Polymermaterial umwachsen. Die Vaskularisierung an der Kontaktstelle zwischen EB und Polymermaterial erfolgt ohne signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung des Materials (Abb. 4-28, Abb. 4-29). Eine unerwartete Beobachtung stellt die geringere Anzahl an CD68-positiven Monozyten/Makrophagen in den mit Polymermaterialien inkubierten EBs im Vergleich zu Kontroll-EBs dar (Abb. 4-30, Abb. 4-31). Auffällig ist die Akkumulation dieser Zellen in räumlicher Nähe des Polymermaterials CLA58, die bei Inkubation der EBs mit den beiden anderen Polymermaterialien nicht so stark zu beobachten ist. Die Zahl der Monozyten/Makrophagen sollte als Indiz für eine immunologische Reaktion dienen. Die Erwartung, dass sich die Monozyten/Makrophagenzahl in EBs mit Polymermaterial erhöht und dass der Methacrylatanteil einen Einfluss auf deren Zahl ausübt, bestätigte sich jedoch nicht. In Tierversuchen sowie in Patienten wurden am Transplantationsort inflammatorische Reaktionen beobachtet, gekennzeichnet durch Schwellung und Schmerz (Ekholm et al., 2003), erhöhte Akkumulation von Makrophagen und Neutrophilen (van Tienen et al., 2002) und Einkapselung des Materials (Pego et al., 2003). Es gab jedoch auch Studien, bei denen keine Inflammation auftrat (Idris et al., 2010). Bei *In-vitro*-Untersuchungen wurde zur Beurteilung der Inflammation die Reaktion von Makrophagen auf verschiedene Polymermaterialien beobachtet, indem die Proteinkonzentrationen von sezernierten Chemokinen, MMP-2 und MMP-9 (Pamula et al., 2008), sowie die Phagozytose-Aktivität und Proteinadsorption an der Polymeroberfläche (Lemarchand et al., 2006) analysiert wurden.

Zur Beurteilung der inflammatorischen Reaktion der EBs auf die eingesetzten Polymermaterialien wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Monozyten/ Makrophagen-

zahl zusätzlich die mRNA-Expression von M-CSF und MCP-1 herangezogen. Nach einem Tag der Inkubation von EBs mit Polymermaterialien zeigt sich eine unveränderte mRNA-Expression von M-CSF (Abb. 4-32). Die Genexpression von M-CSF steigt mit zunehmender Zeit der Inkubation unabhängig von der Zusammensetzung des Polymermaterials im Vergleich zur Kontrolle bis um das 1,5-fache an. Das lässt darauf schließen, dass die Polymermaterialien unabhängig von ihrer Zusammensetzung die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen fördern. Deren Zahl sollte folglich während der Kultivierung der EBs mit den Polymermaterialien ansteigen. Es wurde jedoch das Gegenteil beobachtet, was auf Grenzen in der Methode (Aufnahme der Immunfluoreszenz am LSM) hinweist. Die Ursache der sinkenden Monozyten/Makrophagenzahl könnte an der stärkeren Lokalisation der Zellen an und auf den Polymermaterialien liegen. An dieser Stelle könnten Western-Blot-Daten helfen.

Des Weiteren wurde ein deutlicher Anstieg der MCP-1-mRNA-Expression in den mit Polymermaterialien kultivierten EBs beobachtet (Abb. 4-33). Diese zeigen nach eintägiger Inkubation im Vergleich zu Kontroll-EBs einen starken Anstieg der MCP-1-mRNA-Expression, die mit zunehmender Inkubationszeit wieder herunterreguliert wird. Dabei reagieren die EBs auf die verschiedenen Polymermaterialien mit unterschiedlich starker Hochregulation der MCP-1-Genexpression. Wie in Abb. 4-30 gezeigt, werden Monozyten/Makrophagen in EBs, die mit dem Polymermaterial CLA58 kultiviert wurden, am dichtesten am Material beobachtet. Das korreliert mit der stärksten Hochregulation der MCP-1-Genexpression in diesen EBs. Somit kann die MCP-1-Genexpression als Maß dafür dienen, wie stark ein Material Monozyten/Makrophagen anzieht. Die Hypothese, dass ein höherer Methacrylatanteil eine stärkere inflammatorische Reaktion hervorruft, kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Wie in dieser Untersuchung gezeigt wurde, ist der EB prinzipiell ein geeignetes *In-vitro*-Modellsystem um Polymermaterialien hinsichtlich ihrer Induktion von inflammatorischen Reaktionen zu testen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen auch, dass in einem solchen Test die Zusammensetzung der Polymermaterialien noch mehr variieren sollte, um Unterschiede hinsichtlich der inflammatorischen Reaktion aufzeigen zu können. Außerdem ist es notwendig, die Methode zur Messung der Monozyten/Makrophagenzahl in EBs und mit Polymermaterialien-inkubierten EBs zu optimieren. Daher wurden weiterführende Untersuchungen zu dieser Fragestellung in der Arbeitsgruppe begonnen.

5.7 Schlussfolgerung

Embryoid Bodies (EBs) sind aus embryonalen Stammzellen abgeleitete dreidimensionale Zellverbände, in denen Differenzierungen in Zelltypen aller drei Keimblätter stattfinden. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der endothelialen und myeloid-hämatopoetischen Differenzierung innerhalb der EBs.

Die Differenzierung von Endothelzellen, Erythrozyten und myeloiden Leukozyten wurde während der EB-Entwicklung mittels Genexpression und Immunfluoreszenz spezifischer Marker untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass erste Endothelzellen in CGR8-EBs an Tag 4 bis 6 differenzieren. Diese bilden tubuläre Netzwerke, deren Organisation mit zunehmendem Alter der EBs zunimmt. Erythrozyten differenzieren ab Tag 7, wie die Genexpressionen der erythrozytären Gene β H-Globin und β major-Globin zeigen. Die Genexpression verschiedener Leukozytenmarker wird an Tag 8 hochreguliert, womit zu diesem Zeitpunkt der Beginn der Leukozytendifferenzierung definiert wird. In Immunfluoreszenzmessungen wurden an Tag 8 noch keine Leukozyten nachgewiesen. Erste Leukozyten wurden an Tag 10 und eine maximale Anzahl dieser Zellen an Tag 12 beobachtet. Monozyten/Makrophagen und Neutrophile, Subtypen der myeloiden Leukozyten, konnten durch die Wahl der Antikörper (CD68 als Monozyten/Makrophagenmarker und Neutrophil-Antigen als Neutrophilenmarker) unterschieden werden. Die altersabhängige endotheliale Differenzierung im EB korreliert zeitlich mit den *In-vivo*-Beobachtungen, jedoch tritt die hämatopoetische Differenzierung im EB etwas später als in der *In-vivo*-Entwicklung ein. Beide Differenzierungen finden im Embryo in engem räumlichen Zusammenhang statt, was ebenfalls im EB beobachtet wurde. Der EB ist daher ein *In-vitro*-Modellsystem, mit dem sich frühe Embryonalentwicklungen wie die Differenzierung in Endothelzellen, Erythrozyten und Leukozyten sowie deren Regulierung und Interaktion untersuchen lassen.

Die endotheliale sowie die hämatopoetische Differenzierung werden ausgehend von flk-1-positiven Progenitoren beobachtet (Nishikawa et al., 1998). Wie die vorliegende Arbeit zeigt, sind flk-1-positive Zellen im CGR8-EB ab Tag 3 nachweisbar. Ihre maximale Anzahl findet sich in 5- und 6-Tage-alten EBs. In 5-Tage-alten EBs sind endotheliale Gene in flk-1-positiven Zellen hochreguliert, was für einen endothelialen Phänotyp dieser Zellen spricht. Die hämatopoetische Differenzierung wird durch den Transkriptionsfaktor Runx1 reguliert (Hirai et al., 2005). Die Beobachtung, dass flk-1-negative Zellen aus 5-Tage-alten EBs ein erhöhtes Runx1-Level zeigen, legt die Vermutung nahe, dass sobald die Expression von Runx1 in flk-1-positiven Zellen hochreguliert wird, eine verminderte flk-1-Genexpression zu beobachten ist wie auch Hirai et al. (2005) vorschlagen. Die Runx1-Expression bleibt in

Leukozyten (CD45-positiv) im Vergleich zu CD45-negativen Zellen hoch, was vermuten lässt, dass Runx1 für die Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Status der Zelle eine wichtige Rolle spielt, wie auch von North et al. (2000) diskutiert wird. Die Inhibierung von flk-1 durch SU5416 bewirkt eine Unterdrückung der Angiogenese, die von PECAM-1-positiven Endothelzellen ausgeht. Des Weiteren zeigt sich durch Inkubation der EBs mit SU5416 eine Reduktion der Leukozytenzahl. Dieser Effekt wurde in *In-vitro*-Untersuchungen bisher nicht beobachtet und obwohl SU5416 eine Reihe klinischer Studien unterzogen wurde, ließ sich bisher kein Einfluss von SU5416 auf die Leukozytenzahl *in vivo* feststellen. Es wird jedoch deutlich, dass die endotheliale und hämatopoetische Differenzierung in engem Zusammenhang stehen und aus flk-1-positiven Progenitoren hervorgehen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit ist der Einfluss multizellulärer Tumorsphäroide (MTS) auf die Leukozytendifferenzierung, der in *In-vitro*-Konfrontationskulturen zwischen EBs und MTS bisher nicht untersucht wurde. Die Tumor-induzierte Angiogenese wurde bereits durch Wartenberg et al. (2001) beschrieben und es gibt Hinweise in der Literatur, dass Angiogeneseprozesse in der Tumorprogression eng mit migrierenden Leukozyten zusammenhängen (Sica et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde in Konfrontationskulturen zwischen EBs und MTS eine Hochregulation der Differenzierung von Leukozyten festgestellt. Des Weiteren wurde mit zunehmendem Alter der Konfrontationskultur eine Migration dieser Leukozyten in den Tumorsphäroid beobachtet. Die eingesetzte Konfrontationskultur kann somit als *In-vitro*-Modell zur Testung von pharmakologischen Antitumorsubstanzen dienen, die nicht nur auf die anti-angiogene Therapie setzen, sondern auch den Einfluss der Leukozyten auf die Tumorprogression einbeziehen.

Die erhöhte Anzahl an myeloiden Leukozyten in den Konfrontationskulturen zwischen EBs und MTS wirft die Frage nach der Funktionalität der differenzierenden Leukozyten im EB auf. Daher wurden Untersuchungen zur Stimulation der Differenzierung sowie der inflammatorischen Reaktion an EBs und an den aus EBs isolierten myeloiden Leukozyten unternommen. Durch den koloniestimulierenden Faktor M-CSF wird die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen in EBs hochreguliert, wodurch gezeigt werden kann, dass EBs auf exogen zugeführte Wachstumsfaktoren reagieren. Weiterhin antworten EBs auf Pathogene wie Lipopolysaccharide (LPS) mit Hochregulation des LPS-Rezeptors CD14 und des Integrins Mac-1. Im EB differenzierende Leukozyten, die aus 12-Tage-alten EBs isoliert wurden, zeigen nach Inkubation mit LPS eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Jedoch wird ihre CD14- oder Nox-2-Expression durch LPS nicht

beeinflusst. *E. coli* werden von diesen Leukozyten phagozytiert. Diese inflammatorische Funktionalität der aus EBs isolierten Leukozyten wurde bisher kaum beschrieben, zeigt aber, dass Leukozyten im EB *in vitro* zur Immunantwort befähigt sind.

Aufgrunddessen entstand die Idee, den EB als *In-vitro*-Modell zur Testung von Polymermaterialien einzusetzen, die als mögliche *Scaffolds* in der regenerativen Medizin oder im *Tissue Engineering* Anwendung finden sollen. Als Parameter zur Begutachtung der Polymermaterialien dienten 1) die Angiogenese, 2) die Leukozytendifferenzierung, 3) die Genexpression von M-CSF, welches die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen fördert und 4) die Genexpression von MCP-1, welches die Chemotaxis von Makrophagen entlang des MCP-1-Gradienten arrangiert. Drei Polymermaterialien verschiedener Zusammensetzung dienten als zu begutachtende *Scaffolds*. CGR8-EBs adhärten an allen drei Materialien und zeigten eine nur geringfügig veränderte Angiogenese in Konfrontation mit Polymermaterialien gegenüber Kontroll-EBs. Des Weiteren ist eine unerwartete Erniedrigung der Anzahl an Monozyten/Makrophagen in den EB-Polymermaterial-Konfrontationskulturen im Vergleich zu Kontroll-EBs zu beobachten, was den erhöhten Genexpressionen des Wachstumsfaktors M-CSF und des Chemokins MCP-1 in mit Polymermaterialien kultivierten EBs widerspricht und somit weitere Untersuchungen verlangt. Grundsätzlich stellt der EB ein gutes *In-vitro*-Modell zur Testung von Polymermaterialien im Hinblick auf den Einsatz als *Scaffold*-Material dar, weil der Einfluss der eingesetzten Materialien auf verschiedene Zelltypen im EB untersucht werden kann. Da Endothelzellen im EB differenzieren, kann die Integration und Vaskularisierung der Polymermaterialien im EB beobachtet werden. Des Weiteren lassen sich immunologische Reaktionen des EBs auf *Scaffold*-Materialien nachweisen, weil die im EB differenzierenden Leukozyten die Fähigkeit besitzen, Pathogene zu erkennen und auf solche zu reagieren. Der EB könnte folglich neben Fibroblasten, die häufig zur Testung der Biokompatibilität von Polymermaterialien genutzt werden, als ein weiteres *In-vitro*-Testsystem etabliert werden.

6. Literaturverzeichnis

Aderem A, Underhill DM: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.

Adler S, Pellizzer C, Hareng L, Hartung T, Bremer S: First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 2008;22:200-211.

Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003;101:3765-3777.

Aird WC: Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost* 2005;3:1392-1406.

Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA: EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1990;110:1227-1237.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-738.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A: The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:1-9.

Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Luscinskas FW: Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J Exp Med* 1997;186:517-527.

Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI: Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001;166:678-689.

Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI: Monocytes and macrophages form branched cell columns in matrigel: implications for a role in neovascularization. *Stem Cells Dev* 2004;13:665-676.

Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI: Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *Am J Pathol* 2006;168:529-541.

Anghelina M, Schmeisser A, Krishnan P, Moldovan L, Strasser RH, Moldovan NI: Migration of monocytes/macrophages in vitro and in vivo is accompanied by MMP12-dependent tunnel formation and by neovascularization. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:209-215.

Arnaout MA: Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990;75:1037-1050.

Aslakson CJ, Miller FR: Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992;52:1399-1405.

Austen KF, Fearon DT: A molecular basis of activation of the alternative pathway of human complement. *Adv Exp Med Biol* 1979;120B:3-17.

Babior BM: NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-1476.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A: Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211-217.

Baron MH: Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Exp Hematol* 2003;31:1160-1169.

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9237-9242.

Belaoussoff M, Farrington SM, Baron MH: Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. *Development* 1998;125:5009-5018.

Bertleff MJ, Stegmann T, Liem RS, Kors G, Robinson PH, Nicolai JP, Lange JF: Comparison of closure of gastric perforation ulcers with biodegradable lactide-glycolide-caprolactone or omental patches. *Jsls* 2009;13:550-554.

Beutler B, Rietschel ET: Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003;3:169-176.

Biswas SK, Sica A, Lewis CE: Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 2008;180:2011-2017.

Bloor AJ, Sanchez MJ, Green AR, Gottgens B: The role of the stem cell leukemia (SCL) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:195-206.

Bokoch GM, Diebold BA: Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 2002;100:2692-2696.

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A: Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:168-175.

Borregaard N, Cowland JB: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997;89:3503-3521.

Brack C, Hiramama M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S: A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978;15:1-14.

Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P: Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 2000;96:3838-3846.

Budhu A, Forgues M, Ye QH, Jia HL, He P, Zanetti KA, Kammula US, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW: Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* 2006;10:99-111.

Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR, Holmes N: CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* 1996;183:1707-1718.

Cai Z, de Bruijn M, Ma X, Dortland B, Luteijn T, Downing RJ, Dzierzak E: Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 2000;13:423-431.

- Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, Dvorak HF, Dvorak AM, Springer TA: Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* 2007;26:784-797.
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA: Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 2009;457:887-891.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G: A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125:725-732.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F: Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:10689-10692.
- Christiansen GE, Bacon RL: Direct observations of developing microcirculatory patterns in the posterior limb buds of fetal mice. *Angiology* 1961;12:517-24
- Chung S, Ingle NP, Montero GA, Kim SH, King MW: Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomater* 2009;6:1958-1967.
- Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, Griffiths G: Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* 1998;273:9842-9851.
- Clement HW, Vazquez JF, Sommer O, Heiser P, Morawietz H, Hopt U, Schulz E, von Dobschutz E: Lipopolysaccharide-induced radical formation in the striatum is abolished in Nox2 gp91phox-deficient mice. *J Neural Transm* 2010;117:13-22.
- Coffin JD, Harrison J, Schwartz S, Heimark R: Angioblast differentiation and morphogenesis of the vascular endothelium in the mouse embryo. *Dev Biol* 1991;148:51-62.
- Copp AJ: Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet* 1995;11:87-93.
- Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE: Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001;70:478-490.
- Dahlgren C, Karlsson A: Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999;232:3-14.
- de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E: Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J* 2000;19:2465-2474.
- de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.
- Dejana E: Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98:1949-1953.
- Dejana E: Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:261-270.
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES: Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 2005;307:1630-1634.
- Delassus S, Cumano A: Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* 1996;4:97-106.

DePrimo SE, Wong LM, Khattry DB, Nicholas SL, Manning WC, Smolich BD, O'Farrell AM, Cherrington JM: Expression profiling of blood samples from an SU5416 Phase III metastatic colorectal cancer clinical trial: a novel strategy for biomarker identification. *BMC Cancer* 2003;3:3.

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:27-45.

Drake CJ: Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003;69:73-82.

Drake CJ, Fleming PA: Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 2000;95:1671-1679.

Drevets DA, Campbell PA: Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *J Immunol Methods* 1991;142:31-38.

Eichmann A, Yuan L, Moyon D, Lenoble F, Pardanaud L, Breant C: Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. *Int J Dev Biol* 2005;49:259-267.

Ekelholm M, Hietanen J, Tulamo RM, Muhonen J, Lindqvist C, Kellomaki M, Suuronen R: Tissue reactions of subcutaneously implanted mixture of epsilon-caprolactone-lactide copolymer and tricalcium phosphate. An electron microscopic evaluation in sheep. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:913-918.

Elefanty AG, Begley CG, Hartley L, Papaevangeliou B, Robb L: SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 1999;94:3754-3763.

Faloon P, Arentson E, Kazarov A, Deng CX, Porcher C, Orkin S, Choi K: Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 2000;127:1931-1941.

Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V: Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 2003;130:4217-4227.

Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM: Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* 1998;187:903-915.

Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527-543.

Festag M, Viertel B, Steinberg P, Sehner C: An in vitro embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. II. Testing of compounds. *Toxicol In Vitro* 2007;21:1631-1640.

Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, Loges S, Staib P, Duhrsen U, Flasshove M, Ottmann OG, Jung W, Cavalli F, Kuse R, Thomalla J, Serve H, O'Farrell AM, Jacobs M, Brega NM, Scigalla P, Hossfeld DK, Berdel WE: A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2003;102:2763-2767.

Finlay BB, Hancock RE: Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat Rev Microbiol* 2004;2:497-504.

Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992;3:65-71.

- Fong GH, Klingensmith J, Wood CR, Rossant J, Breitman ML: Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. *Dev Dyn* 1996;207:1-10.
- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G: SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999;59:99-106.
- Fraser ST, Ogawa M, Yokomizo T, Ito Y, Nishikawa S, Nishikawa S: Putative intermediate precursor between hematogenic endothelial cells and blood cells in the developing embryo. *Dev Growth Differ* 2003;45:63-75.
- Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH: Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12355-12358.
- Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM: Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 2001;166:5398-5406.
- Garcia-Porrero JA, Godin IE, Dieterlen-Lievre F: Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 1995;192:425-435.
- Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Pohl I, Seiler A, Clemann N, Bremer S, Becker K: Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim* 2004;32:209-244.
- Giles FJ, Cooper MA, Silverman L, Karp JE, Lancet JE, Zangari M, Shami PJ, Khan KD, Hannah AL, Cherrington JM, Thomas DA, Garcia-Manero G, Albitar M, Kantarjian HM, Stopeck AT: Phase II study of SU5416--a small-molecule, vascular endothelial growth factor tyrosine-kinase receptor inhibitor--in patients with refractory myeloproliferative diseases. *Cancer* 2003;97:1920-1928.
- Godin I, Dieterlen-Lievre F, Cumano A: Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:773-777.
- Godin I, Garcia-Porrero JA, Dieterlen-Lievre F, Cumano A: Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* 1999;190:43-52.
- Gordon S: Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002;111:927-930.
- Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, Hanahan D, Johnson RS: Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res* 1999;59:1592-1598.
- Haar JL, Ackerman GA: Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with the initiation of vitelline circulation. *Anat Rec* 1971;170:437-455.
- Hattersley G, Dorey E, Horton MA, Chambers TJ: Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J Cell Physiol* 1988;137:199-203.
- He L, Liu B, Xipeng G, Xie G, Liao S, Quan D, Cai D, Lu J, Ramakrishna S: Microstructure and properties of nano-fibrous PCL-b-PLLA scaffolds for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2009;18:63-74.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-1529.

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM: Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 1999;27:146-159.

Hermiston ML, Xu Z, Weiss A: CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:107-137.

Hirai H, Ogawa M, Suzuki N, Yamamoto M, Breier G, Mazda O, Imanishi J, Nishikawa S: Hemogenic and nonhemogenic endothelium can be distinguished by the activity of fetal liver kinase (Flk)-1 promoter/enhancer during mouse embryogenesis. *Blood* 2003;101:886-893.

Hirai H, Samokhvalov IM, Fujimoto T, Nishikawa S, Imanishi J, Nishikawa S: Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells. *Blood* 2005;106:1948-1955.

Hoff PM, Wolff RA, Bogaard K, Waldrum S, Abbruzzese JL: A Phase I study of escalating doses of the tyrosine kinase inhibitor semaxanib (SU5416) in combination with irinotecan in patients with advanced colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36:100-103.

Holmes N: CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology* 2006;117:145-155.

Honey K, Rudensky AY: Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2003;3:472-482.

Hutmacher DW: Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001;12:107-124.

Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H: AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004;10:299-304.

Idris SB, Arvidson K, Plikk P, Ibrahim S, Finne-Wistrand A, Albertsson AC, Bolstad AI, Mustafa K: Polyester copolymer scaffolds enhance expression of bone markers in osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A* 2010;94:631-639.

Inman KE, Downs KM: The murine allantois: emerging paradigms in development of the mammalian umbilical cord and its relation to the fetus. *Genesis* 2007;45:237-258.

Itokawa T, Nokihara H, Nishioka Y, Sone S, Iwamoto Y, Yamada Y, Cherrington J, McMahon G, Shibuya M, Kuwano M, Ono M: Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol Cancer Ther* 2002;1:295-302.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.

Jin H, Su J, Garmy-Susini B, Kleeman J, Varner J: Integrin alpha4beta1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer Res* 2006;66:2146-2152.

- Jollie WP: Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* 1990;41:361-381.
- Kabrun N, Buhning HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G: Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 1997;124:2039-2048.
- Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV: Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 1993;13:473-486.
- Keller G, Lacaud G, Robertson S: Development of the hematopoietic system in the mouse. *Exp Hematol* 1999;27:777-787.
- Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, Keller G: A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 1997;386:488-493.
- Kieran MW, Supko JG, Wallace D, Fruscio R, Poussaint TY, Phillips P, Pollack I, Packer R, Boyett JM, Blaney S, Banerjee A, Geyer R, Friedman H, Goldman S, Kun LE, Macdonald T: Phase I study of SU5416, a small molecule inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) in refractory pediatric central nervous system tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52:169-176.
- Kim SH, Chung E, Kim SH, Jung Y, Kim YH, Kim SH: A novel seamless elastic scaffold for vascular tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2010;21:289-302.
- Kim SY, Lee JG, Cho WS, Cho KH, Sakong J, Kim JR, Chin BR, Baek SH: Role of NADPH oxidase-2 in lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase expression and cell migration. *Immunol Cell Biol* 2010;88:197-204.
- Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J: Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 2004;104:19-25.
- Klebanoff SJ: Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77:598-625.
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J: Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 2000;92:193-205.
- Kuang DM, Peng C, Zhao Q, Wu Y, Chen MS, Zheng L: Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells. *Hepatology* 2010;51:154-164.
- Kuang DM, Wu Y, Chen N, Cheng J, Zhuang SM, Zheng L: Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. *Blood* 2007;110:587-595.
- Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas ML: Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med* 2000;6:343-345.
- Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D: Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2000;67:104-108.
- Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, Ono M: Angiogenesis factors. *Intern Med* 2001;40:565-572.
- Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.

- Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H: Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* 1999;284:67-81.
- Lee ME, Temizer DH, Clifford JA, Quertermous T: Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 1991;266:16188-16192.
- Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4625-4629.
- Lemarchand C, Gref R, Passirani C, Garcion E, Petri B, Muller R, Costantini D, Couvreur P: Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. *Biomaterials* 2006;27:108-118.
- Li X, Vradii D, Gutierrez S, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Javed A: Subnuclear targeting of Runx1 is required for synergistic activation of the myeloid specific M-CSF receptor promoter by PU.1. *J Cell Biochem* 2005;96:795-809.
- Lieber JG, Webb S, Suratt BT, Young SK, Johnson GL, Keller GM, Worthen GS: The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood* 2004;103:852-859.
- Lieschke GJ, Dunn AR: Development of functional macrophages from embryonal stem cells in vitro. *Exp Hematol* 1995;23:328-334.
- Lindmark H, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bruder CE: Gene expression profiling shows that macrophages derived from mouse embryonic stem cells is an improved in vitro model for studies of vascular disease. *Exp Cell Res* 2004;300:335-344.
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
- Lucitti JL, Jones EA, Huang C, Chen J, Fraser SE, Dickinson ME: Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development* 2007;134:3317-3326.
- Lugus JJ, Chung YS, Mills JC, Kim SI, Grass J, Kyba M, Doherty JM, Bresnick EH, Choi K: GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development* 2007;134:393-405.
- Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S: Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H(+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+ "leak". *J Biol Chem* 1991;266:24540-24548.
- Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S: Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem* 1990;265:21099-21107.
- Lynch RG: Regulatory roles for FcgammaRIII (CD16) and FcgammaRII (CD32) in the development of T- and B-lineage lymphoid cells. *J Leukoc Biol* 2000;67:279-284.
- Medvinsky A, Dzierzak E: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996;86:897-906.
- Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA: An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 1993;364:64-67.

- Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-145.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr.: Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-344.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr.: Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;296:298-300.
- Mendel DB, Schreck RE, West DC, Li G, Strawn LM, Tanciongco SS, Vasile S, Shawver LK, Cherrington JM: The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function. *Clin Cancer Res* 2000;6:4848-4858.
- Metcalf D: The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986;67:257-267.
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-846.
- Moore MA, Metcalf D: Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 1970;18:279-296.
- Mu J, Adamson SL: Developmental changes in hemodynamics of uterine artery, utero- and umbilicoplacental, and vitelline circulations in mouse throughout gestation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1421-1428.
- Mufson RA, Aghajanian J, Wong G, Woodhouse C, Morgan AC: Macrophage colony-stimulating factor enhances monocyte and macrophage antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* 1989;119:182-192.
- Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E: Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1994;1:291-301.
- Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA: A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med* 1989;170:399-414.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM: PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449-460.
- Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I: Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19812-19817.
- Newman PJ: The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci* 1994;714:165-174.
- Nichols J, Evans EP, Smith AG: Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 1990;110:1341-1348.
- Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T, Kuwano M: Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:1107-1113.

- Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, Yoshida H, Kizumoto M, Kataoka H, Katsura Y: In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 1998;8:761-769.
- Nobes C, Marsh M: Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Curr Biol* 2000;10:R739-741.
- North TE, de Bruijn MF, Stacy T, Talebian L, Lind E, Robin C, Binder M, Dzierzak E, Speck NA: Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 2002;16:661-672.
- North T, Gu TL, Stacy T, Wang Q, Howard L, Binder M, Marin-Padilla M, Speck NA: Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 1999;126:2563-2575.
- Ohmura K, Kawamoto H, Lu M, Ikawa T, Ozaki S, Nakao K, Katsura Y: Immature multipotent hemopoietic progenitors lacking long-term bone marrow-reconstituting activity in the aorta-gonad-mesonephros region of murine day 10 fetuses. *J Immunol* 2001;166:3290-3296.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR: AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996;84:321-330.
- Orkin SH: GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992;80:575-581.
- Ortega N, Jonca F, Vincent S, Favard C, Ruchoux MM, Plouet J: Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* 1997;151:1215-1224.
- Otto F, Lubbert M, Stock M: Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 2003;89:9-18.
- Paige CJ, Kincade PW, Moore MA, Lee G: The fate of fetal and adult B-cell progenitors grafted into immunodeficient CBA/N mice. *J Exp Med* 1979;150:548-563.
- Palacios R, Imhof BA: At day 8-8.5 of mouse development the yolk sac, not the embryo proper, has lymphoid precursor potential in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6581-6585.
- Palis J, Chan RJ, Koniski A, Patel R, Starr M, Yoder MC: Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4528-4533.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G: Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 1999;126:5073-5084.
- Palis J, Yoder MC: Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 2001;29:927-936.
- Pamula E, Dobrzynski P, Szot B, Kretek M, Krawciow J, Plytycz B, Chadzinska M: Cytocompatibility of aliphatic polyesters--in vitro study on fibroblasts and macrophages. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:524-535.
- Patan S: TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 1998;56:1-21.

- Patel PC, Harrison RE: Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Mol Biol Cell* 2008;19:4628-4639.
- Patterson LJ, Gering M, Patient R: Scl is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood* 2005;105:3502-3511.
- Pego AP, Van Luyn MJ, Brouwer LA, van Wachem PB, Poot AA, Grijpma DW, Feijen J: In vivo behavior of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D,L-lactide or epsilon-caprolactone: Degradation and tissue response. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:1044-1054.
- Peterson AC, Swiger S, Stadler WM, Medved M, Karczmar G, Gajewski TF: Phase II study of the Flk-1 tyrosine kinase inhibitor SU5416 in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:4048-4054.
- Petty HR, Todd RF, 3rd: Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today* 1996;17:209-212.
- Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F: Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991;349:257-260.
- Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S: Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res* 1998;58:1486-1493.
- Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S: Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Res* 2000;60:2710-2715.
- Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA: In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest* 1967;46:668-679.
- Rabinowitz SS, Gordon S: Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med* 1991;174:827-836.
- Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D: The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9580-9584.
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J: Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:718-722.
- Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
- Risau W, Flamme I: Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988;102:471-478.
- Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, Metcalf D, Begley CG: Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7075-7079.

- Robertson SM, Kennedy M, Shannon JM, Keller G: A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development* 2000;127:2447-2459.
- Rogers PA, Lederman F, Taylor N: Endometrial microvascular growth in normal and dysfunctional states. *Hum Reprod Update* 1998;4:503-508.
- Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM: Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 1994;164:87-101.
- Ruoslahti E: Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002;2:83-90.
- Ryter A: Relationship between ultrastructure and specific functions of macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1985;8:119-133.
- Sandanger O, Ryan L, Bohnhorst J, Iversen AC, Husebye H, Halaas O, Landro L, Aukrust P, Froland SS, Elson G, Visintin A, Oktedalen O, Damas JK, Sundan A, Golenbock D, Espevik T: IL-10 enhances MD-2 and CD14 expression in monocytes and the proteins are increased and correlated in HIV-infected patients. *J Immunol* 2009;182:588-595.
- Savina A, Amigorena S: Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 2007;219:143-156.
- Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA: CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 2002;3:143-150.
- Schmid MC, Varner JA: Myeloid cell trafficking and tumor angiogenesis. *Cancer Lett* 2007;250:1-8.
- Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR: Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev* 1991;5:728-740.
- Scholz G, Pohl I, Genschow E, Klemm M, Spielmann H: Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: correlation to in vivo teratogenicity. *Cells Tissues Organs* 1999;165:203-211.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990;249:1429-1431.
- Segal AW, Coade SB: Kinetics of oxygen consumption by phagocytosing human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84:611-617.
- Segal AW, Jones OT: Rapid incorporation of the human neutrophil plasma membrane cytochrome b into phagocytic vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;92:710-715.
- Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM: Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:170-200.
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J: A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997;89:981-990.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-1782.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P: Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42:717-727.

Sinha P, Clements VK, Miller S, Ostrand-Rosenberg S: Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:1137-1142.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988;336:688-690.

Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434.

Stopeck A, Sheldon M, Vahedian M, Cropp G, Gosalia R, Hannah A: Results of a Phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2002;8:2798-2805.

Stummann TC, Hareng L, Bremer S: Embryotoxicity hazard assessment of cadmium and arsenic compounds using embryonic stem cells. *Toxicology* 2008;252:118-122.

Stummann TC, Hareng L, Bremer S: Hazard assessment of methylmercury toxicity to neuronal induction in embryogenesis using human embryonic stem cells. *Toxicology* 2009;257:117-126.

Su WH, Chen HI, Jen CJ: Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium. *Blood* 2002;100:3597-3603.

Takamoto T, Sasaki M, Kuno T, Tamaki N: Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416) inhibited the growth of GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival. *Kobe J Med Sci* 2001;47:181-191.

Tazzyman S, Lewis CE, Murdoch C: Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2009;90:222-231.

Toles JF, Chui DH, Belbeck LW, Starr E, Barker JE: Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7456-7459.

Toritsu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M: Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer* 2000;85:182-188.

Trimborn T, Gribnau J, Grosveld F, Fraser P: Mechanisms of developmental control of transcription in the murine alpha- and beta-globin loci. *Genes Dev* 1999;13:112-124.

Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH: An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994;371:221-226.

van Tienen TG, Heijkants RG, Buma P, de Groot JH, Pennings AJ, Veth RP: Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes. *Biomaterials* 2002;23:1731-1738.

Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH: Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* 1998;12:473-479.

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* 1996;88:3424-3431.

Walls JR, Coultas L, Rossant J, Henkelman RM: Three-dimensional analysis of vascular development in the mouse embryo. *PLoS One* 2008;3:e2853.

Wang SY, Tai GX, Zhang PY, Mu DP, Zhang XJ, Liu ZH: Inhibitory effect of activin A on activation of lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Cytokine* 2008;42:85-91.

Wang YH, Shen YC, Liao JF, Lee CH, Chou CY, Liou KT, Chou YC: Anti-inflammatory effects of dimemorfan on inflammatory cells and LPS-induced endotoxin shock in mice. *Br J Pharmacol* 2008;154:1327-1338.

Wartenberg M, Budde P, De Marees M, Grunheck F, Tsang SY, Huang Y, Chen ZY, Hescheler J, Sauer H: Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine. *Lab Invest* 2003;83:87-98.

Wartenberg M, Donmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H: Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *Faseb J* 2001;15:995-1005.

Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H: The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest* 1998;78:1301-1314.

Weiss MJ, Keller G, Orkin SH: Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 1994;8:1184-1197.

Wernig M, Tucker KL, Gornik V, Schneiders A, Buschwald R, Wiestler OD, Barde YA, Brustle O: Tau EGFP embryonic stem cells: an efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation. *J Neurosci Res* 2002;69:918-924.

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

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM: Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-687.

Wobus AM, Boheler KR: Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005;85:635-678.

Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM: Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1525-1539.

Woltmann A, Hamann L, Ulmer AJ, Gerdes J, Bruch HP, Rietschel ET: Molecular mechanisms of sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 1998;383:2-10.

Wong AM, Patel NV, Patel NK, Wei M, Morgan TE, de Beer MC, de Villiers WJ, Finch CE: Macrosialin increases during normal brain aging are attenuated by caloric restriction. *Neurosci Lett* 2005;390:76-80.

Wood HB, May G, Healy L, Enver T, Morriss-Kay GM: CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood* 1997;90:2300-2311.

Woodfin A, Reichel CA, Khandoga A, Corada M, Voisin MB, Scheiermann C, Haskard DO, Dejana E, Krombach F, Nourshargh S: JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood* 2007;110:1848-1856.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-1433.

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J: flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993;118:489-498.

Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC: Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004;6:409-421.

Yates RM, Hermetter A, Taylor GA, Russell DG: Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 2007;8:241-250.

Yokomizo T, Ogawa M, Osato M, Kanno T, Yoshida H, Fujimoto T, Fraser S, Nishikawa S, Okada H, Satake M, Noda T, Nishikawa S, Ito Y: Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells* 2001;6:13-23.

Young PE, Baumhueter S, Lasky LA: The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 1995;85:96-105.

Zanjani ED, Ascensao JL, Tavassoli M: Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* 1993;81:399-404.

Zhou J, Tai G, Liu H, Ge J, Feng Y, Chen F, Yu F, Liu Z: Activin A down-regulates the phagocytosis of lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Cell Immunol* 2009;255:69-75.

Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ: CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993;14:121-125.

7. Appendix

7.1 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Maria Wartenberg bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat die vorliegende Arbeit zu erstellen. Ich danke ihr für ihre stets offene Tür, für ihre zahlreichen Anregungen und Anleitungen sowie für die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf Tagungen präsentieren zu können.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Regine Heller dafür, die Arbeit vor der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät zu vertreten. Außerdem danke ich ihr für ihre Herzlichkeit und das kritische Durchlesen des Manuskripts.

Danke sagen möchte ich den Mitarbeitern von Innovent e. V. Jena für die Herstellung der Polymermaterialien: Herr Dr. Matthias Schnabelrauch, Herr Dr. Jürgen Weißer, Frau Dr. Claudia Rode und Frau Dr. Annika Schmidt.

Besonderer Dank gilt den Doktoranden und Diplomanden an meiner Seite für ihre Bereitschaft ihre Erfahrungen, ihr Wissen und auch ihre Freizeit mit mir zu teilen: Carola Ruhe, Caroline Bartsch (geb. Zietlow), Catrin Strobel, Anne Wolheim, Constance Danzer, Yvonne Noack, Bianka Wissuwa und Claudia Meyer.

Herrn Dr. Martin Förster danke ich für die Einweisung und ständige Hilfe am FACSCalibur, außerdem danke ich ihm, Yvonne Schlenker und Annett Schmidt für das so angenehme Gefühl in ihrem Labor stets willkommen zu sein.

Herrn Dr. Mohamed Bekhite und Herrn Dr. Andreas Finkensieper möchte ich für ihre Hilfe rund um die Publikationen danken.

Und natürlich bin ich sehr dankbar für alle Hilfestellungen zur Erleichterung der Laborarbeit. Dieser Dank geht an Ruth Hesse, Stephanie Kunath, Martina Voigt, Kirstin Hässler und Heike Kersten.

Ich danke Bettina Reißweber, Carola Ruhe und Bianka Wissuwa für das kritische Durchlesen des Manuskripts und meinen Eltern und Schwiegereltern für die moralische Unterstützung.

Meinem Mann gilt besonderer Dank, einfach dafür, dass er mir zu jeder Zeit Stärke verleiht.

7.2 Lebenslauf

Name: Madeleine Richter, geb. Hannig
Geburtsdatum und -ort: 25.08.1979 in Osterburg
Familienstand: verheiratet

PROMOTION

06/2005-03/2007 Beginn der Promotion in der Abteilung Zellbiologie am Institut für Polymerforschung der GKSS, Teltow unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Maria Wartenberg
04/2007-05/2010 Fortsetzung der Promotion in der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung am Forschungszentrum Lobeda (FZL) unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Maria Wartenberg

PRAKTIKUM

04/2005-05/2005 Praktikantin am Institut für Getreideverarbeitung (IGV) in Potsdam-Rehbrücke unter Betreuung von Frau Köhler und Frau Loest „Gewinnung und Stabilisierung von Farbstoffen aus Mikroalgen“

STUDIUM

10/1999-09/2004 Studium der Chemie an der Technischen Universität Dresden (TUD)
03/2002 Forschungspraktikum in der Abteilung Biochemie der TUD „Untersuchungen zur sequenzspezifischen Inhibierung der VEGF-mRNA“ unter Betreuung von Frau Förster
09/2004 Diplom an der TUD unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. van Pée mit dem Thema „Bleiche von Baumwolle mit Hilfe extrazellulärer Enzyme aus dem Weißfäulepilz *Bjerkandera adusta*“

SCHULAUSSBILDUNG

1986-1988 POS Adolf-Hennecke, Senftenberg
1988-1992 POS Ho-Chi-Minh (später 3. Gesamtschule), Senftenberg
1992-1999 Gymnasium Senftenberg
06/1999 Abitur am Gymnasium Senftenberg

7.3 Publikationen und Posterbeiträge

Publikationen

Hannig M, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M: Control of leukocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue. *J Cell Mol Med* 2010;14(1-2):303-12.

Sharifpanah F, Wartenberg M, Hannig M, Piper HM, Sauer H: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists enhance cardiomyogenesis of mouse ES cells by utilization of a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Stem Cells* 2008;26:64-71.

Finkensieper A, Kieser S, Bekhite MM, Richter M, Mueller JP, Graebner R, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M: The 5-lipoxygenase pathway regulates vasculogenesis in differentiating mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2010;86:37-44.

Wartenberg M, Richter M, Datchev A, Gunther S, Milosevic N, Bekhite MM, Figulla HR, Aran JM, Petriz J, Sauer H: Glycolytic pyruvate regulates P-Glycoprotein expression in multicellular tumor spheroids via modulation of the intracellular redox state. *J Cell Biochem* 2010;109:434-446.

Vorträge

Hannig M, Ruhe C, Zietlow C, Sauer H, Förster M, Figulla HR, Wartenberg M: The Interaction of angiogenesis and leukocyte differentiation in embryoid bodies derived from embryonic stem cells. *Acta Physiologica* 2008;OT2-1-5, Köln, 04.05.2008

Richter M, Datchev A, Sauer H, Wartenberg M, P-Glycoprotein expression in multicellular tumor spheroids is regulated via modulation of the intracellular redox state; 2. Postgraduate Symposium on Cancer Research, Dornburg, 24.04.2010

Poster

Finkensieper A, Hannig M, Gräbner R, Habenicht A, Sauer H, Hescheler J, Wartenberg M: Appearance of 5-Lipoxygenase and Leukotriene Receptors in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cell-derived Embryoid Bodies: *Acta Physiologica* 2006;PT07A-11

Hannig M, Ruhe C, Vigants A, Finkensieper A, Wartenberg M: Leukocyte Differentiation in Murine Embryoid Bodies as *in vitro* model for Cellular Defence: *Nova Acta Leopoldina* 2006;95:352

Hannig M, Ruhe C, Noack Y, Sauer H, Wartenberg M: Leukocyte differentiation from mouse embryonic stem cells as a novel *in vitro* model for cellular defence. *Acta Physiologica* 2007;P26-L7-10

Kieser S, Finkensieper A, Bekhite M, Richter M, Sauer H, Figulla HR, Wartenberg M: Characterization of the 5-Lipoxygenase pathway and leukotriene receptors in differentiating mouse embryonic stem cell derived embryoid bodies. *Acta Physiologica* 2009;195: Supplement 669, P153

Milosevic N, Finkensieper A, Richter M, Wartenberg M, Sauer H: Tumor-induced angiogenesis analyzed in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Acta Physiologica* 2009;195: Supplement 669, P158

Wartenberg M, Richter M, Guenther S, Datchev A, Figulla HR, Sauer H: Metabolic pathways regulate P-glycoprotein gene expression via reactive oxygen species. *Acta Physiologica* 2009;195: Supplement 669, P273

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Mich haben keine anderen als die angegebenen Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt. Die Hilfe eines Promotionsberaters nahm ich nicht in Anspruch und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit den Inhalten der vorgelegten Dissertation stehen. Ich habe diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 08.06.2010

Madeleine Richter