

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 Die Endothelzellen des Blutgefäßsystems	3
2.2 Embryonale Entstehung der Blutgefäße	4
2.3 Vaskulogenese und Angiogenese	6
2.3.1 Die angiogene Kaskade	7
2.4 Postnatale Blutgefäßbildung	9
2.4.1 Angiogenese im Corpus luteum	9
2.5 Postnatale Vaskulogenese	10
2.5.1 Nomenklatur der Stamm- und Progenitorzellen	11
2.5.2 Herkunft und Charakterisierung endothelialer Vorläuferzellen im adulten Organismus	13
2.5.3 Hämatopoietische Stammzellen	13
2.5.4 Myeloide Zellen	15
2.5.5 Multipotente adulte Progenitorzellen des Knochenmarks	15
2.5.6 Side Population Cells	16
2.5.7 In Geweben residierende pluripotente Stammzellen	16
2.5.8 Das Ovar als Quelle adulter Stammzellen	17
2.6 Regulationsmechanismen des Gefäßwachstums	19
2.6.1 Regulation der Vaskulogenese während der Embryonal- und Fetalperiode	19
2.6.2 Regulation der Vaskulogenese im adulten Organismus	20
2.6.3 Regulation der Angiogenese	22
2.6.4 Bedeutung des VEGF und seiner Rezeptoren bei der Gefäßbildung	23
2.6.4.1 Die Rolle des VEGF und seiner Rezeptoren im Corpus luteum	24
2.6.5 Die Rolle von Zelladhäsionsmolekülen bei der Gefäßentwicklung	25
2.6.5.1 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31)	25
2.6.5.2 Integrine	27
2.7 Heterogenität des Endothels	28
2.7.1 Morphologische Heterogenität	29
2.7.2 Funktionelle Heterogenität	31

2.7.3	Metabolische Heterogenität	32
2.7.3.1	Heterogenität der oberflächenassoziierten Glykokonjugate	32
2.7.3.2	Heterogenität der Adhäsionsmoleküle (Selektine, Immunglobulinsuperfamilie und Integrine)	32
2.7.3.3	Heterogenität des antigenen Oberflächenprofils	34
2.7.3.4	Heterogenität der Genexpression	34
2.7.3.5	Heterogenität der Reaktion auf Wachstumsfaktoren	35
2.8	Plastizität und Transdifferenzierung der endothelialen Phänotypen	36
2.9	Die <i>in vitro</i> Kultur von Endothelzellen	37
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>39</b>
3.1	Zellkultur	39
3.1.1	Zellen	39
3.1.2	Geräte	40
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	40
3.1.4	Zusätze und Medien	41
3.1.4.1	Zusätze	41
3.1.4.2	Nährmedium (Erhaltungsmedium DMEM <sup>+</sup> )	41
3.1.4.3	Selektivmedium zur Induktion der Angiogenese (P0)	41
3.1.4.4	Medium zur Kryokonservierung der Endothelzellen	42
3.1.5	Chemikalien und Reagenzien	42
3.1.6	Software	42
3.2	Immunzytochemie, histologische Präparation und Apoptosetest	42
3.2.1	Geräte	42
3.2.2	Verbrauchsmaterialien	43
3.2.3	Antikörper, Immunreagenzien und Reaktionskits	43
3.2.4	Chemikalien und Reagenzien	44
3.2.5	Software	44
3.3	Transmissionselektronenmikroskopie	44
3.3.1	Geräte	44
3.3.2	Verbrauchsmaterialien	44
3.3.3	Chemikalien und Reagenzien	45
3.4	PCR	45
3.4.1	Geräte	45
3.4.2	Verbrauchsmaterialien	46
3.4.3	Chemikalien und Reagenzien	46
3.4.4	Primer	47

---

3.4.5	Lösungen zur Auswertung	47
3.4.5.1	Reaktionspuffer	47
3.4.5.2	Agarosegel	47
3.4.5.3	Größenmarker	47
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>48</b>
4.1	Zellkultur	48
4.1.1	Kultivierung der Zellen	48
4.1.2	Subkultivierung	48
4.1.3	Kryokonservierung	49
4.1.4	Auftauen der Zellen	49
4.1.5	Zellzählung der <i>in vitro</i> kultivierten Zellen	50
4.2	Bestimmung der Vitalität der Zellen	50
4.3	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen <i>in vitro</i> kultivierter Endothelzellen	50
4.4	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen <i>in vitro</i> kultivierter Endothelzellen	51
4.5	Immunzytochemische Untersuchung an Endothelzellen des bovinen Corpus luteum <i>in vitro</i>	52
4.5.1	Problematik bei der Durchführung immunzytochemischer Untersuchungen mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern	54
4.5.2	Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Endothelzellen mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper	54
4.5.3	Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Endothelzellen mit En-Vision+TM-Kit	55
4.5.4	Kontrollen der immunzytochemischen Untersuchungen	55
4.5.5	Auswertung der immunzytochemischen Untersuchungen	56
4.6	Histologische Untersuchung mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung	56
4.6.1	Apoptosen im Ablauf der <i>in vitro</i> Kultivierung	57
4.7	RT-PCR <i>in vitro</i> kultivierter Endothelzellen	57
4.7.1	Zellzählung	57
4.7.2	Molekularbiologisches Labor	57
4.7.3	RNA-Extraktion	58
4.7.4	Mengenbestimmung der RNA	58
4.7.5	Reverse Transkription	59
4.7.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	60
4.7.7	Auswertung der PCR	63

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
5.1	Untersuchung der Morphologie und vaskulären Entwicklung der mikro- vaskulären Endothelzellkulturen <i>BCI AA, BCI RN, BCI RA1, BCI RA2</i>	64
5.1.1	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung der mikrovaskulären Endo- thelzellkulturen <i>BCI AA, BCI RN, BCI RA1, BCI RA2 in vitro</i>	65
5.1.1.1	Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur <i>BCI AA in vitro</i>	65
5.1.1.2	Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur <i>BCI RN in vitro</i>	70
5.1.1.3	Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur <i>BCI RA1 in vitro</i>	72
5.1.1.4	Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur <i>BCI RA2 in vitro</i>	75
5.1.1.5	Tabellarischer Vergleich der Morphologie der verschiedenen mikrovaskulä- ren Endothelzellkulturen <i>BCI AA, BCI RN, BCI RA1, BCI RA2</i> des bovinen Corpus luteum während der <i>in vitro</i> Kultivierung	78
5.1.2	Histologische Untersuchung der mikrovaskulären Endothelzellkulturen <i>BCI AA, BCI RN, BCI RA1</i> und <i>BCI RA2</i> aus dem bovinen Corpus luteum <i>in vitro</i>	79
5.1.2.1	Richardsonfärbung	79
5.1.2.1.1	Endothelzellkultur <i>BCI AA</i>	79
5.1.2.1.2	Endothelzellkultur <i>BCI RN</i>	81
5.1.2.1.3	Endothelzellkultur <i>BCI RA1</i>	82
5.1.2.1.4	Endothelzellkultur <i>BCI RA2</i>	84
5.1.2.2	May-Grünwald-Giemsa Färbung	85
5.1.2.2.1	Apoptosen	85
5.1.2.2.2	Lumenbildung in der Endothelzellkultur <i>BCI AA</i>	88
5.1.2.2.3	Synthese faserartiger Strukturen	89
5.1.2.2.4	Endothelzellkulturen <i>BCI RN, BCI RA1, BCI RA2</i>	91
5.1.3	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der mikrovaskulä- ren Endothelzellkulturen <i>BCI AA, BCI RN, BCI RA1, BCI RA2 in vitro</i>	92
5.1.3.1	Ultrastruktur der Endothelzellkultur <i>BCI AA</i>	92
5.1.3.2	Ultrastruktur der Endothelzellkultur <i>BCI RN</i>	99
5.1.3.3	Ultrastruktur der Endothelzellkultur <i>BCI RA1</i>	102
5.1.3.4	Ultrastruktur der Endothelzellkultur <i>BCI RA2</i>	106
5.2	Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellantigenen bei Endothelzellen verschiedener Entwicklungsstadien des bovinen Corpus luteum <i>in vitro</i>	108
5.2.1	Immunzytochemische Markierung mit anti-CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1)	109

---

5.2.1.1	Kontrollen	111
5.2.2	Immunzytochemische Markierung mit anti-CD34	111
5.2.2.1	Kontrollen	113
5.2.3	Immunzytochemische Markierung mit anti-CD117 (c-kit)	114
5.2.3.1	Kontrollen	116
5.2.4	Immunzytochemische Markierung mit anti-Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2 (VEGF-R2, KDR)	117
5.2.4.1	Kontrollen	119
5.2.5	Tabellarische Übersicht der immunzytochemischen Untersuchungen mit Stammzellmarkern	120
5.3	Immunzytochemischer Nachweis der Zelladhäsionsmoleküle anti-Integrin $\beta 1$ (CD29) und anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD51/61) mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum	121
5.3.1	Immunzytochemische Markierung mit anti-Integrin $\beta 1$ (CD29)	121
5.3.2	Immunzytochemische Markierung mit anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD51/61)	126
5.3.3	Kontrollen	129
5.4	Untersuchung der Genexpression der Rezeptoren des Vascular Endothelial Growth Factor VEGF-R1 und -2 <i>in vitro</i> kultivierter Endothelzellen des bovinen Corpus luteum	129
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>131</b>
6.1	Etablierung einer Methode zur Identifizierung adulter Stammzellen des Rindes	132
6.2	Ein neues Modell der <i>in vitro</i> Vaskulogenese: Zellkultur <i>BCI AA</i>	137
6.3	Neue Erkenntnisse der <i>in vitro</i> Angiogenese: Endothelzellkulturen <i>BCI RA1</i> und <i>BCI RA2</i>	141
6.4	Bipotente Vorläuferzellen von Endothelzellen und Granulosazellen? Zellkultur <i>BCI RN</i>	146
6.5	Vaskulogenese und Angiogenese <i>in vitro</i> : Unterschiede in der Lumenbildung	152
6.6	Vaskulogenese und Angiogenese <i>in vitro</i> : Dreidimensionales Wachstum und Adhäsionsmoleküle	154
6.6.1	Das Integrin CD29	154
6.6.2	Das Integrin CD51/61	155
6.7	Determinierte Gefäßarchitektur der lutealen Kulturen <i>BCI AA</i> , <i>BCI RA1</i> und <i>BCI RA2 in vitro</i>	156
6.8	Maturation und Stabilisierung <i>in vitro</i> gebildeter kapillarähnlicher Strukturen	157

6.9	Ausblick	158
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>164</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>167</b>