

2 Literaturübersicht

2.1 Die Endothelzellen des Blutgefäßsystems

Ein Monolayer aus Endothelzellen kleidet das Lumen aller Blutgefäße aus. Trotz orts- und organspezifischer Variabilität liegt den Arterien, Venen, Arteriolen und Venulen ein allgemeingültiger Aufbau zugrunde. In der Regel sind eine innere Tunica interna, eine die Mittelschicht bildende Tunica media und eine darauf folgende Tunica externa/adventitia gegeneinander abgrenzbar. Die Tunica interna besteht als lumenseitige Grenzschicht zum strömenden Blut aus Endothelzellen, die von einer Lamina subendothelialis und der Basalmembran unterlagert sind. Kapillaren stellen die kleinste Einheit im Blutgefäßsystem dar. Sie bestehen nur aus Endothelzellen und der Basalmembran sowie den außen anliegenden Perizyten, die in bestimmten Organen fehlen können (Liebich, 2003).

Das vaskuläre Endothel dient nicht nur als Leitsystem für das Blut einschließlich seiner Zellen, vielmehr ist es metabolisch aktiv und Hauptakteur bei zahlreichen Regulationsprozessen, wie beispielsweise vaskulärer Permeabilität, makro- und mikromolekularem Transport, vaskulärem Tonus, Entzündung und Koagulation (Sato, 2001). Das Endothel bildet eine selektive Barriere zwischen dem umliegenden Gewebe und den im Blut zirkulierenden Zellen, Makromolekülen und löslichen Faktoren. Endotheliale Zell-Zell-Kontakte bestimmen die Permeabilität der Blutgefäßwand. Auf der Basis morphologischer und funktioneller Charakterisierung wurden drei Formen interendothelialer Zellkontakte beschrieben: tight junctions, adherent junctions und gap junctions (Hristov et al., 2003).

Flexibel können Endothelzellen ihre Eigenschaften stoffwechselphysiologischen Bedingungen anpassen. Mittels zahlreicher Moleküle und membrangebundener Rezeptoren steuern sie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Eine grundlegende physiologische Rolle des Endothels ist es, durch seine anti-thrombotische luminalen Oberfläche, welche die Adhäsion und Koagulation der Blutplättchen verhindert, den Blutfluss zu ermöglichen. Die wichtigsten, die Blutgerinnung regulierenden Moleküle werden von Endothelzellen synthetisiert und freigesetzt, u.a. Prostacyclin (PGI), Thrombomodulin, Plasminogen, von Willebrand Faktor (vWF) und Fibrinogen. Unter dem Einfluss chemischer oder mechanischer Noxen vollziehen Endothelzellen einen programmierten biochemischen Wandel, wobei ihre luminalen Oberfläche in eine pro-thrombotische transformiert. Mit ihrer Fähigkeit, vasoaktive

Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1 (ET-1) und Prostacyclin zu synthetisieren, regulieren Endothelzellen den Tonus der Blutgefäße.

Endothelzellen koordinieren die Rekrutierung inflammatorischer Zellen zu entzündetem Gewebe bzw. zu Infektionsherden. Hierfür produzieren und sezernieren sie Kommunikatoren, wie Zytokine, Chemoattraktoren und Wachstumsfaktoren. Gleichzeitig reagieren Endothelzellen auf einige, von ihnen selbst sezernierte, inflammatorische Stimuli. Ihre para- und autokrinen Fähigkeiten katalysieren den Entzündungsprozess. Adhäsionsmoleküle wie Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) und E- und P-Selektin spielen bei der Extravasation der Entzündungszellen eine zentrale Rolle. Sowohl an der Oberfläche von Endothelzellen als auch von Leukozyten exprimiert, ermöglichen sie Adhäsion und Migration der Leukozyten aus dem vaskulären System zum Ort der Entzündung (Cines et al., 1998; Sato, 2001; Ribatti et al., 2002; Michiels, 2003; Hurairah und Ferro, 2004).

Obwohl alle Blutgefäße gemeinsame Funktionen teilen, wie beispielsweise den Transport von Sauerstoff und Metaboliten, sind nicht alle Blutgefäße gleich. Arterien und Venen verschiedener Kompartimente des Organismus exprimieren spezifische Marker und verfügen über spezialisierte Funktionen (z.B. Blut-Gehirn-Schranke), um den unterschiedlichen Bedürfnissen der einzelnen Organe gerecht zu werden (Carmeliet, 2001).

2.2 Embryonale Entstehung der Blutgefäße

Während der Ontogenese eines Vertebratenembryos ist das kardiovaskuläre System das erste funktionale Organsystem. Im frühen Stadium, wenn der Embryo noch durch Diffusion ernährt wird, entsteht das primäre, primitive Gefäßgeflecht extraembryonal im Mesoderm des Dottersacks (Flamme et al., 1997).

Zum Zeitpunkt der Gastrulation wandern vom pluripotenten, intraembryonal lokalisierten Epiblast Zellen zum lateralen extraembryonalen Mesoderm ab. Nach Erreichen des lateralen Mesoderms, in der Phase des Ein-Somitenstadiums, formieren sich diese Zellen zu soliden Zellaggregaten aus epitheloiden Zellen, welche Blutinseln genannt werden. Während die äußeren Zellen der als Cluster bezeichneten Zellaggregate abflachen und zu Vorläuferzellen der Endothelzellen, den Angioblasten, differenzieren, runden die inneren Zellen ab und werden zu hämatopoietischen Zellen, den Vorläufern der Blutzellen (Risau und Flamme, 1995; Wilting und Christ, 1996). Die nahe Verwandtschaft beider Zelllinien führte zu der Annahme, dass Endothelzellen und Blutzellen von einer gemeinsamen mesodermalen Stammzelle, genannt Hämangioblast, abstammen. Die exakte Definition dieser multipotenten Stammzellen gilt bis heute noch weitgehend als ungeklärt (Choi, 2002; Eichmann et al.,

2002; Bailey und Fleming, 2003). Im weiteren Prozess der Ontogenese verschmelzen die benachbarten Blutinseln miteinander und verzweigen sich zum primären Gefäßgeflecht des Dottersacks (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Zwischen extra- und intraembryonaler Blutgefäßentstehung besteht ein großer Unterschied. Während extraembryonal blutgefäßauskleidende Zellen, also Endothelzellen, in enger Gemeinschaft synchron mit den späteren Blutzellen erscheinen, differenzieren im Embryo Angioblasten solitär (Risau, 1995; Drake und Fleming, 2000). Die gemeinsamen Vorläuferzellen der Blut- und Endothelzellen, die Hämangioblasten, scheinen bis auf eine Ausnahme nur extraembryonal aufzutreten. Als extraembryonale Bildungsorte der Hämangioblasten sind bisher Dottersack, Plazenta (Caprioli et al., 2001; Alvarez-Silva et al., 2003) und Allantois (Caprioli et al., 2001) bekannt. Intraembryonal taucht ein kleiner Anteil hämangioblastischer Vorläuferzellen nur am Boden der dorsalen Aorta auf (Ema und Rossant, 2003). Diese hämangioblastischen Vorläuferzellen wandern in späteren Somitenstadien als hämatopoietische Stammzellen zu den blutbildenden Organen (Muller et al., 1994).

Kurz nachdem in den Blutinseln Angioblasten und hämatopoietische Zellen auftreten, erscheinen auch innerhalb des Embryos Angioblasten. Diese differenzieren im engen Kontakt mit dem Entoderm aus intraembryonal gelegenen mesodermalen Zellen (Drake und Fleming, 2000; Flamme und Breier, 2001) und migrieren und aggregieren zu soliden präendothelialen Strängen entlang den axialen Strukturen im Embryo. Im weiteren Verlauf differenzieren die Stränge zu Tubuli. Daraus entstehen die dorsale und ventrale Aorta, die präendokardialen Tubuli des späteren Herzschlauchs, sowie die Dottersackvenen und die Kardinalvenen. Bereits im Zwei-Somiten-Stadium stehen intraembryonale und extraembryonale Urgefäße in Verbindung (Risau und Flamme, 1995; Flamme et al., 1997; Drake et al., 1998; Poole et al., 2001). Die Entwicklung des primitiven Herzschlauchs steht in engem Zusammenhang mit der Bildung der ventralen und dorsalen Aorta. Nachdem die großen Urgefäße sich mit der Herztube vereint haben, beginnt sich die primitive Herzwand zu kontrahieren (Patan, 2000; Patan, 2004). Gleichzeitig treten aus den Blutinseln die Vorläuferzellen der Blutzellen in den Kreislauf ein und differenzieren zu definitiven Blutzellen. Der erste primitive Blutkreislauf und somit das erste funktionierende Organsystem ist entstanden (Risau und Flamme, 1995; Flamme et al., 1997).

Unabhängig davon und ohne begleitende Hämatopoiese, differenzieren Angioblasten aus verschiedenen Anteilen des intraembryonal lokalisierten Mesoderms und emigrieren als ausgesprochen motile Zellen aus ihrem Entstehungsort. Solche Angioblasten fusionieren am Ort ihrer Bestimmung miteinander oder mit Kapillaren, bilden Gefäße in Organen und

Gewebe oder werden in bereits bestehende Gefäße eingebaut (Risau und Flamme, 1995; Patan, 2004).

Der Zeitpunkt der Determinierung vom Angioblasten zur Endothelzelle scheint sich auf verschiedene Stadien der Embryogenese auszudehnen. Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass persistierende Hämangioblasten oder noch primitivere Stammzellen mit mesodermaler Qualität sogar im adulten Organismus existieren (Bailey und Fleming, 2003; Cogle et al., 2004).

2.3 Vaskulogenese und Angiogenese

Zwei verschiedene Mechanismen liegen der Blutgefäßentwicklung im embryonalen Organismus zugrunde, Vaskulogenese und Angiogenese.

Vaskulogenese nennt man den Zweischrittmechanismus, bestehend aus Determination und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Mesoderm und ihre *de novo* Organisation zu einem primitiven vaskulären Gefäßgeflecht (Flamme et al., 1997). Initial entstehen durch den Prozess der Vaskulogenese die extraembryonale Dottersackzirkulation, das primitive Herz und der primäre vaskuläre Plexus innerhalb des Embryos. Des Weiteren werden alle Organe, die sich aus Anteilen des Mesoderms und Entoderms entwickeln, wie z.B. Leber, Milz und Myokard, primär in Form von Vaskulogenese vaskularisiert (deMello et al., 1997; Robert et al., 1998; Gebb und Shannon, 2000; Lammert et al., 2001; Matsumoto et al., 2001; Robert, 2001; Vokes und Krieg, 2002; Patan, 2004).

Weitere Entwicklungsschritte, wie Expansion und Verzweigung der primären Gefäßgeflechte, werden als Angiogenese bezeichnet (Carmeliet, 2000; Patan, 2000). Sie impliziert das Entstehen neuer Kapillaren aus bereits existierenden Blutgefäßen. Man unterscheidet zwischen dem klassischen Aussprossen („sprouting angiogenesis“) und der intussuszeptionellen Entwicklung von Gefäßen („non-sprouting angiogenesis“) (Kalka et al., 2000). Sprossende Angiogenese basiert auf der Migration, Proliferation und Bildung tubulärer Strukturen. Intussuszeption teilt das Lumen existierender Gefäße durch die Insertion von Endothelzell-Pfeilern des interstitiellen Gewebes (Bartel und Lametschwandtner, 2000; Djonov et al., 2000; Patan, 2000; Patan, 2004).

Im Embryo ist die Angiogenese der charakteristische Vaskularisationsprozess für Organe, die nicht initial von Angioblasten besiedelt werden, wie z.B. das Gehirn und das Rückenmark (Baldwin, 1996; Kurz und Christ, 2001). In manchen Regionen tritt Gefäßentwicklung simultan durch Angiogenese und Vaskulogenese auf, was für die sich entwickelnde Niere und Lunge beschrieben ist (Baldwin, 1996; deMello und Reid, 2000; Gomez und Sequeira Lopez, 2001).

2.3.1 Die angiogene Kaskade

Für die Entwicklung der Gefäßstrukturen bedarf es einer komplexen zellulären und molekularen Kaskade. Sie beinhaltet Proliferation und kontrollierten Zelltod sowie Wachstum und Stabilisierung der neuen Gefäße. Der Ablauf dieser sogenannten angiogenen Kaskade hängt von der koordinierten Aktivität zahlreicher, verschiedener Moleküle ab, wie Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren, proteolytischen Enzymen, Zelladhäsionsmolekülen und extrazellulären Matrixkomponenten (Folkman, 1984; Bishop et al., 1999; Vailhe et al., 2001).

Auf einen angiogenen Stimulus hin kommt es als erstes zum **Abbau der Basalmembran und der angrenzenden interstitiellen Matrix** der Endothelzellen (Folkman, 1984). Als spezialisierte Form der extrazellulären Matrix grenzt die Basalmembran direkt an die basale Oberfläche der Endothelzellen an. Ihre Bestandteile Kollagen IV, Laminin, Heparansulfat, Proteoglykan und Fibronectin werden weitgehend vom Endothel selbst synthetisiert (Kramer et al., 1984; Tilling et al., 2002; Iivanainen et al., 2003; Lienau, 2003; Lienau et al., 2005). Auch die Produktion der Proteasen zum Abbau der Basalmembran wird durch die Endothelzellen durchgeführt. Die hierfür notwendigen Enzyme gehören zu dem Plasminogen Aktivator- und Matrix-Metalloproteinase-System (Mignatti und Rifkin, 1996).

Während der lokalen Matrixproteolyse **migrieren und invadieren Endothelzellen** in den nun zur Bildung neuer Gefäße kompatiblen interstitiellen Raum in Richtung des angiogenen Stimulus (Xu und Brooks, 2001) Hinter der Front der migrierenden Zellen erfolgt eine **Proliferation** von Endothelzellen, die zur Verlängerung des soliden endothelialen Stranges führt (Furcht, 1986). Ein ausschlaggebender Prozess hierbei ist die biochemische Kommunikation der aktivierten, das neue Gefäß formenden Endothelzellen mit der umliegenden Matrix. Diese dynamischen Interaktionen werden in erster Linie von Integrinen, welche Zelloberflächenrezeptoren für Adhäsionsmoleküle sind, moduliert (Hynes, 1992). Integrine vermitteln Signale, die das Überleben, die Proliferation, Differenzierung und Migration der Endothelzellen bestimmen (Gamble et al., 1993; Iivanainen et al., 2003).

Der nächste Schritt in der Kaskade ist die **Ausbildung des Lumens**. Verschiedene zelluläre Mechanismen führen zur Lumenisierung neuer Gefäße. Zum einen entstehen Lumina durch das kreisförmige Umbiegen der Endothelzellkörper und die anschließende Vereinigung der Zellenden, wodurch zentral ein Hohlraum umschlossen wird, welcher nur von einer Zelle gebildet sein kann (Paku, 1998). Bei einer anderen Variante erscheinen intrazellulär Vakuolen, deren Durchmesser zunimmt. Schließlich verschmelzen die Vakuolen. Über die Bildung des daraufhin entstehenden kontinuierlichen Lumens existieren unterschiedliche Theorien. Folkman und Haudenschild (1980) postulierten die Entstehung eines kontinuierlichen Lumens durch Vereinigung der Vakuolen benachbarter Endothelzellen, wobei das Lumen im Durchmesser nur von einer Endothelzelle begrenzt sein kann. Eine

andere Möglichkeit der Entstehung eines kontinuierlichen Lumens ist die Fusion der intrazellulären Vakuolen mit interzellulären Spalträumen (Meyer et al., 1997). Eine weitere Ausdehnung erfolgt durch Apoptose der Zellen im Zentrum des Sprosses sowie durch das Einschleiben von Endothelzellen zwischen diejenigen, die das Lumen bereits auskleiden (Meyer et al., 1997; Yang et al., 1999; Davis et al., 2000). Schließlich wird Lumenisierung auch durch einen rein apoptotischen Prozess beschrieben. Innerhalb des zunächst soliden Zellsprosses verlieren die zentral gelagerten Endothelzellen ihren Kontakt zur extrazellulären Matrix. Dieser Kommunikationsverlust leitet charakteristische Veränderungen des Zellkerns ein und die Zellen fallen der Apoptose anheim. Der daraufhin entstehende Raum, der zunächst mit Zelldetritus angefüllt ist, stellt das spätere Lumen dar (Peters et al., 2002; Fierlbeck et al., 2003).

Gleichzeitig proliferieren die in der neuen Spross-Formation befindlichen Zellen stark, jedoch nur die distal befindlichen. Die Endothelzellen an der Spitze solcher Sprosse sind nicht mitotisch. Darüber hinaus **verzweigen** sich die Kapillarspross-Spitzen, einige fusionieren durch Anastomose und bilden Schlingen aus. Ausgehend von der **Schlingenbildung** („Loop-Formation“) kommt es zum Sprossen neuer kapillarähnlicher Strukturen, die sich verzweigen und zu einem **Netzwerk** ausdehnen (Folkman, 1984). Die **Stabilisierung** und Maturation der jungen Gefäßstrukturen beinhaltet einen Proliferations- sowie Migrationsstop, des Weiteren wird die Produktion von Enzymen eingestellt. Daraufhin folgt der Aufbau der Basalmembran und des umliegenden interstitiellen Gewebes (Ausprunk und Folkman, 1977; Jain, 2003). Während der Stabilisierungsphase kommt es bei den meisten Gefäßen zur Anlagerung von Perizyten. Es wird angenommen, dass sie aus den glatten Muskelzellen des ursprünglichen Gefäßes rekrutieren oder aus Fibroblasten differenzieren bzw. aus Endothelzellen transdifferenzieren (Nicosia und Villaschi, 1999; Betsholtz et al., 2005). Ohne Stabilisierung der jungen Gefäße fällt das Endothel apoptotischen Vorgängen anheim (Benjamin et al., 1998).

Die sich daran anschließenden stoffwechselphysiologisch bedingten Umbauprozesse der Gefäßstrukturen, genannt **vaskuläres Remodeling**, umfassen zum einen Wachstum aber auch Regression sowie Veränderungen in der Dichte und Morphologie des Gefäßbaumes (Plendl und Sinowatz, 1999; Hughes und Chang-Ling, 2000) und weitere Veränderungen der Gefäßwand. Durch Zellhypertrophie, Zellproliferation, Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix sowie Apoptose wird das Gefäßsystem an den jeweiligen Bedarf adaptiert (Skalak und Price, 1996; Skalak, 2005).

2.4 Postnatale Blutgefäßbildung

Abgesehen von wenigen Ausnahmen ist im gesunden adulten Organismus die Umsatzrate des Gefäßendothels sehr gering. Physiologische Gefäßneubildung beim adulten Individuum ist außer im Haarfollikel nur im weiblichen Organismus und zwar bei der Entwicklung der Milchdrüse während der Gravidität, in der Plazenta, im Uterus und im Zuge der zyklischen Tätigkeit im Ovar zu finden. Alle anderen Formen der Neovaskularisation im adulten Organismus kommen im Verlauf von regenerativen (z.B. Wundheilung) oder pathologischen Prozessen vor (Folkman, 1971; Folkman, 1995; Plendl und Sinowatz, 1999; Plendl, 2000; Tamani und De Ambrogi, 2004). Dysreguliertes, überschießendes Gefäßwachstum trägt zur Pathogenese zahlreicher Krankheiten bei. Solide Tumoren sind die bekanntesten solcher Erkrankungen. Daneben spielt exzessive Angiogenese u.a. bei Schuppenflechte, Arthritiden, Retinopathien, krankhafter Adipositas, Asthma, Atherosklerose und Autoimmunopathien eine entscheidende Rolle (Carmeliet, 2003).

2.4.1 Angiogenese im Corpus luteum

Jedes Gewebewachstum über einen Durchmesser von einem Millimeter hinaus macht Gefäßbildung erforderlich. Die quantitativ stärksten physiologischen Neovaskularisationsprozesse setzen nach der Ovulation im Zusammenhang mit der Bildung des Gelbkörpers (Corpus luteum, CL) ein. Die angiogene Phase des Ovarialzyklus nimmt etwa ein Drittel der gesamten Zyklusdauer ein. Mehr als 50% der proliferierenden Zellen während der Gelbkörperanbildung sind Endothelzellen. Damit ist die Intensität des Gefäßwachstums im Corpus rubrum 5,5 mal stärker als im Glioblastoma multiforme, einem hochmalignen Tumor mit höchster angiogener Potenz (Augustin, 2000; Davis et al., 2003).

Die Angiogenese des Corpus luteum nach der Ovulation ist ein ausgezeichnetes Modell physiologischer Gefäßneubildung beim Adulten. Die Entwicklung der neuen Mikrozirkulation im sich entwickelnden Corpus luteum ist ein komplexer Prozess aus morphologischen, physiologischen und biochemischen Veränderungen, die bisher noch nicht exakt charakterisiert sind (Fraser und Wulff, 2003). Ein erster notwendiger Schritt hierfür ist der Abbau der Basalmembran, welche eine Grenzschicht zwischen der avaskulären Granulosazelllage und der Theca interna darstellt (O'Shea et al., 1980). Erst durch die Auflösung der Basalmembran ist ein Eintritt von Endothelzellen, sowie von Zellen aus der Theca, von Makrophagen und Fibroblasten in die Granulosazelllage möglich (Espey, 1980; Cavender und Murdoch, 1988).

In der frühen Phase der Entwicklung des Corpus luteum ist die ursprüngliche Follikelhöhle mit Liquorresten, Blutserum und Blutkoagula gefüllt, die später reabsorbiert werden. Unmittelbar nach der Ovulation wandern durch die Lücken der Basalmembran, ausgehend vom

Rand der Rupturstelle, Kapillarsprosse der Theca interna zentripedal in die Granulosazelllage ein. Ein bis zwei Tage nach der Ovulation sind vereinzelt sprossende Gefäße im Corpus luteum zu erkennen (Augustin et al., 1995).

Die meisten Gefäßsprosse befinden sich in der frühen **Anbildungsphase** im Zentrum der Einfaltungen im Bereich der Thecazelllage und wandern später in die Peripherie der Granulosazelllage ein (Zheng et al., 1993). Dann verzweigen sich die Kapillarsprosse in alle Richtungen, um die Luteinzellen zu versorgen (Nottola et al., 1997). Die Kapillarsprosse sind das Resultat von Migration und Proliferation der Endothelzellen (Forsman und McCormack, 1992). Sie zeigen ein intensives Wachstum innerhalb des ersten Zyklusdrittels (Augustin, 1995). Im Corpus luteum entsteht durch diese intensive und anhaltende Angiogenese ein feines Kapillarnetz. Man spricht von einem Corpus rubrum (Augustin et al., 1995).

Im **Stadium der Blüte**, am 9. Zyklustag, ist das Corpus luteum makroskopisch durch seine Gelbfärbung gekennzeichnet. Es hat seine maximale Größe und Kapillardichte erreicht. Das Kapillarnetzwerk ist heterogen verteilt. Neben wenigen Stellen mit geringer Kapillaranzahl, sind Stellen mit hoher Kapillardichte vorhanden (Zheng et al., 1993). Jede Luteinzelle steht in Kontakt mit 2-4 Kapillaren (Goede et al., 1998). Im Zustand der Blüte gehört der Gelbkörper zu den am stärksten vaskularisierten Geweben des Körpers (Smith et al., 1994).

Die Luteolyse führt zur **Rückbildung** sowie zur Volumenabnahme des Gelbkörpers und ist mit einer raschen Regression des Gefäßsystems verbunden (Goede et al., 1998). Im Vergleich zu anderen Zyklusstadien zeigen die Luteinzellen in der Rückbildung eine hohe Apoptoserate (Zheng et al., 1993).

2.5 Postnatale Vaskulogenese

Das Dogma, dass nach der Geburt neue Blutgefäße nur in Form von Angiogenese entstehen, galt bis spät in die 1990er Jahre hinein als allgemein anerkannt. Die Möglichkeit der postnatalen Neovaskularisation via Vaskulogenese wurde allenfalls nur peripher diskutiert. Die vergangenen Jahre jedoch führten zu beachtlichen neuen Erkenntnissen des Prozesses der Gefäßneubildung. Als Ergebnis einer Serie aktuellster Untersuchungen entstand das Konzept, dass adulte Neovaskularisation eine Kombination aus Vaskulogenese und Angiogenese darstellt (Drake, 2003; Schatteman und Awad, 2004).

Als Pioniere auf dem Forschungsgebiet der adulten Vaskulogenese gelten die Wissenschaftler Shi und Asahara. Shi et al. beschrieben 1994 das Phänomen der „fallout endothelialisation“. Arterielle Prothesen wurden nachweislich infolge zweier Mechanismen re-endothelialisiert. Zum einen sprosseten angrenzende, anastomosierende Gefäße ein und zum anderen wurden Endothelinseln, welche offenbar aus dem zirkulierenden Blut stammten, im Zentrum des Transplantats gefunden. 1997 isolierten Asahara et al. aus

humanem peripheren Blut mononukleäre Zellen, welche antigene Eigenschaften mit embryonalen Angioblasten teilten. Die intravenöse Applikation der isolierten und markierten Zellen in eine Maus mit einseitiger Ischämie des Hinterlaufs durch Ligatur der Arteria femoralis zeigte, dass die applizierten Zellen bis zu 25% an der Revaskularisation des ischämischen Gewebes beteiligt waren. 1998 konnten Shi et al. dokumentieren, dass die „fallout endothelialisation“ von Zellen initiiert wurde, die das gleiche antigene Profil zeigten, wie die Zellen aus der genannten Studie von Asahara (Asahara et al., 1997). Da das antigene Profil dieser zur Vaskularisierung befähigten Zellen dem der embryonalen Angioblasten glich, wurden diese Zellen „adulte endotheliale Progenitorzellen“ genannt. In einer Untersuchungsreihe, die Asahara 1999a publizierte, wurde an transgenen Mäusen aufgezeigt, dass endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark sowohl an physiologischer (Plazenta, Gelbkörper) als auch an pathologischer (Tumorstadium) bzw. pathophysiologischer (Wundheilung, Regeneration ischämischer Gewebe) Neovaskularisation beteiligt sind. Während der folgenden Jahre wiesen viele Studien darauf hin, dass im postnatalen Organismus Zellen existieren, welche durch Migration und Proliferation fähig sind, kapilläre Strukturen *de novo* zu generieren (Shi et al., 1994; Shi et al., 1998; Asahara et al., 1999b; Takahashi et al., 1999; Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000; Harraz et al., 2001; Kocher et al., 2001; Quirici et al., 2001; Orlic, 2002; Orlic, 2003; Orlic et al., 2003; Murga et al., 2004).

Anlässlich dieser zahlreichen Beweise wurde Anfang des neuen Jahrtausends anerkannt, dass endotheliale Vorläuferzellen im adulten Organismus existieren. In aktivierter Form migrieren und proliferieren sie, um am Ort ihrer Bestimmung zu Endothelzellen zu differenzieren. Endotheliale Vorläuferzellen sind nachweislich an der Neovaskularisation z.B. ischämischer Gewebe oder der verletzten Kornea, im Zuge der Wundheilung und beim Tumorstadium beteiligt. Der Prozess, durch den adulte Stammzellen oder Progenitorzellen differenzieren und *de novo* Gefäße generieren, wird **postnatale Vaskulogenese** genannt (Luttun et al., 2002; Asahara und Kawamoto, 2004).

2.5.1 Nomenklatur der Stamm- und Progenitorzellen

Stammzellen sind noch nicht ausdifferenziert. Das heißt, sie liegen noch nicht in einer Form vor, die sie für ihre Verwendung im Organismus spezialisiert, vielmehr ist ihre spätere Funktion noch offen. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation aus. Aus Stammzellen können durch mitotische Teilung weitere Stammzellen oder ausdifferenzierte Zellen hervorgehen.

Embryonale Stammzellen werden aus dem Blastozysten-Stadium von Embryonen gewonnen. Sie sind undifferenzierte Stammzellen, welche die Kapazität besitzen, sich selbst zu reproduzieren und sich über Vorläuferzellen in verschiedenen Zelltypen zu differenzieren

(Bishop et al., 2002). Embryonale Stammzellen werden in totipotente (lat. „zu allem fähig“), pluripotente (lat. „zu vielem fähig“) und multipotente (lat. „zu mehrerem fähig“) Zellen unterschieden (Weiss und Orkin, 1996; Wobus, 2001). Totipotente Zellen besitzen die unbegrenzte Kapazität sich in alle intra- und extraembryonale Gewebe und in alle postembryonale Gewebe und Organe zu entwickeln. Pluripotente Zellen dagegen können sich in alle Zelltypen, bis auf die Zellen der Plazenta, welche den sich entwickelnden Organismus versorgen, differenzieren und damit alleine keinen lebensfähigen Organismus ausbilden. Multipotente Stammzellen sind Zellen mit einem höheren Spezialisierungsgrad, die sich in Zellen mit einer bestimmten spezifischen Funktion differenzieren.

Mit der Entdeckung der adulten Stammzellen wurde die Nomenklatur deutlich komplexer. Während embryonale Stammzellen nur im frühen Embryo vorkommen, sind adulte Stammzellen im Organismus nach der Geburt vorhanden. Aus diesen Zellen werden während der gesamten Lebensdauer des Organismus neue Zellen gebildet. Es wurden bereits pluripotente adulte Stammzellen mit Keimblatt-übergreifendem Differenzierungspotential (Young et al., 2004) und multipotente adulte Stammzellen (Hämangioblasten) beobachtet (Gehling et al., 2000).

Eine Progenitorzelle (Vorläuferzelle) ist der Definition nach der Abkömmling einer Stammzelle. Sie weist einerseits hinsichtlich ihrer Teilungsfähigkeit noch Stammzeleigenschaften auf, ist aber andererseits bereits auf einen künftigen Funktionsbereich festgelegt (Blau et al., 2001). Die Bezeichnung „Progenitorzelle“ wird dennoch oft als Synonym für „Stammzelle“ verwendet.

Dementsprechend können Progenitorzellen pluripotent, multipotent (z.B. Hämangioblasten, gemeinsame Progenitorzellen der Endothelzellen, Astrozyten, Neuronen und epitheloiden Zellen bzw. mesenchymale Stammzellen), tripotent (z.B. gemeinsame Progenitorzellen der Knorpel-, Knochen-, und Fettzellen), bipotent (z.B. Adipofibroblasten bzw. gemeinsame Progenitorzellen der Knorpel- und Knochenzellen des Knochenmarks) und unipotent (z.B. Satellitenzellen, Adipoblasten) sein (Ailhaud et al., 1992; Grounds et al., 1992; Vierck et al., 1996; Warejcka et al., 1996; Prockop, 1998; Ratajczak et al., 1998; Jiang et al., 2002; Young et al., 2004).

Die Unterscheidung zwischen verschiedenen Typen von Stammzellen und Progenitorzellen im adulten Organismus wird zunehmend unübersichtlicher, seitdem bekannt ist, dass Zellen durch Dedifferenzierung bzw. Reprogrammierung auf ein ontogenetisch primitiveres Stadium zurückfallen und anschließend in mehrere Gewebearten differenzieren können (Bjornson et al., 1999; Blau et al., 2001; Toma et al., 2001; Hochedlinger et al., 2004; Wagner und Verfaillie, 2004).

Da auf dem Gebiet der Stamm- und Progenitorzellen derzeit sehr intensiv geforscht wird, ist die Nomenklatur der Zellen oft nicht eindeutig zu fixieren.

2.5.2 Herkunft und Charakterisierung endothelialer Vorläuferzellen im adulten Organismus

Während die meisten Zellen adulter Organe eine Komposition determinierter Zellen mit phänotypischen Merkmalen darstellen, adaptiert an das jeweilige Milieu des entsprechenden Organs, ruhen gleichzeitig unterschiedlich differenzierte Stamm- oder Progenitorzellen in verschiedenen Geweben. Unter Stimulation umgebungsbedingter Faktoren einer physiologischen Regeneration oder in bestimmten pathologischen Situationen können sie rekrutiert und mobilisiert werden. Im letzten Jahrzehnt wurden in vielen Geweben und Organen persistierende Stamm- und Progenitorzellen identifiziert, u.a. im Knochenmark, peripheren Blut, Gehirn, Leber, reproduktiven Organen, aber auch in Tumoren (Asahara et al., 1999a; Asahara et al., 2000; Carmeliet, 2001; Asahara und Kawamoto, 2004).

Der Term endotheliale Progenitorzelle beschreibt eine Gruppe von Zellen, die in vielen verschiedenen Stadien existiert und deren Spannweite sich vom Hämangioblast bis hin zur ausdifferenzierten Endothelzelle bewegt. In einer von Lin et al. im Jahr 2000 publizierten Arbeit, die den Titel „Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood“ trägt, wurde eindeutig bewiesen, dass in der Zirkulation mehr als eine endotheliale Progenitorzellspezies vorkommt. Lin und Mitarbeiter (2000) demonstrierten, wie aus isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes morphologisch und funktionell unterschiedliche Endothelzellpopulationen generierten. Sie spekulierten auf verschiedene Differenzierungsstadien unterschiedlicher putativer Progenitor-Subpopulationen (Lin et al., 2000).

Die endgültige Charakterisierung endothelialer Vorläuferzellen ist jedoch bis heute nicht geklärt und selbst in Expertenkreisen herrscht Uneinigkeit darüber, wie endotheliale Vorläuferzellen exakt identifiziert werden können und von welchen Zellen sie abstammen (Caplice und Doyle, 2005; Khakoo und Finkel, 2005).

2.5.3 Hämatopoietische Stammzellen

Ursprünglich wurden hämatopoietische Stammzellen als einzige mögliche Quelle endothelialer Vorläuferzellen angesehen (Schatteman und Awad, 2004). Ausgehend von der Annahme, dass endotheliale Progenitorzellen den adulten Phänotyp der bereits im Embryo charakterisierten (Häm-)Angioblasten darstellen, wurden Populationen mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut oder Knochenmark isoliert, welche antigene Epitope hämatopoietischer Stammzellen exprimieren.

Der Begriff Cluster of Differentiation, abgekürzt CD, bezeichnet Gruppen immunophänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. Bei den CD-Molekülen handelt es sich meistens um membrangebundene Glykoproteine, die teilweise zellspezifisch exprimiert werden und verschiedenste Funktionen haben können (Erber, 1990; Sopp und Howard, 1997).

Als charakteristische Antigene, welche hämatopoietische Stammzellen und endotheliale Progenitorzellen ko-exprimieren, wurden das Glykophosphoprotein CD34 und der Wachstumsfaktorrezeptor Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGF-R2, flk-1, KDR) herangezogen (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999a). CD34⁺/flk-1⁺-mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark oder Blut differenzierten *in vitro* unter selektiven Bedingungen zu reifen Endothelzellen bzw. wurden nach Infiltration in Loci ischämischer Gewebe in neu entstandene Gefäße inkorporiert (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999a). Anderen Arbeitsgruppen gelang es, unter Populationen solcher CD34⁺/flk-1⁺-mononukleärer Zellen Subpopulationen von Stammzellen zu identifizieren, die zusätzliche antigene Determinanten hämatopoietischer Stammzellen exprimieren. Dazu gehören beispielsweise die Epitope CD117/c-kit (Rind, Maus, Mensch), Sca-1 (Maus), CD133 (Mensch) und Angiopoietin Rezeptor 2 (Tie-2) (Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000; Quirici et al., 2001; Grant et al., 2002; Kritzenberger und Wrobel, 2004). Man ging von der Annahme aus, dass Progenitorzellen mit solchen Merkmalen multipotente hämatopoietische Stammzellen darstellen, die als gemeinsame Vorstufe hämatopoietischer und endothelialer Zellen auftreten.

Die endotheliale Determination dieser Stammzellen zeichnet sich in weiteren Entwicklungsstadien durch die Expression endothelzellspezifischer Oberflächenantigene (vWF, PECAM-1, Vascular Endothelial Cadherin/VE-Cadherin), die Fähigkeit zur Aufnahme von acetyliertem Low-Density Lipoprotein (acLDL), die Bindung für bestimmte Lektine und die Ausbildung endothelzelltypischer morphologischer Merkmale (tubuläre Strukturen) aus (Kalka et al., 2000). Eine Unterscheidung zwischen hämatopoietischen Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen ist damit möglich, jedoch ist die Trennung zwischen endothelialen Progenitorzellen und ausdifferenzierten Endothelzellen wegen des Fehlens eines spezifischen Epitops schwierig (Kalka et al., 2000; Rafii, 2000). Die Antigene CD34, flk-1, CD117 und Tie-2 sind nämlich sowohl in embryonalen Blutinseln, auf frühen embryonalen Endothelzellen, als auch auf aktivierten Endothelzellen mikrovaskulärer Gefäße im adulten Organismus nachzuweisen (Krause et al., 1996; Choi et al., 1998; Ziegler et al., 1999; Matsui et al., 2004).

Mit der Entdeckung des hämatopoietischen Stammzellmarkers CD133 (AC133, Prominin), eines Transmembran-Glykoproteins mit noch unbekannter Funktion, wurde bislang erstmals die Differenzierung humaner endothelialer Progenitorzellen des zirkulierenden Blutes bzw.

Knochenmarks zu ausgereiften Endothelzellen nachgewiesen (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997; Gehling et al., 2000). CD133-positive Zellen proliferieren unter selektiven Bedingungen non-adhärenent im Medium und können dazu stimuliert werden, in CD133-negative, mature, adhärenente Endothelzellen zu differenzieren. CD133-positive Zellen besitzen die Fähigkeit als Vorläuferzellen sowohl für Blut- als auch für Endothelzellen zu dienen. Damit schien der Beweis geschaffen, dass diese Zellen adulte Hämangioblasten repräsentieren (Bailey und Fleming, 2003; Asahara und Kawamoto, 2004; Schatteman und Awad, 2004; Yoder, 2004).

2.5.4 Myeloide Zellen

Auch Zellen der myeloiden Linie agieren als endotheliale Vorläuferzellen (Schmeisser et al., 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen spekulierten, dass in einer Untergruppe CD14-positiver Monozyten CD34-negative Angioblasten existieren (Fernandez-Pujol et al., 2000; Moldovan et al., 2000; Harraz et al., 2001; Schmeisser und Strasser, 2002). Solche Zellen vermögen unter proangiogenen Wachstumsbedingungen *in vitro* endotheliale, tubuläre Strukturen zu bilden. Das antigene Profil der Zellen entspricht zum einen dem der Endothelzellen (Expression spezifischer Endothelzellmarker), zusätzlich erscheinen aber auch Monozyten-spezifische Antigene an deren Oberfläche, wie z.B. CD68, CD80, CD45, CD36. Außerdem konnten funktionelle Eigenschaften des Endothels in diesen, aus Monozyten generierten Kulturen nachgewiesen werden, wie z.B. die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). *In vivo* Experimente bestätigten diese Ergebnisse, indem CD14⁺/CD34⁻ Monozyten bzw. Makrophagen in ischämischem Gewebe gefäßähnliche Kanäle ausbildeten (Moldovan et al., 2000). Darüber hinaus scheinen Subpopulationen zirkulierender Monozyten auch an der Regeneration von Muskelgewebe beteiligt zu sein. Aus diesem Grund kamen Zhao et al. (2003) zu der Annahme, dass bestimmte monozytäre Zellen des peripheren Blutes pluripotente Stammzellen sind (Zhao et al., 2003).

2.5.5 Multipotente adulte Progenitorzellen des Knochenmarks

Neben den hämatopoietischen Stammzellen enthält das Knochenmark Stammzellen für die Regeneration mesenchymaler Gewebe, wie z.B. Knochen, Knorpel, Muskel, Sehnen oder Fett (Tuan et al., 2003). Erst kürzlich trat die Erkenntnis, dass Endothelzellen auch von nicht-hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks abstammen könnten, in die Vorfront (Drake, 2003). Ähnlich wie bei der Isolierung hämatopoietischer Stammzellen, beruht der Ansatz, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark zu expandieren, auf der Markierung spezifischer Epitope (CD45⁻, Glykophorin-A⁻). Reyes et al. (2001) isolierten multipotente mesenchymale Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Diese Stammzellen besaßen das Potential, in verschiedene mesenchymale und neuroektodermale Phänotypen zu diffe-

renzieren. 2002 veröffentlichten Reyes et al. eine weitere Studie, worin der Verlauf der Determination dieser multipotenten, zunächst non-endothelialen Progenitorzellen (CD34⁻, Vascular Endothelial Cadherin⁻ (VE-cadherin), c-kit⁻, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin⁻, flk-1⁺, AC133⁺) aus dem Knochenmark dokumentiert wurde. *In vitro* differenzierten diese Zellen unter Exposition angiogener Faktoren erst zu Angioblasten (CD34⁺, flk-1⁺, VE-cadherin⁺) und schließlich zu murenen Endothelzellen. Diese exprimierten spezifische Marker (vWF, CD31, VCAM), nahmen acLDL auf, zeigten charakteristische funktionelle Eigenschaften und waren *in vivo* an der Neovaskularisation von Tumoren oder bei der Wundheilung beteiligt (Reyes et al., 2001; Reyes et al., 2002).

2.5.6 Side Population Cells

Eine alternative Variante, adulte Stammzellen anzureichern, wurde auf der Basis ihrer funktionellen Eigenschaften entwickelt. „Side Population Cells“ sind adulte Stammzellen, die im Knochenmark (Goodell et al., 1996; Jackson et al., 2001) und in anderen Geweben wie z.B. in der Skelettmuskulatur (Jackson et al., 1999; Guo et al., 2003) residieren. Der Begriff „Side Population Cells“ schließt mesenchymale bzw. stromale multipotente Stammzellen ein. Diese Stammzellen scheinen einen hohen Grad an Plastizität zu besitzen. Möglicherweise sind „Side Population Cells“ in vielen verschiedenen Geweben die am geringsten determinierten, also primitivsten Stammzellen (Alison et al., 2002; Parmar et al., 2003). Es wird spekuliert, dass „Side Population Cells“ eine Vorstufe hämatopoietischer Stammzellen sind, da sie zu endothelialen Progenitoren und zu myokardialen Zellen differenzieren können (Jackson et al., 2001). Frisch isoliert, d.h. ohne Substitution von Selektionsmedien, zeigen solche Zellen *in vitro* noch keine phänotypischen Merkmale einer Zellspezies (Guo et al., 2003). „Side Population Cells“ entwickeln einen speziellen zellulären Schutzmechanismus, der sie befähigt, toxische Metabolite und Xenobiotika auszuschleusen. Dieser Mechanismus beinhaltet die Expression eines ATP-bindenden Transportsystems. Hoechst33342 ist ein Stammzellmarker, der entwickelt wurde, um dieses Transportsystem nachzuweisen. Das sogenannte „Hoechst dye efflux Phänomen“ ist in weiteren Entwicklungsstufen dieser Zellen nicht mehr nachweisbar (Goodell et al., 1997; Alison et al., 2002; Guo et al., 2003).

2.5.7 In Geweben residierende pluripotente Stammzellen

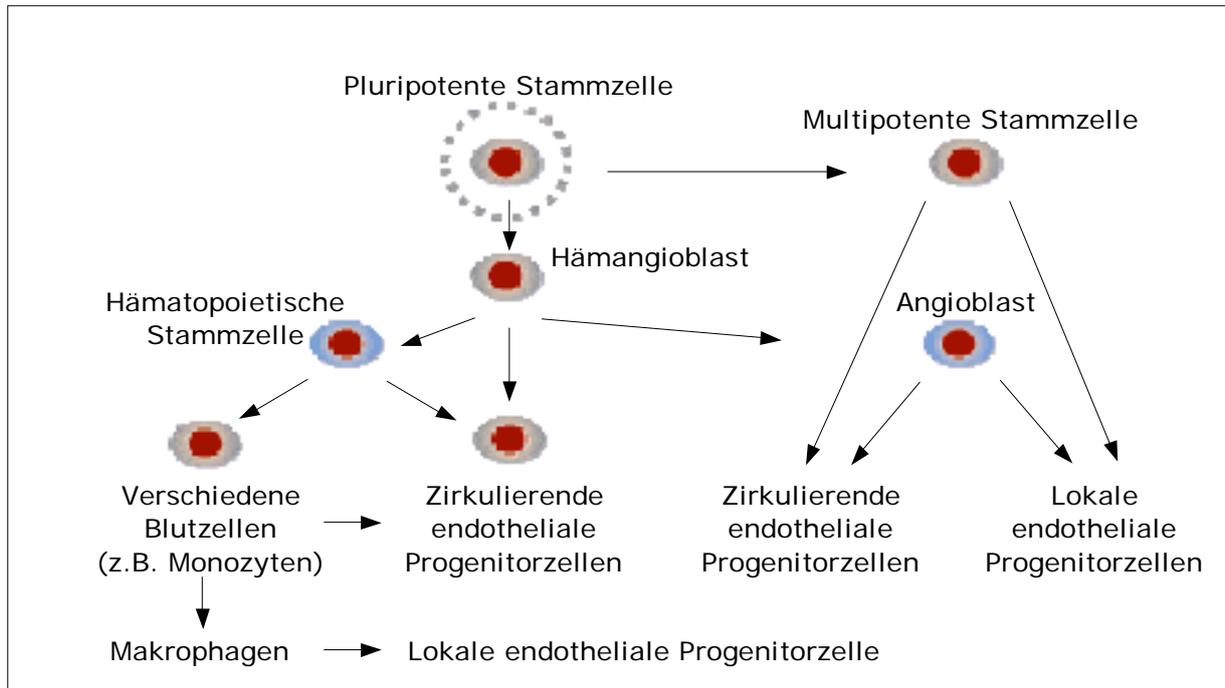
Während der pränatalen Entwicklung differenzieren die meisten Zellen ihrer Determination gemäß, um als mature Zellen Organe und Gewebe zu bilden. Einige bestimmte Zellen aber verlassen im Verlauf der Ontogenese dieses Kontinuum, um als „Reserve-Progenitoren“ zu dienen. Solche Zellen sind z.B. hämatopoietische Stammzellen im Knochenmark oder Satelliten-Myoblasten in der Skelettmuskulatur. Sie dienen zum Erhalt und zur Reparatur der

Gewebe. Diese Progenitoren sind determinierte Zellen, deren Differenzierungsvermögen auf bestimmte Gewebe limitiert ist. Young und Black postulierten in einer 2004 publizierten Studie, dass im adulten Organismus zwei Kategorien von „Reserve-Stammzellen“ persistieren: linien-untergeordnete Progenitorzellen und nicht-linien-untergeordnete pluripotente Stammzellen. Linien-untergeordnete Progenitorzellen können uni-, bi-, tri- und multipotente Zellen sein. Sie sind einem oder mehreren spezifischen Geweben untergeordnet. Young und Black (2004) identifizierten im Bindegewebe aller Organe verschiedener Altersgruppen und Spezies, einschließlich des Menschen, zwei Untergruppen primitiver, nicht-linien-untergeordneter, pluripotenter Stammzellen. Zunächst charakterisierte diese Arbeitsgruppe pluripotente mesodermale Stammzellen, die in 18 und mehr Phänotypen innerhalb der mesodermalen Linie differenzieren können. Darüber hinaus wurde die Existenz primitiver pluripotenter Stammzellen dargelegt, die über die Fähigkeit verfügen, in Progenitorzellen aller Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) zu differenzieren. Diese Zellen wurden als „Pluripotent-Epiblastic-like Stem Cells“ terminiert. Über in Geweben residierende Stammzellen, die Keimblatt-übergreifende Differenzierungspotenz besitzen, wurde in den letzten Jahren intensiv geforscht (Bjornson et al., 1999; Jackson et al., 1999; Clarke et al., 2000; Beltrami et al., 2003; Zhao et al., 2003; Hu et al., 2004; Oishi et al., 2004; Young und Black, 2004).

2.5.8 Das Ovar als Quelle adulter Stammzellen

Großes Aufsehen erregten neueste Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Bukovsky et al. (2004, 2005) und Johnson et al. (2004). Unabhängig voneinander wiesen sie die Existenz von Stammzellen im Ovar nach, aus denen neue Keimzellen im adulten weiblichen Organismus hervorgehen. Bukovsky et al. (2004, 2005) beschrieben multipotente, proliferative Stammzellen in der Tunica albuginea des postnatalen Ovars von Säugetieren, welche das Potential besitzen in Oozyten und Follikelzellen zu differenzieren. Diese Arbeitsgruppe demonstrierte, dass die Tunica albuginea mesenchymale, multipotente Stammzellen beherbergt, welche durch einen mesenchym-epithelialen Übergang chronologisch, *de novo* in primitive epitheloide Zellen differenzieren. Diese formieren sich in Zellcluster und migrieren dann in eine tiefere Schicht der ovariellen Cortex um daraufhin in Granulosazellen und Oozyten zu differenzieren. Da dieser Vorgang hormonstimuliert ist und von Östrogen abhängt, wird davon ausgegangen, dass die Differenzierung zu Granulosazellen und Oozyten gleichzeitig mit den höchsten Östrogenkonzentrationen in der präovulatorischen Phase einhergeht. Durch diese Ergebnisse wurde das Dogma, dass alle Oozyten adulter weiblicher Säugetiere in der fötalen Lebensspanne generieren und dort persistieren, ungültig. Die multipotenten, proliferativen ovariellen Stammzellen könnten als Progenitorzellen diverser Zelltypen dienen

oder nach Befruchtung zur Produktion totipotenter embryonaler Stammzellen eingesetzt werden (Bukovsky et al., 2004; Bukovsky et al., 2005).



Graphik A: Schematische Darstellung der Differenzierungs-Hierarchie adulter pluripotenter Stammzellen zu endothelialen Progenitorzellen.

2.6 Regulationsmechanismen des Gefäßwachstums

Vaskuläres Wachstum unterliegt im Rahmen physiologischer Bedingungen strikter Kontrolle. Dabei spielt die Balance verschiedener löslicher, stimulierender und inhibierender Faktoren, die para- oder autokrin auf die Gefäße wirken, die Schlüsselrolle. Diese Faktoren können direkt auf Endothelzellen wirken oder indirekt, indem sie zuerst andere Zellen aktivieren, die daraufhin Wachstumsfaktoren freisetzen. Gefäßwachstum stellt sich ein, wenn das Gleichgewicht zwischen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren zugunsten der ersteren verschoben wird. Im gegenteiligen Fall tritt Regression der Gefäße ein. Proangiogene Faktoren dienen auch dem Erhalt der Integrität der Gefäße (Pepper, 1997a; Pepper, 1997b; Carmeliet, 2001; Plendl et al., 2002a).

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Gefäßbildung in Tumoren zur Entgleisung der Regulationsmechanismen. Tumoren wachsen autonom. Sie besitzen die Fähigkeit lösliche Faktoren zu produzieren, die das Wachstum von Gefäßen kontinuierlich stimulieren, um den Nährstoff- und Sauerstoffbedarf des Tumors sicherzustellen (Folkman, 1971; Plendl et al., 1992b; Folkman, 1995; Plendl und Sinowatz, 1999).

Verschiedene Signale führen zur Freisetzung proangiogener Faktoren. Beispielsweise bewirken metabolische Reize wie Hypoxie, niedriger pH oder Hypoglykämie Gefäßwachstum. Außerdem lösen mechanische (erhöhter Blutdruck) oder immunologische bzw. inflammatorische Prozesse das Umschalten des ruhenden Endothels in eine aktivierte, angiogene Form aus. Als noch weitgehend ungeklärt gilt, in wieweit genetische Faktoren und Faktoren des umliegenden Gewebes Gefäßbildung und -wachstum beeinflussen (Kakizawa et al., 2004; Crivellato und Ribatti, 2005).

2.6.1 Regulation der Vaskulogenese während der Embryonal- und Fetalperiode

Bei der Aktivierung der **Vaskulogenese im Embryo** nehmen insbesondere der Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2, basischer FGF), sowie der Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) und seine Rezeptoren VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (KDR, flk-1) eine ausschlaggebende Rolle ein (Risau, 1995; Risau und Flamme, 1995; Flamme et al., 1997). FGF-2 wird von entodermalen Zellen sezerniert und bewirkt die Induktion des benachbarten Mesoderms (Riese et al., 1995; Cox und Poole, 2000; Faloon et al., 2000). Aktivierung und Signaltransduktion der mesodermalen FGF-Rezeptoren führen zur Differenzierung mesodermaler Zellen zu Angioblasten bzw. Hämangioblasten und deren Transkription des VEGF-R2 (Risau und Flamme, 1995; Wilting und Christ, 1996; Flamme et al., 1997). Kürzlich wurden weitere, an der vaskulären Induktion des Mesoderms maßgeblich beteiligte Faktoren nachgewiesen,

nämlich das Ephrin/Ephrin-Tyrosinkinase-Rezeptor (EphB4)-System und der Signalfaktor Indian Hedgehog (IHH). Die Expression dieser Faktoren erhöht signifikant die Proliferation von (Häm)-Angioblasten (Byrd et al., 2002; Wang et al., 2004).

Für die Determinierung mesodermaler Zellen zu Angioblasten gilt VEGF-R2 als der spezifischste und am frühesten exprimierte Marker und Mediator (Risau und Flamme, 1995; Nishikawa et al., 1998; Saha et al., 2004). Mit hoher Affinität bindet er den Liganden VEGF-A. Genetische (z.B. Scl-Tal1) und metabolische (z.B. Hypoxie) Faktoren im schnell wachsenden Embryo aktivieren die Expression des VEGF-A in Ento- und Mesoderm (Kotch et al., 1999; Ema et al., 2003; Gering et al., 2003; Moser et al., 2003). Infolge der VEGF-A-Exposition steigt die Anzahl der flk-1 Rezeptoren an der Oberfläche endothelialer Progenitoren (Miquerol et al., 1999). Bevor Angioblasten zu Endothelzellen differenzieren, migrieren sie gegen VEGF-A an den Ort ihrer Bestimmung. Obwohl mittlerweile nachgewiesen werden konnte, dass auch das VEGF-A/flk-1-System an der Determinierung des Mesoderms beteiligt ist (Baron, 2003; Ema und Rossant, 2003), scheint seine Hauptaufgabe aber eher im Bereich der Expansion und Migration der Angioblasten, deren Differenzierung zu Endothelzellen und am Erhalt der Integrität des Endothels zu liegen (Ferrara, 1999; Hidaka et al., 1999; Schuh et al., 1999; Vokes und Krieg, 2002). Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass das VEGF-A/flk-1-System für die normale embryonale Gefäßentwicklung existenziell ist (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Untersuchungen an flk-1-defizienten Mäusen zeigten, dass Vaskulogenese ausbleibt und weder im Embryo noch im Dottersack Blutinseln entstehen. Solche Embryonen sterben zwischen Tag 8,5 und 9,5 (Shalaby et al., 1995). VEGF-R1 ist der kompetitive Inhibitor des VEGF-A/flk-1-Systems. Mit hoher Affinität bindet er VEGF-A und gewährleistet damit kontrollierte Proliferation und organisierte Gefäßmorphologie (Drake und Little, 1995; Fong et al., 1999). Neben weiteren Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem Transforming Growth Factor (TGF) sind auch die extrazelluläre Matrix und zelluläre Adhäsionsmoleküle in die Gefäßbildung involviert (Patan, 2000).

2.6.2 Regulation der Vaskulogenese im adulten Organismus

Über die Mechanismen, welche die **adulte Vaskulogenese** kontrollieren, ist noch wenig bekannt. Es wurde beobachtet, dass die Anzahl an endothelialen Progenitoren im zirkulierenden Blut in bestimmten pathologischen Situationen wie kardiomyogenen Ischämien, arterieller Verschlusskrankheit, Inflammation und Wundheilungsprozessen enorm und schnell ansteigt (Asahara et al., 1999a; Lee et al., 2000; Shintani et al., 2001; Lutun et al., 2002). Diese Prozesse gehen mit signifikanter Hochregulation von endogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und Stroma Cell Derived Factor-1 (SDF-1) einher. Im Knochenmark aktivieren diese Faktoren hämatopoietische Stammzellen zur Expression von Proteinase, wie z.B. Elastase,

Cathepsin-G und Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) (Pillarsetti und Gupta, 2001; Papayannopoulou, 2004). Dadurch werden zwei Mechanismen initialisiert. Zum einen lösen sich die über Integrine kommunizierenden Bindungen zwischen Stroma- und Stammzellen. Zum anderen wird durch MMP-9 die Transformation des membrangebundenen Kit-Liganden (KitL, Stem Cell Factor, SCF) zu einem löslichen Kit-Liganden eingeleitet. Durch die Bindung an seinen Rezeptor c-kit (CD117, KIT) transferieren ruhende (c-kit-positive) Stamm- und Progenitorzellen, inklusive hämatopoietische und angioblastische Progenitorzellen des Knochenmarks in einen proliferativen Status und migrieren in die Zirkulation. Die Interaktion des Kit-Liganden mit seinem Rezeptor ist essentiell für die Proliferation, Migration, Differenzierung und den Schutz vor Apoptose der Stamm- und Progenitorzellen zahlreicher Gewebe, beispielsweise der Blutzellen, Endothelzellen, Melanozyten, Keimzellen und interstitiellen Zellen (Heissig et al., 2002; Heissig et al., 2003).

Auch die Administration weiterer Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF-2 (Kalka et al., 2000), Angiopoietin (Hattori et al., 2001), Erythropoietin (Heeschen et al., 2003; Bahlmann et al., 2004), Thrombopoietin (Tordjman et al., 1999), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) (Takahashi et al., 1999; Gehling et al., 2000) scheint zur Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark beizutragen.

VEGF-A ist einer der Schlüsselfaktoren in der Kinetik adulter endothelialer Vorläuferzellen des Knochenmarks. Seine Präsenz steuert die Rekrutierung von flk-1 und Neuropillin-1-exprimierenden Stammzellen des Knochenmarks auf verschiedenen Ebenen (Peichev et al., 2000; Tordjman et al., 2001; Rabbany et al., 2003). Durch Bindung an seine Rezeptoren bewirkt VEGF die Proliferation und Migration der Stammzellen. Chemotaktisch dirigiert der Faktor diese Zellen in Richtung Blutzirkulation. VEGF ermöglicht den Übertritt vom Knochenmark-Kompartiment in die Gefäße durch Beeinflussung der Permeabilität der Knochenmark-Blutbarriere (Naiyer et al., 1999; Bautz et al., 2000; Carmeliet, 2001). Letztendlich gewährleistet VEGF im Synergismus mit Angiopoietin-1/-2 die Überlebensfähigkeit hämatopoietischer Stammzellen (Hattori et al., 2001).

Erst kürzlich wurde beobachtet, dass Östrogene ruhende endotheliale Progenitorzellen mobilisieren und zur Neovaskularisation anregen (Iwakura et al., 2003; Strehlow et al., 2003; Sugawara et al., 2005). Östradiol, dessen Sekretion im präovulatorischen Ovar sein Maximum erreicht, induziert endotheliale Progenitorzellen zur Proliferation und Migration und schützt diese Zellen vor apoptotischem Untergang. Iwakura et al. (2003) propagierte, dass Östradiol sogar eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung vaskulärer Vorläuferzellen spielt und der Serumöstradiolspiegel signifikant mit der Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen korreliert.

In Regionen, in denen Gefäßneubildung in Form adulter Vaskulogenese stattfindet, vermögen endotheliale Progenitorzellen ein angiogenes Umfeld zu schaffen. Sowohl hämatopoietische Stammzellen als auch endotheliale Progenitorzellen sezernieren die Angiogenesefaktoren VEGF und Placental Growth Factor (PlGF), insbesondere wenn sie durch Zytokine, z.B. GM-CSF, stimuliert werden. Dadurch veranlassen sie z.B. beim myokardialen Infarkt die sprossende Angiogenese der um das Infarktgebiet residierenden muren Endothelzellen (Bautz et al., 2000; Carmeliet, 2001; Kocher et al., 2001).

Die Identität und das Zusammenspiel der Signale, welche die Differenzierung der Stammzellen bzw. eine Determinierung der Hämangioblasten zu hämatopoietischen Stammzellen oder Angioblasten einleiten, ist noch weitgehend unbekannt. Es wird spekuliert, dass die Linienzuordnung beim Übertritt in die Blutbahn festgelegt wird. Des Weiteren ist bis heute auch noch nicht geklärt, welche Faktoren das „Homing“ der Progenitoren lenken. Möglicherweise sind angiogene Wachstumsfaktoren der Peripherie beteiligt. Neueste Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) und Adhäsionsmoleküle diesen Prozess beeinflussen (Hristov et al., 2003; Schatteman und Awad, 2004).

2.6.3 Regulation der Angiogenese

Die **Angiogenese** ist ein kaskadenartiger Prozess, bei dem aus bereits bestehenden Kapillaren neue Blutgefäße sprossen und sich konfigurieren. Dabei ist ein Sortiment aus löslichen Wachstumsfaktoren, Enzymen, Liganden und Oberflächenrezeptoren involviert. Diese Faktoren agieren synergistisch oder ergänzen sich in ihrer Wirkung. Die wichtigsten, das Endothel spezifisch regulierenden Faktoren sind VEGF und die Angiopoietine (Ang). Beide spielen separate, aber essentielle Rollen bei der Angiogenese, zusammen potenziert sich ihre Wirkung (Yancopoulos et al., 2000; Li et al., 2003). Derzeit sind vier Angiopoietinisoformen bekannt (Ang-1 bis Ang-4), alle binden an den Rezeptor Tie-2 (Tyrosin-Kinase with Immunglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domain), welcher nur auf Endothelzellen exprimiert wird (Dumont et al., 1992). Für den Tie-1-Rezeptor, der mit Tie-2 sehr nah verwandt ist und ebenfalls nur von Endothelzellen exprimiert wird, wurde bislang kein bekannter Ligand identifiziert. Ang-1 und Ang-2 binden an Tie-2, aber nur Ang-2 vermag die Phosphorylierung des Rezeptors hervorzurufen. Ang-1 scheint der natürliche Antagonist von Ang-2 zu sein (Maisonpierre et al., 1997; Procopio et al., 1999).

Die Angiogenese wird neben endothelzellspezifischen auch von Faktoren moduliert, die andere Zielzellen anregen (z.B. Entzündungszellen). Der bedeutendste Vertreter dieser Faktoren ist FGF. Die Familie der FGF zählt 20 Homologe, wovon der FGF-1 (acidic FGF) und der FGF-2 (basic FGF) bevorzugt am Ablauf der Angiogenese beteiligt sind (Folkman und Shing, 1992; Friesel und Maciag, 1995). Von Endothelzellen selbst produziert, wirken beide in parakriner Weise hoch mitogen. Sie unterstützen die Proliferation, Differenzierung und Motilität

der Endothelzellen (Nakamura et al., 2001). FGFs regen außerdem die Expression von Proteasen und Integrinen an, welche die zelluläre Migration ermöglichen. Vier Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wurden bisher beim Menschen gefunden, wovon nur FGFR-1 und FGFR-2 von Endothelzellen exprimiert werden (Sepp et al., 1994; Gualandris und Presta, 1995).

Schließlich existiert eine Gruppe von Angiogenesestimulatoren, die nicht direkt auf Endothelzellen wirken, sondern diese sowie andere Zellen (Tumorzellen, Entzündungszellen) zur Sekretion von Angiogenesefaktoren (u.a. VEGF, FGF, Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) aktivieren (Kim et al., 2001). Am besten beschrieben wurden bisher der Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) und der Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Der Effekt dieser beiden Faktoren *in vitro* und *in vivo* ist widersprüchlich. Während die *in vitro*-Angiogenese unter ihrem Einfluss gehemmt wird, wirken diese Faktoren *in vivo* angiogen (Sanchez-Elsner et al., 2001).

2.6.4 Bedeutung des VEGF und seiner Rezeptoren bei der Gefäßbildung

Der **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** ist in erster Linie als ein endothelspezifisches Mitogen bekannt. Zahlreiche Studien lassen aber darauf schließen, dass sein mitogener Effekt auch auf bestimmte, nicht-endotheliale Zellen wirkt (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001). Indem VEGF die zytoplasmatische Calciumkonzentration von Endothelzellen erhöht, wird eine Veränderung der zytoskeletalen Morphologie herbeigeführt, die eine Mitose und Migration induziert (Carmeliet, 2000). Im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren stimuliert VEGF nicht nur das Gefäßwachstum, sondern erhöht auch die Gefäßpermeabilität. Daher wird der VEGF auch als Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet.

Der Transport von Metaboliten wird zum einen infolge einer Aktivierung intrazellulärer vesikulo-vakuolärer Organellen beschleunigt und zum anderen bewirkt VEGF die Degradation interzellulärer Kontakte (Kohn et al., 1992; Kevil et al., 1998). Durch VEGF aktiviert, produziert das Endothel Proteasen und Kollagenasen, wodurch Komponenten der extrazellulären Matrix dissoziieren und die Invasion der Endothelzellen in das umliegende Gewebe ermöglichen (Pepper, 1997a). Eine weitere Aufgabe des VEGF ist der Erhalt der Integrität der Endothelzellen und somit der vaskulären Strukturen im Sinne eines „survival factor“. Auf verschiedenen Wegen inhibiert VEGF die Apoptose endothelialer Zellen (Gerber et al., 1998; Benjamin et al., 1999). *In vitro* schützt VEGF Endothelzellen unter serumreduzierten Bedingungen vor Apoptose, indem es den Phosphatidyl-Inositol-Kinase-Apparat aktiviert. *In vivo* regt VEGF-Exposition die Expression anti-apoptotischer Proteine an und steuert die Perizyten-Adhäsion um Gefäße. Bei der Mobilisierung endothelialer und hämatopoietischer Progenitorzellen wirkt VEGF proliferativ und chemotaktisch (Hattori et al., 2001).

Zur VEGF-Genfamilie zählen derzeit sieben Mitglieder: VEGF-A (VEGF), VEGF-B/VRF (VEGF Related Factor), VEGF-C/VRP (VEGF Related Protein), VEGF-D/FIGF (VEGF C-Induced Factor), VEGF-E/NZ7, PIGF (Placental Growth Factor), EG-VEGF (Endocrine Gland-VEGF). Außerdem sind VEGF-A-Homologe im Genom des Parapox-Orf Virus identifiziert worden, die ähnliche Aktivität wie VEGF aufweisen. Das VEGF-A-Gen ist in acht Exons organisiert, welche durch sieben Introns zergliedert werden können. Von VEGF-A sind sechs alternative Spliceformen bekannt. Entsprechend der Aminosäureanzahl werden diese Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ benannt. Davon ist VEGF₁₆₅ die dominierende sezernierte Isoform (Papetti und Herman, 2002; Ferrara et al., 2003; Ferrara et al., 2004; Machein und Plate, 2004).

VEGF-A bindet an zwei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren: **VEGF-R1 (flt-1)** und **VEGF-R2 (KDR, flk-1)**.

VEGF-R1 bindet nicht nur VEGF-A, sondern auch VEGF-B und PIGF, welche nicht an den VEGF-R2 binden. Die lösliche Form von VEGF-R1 (soluble-flt-1) inhibiert die Funktionen des VEGF-A. Dieser Rezeptor beeinflusst die Wirkung von VEGF-A auf das Endothel, indem er die Bindung an VEGF-R2 kompetitiv hemmt. Embryonal ist VEGF-R1 für eine kontrollierte Organisation des Endothels verantwortlich, indem exzessive Proliferation verhindert und damit die Entstehung geordneter tubulärer Strukturen ermöglicht wird. Die Signaltransduktion durch den aktivierten VEGF-R1 scheint auch für die Hämatopoese und die Rekrutierung hämatopoietischer Stammzellen aus dem Knochenmark wichtig zu sein. Durch Aktivierung der Expression gewebespezifischer Wachstumsfaktoren weist VEGF-R1 einen indirekten mitogenen Effekt auf (Ferrara et al., 2003).

Heutzutage gilt als erwiesen, dass der **VEGF-R2** für die Gefäßbildung und Hämatopoese sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus die Schlüsselposition einnimmt. Die Bindung von VEGF-A an diesen Rezeptor führt zu mitogenen, chemotaktischen und anti-apoptischen Signalen in Endothelzellen. Außerdem zeigt das VEGF-A/flk-1-System den größten Einfluss auf die Permeabilität der Gefäßwand (Gille et al., 2001; Cross et al., 2003).

Die Bedeutung von **Neuropilin (NRP1 und NRP2)** als VEGF-Rezeptor ist noch nicht gänzlich geklärt. Neuropilin steigert die Bindungsaffinität von VEGF₁₆₅ an Zellen, die VEGF-R2 und Neuropilin koexprimieren (Neufeld et al., 2002).

2.6.4.1 Die Rolle des VEGF und seiner Rezeptoren im Corpus luteum

Bei der Anbildung des Corpus luteum spielt VEGF eine wichtige Rolle (Redmer und Reynolds, 1996; Fraser und Wulff, 2003). Ein Antikörper gegen VEGF hemmt nicht nur den migrationsfördernden Effekt auf Endothelzellen, sondern führt zu einer vollständigen Hem-

mung der Angiogenese und somit auch zur Hemmung der Entwicklung des Corpus luteum (Ferrara et al., 1998; Wulff et al., 2001; Zimmermann et al., 2001).

Höchste Werte von VEGF-mRNA sind in Corpora lutea in der Anbildung zu finden. Insbesondere 1-2 Tage post ovulationem ist VEGF vorrangig in Luteinzellen nachzuweisen. Von Luteinzellen freigesetzt, initiiert er auf parakrinem Weg angiogene Prozesse im sich heranzubildenden Corpus luteum (Berisha et al., 2000). Seine Rezeptoren flt-1 und KDR sind sowohl in Luteinzellen als auch in Endothelzellen lokalisiert (Sugino et al., 2000).

Im Verlauf von der Anbildung bis zur Rückbildung des Corpus luteum werden flt-1 und KDR auf konstantem Level exprimiert. Demgegenüber erreicht die KDR-Expression 3 Tage post ovulationem ihr Maximum (Berisha et al., 2000).

VEGF ist im Thecagewebe, in der glatten Muskulatur von Arterien sowie in Perizyten des Gelbkörpers zu finden. VEGF wird im präovulatorischen Gewebe nicht in der Granulosa-, sondern in der Thecazellschicht gefunden (Reynolds und Redmer, 1998).

Jüngste Untersuchungen indizieren, dass EG-VEGF, ein neuer selektiver Angiogenesefaktor ist, der bei der Regulation der Angiogenese im Ovar zusammen mit VEGF eine kooperative Rolle spielt (LeCouter et al., 2001). EG-VEGF ist strukturell nicht mit VEGF verwandt, zählt aber zur gleichen Genfamilie (LeCouter et al., 2002). Im Corpus luteum tritt eine sequenzartige Expression beider Gene auf. Während VEGF, wie bereits beschrieben, in der frühen Phase des sich entwickelnden Corpus luteum intensiv exprimiert wird, sinkt seine Expressionsrate zur Mitte des Zyklus hin. Dagegen wird EG-VEGF erst etwas später als VEGF exprimiert und die Intensität seiner Expression persistiert über die Mitte des Zyklus hinweg (Ferrara et al., 2003; Ferrara et al., 2004).

2.6.5 Die Rolle von Zelladhäsionsmolekülen bei der Gefäßentwicklung

Die systematische Organisation der Endothelzellen in ein ausgereiftes kardiovaskuläres System ist das Resultat einer komplexen Serie von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Die Interaktionen werden von **Zelladhäsionsmolekülen** (CAMs) gelenkt. Zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle zählen Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie, Integrine, Cadherine und Selektine.

2.6.5.1 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31)

PECAM-1 (CD31) ist ein Transmembran-Glykoprotein und Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie (Ig-CAM). Als in erster Linie endothelzellspezifisches Adhäsionsmolekül ist es vorwiegend an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Geringere Expression konnte auch an Stammzellen des Knochenmarks, Leukozyten, T-Lymphozyten, Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden (Robson, 2001). PECAM-1 ist an der Entwicklung des primären vaskulären Plexus aus embryonalen Blutinseln beteiligt. Im

Verlauf der Differenzierung von Angioblasten zu Endothelzellen zeigt sich PECAM-1 als erstes nachweisbares Adhäsionsmolekül an der Oberfläche der Endothelzellen (Pinter et al., 1997; Drake und Fleming, 2000). Während der Ontogenese spielt die Präsenz von PECAM-1 zunächst aber nicht nur für Endothelzellen eine Rolle, sondern offenbar für die meisten, nicht differenzierten embryonalen Stammzellen. Einige Studien zeigten, dass die Zellen der inneren Zellmasse in der embryonalen Blastozyste PECAM-1 an ihren intrazellulären Domänen exprimieren (Drake und Fleming, 2000; Robson, 2001; Furusawa et al., 2004). Von diesen Zellen stammen die nicht-differenzierten embryonalen Stammzellen ab. Da PECAM-1 bei den nicht-differenzierten embryonalen Stammzellen ausschließlich an den Zellgrenzen lokalisiert ist, geht man davon aus, dass das Molekül zu diesem frühen Zeitpunkt dazu dient, die Formation des Zellclusters zu stabilisieren, um den pluripotenten Charakter der Zellen zu garantieren. Diese Erkenntnis bestätigte sich auch in *in vitro* Untersuchungen. Die Gruppe um (Li et al., 2005) fand, dass undifferenzierte, murine embryonale Stammzellen Zellcluster bildeten. Bis zu 95% der undifferenzierten Zellen innerhalb der Cluster exprimierten PECAM-1. Während der folgenden Differenzierungsschritte war die Expression von PECAM-1 zunächst rapide herunterreguliert. Danach folgte wieder die Zunahme der PECAM-1-mRNA-Expression innerhalb dieser Zellen. Bei Zugabe angiogener Faktoren organisierten sich bis zu 70% der embryonalen Stammzellen in ein Netzwerk vaskulärer Strukturen, welche PECAM-1 exprimierten.

PECAM-1 nimmt verschiedene Funktionen in der Zirkulation ein, wie z.B. Aktivierung von Immunreaktionen, Emigration von Leukozyten, T-Zell-Aktivierung, Blutplättchenaggregation, Hämostase und Erhalt der Barrierefunktion des Endothels (Thompson et al., 2000; Patil et al., 2001).

Interzelluläre Kontakte kann PECAM-1 mit homologen, aber auch mit anderen Molekülen aufbauen, u.a. mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen, heparinhaltigen Proteoglykanen und CD38 (Wong et al., 2000). Im ruhenden Endothel dienen PECAM-1-PECAM-1-Interaktionen der Stabilität endothelialer Zellkontakte. Stabilisierend agieren auch die intrazellulären Domänen von PECAM-1, die eine Anzahl verschiedener zytosolischer Moleküle aktivieren können. Beispielsweise fördert PECAM-1 die Bindungspotenz von Cateninen an das Zytoskelett (Ilan et al., 1999). Im Falle eines angiogenen Stimulus vollzieht sich eine Umverteilung der PECAM-1-Moleküle an der endothelialen Oberfläche. PECAM-1 beeinflusst hierbei positiv die Motilität aktivierter Endothelzellen, vermutlich durch eine Modifikation der Bindung anderer, mit der extrazellulären Matrix assoziierten Adhäsionsmoleküle, z.B. Integrine (Cao et al., 2002). PECAM-1 steuert ein organisiertes Aneinandergliedern der proliferierenden und migrierenden Zellen während der Gefäßbildung in funktionsfähige endotheliale Kanäle. *In*

vitro ist PECAM-1 an der Ausbildung lumenisierter, netzartiger Strukturen aus Endothelzellen beteiligt (Yang et al., 1999).

2.6.5.2 Integrine

Integrine sind eine Familie heterodimerer Transmembranproteine. Sie bestehen aus α und β Untereinheiten, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die spezifische Kombination von α und β Untereinheiten bestimmt den Liganden, der gebunden wird. Obwohl einige der Integrine mit mehreren Liganden kommunizieren können, übermittelt jedes seine individuelle Information. Derzeit sind 18 α und 8 β Untereinheiten bekannt, woraus über 24 unterschiedliche Integrine entstehen können. Im Kontext der Morphogenese von Gefäßstrukturen wurde die Rolle der α_v und β_1 -Integrine bisher am intensivsten untersucht. Mittels Integrin-Adhäsionsmolekülen sind Endothelzellen in der extrazellulären Matrix verankert. Die Assoziation der Integrine mit ihren Liganden kann zu Proliferation, Differenzierung, Migration und Aktivierung der Genexpression von Endothelzellen führen (Robson, 2001; Iivanainen et al., 2003; Patan, 2004).

Das **$\alpha_v\beta_3$ -Integrin (CD51/61)** kann mit verschiedenen Liganden (von Willebrand Faktor, Vitronektin, Fibronektin, Fibrin) interagieren. Für die Gefäßbildung im prä- und postnatalen Organismus ist die Funktion des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins notwendig. Embryonal wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vor und während der Vaskulogenese auf Angioblasten intensiv exprimiert (Rupp et al., 2004). An α_v -knock out Mäusen konnte demonstriert werden, dass ausbleibende $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Produktion im frühen Entwicklungsstadium zu abnormalem Gefäßwachstum führt. Dieses ist durch diskontinuierliche Lumina und lückenhafte vaskuläre Netzwerke gekennzeichnet. 80% solcher Embryonen sterben *in utero* (Hynes et al., 1999). *In vitro* bewirkt CD51/61 die Adhäsion der Endothelzellen, ihre Migration und die Lumenbildung endothelialer Stränge (Bayless et al., 2000; Leu et al., 2002; Nisato et al., 2003). Angiogenesefaktoren, wie z.B. bFGF oder VEGF, fördern die Expression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins (Enaida et al., 1998). Die pro-angiogene Wirkung der genannten Faktoren scheint von der Präsenz des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins abhängig zu sein. Unter einer Blockade dieses Integrins bleibt der Vorgang des endothelialen Sprossens aus, es entstehen keine neuen Gefäße. Die bereits bestehenden Gefäße bleiben dabei aber unbeschadet (Brooks et al., 1994; Liu et al., 2003). Die Rolle des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins bei der Angiogenese ist nicht nur auf die Adhäsion der Endothelzellen an extrazelluläre Matrixkomponenten begrenzt. CD51/61 geht eine Bindung mit Matrix-Metalloproteinase-2 ein, die dadurch aktiviert wird. Besonders an den distalen Enden neu entstehender Kapillarsprosse lokalisiert, reguliert das CD51/61-Integrin gezielte Degradation der extrazellulären Matrix und ermöglicht die Invasion und Adhäsion der migrierenden, angiogenen Endothelzellen (Clark et al., 1996).

Indem CD51/61 die Aktivierung von VEGF-R2 induziert, erweist es auch indirekt mitogene Effekte im Rahmen der Bildung neuer Gefäße (Soldi et al., 1999; Masson-Gadais et al., 2003). Letztendlich unterbindet CD51/61 das Vorkommen von Apoptosen und dient somit dem Erhalt der Endothelzellen (Meerovitch et al., 2003).

Integrine der **β 1-Familie (CD29)** sind Rezeptoren für Kollagen I und IV, sowie für Laminin Fibronectin und Vitronectin der extrazellulären Matrix. Außerdem spielen einige β 1-Integrine auch eine Rolle bei der interzellulären Adhäsion (Haas und Plow, 1994). VEGF und β 1-Integrine kollaborieren insbesondere bei der Angiogenese von Mikrogefäßen in der Haut. Haptotaktisch lotst β 1-Integrin sprossende und migrierende Endothelzellen durch die kollagenreiche interstitielle Matrix in Richtung des chemotaktischen Signals VEGF. β 1-Integrin scheint auch bei der Signaltransduktion von VEGF eine Rolle zu spielen. Unter Blockade des Integrins ist die angiogene Potenz des VEGF, insbesondere das Auslösen von Sprossung und Proliferation, um 70% reduziert (Bloch et al., 1997; Cenni et al., 2001; Senger et al., 2002).

β 1-Integrine sind schon in der frühen Phase der Gefäßentwicklung von großer Bedeutung. Obgleich ihre Präsenz weder Einfluss auf die Determination mesodermaler Zellen zu Angioblasten noch auf die Differenzierung von Angioblasten zu Endothelzellen nimmt, hat sie große Bedeutung bei den folgenden morphologischen Stadien der Gefäßbildung. Unter einer Blockade des β 1-Integrins bleibt die Ausbildung vaskulärer lumenisierter Strukturen im Embryo aus (Drake et al., 1992; Brakebusch et al., 1997). Gleiches zeigt sich bei *in vitro* Untersuchungen der Angiogenese von Endothelzellen aus der Nabelschnur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC). β 1-Integrine scheinen in zwei Phasen der angiogenen Kaskade unabdingbar zu sein: sowohl bei der Migration der Endothelzellen zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen als auch bei der Entstehung von Vakuolen, die schließlich zu einem Lumen konfluieren, ist der Effekt von CD29 essentiell (Kubota et al., 1996; Gamble et al., 1999).

Eine Elimination aller β 1-Integrine in knock-out Mäusen verursacht embryonalen Tod noch vor der Implantation und Gastrulation (Stephens et al., 1995).

2.7 Heterogenität des Endothels

Weit davon entfernt einen Monolayer aus einer homogenen Zellpopulation darzustellen, repräsentiert das vaskuläre Endothel ein Konsortium kleiner, in den verschiedenen Geweben und Organen lokalisierter Untereinheiten (Aird, 2003). Vielfach wurde bereits dokumentiert, dass Endothelzellen eine ausgesprochen heterogene Zellpopulation bilden. Innerhalb aller

Segmente des Gefäßbaumes variieren Phänotypen endothelialer Zellen in Struktur und Funktion, metabolischen Eigenschaften sowie der Expression von Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren (Thorin und Shreeve, 1998). Die spezifischen Charakteristika hängen ab von Spezies, Subspezies, Geschlecht, Entwicklungsphase und Organ. Endothelzellen unterscheiden sich sogar innerhalb eines Organs oder Gefäßbettes (Plendl et al., 1992a; Plendl et al., 1992b; Plendl et al., 1993; Plendl, 1997). Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Heterogenität der Endothelzellen vom embryonalen Ursprung, dem genetischen Profil und den Einflüssen des umliegenden Gewebes ausgeht (Ribatti et al., 2002; Aird, 2003). Die präzise Kenntnis der gewebe- und organspezifischen Heterogenität im Sinne eines „Profiling“ der Endothelzellen würde die Möglichkeit eröffnen, sich bei therapeutischen Eingriffen gezielt auf bestimmte gefäßbettspezifische biologische Eigenschaften des Endothels zu konzentrieren.

2.7.1 Morphologische Heterogenität

Endotheliale Heterogenität ist auf morphologischem Level am deutlichsten ausgeprägt. Schon bei der Zellgröße wurden bereits frühzeitig erhebliche Unterschiede entdeckt. Erstaunlicherweise sind Endothelzellen großer Gefäße oftmals geringeren Ausmaßes als die kleinerer Gefäße. Beispielsweise sind Endothelzellen der Koronararterien des Schweines um 30% größer als die in der Aorta (Ohbayashi et al., 1994). Endothelzellen der Gehirnarterien des Menschen sind größer als Endothelzellen von Gefäßen ähnlichen Kalibers anderer Organe (Thorin et al., 1997). Endothelzellen der Pulmonalarterie der Ratte sind länger als die der Aorta (Kibria et al., 1980).

Variationen der Zellform zeigen makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen. Während die der mikrovaskulären Gefäße flach, langgestreckt und in Blutflussrichtung angeordnet sind, zeigen sich die der großen Gefäße eher polygonal (Kumar et al., 1987).

Die Polarisierung des Zellkerns ist typspezifisch. Kerne der Aorten-Endothelzellen liegen unterhalb des Mittelpunktes der Längs-Zellachse und immer in Blutflussrichtung, während die der Vena cava oberhalb dieser Linie lokalisiert sind (Flaherty et al., 1972; Dewey et al., 1981).

Zahlreiche Studien weisen auf die Heterogenität des Gehalts und der Lokalisation endothelialer Organellen hin. Weibel-Palade-Körperchen (WPB) sind endothelzellspezifische Organellen, in denen u.a. der für die Adhäsion von Blutplättchen notwendige von Willebrand-Faktor sowie P-Selektin, welches die Adhäsion von Leukozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse vermittelt, nach ihrer Synthese gespeichert werden (Wagner, 1993; Junqueira et al., 2002). Von Organ zu Organ differiert ihre Anzahl. Ihre zytoplasmatische Dichte korreliert negativ mit der Distanz vom Herzen. Folglich ist deren höchste Anzahl in Blutgefäßen, die nahe am Herzen liegen, zu finden. In Kapillaren treten

die wenigsten Weibel-Palade-Körperchen auf (Weibel und Palade, 1964; Steinsiepe und Weibel, 1970; McCarthy et al., 1991). WPB treten in unterschiedlicher Form auf. Alle Weibel-Palade-Körperchen in der Aorta, im Gehirn und im Myokard sind stabförmig und langgestreckt, im Ovar sind sowohl längliche als auch rundlichere, mit höherer Elektronendichte zu finden. Beim Rind sind WPB, wenn überhaupt, nur in atypischen Formen aufzufinden (Plendl, 1997).

Das Zytoskelett ist ein funktionell wichtiger Bestandteil der Endothelzelle. Ein Komplex unterschiedlich geformter und strukturierter Proteine, ermöglicht den Erhalt und die Veränderung der Zellform sowie Bewegungen der Endothelzellen. Mit Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Mikrofilamenten ausgestattet, sind sie zur Kontraktion befähigt (Welt et al., 1990). Verglichen mit Kapillaren kommen in Venulen und Arteriolen besonders reichlich Mikrofilamente vor, sie sind aber nicht in allen Endothelzellen nachweisbar (Rhodin, 1967; Bruns und Palade, 1968).

Das Plasmalemm der Endothelzellen bildet verschiedenartige Strukturen wie beispielsweise Vesikel, Stomata, Fenestrationsen, zytoplasmatische Protrusionen oder Mikrovilli. Die zahlreichsten Mikrovilli zeigen Endothelzellen an Loci höchster Strömungsturbulenzen großer Venen (Buss et al., 1979). Im arteriellen Endothel kommen weniger plasmalemmale Vesikel als in postkapillären Venulen und Arteriolen vor (Simionescu et al., 1978). Endothelzellen vieler Organe weisen mikropinozytotische Vesikel auf, d.h. Einstülpungen der Zellmembran. Mehrere solcher Vesikel können miteinander verschmelzen und transepitheliale Kanäle bilden (Simionescu, 1983; Plendl, 1997).

Die Permeabilität des Endothels wird durch die Ausbildung von Zellkontakten bestimmt. Die einzelnen Segmente des Gefäßbaums weisen je nach funktionellen Bedürfnissen Varianten von Zellverbindungen auf: tight junctions (Zonulae occludentes), gap junctions (Nexus), zonulae adherentes (Gürteldesmosomen). Endothelzellen von Arteriolen präsentieren ein kontinuierliches, komplexes Netzwerk aus tight junctions und gap junctions. Arterien verfügen über ein weniger komplexes System von Zellkontakten, Kapillaren haben keine gap junctions und in Venulen sind Zellkontakte am wenigsten organisiert (Simionescu et al., 1975; Simionescu et al., 1976a; Simionescu et al., 1976b; Dejana et al., 1995).

Im Hinblick auf die Endothelzellen werden kontinuierliche, fenestrierte und diskontinuierliche Kapillaren unterschieden. Ein sogenanntes Schrankenendothel, charakterisiert durch ein zusammenhängendes Endothel und umgebende kontinuierliche Basalmembran, findet man beispielsweise in Gehirn, Lunge und Netzhaut. Mit einer hohen Anzahl von tight junctions gewähren solche Endothelien eine dichte Barriere (z.B. Blut-Gehirnschranke, Blut-Retinaschranke). Diskontinuierliche Kapillaren finden sich in der Milz, im Knochenmark und in den Sinusoiden der Leber. Solche Kapillaren sind durch Lücken gekennzeichnet, wodurch zellulärer Transport erlaubt wird. In Geweben mit hohem Stoffaustausch (Darm, endokrine Drü-

sen, Nieren) findet man Kapillaren mit Endothelzellen, die Fenestrations aufweisen. Ein extremer Fall der Endothel-Heterogenität innerhalb eines Organs ist die Niere. Während fenestriertes Endothel die peritubulären Kapillaren auskleidet, tritt in den glomerulären Kapillaren diskontinuierliches Endothel und in den anderen Regionen kontinuierliches Endothel auf (Risau und Flamme, 1995; Dejana, 1996).

2.7.2 Funktionelle Heterogenität

Die Hauptaufgaben des Endothels, nämlich die Kontrolle der Hämostase und des vasomotorischen Tonus, der Transport von Zellen und Nährstoffen, die Barrierefunktion und das Gefäßwachstum werden innerhalb der Gefäßbaumsegmente differenziert reguliert (Aird, 2001; Aird, 2002). Kaum eine Erkrankung des Blutgefäßsystems affiziert jeden Phänotypen der Gefäße im Organismus. Beispielsweise gehen mit Diabetes v.a. Vaskulopathien in kleinen Arteriolen der Retina, der Nieren und der Haut einher (Cooper et al., 2001). Arteriosklerotische Läsionen sind nur in bestimmten Regionen des arteriellen Schenkels lokalisiert (Dai et al., 2004; Garfinkel et al., 2004).

Zur Regulation des Blutflusses wird der vasomotorische Tonus durch die Aktivität autokriner, parokriner und zirkulierender Faktoren gesteuert. Endothelzellen sezernieren hierfür u.a. Stickstoffmonoxid (NO). Organspezifisch und insbesondere zwischen venösem und arteriellem Schenkel des Gefäßbaumes herrschen dabei deutliche Unterschiede, wobei die Stickstoffmonoxid-Produktion auf der arteriellen Seite der Zirkulation höher als auf der venösen zu sein scheint (Andries et al., 1998). Das höchste Level an Stickstoffmonoxid-Produktion weisen Endothelien des Herzens und der Lunge auf, während das geringste in der Leber vorkommt (Cosentino, 1999; Guillot et al., 1999).

Unter Ruhebedingungen zeigen intakte Gefäßbetten differierende Verteilungsmuster von Hämostasefaktoren. Herz- und Gehirnendothelien exprimieren am meisten Tissue-Plasminogen-Aktivator-mRNA, die der Nieren Urokinase-Plasminogen-Aktivator-mRNA. Thrombomodulin wird von Endothelzellen aller Gefäßbetten mit Ausnahme des Gehirns exprimiert (Ishii et al., 1986; Yamamoto und Loskutoff, 1996).

Endothelzellen sind für einen sehr aktiven Adenosinmetabolismus bekannt, der sich durch eine hohe Kapazität für die Aufnahme und Abgabe von Nucleosiden auszeichnet. Adenosin stimuliert oder inhibiert die Freisetzung angiogener Faktoren (z.B. VEGF, bFGF, Interleukine). Während einer Ischämie moduliert Adenosin Endothelzellfunktionen in Form der Aktivierung von Zellmembranrezeptoren. Endothelzellen unterschiedlicher Kompartimente exprimieren unterschiedliche Adenosinrezeptor-Subtypen (Feoktistov et al., 2002).

Mikrovaskuläre Endothelzellen des Knochenmarks zeigen hohe Affinität für Megakaryozyten und CD34⁺ Progenitorzellen. Diese Endothelzellen sind die Hauptproduktionsstätte der Fak-

toren, die hämatopoietische Stammzellen zur Proliferation und Differenzierung stimulieren, z.B. Kit-Ligand, G-CSF, GM-CSF, Interleukin-6 (Rafii et al., 1995).

2.7.3 Metabolische Heterogenität

Die Blutgefäße der verschiedenen Gewebe besitzen spezialisierte Funktionen. Um diese zu erfüllen, sind Endothelzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgerüstet. Welche Faktoren solch eine Heterogenität determinieren, wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.7.3.1 Heterogenität der oberflächenassoziierten Glykokonjugate

Glykokonjugate dienen als Rezeptoren für die interzelluläre Kommunikation, also für wichtige funktionelle Eigenschaften der Zelle (Ponder und Wilkinson, 1983; Auerbach et al., 1985; Plendl et al., 1992a; Plendl et al., 1992b; Plendl et al., 1993; Plendl et al., 1995). Mit Lektinen (z.B. Dolichos biflorus Agglutinin, Bandeiraea simplicifolia Agglutinin) können definierte Glykokonjugate auf Endothelzellen markiert werden. Glykohistochemische Untersuchungen zeigen spezieis-, subspezies-, organ- (Porter et al., 1990), gefäßkaliber-, alters- und sogar geschlechtsspezifische Affinitätsprofile von Lektinen (Fatehi et al., 1987; Belloni und Nicolson, 1988; Schnitzer et al., 1990). Endothelzellen des Gehirns, der Aorta und des Ovars von Schweinen zeigen eine höhere Affinität zu Bandeiraea simplicifolia Agglutinin (BSA-I) als myokardiale oder testikuläre Endothelzellen (Plendl et al., 1996b). Undifferenziertes neurogliales Gewebe der Maus bindet Dolichos biflorus Agglutinin, während im ausdifferenzierten Gewebe keine Bindung mehr nachweisbar ist (Plendl et al., 1992b). Endothelien des Hundes gehen physiologischerweise keine Verbindung mit BSA-I ein, während sich neoplastisches Endothel mit diesem Lektin markieren lässt (Augustin-Voss et al., 1990).

2.7.3.2 Heterogenität der Adhäsionsmoleküle (Selektine, Immunglobulinsuperfamilie und Integrine)

Die Aktivierung von Endothelzellen geschieht unter anderem infolge der Induktion ihrer zahlreichen Adhäsionsmoleküle. Aktivierte Endothelzellen reagieren stimulus- und organspezifisch. Dank hochkomplexer molekularer Mechanismen, die Zell-Zell-Interaktionen regulieren und beschleunigen, erreichen zirkulierende und gegebenenfalls auch transformierte Zellen den Ort ihrer Bestimmung signifikant selektiv (Kieda, 2003). Dieser Prozess des selektiven „Homing“ wird in erster Linie von den Adhäsionsmolekülen des Endothels gesteuert. Die Invasion metastasierender Tumorzellen ist organspezifisch, möglicherweise entstehen deshalb Fernmetastasen, die über die Blutbahn verbreitet werden, immer in ganz bestimmten Organen (Auerbach et al., 1985; Belloni und Nicolson, 1988; Kieda, 2003). Ähnliches Prinzip gilt für Leukozyten. Am Ort einer Entzündung exprimieren

Endothelzellen bestimmte Adhäsionsmoleküle, durch die Leukozyten gebunden werden (Hickey et al., 1999). Vaskulitiden treten bevorzugt in Arterien, Venen oder Kapillaren ganz bestimmter Gefäßbetten auf (Cines et al., 1998). Eines der deutlichsten Beispiele von Endothelzellheterogenität sind die Homing-Rezeptoren beim „Lymphozyten Homing“. Lu-ECAM-1 (Lung Specific Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) wird ausschließlich von Endkapillaren der Lunge exprimiert, während Mad-CAM-1 (Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1) primär auf den „high endothelial venules“ der Peyerschen Platten im Dünndarm auftritt. Des Weiteren wurden gewebespezifische Oberflächenantigene an Endothelzellen peripheren lymphoiden Gewebes gefunden (Streeter et al., 1988a; Streeter et al., 1988b; Butcher und Picker, 1996). Das Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle differiert nicht nur innerhalb der verschiedenen Gefäßbetten, es kann sich auch von Segment zu Segment verändern (Drake et al., 1993; Henninger et al., 1997; Bauer et al., 2000). Makrovaskuläre Endothelzellen aus Koronararterien zeigen eine höhere Expression von E-Selektin als Endothelzellen aus kardialen Mikrogefäßen. Eine vermehrte Expression von L-Selektin (z.B. durch Angiotensin-II induziert) verursacht erhöhte Adhäsion von Leukozyten und Makrophagen. Makrophagen akkumulieren z.B. in arteriosklerotischen Regionen und sind dann in der Lage, eine Inflammation durch das Sezernieren von Angiotensin-II und Zytokinen selbst zu unterhalten. Da auch andere Adhäsionsmoleküle, insbesondere Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und VCAM-1, in arteriosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert werden, kommt es zu einer stabilen Adhäsion von Monozyten an die Gefäßwand. Dies ist ein charakteristischer Befund in den frühen Stadien der Arteriosklerose (Grafe et al., 1999).

P-Selektin wird grundsätzlich von allen Endothelien exprimiert, die Quantität differiert aber innerhalb der verschiedenen Gefäßbetten, auch von Segment zu Segment (Henninger et al., 1997; Bauer et al., 2000).

Page et al. (1992) überprüften mittels monoklonaler Antikörper das Verteilungsmuster von spezifischen Endothelzell-Markern (z.B. vWF, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) und von Majorhistokompatibilitäts-Komplex-Molekülen der Klasse I und Klasse II auf der luminalen Oberfläche mikrovaskulärer Endothelien verschiedener Organe des Menschen. Das Screening ergab ein variierendes, organeigenes Expressionsmuster (Page et al., 1992). Andere Gruppen bestätigten diese Ergebnisse: makrovaskuläre Endothelzellen zeigten hohe Level an PECAM-1, Endothelzellen der Mikrogefäße, z.B. glomeruläre der Niere oder der Haut, deutlich geringere. Dabei wurde auch eine unterschiedliche Induzierbarkeit der Expression innerhalb der Gefäßbetten beobachtet (Murakami et al., 2001). PECAM-1 wird auch nicht von allen Endothelzellen exprimiert. *In situ* Untersuchungen der humanen Leber bewiesen das Vorhandensein zweier unterschiedlicher sinusoidaler Endothelzellphänotypen. Periportale

Endothelzellen exprimierten PECAM-1 (und CD34), während sinusoidale intrahepatische Endothelzellen keine Expression zeigten (Morin et al., 1984).

Im Zuge der Wundheilung erscheint Integrin $\alpha_v\beta_3$ temporär an der distalen Spitze angiogener, sprossender Kapillaren. In Granulationsgewebe wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in hohem Grad exprimiert, dagegen ist es auf Gefäßen normaler Haut nicht nachweisbar (Brooks et al., 1996).

2.7.3.3 Heterogenität des antigenen Oberflächenprofils

Endothelzellen unterscheiden sich in ihrer antigenen Ausstattung. Auerbach et al. entwickelten schon 1985 monoklonale Antikörper gegen organspezifische Endothelzellen-Oberflächenantigene. Selektiv reagierten nur Antigene der entsprechenden Organkapillaren. Im Plexus choroideus des Gehirns werden hochspezifische Antigene exprimiert, welche auf Endothelien anderer Bereiche des Gehirns nicht nachzuweisen sind (Ghandour et al., 1982; Michalak et al., 1986). Auch in der Lunge wurden bereits organassoziierte endotheliale Antigene nachgewiesen (Kennel et al., 1987).

Das Verteilungsmuster des von Willebrand-Faktors wurde eingehend von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Dabei konnte aufgedeckt werden, dass vWF in glomerulären Kapillaren der Niere und dem sinusoidalen Endothel der Leber nicht nachweisbar ist (McCarthy et al., 1991). Im Endothel des venösen Schenkels wird vWF in höheren Mengen exprimiert als im arteriellen (Smith et al., 1996; Yamamoto et al., 1998). Auch große Gefäße und das Endothel des Endokards exprimieren vWF stärker als kleine Gefäße (Smith et al., 1996). Segmental, von Endothelzelle zu Endothelzelle, lassen sich an der Aorta der Maus unterschiedliche Immunreaktivitäten für vWF beobachten (Tomlinson et al., 1991).

2.7.3.4 Heterogenität der Genexpression

Transkriptionale Unterschiede wurden zwischen verschiedenen Populationen von Endothelzellen identifiziert, wie z.B. zwischen großen und kleinen Gefäßen, Arterien und Venen, Gefäßen gesunden Gewebes und Tumoren. Ein besonders prominentes Beispiel der variierenden Genexpression ist die Entdeckung, dass nur arterielle Gefäße das Ephrin-B2, einen Transmembranliganden aus der Familie der Ephrine, exprimieren, venöse Gefäße nicht. Im Gegensatz dazu ist Ephrin-B4, ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der Ephrin-B2 bindet, in viel höherer Rate in Endothelzellen von Venen zu finden als von Arterien (Wang et al., 2004).

Untersuchungen mit retroviralen Vektoren von Zelllinien in Hühnerembryonen deckten unterschiedliche Ursprünge des Endothels der Koronargefäße und des Endokardiums auf. Das endokardiale Endothel entstammt vermutlich aus dem lateralen Mesoderm, während das Endothel der Koronargefäße von dem sogenannten proepikardialen Organ, das im dorsalen Mesoderm lokalisiert ist, ausgeht. Die Progenitoren des proepikardialen Organs sind multiplo-

tent, sie können zu Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten differenzieren (Reese et al., 2002).

Transkriptionales Profiling erbrachte tumor-spezifische endotheliale Gene. St. Croix und Kollegen (2000) verglichen das endotheliale Genexpressionsmuster von Gefäßen in Tumoren und gesunden Geweben. Sie fanden, dass 46 Transkripte speziell nur im Tumorendothel adulter Gewebe auffindbar waren. Eine weitere Analyse der 46 Transkripte indizierte, dass diese Gene zum Teil schon während der embryonalen Gefäßentwicklung aber auch beim adulten vaskulären Remodeling (z.B. während der Wundheilung) exprimiert werden (St Croix et al., 2000; Carson-Walter et al., 2001).

Heterogenität des Endothels zeichnet sich auch in der Expression und Aktivität seiner Angiogenesefaktoren ab. In den verschiedenen Geweben variiert das Aufkommen von VEGF und Angiopoietin-1 außerordentlich. Sogenannte gering-permeable Tumoren überexprimieren Angiopoietin-1 oder unterexprimieren VEGF oder beides gleichzeitig, während hochpermeablen Tumoren Angiopoietin-1 fehlt (Tian et al., 2002; Gilad et al., 2005). Einige Autoren fanden einen Unterschied zwischen venöser und arterieller Resonanz auf VEGF. Beispielsweise wird Neuropilin-1, eine Isoform spezifischer VEGF-Rezeptoren, vorwiegend im venösen Schenkel der Zirkulation exprimiert und Neuropilin-2 (eine splicing Variante spezifischer Rezeptoren) auf der arteriellen Seite (Herzog et al., 2001).

Jüngste Untersuchungen deckten ein neues VEGF-ähnliches Molekül auf, welches nur für bestimmte Organtypen spezifisch ist. Endocrin Gland-VEGF (EG-VEGF) zeigt identische Funktionen wie VEGF. Die Produktion der EG-VEGF-mRNA ist auf das Endothel steroidaler endokriner Drüsen limitiert (LeCouter et al., 2001).

2.7.3.5 Heterogenität der Reaktion auf Wachstumsfaktoren

Endotheliale Heterogenität wurde ferner durch die Inkubation von Endothelzellen in Wachstums- und Angiogenesefaktoren bestätigt. Hier existieren Unterschiede in der Reaktion des Endothels von großen Gefäßen und von Kapillaren. Unter Exposition von VEGF-A, PlGF-1 und -2 (Placental Growth Factor) und FGF-2 antworten die Endothelzellen der Mikrogefäße insgesamt intensiver mitogen. PlGF-1 und -2 verursachen keine Wirkung auf die Endothelzellen der großen Gefäße (Lang et al., 2001).

Ein organspezifischer angiogener Effekt wurde für VEGF und FGF-2 dokumentiert (Pettersson et al., 2000; Allen et al., 2001). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass FGF-2 bei der Maus neoplastische Läsionen in aus Gehirn und Aorta isoliertem Endothel induziert, jedoch nicht in Endothelien des Endokards (Bastaki et al., 1997). Ein anderes Beispiel ist der Effekt von Angiopoietin-1, welches Angiogenese in der Haut stimuliert, aber im Herzen supprimiert.

Organspezifische Angiogenesefaktoren determinieren den sogenannten „angiogenic switch“, die Aktivierung der Angiogenese, nur in begrenzter Weise und nur in bestimmten Organen. Beispiele hierfür sind das Fibulin-2 und die Epikardialsubstanz, die nur im Herzen wirken bzw. der EG-VEGF der nur in endokrinen Drüsen Angiogenese induziert (LeCouter et al., 2001; Tsuda et al., 2001).

Ergebnisse über speziesspezifische mitogene Wirkung verschiedener Angiogenese- und Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF, humanes Serum, PDGF) erzielten u.a. Harvey et al. (2002) bei einem Vergleich boviner und menschlicher Endothelzellen.

2.8 Plastizität und Transdifferenzierung der endothelialen Phänotypen

Endothelzellen bewahren im adulten Organismus eine gewisse Plastizität, die es ihnen ermöglicht, sich dem umliegenden Milieu anzupassen. Werden die Zellen mit der Matrix heterotoper Organe kokultiviert, nehmen sie phänotypische Eigenschaften der Endothelzellen des entsprechenden Organs an (Augustin-Voss et al., 1991; Ribatti et al., 2002). Die induktive Bedeutung der extrazellulären Matrix wurde in zahlreichen Experimenten erprobt. Beispielsweise entwickeln auf Nierenmatrix kultivierte Endothelzellen der Aorta oder der Nebennierenrinde Fenestrae *in vitro* (Milici et al., 1985). Werden Endothelzellen der Peripherie mit Astrozyten kokultiviert, dann entwickeln diese Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (Janzer und Raff, 1987). Umgekehrt verlieren Blutgefäße des Gehirns unter dem Einfluss peripherer Gewebe tight junctions (Aird, 2003). Weiter wurde gezeigt, dass umgebendes Gewebe die Expression spezifischer endothelialer Gene modifiziert. Im *in vitro* Modell wurde die Auf- und Abregulierung der Expression des von vWF-Gens in mikrovaskulären Endothelzellen des Herzens demonstriert, wenn diese mit heterotopen Geweben kokultiviert wurden. Während Herzmuskelgewebe die Expression der vWF-mRNA steigerte, beeinflussten Fibroblasten, Hepatozyten oder ventrikuläre Myozyten das Expressionsmuster nicht (Aird et al., 1997).

Unter **Transdifferenzierung** einer determinierten Zelle versteht man deren Umprogrammierung in einen Zelltyp einer anderen Gewebeart. Bereits differenzierte Endothelzellen können ihre Determination ändern und in einen anderen Zelltyp transdifferenzieren (Condorelli et al., 2001; Paranya et al., 2001; Frid et al., 2002; Arciniegas et al., 2003; Tintut et al., 2003). Nach Condorelli (2001) sind sowohl endotheliale Progenitorzellen als auch differenzierte Endothelzellen unter bestimmten Milieubedingungen *in vivo* und *in vitro* zu Kardiomyozyten umwandelbar. Den Beweis lieferte Condorelli (2001) anhand der Ko-Expression zellspezifischer Gene beider Zelltypen. Nachdem Endothelzellen mit Herzmuskelzellen ko-kultiviert oder in post-ischämische Herzen injiziert worden waren, exprimierten diese sowohl endotheliale (vWF), als auch myokardiale (Sarkomyosin) Zellmarker. Diese transienten Zellen zeigten

morphologische und funktionale Merkmale von Herzmuskelzellen. Des Weiteren trugen die implantierten Zellen erheblich zur Regeneration des Herzmuskels bei. Die Umwandlung von Endothelzellen in einen anderen Zelltyp scheint in erster Linie vom umliegenden Gewebe und dessen aktuellen Bedürfnissen diktiert zu werden (Lipton et al., 1992; Paranya et al., 2001). Während bei der Embryogenese bestimmte lösliche Faktoren Zelldifferenzierung induzieren (Risau, 1995; Risau und Flamme, 1995), scheinen andere Signale, wie z.B. Zell-Zell-Kontakt, die Transdifferenzierung maturer Endothelzellen in andere Zelltypen einzuleiten (Condorelli et al., 2001).

2.9 Die *in vitro* Kultur von Endothelzellen

Alle Teilschritte der angiogenen Kaskade sind bei der Bildung neuer Gefäße elementar. Endothelzellen müssen ihre stabile Lokalisation verlassen, wobei sie durch die Basalmembran dringen. Wenn dies erreicht ist, migrieren die Zellen in Richtung eines angiogenen Stimulus. Hinter der Front migrierender Zellen proliferieren Endothelzellen, um die notwendige Anzahl von Zellen sicherzustellen, die zur Ausbildung kapillärer Strukturen notwendig ist. Schließlich bedarf es einer Neuorganisation der Endothelzellen in ein funktionsfähiges dreidimensionales Netzwerk tubulärer Strukturen. Jedes Stadium dieser Kaskade bietet bei Bedarf die Möglichkeit einer Intervention und jedwede Intervention kann im *in vitro* Modell detailliert untersucht werden (Auerbach et al., 2003).

Insbesondere im Stadium der *Proliferation* verschaffen zahlreiche, gut etablierte *in vitro* Assays die Möglichkeit, die Vermehrungsrate der Zellen zu messen. Die Zellproliferation kann am Thymidin-Inkorporations-Modell, durch mikroskopische Auszählung der Endothelzellen mit Zählkammern oder mittels Zählgeräten erfolgen. Eine Quantifizierung ist ferner durch immunzytochemische Markierung mitotischer Zellen möglich (Pedram et al., 1997; Ahmad et al., 2001; Amann et al., 2001).

In Zell-Migrations-Assays wird die richtungsorientierte *Motilität* mikrovaskulärer Endothelzellen in Richtung chemotaktischer Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) analysiert. Die Boyden-Kammer ist die hierfür am häufigsten angewandte Methode. Diese Kammer besteht aus zwei übereinander installierten Abteilungen. Ein Filter mit definierter Porengröße trennt die beiden Untereinheiten, von denen die obere mit Endothelzellen besät wird. In den unteren Teil wird die chemotaktische Testsubstanz eingebracht. Nach Inkubation wandern die Zellen durch den Filter in den unteren Bereich der Kammer und können dort ausgezählt werden (Malinda et al., 1999; Lamszus, 2004).

Der aussagekräftigste Test für die *Angiogenese* der Endothelzellen ist die Ermittlung ihrer Fähigkeit dreidimensionale tubuläre Strukturen mit einem Lumen auszubilden. In Kulturschalen eingesät, formen Endothelzellen nach gegebener Inkubationszeit spontan Tubuli

(Folkman und Haudenschild, 1980; Plendl, 1997). Die Endothelzellen synthetisieren *in vitro* entsprechende Komponenten der extrazellulären Matrix und bilden sich dadurch ihr eigenes, dreidimensionales Substrat (Auerbach et al., 2003; Lienau et al., 2005). In diesem Modell kann der Abbau der extrazellulären Matrix, die Migration, Differenzierung zu kapillarähnlichen Strukturen, deren Lumenisierung und ein anschließendes Remodeling beobachtet werden (Lienau, 2003; Lienau et al., 2005). Elektronenmikroskopisch können Zellkontakte und Lumenbildung überprüft werden. Somit bietet das *in vitro* Modell eine Möglichkeit, in Annäherung an die *in vivo* Situation, die Ausbildung vaskulärer Strukturen und deren Inhibierung qualitativ und quantitativ zu studieren (Nicosia et al., 1994). Dennoch spiegeln Zellkultur-Modelle nicht die komplexen Verhältnisse im lebenden Organismus wieder, da die Angiogenese *in vivo* auch vom umliegenden Gewebe sowie Perizyten, glatten Muskelzellen und der extrazellulären Matrix beeinflusst wird. Ausführlich wurden *in vitro* Versuche der Angiogenese sowie deren Vor- und Nachteile von Bahramsoltani und Plendl (2004) beschrieben.