

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Endothelzellkulturen aus dem bovinen Corpus luteum *in vitro* kultiviert und charakterisiert. Eine Zellkultur davon stammte aus dem Corpus luteum cyclicum in Anbildung (*BCI AA*), drei Zellkulturen (*BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2*) aus dem Corpus luteum cyclicum in Rückbildung.

Trotz standardisierter Kultivierungsbedingungen zeigten diese Endothelzellen, die aus dem gleichen Organ, dem Corpus luteum, drei davon sogar aus dem gleichen Entwicklungsstadium dieses Organs, isoliert worden waren, unterschiedliche angiogene Potenz. Neben angiogenen und hoch angiogenen Kulturen (*BCI AA*, *BCI RA1*, *BCI RA2*), die ein komplexes, kapillarähnliches Netz mit kontinuierlichem Lumen *in vitro* bildeten, zeigte eine Kultur (*BCI RN*) keine Anzeichen der Gefäßbildung *in vitro*.

Ziel dieser Arbeit war es, eine vergleichende Untersuchung dieser funktionell heterogenen Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum *in vitro* durchzuführen. Nicht-angiogene und angiogene Kulturen sollten auf zellulärer und molekularer Basis charakterisiert werden.

Es kann ausgeschlossen werden, dass die morphologische Heterogenität der vier Kulturen eine Konsequenz der *in vitro* Kultur, also des künstlichen Milieus ist, da die Zellen unter vollkommen identischen Bedingungen inkubiert und in gleichen Passagen (10 bis 15) für die Untersuchungen verwendet wurden. Morphologische Heterogenität der Endothelzellen, auch innerhalb eines Organs, wurde ebenso *in vivo* festgestellt (Feinberg et al., 1991; Davis et al., 2003). Das Gefäßendothel hat zahlreiche Funktionen und die Endothelzellen erfüllen vielfältige Aufgaben. Deshalb weisen Endothelzellen, u.a. abhängig von ihrer Funktion, eine unterschiedliche Morphologie im selben Organ und Organbett auf (Risau, 1987; Plendl, 1997).

Insbesondere sollte eruiert werden, ob in den hoch angiogenen bovinen lutealen Endothelzellkulturen möglicherweise spezifische Zellen im Sinne von Stamm- oder Progenitorzellen eine kritische und initiierende Rolle bei der Gefäßentwicklung *in vitro* einnehmen. Diese Aufgabe setzte als ersten Schritt die Ermittlung, Auswahl und Analyse der in Frage kommenden Marker von Stamm- und Progenitorzellen voraus. Dabei zeigte sich als besondere Problematik, dass Forschung an adulten Stammzellen ein neues Terrain darstellt und das Wissen über

Stamm- und Progenitorzellen derzeit noch fragmentarisch ist. Publierte Studien erbrachten teils widersprüchliche Resultate. Definitionen von spezifischen Zellen sind häufig noch nicht ausgearbeitet bzw. fixiert.

Obwohl es zahlreiche neue Veröffentlichungen über die Präsenz adulter Stamm- und Progenitorzellen gibt, die zu vaskulären Zellen differenzieren, existieren bislang keine Untersuchungen über die Beteiligung adulter Stamm- oder Progenitorzellen an der Vaskularisierung des postovulatorischen Corpus luteum.

Da mit bovinem Zellmaterial gearbeitet wurde, gestaltete sich die Wahl der Markermoleküle, trotz der Vielfalt heute anerkannter Nachweisverfahren endothelialer Progenitorzellen, schwierig. Die in der Literaturübersicht beschriebenen Methoden zur Identifizierung adulter Stammzellen beziehen sich vorwiegend auf die biologische Forschung an Versuchstieren wie Mäusen und anderen Nagern und auf *in vitro* Modelle humaner oder muriner Zellen. Kommerziell erhältliche Antikörper für das bovine System stehen nicht zur Verfügung.

Aus den gesagten Gründen ging den hier durchgeführten Experimenten eine intensive Recherche nach geeigneten Stammzellmarkern sowie die Durchführung zahlreicher Vor- und Kontrollversuche voraus. Nur nach intensiver Überarbeitung der immunhistochemischen Protokolle waren spezifische Reaktionen der ausgewählten Antikörper mit dem Material der vorliegenden Studie möglich.

6.1 Etablierung einer Methode zur Identifizierung adulter Stammzellen des Rindes

Die bisher definierten Differenzierungsschritte endothelialer Vorläuferzellen im Adulten zu organadaptierten, maturen Zellen stellen eine Rekapitulation der Differenzierungsschritte embryonaler (Häm-) Angioblasten dar. Identische lösliche Faktoren mobilisieren sowohl im Embryo als auch im Adulten Progenitorzellen zur Vaskulogenese (Shalaby et al., 1995; Flamme et al., 1997; Asahara et al., 1999a; Takahashi et al., 1999; Heeschen et al., 2003; Bahlmann et al., 2004; Tepper et al., 2005). Das antigene Profil embryonaler Stamm- und Progenitorzellen, welche zu Endothelzellen differenzieren, gleicht dem der adulten endothelialen Progenitoren oder Hämangioblasten (Choi et al., 1998; Gehling et al., 2000; Choi, 2002; Eichmann et al., 2002; Bailey und Fleming, 2003; Heissig et al., 2003; Kanayasu-Toyoda et al., 2003; Bailey et al., 2004; Calabrese und Wainstok, 2004; Nowak et al., 2004).

Eine sichere Trennung zwischen endothelialen Progenitorzellen und ausdifferenzierten Endothelzellen ist schwierig, da bislang kein spezifisches Epitop identifiziert wurde (Kalka et al., 2000; Rafii, 2000). Eine eindeutige Aussage über den immaturen Charakter von Zellen ist mit einem einzigen Marker nicht möglich. Nur die Kombination mehrerer Markermoleküle,

gekoppelt mit der Analyse des spezifischen Wachstumsmusters von Zellen, erlaubt eine weitgehend sichere Identifikation endothelialer Stamm- und Progenitorzellen.

Durch die Kombination der Marker für **CD31** (PECAM-1), **CD34**, **VEGF-R2** (flk-1, KDR) und **CD117** (**c-kit**, SCF-Rezeptor) gelang es in der vorliegenden Arbeit, aussagekräftige Ergebnisse über die Präsenz bzw. Absenz von Progenitorzellen in den endothelialen Kulturen zu erhalten. Die Koexpression und die Kinetik des Expressionsmusters der Markermoleküle war dabei ausschlaggebend für den Aussagewert der Untersuchungen.

Die Kinetik des Expressionsmusters von **PECAM-1** in Stamm- und Progenitorzellen dient als Indikator für endotheliale Differenzierung (Pinter et al., 1997; Drake und Fleming, 2000). Redick und Bautch (1999) beschrieben, dass PECAM-1 bereits in der embryonalen Blastocyste exprimiert wird, in der noch keine Zuordnung der Zellen zu einer Zelllinie gegeben ist. Während weiterer Differenzierungsschritte verschwindet die Expression von PECAM-1 temporär. Später kann die Expression von PECAM-1 in den Dottersackblutinseln wieder nachgewiesen werden. Diese sogenannten „späten“ PECAM-1-positiven Zellen ko-exprimieren dann bestimmte hämatopoietische bzw. endotheliale Markermoleküle. Sobald also eine Determination stattgefunden hat, kann zwischen „frühen“ und „späten“ PECAM-1-positiven Zellen unterschieden werden. Die Arbeitsgruppe um Kanayasu-Toyoda (2003) isolierte multipotente Vorläuferzellen aus dem Blut von Erwachsenen. Nachdem zuerst alle Zellen PECAM-1 exprimierten, sank nach Zugabe angiogener (differenzierungsfördernder) Faktoren die Anzahl positiv reagierender Zellen. Erst nach weiteren zwei Wochen konnte PECAM-1 wieder in allen Zellen nachgewiesen werden. Während der Zeitspanne in der PECAM-1 herunter reguliert war aber nahmen die Zellen erstmals acLDL auf und reagierten immunopositiv für vWF, was für ihre Differenzierung in die endotheliale Reihe spricht. Es wird vermutet, dass eine intrinsische molekulare Uhr existiert, welche das Expressionsmuster von PECAM-1 und somit offenbar die Differenzierung bestimmter Zellen determiniert (Redick und Bautch, 1999; Robson, 2001).

„Späte“ PECAM-1-positive Zellen exprimieren PECAM-1 und **CD34** gleichzeitig.

CD34 wird prinzipiell von hämatopoietischen Stammzellen und immaturren Endothelzellen exprimiert. Seine physiologische Funktion ist nicht endgültig geklärt (Krause et al., 1996). In der Differenzierungskaskade pluripotenter Stammzellen zu determinierten hämatopoietischen oder/und endothelialen Vorläuferzellen nimmt CD34 eine wichtige Position ein. „Späte“ PECAM-1-positive Zellen, welche CD34 ko-exprimieren, gelten als die ersten Vorläuferzellen in der Maturationskaskade hämatopoietischer Stammzellen (Redick und Bautch, 1999).

Die Determinierung multipotenter Stammzellen zur endothelialen Linie findet aber nicht nur in einer Herunterregulierung von PECAM-1 Ausdruck, vielmehr korreliert dieses Herunterregulieren mit einem Maximum der **KDR**-Expression dieser Zellen schon während der Differenzierungsphase zu Endothelzellen. Für die Determinierung multipotenter Zellen zu Angioblasten gilt KDR derzeit als hochspezifischer und einer der am frühesten exprimierten Marker und Mediatoren (Risau, 1995; Risau und Flamme, 1995; Nishikawa et al., 1998; Saha et al., 2004). Das Auftreten des KDR leitet die Determinierung zu endothelialen Progenitorzellen ein. „Späte“ PECAM-1⁺/KDR⁺-Zellen nehmen acLDL auf und reagieren positiv für vWF (Kanayasu-Toyoda et al., 2003).

KDR nimmt für die Gefäßbildung und Hämatopoese während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus eine Schlüsselposition ein. Postnatal werden KDR-exprimierende Stammzellen des Knochenmarks auf verschiedenen Ebenen durch VEGF-A rekrutiert (Peichev et al., 2000; Tordjman et al., 2001; Rabbany et al., 2003). Das VEGF-A/KDR-System reguliert somit Differenzierung, Proliferation und Migration adulter endothelialer Vorläuferzellen sowie deren Mobilisierung aus dem Knochenmark.

c-kit, der Rezeptor des Stammzellsfaktors (SCF), wurde als weiterer Marker ausgewählt, weil er die Brücke von den hämatopoietischen Stammzellen zu den Zellen des Ovars zu schlagen vermag.

Da c-kit⁺ Zellen während der Embryonalperiode in Kapillarnetzen sich entwickelnder Organe, welche durch Vaskulogenese generieren, nachgewiesen werden konnten, wird angenommen, dass c-kit generell als Vaskulogenesemarker genutzt werden kann (Kritzenberger und Wrobel, 2004). Die Interaktion mit seinem Liganden, dem Stammzellsfaktor, ist essentiell für die Proliferation, Migration, Differenzierung und den Schutz vor Apoptose für verschiedene Stamm- und Progenitorzellen, beispielsweise von Blutzellen, Endothelzellen, Melanozyten, Keimzellen und interstitiellen Zellen (Heissig et al., 2002; Heissig et al., 2003).

Bereits embryonal zeichnet sich ein enger Zusammenhang zwischen hämatopoietischen Stammzellen und Primordialkeimzellen ab. Intraembryonal taucht ein kleiner Anteil hämangioblastischer Vorläuferzellen am Boden der dorsalen Aorta auf (Ema und Rosent, 2003), welche nach neuesten Erkenntnissen als Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region) bezeichnet wird. Diese noch nicht differenzierten Zellen ko-exprimieren c-kit- und CD34 und wandern in späteren Somitenstadien als hämatopoietische Stammzellen zu den blutbildenden Organen (Muller et al., 1994; Wood et al., 1997; Yoshida et al., 1998). c-kit wurde im embryonalen hämatopoietischen Gewebe verschiedener Spezies, auch des Rindes, nachgewiesen (Marcos et al., 1997; Kritzenberger und Wrobel, 2004). Nicht alle c-kit-positiven Zellen der AGM-Region aber sind hämatopoietische Stammzellen. Neben

multipotenten Stammzellen sind in der AGM-Region (Medvinsky und Dzierzak, 1996) sowohl intra- als auch extragonadal primordiale Keimzellen lokalisiert (Wrobel und Suss, 1998).

Im adulten Ovar spielt die Präsenz von c-kit und seinem Liganden offenbar eine wichtige Rolle bei der Follikulogenese (Besmer et al., 1993; Manova et al., 1993; Packer et al., 1994). Mutationen der Gene beider Moleküle bedingen schwerwiegende Defekte der Migration von Oozyten sowie der Follikulogenese, die zur Sterilität führen (Chabot et al., 1988; Huang et al., 1990; Huang et al., 1993). Erst kürzlich wurden zur Funktion des SCF/c-kit-Regulatorsystems bei der Follikulogenese neue Ergebnisse beschrieben. Diese Proteine fungieren möglicherweise interagierend als „Granulosa cell derived Theca-cell organizer“. Granulosazellen produzieren und sezernieren SCF und stimulieren damit die Proliferation und Differenzierung c-kit⁺ ovarieller, interstitieller Stromazellen zu Thekazellen (Parrott und Skinner, 2000; Huang et al., 2001). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass SCF im adulten Ovar in gleicher Weise für die Stammzellrekrutierung verantwortlich sein könnte wie im Knochenmark oder anderen hämatopoietischen Organen.

Antikörper	Zielzellen	Anteil positiver Zellen in %	
PECAM-1 (CD31)	pluripotente Stammzellen der Blastozyste multipotente Stammzellen des Knochenmarks Endothelzellen Leukozyten, T-Lymphozyten, Megakaryozyten, Thrombozyten Subpopulationen von Granulosazellen	BCI AA	65%
		BCI RA1	98%
		BCI RA2	93%
		BCI RN	65%
CD34	mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks hämatopoietische Stammzellen endotheliale Progenitorzellen Endothelzellen kleiner Gefäße (z.B. Kapillaren) Fibroblasten	BCI AA	40%
		BCI RA1	0%
		BCI RA2	0%
		BCI RN	0%
KDR (VEGF-R2, flk-1)	endotheliale Progenitorzellen (KDR-Ko-Expression) Hämangioblasten (c-kit-Ko-Expression)	BCI AA	60%
		BCI RA1	40%
		BCI RA2	40%
		BCI RN	60%
c-kit (CD117)	Hämangioblasten mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks hämatopoietische, angioblastische Progenitorzellen	BCI AA	90%
		BCI RA1	80%
		BCI RA2	71%
		BCI RN	67%
	endotheliale Progenitorzellen (KDR-Ko-Expression) Hämangioblasten (CD34-Ko-Expression)		
	Endothelzellen extragonadale, primordiale Keimzellen Thecaluteinzellen Fibroblasten		

Tabelle 11: Anteil der Zellen der Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1*, *BCI RA2* und *BCI RN*, welche die verwendeten Antikörper banden. In der mittleren Spalte werden die Zielzellen der Antikörper zusammengefasst.

6.2 Ein neues Modell der *in vitro* Vaskulogenese: Zellkultur BCI AA

Gruppen von spezifischen Zellen der Kultur BCI AA zeichneten sich durch charakteristische morphologische Eigenschaften aus. Diese Zellen, welche in verschiedenen Arealen des Zellrasens erschienen, proliferierten besonders intensiv und bildeten Zellcluster. Die initiierte Gefäßentwicklung *in vitro* ging von diesen spezifischen Zellgruppen aus, weshalb sie als „Starting Points“ betitelt wurden. Über Zellbrücken kommunizierten diese spezifischen Zellgruppen und bildeten zunächst einen einfachen Plexus endothelialer Stränge. Infolge von Expansion und Verzweigung waren diese primären Strukturen nach einer bestimmten Zeitspanne der *in vitro*-Kultivierung komplex vernetzt, dreidimensional angeordnet und lumenisiert.

Die Gefäßbildung der Zellkultur BCI AA war durch spezifische Zellen initiiert worden. Die Untersuchungen auf zellulärer, ultrastruktureller und molekularer Ebene zeigten, dass es sich bei diesen Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um Progenitorzellen handelt und dieses *in vitro* Modell damit als erstes Modell der *in vitro* Vaskulogenese adulter boviner endothelialer Progenitorzellen gelten darf.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, dass im bovinen Ovar Stamm- oder Progenitorzellen existieren, die durch *in situ* Differenzierung in Form der Vaskulogenese am Neovaskularisationsprozess im Zuge der Anbildung des Corpus luteum beteiligt sind. Young und Black (2004) konnten im lockeren Bindegewebe aller Organe verschiedener Altersgruppen sowohl von Tieren als auch des Menschen nicht nur linienuntergeordnete Progenitorzellen (uni-, bi-, tri-, multipotent), sondern auch primitive, nicht-linienuntergeordnete, pluripotente Stammzellen nachweisen.

Progenitorzellen besitzen charakteristische morphologische Eigenschaften (Quirici et al., 2001; Young und Black, 2004), welche Parallelen zu den in dieser Studie beschriebenen spezifischen Zellgruppen der „Starting Points“ aufweisen. Die endotheliale Progenitorzelle hat eine längliche bis spindelige Form, nach *in vitro* Aussaat proliferiert sie stark, wird adherent und bildet Zellcluster aus. Ingram und Kollegen definierten 2004 in ihrer Studie „Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood“ die Differenzierungsschritte primitiver endothelialer Progenitorzellen zu murenen Endothelzellen basierend auf ihrem Potential zu proliferieren und klonogene Zellcluster zu formen. Sie fanden, dass die primitivste Form endothelialer Progenitorzellen (High Proliferative Potential Colony Forming Cell, HPP-ECFC) fähig ist, sekundäre und tertiäre Zellcluster zu bilden, welche aus mehr als 50 Zellen bestehen. Die folgende, weniger primitive Stufe der Progenitorzellen (Low Proliferative Potential Colony Forming Cell, LPP-ECFC) ist im Stande,

Zellcluster mit mehr als 50 Zellen zu bilden, aber keine sekundären und tertiären Zellcluster. Aus den LPP-ECFC gehen Zellcluster (Endothelial Cell Cluster) hervor, die aus weniger als 50 endothelialen Progenitoren bestehen. Daraus differenzieren schließlich Endothelzellen (Mature Differentiated Endothelium) ohne Potential zur Ausbildung klonogener Zellcluster (Ingram et al., 2004). Die Zellen der „Starting Points“ der vorliegenden Untersuchung bildeten innerhalb der ersten sieben Tage *in vitro* Kultivierung Zellcluster mit mehr als 50 Zellen. Nach der Definition nach Ingram et al. (2004) entsprechen die Zellen in den Clustern der „Starting Points“ somit den LPP-ECFC.

Immature Zellen zeigen eine rege mitotische Aktivität und Ansprechbarkeit auf Wachstumsfaktoren, welche eine schnelle Differenzierung der Zellen verursachen (Young und Black, 2004; Young et al., 2004). Infolge Substitution spezifischer proangiogener Faktoren entwickeln endotheliale Progenitorzellen *in vitro* die Fähigkeit, nach Vernetzung von Zellclustern über Zellausläufer, tubuläre Strukturen zu bilden (Asahara et al., 1997; Di Stefano et al., 2002; Bompais et al., 2004).

Die Kultur *BCI AA* zeigte in den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen hochaktive Zellen bezüglich ihres Metabolismus und der Biosynthese, welche typisch sind für immature Endothelzellen (Welt et al., 1990). In hoher Anzahl waren im feingranuliert erscheinenden Zytoplasma über den gesamten Zelleib hinweg Ribosomen und Polyribosomen sowie Glykogengranula verteilt. Ebenso zeigten sich zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ. Die Mitochondrien waren insbesondere in Kernnähe und in der Peripherie unmittelbar an der Plasmamembran lokalisiert.

Eine hohe Anzahl von Mitochondrien stehen für eine hohe respiratorische Kapazität sowie für eine wiederholte Mitose und Biosynthese (Spanel-Borowski und Mayerhofer, 1987; Sinowatz, 2000). Raues endoplasmatisches Retikulum war zahlreich vorhanden und kam gleichmäßig verteilt im Zytoplasma als auch vermehrt in Zellkernumgebung vor. Raues endoplasmatisches Retikulum ist besonders gut in Zellen entwickelt, die auf den Export von Proteinen spezialisiert sind (Spanel-Borowski und Mayerhofer, 1987; Sinowatz, 2000).

Die immunzytochemischen Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigten nach 3 Tagen Inkubation in DMEM⁺ (Erhaltungsmedium ohne Wachstumsfaktoren) 35% **PECAM-1**-negative Zellen und 40% **CD34**-positive Zellen innerhalb der Zellkultur *BCI AA*. Ein spezifisches Verteilungsmuster PECAM-1-positiver Zellen wurde nicht beobachtet. PECAM-1 wurde von den Zellen der Kultur *BCI AA* temporär exprimiert. Bei Untersuchungen, welche zu einem späteren Zeitpunkt (nach 7 bzw. 14 Tagen) durchgeführt wurden, waren annähernd 100% der Zellen dieser Kultur PECAM-1-positiv. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen damit die Einteilung in „frühe“ und „späte“ PECAM-1-positive Zellen der Kultur *BCI AA* zu (Redick und Bautch, 1999; Kanayasu-Toyoda et al., 2003). Unter den CD34-positiven

Zellen dieser Kultur aber war das Verteilungsmuster der mit diesem Antikörper markierten Zellen der „Starting Points“ auffällig. PECAM-1-negative Zellen traten also nur temporär in Erscheinung, parallel dazu konnte die Expression von CD34 in den Zellen der „Starting Points“ nachgewiesen werden. Nach Asahara et al. (1997, 1999a, b) kann davon ausgegangen werden, dass die CD34-positiven Zellen die endothelialen Progenitorzellen dieser Kultur repräsentieren. Die Absenz des PECAM-1 spricht für den Maturationsprozess multipotenter „früher“ PECAM-1 positiver Zellen zu Zellen der hämatopoietischen Linie (Redick und Bautch, 1999). Die Zellen, welche eine intensivere Markierung mit CD34 zeigten, befanden sich ausschließlich in den als „Starting Points“ beschriebenen Zellarealen mit höherer Zelldichte, von denen aus die vaskuläre Entwicklung startete. Regelmäßig waren hier in den Zellen innerhalb der „Starting Points“ zahlreiche Mitosen zu beobachten. Benachbarte Zellen zwischen den zellichten Arealen zeigten eine wesentlich schwächere Anfärbung.

Das Verteilungsmuster der **KDR**-positiven Zellen dieser Kultur entsprach denen der CD34-positiven Zellen. Die synchrone Expression von KDR und CD34 in den Zellen der „Starting Points“ und die gleichzeitig auftretenden PECAM-1-negativen Zellen untermauern die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass multipotente Zellen der Kultur zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Differenzierung zu endothelialen Progenitorzellen bzw. zu Endothelzellen durchliefen (Redick und Bautch, 1999; Kanayasu-Toyoda, 2003).

Ein qualitativer Nachweis der VEGF-Rezeptoren **KDR** und **flt-1** auf Transkriptebene, konnte in der vorliegenden Arbeit mittels konventioneller RT-PCR erbracht werden. Entsprechend der immunzytochemischen Untersuchung war die Expression des KDR in den Zellen der Kultur *BC/AA* auch auf molekularer Ebene nachzuweisen.

Eine deutliche Expression war auch von flt-1 zu beobachten. Flt-1 bindet mit hoher Affinität seinen Liganden VEGF-A und gewährleistet damit kontrollierte Proliferation, die Entstehung geordneter tubulärer Strukturen und eine organisierte Gefäßmorphologie (Kendall und Thomas, 1993; Drake und Little, 1995; Fong et al., 1995).

Die höchste Intensität der Markierung mit **c-kit** fand sich fokal in den „Starting Points. Die benachbarten Zellen zwischen den zellichten Arealen zeigten eine schwächere Anfärbung. Dies zeigt, dass eine hohe Anzahl SCF-empfindlicher Zellen innerhalb der hier untersuchten Zellkultur existiert. SCF wird, wie beschrieben, von verschiedenen Zellen des Ovars produziert. Im adulten Organismus steuert SCF die Rekrutierung, Differenzierung und Proliferation von Stammzellen in zahlreichen Geweben (Gentry et al., 1998; Parrott und Skinner, 2000; Huang et al., 2001; Heissig et al., 2002; Heissig et al., 2003). Möglicherweise fungiert SCF in gleicher Weise im Ovar und transferiert Stammzellen oder endotheliale

Vorläuferzellen in einen vaskulogenen Status. Dieses Konzept wird im Fall der Zellkultur *BCI AA* durch die c-kit-positiven Zellen der „Starting Points“ bestätigt, da sich diese Zellen zu Zellclustern formieren und sich in kapillarähnlichen Strukturen durch einen der Vaskulogenese gleichenden Prozess organisieren.

Die Herkunft der Progenitorzellen der Kultur *BCI AA* ist nicht bekannt. Mehrere Möglichkeiten können diskutiert werden:

Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass Endothelzellkulturen ruhende endotheliale Progenitorzellen beherbergen, welche als Reservezellen dienen und gegebenenfalls infolge der Exposition spezifischer Wachstumsfaktoren bei der *in vitro* Kultivierung aktiviert werden (Ingram et al., 2005). Gleichermassen könnten Endothelzellen per se während ihrer Lebensspanne hinweg einen gewissen plastischen, immaturren Charakter bewahren, welcher hier noch vorliegen könnte (Condorelli et al., 2001; Ingram et al., 2005). Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die hier beschriebene Kultur bei der Isolierung mit Stamm- oder Progenitorzellen aus dem ovariellen Stroma kontaminiert wurde (Bukovsky et al., 2004; Johnson et al., 2004; Young und Black, 2004; Bukovsky et al., 2005). Letztendlich könnten endotheliale Progenitoren durch bestimmte Stimuli, beispielsweise einen hohen Serumöstradiolspiegel, auch aus dem Knochenmark oder dem zirkulierenden Blut rekrutiert worden sein (Asahara et al., 1999a; Asahara et al., 1999b; Iwakura et al., 2003). Östradiol, dessen Sekretion im präovulatorischen Ovar sein Maximum erreicht, induziert endotheliale Progenitorzellen zur Proliferation und Migration (Iwakura et al., 2003; Strehlow et al., 2003; Sugawara et al., 2005).

Die Zellen der Kultur *BCI AA* waren für frühere Studien als Endothelzellen in Reinkultur durch die Aufnahme von acLDL, die Expression des vWF und die Bindung des Lektins Bandeiraea simplicifolia Agglutinin 1, identifiziert worden (Plendl et al., 1996b; Plendl, 1997; Fuchs-Schönleber, 1999). Dies wirft die Frage auf, ob damit die Präsenz endothelialer Progenitoren innerhalb der Zellkultur ausgeschlossen werden kann. Nach Rafii (2000) und Kalka et al. (2000) zeichnet sich die endotheliale Determination multipotenter Stammzellen in weiteren Entwicklungsstadien durch die Expression endothelialspezifischer Oberflächenantigene (vWF, PECAM-1, Vascular Endothelial Cadherin/VE-Cadherin), die Aufnahme von acetyliertem Low-Density Lipoprotein (acLDL), die Bindung für bestimmte Lektine und die Ausbildung endothelzelltypischer morphologischer Merkmale (tubuläre Strukturen) *in vitro* aus. Eine Unterscheidung zwischen hämatopoietischen Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen ist damit möglich, jedoch ist die Trennung zwischen endothelialen Progenitorzellen und ausdifferenzierten Endothelzellen nicht möglich, da bislang noch kein spezifisches Epitop nachgewiesen wurde.

Ganz prinzipiell ist die Definition des Terms „ausdifferenzierte“ oder „mature“ Endothelzelle derzeit noch kaum möglich. Auch in der Gefäßwand adulter Individuen wurden Zellen entdeckt, die über Charakteristika immaturer Zellen verfügen. Die Arbeitsgruppe um Ingram et al. (2005) beschrieb Zellen, welche aus dem endothelialen Monolayer der Gefäßwand der Aorta (HAEC) stammten und sowohl über das proliferative als auch clonogene Potential endothelialer Progenitorzellen verfügen.

	Morphologische Besonderheiten	Immunzytochemie % positiver Zellen		Deutung
Zellkultur BCI AA	"Starting Points" Zellcluster (> 50 Zellen) einfacher Plexus endothelialer Stränge ultrastrukturelle Merkmale hochaktiver Zellen bezüglich Metabolismus und Biosynthese	PECAM-1	65%	65% PECAM-1-positive Zellen sind Endothelzellen 35% PECAM-1-negative Zellen sind multipotente Stammzellen, die zu endothelialen Progenitorzellen differenzieren
		CD34	40%	Zellen, die alle drei Epitope zeigen, entsprechen den endothelialen Progenitorzellen
		KDR	60%	
		c-kit	90%	

Tabelle 12: Morphologische Besonderheiten der Kultur BCI AA, Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen und Deutung der Zusammenhänge.

6.3 Neue Erkenntnisse der *in vitro* Angiogenese: Endothelzellkulturen BCI RA1 und BCI RA2

Im Gegensatz zur Kultur BCI AA startete die Gefäßentwicklung der beiden Zellkulturen BCI RA1 und BCI RA2 *in vitro* in Form einer Umstrukturierung des Monolayers. Ausgehend von einer initialen linearen oder zirkulären Aneinanderreihung und Migration der Endothelzellen, in welche im Laufe der Kultivierungsspanne annähernd alle Endothelzellen des Zellrasens involviert waren, arrangierten sich kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen.

Angiogenese basiert auf der Migration, Proliferation und Bildung tubulärer Strukturen durch Endothelzellen (Bartel und Lametschwandtner, 2000; Patan, 2000; Patan, 2004). Die *in vitro* linear aneinandergereihten Endothelzellen sind vergleichbar mit den während der *in vivo*-Angiogenese durch Migration und Proliferation entstehenden endothelialen Zellsprossen. Da kein Gradient pro-angiogener Faktoren im Kulturmedium vorhanden war, konnte die lineare Aneinanderreihung der Endothelzellen durch Migration und Proliferation nicht zielgerichtet,

sondern verteilt über die Kulturschale an verschiedenen Stellen beobachtet werden. In Anlehnung an das von Lienau et al. (2005) etablierte *in vitro* Modell der Angiogenese humaner Endothelzellen, durchliefen die beiden Zellkulturen *BCI RA1* und *RA2* die Stadien 0-4 (0=Proliferation der Endothelzellen, 1=Subkonfluenter bis konfluenter Monolayer, 2=Lineare Aneinanderreihung und Ringbildung, 3=Bildung kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen planar zum Kulturschalenboden, 4=Organisation eines dreidimensionalen Netzwerkes kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen mit Remodeling) der angiogenen Kaskade. Damit kann die beobachtete Organisation der Endothelzellen in den Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* als Angiogenese bezeichnet werden.

Interessanterweise konnten hierbei aber zwei verschiedene morphologische Phänotypen der Angiogenese beobachtet werden. Während sich die Zellen der Kultur *BCI RA1*, nachdem sie das für Endothelzellen als typisch geltende „Kopfsteinpflastermuster“ ausbildeten, linear und zirkulär anordneten und dadurch direkt in einen angiogenen Status übergingen, fand bei den Zellen der Kultur *BCI RA2* zunächst eine deutliche Reduktion (bis zu 30%) der Zellen statt. Plendl beschrieb bereits 1997 diesen Ablauf der Angiogenese bei Endothelzellen desselben Gelbkörperstadiums und wies nach, dass es sich bei den abgeschwommen Zellen um Trypanblau-positive, also tote Zellen handelte.

Eine potentielle Ursache für die unterschiedlichen Formen der Angiogenese dieser Endothelzellen könnte in dem genauen Zeitpunkt des lutealen Stadiums, in dem die Isolierung der Zellen vorgenommen wurde, liegen. Prinzipiell ist bemerkenswert, dass hochangiogene Kulturen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung isoliert wurden (Plendl et al., 1996a; Plendl et al., 1996b; Plendl, 1997) und dementsprechend starke Angiogenese der Endothelzellen aus diesem Gelbkörperstadium beschrieben wird (Schuster, 2002; Bahramsoltani und Plendl, 2004). Verschiedene Stadien des Regressionsgelbkörpers aber zeigen große Unterschiede in der Angiogenese (Plendl et al., 1996a; Plendl, 2000). Das Corpus luteum als transienter Funktionskörper fällt am Ende des Ovarialzyklus vollständig der Regression anheim. Dabei kommt es im frühen Stadium der Regression des Gelbkörpers zur primären Reduktion der Endothelzellen. In späten Stadien des Regressionsgelbkörpers *in vivo* jedoch tritt eine neue Angiogenesewelle auf (Bisplinghoff et al., 2003). Dementsprechend ließe sich zum einen die Reduktion der Zellen von Kultur *BCI RA2* während der ersten Kultivierungstage erklären (frühe Phase lutealer Regression), zum anderen aber auch die angiogene starke Aktivität der Zellen (späte Phase lutealer Regression mit Angiogenesewelle) der Kultur *BCI RA1*.

Die Endothelzellen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* unterschieden sich auch auf ultrastruktureller Ebene. Abgesehen von den euchromatischen Zellkernen und den freien Ribosomen sowie Polysomen, waren andere Zellorganellen wie Mitochondrien, rER, Golgi-

Stapel, Pinozytosevesikel und freie Vesikel spärlich vorhanden. Nach Welt (1990) zeichnet dies unter anderem reife Endothelzellen aus. Im Gegensatz zu den Zellen der Kultur *BCI RA2* nahm die Anzahl der Organellen in Kultur *BCI RA1* bis zum Tag 42 der Untersuchung zu, was die angiogene Aktivität dieser Kultur weiterhin erklärt.

Die Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* waren **CD34**-negativ und annähernd zu 100% immunopositiv für **PECAM-1**. Dies spricht deutlich dafür, dass es sich um „späte PECAM-1“-positive Zellen handelt, welche die Differenzierung zur Endothelzelllinie bereits vollzogen hatten. Dieses Konzept wird durch das angiogene Wachstumsverhalten dieser Zellen *in vitro* unterstützt (Kanayasu-Toyoda et al., 2003).

Nur 40% der Zellen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* zeigten Markierung ihrer **KDR**-Domänen. Ein spezifisches Verteilungsmuster positiver Zellen ließ sich nicht erkennen. Die Regression der Blutgefäße im Gelbkörper steht in enger funktioneller Beziehung zur Luteolyse. Mit Einsetzen der Luteolyse kommt es zur drastischen Herunterregulierung der VEGF-A-Expression und damit auch seines Rezeptors VEGF-R2 (Goede et al., 1998). Diese Tatsache erklärt die geringe Rate KDR-positiver Zellen in den hier untersuchten Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* aus dem Regressionsgelbkörper. Die qualitative RT-PCR erbrachte eine schwache Genexpressionsstärke von **KDR** in den beiden Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2*. Eine Unterscheidung der beiden Banden hinsichtlich ihrer Stärke war nicht möglich. Dieses Ergebnis bestätigt das Resultat der immunzytochemischen Untersuchung.

Die Expression des **flt-1** konnte in beiden Kulturen demonstriert werden. Während die Genexpressionsstärke in den Zellen der Kultur *BCI RA2* hoch war, war die der Kultur *BCI RA1* schwächer. Flt-1 ist der kompetitive Inhibitor des VEGF-A/flk-1-Systems (Drake und Little, 1995; Fong et al., 1995). Die zellulären Vorgänge der Regression im Corpus luteum cyclicum in der Rückbildung sind die Folge des An- und Ausschaltens eines molekularen Systems, da VEGF-A bei der Regression rapide herunter- und die Expression von flt-1 stark heraufreguliert wird (Augustin, 2000). In den Zellen der Kultur *BCI RA2*, welche geringere Angiogenese zeigte (frühe luteale Phase), war dementsprechend die Genexpressionsstärke von flt-1 höher. In diesem Zusammenhang veranschaulicht der hohe prozentuale Anteil von Apoptosen in Kultur *BCI RA2* einen weiteren Mechanismus, der zur Zellregression führte. Damit sich Gefäßwachstum einstellt, muss ein Gleichgewicht zwischen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren zugunsten der ersteren gewährleistet sein (Folkman, 2000; Carmeliet, 2001). In der Kultur *BCI RA1*, deren Zellen flt-1 deutlich exprimierten, reguliert der Rezeptor die systematische Organisation der späten Angiogenesewelle im Corpus luteum der Rückbildung (Ferrara et al., 2003).

Für eine andere Ursache der unterschiedlichen Formen der Angiogenese in diesem Zusammenhang spricht die Hypothese von Young und Black (2004). Sie beschrieben, dass Kulturen isolierter Zellen, welche massive Differenzierungsschritte *in vitro*, ähnlich den hier beschriebenen aufweisen, durch nicht erkannte Progenitorzellen und/oder pluripotente Stammzellen kontaminiert sind. Diese Zellen verfügen entweder noch nicht über gewebespezifische Charakteristika oder können, wenn dazu stimuliert, gewebespezifische Charakteristika annehmen (Young und Black, 2004). Bei den Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* könnte es sich folglich um eine Kultur von Endothelzellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades handeln. Dafür spricht, dass die angiogene Kaskade zwar im zellulären Monolayer gleichmäßig verteilt begann, dennoch aber zunächst erst einige, später ca. 50 % und erst am Ende alle Endothelzellen an der Ausbildung gefäßähnlicher Strukturen sowie im Anschluss daran an der Arborisierung der tubulären Strukturen beteiligt waren.

In den Zellen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* wurde **c-kit** nachgewiesen. Kapilläre Endothelzellen und hämatopoietische Stammzellen exprimieren c-kit (Matsui et al., 2004). Der Ligand von c-kit (SCF) wird in allen Stadien des Corpus luteum cyclicum von Granulosazellen synthetisiert (Gentry et al., 1998; Huang et al., 2001). Nach Parrott und Skinner (2000) sowie nach Huang et al. (2001) könnte der Stammzellfaktor (Ligand von c-kit) im Ovar in gleicher Weise für die Stammzellrekrutierung verantwortlich sein wie im Knochenmark oder in anderen hämatopoietischen Organen. Nach Gentry (1998) regt der Stammzellfaktor während der lutealen Phase die Differenzierung, Migration und Proliferation c-kit-exprimierender Zellen an, die am Aufbau des Corpus luteum beteiligt sind.

Das hohe Level c-kit positiver Zellen in den Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* indiziert die Interaktion des SCF mit seinem Rezeptor und bestätigt die Hypothese, dass auch in Populationen vaskulärer Zellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung endotheliale Progenitorzellen vorkommen können. Da die Funktion des c-kit im vaskulären Endothel bislang ungeklärt ist (Matsui, 2004), bleibt offen, ob der SCF im kapillären Endothel (des Corpus luteum) in gleicher Weise wirkt, wie im Knochenmark.

	Morphologische Besonderheiten	Immunzytochemie % positiver Zellen	Deutung
Zellkultur BCI RA1	Umstrukturierung des Monolayers und Angiogenese „Kopfsteinpflastermuster“ direkter Übergang in angiogenen Status Zellorganellen spärlich, später 28.-42. Tag <i>in vitro</i> Zunahme der Organellenanzahl	PECAM-1 98%	"späte" PECAM-1-positive und CD34-negative Zellen entsprechen Endothelzellen, die die Differenzierung zur endothelialen Zelllinie vollzogen haben
		CD34 0%	
		KDR 40%	
		c-kit 80%	der Ligand des c-kit (SCF) rekrutiert Stammzellen von Endothelzellen und Granulosazellen
Zellkultur BCI RA2	Umstrukturierung des Monolayers und Angiogenese initiale Reduktion der Zellen (bis zu 30%), danach Übergang in angiogenen Status Zellorganellen spärlich	PECAM-1 93%	"späte" PECAM-1-positive und CD34-negative Zellen entsprechen Endothelzellen, die die Differenzierung zur endothelialen Zelllinie vollzogen haben
		CD34 0%	
		KDR 40%	
		c-kit 71%	der Rezeptor wird in der frühen lutealen Regression herunterreguliert, seine Funktion ist im Endothel unbekannt

Tabelle 13: Morphologische Besonderheiten der Kulturen BCI RA1 und BCI RA2, Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen und Deutung der Zusammenhänge.

6.4 Bipotente Vorläuferzellen von Endothelzellen und Granulosazellen? Zellkultur *BCI RN*

Die Zellen der Kultur *BCI RN* persistierten während des gesamten Kultivierungszeitraums im zweidimensionalen Monolayerstadium. Sie zeigten keine Potenz zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass diese nicht-angiogenen Zellen aus einem späten Stadium der lutealen Regression stammen, in welchem die Endothelzellen weder intrinsische noch extrinsische Informationen zur Gefäßbildung umsetzen. Andererseits könnte es sich bei den Zellen auch um ruhende Zellen handeln, welche einen spezifischen Stimulus benötigen, der nicht im Kulturmedium vorhanden war (Fuchs-Schönleber, 1999).

Auffällig an der Kultur *BCI RN* waren die zwei verschiedenen Erscheinungsformen der Zellen, nämlich große polygonale und spindelförmige Typen. Bei beiden Zelltypen ließen sich deutliche zytoplasmatische granuläre Strukturen beobachten. Es wurde kein für Endothelzellen typisches „Kopfsteinpflastermuster“ ausgebildet, stattdessen zogen sich planare, girlandenförmige Zellstraßen durch den Zellrasen.

Im Rahmen ihrer Dissertationen (Leitung J. Plendl) charakterisierten Fuchs-Schönleber (1999) und Stadler (1997) Granulosazellkulturen. Das von Fuchs-Schönleber beschriebene Zellbild von Granulosazellen *in vitro* zeigte deutliche morphologische Übereinstimmung mit dem der Kultur *BCI RN*. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass Granulosazellen isoliert wurden, welche angiogene Eigenschaften zeigten und Moleküle exprimierten, die in der Anfangsphase der Angiogenese bei Endothelzellen eine Rolle spielen (Plendl et al., 2002b; Plendl et al., 2002c; Plendl und Hirschberg, 2004b; Plendl und Hirschberg, 2004a). Diese Granulosazellen migrierten, proliferierten und ordneten sich in tubulären Strukturen an. Sowohl das Transkript des VEGF als auch das seines Rezeptoren flt-1 und KDR wurde nachgewiesen. Plendl et al. vermuteten, dass es sich um eine physiologische vaskuläre Mimikry handelte, welche bisher nur für die Vaskularisierung bestimmter Tumoren beschrieben worden war (Plendl et al., 2002b; Plendl et al., 2002c).

Es stellt sich somit die Frage, ob es sich bei der Kultur *BCI RN* um Endothelzellen, um Granulosazellen oder um eine Mischkultur aus beiden handelt.

An dieser Stelle ist ausdrücklich hervorzuheben, dass die Identität und Reinheit der Kultur mit spezifischen Endothelzellmarkern geprüft wurde. Es wurde beispielsweise die *in vitro* Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), die Expression des von Willebrand Faktors (vWF) und des Angiotensin Converting Enzyms (ACE) und die zelluläre Bindung des Lektins *Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin I (BSA I) positiv festgestellt. Daher

kann zunächst davon ausgegangen werden, dass es sich bei Zellkultur *BCI RN* um eine Reinkultur bestehend aus Endothelzellen handelt (Plendl et al., 1993; Plendl et al., 1995; Plendl et al., 1996a; Plendl et al., 1996b; Plendl et al., 2002b; Plendl et al., 2002c).

Die eigenen Ergebnisse sowie die genannten Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe lassen aus verschiedenen, im folgenden Abschnitt diskutierten Gründen aber durchaus die Annahme zu, dass es sich bei der Kultur *RN* um eine Kultur bipotenter Zellen handeln könnte, welche sowohl zu Endothel- als auch zu Granulosazellen differenzieren kann. Dies wird unterstützt durch Untersuchungen von Spanel-Borowski et al. (1990). Eine von ihr bereits vielfach analysierte und als „Zellpopulation 5“ betitelte Endothelzellkultur aus dem bovinen Corpus luteum entpuppte sich nach weiteren Untersuchungen als Population immaturer Granulosazellen (Spanel-Borowski und van der Bosch, 1990; Spanel-Borowski und Fenyves, 1994; Spanel-Borowski et al., 1994a; Spanel-Borowski et al., 1994b; Spanel-Borowski et al., 1994c; Davis et al., 2003). Entsprechend den Granulosazellen aus antralen kleinen Follikeln, vermochten die „Typ 5“ Zellen kleine Mengen Progesteron zu produzieren und reagierten auf die Behandlung mit dem luteinisierenden Hormon (LH) (Spanel-Borowski et al., 1994a; Davis et al., 2003). „Zellpopulation 5“ war ursprünglich u. a. mit den oben genannten und von Plendl et al. (Plendl et al., 1993; Plendl et al., 1995; Plendl et al., 1996a; Plendl et al., 1996b; Plendl, 2000; Plendl et al., 2002b; Plendl et al., 2002c) ebenso angewandten Endothelmarkern identifiziert und isoliert worden. Es stellte sich heraus, dass Endothelzellen und Granulosazellen gewisse antigene Eigenschaften teilen. Dementsprechende Ergebnisse erzielten auch andere Arbeitsgruppen. Antcak und Van Blerkom (2000) legten dar, dass sich Subpopulationen humaner und muriner ovarieller Granulosazellen wie spezialisierte endothelartige Zellen verhalten, die tubuläre Strukturen bilden und unter Hypoxie endotheliale Marker exprimieren. Sie demonstrierten, dass Granulosazellen mit einigen Markern reagieren, welche standardmäßig für die Identifikation von Endothelzellen herangezogen werden (Antczak und Van Blerkom, 2000). Im Kreise von Spanel-Borowski (Davis et al., 2003) wurde daher spekuliert, dass die „Typ 5“ Zellen möglicherweise gemeinsame Vorläuferzellen der folliculären und vaskulären Zellen im bovinen Corpus luteum repräsentieren könnten.

Besonders interessant waren die Resultate ultrastruktureller Untersuchungen der Kultur *BCI RN*, welche, ähnlich der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen, den granulosazell-ähnlichen Charakter der Zellen bestätigte. Während diese Zellen im Phasenkontrastmikroskop einen wenig proliferativen, nicht angiogenen Eindruck erweckten, zeigten sie, verglichen mit den anderen drei Kulturen, alle ultrastrukturellen Merkmale hochaktiver Zellen, z.B. zahlreiche Mitochondrien, einen ausgeprägten Golgi-Apparat und reichlich rER, welches z.T. dilatierte Zisternen zeigte. Ebenso beschrieb die Gruppe um

Spanel-Borowski (1994a) einen prominenten Golgi-Apparat, reichlich raues ER mit dilatierten Zisternen und eine geringe proliferative Aktivität bei den Zellen der „Zellkultur 5“.

Als morphologische Besonderheit traten in den Zellen der Kultur *BCI RN* intrazelluläre Strukturen mit lipidartigem Inhalt auf. Solche Strukturen waren herdförmig angeordnet und häufig von kleinen Vesikeln und Stapeln des rauen endoplasmatischen Retikulums umgeben. Auffällig waren auch zahlreiche in den Zellen befindliche Glykogendepots. Diese Merkmale wurden auch in den „Typ 5“ Zellen beschrieben (Spanel-Borowski, 1991; Spanel-Borowski et al., 1994a).

Granulosazellen zeigen bestimmte ultrastrukturelle Kennzeichen der Luteinisierung, wie insbesondere das Vorkommen von Lipidtropfen und Glykogendepots. Die Lipide gelten als Vorstufe der Steroidhormon- bzw. Progesteronsynthese (Stadler, 1997; Sinowatz et al., 1998).

Auf weitere Gemeinsamkeiten der Kultur *BCI RN* mit Granulosazellen verweisen die Zellkontakte. *BCI RN* zeigte sowohl Desmosomen (Maculae adherentes) als auch Gap junctions. Letztere wurden in der vorliegenden Arbeit nur in der Kultur *BCI RN* nachgewiesen. Immature Granulosazellen zeigen Maculae adherentes und Gap junctions *in vivo* und *in vitro* (Amsterdam und Rotmensch, 1987). Gap junctions zählen zu den kommunizierenden Verbindungen, welche eine Passage von Ionen und kleinen Molekülen vom Zytoplasma einer Zelle in das der Nachbarzelle ermöglichen (Sinowatz, 2000). Nach der Ovulation proliferieren und differenzieren die Zellen im Corpus luteum rasch und für diesen Prozess sind Gap junctions sehr wichtig. Sehr schnell werden Moleküle wie Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine direkt von Zelle zu Zelle übertragen (Redmer et al., 1991; Grazul-Bilska et al., 1997). Zwischen kleinen und großen Luteinzellen verschiedener Tierspezies wurden Gap junctions nachgewiesen (Khan-Dawood, 1997). Entsprechend zu den hier vorliegenden Ergebnissen, können Gap junctions bei Endothelzellen nicht nachgewiesen werden (Larson und Sheridan, 1985). Redmer und Reynolds (1996) hingegen halten Gap junctions bei Endothelzellen im Anbildungsgelbkörper zum direkten Kontakt zwischen Lutein- und Endothelzellen für möglich. In späteren Stadien des Zyklus existieren diese nicht mehr, da die Kapillaren von einer Basalmembran umgeben sind und deshalb direkter Kontakt bzw. Stoffaustausch nicht mehr gegeben ist (Zheng et al., 1993).

Tubuläre Mitochondrien und glattes ER gelten als typische Merkmale antraler Granulosazellen (Sinowatz, 2000). Fuchs-Schönleber (1999) konnte allerdings weder *in vitro* noch *in vivo* ein Vorherrschen der Mitochondrien vom Tubulus-Typ in den von ihr charakterisierten, antralen Granulosazellen belegen. Die Granulosazellen enthielten vermehrt Mitochondrien vom

Crista-Typ und nur wenige vom Tubulus-Typ. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden in den Zellen der Kultur *BCI RN* keine Mitochondrien vom Tubulus-Typ detektiert.

Glattes ER wurde sowohl in „Typ 5“ Zellen von Spanel-Borowski (1991), als auch in der hier untersuchten Kultur *BCI RN* nicht identifiziert. Diese Form des ER liegt meist in Zellen mit einem gesteigerten Lipidstoffwechsel vor, denn in den Membranen des glatten ER sind die Enzyme zur Synthese von Lipoproteinen gestapelt und Teile der Glukoneogenese verankert (Liebich, 2003).

Ein wichtiges Merkmal für Granulosazellen ist es, während der lutealen Regression sowohl *in vivo* als auch *in vitro* dem programmierten Zelltod anheim zu fallen (Hughes und Gorospe, 1991; Tilly et al., 1992). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen war der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur *BCI RN* mit insgesamt 11% beträchtlich.

Niswender (1985) und Schwall (1986) stellten erstmals die Hypothese auf, dass unter anderem Stammzellen für das Wachstum des Corpus luteum verantwortlich sind. Spanel-Borowski et al. (1994a; Davis et al., 2003) griffen diese Überlegung auf und erwogen, dass die „Typ 5 Zellen“ als gemeinsame Vorläuferzellen der Granulosazellen und der vaskulären Zellen solche Stammzellen repräsentieren könnten. Nach Spanel-Borowski et al. (1994a) wären diese Stammzellen am Ende ihrer proliferativen Lebensspanne und am Anfang der Luteinisierungsperiode. Somit ließe sich die Absenz bestimmter steroidogener Organellen und die geringe Proliferationsrate der „Typ 5 Zellen“ erklären.

Immature Endothelzellen werden charakterisiert als Zellen mit großem Organellenreichtum, Lipideinschlüssen und Glykogendepots. Ihre intrazelluläre Adhärenz ist wenig dauerhaft, sie besitzen eine hohe Permeabilität (Alimov et al., 1989). Ähnliche Befunde zeigten auch die hier untersuchten Zellen der Kultur *BCI RN*.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die Zellen der Kultur *BCI RN* Repräsentanten einer plastischen Population von Zellen sind, die im adulten Organismus existieren, simultan Eigenschaften von Endothelzellen und Granulosazellen zeigen und möglicherweise die Vorläuferzellen beider genannter Zellspezies darstellen. Um die exakte Identifizierung solcher Zellen sicher zu stellen, müssten die funktionellen granulosazelltypischen Eigenschaften dieser Zellen, darunter auch der Nachweis der Progesteronsynthese, systematisch untersucht werden, was im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt wurde.

Die Zellen waren immunonegativ für **CD34**. Dies zeigt an, dass es sich nicht um Zellen der hämatopoietischen Differenzierungsreihe handelt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Differenzierungsprozess erfolgte, weil 35% der Zellen dieser Kultur nach 3 Tagen Inkubation im Erhaltungsmedium DMEM⁺ **PECAM-1-negativ** waren. Da die Zellen der Kultur *BCI RN* morphologische Merkmale von Granulosazellen und Endothelzellen zeigten, können die 35% PECAM-1-negativen Zellen als Anteil bipotenter Vorläuferzellen von endothelialen Progenitorzellen bzw. Endothelzellen (Kanayasu-Toyoda et al., 2003; Li et al., 2005) sowie von Granulosazellen (Niswender et al., 1985; Schwall et al., 1986; Spanel-Borowski et al., 1994a; Davis et al., 2003) gedeutet werden. Die Tatsache, dass Subpopulationen von Granulosazellen unter bestimmten Bedingungen fähig sind, PECAM-1 zu exprimieren (Antczak und Van Blerkom, 2000), bestätigt die Hypothese, dass Endothelzellen und Granulosazellen aus einer gemeinsamen, bipotenten Stammzelle generieren können. Der Differenzierungsprozess war nach Zugabe proangiogener Faktoren beendet, da dann alle Zellen Immunopositivität für PECAM-1 zeigten (Kanayasu-Toyoda et al., 2003; Li et al., 2005).

Der Anteil **KDR**-negativer Zellen betrug 40%. In vergleichbarer Weise wie PECAM-1 können auch die KDR-negativen Zellen als Repräsentanten der bipotenten Vorläuferzellen genannter Zellspezies gewertet werden, da KDR ein früher Marker der endothelialen Zelllinie ist (Drake und Fleming, 2000). Auch KDR wird von Subpopulationen der Granulosazellen exprimiert (Plendl et al., 2002b; Plendl et al., 2002c; Plendl und Hirschberg, 2004b; Plendl und Hirschberg, 2004a). Entsprechend der oben genannten Ergebnisse weist also auch dieses Ergebnis auf die nahe Verwandtschaft beider Zellarten hin.

Die Determination zur endothelialen Linie wird durch die immunzytochemische Markierung mit KDR (60%) und durch die Demonstration der KDR-Expression mittels qualitativer RT-PCR angezeigt.

Eine eindrucksvolle Parallele zur Lokalisation des **PECAM-1** und des **KDR** wurde durch die Untersuchungen von **CD117** dargestellt: 33% c-kit-negative Zellen wurden in der Kultur *BCI RN* nachgewiesen. Da c-kit nur von Thekaluteinzellen, deren stromalen Vorläuferzellen und Endothelzellen exprimiert wird, nicht aber von Granulosazellen (Gentry et al., 1998; Brankin et al., 2004), darf dieses Ergebnis im Licht der bereits diskutierten immunzytochemischen Untersuchungen als offensichtliches Indiz dafür gelten, dass die c-kit-negativen Zellen bipotente Vorläuferzellen von Endothel- und Granulosazellen sind. Diese ca. 35% PECAM-1-negativen, KDR-negativen und c-kit-negativen Zellen weisen weder eine endgültige Determination zur Endothelzelllinie noch zur Granulosazelllinie auf.

Flt-1, der nur mittels qualitativer RT-PCR untersucht wurde, zeigte keine Expression in den Zellen der Kultur *BCI RN*. Da der Rezeptor als kompetitiver Hemmer von VEGF fungiert

(Ferrara und Gerber, 2001; Ferrara et al., 2003), liefert dieses Ergebnis einen weiteren Hinweis für den granulosazellartigen Charakter dieser Kultur: Trotz Expression des KDR findet keine Angiogenese statt.

	Morphologische Besonderheiten	Immunzytochemie % positiver Zellen		Deutung
Zellkultur BCI RN	zwei verschiedenen Erscheinungsformen der Zellen	PECAM-1	65%	65% PECAM-1-positive Zellen sind Endothelzellen 35% PECAM-1-negative Zellen entsprechen multi- oder bipotenten Stammzellen, die zu Endothelzellen oder Granulosazellen bzw. deren Progenitorzellen differenzieren können
	granulosazellartige Morphologie			
	persistieren im zweidimensionalen Monolayer, planare, girlandenförmige Zellstraßen	CD34	0%	keine Zellen der hämatopoietischen Differenzierungsreihe
	Reinheit der Kultur mit Endothelzellmarkern geprüft			
	ultrastrukturelle Merkmale hochaktiver Zellen bezüglich Metabolismus und Biosynthese zytoplasmatische granuläre Strukturen Gap junctions, Desmosomen	KDR	60%	60% KDR-positive Zellen sind endotheliale Progenitorzellen oder Endothelzellen 40% KDR-negative Zellen entsprechen multi- oder bipotenten Stammzellen, die zu Endothelzellen oder Granulosazellen differenzieren können
	Kennzeichen der Luteinisierung: intrazelluläre Strukturen mit lipidartigem Inhalt zahlreiche Glykogendepots			
	prozentualer Anteil apoptotischer Zellen 15%	c-kit	67%	67% c-kit-positive Zellen sind endotheliale Progenitorzellen oder Endothelzellen 33% c-kit-negative Zellen entsprechen multi- oder bipotenten Stammzellen, die zu Granulosazellen bzw. deren Progenitorzellen differenzieren können

Tabelle 14: Morphologische Besonderheiten der Kultur *BCI RN*, Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen und Deutung der Zusammenhänge.

6.5 Vaskulogenese und Angiogenese *in vitro*: Unterschiede in der Lumenbildung

In der vorliegenden Arbeit wurden angiogene Kulturen beschrieben, die ein komplexes, kapillarähnliches Netz mit kontinuierlichem Lumen *in vitro* bildeten.

Verschiedene zelluläre Mechanismen, die zur Lumenisierung von Gefäßen führten, ließen sich bei den Endothelzellen der Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2* beobachten.

Von Paku (1998) wurde ein Mechanismus der Lumenbildung beschrieben, der durch kreisförmige Umbiegung der Zellkörper von Endothelzellen entsteht. Das anschließende Vereinigen der Zellenden führt zu einem zentralen Lumen, welches im Durchmesser nur von einer Zelle begrenzt sein kann (Paku, 1998). Anzeichen für diesen Mechanismus konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich bei der Zellkultur *BCI AA* beobachtet werden.

Sehr offensichtlich war das Erscheinen intrazellulärer Vakuolen im Zuge der Lumenbildung, wie es 1980 erstmals von Folkman und Haudenschild und später von anderen Autoren (Davis und Camarillo, 1996; Meyer et al., 1997; Yang et al., 1999; Davis et al., 2000; Bayless und Davis, 2002) beschrieben wurde. Im Zuge der Lumenisierung erscheinen intrazelluläre Vakuolen, deren Durchmesser zunimmt. Schließlich verschmelzen sie zu einer großen Vakuole. Nach Folkman und Haudenschild (1980) entsteht das Lumen durch Vereinigung der Vakuolen benachbarter Endothelzellen. Diese Form der Lumenbildung wurde bei den Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2* beobachtet.

Nach der Theorie von Meyer (1997) erfolgt nach der Fusion intrazellulärer Vakuolen mit interzellulären Spalträumen die weitere Ausdehnung des Lumens durch Apoptose der Zellen im Zentrum des Sprosses, sowie durch das Einschleiben weiterer Endothelzellen zwischen diejenigen, die das Lumen bereits auskleiden. Da in den Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2* zahlreiche tubuläre Strukturen vorkamen, welche von mehr als einer Zelle ummantelt wurden, wird davon ausgegangen, dass dieser Mechanismus auch in den hier untersuchten Zellkulturen zum Tragen kam. Dieses wird unterstützt durch die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung der Apoptosen in nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Präparaten. Morphologische Charakteristika umfassten die Kondensation des Kernchromatins, eine hochgradige Schrumpfung der Zelle und die Entstehung von apoptotischen Körperchen. In der vorliegenden Untersuchung wurde zwischen frühen und späten Apoptosen differenziert. Als frühe Apoptose galt die Chromatinkondensation, die sich am Saum des Kerns einer Zelle als dunkler Rand zeigte. Späte Apoptosen wurden charakterisiert als vollständige Kondensation des Chromatins (dunkler Kern) und beginnende Zellschrumpfung mit einem Kern-Plasmaverhältnis zugunsten des Kerns, bis hin zur kompletten Schrumpfung der Zelle.

Es ist anzumerken, dass bei den ultrastrukturellen Untersuchungen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* nach 42 Tagen in Kultur regelmäßig röhrenartige Hohlräume in Quer- und Längsschnitten beobachtet wurden, jedoch waren intrazelluläre Vakuolen bei der Kultur *BCI RA1* nicht und bei der Zellkultur *BCI RA2* nur spärlich zu detektieren. In der lichtmikroskopischen Darstellung der Zellen in Semidünnschnitt-Präparaten, nach Richardson gefärbt, aber waren zahlreiche Vakuolen nachweisbar. Die Ursache dieses Phänomens beruht auf der Tatsache, dass die Semidünnschnitt-Präparate in hoher Anzahl in Serienschnitten angefertigt wurden und Zellen oder Anteile von Zellen nicht verloren gehen konnten. Endothelzellen sind ein äußerst fragiles Arbeitsmaterial. Das Ablösen der Zellen aus den Kulturschalen für die ultrastrukturelle Untersuchung bedarf höchster Vorsicht, es ist fast unmöglich den Zellrasen in einer Ebene im Epon einzubetten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zur detaillierten Beschreibung der Gefäßbildung *in vitro*, viele verschiedene Schnittebenen angefertigt werden müssen um der Dreidimensionalität des Zellrasens zu erfassen.

Ein wesentlicher Unterschied bei der Lumenisierung zwischen den Kulturen der Anbildung (*BCI AA*) und Rückbildung (*BCI RA1* und *BCI RA2*) manifestierte sich in folgender Beobachtung:

Die hoch aktiven Zellen der Kultur *BCI AA* proliferierten in den ersten Tagen der *in vitro* Kultivierung sehr stark und bildeten Cluster, von welchen aus die *in vitro* Gefäßbildung startete. Die Lumenisierung zu endothelialen Röhren ging bei *BCI AA* von diesen als „Starting Points“ identifizierten Zellclustern aus. Mittels der mit May-Grünwald-Giemsa gefärbten histologischen Präparate konnte die Kinetik der Ausbreitung zentraler Lumina in zentrifugaler Richtung beobachtet werden. Innerhalb der Zellen der „Starting Points“ wurden zunächst einzelne, später Gruppen von Zellen mit großen intrazellulären Vakuolen beobachtet. Diese Vakuolen traten in *BCI AA* wesentlich früher auf als in den Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2*. Die benachbarten Zellen mit großen intrazellulären Vakuolen der Kultur *BCI AA* vereinigten sich. Auf diese Weise entstanden kapillarähnliche endotheliale Röhren, die sich in die Peripherie ausdehnten. Innerhalb solider endothelialer Stränge, welche von den Zellclustern ausstrahlten, trat eine Front von Zellen mit intrazellulären Vakuolen auf, welche miteinander konfluieren. Diese Entwicklung schritt von zentral nach peripher, bis schließlich einzelne Systeme kommunizierender endothelialer Röhren im Zellrasen entstanden waren, die sich später miteinander vernetzten. Die Lumenisierung endothelialer Stränge wurde bisher nur an Modellen der Angiogenese beschrieben (Davis und Camarillo, 1996; Meyer et al., 1997; Yang et al., 1999; Davis et al., 2000; Bayless und Davis, 2002). Im Fall der Zellkultur *BCI AA* entstanden kapillarartige Strukturen jedoch ausgehend von sich vernetzenden Zellclustern im Rahmen der Vaskulogenese. Die Lumenisierung endothelialer Stränge im Zuge der Vaskulogenese

und die gezeigte Chronologie der Entstehung kontinuierlicher Lumina wurde hier erstmals beschrieben.

6.6 Vaskulogenese und Angiogenese *in vitro*: Dreidimensionales Wachstum und Adhäsionsmoleküle

Die systematische Organisation der Endothelzellen in ein ausgereiftes kardiovaskuläres System ist das Resultat einer komplexen Serie von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die von Zelladhäsionsmolekülen gelenkt werden. Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle die als transmembranes Element der Basalmembran das intrazelluläre Zytoskelett mit extrazellulären Matrixkomponenten verbinden. Die Konjugation der endothelialen Integrine mit der extrazellulären Matrix hat neben der strukturellen Funktion auch für die Migration, Proliferation und Differenzierung wichtige Bedeutung (Ekblom et al., 1986; Sternlicht und Werb, 2001). Dabei interagieren die Integrine der Zellen unter anderem direkt mit der Matrix und initiieren so Signalkaskaden, die die Differenzierung der Zellen beeinflussen.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Untersuchungsergebnisse verweisen auf die Funktion der Integrine und der extrazellulären Matrix (ECM) bei der Gefäßbildung im bovinen Corpus luteum.

6.6.1 Das Integrin CD29

Eine deutliche Darstellung des Integrins der β 1-Familie CD29 gelang an den Membranen der Endothelzellen aller Kulturen. Insbesondere die kommunizierenden Zellgrenzen waren deutlich angefärbt.

Integrine der β 1-Familie sind Rezeptoren für Kollagen I und IV sowie für Laminin, Fibronectin und Vitronectin der extrazellulären Matrix (Haas und Plow, 1994). β 1-Integrine spielen aber auch eine Rolle bei der interzellulären Adhäsion (Haas und Plow, 1994). Die Leit- und Ankerfunktion der Adhäsionsmoleküle für die Invasion der aktivierten Endothelzellen in die Umgebung stellen die hier erzielten Ergebnisse unter Beweis. Die Lokalisation der Integrine lässt Rückschlüsse auf die Kommunikation der tubulären Strukturen mit der ECM zu. Bei den ultrastrukturellen Untersuchungen dieser Studie wurde Produktion und Exkretion fibrillären Materials festgestellt. Teilweise waren die Zellen an dem fibrillären Material über Semidesmosomen verankert. Zellkontakte sind Bereiche der Plasmamembran mit maximaler Expression von Adhäsionsmolekülen (Iivanainen et al., 2003). Um kapillarähnliche Strukturen *in vitro* entwickeln zu können, synthetisieren die Endothelzellen bestimmte Komponenten der extrazellulären Matrix und bilden sich dadurch ihr eigenes, dreidimensionales Substrat (Auerbach, 2003; Lienau et al., 2005). Dieses dient als

Stützskelett für die Migration und Differenzierung zu kapillarähnlichen Strukturen (Lienau, 2003, Lienau et al., 2005). Besonders augenscheinlich hoben sich in der vorliegenden Untersuchung durch die Markierung der Integrine dreidimensionale Gefäßstrukturen vom teilweise persistierenden zweidimensionalen Zellrasen ab. Entsprechendes galt auch für die deutliche Darstellung des zentralen Lumens innerhalb der tubulären Strukturen.

CD29 ist in zwei Phasen der angiogenen Kaskade unabdingbar, nämlich bei der Migration der Endothelzellen zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen und bei der Entstehung von Vakuolen, die schließlich zu einem Lumen konfluieren (Kubota et al., 1996; Gamble et al., 1999). Das Integrin CD29 war auf der Oberfläche der Zellen der Kulturen *BCI AA* und *BCI RN* gleichmäßig verteilt. Es bestand kein spezifisches Verteilungsmuster der immunopositiv reagierenden Zellen. Ein Unterschied der Immunopositivität dagegen manifestierte sich innerhalb der Endothelzellen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA 2*. Grundsätzlich war CD29 auf annähernd allen Zellen dieser beiden Kulturen nachzuweisen, jedoch beschränkte sich die deutliche Lokalisation auf Zellen, die sich an Ringstrukturen beteiligten und in tubulären Strukturen angeordnet waren. Zellen, welche nicht in die Stränge eingegliedert waren, waren schwach oder gar nicht angefärbt. Das Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle differiert offenbar 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). Es wäre denkbar, dass es innerhalb der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* verschieden aktive Zellen gibt, nämlich früh angiogene und spät angiogene. Schuster (2002) gab an, dass sich Endothelzellen im Verlauf der Angiogenese in Zellen mit und ohne angiogene Potenz differenzieren. Nach Vittet (1996) wechselt das Expressionsmuster endothelialer Marker temporär, während der verschiedenen Stadien der Zellmaturation werden die meisten Marker auf den selben Zellen noch ko-exprimiert (Vittet et al., 1996).

Die Präsenz des Integrins war auch auf der Oberfläche der Zellen der nicht angiogenen Kultur *BCI RN* deutlich erkennbar. Interessanterweise ist die Expression der $\beta 1$ -Integrine bei Oozyten, Granulosazellen, Thecazellen und im Corpus luteum nachweisbar (Burns et al., 2002). Sie erfüllen im Ovar wichtige Aufgaben bei der Differenzierung und Proliferation der Luteinzellen im Corpus luteum (Fujiwara et al., 1998; Lehmann et al., 2000; Burns et al., 2002). Die potentielle Präsenz bipotenter Vorläuferzellen von Granulosa- und Endothelzellen in dieser Kultur wurde in Kapitel 6.4 diskutiert.

6.6.2 Das Integrin CD51/61

Der Nachweis des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins CD 51/61 erbrachte bei den Zellen der Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2* ähnliche Ergebnisse. Es war eine Bindung des Antikörpers gegen das Integrin CD 51/61 zu beobachten. Sowohl tubuläre Strukturen als auch Zellen des

Monolayers am Kulturschalenboden dieser angiogenen Kulturen waren markiert. Insbesondere die kommunizierenden Zellgrenzen stellten sich in der vorliegenden Studie mit dem Integrin gut dar. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden nachgewiesen, dass CD51/61 *in vitro* die Adhäsion, Migration und die Lumenbildung angiogener Endothelzellen unterstützt (Bayless et al., 2000; Leu et al., 2002; Nisato et al., 2003). Besonders an den distalen Enden neu entstehender Kapillarsprosse lokalisiert, reguliert CD51/61-Integrin gezielte Degradation der extrazellulären Matrix und ermöglicht die Invasion und Adhäsion der migrierenden, angiogenen Endothelzellen (Clark et al., 1996).

Die Kultur *BCI RA1* ließ jedoch teilweise Lücken im Lokalisationsmuster dieses Integrins beobachten. Wie im Kapitel 6.3 diskutiert, wird von der Annahme ausgegangen, dass die Zellen der Kultur *BCI RA1* aus der späten lutealen Phase mit Angiogenesewelle stammen. In diesem Kontext verdeutlicht die Absenz des Integrins möglicherweise die fehlende Integrität der kapillarartigen Strukturen im Corpus luteum der späten Regression. Brooks (1994) und Liu et al. (2003) berichteten, dass unter Blockade des Integrins der Vorgang des endothelialen Sprossens zwar ausbleibt und keine neuen Gefäße entstehen, die bereits bestehenden Gefäße aber unbeschadet bleiben.

In den Zellen der Kultur *BCI RN* reagierten nach 28 Tagen nur zytoplasmatische Epitope mit dem Antikörper. Nach 42 Tagen *in vitro* zeigte sich das typische Verteilungsmuster des Integrins auf der Oberfläche der Zellen, mit deutlicher Reaktivität der interzellulären Kontakte. In Anlehnung an den im Kapitel 6.4 diskutierten, granulosazellartigen Phänotypen der Kultur *BCI RN* ist zu sagen, dass α_v -Integrine als Differenzierungsmarker der Granulosazellen gelten. Das Erscheinen der α_v -Integrine auf der Granulosazelloberfläche gilt als initiales Zeichen der Luteinisierung (Honda et al., 1997). Granulosazellen tragen generell während ihrer Differenzierung bestimmte Integrine auf ihrer Oberfläche und der Wechsel der Integrine zeigt die verschiedenen Stadien der Granulosazellendifferenzierung an (Yamada et al., 1999).

6.7 Determinierte Gefäßarchitektur der lutealen Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2 in vitro*

Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten sich die deutlichsten morphologischen Unterschiede zwischen den Endothelzellkulturen in den ersten Tagen der *in vitro* Kultivierung. Nach dem finalen Ausbilden der dreidimensionalen Netzwerke der angiogenen Zellkulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2* zeigte sich ein auffälliger Befund.

Obwohl die Kultur *BCI AA* komplexere und ausgedehntere Netzwerke aufwies, glich ihr Zellbild dem der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2*. Alle drei Kulturen entwickelten somit wabenartige, dreidimensionale, tubuläre Netzwerke. Die zellfreien Lücken innerhalb des Netzwerkes mit einem Durchmesser von 50-100 μm entsprachen damit ungefähr der Größe von ein bis

zwei Granulosazellen. Dies kann kaum zufällig sein, sondern spricht für eine Prädeterminati-
on, sei sie genetisch oder induktiv, durch das ursprüngliche, vor der Isolierung benachbarte
Gewebe des Corpus luteum (Milici et al., 1985; Janzer und Raff, 1987; Vittet et al., 1996;
Aird et al., 1997; St Croix et al., 2000; Carson-Walter et al., 2001). Die Endothelzellen bilde-
ten trotz aller Heterogenität letztendlich die Architektur eines Netzwerkes gefäßähnlicher
Strukturen aus, welches dem Kapillarnetz *in vivo* des Corpus luteum gleicht. Dies wurde hier
erstmals beschrieben und kann als weiterer Hinweis gelten, dass *in vitro* Modelle in vielen
Punkten der Situation *in vivo* gleichen und daher als Ersatz- und Ergänzungsmethode zu
Tierversuchen für viele Studien herangezogen werden können und sollen.

6.8 Maturation und Stabilisierung *in vitro* gebildeter kapillarähnlicher Strukturen

Die Stabilisierung und somit die Maturation der jungen Gefäßstrukturen impliziert einen
Proliferations- sowie Migrationsstop und das Ende der extrazellulären Proteolyse. Daraufhin
erfolgt der Aufbau der Basalmembran und des umliegenden interstitiellen Gewebes
(Ausprunk und Folkman, 1977; Jain, 2003).

Die Zellen aller untersuchten Endothelzellkulturen zeigten eine intensive Synthese
extrazellulärer Matrix. Diese wurde sowohl intrazellulär als auch extrazellulär beobachtet.
Der extrazelluläre Anteil war innerhalb tubulärer Strukturen und in unmittelbarer Umgebung
der Zellen vorzufinden. Das fibrilläre Material ist Bestandteil der für den Erhalt der tubulären
Strukturen notwendigen Basalmembran. Es hat sich gezeigt, dass die Endothelzellen *in vitro*
entsprechend den *in vivo* Verhältnissen verschiedene Komponenten der Basalmembran
bilden und sezernieren. Als spezialisierte Form der extrazellulären Matrix grenzt die
Basalmembran direkt an der basalen Oberfläche der Endothelzellen an. Ihre Bestandteile
Kollagen IV, Laminin, Heparansulfat, Proteoglykan und Fibronectin werden weitgehend vom
Endothel selbst synthetisiert und konnten in endothelialen Reinkulturen bereits auch in
Arbeiten von Kramer et al. (1984), Tilling et al. (2002), Iivanainen et al. (2003) und Lienau et
al. (2005) nachgewiesen werden.

Ein besonderer und hier erstmals beschriebener Befund war das abschnittweise Auftreten
einer zweiten Zellschicht tubulärer Strukturen der Zellkultur *BCI AA* nach 63 Tagen Kultivie-
rung. Diese einzeln auftretenden, flachen Zellen waren der luminalen Zellschicht außen eng
angelernt. In keinem Fall trat eine ungeordnete oder mehrlagige Anordnung in Erscheinung.
Während der Stabilisierungsphase kommt es *in vivo* bei den meisten Gefäßen zur Anlage-
rung von Perizyten. Im Corpus luteum kennzeichnet die Rekrutierung von Perizyten die Rei-

fung des Gefäßbettes. Sie umgeben die Kapillaren und stabilisieren sie (Augustin, 2000). Das vorliegende Zellbild könnte somit als Analogie der Situation *in vivo* interpretiert werden. Der Ursprung der Perizyten ist bis heute nicht mit letzter Sicherheit geklärt. Es werden Fibroblasten, Endothelzellen und nach neueren Erkenntnissen auch vaskuläre Muskelzellen angegeben (Nicosia und Villaschi, 1999; Ozerdem und Stallcup, 2003; Betsholtz et al., 2005; Song et al., 2005). Angesichts der in der vorliegenden Studie zutage tretenden, hohen Plastizität der vaskulogenen Zellkultur *BCI AA*, ist eine Transdifferenzierung in Perizyten denkbar (Doherty und Canfield, 1999; Condorelli et al., 2001; Yokomizo et al., 2001; Song et al., 2005). Den Beweis dafür könnte nur eine Darstellung spezifischer Perizytenmarker liefern. Die spezifische Darstellung von Perizyten aber gestaltet sich schwierig. Mehrere Moleküle, wie beispielsweise PDGFR β (Hellstrom et al., 1999) oder Annexin 5A (Anxa 5) (Brachvogel et al., 2005), werden zu diesem Zweck eingesetzt, die Ergebnisse allerdings sind widersprüchlich und für das bovine System nicht etabliert. Auch erste eigene Pilotstudien ergaben Schwierigkeiten bei der Etablierung von Perizytenmarkern im bovinen System. Deshalb sind weiterführende Studien notwendig und in der Arbeitsgruppe anvisiert, um diesen interessanten Befund aufzuklären.

Im Gegensatz zur eindeutig definierten Polarität von Endothelzellen *in vivo*, ist die Bestimmung der Polarität *in vitro* kultivierter Endothelzellen schwierig und verschiedene Studien zeigen aufgrund unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen divergierende Ergebnisse (Lienau et al., 2005). Bei der hier vorliegenden Untersuchung zeigten die Zellen der Kultur *BCI AA* nach 63 Tagen der *in vitro* Kultivierung, analog zur *in vivo*-Situation, eine Polarität mit nach innen gewandter luminaler und nach außen gerichteter abluminaler Seite. Damit demonstriert die vorgestellte Kultur *BCI AA* einen weiteren Beweis für die Realitätsnähe der *in vitro* Situation.

6.9 Ausblick

Die Heterogenität von Endothelzellen im bovinen Ovar hinsichtlich ihres Maturationsgrades und ihrer Herkunft zeigt an, dass zukünftig bei Eingriffen, welche die Gefäßentwicklung modifizieren, bedacht werden sollte, dass zum Spektrum der Zellen, welche auf lösliche Faktoren reagieren, auch (endotheliale) Progenitoren zählen. Dies eröffnet die Möglichkeit einer Optimierung der Effizienz therapeutischer Maßnahmen, die darauf zielen, hemmend oder anregend auf das Gefäßwachstum zu wirken.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit sind eine Reihe weiterer Untersuchungen interessant und geplant:

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden in der Zellkultur *BCI AA* des bovinen Corpus luteum cyclicum in Anbildung endotheliale Progenitorzellen und deren Beteiligung am Vorgang der Vaskularisation in Form adulter Vaskulogenese nachgewiesen.

Offen bleibt, aus welcher Quelle die endothelialen Progenitorzellen stammen. Verschiedene Möglichkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit in Betracht gezogen:

1. Endothelzellpopulationen beherbergen ruhende endotheliale Progenitorzellen, welche als Reservezellen dienen (Ingram et al., 2005).
2. Endothelzellen per se bewahren während ihrer Lebensspanne hinweg einen gewissen plastischen, immaturen Charakter (Yokomizo et al., 2001; Ingram et al., 2005).
3. Kontamination der Kultur bei der Isolierung mit Stamm- oder Progenitorzellen aus dem ovariellen Stroma (Bukovsky et al., 2004; Johnson et al., 2004; Young und Black, 2004; Bukovsky et al., 2005).
4. Rekrutierung endothelialer Progenitoren aus dem Knochenmark oder dem zirkulierenden Blut (Asahara et al., 1999a; Iwakura et al., 2003).

Ein systematisches Screening parenchymaler und stromaler Anteile des Ovars wäre sinnvoll, um den Ursprung der endothelialen Progenitorzellen zu beleuchten. Insbesondere sollte herausgefunden werden, ob im Ovar endotheliale Progenitorzellen residieren bzw. primitivere Vorstufen aus denen letztere hervorgehen. Es sollte auch determiniert werden, welche Faktoren (Hormone, Zytokine) die Vaskulogenese im Ovar fördern und inhibieren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob dieselben Stammzellen auch an anderen zyklischen Vorgängen des Ovars beteiligt sind.

Ein weiterer besonderer Befund dieser Studie war das abschnittweise Auftreten einer zweiten Zellschicht tubulärer Strukturen der Zellkultur *BCI AA* nach 63 Tagen Kultivierung. Es ist möglich, dass die Zellen dieser zweiten Zellschicht Perizyten sind, welche durch eine Transdifferenzierung aus Endothelzellen hervorgegangen sind. Weiterführende Untersuchungen sollten die eindeutige Identität dieser Zellen klären.

Die Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* zeigten verschiedene morphologische Phänotypen der Angiogenese. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Zuordnung der Zellen in ein frühes und spätes Stadium der lutealen Regression determiniert werden. In den Kulturen wurden aber auch Zellen detektiert, die Stammzellmarker exprimierten. Möglicherweise demonstrieren diese Ergebnisse den plastischen, immaturen Charakter bestimmter endothelialer Subpopulationen. Durch eine single cell analysis kultivierter Endothelzellen könnte der Werdegang solitärer Zellen während der Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen verfolgt werden.

Die Ergebnisse der Zellkultur *BCI RN* indizieren, dass gemeinsame Stammzellen parenchymaler und vaskulärer Zellen im Ovar existieren. Um die exakte Identifizierung dieser Zellen sicher zu stellen, müssten die funktionellen granulosazelltypischen Eigenschaften dieser Zellen, darunter auch der Nachweis der Progesteronsynthese, systematisch untersucht werden.