

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün**

**Die Rolle der residenten Stammzellen der Gefäßwand bei der Bildung der Mikroglia
und Angiogenese im adulten Gehirn**



**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Yaser Al-Zuraiqi
aus IBB (Jemen)**

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Yaser Al-Zuraiqi
aus IBB (Jemen)**

Würzburg, Februar 2019

Referentin: Prof. Dr. Stefanie Kürten
Korreferent: Prof. Dr. Carmen Villmann
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2019
Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Immunsystem im ZNS.....	1
1.2.	Mikroglia im ZNS	2
1.2.1.	Geschichte der Mikroglia	2
1.2.2.	Ontogenese der Mikroglia	3
1.2.3.	Morphologie der Mikroglia	5
1.2.4.	Phänotyp der Mikroglia	6
1.2.5.	Funktion der Mikroglia	7
1.3.	Makrophagen im ZNS.....	8
1.4.	Charakterisierung der Makrophagen und Mikroglia	9
1.5.	Das Blutgefäßsystem	10
1.5.1.	Aufbau und Funktion der Gefäßwand	10
1.5.2.	Vaskulogenese und Angiogenese.....	11
1.6.	Stammzellen	12
1.6.1.	Klassifikation der Vorläuferzellen in der Gefäßwand	13
2.	Zielsetzung	15
3.	Material und Methoden	16
3.1.	Materialien	16
3.1.1.	Geräte.....	16
3.1.2.	Chemikalien.....	16
3.1.3.	Versuchstiere.....	17
3.1.4.	Verwendete Antikörper	17
3.2.	Methoden.....	20
3.2.1.	Brain Ring Assay	20
3.2.2.	Histologische Untersuchung.....	22
3.2.3.	Mikroskopie und Auswertung	24
4.	Ergebnisse.....	25
4.1.	Brain- Ring-Assay (<i>BRA</i>).....	25
4.1.1.	Zeitliche Verlaufsuntersuchung des <i>BRA</i>	25
4.1.2.	Qualitative und semi-quantitative Auswertung mittels HE-Färbung	29
4.2.	Immunhistochemische Charakterisierung des <i>BRA</i>	31
4.2.1.	Immunhistochemische Untersuchung der CD44-Expression.....	31
4.2.2.	Immunhistochemische Untersuchung der CD45-Expression	39
4.2.3.	Untersuchung der Mikroglia-/Makrophagenmarker	43

4.2.3.1.	Untersuchung der F4/80- und IBA-1-Ko-Expression.....	45
4.2.4.	Untersuchung zur Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 und des Endothelzellmarkers CD31 in <i>BRA</i> -Gewebe.....	46
5.	Diskussion	50
5.1.	Der <i>BRA</i> eignet sich als Modell zur Untersuchung der Angiogenese und Charakterisierung der gefäßwandständigen Stammzellen.....	50
5.2.	Gefäßwandständige Stammzellen tragen zur Angiogenese im adulten Gehirn bei.....	54
5.3.	Handelt es sich bei Iba-1(+) Zellen im <i>BRA</i> um Mikroglia?	57
5.4.	Die Hirngefäßwand-residenten Stammzellen besitzen hohes Proliferationspotential.....	60
6.	Schlussfolgerung	61
7.	Zusammenfassung	63
II.	Literaturverzeichnis	65
III.	Abbildungsverzeichnis.....	81
IV.	Tabellenverzeichnis.....	81
V.	Danksagung.....	82

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
α -SMA	Alpha-smooth muscle actin
ARA	Aortic ring assay
BBB	Blut-Hirn-Schranke
BRA	Brain ring assay
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D.h.	Das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dest.	Destilliert
EC	Endothelial stem cell
FACS	Flow cytometry
FCS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämalaun-Eosin
HSCs	Hematopoietic stem cells
Iba-1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IL	Interleukin
INF	Interferon
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6c	Lymphocyte Ag 6C
M	Molar
μ l	Mikroliter
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MEM	Minimum essential medium
NDS	Normal donkey serum
NG2	Neural/glial antigen 2

NGS	Normal goat serum
P/S	Penicillin/streptomycin
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
PFA	Paraformaldehyd
PH	Potentia hydrogenii
RA	Ring assay
ROS	Reactive oxygen species
Sca-1	Stem cells antigen-1
SMCs	Smooth muscle cell
Sog.	Sogenannt
VEGF	Vascular endothelial growth Factor
VWF	Von-Willebrand-Faktor
VW-SCs	Vascular wall-resident stem cells
Z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Das Zentralnervensystem (ZNS) besteht aus Gehirn und Rückenmark und wird hauptsächlich von zwei Zelltypen, nämlich Nervenzellen und Gliazellen, gebildet (1). Unter Gliazellen werden die Oligodendrozyten, Astrozyten, Mikroglia und das Ependym zusammengefasst (2). Die Oligodendrozyten und Astrozyten werden als Makroglia bezeichnet. Die Astrozyten bilden einen großen Teil der Gliazellen im ZNS und spielen eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der neuronalen Funktion und Kontrolle der Blut-Hirn-Schranke (*blood brain barrier* = BBB) (3–5).

Die Oligodendrozyten bilden die Myelinscheide um die Nervenfortsätze, so dass die Neurone eine höhere Leitungsgeschwindigkeit des elektrophysiologischen Aktionspotentials erlangen (6).

1.1. Das Immunsystem im ZNS

Das ZNS wird kontinuierlich durch ein eigenes Immunsystem überwacht. Die Mikroglia sind ein wichtiger Vertreter dieses Immunsystems und ein besonderes Charakteristikum des ZNS. Sie dienen als Schnittstelle zwischen dem adaptiven und erworbenen Immunsystem. Die Mikroglia schützen das Gehirn vor potenzieller Gefahr wie Infektionen oder schädlichen Substanzen. Dadurch sorgen sie für eine optimale Funktion dieses lebenswichtigen Organs und für das Aufrechterhalten seiner Homöostase (7). Die BBB verleiht dem ZNS weitere Besonderheiten: sie dient als Schleuse und lässt selektiv nur bestimmte Agentien oder Zellen von der Blutbahn in das Hirnparenchym (8).

1.2. Mikroglia im ZNS

Mikroglia sind die residenten Makrophagen des ZNS und sind sowohl im Gehirn als auch im Rückenmark und in der Retina anzutreffen (9). Sie machen ca. 5-20 % der gesamten Gliazellen im ZNS aus und sind in verschiedenen ZNS-Regionen in unterschiedlicher Zelldichte und unterschiedlichem Verteilungsmuster zu finden. Diese Zellen spielen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. So besteht ihre Rolle nicht nur darin, als Teil des Immunsystems bei der lokalen Immunabwehr und Eliminierung der eingedrungenen Fremdsubstanzen und Krankheitserreger mitzuwirken, sondern auch bei der Entwicklung und bei Reifungsprozessen des Gehirns während der embryonalen und perinatalen Zeit (10, 11).

1.2.1. Geschichte der Mikroglia

Erstmals wurden die Mikroglia im 19. Jahrhundert von Franz Nissl beschrieben. Er bezeichnete die Mikroglia aufgrund ihrer Morphologie und Beschaffenheit als rote Zellen bzw. Stäbchenzellen. Im Jahr 1913 beschrieb Ramon y Cajal eine Zellpopulation im ZNS, die sich funktionell und morphologisch von Astrozyten und Neuronen unterschied, als drittes Element (12).

Im 19. Jahrhundert führte Del Rio Hortega den Begriff der Mikroglia ein, um diese Zellen von anderen Gliazellen zu unterscheiden. Unter Anwendung der Silberimprägnationstechnik war es ihm gelungen, zwei unterschiedliche Zellpopulationen, nämlich eine große und eine kleine Population, voneinander zu unterscheiden. Unter der kleinen Population werden die residenten ramifizierten „*resting*“ Mikroglia zusammengefasst. Die Neuroglia bzw. Makroglia wurde als Erstes 1856 durch Virchow beschrieben (11, 13).

1.2.2. Ontogenese der Mikroglia

Die Ontogenese der Mikroglia war lange Zeit Gegenstand der kontroversen wissenschaftlichen Diskussionen und kann bis heute als noch nicht abschließend geklärt betrachtet werden. Im Hinblick auf zahlreiche Studien wurde der Ursprung der Mikroglia mesodermal, hämatopoetisch oder ektodermal beschrieben (14).

Del Rio Hortega postulierte 1932 den mesodermalen bzw. nicht-neuroektodermalen Ursprung der Mikroglia (15). Aufgrund mehrerer ähnlichen Merkmale wie bei den Monozyten/Makrophagen, wie beispielsweise der Fähigkeit zur Phagozytose und der zellulären Morphologie, wurde die Herkunft der Mikroglia zunächst eher im Makrophagen-Monozyten-System gesehen (13).

Bereits zu Zeiten von Del Rio Hortega wurde aufgrund der zahlreichen Arbeiten die mögliche neuroektodermale Herkunft der Mikroglia, d.h. eine gemeinsame Herkunft mit den Makroglia, diskutiert (16–18). Diese Überlegung galt bis weit in das 20. Jahrhundert hinein. Hierzu zeigten Fujita und Kitamura, dass sich *in vitro* sowohl die murinen neuronalen Stammzellen als auch Astrozyten zu mikrogliaähnlichen Zellen differenzieren können (19). Das Kultivieren der Astrozyten führte zur Bildung von Mac-1-, Mac-3- und F4/80⁺ Mikroglia-ähnlichen Zellen (20, 21). Außerdem haben die frühen Untersuchungen gezeigt, dass die Mikroglia bereits vor der Entwicklung des Gefäßsystems im ZNS existieren. Darüber hinaus erscheinen die Mikroglia im ZNS bevor die Hämatopoese in Gang gesetzt wird (16, 22). Trotz dieser zahlreichen Studien herrschte kontrovers die Meinung, dass die Mikroglia von der monozytären Zelllinie abstammen und während der embryonalen Entwicklung über Blutstrom, Ventrikelraum und Meningen in das ZNS einwandern (Abb. 1a) (23). Diese Hypothese lässt sich durch den Nachweis ähnlicher Oberflächenmarker und biochemischer Eigenschaften wie bei den Makrophagen unterstützen (15, 24–26).

Allerdings lautet derzeit vor allem die Hypothese, die durch Zell-Tracing-Analysen und genetische Mausmodelle unterstützt wird, dass die Mikroglia während der embryonalen Entwicklung von mesodermalen Stammzellen des Dottersacks abstammen, in das ZNS migrieren und dort bis zum Erwachsenenalter persistieren (Abb. 1b) (27).

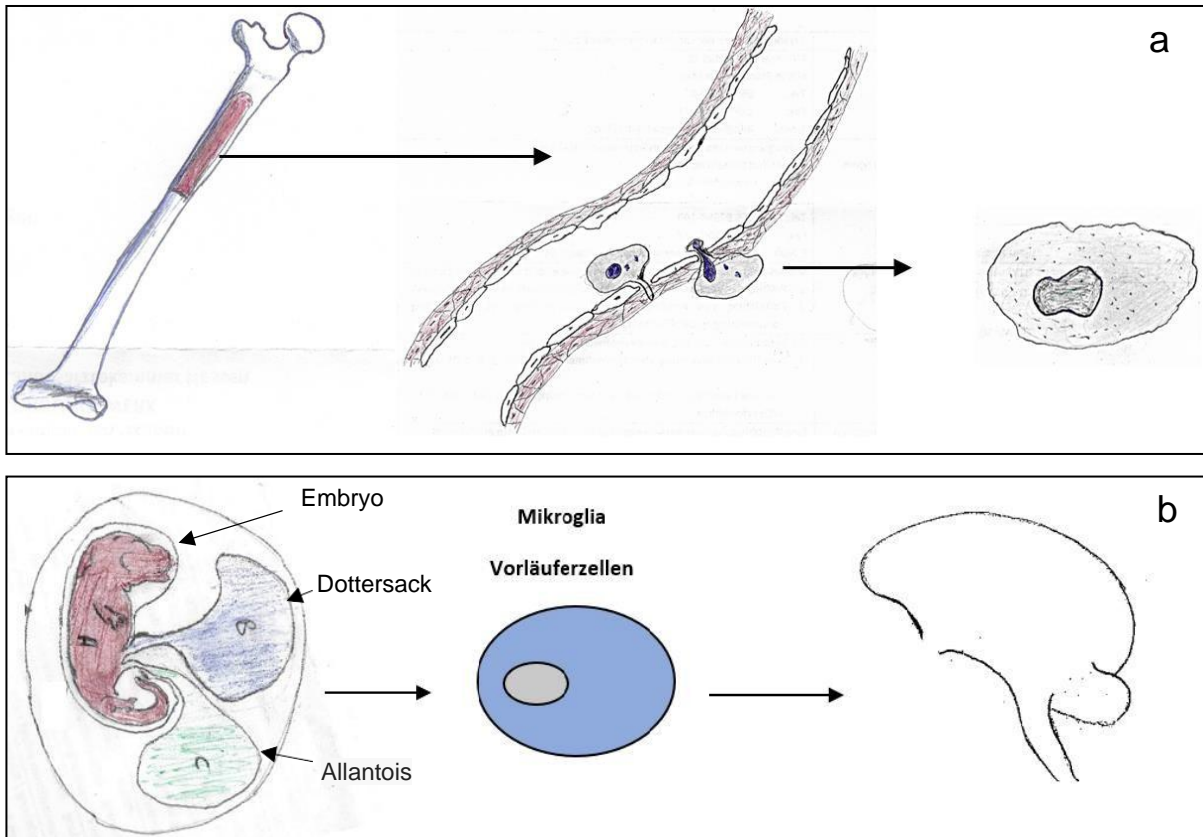


Abbildung 1 Ontogenese der Mikroglia.

a. Makrophagen entwickeln sich aus den im Blut zirkulierenden peripheren Monozyten, die wieder rum aus den hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark entstehen. Monozyten können in das Gewebe einwandern und residieren dort als Gewebemakrophagen. b. Die Abbildung dient der Darstellung des Mikroglieverhältnisses zu den Makrophagen während der embryonalen Entwicklung. Die Mikroglia stammen am 8. embryonalen Tag von den hämatopoetischen Stammzellen des Dottersacks (B) ab und wandern in das ZNS ein. Sie lassen sich am 10-11. embryonalen Tag im Gehirn detektieren.

1.2.3. Morphologie der Mikroglia

Generell lassen sich zwei typische Morphologien der Mikrogliazellen erkennen, nämlich die amöboidförmig phagozytierenden und die ramifizierten ruhenden Mikroglia (28). Auf den ersten Blick erscheinen die Mikroglia in ausgereiften gesunden ZNS-Gewebe ramifiziert und phagozytotisch inaktiv zu sein. Diese Zellen sind durch lange verzweigte Fortsätze und einen kleinen Zellkörper charakterisiert (29). Allerdings sind die Mikroglia unter bestimmten Bedingungen fähig, sich von ruhenden ramifizierten zu reaktiven runden Zellen zu transformieren (30). Die Transformationsprozesse der ruhenden Mikroglia zu aktiven Mikroglia unterliegen mehreren Stadien und werden durch Veränderungen der Zellmorphologie begleitet. Die ramifizierten (ruhenden) Mikroglia ändern ihre Morphologie zu aktiven amöboiden Mikroglia, indem sie ihre langen Ausläufer verkürzen und in ihren Zelleib einziehen. Möglicherweise ändern diese Zellen ihre Morphologie, um den erforderlichen funktionellen Zustand zu erreichen (12).

In vitro weisen die Mikroglia morphologische Heterogenität auf und zeigen oft nicht die typische Ramifizierung, die im ZNS zu finden ist. Hierzu ist eine große Variabilität von spindelförmig oder amöboid geformten Zellen bis hin zu dicken aufgeblähten Zellen mit wenigen kurzen Verzweigungen zu beobachten (31).

1.2.4. Phänotyp der Mikroglia

Das Konzept der verschiedenen Makrophagen-Aktivierungsstatus, also die Transformation von der klassischen Aktivierung zu sogenannter alternativer Aktivierung bzw. von Typ M1 zu Typ M2, welche bei den peripheren Makrophagen vorbekannt ist, lässt sich auch auf die Mikroglia übertragen (32, 33). Analog zu den klassischen Makrophagen kann sich der Phänotyp der Mikroglia nach einer Läsion positiv oder negativ auf die Neuroregeneration auswirken. Außerdem vermittelt der Phänotyp verschiedene Aspekte der Neuroinflammation, Zytotoxizität, Reparatur und Immunsuppression (34). Prinzipiell können vier verschiedenen Phänotypen erkannt werden; nämlich der klassisch aktivierte M1-Typ mit zytotoxischen Eigenschaften; M2a mit alternativer Aktivierung und Beteiligung an Reparatur und Regeneration; M2b mit immunregulatorischem Phänotyp; oder M2c mit erworbenem deaktiviertem Phänotyp (35, 36). Die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps wird durch verschiedene Mediatoren reguliert. Beispielweise führt die Stimulation der Mikroglia durch LPS oder IFN bei Typ M1 zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Im Gegensatz dazu wird durch IL-4/IL-13 bei Typ M2 die Immunantwort unterdrückt und die Gewebereparatur angeregt (33). Allerdings weicht die Immunantwort der Mikroglia von der Immunantwort der zirkulierenden Monozyten ab, die nach einer Schädigung im ZNS den Läsionsort infiltrieren. Die eingewanderten Makrophagen wirken in größerem Ausmaß, v.a. destruktiv, und führen zur Ausdehnung der Gewebeschädigung. Im Gegensatz dazu wirken die residenten Mikroglia eher protektiv und unterdrücken die Immunantwort (37, 38).

1.2.5. Funktion der Mikroglia

Mikroglia sind ein Teil des Immunsystems und dienen als residente Makrophagen des ZNS. Hauptsächlich übernehmen die Mikroglia zwei Funktionen: Immunabwehr und Aufrechterhaltung der ZNS-Homöostase (39).

Die Mikroglia dienen als Wächter des ZNS. Mit ihren langen Ausläufern scannen sie fortlaufend das ZNS und sorgen für eine reibungslose Funktion der Neurone. Sie spüren durchgehend die Krankheitserreger in ihrer Umgebung auf und eliminieren diese durch Phagozytose. Außerdem dienen die Fortsätze als Kommunikationsbrücke zu anderen Zellen des ZNS (17, 39). Sie reagieren schnell auf äußere Reize wie Infektionen oder Traumata und ändern schnell ihre Morphologie zu aktivierten amöboiden phagozytierenden Zellen (40). Darüber hinaus produzieren die Mikroglia aktive Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid, die zur Eliminierung der eingedrungenen Fremdkörper führen (41). Allerdings führt andererseits eine lange oder übermäßige Aktivierung der Mikroglia wie bei den neurodegenerativen Erkrankungen zur Entstehung, Aufrechterhaltung oder Progression einer inflammatorischen Reaktion (42), die sowohl den Krankheitsverlauf als auch die Prognose einer neurodegenerativen Erkrankung negativ beeinflusst (43).

Eine Besonderheit der Mikroglia ist ihre bivalente Funktion. Sie können sowohl neurotoxisch als auch neuroprotektiv wirken (44, 45). Zum einen setzen die Mikroglia diverse Botenstoffe frei, die eine Entzündungsreaktion verursachen und die Aktivierung des erworbenen Immunsystems vermitteln. Zu diesen Botenstoffen gehören u.a. neurotoxische Substanzen, die die Apoptose der Neurone induzieren (46). Zum anderen können die Mikroglia unter pathologischen Bedingungen eine neuroprotektive Rolle spielen oder bei der Unterstützung der Gewebereparatur unterstützend mitwirken (47).

Trotz der wichtigen Rolle der Mikroglia bei der Immunantwort ist ihre besondere Rolle unter den physiologischen Zuständen nicht zu vernachlässigen. Während der embryonalen Entwicklung spielen die Mikroglia eine wichtige Rolle bei der Synaptogenese und somit beim Ausreifen des ZNS (48, 49).

1.3. Makrophagen im ZNS

Im Gegensatz zu Mikroglia, welche unter physiologischen Bedingungen als wichtiger Vertreter des monozytären Systems innerhalb des Hirnparenchyms lokalisiert sind, sind die infiltrierenden Makrophagen im ZNS hauptsächlich im perivaskulären Raum, in den Meningen und im Plexus choroideus anzutreffen. Diese nicht-parenchymalen Makrophagen stammen von den Monozyten bzw. dem monozytären System des peripheren Blus ab und befinden sich im Vergleich zu Mikroglia außerhalb des Hirnparenchyms (50). Allerdings können unter pathologischen Zuständen beispielsweise wie bei einer Inflammation oder neurodegenerativen Erkrankungen auch infiltrierende Makrophagen aus dem Knochenmark im Hirnparenchym nachgewiesen werden (51). Bis vor kurzem waren die infiltrierenden Makrophagen in der klassischen Hinsicht als pathologisch zu betrachten. Allerdings wurde in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend darüber berichtet, dass die infiltrierenden Makrophagen auch bei Reparatur- und Heilungsprozessen eine wichtige Rolle spielen (52).

Die perivaskulären Makrophagen lassen sich im sogenannten „Virchow-Robin Raum“ zwischen dem Endothel und der *Membrana glia limitans perivascularis* lokalisieren. Diese Zellen können zum einen durch ihre typische Morphologie als langgestreckte schlanke Zellen mit kurzen Fortsätzen, zum anderen durch die Expression bestimmter Marker, wie z.B. MHC-II und Cyclooxygenase, von Mikroglia abgegrenzt werden (53, 54).

Die meningealen Makrophagen sind eher runde große Zellen und befinden sich zwischen dem meningealen Epithel und der Basalmembran. Diese Zellen teilen mehr biochemische Eigenschaften mit den perivaskulären Makrophagen als mit den Mikroglia (55).

Hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften ist anzumerken, dass die perivaskulären und meningealen Makrophagen sowie Makrophagen des Plexus choroideus ein gemeinsames Expressionsmuster von CX3CR1, CD11b und CD45^{hi} aufweisen (56, 57) und sie sind v.a. bei der lokalen Immunantwort involviert. Im Fall einer Inflammation werden weitere Monozyten aus dem Blutsystem rekrutiert. Diese infiltrierenden Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Expressionsmuster von Ly6C^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{lo} aufweisen (58, 59).

1.4. Charakterisierung der Makrophagen und Mikroglia

Die Silbercarbonat-Imprägnierung gilt als erste Methode, die zum Nachweis und zur Charakterisierung von Mikroglia verwendet wurde (60). Seit der Einführung der Immunhistochemie können die Mikroglia zuverlässiger nachgewiesen werden. Bei der immunhistochemischen Untersuchung wurden zum Nachweis der Mikroglia einige Antikörper entwickelt, die gegen bestimmte Oberflächen- oder intrazellulär lokalisierte Antigene gerichtet sind. Als einer der ersten wurde der Antikörper gegen CD11b zum Nachweis von Mikroglia und Makrophagen verwendet (61). Weitere Antikörper, die häufig zur Charakterisierung von Mikroglia/Makrophagen verwendet werden, sind anti-F4/80- und anti-Iba-1-Antikörper. Allerdings gelang es auch mit diesem Fortschritt nicht, einen exklusiv spezifischen Marker für Mikroglia zu finden und damit die Mikroglia gegenüber den anderen Makrophagen mit absoluter Sicherheit abzugrenzen (62).

Kürzlich wurden jedoch weitere Marker (Anti-TMEM119) für Mikroglia eingeführt, die spezifischer als bisherige Marker sein sollen (63). Bei TMEM119 handelt sich dabei um ein Protein, welches nur von Mikroglia und nicht von anderen Zellen des monozytären Systems exprimiert werden soll (64). Damit können die Mikroglia im Gegensatz zu anderen Makrophagen, u.a. zu den perivaskulären und meningealen Makrophagen, spezifisch nachgewiesen werden (64).

1.5. Das Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem umfasst das Herz, die Arterien, die Venen und die Kapillaren. Es stellt eine geschlossene Einheit dar und besteht aus hintereinander geschalteten Blutkreislauforganen. Als Arterien werden Gefäße, die das Blut vom Herzen in alle Körperteile zuführen, bezeichnet. Sie verzweigen sich immer weiter in zunehmender Zahl in Arteriolen und schließlich zu Kapillaren. Hier erfolgt der Sauerstoffaustausch zwischen Blut und dem die Blutgefäße umgebenden Gewebe in der Peripherie. Das Kapillarblut wird über postkapilläre Venolen in kleinen Venen gesammelt, die sich wiederum zu großen Venen vereinigen. Im Gegensatz zu den Arterien haben die Venen eine dünne Muskelschicht. Sie dienen dem Transport des Blutes aus der Peripherie zum Herzen zurück (65, 66).

1.5.1. Aufbau und Funktion der Gefäßwand

Die Blutgefäße sind Hohlorgane. Sie bilden ein zusammenhängendes Netz, das den gesamten Körper durchzieht. Die Gefäßwand umschließt einen Hohlraum, in dem das Blut fließt. Die Wand der kleinsten Gefäße, nämlich der Kapillaren, ist meist zweischichtig und besteht aus einer Endothelzellschicht, die das Lumen der Kapillaren auskleidet und einer nicht geschlossenen Schicht von Perizyten, die kontraktile sind. Im Vergleich dazu besteht die Gefäßwand der großen und mittelgroßen Gefäße aus drei Schichten:

- Innere Schicht (Intima, *Tunica intima*): diese ist eine dünne Schicht und besteht aus Endothelzellen und einer subendothelialen Matrix. Sie dient zum einen der Abdichtung der Gefäßwand gegenüber Blut (endotheliale Barriere). Zum anderen sorgt diese Schicht für den Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gefäßwand.
- Mittlere Schicht (Media, *Tunica media*): diese besteht aus glatten Muskelzellen und elastischem Bindegewebe. In Abhängigkeit des Gefäßabschnittes variiert die Dicke der Tunica media und der Anteil des elastischen Bindegewebes sehr.
- Äußere Schicht (Adventitia, *Tunica adventitia*): sie besteht aus Kollagenfasern und elastischen Netzen, umgibt die Blutgefäße nach außen und verankert sie mit dem umliegenden Gewebe. Sie enthält zudem Vasa vasorum und Nervenbündel für die gefäßwandeigene Versorgung.

Die verschiedenen Blutgefäße unterscheiden sich in Länge, Durchmesser und Dicke der Gefäßwand und der einzelnen Schichten. Je nach Funktion der Blutgefäße sind die einzelnen Wandschichten mehr oder weniger stark ausgebildet (67).

1.5.2. Vaskulogenese und Angiogenese

Unter Vaskulogenese versteht man die embryonale *de novo* Gefäßbildung durch sog. Angioblasten oder Hämangioblasten, die embryologisch in den sogenannten „Blutinseln“ (*blood islands*) der Dottersackwand und der Splanchnopleura zu finden sind. Aus diesen mesodermalen Vorläuferzellen (Hämangioblasten) gehen sowohl Endothelzellen als auch Blutzellen hervor. Die Endothelzellen kleiden das Gefäßlumen aus und erfüllen zahlreiche Funktionen, wie beispielweise das Abdichten des Gefäßes (68, 69). Während man über Jahrzehnte hinweg glaubte, dass dies die einzige Quelle der Endothelzellen wäre, konnte man erstmalig 1997 im peripheren Blut zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells* = EPCs) nachweisen (70), die an Orten der Angiogenese, also der Gefäßneubildung herangezogen werden und somit zur Neuformierung der Blutgefäße, wie z. B. bei der Tumoriangiogenese oder Gefäßverletzung, beitragen (70–72).

Als Angiogenese wird die Kapillaraussprossung aus bereits existierenden Gefäßen bezeichnet. Dieser Prozess wurde erstmalig 1971 von J. Folkman beschrieben (73). Bei diesem Prozess lösen sich die bereits reifen Endothelzellen aus dem Zellverband heraus, proliferieren und wandern in die umliegende extrazelluläre Matrix ein. Anschließend vermehren sie sich durch weitere Proliferation und können sich bei geeigneter Mikroumgebung (durch Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF oder FGF-2 zu neuen Blutgefäßen formieren. Bei diesen Prozessen spielen neben den genannten proangiogenetischen Faktoren und Mediatoren wie VEGF-2 und FGF auch weitere Zytokine sowie Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle (74, 75).

Die Vaskulogenese beschränkt sich nicht nur auf die Embryogenese, wie man lange Zeit glaubte, sondern sie findet darüber hinaus auch bei adulten Organismen statt. Um die Vaskulogenese bei Erwachsenen (Gefäßneubildung durch vaskuläre Stamm- und Vorläuferzellen) von der embryonalen Vaskulogenese abgrenzen zu können, wird die erwachsene Vaskulogenese im Allgemeinen als „postnatale Vaskulogenese“ bezeichnet (76, 77). Im Wesentlichen werden die endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und/oder aus dem peripheren Gewebe, welche v. a. durch eine Ischämie oder Gefäßverletzung besonders mobilisiert werden, zur Gefäßneubildung

angeregt (70, 71, 78). Physiologisch ist die Angiogenese bei der Gefäßreparatur und Wundheilung unabdingbar (79). Allerdings spielt die Angiogenese auch unter pathologischen Zuständen wie im Rahmen des Tumorwachstums und der Tumormetastasierung ebenfalls eine wichtige Rolle (80, 81) und trägt eher zu einer Verschlechterung der Krankheitsprognose bei.

1.6. Stammzellen

Das Konzept der Stammzellen entstand Mitte des 19. Jahrhunderts (82). Die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark der Maus zählen zu den ersten Stammzellen, die in der Stammzellforschung studiert wurden (83). Je nach ihrem Differenzierungspotenzial unterscheidet man zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen (84). Totipotente Stammzellen haben das Potential sich zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren und einen ganzen Organismus zu bilden und dabei nicht embryonale als auch extraembryonale Zellen zu liefern. Im Gegensatz zu den totipotenten Stammzellen können die pluripotenten Stammzellen nur embryonale Zellen liefern und sich dabei zu allen Zelltypen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) differenzieren.

Die multipotenten Stammzellen haben die Fähigkeit sich zu verschiedenen Zellen innerhalb des Gewebetyps zu differenzieren. Zu diesen Zellen zählen die hämatopoetischen Stammzellen. Diese Zellen können sich zu verschiedenen Zelltypen der hämatopoetischen Zelllinien differenzieren. Sie kommen nicht nur im Knochenmark, sondern auch in anderen Geweben u.a. im Nabelschnurblut vor (85).

Weiterhin wird zwischen den embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden. Der Begriff der embryonalen Stammzellen dient der Beschreibung bestimmter Stammzellen, die sich in der inneren Zellmasse eines Blastozysten befinden. Diese Zellen können sich zu verschiedenen Zelltypen differenzieren (86). Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen kommen die adulten Stammzellen sowohl im frühen Embryo als auch nach der Geburt vor. Die adulten Stammzellen können aus verschiedenen Geweben wie dem Knochenmark, der Haut und dem Fettgewebe isoliert werden. Sie besitzen das Potential sich zu teilen und zu differenzieren (87).

Ein weiterer Stammzelltyp sind die mesenchymalen Stammzellen. Sie kommen in verschiedenen Geweben wie im Fettgewebe, Knochenmark und in der Haut vor und dienen in erster Linie zur Bildung von Binde- und Stützgeweben (88).

1.6.1. Klassifikation der Vorläuferzellen in der Gefäßwand

Die Blutgefäße dienen hauptsächlich dem Transport von Blut und Nährstoffen zum Gewebe und dem Rücktransport von CO₂ sowie einiger Stoffwechselabfallprodukte. Da jede Zelle des Körpers zum Leben Sauerstoff und Nährstoffe braucht, verläuft das Gefäßsystem weit verzweigt von großen Arterien zu Kapillaren. Allerdings beschränkt sich die Funktion des Gefäßsystems aus heutiger Sicht nicht nur auf die genannten Aufgaben, sondern erstreckt sich auch dahin, dass die von Gefäßwandzellen induzierten Signalwege und abgegebenen Faktoren für die Entwicklung und Morphogenese von Organen eine zentrale Rolle spielen (89–91). Darüber hinaus zeigen neuere Befunde und Erkenntnisse, dass die Blutgefäße kein stilles oder zeitlebens ruhendes Organ sind, sondern auch über ein bedeutsames Potenzial an Erneuerung verfügen, da sie in ihren Wänden Stammzellen enthalten, die die Hämatopoese und Vaskulogenese unterstützen (92–95). Die gefäßwandständigen Stamm- und/oder Vorläuferzellen sitzen hauptsächlich in einer besonderen Zone innerhalb der vaskulären Adventitia, die in Analogie zur embryonalen Vaskulogenese als „vaskulogene Zone“ benannt wurde (93, 95). Die in dieser Zone bisher beschriebenen Stamm- oder Vorläuferzellen weisen mehrheitlich Oberflächenmarker wie CD34 oder Flk1 (VEGFR-2), CD44, c-Kit und in deutlich geringerer Expression CD45 auf (95, 96).

Zahlreiche Studien in den letzten 15 Jahren deuten auf die Bedeutung dieser Stammzellnische sowohl bei der Entstehung von Gefäßkrankheiten wie Atherosklerose und Neointimabildung (97–99), als auch bei Reparatur und Erneuerung der Gefäßwand, aufgrund ihres Potentials zur Differenzierung zu den reifen Gefäßwandzellen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Perizyten hin (93, 100, 101). Darüber hinaus beherbergt die Stammzellnische der Gefäßwand nicht nur vaskuläre Vorläuferzellen, sondern auch multipotente Stammzellen, die sich zu hämatopoetischen Zelltypen differenzieren lassen, wie z.B. Makrophagen oder dendritischen Zellen (94, 96). Dieses breite Spektrum an Differenzierungspotenzial konnte sowohl für menschliche Gefäße (unter Verwendung der Arteria thoracica interna) als auch für Mausgefäße (unter Verwendung der Mauseorta) nachgewiesen werden. Ein geeignetes *ex vivo* Modell für die Analyse der Gefäßwand-residenten Stamm- und Vorläuferzellen bildet das arterielle Sprouting-Assay (ARA), womit beispielsweise gezeigt werden konnte, dass die aus der arteriellen Adventitia stammenden CD34⁺ Zellen in der Lage sind, gefäßförmige Aussprossungen zu bilden

bzw. unter *in vitro* Bedingungen sich in Kapillar-ähnlichen Strukturen zu formieren (95). Diese Zellen spielen bei der postnatalen Vaskulogenese, der Stabilisierung neu gebildeter Gefäße und der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle (95, 100, 102). Außerdem befinden sich in der Gefäßwand residente Stammzellen, die lokal proliferieren und den Zellpool der Makrophagen aufrechterhalten (93, 94, 103). Insgesamt wird für die immunphänotypische Charakterisierung der Gewebe- und/oder Gefäßwand-residenten Stammzellen der Nachweis von Zellmarkern wie CD34, CD44, CD45, CD133, c-Kit und Nestin verwendet (96, 101, 104). Des Weiteren wurden mithilfe der Immunhistochemie und Durchflusszytometrie in der Arterienadventitia einige Zellen charakterisiert, die mesenchymale Eigenschaften wie die Expression des Oberflächenmoleküls CD44 aufweisen. Diese Zellen wurden als „Gefäßwand-residente multipotente mesenchymale Stammzellen“ bezeichnet. *In vitro* können diese Zellen zu verschiedenen Zelltypen wie Adipozyten, Chondrozyten oder Osteozyten differenziert werden und sie verfügen über die Kapazität sich in glatte Muskelzellen und Perizyten zu differenzieren, die *in vitro* und *in vivo* Endothelzellen neu gebildeter Kapillaren von außen ummanteln und die Gefäße somit stabilisieren (93, 101).

2. Zielsetzung

Mikroglia sind die gewebeständigen Makrophagen des ZNS und vertreten somit das angeborene Immunsystem im ZNS, das einerseits für den Schutz des ZNS gegen potentielle pathogene Faktoren verantwortlich ist, aber auch für die Homöostase eine wichtige Rolle spielt und in degenerative ZNS-Erkrankungen involviert ist. Der Ursprung der Mikroglia war lange Zeit umstritten und ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Insgesamt wurde die Herkunft der Mikroglia als mesodermal, hämatopoetisch oder neuroektodermal beschrieben (14). Allerdings unterstützen die jüngsten Studien eher die Hypothese, dass Mikrogliazellen von mesodermalen Vorläufern der Dottersackwand (aus den Blutinseln) abstammen, welche während der embryonalen Entwicklung ins ZNS einwandern, dort proliferieren und bis zum Erwachsenenalter persistieren (16, 105).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob die gefäßwandständigen hämatopoetischen Stammzellen zur Bildung der Mikroglia und Aufrechterhaltung des Mikrogliazellpools beitragen könnten. Weiterhin war in diesem Zusammenhang von großem Interesse, die Rolle der mesenchymalen gefäßwandständigen Stammzellen bei der Angiogenese und Gefäßneubildung im adulten Gehirn zu untersuchen.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde der Brain Ring Assay (*BRA*) etabliert und bezüglich potenzieller Differenzierungswege von Stamm- und Vorläuferzellen aus der Wand der Mausehirngefäße durchgeführt. Das Konzept der *BRA*-Entwicklung erfolgte in Anlehnung an den Aortic Ring Assay (*ARA*) bei der Ratte und wurde im Vorfeld entwickelt, um die Angiogenese *in vitro* zu untersuchen (102). Unter Verwendung der Hirngefäßstücke aus dem Mausgehirn und des damit assoziierten Hirnparenchymgewebes wurden die *BRAs* durchgeführt. Die immunphänotypische Charakterisierung des *BRA* und der Zellen, die dadurch zur Aussprossung aktiviert wurden, erfolgte mit Hilfe der Immunhistochemie für die Marker F4/80, CD45, Iba-1, GFAP, CD34, CD31 CD44, α -SMA, NG2 und Ki67 in Einzel- und/oder Doppelfärbung.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Gerät	Firma
Inkubator	Thermo scientific
Mikroskop	Keyence BZ-9000
Mikrotm	Leica SM2000R
Pipetus akku	Accu jet

3.1.2. Chemikalien

Material	Firma
DePex	Serva
DMEM	Gibco
Eosin	AppliChem
FCS	Gibco
Goat Serum	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin	Chroma
L-Glutamin	Sigma
Natrium-Pyruvat	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Sigma
PureCol, Bovine Collagen I 3,1 mg/ml	Cellsystems

3.1.3. Versuchstiere

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden C57BL/6-Wildtypmäuse verwendet, deren Hirngefäße zur Herstellung der *BRA* präpariert wurden. Sie stammten ursprünglich von Charles River (Sulzfeld) und wurden bis max. zur vierten Generation nachgezüchtet. Gehalten wurden die Tiere im Tierstall des Instituts für Physiologie der Universität Würzburg in einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus mit uneingeschränktem Zugang zu Futter (von Sniff, Soest) und Wasser. Sie waren 8-12 Wochen alt und wogen 16-24 g.

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 46 C57BL/6 Mäuse verwendet. Zum Etablieren des *BRAs* wurden 36 Versuchstiere verwendet. Die übrige Anzahl der Versuchstiere (n= 10) wurde zum Studieren der Kinetik verwendet.

3.1.4. Verwendete Antikörper

3.1.4.1. CD44

CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül bzw. ein Rezeptor für Hyaluronsäure, Zytokine und Wachstumsfaktoren (106). CD44 ist charakteristisch für hämatopoetische sowie andere Stammzellen und essentiell für Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung (107). Es existieren zwei Isoformen, nämlich CD44s und CD44v. Im Vergleich zur CD44s-Isoform wird die CD44v-Isoform auf hämatopoetischen Stammzellen weniger exprimiert. CD44 dient sowohl als ein Stammzellmarker für hämatopoetische Stammzellen, als auch für mesenchymale Stammzellen (107, 108). CD44 ist für Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Adhäsion, *homing* der Stammzellen und Resistenz gegen die Apoptose von großer Bedeutung (108).

3.1.4.2. CD45

Bei CD45 handelt es sich um ein Membranprotein, welches mit Ausnahme von Erythrozyten, von allen hämatopoetischen Zellen und Stammzellen exprimiert wird (109). Eine Mutation von CD45 geht mit einer schweren Immunsuppression einher (110).

3.1.4.3. CD34

CD34 ist ein Membranprotein, welches von hämatopoetischen und unreifen Endothelzellen exprimiert wird. Es spielt bei der Regulation der Hämatopoese im Knochenmark und der hämatopoetischen Stammzellnische eine Rolle (111, 112). Dieses Antigen wird in der klinischen Arbeit zwecks Knochenmarktransplantation

verwendet, um die hämatopoetischen Stammzellen aus der Peripherie zu isolieren (113).

3.1.4.4. F4/80

F4/80 ist ein Adhäsionsmolekül und ein spezifischer Marker für Makrophagen/Mikroglia. Außerdem dient F4/80 als ein Differenzierungsmarker für die Makrophagen (114).

3.1.4.5. Iba-1

Iba-1 ist ein zytoplasmatisches Protein, welches von Makrophagen/Mikroglia exprimiert wird. Unter inflammatorischen Bedingungen führen einige Mediatoren wie INF- γ und IL-1 β zur Überexpression dieses Protein (115).

3.1.4.6. GFAP

GFAP (saurer Gliafaserprotein) ist ein Bestandteil der Intermediärfilamente der Gliazellen und der Astrozyten im ZNS (116). Die Astrozyten dienen als Stützzellen des ZNS und beteiligen sich bei der Regulation der BBB (117). Weiterhin wird GFAP als Marker bei der Diagnostik von Hirntumoren wie Astrozytomen, Glioblastomen und Ependymomen verwendet (116, 118).

3.1.4.7. CD31

CD31 bzw. PECAM-1 ist ein Zelloberflächenprotein, welches von verschiedenen Zellen wie Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten exprimiert wird. *In vivo* wird Anti-CD31 verwendet, um Gefäßendothel nachzuweisen (119). CD31 dient als Zelladhäsionsmolekül, welches für die transendotheliale Migration der Makrophagen besonders unter pathologischen Bedingungen wie Inflammation von großer Bedeutung ist. Außerdem ist CD31 bei der Aktivierung der T-Zellen, Thrombozyten und der Adhäsion der Leukozyten beteiligt (120). Weiterhin spielt es bei der Angiogenese eine essentielle Rolle, was sich bei der Arteriosklerose und beim abdominalen Aortenaneurysma beobachten lässt (121).

3.1.4.8. Glattmuskuläre Aktin (α -SMA)

Das glattmuskuläre Aktin (α -SMA) ist Teil der Mikrofilamente der Zytoskelettproteine, dieses ist in den Gefäßwänden, Lunge und im Stroma verschiedener Gewebe zu finden (122). Glattmuskuläres alpha-Aktin gilt als Marker für glatte Muskelzellen (123).

3.1.4.9. NG2

Das NG2-Proteoglykan ist ein Transmembranprotein. Es wird *in vivo* und *in vitro* verwendet, um diverse Zellpopulationen, u.a. perivaskuläre und Gefäßperizyten, zu identifizieren (124). Im ZNS ist es auf den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten und Perizyten zu identifizieren.

Antikörper	Hersteller	Antigen-Spezies	Verdünnung
CD45	eBioscience	Ratte	1:100
CD44	Abcam	Ratte	1:100
CD34	Abcam	Ratte	1:50
CD31	Abcam	Rabbit	1:100
F4/80	Abcam	Ratte	1:200
Iba-1	Wako	Rabbit	1:500
Ki67	Abcam	Rabbit	1:300
NG2	Biorbyt	Rabbit	1:100
α -SMA	Abcam	Rabbit	1:100
GFAP	Abcam	Rabbit	1:10000

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat anti-mouse Cy5	Abcam	1:500
Goat anti-rabbit Cy5	Abcam	1:500
Goat anti-rat Cy5	Abcam	1:500
Goat anti-mouse Cy3	Abcam	1:500
Goat anti-rabbit Cy3	Abcam	1:500
Goat anti-rat Cy3	Abcam	1:500
Goat anti-mouse Cy2	Abcam	1:500
Goat anti-rabbit Cy2	Abcam	1:500
Goat anti-rat Cy2	Abcam	1:500

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

3.2. Methoden

3.2.1. Brain Ring Assay (*BRA*)

a. Vorbereitungen der Ausgangslösung für den *BRA*

Auf Eis wurden in einer sterilen Werkbank die Zutaten (destilliertes steriles H₂O 39,1%, PureCol, Bovine Collagen I 3,1mg/ml 42,2%, Natrium-Pyruvat 1%, Natrium-Hydrogencarbonat 5%, 10X MEM 10%, L-Glutamin 1%) in einem Reagenzglas zusammen pipettiert und durch Schwenken per Hand gemischt. Ganz wichtig war dabei das Vermeiden von Luftblasen und ein steriles Arbeiten. Anschließend wurde die Lösung für eine Stunde auf Eis durch eine Vakuum-Pumpe entgast. In der Zwischenzeit wurde die Präparation unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

In eine 48-Well-Platte wurden je Well 200 µl der Mischung aufgetragen. Danach wurden die Platten für eine Stunde in den Brutschrank (37 °C/5% CO₂) gelegt. Beim Auftragen war ebenfalls auf das Vermeiden der Luftblasen zu achten. Die hohe Temperatur führte zur Polymerisation der Kollagenmatrix. Danach wurden die präparierten Gefäße vorsichtig mittig in die mit Kollagen beschichteten Wells gelegt. Anschließend wurden die Platten für 10 min zum Antrocknen weiter im Brutschrank (37°/5% CO₂) gehalten. Danach wurden pro Well 200 µl des auf Eis gehaltenen Ansatzes aufgetragen und dann für eine Stunde im Brutschrank auspolymerisiert. Abschließend wurden pro Well 400 µl DMEM + P/S und 20% FCS zugegeben und das Gewebe im Brutschrank (37°C /5% CO₂) kultiviert.

Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Da das Medium im Kühlschrank bei 6 °C aufbewahrt ist, sollte es vor dem Verwenden im Wasserbad aufgewärmt werden.

Gleich nach der Präparation wurden jeweils am Tag 0 frisch isolierte Hirngefäße in Kollagen mit 4% PFA fixiert und histologisch sowie immunhistochemisch untersucht. Zu anderen bestimmten Zeitpunkten wurden ebenfalls 2-3 Wells je Platte mit 4% PFA fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch untersucht.

b. Präparation

Vor dem Ansetzen des Kollagens oder in der Zwischenzeit erfolgte die Präparation der Hirngefäße. Bei allen Arbeitsschritten war auf die Sterilität strikt zu achten. Für die Präparation mussten desinfiziertes Präparierbesteck und mit kalten D-MEM/10%FCS (auf Eis) gefüllte Schälchen/12-Well-Platte, vorbereitet werden.

Das Abtöten der Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation. Das Fell wurde dann mit reichlich 70% Ethanol angefeuchtet. Danach wurde der Schädel geöffnet, das Gehirn vorsichtig entnommen und in eine auf Eis gelagerte, mit Medium gefüllte, Schale gelegt. Dann wurden die Gefäße unter dem Binokular präpariert und in Medium auf Eis gelegt. Zur Orientierung im nächsten Schritt beim Schneiden wurden die Gefäße mit einem kleinen Stückchen Hirngewebe präpariert. Zum Schluss wurden Gewebsreste entsorgt und die präparierten Gefäße für den *BRA* verwendet.

3.2.1.1. Erstellung der Zeitreihe

Bei diesen Experimenten wurde eine Zeitreihe durchgeführt, um das Verhalten des *BRA* über die Zeit zu beobachten. Es wurden fixe Zeitpunkte festgelegt (Tag 0, 5, 10, 15), indem jeweils 2-3 Wells mit 4% PFA über Nacht bei 6 °C fixiert wurden. Vor dem Fixieren wurde das Medium im BAA in den Wells mit 1 ml PBS ausgewaschen. Das Waschen mit PBS diente zum Befreien der *BRA* vom Medium, welches die Färbung und damit die Ergebnisse im negativen Sinn beeinflussen hätte können. Die Fixierung mit PFA führte zur Quervernetzung von Proteinen unter Beteiligung der Aldehydgruppen des Formaldehyds. Dadurch konnte die Proteinstruktur der Gewebe über die Zeit erhalten und zu jedem Zeitpunkt untersucht werden. Nach 24 h wurden die bereits fixierten *BRA* in Paraffin eingebettet.

A. Paraffineinbettung und Anfertigen der Schnittpräparate

Eine Zeitreihe wurde durchgeführt, um den *BRA* zu verschiedenen Zeitpunkten zu erfassen und zu beobachten. Zwei bis drei Wells je Platte wurden zu jedem Zeitpunkt mit 4% PFA über Nacht und bei 6 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die *BRA* mit einer feinen Pinzette aus den Wells vorsichtig entnommen und in Blocks gelegt. Danach wurden die Blocks in 70% Ethanol zum Auswaschen des PFA auf dem Schüttler gehalten. Ethanol wurde mehrmals gewechselt. Die histologischen Untersuchungen wurden an den in Paraffin eingebetteten *BRAs* durchgeführt, welche am Mikrotom in 6-8 µm dünne Schichten geschnitten, in warmes Wasser zum Strecken gebracht und auf Objektträger aufgezogen wurden. Anschließend wurden die Schnitte zum Antrocknen in einem warmen Trockenschrank über Nacht bei 30 °C gebracht. Da die *BRAs* in Paraffin beim Schneiden schwer zu sehen waren, wurden Schnitte unter dem Mikroskop kontinuierlich kontrolliert. Alternativ wurde durch eine HE-Färbung kontrolliert, ob in den Schnitten auch *BRA* dargestellt war.

3.2.2. Histologische Untersuchung

3.2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wird in der Routine zur morphologischen Darstellung der untersuchten Gewebe verwendet. Durch diese Färbung kann ein Überblick über verschiedene Gewebestrukturen erlangt werden. Bei der HE-Färbung binden die positiv geladenen Hämatein-Komplexe an die negativ geladenen Phosphatreste der Nukleinsäure. Hämatoxylin wird zu Hämatein oxidiert und lässt sich als rot darstellen. Hämatoxylin ist eine Färbelösung für die Kernfärbung. In der Hämatoxylinlösung bildet Hämatoxylin mit Aluminiumionen eine Komplexverbindung. Eine selektive Kernfärbung wird durch die Azidität der Färbelösung und einen Überschuss an Alaun erreicht.

Für die morphologische Beurteilung des *BRA* wurde in der vorliegenden Arbeit eine HE-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die *BRAs* in Formaldehyd (4%) fixiert. Nach der Entwässerung wurden die *BRAs* in Paraffin eingelegt und anschließend am Mikrotom geschnitten. Für die HE-Färbung wurden die 6-8 µm dünnen Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Dann fand die Färbung mit Hämalaun statt, um die saure Komponente anzufärben. Für die Gegenfärbung der basischen Strukturen wurden die histologischen Schnitte, nach kurzem Baden in destilliertem Wasser, in Eosin überführt. Abschließend erfolgte die Entwässerung in der aufsteigender Alkoholreihe, Inkubation in Xylol und zuletzt das Eindeckeln mit Depex.

3.2.2.2. Immunhistochemische Färbung

Prinzipiell dient die immunhistochemische Färbung mit Hilfe von markierten Antikörpern der Darstellung von Antigenen innerhalb der Zellen, auf der Zelloberfläche und in der Extrazellulärmatrix des Gewebes.

Die Gewebeschnitte werden bei dieser Methode Antikörpern ausgesetzt, welche spezifische Antigene erkennen. Es gibt eine direkte und eine indirekte Methode zur Immunfärbung. Bei der direkten Methode sind die Antikörper mit einem Marker gekoppelt und können direkt die Epitope nachweisen. Im Vergleich dazu wird bei der indirekten Methode ein Sekundärantikörper verwendet, welcher mit einem Marker gekoppelt ist. Die indirekte Methode verfügt über bessere Signalintensität. Allerdings führt das unspezifische Binden der Sekundärantikörper an anderen Strukturen zur unspezifischen Färbung der Gewebeschnitte und damit zur Zunahme der Hintergrundfärbung. Bei der Immunfluoreszenz binden mit Fluoreszenzmarkern gekoppelte Antikörper an die Epitope, die bei Erregung durch Licht mit bestimmter Wellenlänge sichtbar gemacht werden kann.

Zur Bestimmung der optimalen Antikörper-Konzentration wurde eine Titrationsreihe durchgeführt. Die Antikörper-Konzentrationen bei der immunhistochemischen Färbung wurden wie in Tabelle 1 angegeben verwendet. Bei jeder Färbung wurde parallel eine positive und negative Kontrolle durchgeführt. Dabei wurde eine Über- sowie Unterfixierung des Gewebes vermieden, welche zu falschen Ergebnissen geführt hätte. Die immunhistochemische Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

Die Paraffinschnitte wurden zu Beginn in Xylol entparaffiniert, dann über absteigende Alkoholreihe gewässert und schließlich mit destilliertem Wasser sowie PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Antigendemaskierung, in dem die zu färbenden Schnitte im 10 mM Citratpuffer für 10 min gekocht wurden. Nach dem Abkühlen erfolgte erneut das Waschen in destilliertem Wasser. Die freien Bindungsstelle wurden mit 5% NGS/NDS in PBS blockiert. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem Primär Antikörper über Nacht bei 6 C° inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und für jeweils 5 min wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper in einer dunklen feuchten Kammer für 2 Std. inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit DAPI für 10 min, um die Zellkerne anzufärben. Nach weiteren Waschschritten in PBS und destilliertem Wasser wurden die Präparate eingedeckelt und bei 4 C° im Dunkeln bis zur Aufnahme aufbewahrt.

3.2.3. Mikroskopie und Auswertung

Zur histologischen Auswertung wurde pro Tier (N=10) zu festgelegten Zeitpunkten (Tag 0, 5, 10, 15) die fixierten *BRA* in durchschnittlich 24 Schnitte zerlegt. Im Anschluss wurde jeder 10. Schnitt mit HE gefärbt, um die Stelle mit der am ausgeprägtesten Aussprossung darzustellen. Die jeweils davor und dahinter liegenden Schnitte wurden immunhistochemisch gefärbt: CD31, CD34, CD44, CD44/Ki67, CD44/NG2, CD44/ α -SMA, CD45, CD45/F480, F480/Iba-1, F4/80, Iba-1, GFAP. Anschließend wurden die gefärbten Präparate mikroskopisch dargestellt und fotografiert. Die lichtmikroskopische Darstellung der Gewebeschnitte erfolgte an einem Digitalmikroskop von Keyence in Verbindung mit einer Digitalkamera und motorisiertem Objektisch (Keyence BZ9000). Mit Hilfe des Programmes Image J wurden die Präparate aufgenommen. Für jeden einzelnen histologischen Schnitt erfolgte eine Komplettaufnahme. Des Weiteren wurde zur Darstellung der histologischen Feinheiten eine Aufnahme mit 10er, 20er und 40er Objektiven durchgeführt. Insgesamt wurden 685 Fotos aufgenommen. Davon wurden 584 Fotos ausgewertet. Alle Präparate wurden mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen, um Signale in identischer Intensität zu gewährleisten.

Zuerst wurde das Ausmaß der Aussprossung über die bestimmten Zeitpunkte beurteilt. Danach wurden alle Färbungen durchgeführt. Erst nach Abschluss der Auswertung einer Färbung wurde mit der jeweils nächsten Auswertung begonnen. Das Ausmaß der Färbung wurde nach Augenmaß bestimmt. Zur Beschreibung der Kinetik wurde die Ausprägung der Färbung pro Tier zwischen den festgelegten Zeitpunkten verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Brain- Ring-Assay (*BRA*)

Das Ziel des *BRA* war es, in einem ersten Schritt zu überprüfen, ob und zu welchem Ausmaß hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, beispielsweise Vorläuferzellen für Makrophagen und/oder Mikrogliazellen, in der Wand der Maushirngefäße darzustellen sind. Die Gefäße wurden nach der Präparation in dreidimensionaler Kollagenmatrix eingebettet und im Inkubator für 15 Tage kultiviert. Physiologische Bedingungen wurden hierbei durch das ständige Erneuern des Nährstoffes (DMEM) und permanent konstante Temperatur aufrechterhalten.

In dreidimensionaler Kollagenmatrix können die eingebetteten Gefäßstücke der Maushirngefäße in geeigneten Medien kultiviert, ggf. mit Faktoren stimuliert und somit in ihrer Aktivität zur Aussprossung gebracht werden. Dieses Assay ist angelehnt an den etablierten und international vielfach verwendeten *aortic sprouting assay*, der eingeführt wurde, um Angiogenese zu studieren (125). Später konnte mit Hilfe dieses Assays auch die Differenzierungs- und Proliferationskapazität der Gefäßwand-residenten Stammzellen (*VW-SCs*) untersucht und diese Zellen immunphänotypisch charakterisiert werden (95).

4.1.1. Zeitliche Verlaufsuntersuchung des *BRA*

Zwischen Kulturtag 4-6 nach der Präparation der Gefäße und Platzieren der Gefäßstücke in der Kollagenmatrix kam es zu den ersten unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtbaren Aussprossungen aus dem Gefäßring in das umgebende Kollagengel. Diese waren charakterisiert durch spindelförmig verzweigte Einzelzellen oder kleine Zellstränge (Abb. 2a-b). Die Aussprossung erfolgte vermutlich durch Proliferation und anschließende Migration der daraus hervorgehenden Zellen und/oder durch einfache Migration der Vorläuferzellen aus ihrer Nische in der Gefäßwand. Sie nahm mit der Dauer der Kultivierung zu und erreichte ihr Maximum nach ca. 2 Wochen (Abb. 3, Tabelle 3). Ab dem ca. 21. Kultivierungstag begannen die Zellen eine runde Form anzunehmen.

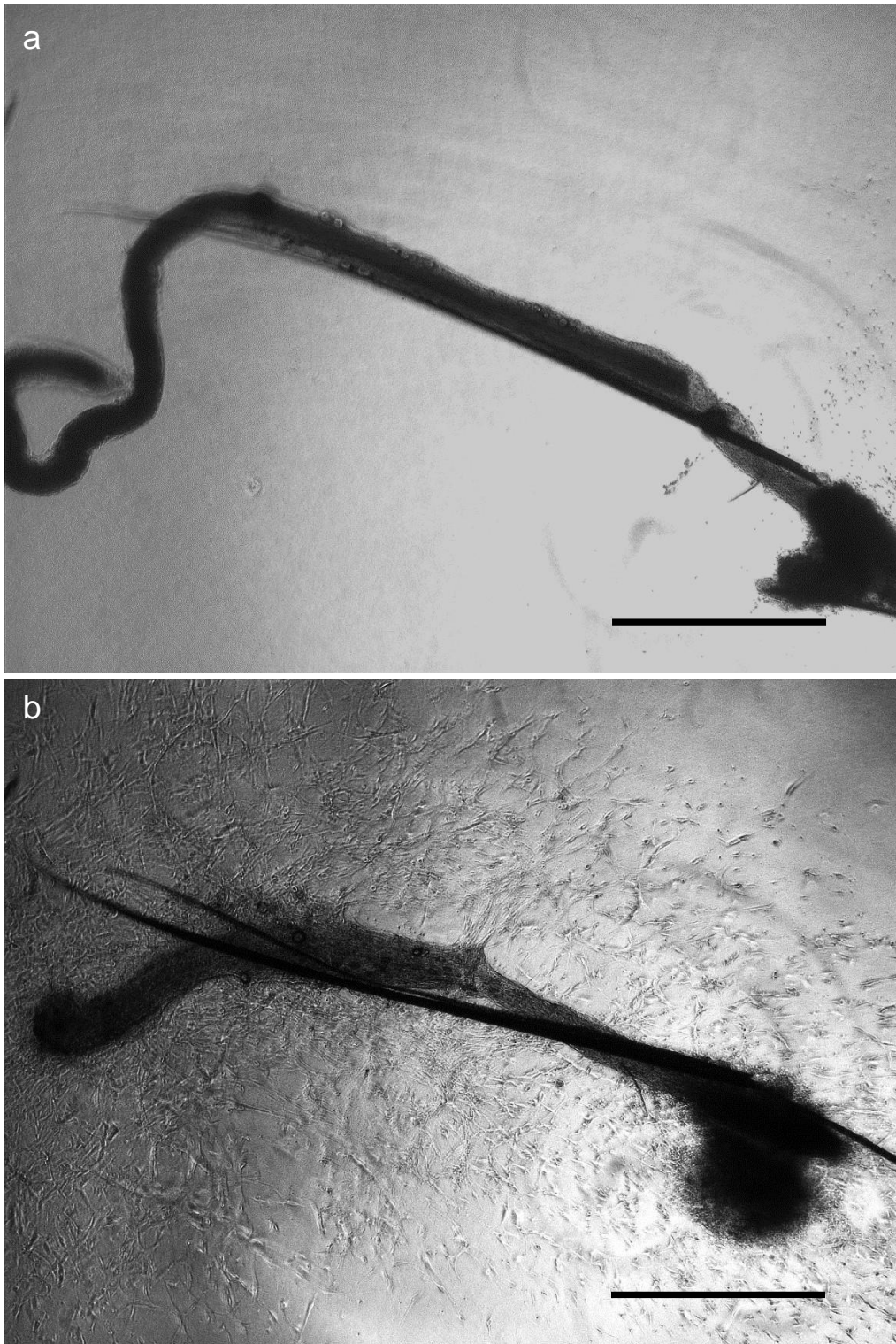


Abbildung 2 Lichtmikroskopische Darstellung des *BRA*.

(a) *BRA* am Tag 0 in 3D-Kollagenmatrix. Maßstab 400 μm . (b) Der *BRA* zeigte am Tag 10 ausgeprägte Aussprossung. Maßstab 400 μm . Die Daten sind repräsentativ für $n = 46$ Mäuse.

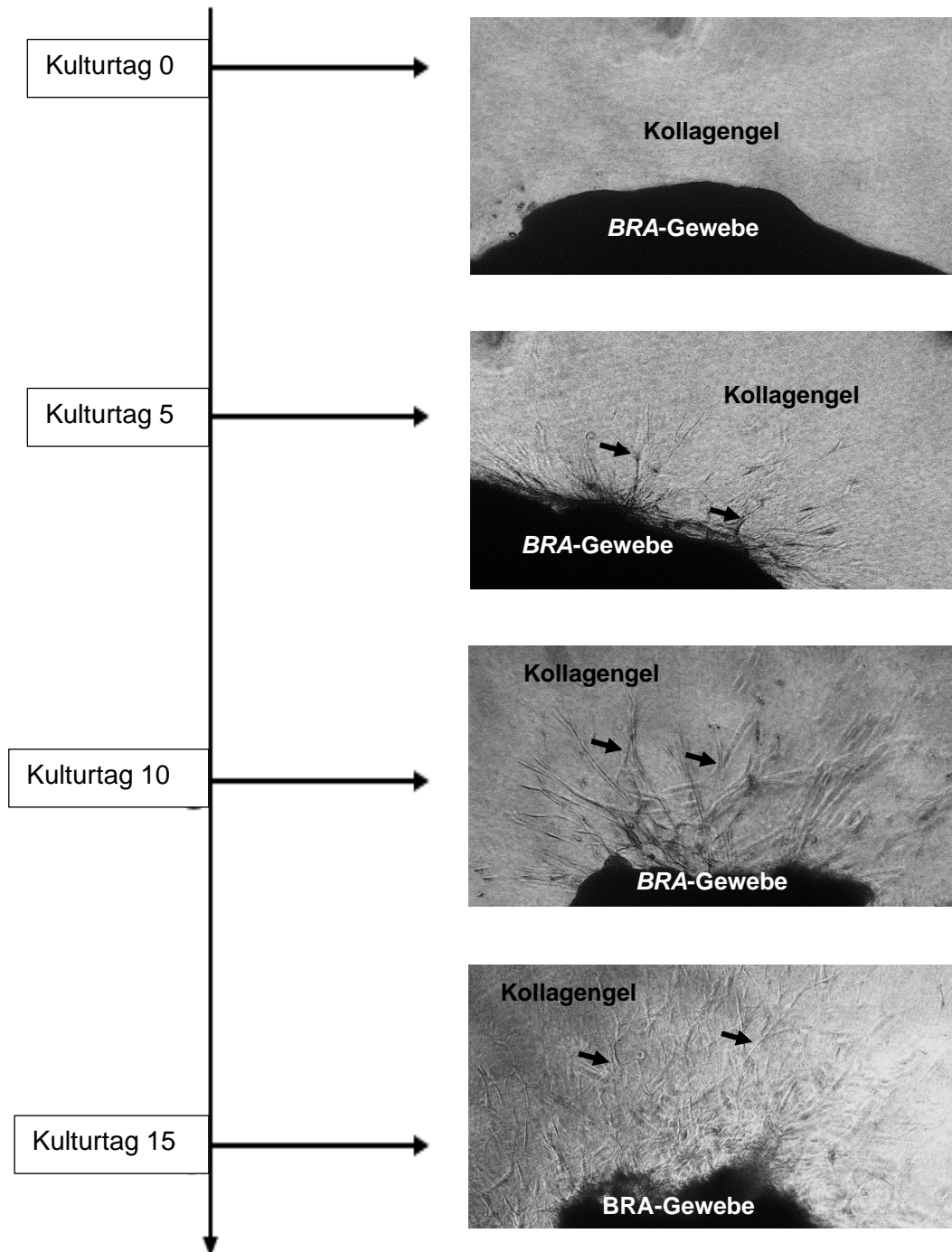


Abbildung 3: Darstellung der Zeitreihe

Die Abbildung dient zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs bei der Untersuchung des *BRA*. Am Tag 0 erfolgte Präparation und Herstellung des *BRA* (Einbetten des *BRA*-Gewebes in das Kollagengel). Erwartungsgemäß keine Aussprossung zum Zeitpunkt Kulturtag 0. Dagegen zunehmende Aussprossung (Pfeile) (Aussprossungslänge, Zelldichte und Vernetzung der Aussprossung) mit steigendem Kulturtag. Zu dem jeweils eingetragenen *BRA*-Kulturzeitpunkt (Tag 0, 5, 10, 15) wurden je Maus 2-3 *BRA*-Gewebestücke in Wells fixiert und histologisch bearbeitet und die hiervon angefertigten Gewebeschnitte wurden zur Durchführung der unten genannten histologischen sowie immunhistochemischen Färbungen verwendet.

Tier \ Tag	0	5	10	15
1	0	X	XXX	XX
2	0	X	XXX	X
3	0	XX	XXXX	XX
4	0	XX	XXX	XXX
5	0	X	XX	XXX
6	0	XX	XXX	XXX
7	0	X	XXX	XX
9	0	XX	XXXX	XX
10	0	XX	XXXX	XXX

Tabelle 3 Semiquantitative Auswertung der Aussprossungen im *BRA*

In der Tabelle ist die Kinetik des *BRA* dargestellt. Die erste sichtbare Aussprossung war ca. am 4. Kulturtag nach der Präparation zu beobachten. Am ausgeprägten war die Aussprossung durchschnittlich ca. nach 2 Wochen der *BRA*-Kultur zu beobachten. 0= gar keine Aussprossung, X= niedrige Aussprossungsrate, XX= mittelstarke Aussprossungsrate, XXX= starke Aussprossungsrate, XXXX= stärkste Aussprossungsrate

4.1.2. Qualitative und semi-quantitative Auswertung mittels HE-Färbung

Um einen besseren Überblick über die Morphologie der Aussprossung bzw. die aussprossenden Zellen zu erhalten, wurden die Gefäßringe samt Kollagengel mit Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und zur Herstellung von Gewebeschnitten verwendet. Diese Gewebeschnitte wurden zunächst mit der konventionell-histologischen HE-Färbung gefärbt. Mittels der HE-Färbung war es möglich, die Morphologie der Gefäße im *BRA* und der an der Aussprossung beteiligten Zellen zu den verschiedenen festgelegten Zeitpunkten (Tag 5, Tag 10, Tag 15) zu erfassen (Abb. 3). Am Tag der Präparation zeigten die Gefäße eine normale Struktur mit den bekannten Wandschichten Intima, Media und Adventitia und waren zum Teil von Hirngewebe umgeben (Abb. 4a). Durch Kultivierung der Hirngefäßringe im Rahmen des *BRA* wurden die Gefäßwandzellen aktiviert und es kam zur Aussprossung kapillarförmiger Strukturen und waren assoziiert zu den Gefäßringen. Die Aussprossungen befanden sich, die sich sowohl im Kollagengel als auch in den Resten des Hirnparenchyms (Abb. 4b). Die Zellen der Aussprossung zeigten verschiedene Morphologien. Zum einen ließen sich dendritisch verzweigte Zellen nachweisen, die zunehmend in Richtung der Peripherie des Kollagengels auswanderten. Die Dichte dieser Zellen nahm mit der Kultivierungszeit zu und umgab das abgestorbene Hirngewebe. Zum anderen ließen sich rundliche Zellen mit stark gefärbtem Zytosol nachweisen, die teilweise im Hirnparenchym lokalisiert waren. Einige der rundlichen Zellen waren zweikernig. Mit dem zeitlichen Verlauf nahm die Anzahl der ausgesprossenen Zellen deutlich zu.

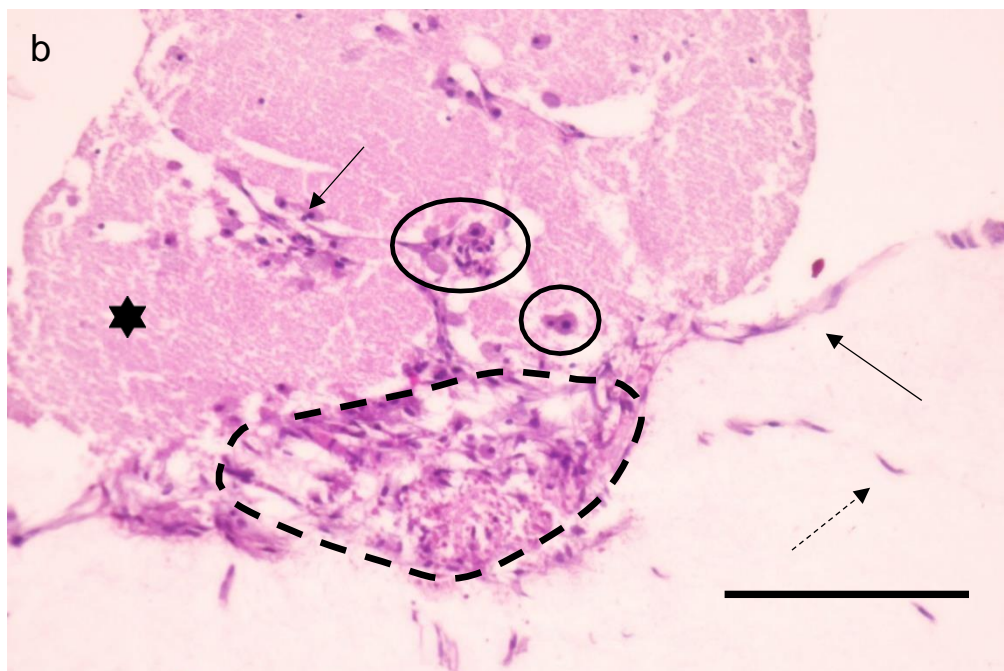
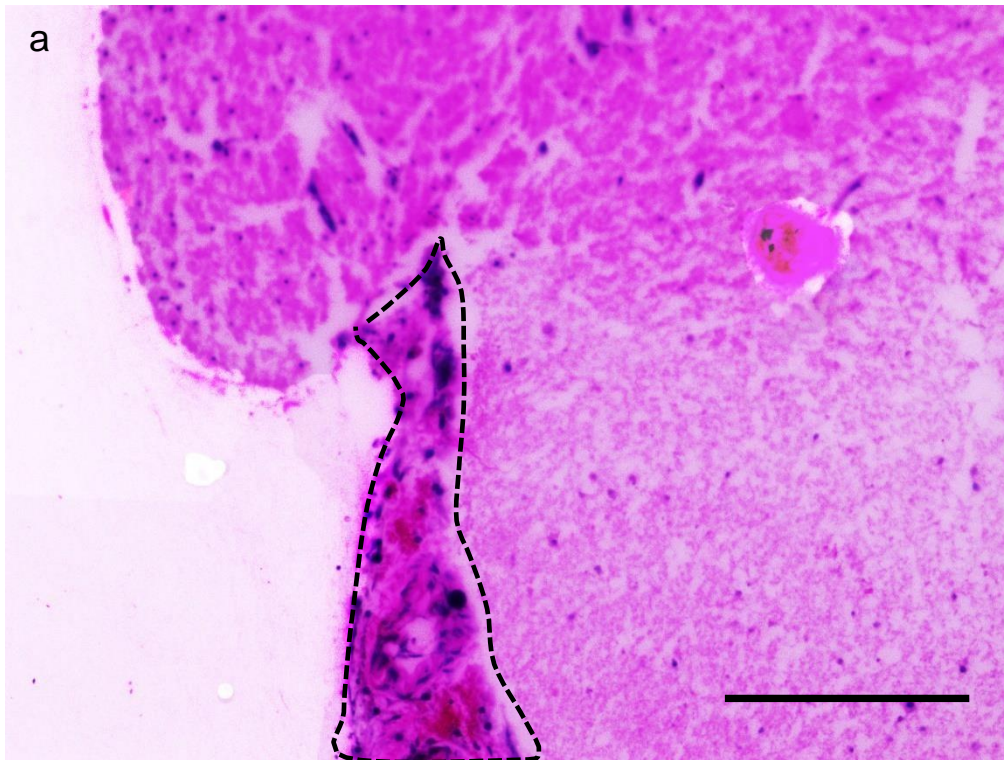


Abbildung 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) des *BRA*

(a) Darstellung des *BRA* am Kulturtag 0 nach der Präparation, Maßstab 200 μm . (b) Darstellung des *BRA* am Kulturtag 10. Hier ist die Assoziation dieser Zellen zu den Gefäßen deutlich dargestellt. Die gestrichelte Linie dient zur Abgrenzung der Hirngefäße gegenüber dem Hirnparenchym (mit Stern markiert) und der Aussprossungen. Die Pfeile dienen zur Darstellung der Aussprossungen sowohl im Hirnparenchym als auch in der Peripherie. Zum einen waren Zellen mit runder Morphologie zu erkennen (Kreis), diese waren insbesondere im Hirnparenchym zu erkennen, teilweise bildeten diese Zellen eine Art von Kolonien. Zum anderen sind spindelförmige bzw. längliche Zellen zu erkennen, die besonders im Kollagengel sich befanden und scheinbar Richtung der Peripherie ausgewandert erschienen (gestrichelter Pfeil). Maßstab 200 μm . N = 46 Tiere.

4.2. Immunhistochemische Charakterisierung des *BRA*

Bei den folgenden Experimenten wurden spezifische Antikörper gegen verschiedene Marker verwendet, um die Zellen des *BRA* immunphänotypisch zu charakterisieren. Zu diesen Markern zählten: anti-CD44, -CD45, -CD34, -CD31, -F4/80, -Iba-1, -SMA, -NG2 und -GFAP. Bei jeder Färbung wurde parallel eine negative Kontrolle, bei der die Gewebeschnitte nur mit einem sekundären Antikörper (einer IgG-Kontrolle) exponiert waren, durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

4.2.1. Immunhistochemische Untersuchung der CD44-Expression

Viele der im Rahmen des *BRA* ausgesprossenen Zellen wiesen die Expression des Oberflächenmarkers CD44 auf. Die CD44⁺ Zellen waren bereits am Tag 0 in der Adventitia der Gefäßwand nachzuweisen (Abb. 5 a-c). Mit dem zeitlichen Verlauf des *BRA* erhöhte sich die Anzahl der CD44⁺ Zellen deutlich (Tabelle 4). Die CD44⁺ Zellen waren am 10. Kulturtag sowohl im assoziierten Hirngewebe als auch innerhalb des Kollagengels nachzuweisen (Abbildung 5f, gepunkteter Kreis), was dafürspricht, dass diese Zellen aus dem Gewebe in das Gel migriert sind. Im Vergleich zu Kulturtag 0 (frisch isolierte Zellen) zeigten die ausgesprossenen CD44⁺ Zellen am Kulturtag 10 eine eher rundliche Morphologie und waren zudem zum Teil zweikernig (Abb. 5 f, Pfeil). Neben den rundlichen Zellen waren flache CD44⁺ Zellen weiterhin im Kollagen nachzuweisen. Die rundlichen CD44⁺ Zellen befanden sich zum großen Teil auf der Seite *BRA*-Gewebes, wo das Hirnparenchym assoziiert war.

Tier \ Tag	0	5	10	15
1	X	XX	XXXX	XXX
2	X	XX	XXX	XXX
3	X	XX	XXXX	XXX
4	X	XXX	XXXX	XXX
5	X	XX	XXXX	XXX
6	X	XXX	XXXX	XXX
7	X	XXX	XXXX	XXX
9	X	XX	XXXX	XXXX
10	X	XXX	XXXX	XXX

Tabelle 4 Semiquantitative Auswertung der CD44⁺ Zellen

Die CD44⁺ Zellen sind bereits am Kulturtag 0 im *BRA* zu beobachten. Deren Anzahl nahm im zeitlichen Verlauf zu. Am höchsten war die Anzahl der CD44⁺ Zellen beobachtungswise ca. am *BRA*-Kulturtag 10. Allerdings nahm deren Anzahl im weiteren Verlauf wieder ab. 0= keine positive Färbung, X= einzelne positive Färbung, XX= mittelstarke positive Färbung, XXX= starke positive Färbung, XXXX= stärkste positive Färbung.

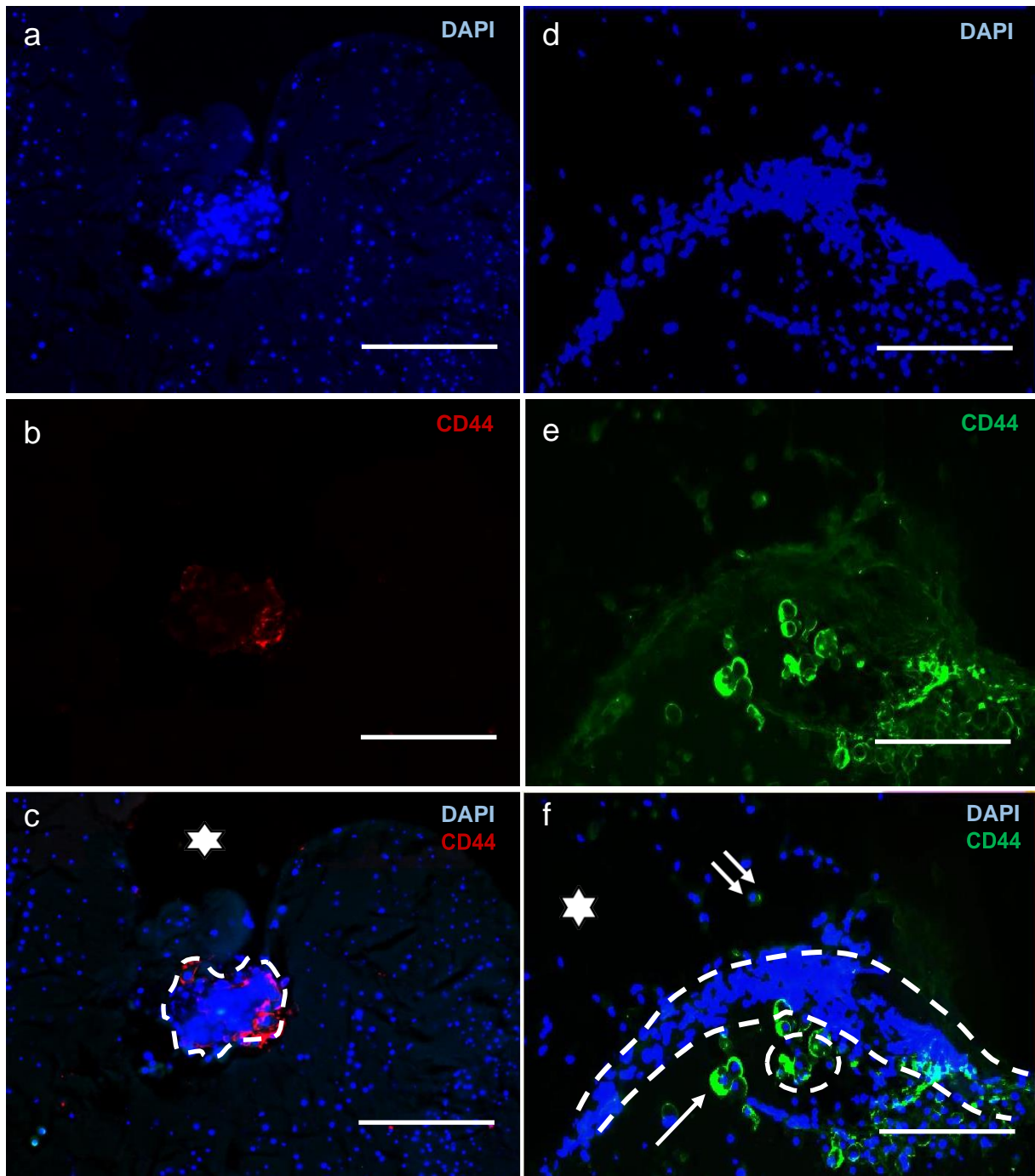


Abbildung 5: Charakterisierung der CD44+ Zellen mittels Immunfluoreszenz

a-c Darstellung der CD44⁺ Zellen in der Gefäßwand am Kulturtag 0. Der gepunktete Kreis dient zur Abgrenzung des Gefäßes gegenüber dem Hirnparenchym. Das Kollagen ist durch einen Stern markiert, Maßstab 400 μm . d-f Charakterisierung der CD44⁺ Zellen mittels Immunfluoreszenz. Darstellung der CD44⁺ Zellen am Kulturtag 10, einige Zellen sind zweikernig (Pfeil), die rundlichen CD44⁺ Zellen befinden sich vor allem auf der Seite des Hirngewebes (gepunkteter Kreis). Ebenso zeigten einige Zellen der Ausprossung im Kollagen (mit Stern markiert) CD44-Expression (Doppelpfeil). Die Linien dienen zur Darstellung der präparierten Gefäße. Maßstab 200 μm , n = 10 Tiere.

4.2.1.1. Expression des Proliferationsmarkers Ki67

Da sich sowohl in HE-Färbung als auch bei der Immunfärbung für CD44 Hinweise auf mögliche Zellproliferation (z.B. Doppelkernigkeit einiger Zellen) ergaben, wurde das *BRA*-Gewebe hinsichtlich der Proliferationsaktivität untersucht. Hierzu wurde in folgenden Experimenten die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht, um beispielsweise die Proliferationsaktivität der CD44⁺ Zellen beurteilen zu können. Hierzu wurden an Schnitten des *BRA* auch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für Ki67 und CD44 durchgeführt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Aufnahmen angefertigt. Die Analysen zeigten, dass ein Teil der CD44⁺ Zellen ebenfalls eine nukleäre Färbung für Ki67 aufwies. Die Zellen waren bereits am 5. Kulturtag nach der Präparation nachzuweisen und befanden sich auch in der Aussprossung in der Kollagenmatrix. Im Verlauf der Kultivierung zeigten die für Ki67 und CD44 doppelpositiven Zellen ein typisches Verteilungsmuster. Zum großen Teil befanden sie sich auf der Seite des *BRA*-Gewebes, wo das Hirnparenchymgewebe assoziiert war (Abb. 6, Pfeil). Zu einem späteren Zeitpunkt (Kulturtag 10) zeigten die doppelpositiven Zellen eine rundliche Form und waren zum Teil doppelkernig (Abb. 6, gestrichelter Pfeil).

Im *BRA* waren auch Ki67⁺ Zellen nachzuweisen, die kein CD44 exprimierten. Dies weist darauf hin, dass während der Kultur des *BRA* verschiedene Zelltypen eine proliferatorische Aktivität aufwiesen. Die Ki67-Expression war in den doppelpositiven Zellen inhomogen, eine relativ schwache Ki67-Expression war vor allem mit zunehmender Entfernung der Zellen zum *BRA* zu beobachten.

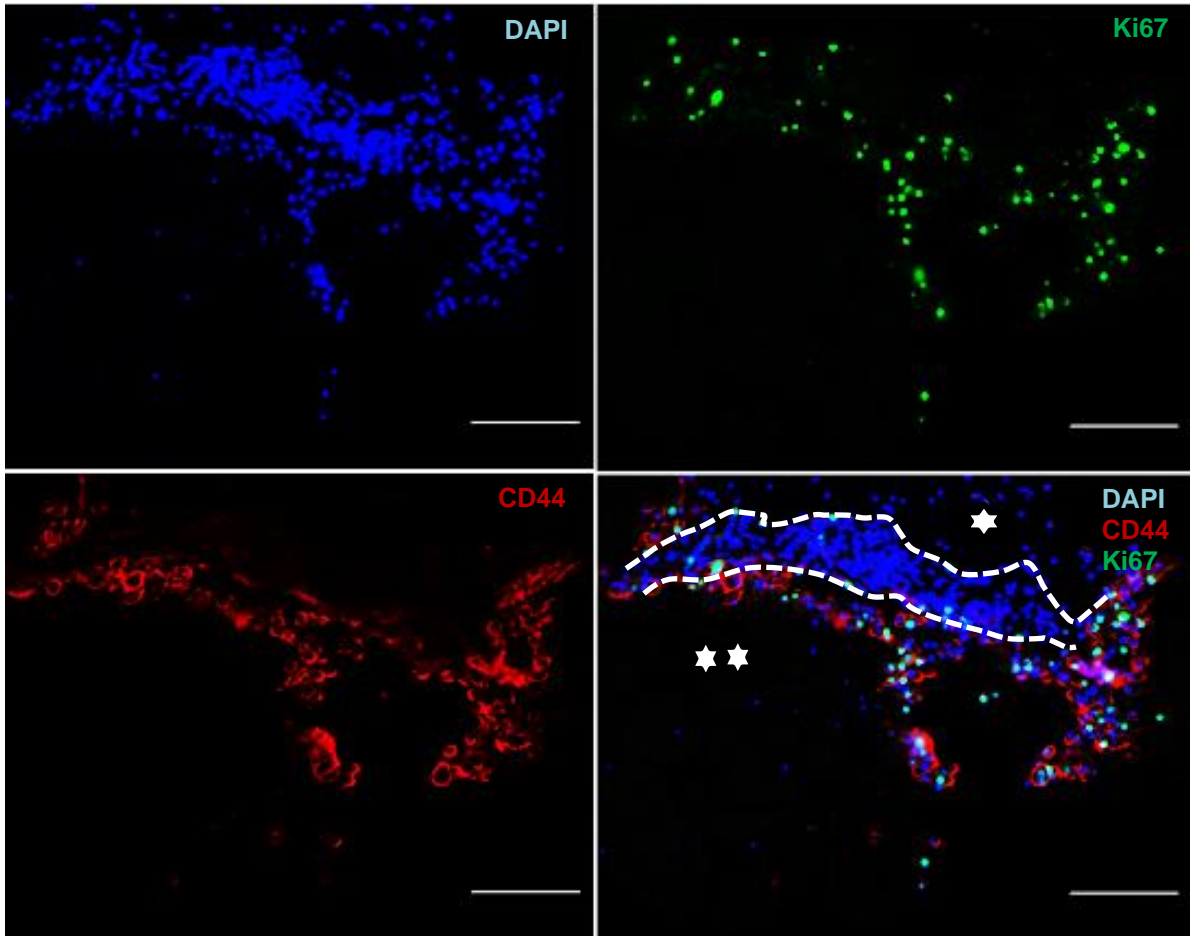


Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung des *BRA* gegen CD44 und Ki67

Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen des *BRA* gegen CD44 und Ki67. CD44⁺Ki67⁺ Zellen am Tag 10 befanden sich vor allem auf der Seite des Hirnparenchyms, einige CD44⁺ Zellen zeigten keine Ki67-Expression. Der *BRA* ist durch die gestrichelten Linien markiert. Der Kollagen ist mit einem Stern markiert, das Hirngewebe mit 2 Sterne markiert. Maßstab 200 µm, n = 6 Tiere.

4.2.1.2. Immunhistochemische Untersuchung der α -SMA-Ko-Expression

Im nächsten Schritt wurden an *BRA*-Gewebeschnitten Immunfärbungen für Aktin der glatten Muskulatur (α -SMA) durchgeführt, um die glatten Muskelzellen zu identifizieren. Die Ergebnisse dieser Immunfluoreszenzversuche zeigten, dass einige aus dem *BRA* ausgesprossene Zellen α -SMA exprimierten. Die α -SMA-Expression war bereits am 5. Tag der *BRA*-Kultur nachzuweisen. Die α -SMA⁺ Zellen waren hauptsächlich assoziiert zu den kapillarähnlichen Aussprossungen, die sich teilweise auch innerhalb des Hirnparenchymgewebes befanden, das die kultivierten Hirngefäße umgab. In Relation zu den CD44⁺ Zellen waren die α -SMA⁺ Zellen eher in einer inneren Zellschicht der Gefäßaussprossungen organisiert, während die CD44⁺ Zellen sich bevorzugt in einer äußeren Lage befanden und die Aussprossungen ummantelten. Des Weiteren zeigten die CD44⁺ Zellen zu einem frühen Kulturzeitpunkt (am Tag 5) zum Teil eine α -SMA-Ko-Expression. Allerdings nahm die Intensität der Ko-Expression mit dem Zeitverlauf der *BRA*-Kultur ab. Zu einem späteren Zeitpunkt (am Kulturtag 15) zeigten die ausgesprossenen Strukturen ein ausgeprägtes kapillarähnliches Bild (Abb.7).

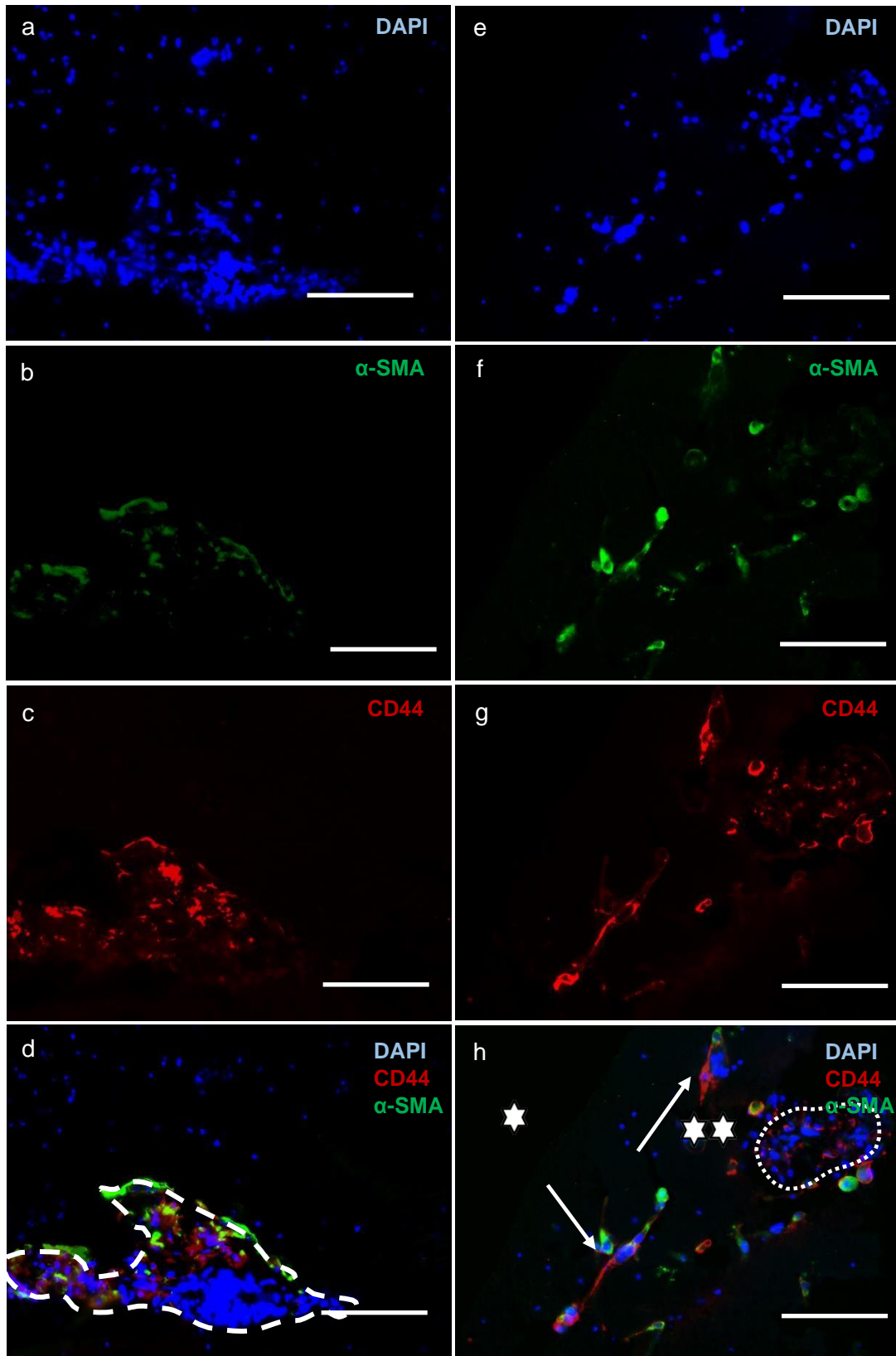


Abbildung 7: repräsentative Immunfluoreszenz-Doppelfärbung des *BRA* gegen glatte Muskelzellenmarker (alpha-SMA) und Stammzellmarker (CD44)

a-d Die CD44- und α -SMA-Co-Expression am Tag 0, e-h Die CD44- und α -SMA-Co-Expression am Tag 10, die Größe der kapillarförmigen Struktur nimmt mit der Kultivierungszeit zu. Die Pfeile zeigen die Aussprossungen. Der Kollagen ist mit einem Stern markiert, das Hirngewebe mit 2 Sterne markiert. Maßstab 200 μ m. n = 4 Mäuse

4.2.1.3. Untersuchung der NG2/CD44-Co-Expression

NG2 ist ein Proteoglykan und ein Transmembranprotein. Es wird *in vivo* und *in vitro* verwendet, um diverse Zellpopulationen, u.a. peri-endotheliale Zellen und Perizyten der Kapillarwand zu identifizieren (124). Im ZNS wurde NG2 auf den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten und auch auf Perizyten nachgewiesen (126, 127). Das Ziel der immunhistochemischen Untersuchung für NG2 im Rahmen dieser Arbeit war die Lokalisierung potenzieller NG2⁺ Zellen in Hirngefäßen vor und nach dem *BRA*. Auch die NG2⁺ Zellen waren in kapillarförmige Strukturen, oder assoziiert zu solchen Aussprossungen, organisiert. Diese gefäßähnlichen Strukturen bestanden aus mehreren Zellschichten. In der äußeren Schicht waren hauptsächlich die CD44⁺ Zellen zu finden. Die innere Schicht enthielt im Wesentlichen die NG2⁺ Zellen. Einige Zellen, die eine CD44-NG2-Ko-Expression aufwiesen, wurden in beiden Schichten beobachtet (Abb. 8).

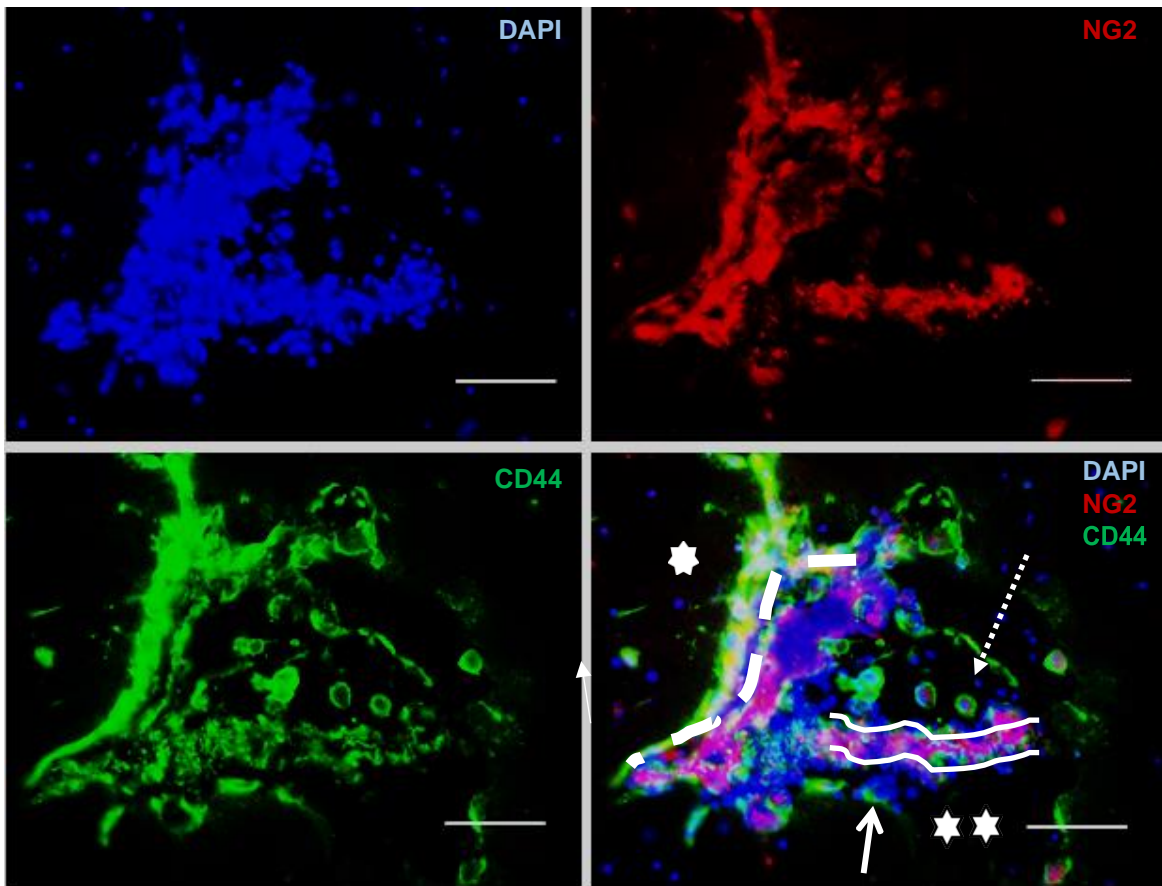


Abbildung 8: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen des *BRA* gegen CD44 und NG2

Die CD44⁺ Zellen bildeten vor allem die äußere Zellschicht (dicker Pfeil). Einige waren doppelpositiv für beide Marker. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze zwischen den gedachten Schichten. Die NG2⁺ Zellen zeigten kapillarförmige Strukturen (eine durchgezogene Linie). Einige Zellen waren doppelpositiv für CD44 und NG2 (dünne Pfeil). Die gestrichelten Pfeile deuten auf die Aussprossungen. Das Hirnparenchym mit Stern markiert. Maßstab 100 μm . n = 4 Tiere

4.2.2. Immunhistochemische Untersuchung der CD45-Expression

CD45 ist ein Oberflächenmarker und wird von allen in Zellen der leukozytären Reihe und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (109). Dieser Marker wurde verwendet, um das *BRA*-Gewebe in Bezug auf Vorhandensein von Zellen der leukozytären Linie und von hämatopoetischen Stammzellen überprüfen bzw. nach *BRA* nachweisen zu können. In immunhistochemischen Färbungen an Gewebeschnitten frisch präparierter *BRA* (also Tag 0 der Kultur) konnten bereits einzelne CD45⁺ Zellen in Assoziation zu den Hirngefäßwänden nachgewiesen werden (Abb. 9 a-c). Die Zellzahl nahm mit dem zeitlichen Verlauf, d.h. steigender Anzahl an *BRA*-Kulturtagen, zu (Tabelle 5). Auch im mitpräparierten Hirnparenchymgewebe konnten CD45⁺ Zellen beobachtet werden. Mit zunehmender Entfernung der ausgesprosten Zellen zum *BRA*-Gewebe wurde CD45 schwächer exprimiert. Die CD45⁺ Zellen zeigten eine rundliche Morphologie (Abb. 9 d-f). Die Verteilung der CD45⁺-Zellen war inhomogen und in deutlich höherer Dichte waren sie, um die Gefäßregion zu finden. Zudem konnten die CD45⁺ Zellen im Hirnparenchymgewebe erst zu einem späteren Zeitpunkt der *BRA*-Kultur nachgewiesen werden.

Tier \ Tag	0	5	10	15
1	X	XXX	XXXX	XXX
2	X	XX	XXX	XXX
3	X	XX	XXXX	XXX
4	X	XX	XXXX	XXX
5	X	XX	XXX	XXX
6	XX	XXX	XXXX	XXXX
7	X	XXX	XXXX	XXX
9	X	XX	XXXX	XXX
10	X	XXX	XXXX	XXX

Tabelle 5 Semiquantitative Auswertung der CD45⁺ Zellen im *BRA*

Der *BRA* enthielt bereits am Tag 0 CD45⁺ Zellen. Deren Anzahl nahm mit der Kultivierungszeit zu und war ca. am Tag 10 am höchsten zu beobachten. 0= keine positive Färbung, X= einzelne positive Färbung, XX= mittelstarke positive Färbung, XXX= starke positive Färbung, XXXX= stärkste positive Färbung.

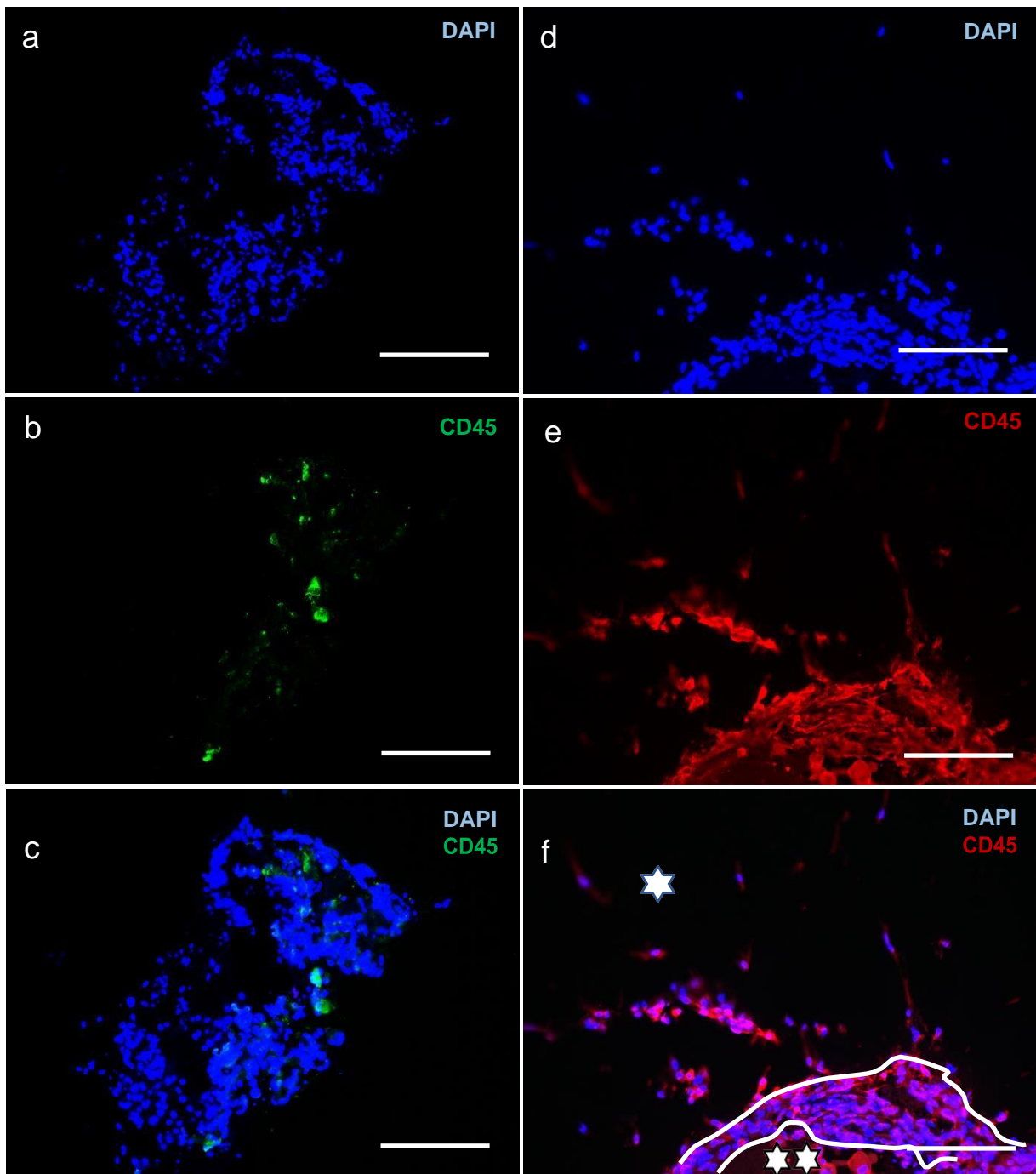


Abbildung 9: Charakterisierung der CD 45⁺ Zellen des *BRA*

a-c bereits am Tag 0 waren im *BRA* CD45⁺ Zellen nachzuweisen, deren Verteilung inhomogen war. Maßstab 400 μm . d-f Darstellung der CD45⁺ Zellen am Tag 10. Sowohl im Hirngewebe als auch im Kollagengel (mit Stern markiert) zeigten die Zellen der Aussprossung eine CD45-Expression. Die Zellen zeigten eine spindelförmige verzweigte Struktur und wanderten Richtung Peripherie. Die präparierten Gefäße sind durch die Linien markiert, Maßstab 200 μm , n =10 Tiere.

4.2.2.1. Immunhistochemische Untersuchung der CD45-F4/80-Ko-Expression

F4/80 ist ein Adhäsionsmolekül und spezifischer Marker für Makrophagen und wird auch von Mikrogliazellen exprimiert. Die Makrophagen stammen aus den im Blut zirkulierenden Monozyten, die bei Bedarf die Blutzirkulation verlassen und in das umliegende Gewebe einwandern und sich dann zu Makrophagen umwandeln. Die Monozyten selbst sind wiederum Derivate der im Knochenmark ansässigen hämatopoetischen Stammzellen (128, 129). Hinsichtlich der Mikroglia glaubte man bis vor kurzem, dass sie ebenfalls Derivate der im Knochenmark ansässigen Stammzellen sind. Neuere Befunde unter Nutzung von Reportermausmodellen und Cell-Tracing-Analysen konnten glaubhaft darstellen, dass die Mikroglia während der embryologischen Entwicklung aus den hämatopoetischen Stammzellen der Dottersackwand hervorgehen, das Hirngewebe besiedeln und im adulten Zustand immer noch Erneuerungspotenzial besitzen (27). Die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass einige CD45⁺ Zellen gleichzeitig F4/80 exprimierten. Die CD45-F4/80 doppelpositiven Zellen waren insbesondere im Hirnparenchym um die kultivierten Hirngefäße anzutreffen. Die aus der Wand der kultivierten Hirngefäße ausgesprossenen spindelförmigen Zellen zeigten ebenfalls eine CD45-F4/80-Koexpression. Allerdings zeigten diese Zellen erst mit zunehmender Entfernung eine stärkere F4/80- und schwächere CD45-Expression (Abb. 10).

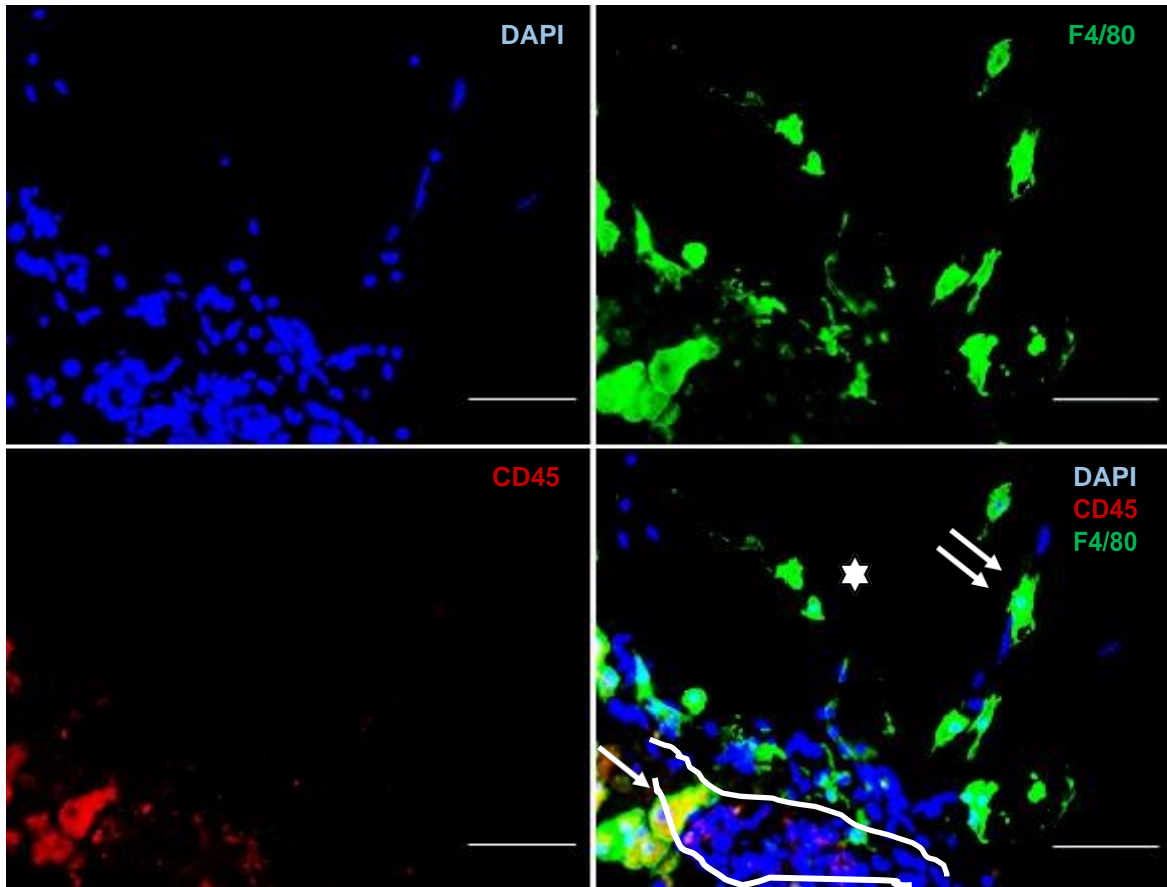


Abbildung 10: Charakterisierung der CD 45⁺ Zellen mittels Immunfluoreszenz

Charakterisierung der CD45⁺ Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung. Darstellung der CD45⁺ Zellen am Tag 10. Einige CD45⁺ Zellen zeigten eine Expression des Mikroglia-/Makrophagenmarker F4/80 (Pfeil). CD45-F4/80-Co-Expression. Die Zellen wanderten Richtung Peripherie und zeigten eine spindelförmig verzweigte Morphologie (Doppelpfeil). die CD45-Expression nahm mit der zunehmenden Distanz zum *BRA* ab. Die Linien dienen zum Abgrenzen des Gefäßes gegenüber Kollagen und Hirngewebe. Das Kollagen ist mit Stern markiert. Maßstab 100 µm. n = 13 Tiere.

4.2.3. Untersuchung der Mikroglia-/Makrophagenmarker

Iba-1 ist ein zytoplasmatisches Protein, welches bei den Makrophagen/Mikroglia vor allem nach Aktivierung dieser Zellen exprimiert wird (130–132). So wurde eine Hochregulation der Iba-1-Expression in Mikrogliazellen in experimentell induzierten Inflammations- oder Ischämieprozessen des ZNS beobachtet (115). Der Iba-1-Nachweis wird verwendet, um die Makrophagen und Mikroglia besonders in inflammatorischen Läsionen zu identifizieren (115).

Hierbei stellte sich die Frage, inwiefern die ausgesprossenen Zellen im Verlauf der *BRA*-Kultur Iba-1⁺ werden. Zunächst wurden einfache Immunfärbungen für Iba-1 an *BRA*-Gewebeschnitten durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Analysen belegten, dass die Iba-1⁺ Zellen bereits am Tag des Erstellens des *BRA* in geringer Zahl nachzuweisen waren und wenige Tage nach der Kultivierung des *BRA* zunehmend gebildet wurden (Tabelle 6). Die Iba-1⁺ Zellen waren rundlich und befanden sich hauptsächlich um die präparierten-Gefäße. Im *BRA* konnte man aufgrund des Verteilungsmusters dieser Zellen den Eindruck gewinnen, dass sie vermutlich in das umliegende Hirngewebe migrierten und dabei teilweise Zell-Cluster bildeten (Abb. 11 d-f).

Tier \ Tag	0	5	10	15
1	X	XXX	XXXX	XXXX
2	X	XXX	XXX	XXXX
3	X	XX	XXXX	XXXX
4	XX	XXX	XXXX	XXXX
5	XX	XXX	XXX	XXXX
6	X	XX	XXX	XXX
7	X	XXX	XXXX	XXXX
9	X	XX	XXXX	XXXX
10	X	XXX	XXXX	XXXX

Tabelle 6 Semiquantitative Erfassung der Iba-1⁺ Zellen im BRA

0= keine positive Färbung, X= einzelne positive Färbung, XX= mittelstarke positive Färbung, XXX= starke positive Färbung, XXXX= stärkste positive Färbung.

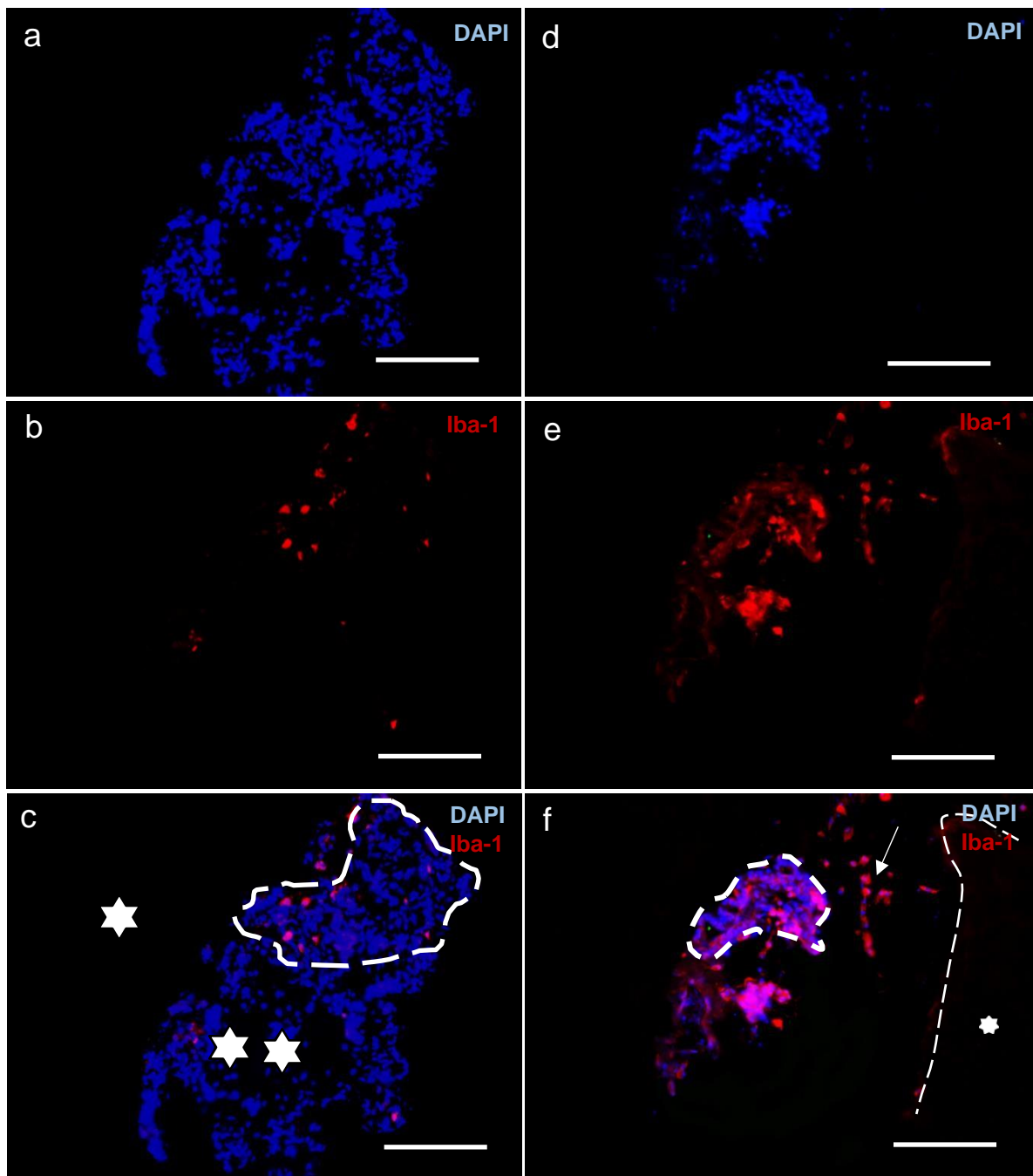


Abbildung 11: repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung des *BRA* gegen Mikroglia/Makrophagenmarker Iba-1

a-c Darstellung der Iba-1⁺Zellen am Tag 0, Maßstab 200 μ m. d-f Die Zellen zeigen am Tag 10 eine Iba-1-Expression und befinden sich in größerer Zahl um das *BRA* und schienen Richtung des Hirnrestgewebes zu wandern (Pfeil). Der gepunktete Kreis grenzt die Hirngefäße. Das Hirnparenchym mit Stern markiert. Die gestrichelte Linie dient zum Abgrenzen des Gefäßes gegenüber Kollagen und Hirngewebe. Das Kollagen ist mit einem Stern, das Hirngewebe ist mit 2 Sterne markiert. Maßstab 400 μ m. n = 10

4.2.3.1. Untersuchung der F4/80- und IBA-1-Ko-Expression

Für die weitere Charakterisierung der Iba-1⁺ Zellen, die im Rahmen der *BRA*-Kultur mit Hirngefäßen assoziiert und/oder im umliegenden Hirnparenchymgewebe lokalisiert waren, wurden Doppelimmunfärbungen für Iba-1 und F4/80 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Untersuchung zeigten, dass einige Zellen des *BRA*-Gewebes beide Antigene exprimierten. Insbesondere einige Zellen, die weit verzweigte Ausläufer aufwiesen, zeigten eine starke Ko-Expression von Iba-1 und F4/80. Weitere Analysen in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs des *BRA* zeigten, dass die Anzahl der doppelpositiven Zellen mit dem zeitlichen Verlauf der *BRA*-Kultur zunahm und solche Zellen in höherer Anzahl nicht nur in der engeren Gefäßumgebung, sondern auch in der Peripherie des Hirnparenchymgewebes zu finden waren (Abb. 12).

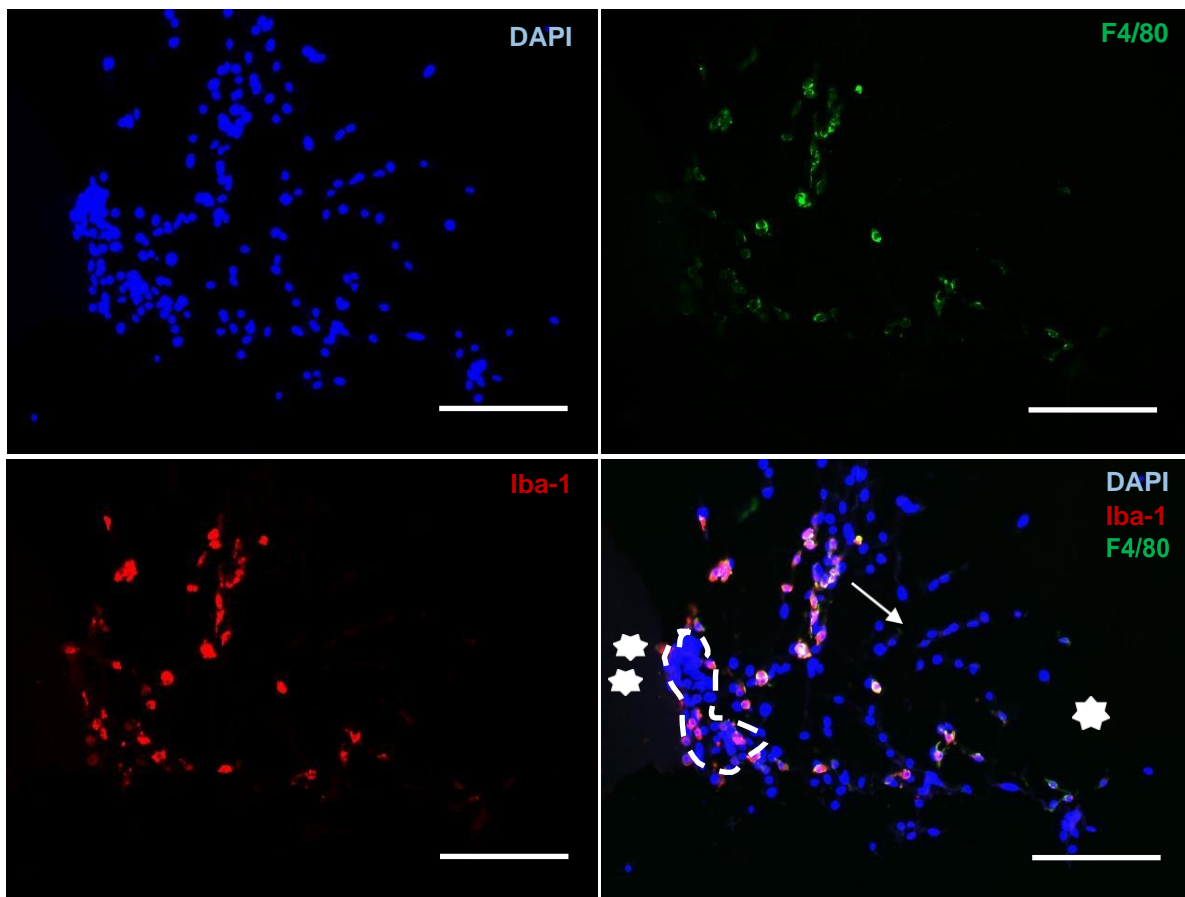


Abbildung 12: repräsentative immunfluoreszenz-Doppelfärbung des *BRA* gegen Iba-1 und F4/80

Die Zellen der Aussprossung zeigen eine Expression der Mikroglia/-Makrophagenmarker (Iba-1 und F4/80) (Pfeil). Die gestrichelte Linie dient zum Abgrenzen des Gefäßes gegenüber Kollagen und Hirngewebe. Das Kollagen ist mit einem Stern, das Hirngewebe ist mit 2 Sterne markiert Maßstab 100 μ m. n = 6 Tiere

4.2.4. Untersuchung zur Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 und des Endothelzellmarkers CD31 in *BRA*-Gewebe

CD34 ist ein Membranprotein, welches von hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen sowie teilweise in reifen Endothelzellen exprimiert wird (111, 133). CD31 bzw. PECAM-1 ist ein Zelloberflächenprotein, welches vor allem von Endothelzellen exprimiert wird, aber auch auf der Oberfläche von Thrombozyten und Leukozyten nachzuweisen ist (134). Immunfärbungen unter Verwendung von CD31-Antikörpern dienen hauptsächlich dazu, um Gefäßendothel und damit Blutgefäße sichtbar zu machen. CD31 und CD34 können auch zusammen als Endothelzellmarker verwendet werden (135). Die immunhistologische Untersuchung an Gewebeschnitten von *BRA* ergab keine Expression der beiden Zellmarker in der Aussprossung des *BRA*. Parallel wurde eine negative (Abb. 13 a-c) und positive Kontrolle (Abb. 13 d-f) (Querschnittpräparate der Aorta) durchgeführt.

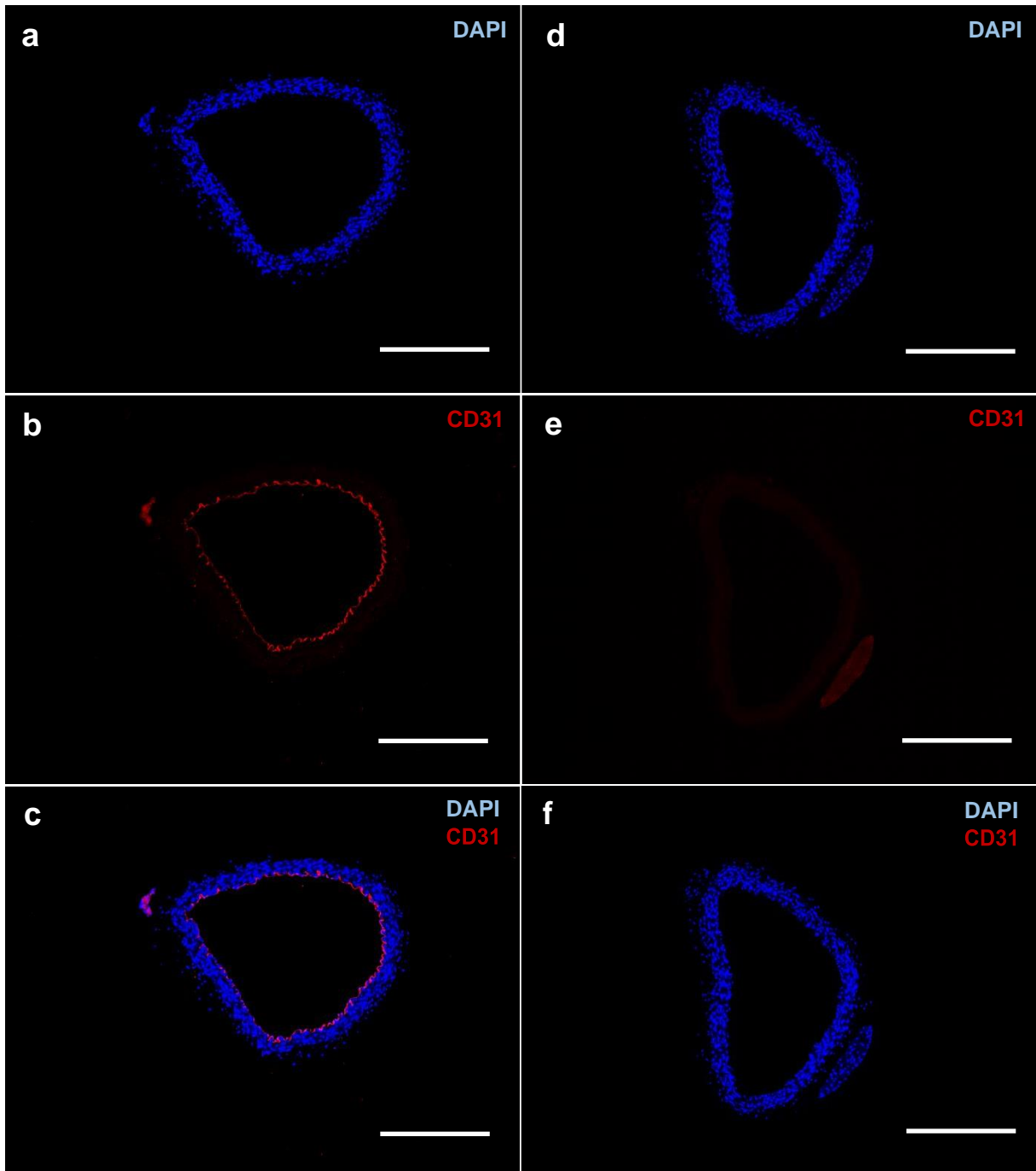


Abbildung 13: a-c positive Kontrolle für CD31-Antikörper im ARA. e-f. negative Kontrolle für CD31-Antikörper.

Maßstab 400 µm.

4.2.5. Untersuchung des Astrozytenmarkers GFAP

GFAP ist ein Bestandteil der Intermediärfilamente und wird spezifisch in Astrozyten des ZNS und in Enterogliazellen nachgewiesen. Die Astrozyten sind wie die anderen Gliazellen Bestandteile des Stützgewebes des ZNS, dienen der Konstanthaltung des Extrazellulärmilieus des ZNS und sind am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Ziel der Immunfärbung für GFAP an Gewebeschnitten von *BRA* war es zu untersuchen, ob und inwiefern die aus den Hirngefäßen im Rahmen von *BRA* ausgesprossenen Zellen auch für GFAP positiv werden. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchung zeigten keine GFAP-positiven Zellen in der Aussprossung des *BRA* (Abb. 14).

Die ausgesprossenen Zellen des *BRA* waren negativ für GFAP zu allen Zeitpunkten der *BRA*-Kultur. Eine Doppelfärbung für F4/80 und GFAP wurde ebenfalls durchgeführt, um zu zeigen, dass es sich bei den ausgesprossenen Zellen um Makrophagen/Mikrogliazellen handelt und nicht um Astrozyten. Die Ergebnisse dieser Analysen bestätigten diese Annahme. Parallel konnte zur positiven Kontrolle (Querschnitt Hirngewebe) GFAP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 15).

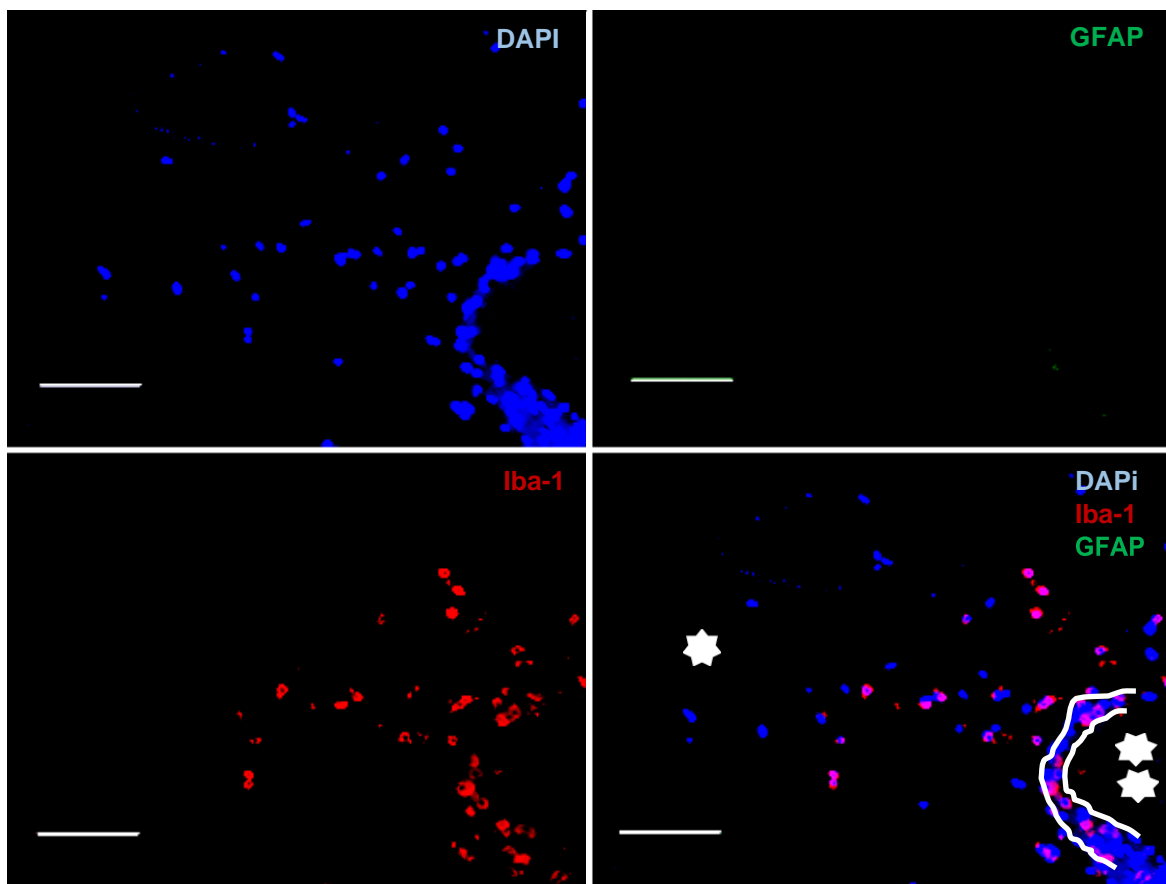


Abbildung 14: repräsentative immunfluoreszenz-Doppelfärbung des *BRA* gegen den Astrozytenmarker (GFAP) und den Mikroglia-/Makrophagenmarker (F4/80).

Die Linien dienen zum Abgrenzen des Gefäßes gegenüber Kollagen und Hirngewebe. Das Kollagen ist mit Stern markiert, das Hirngewebe ist mit 2 Sternen markiert. Maßstab 200 μm . n = 5 Tiere.

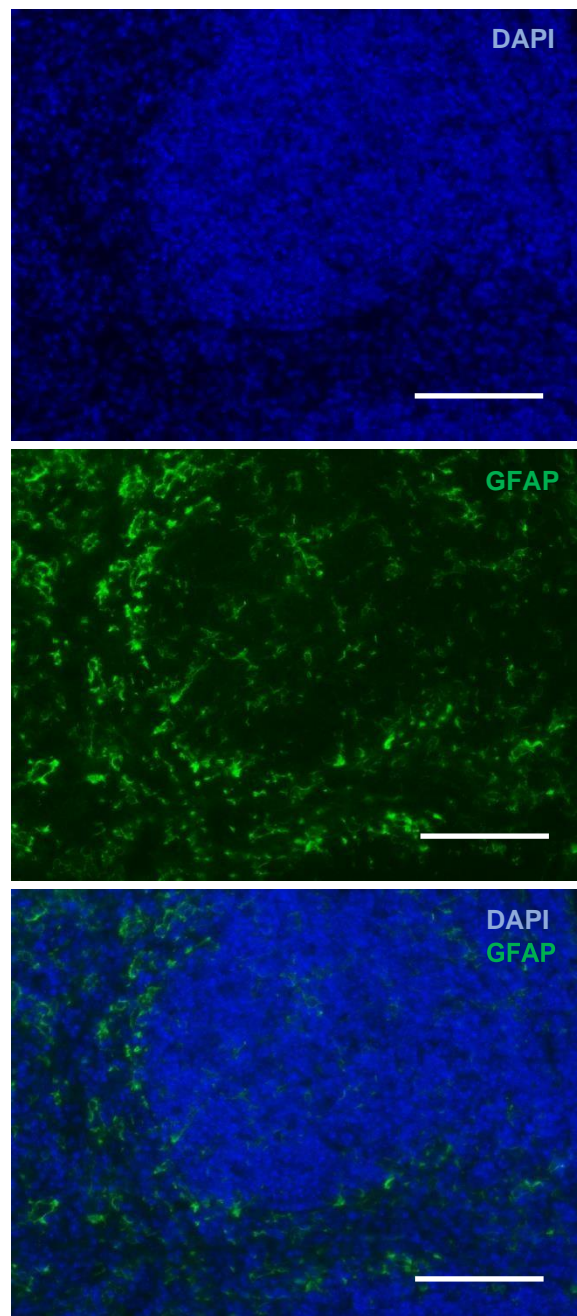


Abbildung 15: positive Kontrolle für GFAP-Antikörper.

Maßstab 200 µm.

5. Diskussion

Die hier vorgelegte Dissertationsarbeit beschäftigte sich im Wesentlichen mit der Aufgabe, ein *in vitro* / *ex vivo* experimentelles Modell unter Verwendung von Maushirngefäßen zu etablieren, das erlaubt, die Stamm- und Vorläuferzellen aus der Wand der Hirngefäße sowie deren Derivate, insbesondere ihren potenziellen Beitrag zur Mikroglia zu untersuchen. Das vorgelegte Modell mit *BRA* ermöglicht erstmalig, die Aussprossung von Zellen und kapillarähnlichen Strukturen aus den Hirngefäßen zu studieren.

5.1. Der *BRA* eignet sich als Modell zur Untersuchung der Angiogenese und Charakterisierung der gefäßwandständigen Stammzellen

Das Konzept der *BRA*-Entwicklung erfolgte in Anlehnung an den schon seit Jahrzehnten etablierten und eingesetzten *arterial* und/oder *aortic ring-assay* (*ARA*), der zunächst unter Verwendung der Arterien- oder Aortenstücke der Ratte (125) und später auch der Maus durchgeführt wurde. Dieser Assay wurde etabliert, um die Angiogeneseprozesse, also Aussprossung neuer Gefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen, nicht nur unter Verwendung von Endothelzellen *in vitro*, sondern durch den Einsatz intakter Gefäßstücke zu studieren. Die intakte Gefäßwand mit allen Wandschichten wie Intima, Media und Adventitia ermöglichte die Schritte der Angiogenese unter den Bedingungen zu analysieren, die die *in vivo* Bedingungen besser nachahmen. Daher wurde dieser Assay als *ex vivo* Angiogenese-Assay bezeichnet (125). Das Modell des *ARA* wurde seit seiner Erstbeschreibung kontinuierlich weiterentwickelt und gewünschten Bedingungen oder Anforderungen angepasst. Es ist dadurch ein vielseitiges Modell zur Analyse der Angiogenese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen geworden (102). Genau genommen kann man am *ARA*-Modell nicht nur klassische Angiogenese, sondern auch postnatale Vaskulogenese studieren, seitdem gezeigt wurde, dass dieser Assay auch geeignet ist, Aussprossung und Gefäßbildungskapazität der Gefäßwand-residenten Vorläufer- und Stammzellen zu untersuchen (95).

In den letzten drei Jahrzehnten wurden verschiedene Modelle etabliert, um die Angiogenese *in vitro* und *ex vivo* zu studieren. Diese Modelle unterscheiden sich durch mehrere Eigenschaften, insbesondere dadurch, dass zum einen die Zusammensetzung der Matrix, in der die Gefäßstücke eingebettet werden, modifiziert werden kann und zum Anderen unterschiedliche Gefäße bzw. Gefäßabschnitte

studiert werden können. Die Matrix sollte möglichst die physiologischen Bedingungen simulieren bzw. der normalen Extrazellulärmatrix ähnlich sein, um die Eigenschaften der Angiogenese wie Migration, Proliferation, Adhäsion und Differenzierung der an dem Prozess der Gefäßneubildung beteiligten Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde die Matrix aus Kollagen Typ I verwendet, weil diese weniger artifiziell ist, als das in endothelialen Tubeformierungs- und/oder *ARA* häufig verwendete Matrigel. Bei niedriger Temperatur zeigt die Matrix eine flüssige Konsistenz, welche sich bei 37 °C in die Form eines Gels ändert. Neben Kollagen Typ I wird der Matrix Nährmedium (DMEM) zugegeben. Dieses beinhaltet diverse Substanzen, u.a. Wachstumsfaktoren in Konzentrationen, die den normalen physiologischen Bedingungen vergleichbar sind, und fördert somit die für die Aussprossung notwendigen Prozesse der Zellproliferation, Migration und Differenzierung. Der *ARA* in der Kollagen Typ I-Matrix ist bereits vielfach publiziert (136–138).

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Architektur des Modells. In der gefäßbiologischen Forschung wird oft ein zweidimensionales Modell verwendet, in dem sich die neuen Kapillaren planar zur Kulturoberfläche nur in einer Ebene bilden. Hier werden die Endothelzellen in Kulturschalen gezüchtet, die meist mit Kollagen, Fibrin oder Matrigel beschichtet sein können (139). Die 2D-Modelle werden häufig eingesetzt, um den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die endotheliale Differenzierung zu untersuchen. Zusammengefasst unterscheidet man zwischen Kurzzeit- und Langzeit-2D-Modellen. In den Kurzzeit-2D-Modellen können die neu geformten Kapillaren bereits nach 1-3 Tagen studiert werden. Im Vergleich dazu kann die Angiogenese in der Langzeit-2D-Kultur über lange Zeit beobachtet werden. Trotz der Vorteile des 2D-Modells, bietet das 3D-Modell die Fähigkeit der Konfiguration der neuen Kapillaren in der dritten Ebene an und ist damit realitätsnah. Das endotheliale Tube-Formierungs-Assay kann ebenfalls in Matrigel oder Kollagengel durchgeführt werden und gibt Aufschluss über Prozesse der Kapillarbildung durch Endothelzellen. Zusätzlich können auch peri-endotheliale Zellen wie Perizyten oder glatte Muskelzellen mit kultiviert werden, um die Assoziation solcher Zellen zu den neu formierten Kapillaren studieren zu können. Im Vergleich zu einem zweidimensionalen Modell bietet der *ARA* die Möglichkeit, ein dreidimensionales Bild von der Kapillaraussprossung und ihrer Vernetzung zu erhalten. Außerdem können in diesem Modell weitere Eigenschaften und Merkmale wie die Proliferation, Migration, Kapillarformation und Bildung von Mikrogefäßen über den zeitlichen Verlauf analysiert

werden, wie auch im endothelialen Tube-Assay. Allerdings unterscheidet sich der *ARA* vom Tube-Assay im Wesentlichen darin, dass a) beim *ARA* die Zellen nicht aus der Gefäßwand isoliert und somit in ihrer natürlichen Mikroumgebung studiert bzw. zur Aussprossung angeregt werden und b) nicht einzelne kultivierte Zelltypen, (wie beispielsweise Endothelzellen oder glatte Muskelzellen) sondern verschiedene vaskuläre Zelltypen, also Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Perizyten (je nach Gefäßabschnitt) und mesenchymale Zellen in ihrer gewohnten Mikroumgebung und gleichzeitig aktiviert werden, sowie sich bei diesem Prozess gegenseitig beeinflussen können, wie es auch in der *in vivo* Gefäßneubildung höchstwahrscheinlich der Fall ist (140). Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Möglichkeit, die zellulären und molekularen Mechanismen der Angiogenese in einer komplexen multizellulären Umgebung darzustellen. Damit können pro- und anti-angiogenetische Wirkstoffe in ihrem Wirkungsspektrum besser identifiziert bzw. getestet werden (141). Die Anwendung des *ARAs* hat sich nicht nur für die Untersuchung der Angiogenese als geeignet erwiesen. Der *ARA* bietet auch die Möglichkeit, das Verhalten verschiedener Zellpopulationen, u.a. residenter Vorläufer- und Stammzellen in der Gefäßwand, zu untersuchen. Diese bilden essentielle Ressourcen für die Angiogenese und postnatale Vaskulogenese. Zu einer Sondergruppe dieser Vorläuferzellen zählen die hämatopoetischen Vorläuferzellen. Diese Zellen können postnatal Hämatopoese betreiben und sind fähig, unabhängig vom Knochenmark Makrophagen zu generieren (94, 95, 103).

Die besondere Herausforderung dieses Modells besteht des Weiteren darin, dass die Kapillar-Aussprossungen in einem breiten dreidimensionalen Raum wachsen und aus diesem Grund nicht so leicht in einer Ebene quantifiziert werden können. Auch die Aufnahmen mit herkömmlichen licht- und fluoreszenzmikroskopischen Techniken können nur ein additives Bild vermitteln und sind für Quantifizierung nur bedingt geeignet. Häufig sind entweder aufwendige und zeitintensive Serienschnitte mit anschließender histologischer oder immunhistologischer Färbung notwendig, um einen zuverlässigen Gesamteindruck erarbeiten zu können, oder es sind konfokalmikroskopische Aufnahmen mit z-Stack von den *ARA*-Schnitten erforderlich, um die genaue Lokalisierung von beteiligten Zelltypen in Relation zueinander analysieren zu können. Dennoch ist es möglich, sowohl die Länge der Aussprossungen, als auch deren Vernetzung unter dem Phasenkontrastmikroskop semi-quantitativ oder sogar mit Hilfe von einem Analyse-Programm z.B. ImageJ

quantitativ auszuwerten und durch einfache oder Doppel-Immunfluoreszenzfärbung die beteiligten Zellen zu charakterisieren. Da es im Rahmen dieser Arbeit im Wesentlichen zunächst darum ging, das *ARA* unter Verwendung der relativ kleinkalibrigen (im Vergleich zur Aorta oder gar zu menschlichen Gefäßen) Maushirngefäßen zu etablieren, standen die Etablierung des Modells und die immunphänotypische Charakterisierung der Aussprossungen mit besonderem Interesse an der Mikroglia im Fokus dieser Dissertationsarbeit. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass bereits vier Tage nach Erstellen der Kultur die ersten Aussprossungen sichtbar wurden. Damit gelang es zu zeigen, dass arterielle Maushirngefäße für *ARA* verwendet werden können, obwohl anzumerken ist, dass es im Vergleich zur Aorta schwieriger ist, diese relativ kleinen Gefäße zu isolieren und anschließend unbeschadet in das Kollagengel einzusetzen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Aussprossung einer Kinetik unterlag, bei der das Maximum am 7. Tag nach dem Erstellen des *BRA* erreicht war. Durch Verlängerung des Kultivierungszeitrahmens konnte eine weitere Zunahme der Zahl der Aussprossungen beobachtet werden. Allerdings fiel auf, dass das Wachstum der Aussprossungen ab dem 14. Tag nach Erstellen der Kultur unverändert blieb. Damit lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass das Wachstum der Kapillaraussprossungen aus dem *BRA* unter den hier getesteten Bedingungen limitiert zu sein scheint.

Diese Befunde stehen im Einklang mit den bereits publizierten Ergebnissen des klassischen *ARA*. So konnte gezeigt werden, dass die Bildung von neuen Mikrogefäßen in Kollagengel-Kultur stattfindet, jedoch geht die Kapazität der Gefäßneubildung über die Zeit zurück bzw. sie wird reduziert (142, 143). Das *BRA* zeigt außerdem ein typisches Muster. Die Zellen bildeten Zellverbände und ordneten sich in röhrenförmigen Strukturen an. Damit ist anzunehmen, dass nicht nur einzelne Zellen oder Zellverbände aus den Hirngefäßen ins Kollagengel einwandern, sondern ein Teil dieser Zellen in der Lage ist, in morphogenetische Prozesse einzutreten und kapillarähnliche Strukturen zu formieren. Obwohl bereits vorher durchgeführten Studien zeigten, dass in der Gefäßwand sowohl der groß- als auch kleinkalibrigen Gefäßen CD31⁺ und CD34⁺ Zellen nachzuweisen sind (100), war dies in der vorliegenden Arbeit nicht zu beobachten. Möglicherweise liegen die CD34- und CD31-Antigene beim Verwenden des oben genannten Färbeprotokolls unterhalb der Nachweisgrenze. Eine weitere Erklärung wäre, dass die residenten Stammzellen in

den kleinen Hirngefäßen weiter differenziert waren und keine der beiden Marker exprimierten.

Die Immunhistochemie ist ein sensitives Verfahren zum spezifischen Nachweis von Faktoren in Zellen und Geweben. Sie ist eine bekannte Methode, die seit Jahrzehnten etabliert und weltweit zur Untersuchung bzw. Identifizierung sowie Lokalisierung bestimmter Antigene angewendet wird. Bei der Durchführung der Immunhistochemie ist eine große Sorgfalt unabdingbar. Um die optimale Konzentration der Antikörper zu bestimmen, wurde auch in dieser Arbeit für jede Färbung zunächst eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Außerdem wurde bei jeder Färbung eine negative Kontrolle, bei der der Gewebeschnitt nur mit einem sekundären IgG exponiert wurde, mitgeführt, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antikörper verwendet. Diese Antikörper dienen zum einen dazu, gefäßwandständige Stammzellen zu charakterisieren. Zum anderen wurde untersucht, ob diese Stammzellen Proliferationspotential haben und zur Bildung von Makrophagen/Mikroglia und zur Angiogenese im adulten Gehirn beitragen können. Während man mittels der Immunhistochemie verschiedene Zelltypen immunphänotypisch identifiziert und im Gewebeverband gut lokalisieren kann, ist die Quantifizierung der dadurch erzielten Daten nur eingeschränkt möglich und kann nur als semi-quantitative Evaluation der Daten angegeben werden.

5.2. Gefäßwandständige Stammzellen tragen zur Angiogenese im adulten Gehirn bei

Stammzellen werden durch ihre unbegrenzte Fähigkeit zur Teilung, Selbsterneuerung und ihr Potential zur Differenzierung definiert (144). Insgesamt wurden vier Quellen für Stammzellen beschrieben, zu denen embryonale Stammzellen, germinale Stammzellen, Stammzellen aus embryonalen Karzinomen (Teratokarzinomen) und somatische Stammzellen gehören. Letztere werden als adulte Stammzellen bezeichnet und befinden sich in verschiedenen postnatalen Geweben (145). Adulte Stammzellen, vor allem HSCs und MSCs, haben besondere Eigenschaften und sind von besonderem Interesse für die Therapie und klinische Forschung. Insgesamt wurden in der Literatur zwei Aufenthaltsorte der Stammzellen in der Gefäßwand beschrieben, nämlich die *subendotheliale Zone* und die *vasculogenic zone* der Tunica adventitia. Die ersten und längst bekannten Stammzellen sind die Vorläuferzellen der ECs und SMCs. Diese wurden in der subendothelialen Zone entdeckt. Die Existenz

der adulten Vorläuferzellen für Blutgefäßneubildung, und damit vor allem für ECs, wurde erstmalig Ende der 90er Jahre beschrieben (70). Später konnte ihre Rolle bei der Wundheilung und Regeneration sowie Tumorstromavaskularisierung beschrieben werden (71). Allerdings blieb die Frage danach, ob sich diese Zellen in der Gefäßwand dauerhaft aufhalten oder hauptsächlich im Blut zirkulieren und sich nur zeitweise in der Gefäßwand aufhalten, lange Zeit unbeantwortet (95, 146–148), obwohl bereits Zengin et al. (2006) *in vivo* zeigen konnten, dass die vaskuläre Adventitia auch unter Knochenmarksdepletion in der Lage ist, Makrophagen zu generieren. Dies sprach eher dafür, dass die Stammzellen ständig in der Gefäßwand residieren. Auch die Arbeit von Pasmann et al. (2008) unterstützte diese Annahme, weil ihre Analysen mittels Reportermausmodell belegten, dass die glattmuskulären Vorläuferzellen von der embryologischen bis zur adulten Zeit in der „*vasculogenic zone*“ der Adventitia nachzuweisen sind. Neuere extensive Untersuchungen unter Verwendung von Maus-Chimären-Modellen konnten eindeutig bestätigen, dass die vaskulären und ein Teil der hämatopoetischen Zellen kontinuierlich in der vaskulären Adventitia sitzen und nicht vom Knochenmark aus erneuert werden (94, 103, 149).

Es ist von mehreren Gruppen belegt, dass die Zellen der adventitiellen Nische eine Ressource für Vorläuferzellen der postnatalen Vaskulogenese darstellen und zur Neuformierung von Blutgefäßen führen (95, 147, 150). Die Zellen der *vasculogenic zone* bilden jedoch keineswegs eine homogene Zellpopulation, sondern vielmehr ein heterogenes Zellgemisch von Progenitor- und Vorläuferzellen für ECs, SMCs und HSCs sowie multipotente mesenchymale Stammzellen. Durch den Einsatz bestimmter Marker wie CD34, C44, CD45, CD133, CD31, konnten diese Zellen immunphänotypisch charakterisiert und in ihrem Differenzierungspotenzial *in vitro* und *in vivo* studiert werden (93, 96, 150). Eine CD44⁺ Subpopulation der adventitiellen Stammzellen konnte als mesenchymaler Stammzelltyp identifiziert werden, der sich *in vitro* in Chondrozyten, Osteozyten und Adipozyten differenzieren konnte (93). Weiterhin ist diese Nische ein komplexes Milieu und besteht aus einer Mischung verschiedener stromaler Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen, z. B. der Vasa vasorum, die u.a. das Überleben der ruhenden Stammzellen unterstützen. Zum anderen erlauben diese Zellen die Expansion, Differenzierung und Migration der Vorläuferzellen und unterstützen die Hämatopoese (151). Die stromalen Zellen sind für die Funktion der HSCs und die Hämatopoese nicht zu nachverlässigen (152).

Angesichts der Ergebnisse mehrerer experimenteller Arbeiten entstehen diese Zellen aus dem lateralen posterioren Mesoderm (153). Sie wandern in den Dottersack ein, wo sie sich anschließend zu ECs und hämatopoetischen Stammzellen differenzieren (154). Die Entstehung neuer Blutgefäße beschränkt sich nicht nur auf die embryonale Zeit, sondern auch adulte Blutgefäße verfügen über diese wichtigen Eigenschaften, um die Gefäßreparatur und Bildung von neuen Blutbahnen gewährleisten zu können (155).

Die Angiogenese ist mit der Hämatopoese eng verknüpft. Die beiden interagieren miteinander und haben gemeinsame Vorläuferzellen, sogenannte Hämangioblasten. Dieser Prozess ist sinnvoll, um den Körper mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen (156). Bei der Angiogenese handelt es sich um die Bildung neuer Gefäße aus präexistierenden Blutgefäßen. Um diesen Prozess zu gewährleisten, ist eine Proliferation und Migration von Endothelzellen mit anschließender Bildung gefäßrohrähnlicher Strukturen erforderlich. Angiogenese wurde erstmalig Anfang der 70er Jahre beschrieben (73) und trägt zu Gefäßneubildung unter physiologischen (z.B. im Rahmen des zyklischen Endometriumaufbau und des ovariellen Zyklus) wie pathologischen Bedingungen, beispielsweise bei Tumoren, Inflammation und der Atherosklerose, bei. Dieser Prozess wurde lange Zeit als der einzige Weg angesehen, der beim Erwachsenen zur Gefäßneubildung führt. Mit der Entdeckung endothelialer Vorläuferzellen im Jahr 1997 (70) wurde dieses Konzept dahingehend modifiziert, dass beim Erwachsenen neue Blutgefäße auch aus adulten Vorläuferzellen, also durch postnatale Vaskulogenese entstehen können. In Übereinstimmung mit dem neuen Konzept zur Gefäßneubildung beim Erwachsenen durch Angiogenese und postnatale Vaskulogenese konnte im RA gezeigt werden, dass die adventitielle Gefäßwandresidente Stammzellnische ähnlich wie bei den sogenannten embryologischen „Blutinseln“, die die Hämangioblasten enthalten, sowohl vaskuläre als auch hämatopoetische Vorläufer- oder Stammzellen beherbergt (96, 149). Im Vergleich zu vaskulären Vorläuferzellen wurde berichtet, dass diese Nische deutlich weniger CD45⁺ Zellen enthält, die jedoch in der Lage sind, sich in einen Teil der Blutzellen zu differenzieren (94, 95, 103).

Wie oben kurz beschrieben, bilden die CD44⁺ multipotenten Zellen eine wichtige Subpopulation der adventitiellen Stammzellen, die sich vor allem in glatte Muskelzellen und Perizyten differenzieren lassen (93, 101). Die in der vorliegenden Arbeit

vorgelegten Befunde zeigen, dass bereits die frisch präparierten Hirngefäße sowohl CD44⁺ als auch CD45⁺ Zellen enthielten. Diese Befunde stimmen mit denen überein, die von den anderen großen Gefäßen, wie der Mousaorta oder der menschlichen Arteria thoracica interna erhoben wurden (93, 95, 103). Damit bestätigt sich auch für die Maushirngefäße, dass sie in ihrer Wand eine Stammzellnische mit heterogener Zellpopulation, d.h. sowohl hämatopoetische als auch mesenchymale Stammzellen aufweisen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die CD44⁺ Zellen, die vermutlich während des *BRA* aus der Gefäßwand in das Kollagengel migriert waren, zur Bildung von perizytenähnlichen Zellen und Gefäßmuskelzellen in den neuformierten Gefäß-ähnlichen Strukturen beitrugen. Diese Befunde bestätigen die kürzlich von Klein et al. publizierten Ergebnisse aus humanen Gefäßen (93, 101) und zeigen somit, dass ähnliches Stammzellpotenzial auch in den Wänden der Hirngefäße vorhanden ist. Schon zu einem frühen Zeitpunkt (*BRA* Kulturtag 5) ließen sich überwiegend CD44⁺ Zellen nachweisen, die vor allem außen die kapillarähnlichen Strukturen ummantelten. Einige dieser Zellen zeigten eine Koexpression vom glattmuskulären Marker SMA und dem Perizytenmarker NG2. Zu einem späteren Zeitpunkt zeigten die α -SMA⁺ und NG2⁺ Zellen, die kapillarähnliche Strukturen bildeten, schwache bis keine CD44-Expression. Die NG2⁺ und α -SMA⁺ Zellen wiesen im Verlauf des *BRA* eine zunehmend schwächer werdende Expression von CD44 auf. Damit lässt sich interpretieren, dass die CD44⁺ Zellen proliferierten und sich zu NG2⁺ und/oder α -SMA⁺ Zellen differenzierten. Dies entspricht der Beobachtung zahlreicher Studien (157). Hier konnte gezeigt werden, dass im *ARA* am Tag 3 nach der Kultivierung CD44⁺ Zellen nachzuweisen waren (93). Diese Zellen wanderten aus dem *aortic ring* in die Matrix und wiesen dann eine Expression des Perizytenmarkers NG2 auf. Außerdem befanden sich in der *vasuologenic zone* einige CD44⁺ Zellen, die ebenfalls α -SMA und NG2 exprimierten.

5.3. Handelt es sich bei Iba-1(+) Zellen im *BRA* um Mikroglia?

Die Mikroglia werden als organständige Makrophagen des ZNS bezeichnet. Sie teilen mit den von Monozyten abgeleiteten Makrophagen ähnliche Eigenschaften, wie die Iba-1 und F4/80-Expression. CD45 und CD34 sind charakteristische Marker für Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zelllinie.

In dieser Arbeit wurden sowohl Iba-1⁺ als auch F4/80⁺ Zellen als Makrophagen bezeichnet. Obwohl in der Literatur die Entität der beiden Zellarten unterschiedlich

beschrieben wurde (158), fehlt bisher der Beweis, dass es sich hierbei um unterschiedliche Zellpopulation handelt, da sie die Expression der gleichen Zellmarker aufweisen (159) .

Der Ursprung der Mikroglia ist seit Jahrzehnten immer wieder Gegenstand der Forschung, blieb jedoch kontrovers. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Ursprung der Mikroglia als mesenchymal, hämatopoetisch und aus dem Dottersack stammend beschrieben wurde. Bisher sind die Entwicklung und die Selbsterneuerung der Mikroglia nicht abschließend geklärt. Die neueren Studien unterstützen eher die Hypothese, dass die Mikroglia noch während der embryonalen Entwicklung aus den Vorläuferzellen des Dottersacks hervorgehen und das ZNS besiedeln (27). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und zu welchem Ausmaß die Mikroglia sich aus den Gefäßwand-residenten Stamm- und Vorläuferzellen entwickeln können.

Bei der gezielten Suche nach einer Differenzierung Gefäßwand-residenter Stammzellen in Mikroglia/Makrophagen, ausgehend von vermutlichen hämatopoetischen Vorläuferzellen in der vaskulären Nische, wurde in dieser Arbeit die Untersuchung der CD45-, CD44- und CD34-Expression untersucht. Die bisherigen Studien deuten darauf hin, dass CD45 als ein Marker für die Untersuchung der Hämatopoese und der HSCs ist. CD45 ist ein Oberflächenmarker und wird von hämatopoetischen Stammzellen, einigen Blutzellen der leukozytären Reihe und Osteoblasten auf der Membranoberfläche exprimiert. Allerdings haben die Zelltypen einen einheitlichen Ursprung (109). Ein Ausschalten der CD45-Funktion zeigte bei Knock-out-Mäusen einen schweren Immundefekt (110). Allerdings ist CD45 kein absolut zuverlässiger Stammzellmarker, da es auch von einigen differenzierten hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Daher sollte die Expression mehrerer Marker in Kombination studiert werden, um die HSCs immunphänotypisch zu identifizieren bzw. nachzuweisen. Dies kann in Form von Immundoppelfärbung an Gewebeschnitten und/oder durch FACS-Analysen durchgeführt werden. Für die FACS-Analyse wird eine große Zellzahl benötigt. Bei dem *BRA* kann nach einer Dispersion der relativ kleinen Hirngefäße so eine große Zellzahl nicht isoliert werden. Damit war die Durchführung einer solchen Analyse nicht erfolgsversprechend bzw. technisch kaum möglich.

Bei der Untersuchung des *BRA* waren einige CD45⁺ Zellen am Tag des Erstellens der Kultur in der Gefäßwand nachzuweisen. Da weitere Zelltypen des monozytären Systems wie Makrophagen oder Osteoblasten ebenfalls eine CD45-Expression

aufweisen können, wurde untersucht, ob die gefäßwandständigen CD45⁺ Zellen auch eine Expression der Makrophagen/Mikroglia-Marker wie Iba-1 und/ F4/80 aufweisen. Die Ergebnisse zeigten, dass diese CD45⁺ Zellen zu diesem Zeitpunkt, also frisch nach Isolierung der Hirngefäße, keine F4/80- oder Iba-1-Expression aufwiesen. Demgegenüber war ein Teil der Zellen, die im Rahmen des *BRA* in das Kollagengel ausgesprosst waren, positiv für Iba-1 und F4/80. Einige Zellen zeigten eine Co-Expression der beiden Marker CD45 und Iba-1. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die gefäßwandständigen CD45⁺ Zellen die Kapazität besitzen, sich zu Makrophagen/Mikroglia zu differenzieren. Derzeit ist kein einheitlicher Marker zu finden, um zwischen Mikroglia und Makrophagen mit absoluter Sicherheit zu unterscheiden. Um diese Fragestellung zu beantworten, sollte in zukünftigen Arbeiten möglicherweise entweder neue Marker identifiziert und verwendet werden, die z.B. für Mikroglia spezifisch sind, oder die bestehende Mikroglia depletiert und die erneute Repopulation der Mikroglia in Detail studiert werden. Es sollten auch die CD45⁺ Monozyten depletiert werden bzw. man könnte zumindest vor der Präparation die Mäuse perfundieren, auch wenn das nicht alle CD45⁺ Zellen eliminiert.

Ein weiterer charakteristischer hämatopoetischer Stammzellmarker ist CD34. Bei CD34 handelt sich um den ersten Zellmarker, der bei hämatopoetischen Stammzellen und anderen Vorläuferzellen wie EPCs identifiziert wurde. Für die Isolation der Knochenmarkszellen und auch bei der Knochenmarkstransplantation wird dieser Marker häufig verwendet (111). Die CD34⁺ Zellen befinden sich nicht nur in der Stammzellnische im Knochenmark, sondern sie wurden in mehreren Studien auch in der Stammzellnische der Gefäßwand nachgewiesen und charakterisiert. Die undifferenzierten CD34⁺ CD31⁻ Stammzellen konnten in der Gefäßwand der embryonalen Aorta nachgewiesen werden (160). Diese Zellen proliferieren und differenzieren sich zu CD31⁺ vWF⁺ Zellen und bilden ein Netzwerk von kapillarähnlichen Strukturen im Matrigel (95, 100, 102). In der vorliegenden Arbeit konnte dies zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Möglicherweise fehlt diese Stammzellkapazität in den Hirngefäßen oder aber es bedarf weiterer zellbiologischer Analysen, um mit Gewissheit aussagen zu können, ob diese Stammzellsubpopulation den Hirngefäßen fehlt oder aber andere Kulturkonditionen erforderlich sind, damit der in der Aorta oder anderen großen Gefäßen nachgewiesene Differenzierungsweg auch im *BRA* vollzogen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit stand das Etablieren des *BRA* und das Studieren unterschiedlicher Zelltypen mit Hilfe von Immunhistochemie im Vordergrund. In den weiteren Experimenten sollte die Quantifizierung der Aussprossungen und verschiedenen Zelltypen anhand der untersuchten Zellmarker durchgeführt werden. Weiterhin wäre prospektiv die Etablierung einer "reineren" Kultur, bei dem kein Hirngewebe enthalten ist, von großem Interesse. Hier sollte auf große, leicht zu präparierende große Gefäße des ZNS fokussiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die untersuchten Maushirngefäße zum Teil mit Stückchen Hirngewebe untersucht. Daher wäre ganz wichtig die Entfernung differenzierter Makrophagen vor Beginn der Kultur, um die tatsächliche "*de novo*" Entstehung von Makrophagen in der Kultur nachzuweisen, z.B. über Clodronat-beladene Liposomen, die speziell phagozytierenden Zellen abtöten. Denkbar wäre auch der Verdau des Gefäßes und FAC-Sortierung von Zellen in adventitielle Zellen (z.B. CD34, VEGF-R2) bei gleichzeitiger Aussortierung differenzierter Makrophagen (CD11b, F4/80, Iba1). Eine weitere Möglichkeit wäre das Studieren von *in vivo* Depletionsmodellen für ZNS-Makrophagen (pharmakologisch über CSF1-R Inhibition oder genetisch über Tamoxifen-induzierbare Diphtherie-Toxin-Rezeptor Expression in CX3CR1⁺ Zellen, CX3CR1-CreER Rosa26-flox-Stop-flox DTR). Dabei sollte eine möglichst hohe Depletionseffizienz erzielt werden, um beobachten zu können, woher ZNS-Makrophagen nach ihrer Depletion wieder neu entstehen. Sollten Gefäße der Ursprung sein, sollten Cluster proliferierender Makrophagen, v.a. rund um Gefäße herum, entstehen. Weiterhin sollte die Stimulation der Makrophagen-Differenzierung über Zugabe von Wachstumsfaktoren wie CSF1, IL-34, GM-CSF etc. untersucht werden.

5.4. Die Hirngefäßwand-residenten Stammzellen besitzen hohes Proliferationspotential

Ki67 ist ein Protein, das zur Charakterisierung von sich teilenden Zellen eingesetzt wird. Während der Interphase kann das Antigen ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden, wohingegen in der Mitose das Protein auf die Chromosomen verlagert wird. Die Tatsache, dass Ki67 während der aktiven Phase aller Zellzyklen (G1, G2, S und Mitose), aber nicht in der G0-Phase von ruhenden Zellen exprimiert wird, macht diesen Faktor zu einem geeigneten Marker für die Untersuchung der Zellproliferation. Häufig werden anti-Ki67-Antikörper zur Untersuchung der Proliferationsrate und Aktivität eines Tumors wie bei Prostata- und Mammakarzinom

eingesetzt (161). In der vorliegenden Arbeit wurde der Antikörper verwendet, um das Proliferationspotenzial von CD44⁺ und CD45⁺ Zellen *BRA* zu untersuchen. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass schon zu einem frühen Zeitpunkt der *BRA*-Kultur eine hohe Anzahl von CD44⁺ Zellen in der Nähe der präparierten Gefäße eine nukleäre Färbung für Ki67 aufwies. In Übereinstimmung mit der Literatur (93) konnte eine Abnahme der Proliferations-Aktivität mit zunehmender Entfernung vom Gefäßring beobachtet werden. Des Weiteren wurde eine besonders hohe Proliferationsaktivität von CD44⁺ Zellen in der vaskulogenen Zone nachgewiesen.

6. Schlussfolgerung

Die hier vorgelegten Befunde belegen, dass es gelungen ist, die Kultivierung der Hirngefäße in einer Matrix über mehrere Wochen zu etablieren, sie zur Aussprossung von Zellen und kapillarähnlicher Strukturen zu aktivieren und an davon hergestellten Gewebeschnitten die ausgesprossenen Zellen immunphänotypisch zu analysieren. Weiterhin zeigen diese Analysen, dass ähnlich wie bei früheren bereits publizierten Untersuchungen unter Verwendung der Maus- und Rattenaorta sowie der menschlichen Arteria thoracica interna auch aus den relativ kleineren Hirngefäßen Vorläufer- oder Stammzellen generiert werden können, die sich zu Makrophagen und glatten Muskelzellen differenzieren können. Mit diesen Eigenschaften kann das *BRA* durchaus für *ex vivo* Analysen geeignet sein, um a) die Stammzellnische der Hirngefäße detaillierter zu charakterisieren, b) das Potenzial dieser Nische für Mikroglia-Regeneration zu eruieren und c) die Interaktion zwischen Hirngewebe und Hirngefäßen unter experimentellen Bedingungen zu studieren. Auf der anderen Seite ist anzumerken, dass die Aussagekraft des *BRA* limitiert ist. Zum einen können im Blut zirkulierende Zellen in die Gefäßwand transmigrieren und somit bei der Isolierung der Hirngefäße mit isoliert werden. Dies erschwert die anschließenden Analysen über Herkunft der Stamm- oder Vorläuferzellen. Zum zweiten kann aus der Dispersion dieser relativ kleinkalibrigen Maushirnblutgefäße nur geringes zelluläres Material extrahiert werden. Das wiederum führt dazu, dass weitere konventionelle Untersuchungen, wie FACS-Analysen, die dafür am besten geeignet wären, kaum zuverlässig angewendet werden können. Dennoch ist festzuhalten, dass das hier etablierte Modell des *BRA* dafür geeignet ist, das Verhalten der Gefäßwand-residenten Stamm- und Vorläuferzellen und deren Beitrag zur Angiogenese und Inflammation des Hirngewebes zu untersuchen. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass im

Rahmen des *BRA* in enger Assoziation zur Gefäßwand F4/80⁺ und Iba-1⁺ Zellen generiert werden konnten, auch wenn im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, ob und inwieweit die Gefäßwand-residenten Stammzellen hierzu beigetragen haben. Die Existenz der CD45⁺ Zellen in der Adventitia frisch isolierter Maushirngefäße lässt zumindest vermuten, dass aus der Nische Mikroglia zumindest teilweise neu gebildet werden könnte. Zusammenfassend liefern die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde wichtige Grundlagen für zukünftige detaillierte Analysen unter Verwendung von Knochenmark-Chimären und/oder genetischen Reportermausmodellen, um den Beitrag der Gefäßwand-residenten Stammzellen zur Repopulation oder Erneuerung der Mikroglia sowie lokaler inflammatorischer Prozesse im Hirngewebe zu klären.

7. Zusammenfassung

Das Immunsystem dient der Abwehr von Erkrankungen durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, die lebensgefährliche Infektionen hervorrufen können, sowie von bösartigen Tumorerkrankungen. Das Immunsystem im ZNS ist durch mehrere Besonderheiten charakterisiert. Zum einen gehört das ZNS zu den immunprivilegierten Organen beim Menschen. Zum anderen verfügt das ZNS über ein eigenes Immunsystem. Die Mikroglia sind ein wichtiger Vertreter dieses Immunsystems, die besonders den Erfordernissen des ZNS angepasst sind. Diese Zellen spielen unter physiologischen und pathologischen Zuständen eine zentrale Rolle für die Homöostase des ZNS. Sie dienen nicht nur zum Schutz des ZNS gegen potentielle Fremdstoffe, sondern spielen auch eine bedeutende Rolle bei neuronaler Entwicklung und Ausreifungsprozessen und tragen zur Aufrechterhaltung der Homöostase des adulten ZNS bei. Die Herkunft der Mikroglia war für lange Zeit Gegenstand der kontroversen wissenschaftlichen Hypothesen bzw. Konzepte. Seit der ersten Beschreibung der Mikroglia wurde deren Ursprung mal mesodermal, neuroektodermal oder von einigen Gruppen als mesenchymal bezeichnet. Naheliegend war auch anzunehmen, dass die im Blut zirkulierenden Monozyten das Blutsystem verlassen und im Gewebe des ZNS zu Mikroglia werden. Allerdings überwiegt derzeit die Meinung - und dafür sprechen überzeugende kürzlich publizierte Befunde - dass die Mikroglia von Vorläuferzellen geliefert wird, die während der Embryonalentwicklung aus der Dottersackwand ins Gehirn migrieren, dort bis zum Erwachsenenalter persistieren und immer wieder zur Erneuerung der Mikroglia herangezogen werden. Wo genau im Hirngewebe derartige oder andere potenzielle Mikroglia-vorläuferzellen im ZNS residieren, ist bis heute nicht abschließend geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob die Gefäßwand-ständigen Stamm- und Vorläuferzellen zur Bildung von Mikroglia beitragen könnten. Zur Untersuchung der Fragestellung wurden C57BL/6-Wildtypmäuse verwendet, deren Hirngefäße zur Herstellung und Etablierung des *BRA* präpariert wurden. Damit konnte erstmalig ein vaskuläres *Sprouting-Assay* unter Verwendung der Maushirngefäße etabliert werden. Des Weiteren wurde ein besonderes Augenmerk auf die Charakterisierung der hämatopoetischen und/oder mesenchymalen Stammzellen und Zellen der Aussprossung gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits vier Tage nach Erstellen der Kultur die ersten Aussprossungen sichtbar wurden. Außerdem unterlag die

Aussprossung einer Kinetik, bei der das Maximum am 7. Kulturtag nach dem Erstellen des *BRA* erreicht war. Durch Verlängerung des Kultivierungszeitrahmens konnte eine Zunahme der Zahl der Aussprossungen beobachtet werden. Allerdings fiel auf, dass das Wachstum der Aussprossungen ab dem 14. Kulturtag nach Erstellen des *BRA* unverändert blieb. Damit lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass Aussprossung von Zellen und kapillar-ähnlichen Strukturen aus *BRAs* limitiert ist.

Als nächstes wurden zur Charakterisierung des *BRA* und der aus dem *BRA* ausgesprossenen Zellen sowie Kapillarstrukturen immunhistochemische Untersuchungen in Einzel- und Doppelfärbung durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass bereits die frisch präparierten Hirngefäße sowohl CD44⁺ als auch CD45⁺ Zellen in ihren Wänden aufweisen. Außerdem ließ sich beobachten, dass die CD44⁺ Zellen im *BRA* nach außen wanderten und sich zu Perizyten-ähnlichen und glatten Muskelzellen differenzierten. Diese Befunde ließen darauf schließen, dass die CD44⁺ Zellen mit diesen Eigenschaften das Potenzial haben, zur Gefäßneubildung beizutragen. Darüber hinaus konnten CD45⁺ Zellen in der Adventitia frisch isolierter Hirngefäße nachgewiesen werden, die im *BRA* teilweise für F4/80 und/oder Iba-1 positiv wurden. Dies wiederum lässt vermuten, dass aus der Wand der Hirngefäße Mikroglia- und Makrophagen-ähnliche Zellen generiert werden können. Es blieb jedoch offen, ob diese CD45⁺ Vorläuferzellen dauerhaft in der Adventitia der Hirngefäße residieren oder aber immer wieder durch im Blut zirkulierende Monozyten erneuert werden. Diese Frage zu klären, ist von klinischer Relevanz, bleibt jedoch zukünftigen Arbeiten überlassen. Das hier etablierte *BRA* könnte auch bei solchen Analysen hilfreich sein.

II. Literaturverzeichnis

1. Kristjan R Jessen. Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; Pages 1861-1867.
2. Aschner M, Allen JW, Kimelberg HK, LoPachin RM, Streit WJ. Glial cells in neurotoxicity development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:151–73. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.151.
3. Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bachá RS, Báez E, García-Segura LM et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:211. doi: 10.3389/fncel.2014.00211.
4. Hofmann K, Rodriguez-Rodriguez R, Gaebler A, Casals N, Scheller A, Kuerschner L. Astrocytes and oligodendrocytes in grey and white matter regions of the brain metabolize fatty acids. *Sci Rep* 2017; 7(1):10779. doi: 10.1038/s41598-017-11103-5.
5. Jessen KR, Hrsg. *Glial cell development: Basic principles and clinical relevance*. 2. ed. Oxford: Oxford Univ. Press; 2001. (Molecular and cellular neurobiology).
6. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119(1):37–53. doi: 10.1007/s00401-009-0601-5.
7. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 2010; 58(3):253–63. doi: 10.1002/glia.20928.
8. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36(3):437–49. doi: 10.1007/s10545-013-9608-0.
9. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39(1):151–70. doi: 10.1016/0306-4522(90)90229-W.
10. Parizad M, Bilimoria, Beth Stevens. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Research* 2015; 1617:7–17.

11. Hugh Perry V. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of Neuroimmunology* 1998; 90(2):113–21. doi: 10.1016/S0165-5728(98)00145-3.
12. Fernández-Arjona MdM, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Front Cell Neurosci* 2017; 11:235.
13. Rio-Hortega P. The microglia. *The Lancet* 1939; 233(6036):1023–6. doi: 10.1016/S0140-6736(00)60571-8.
14. Perry VH, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends in Neurosciences* 1988; 11(6):273–7. doi: 10.1016/0166-2236(88)90110-5.
15. Cuadros M. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Progress in Neurobiology* 1998; 56(2):173–89. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00035-5.
16. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 2013; 7:45. doi: 10.3389/fncel.2013.00045.
17. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:367–402. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240.
18. Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(8):a020537. doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
19. Kitamura T, Miyake T, Fujita S. Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1984; 226(3):421–33. doi: 10.1002/cne.902260310.
20. Fedoroff S, Zhai R, Novak JP. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* 1998; 50(3):477–86. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19971101)50:3<477::AID-JNR14>3.0.CO;2-3.
21. Hao C, Richardson A, Fedoroff S. Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: Characterization and properties of the macrophage-like cells. *International Journal of Developmental Neuroscience* 1991; 9(1):1–14.

22. Arnold T, Betsholtz C. The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vascular Cell* 2013; 5(1):4.
23. Cuadros MA, Navascués J. Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. In: *Progress in Brain Research : Glial cell function*: Elsevier; 2001. S. 51–9.
24. Streit WJ. Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* 2001; 22(5):619–24.
25. Acarin L, Vela JM, González B, Castellano B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1994; 42(8):1033–41. doi: 10.1177/42.8.8027523.
26. Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC, Hickey WF. Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: Definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 1993; 7(1):34–40. doi: 10.1002/glia.440070108.
27. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)* 2010; 330(6005):841–5.
28. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27(1):119–45. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
29. Harry GJ, Kraft AD. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 2012; 33(2):191–206.
30. Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G et al. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *Journal of Neuroinflammation* 2014; 11:12.
31. Streit WJ, Braak H, Xue Q-S, Bechmann I. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2009; 118(4):475–85.

32. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation* 2014; 11(1):98.
33. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology* 2016; 173(4):649–65.
34. Luo X-G, Chen S-D. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Translational Neurodegeneration* 2012; 1(1):9.
35. Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10). doi: 10.3390/ijms18102135.
36. Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2016; 53(2):1181–94. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5.
37. Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *The Journal of Neuroscience* 2007; 27(10):2596. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5360-06.2007.
38. Schmid CD, Melchior B, Masek K, Puntambekar SS, Danielson PE, Lo DD et al. Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *Journal of Neurochemistry* 2009; 109 Suppl 1:117–25.
39. Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response. *Neuron Glia Biology* 2011; 7(1):47–53.
40. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience* 2007; 10:1387 EP -.
41. Nakanishi H, Hayashi Y, Wu Z. The role of microglial mtDNA damage in age-dependent prolonged LPS-induced sickness behavior. *Neuron Glia Biology* 2011; 7(1):17–23.
42. Xu H, Gelyana E, Rajsombath M, Yang T, Li S, Selkoe D. Environmental enrichment potently prevents microglia-mediated neuroinflammation by human

- amyloid β -protein oligomers. *The Journal of Neuroscience* : the official journal of the Society for Neuroscience 2016; 36(35):9041–56.
43. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* 2010; 6:193 EP -.
 44. Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 2017; 35:441–68. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.
 45. Kraft AD, Harry GJ. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8(7):2980–3018. doi: 10.3390/ijerph8072980.
 46. Li L, Lu J, Tay SSW, Moochhala SM, He BP. The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Research* 2007; 1159:8–17.
 47. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain : a Journal of Neurology* 2009; 132(Pt 2):288–95.
 48. Tremblay M-È, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *The Journal of Neuroscience* 2011; 31(45):16064. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011.
 49. Ekdahl CT. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Frontiers in Pharmacology* 2012; 3:41.
 50. Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in Immunopathology* 2013; 35(5):601–12.
 51. Yang Y, Jorstad NL, Shiao C, Cherne MK, Khademi SB, Montine KS et al. Perivascular, but not parenchymal, cerebral engraftment of donor cells after non-myeloablative bone marrow transplantation. *Experimental and Molecular Pathology* 2013; 95(1):7–17.
 52. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science (New York, N.Y.)* 2013; 339(6116):156–61.

53. Faraco G, Park L, Anrather J, Iadecola C. Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 2017; 95(11):1143–52.
54. Linehan SA, Martínez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 189(12):1961–72.
55. Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Research Reviews* 2004; 46(3):261–81.
56. Katsumoto A, Lu H, Miranda AS, Ransohoff RM. Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. *The Journal of Immunology* 2014; 193(6):2615. doi: 10.4049/jimmunol.1400716.
57. Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K et al. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* 2016; 17(7):797–805. doi: 10.1038/ni.3423.
58. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19(1):71–82. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00174-2.
59. Greter M, Lelios I, Croxford AL. Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation. *Frontiers in Immunology* 2015; 6:249.
60. Rezaie P, Male D. MESOGLIA & MICROGLIA – a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *Journal of the History of the Neurosciences* 2002; 11(4):325–74. doi: 10.1076/jhin.11.4.325.8531.
61. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985; 15(2):313–26.

62. Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 75(3):388–97. doi: 10.1189/jlb.0303114.
63. Satoh J-i, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T et al. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology* 2015; 36(1):39–49. doi: 10.1111/neup.12235.
64. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016; 113(12):E1738-E1746.
65. Pittman RN. Regulation of tissue oxygenation. Colloquium series on integrated systems physiology: From Molecule to Function 2011; 3(3):1–100. doi: 10.4199/C00029ED1V01Y201103ISP017.
66. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system: An overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2000; 44(2):333–40.
67. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K et al. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edition. New York: Garland Science; 2015.
68. Jousen AM, Kirchhof B, Gottstein C. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Der Ophthalmologe* 2003; 100. doi: 10.1007/s00347-003-0799-x.
69. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1995; 11(1):73–91. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
70. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302):964. doi: 10.1126/science.275.5302.964.
71. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95(10):3106.

72. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *British Journal of Haematology* 2005; 128(3):303–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05291.x.
73. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 1971; 285(21):1182–6. doi: 10.1056/NEJM197111182852108.
74. Conway E, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research* 2001; 49.
75. Schmidt M, Paes K, Mazière A de, Smyczek T, Yang S, Gray A et al. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Development* 2007; 134(16):2913. doi: 10.1242/dev.002576.
76. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(3):C572-9. doi: 10.1152/ajpcell.00330.2003.
77. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of Development* 2001; 100(2):157–63. doi: 10.1016/S0925-4773(00)00522-0.
78. Asahara Takayuki, Masuda Haruchika, Takahashi Tomono, Kalka Christoph, Pastore Christopher, Silver Marcy et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research* 1999; 85(3):221–8. doi: 10.1161/01.RES.85.3.221.
79. Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: A source for therapeutic vasculogenesis? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007; 8(4):509–18. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00475.x.
80. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005; 438:937 EP -.
81. Cao Y. Tumor angiogenesis and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005; 59:S340-S343.
82. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4):313–9.

83. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* 1961; 14(2):213–22.
84. Ehnert S, Glanemann M, Schmitt A, Vogt S, Shanny N, Nussler NC et al. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbeck's Archives of Surgery* 2009; 394(6):985–97.
85. Prindull G, Prindull B, van der Meulen N. Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatrica Scandinavica* 1978; 67. doi: 10.1111/j.1651-2227.1978.tb16347.x.
86. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; 78(12):7634–8.
87. Lázaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J et al. Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* 2003; 38(5):1095–106. doi: 10.1053/jhep.2003.50448.
88. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143. doi: 10.1126/science.284.5411.143.
89. Ramasamy SK. Structure and functions of blood vessels and vascular niches in bone. *Stem Cells Int* 2017; 2017:5046953. doi: 10.1155/2017/5046953.
90. Sivaraj KK, Adams RH. Blood vessel formation and function in bone. *Development* 2016; 143(15):2706–15. doi: 10.1242/dev.136861.
91. Eble J, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *CPD* 2009; 15(12):1385–400. doi: 10.2174/138161209787846757.
92. Amato B, Compagna R, Amato M, Grande R, Butrico L, Rossi A et al. Adult vascular wall resident multipotent vascular stem cells, matrix metalloproteinases, and arterial aneurysms. *Stem Cells Int* 2015; 2015:434962.
93. Klein D, Weisshardt P, Kleff V, Jastrow H, Jakob HG, Ergün S. Vascular wall-resident CD44+ multipotent stem cells give rise to pericytes and smooth muscle

- cells and contribute to new vessel maturation. *PLoS one* 2011; 6(5):e20540-e20540.
94. Psaltis Peter J., Puranik Amrutesh S., Spoon Daniel B., Chue Colin D., Hoffman Scott J., Witt Tyra A. et al. Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature. *Circulation Research* 2014; 115(3):364–75. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303299.
 95. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 2006; 133(8):1543. doi: 10.1242/dev.02315.
 96. Wörsdörfer P, Mekala SR, Bauer J, Edenhofer F, Kuerten S, Ergün S. The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. *Pharmacology & Therapeutics* 2017; 171:13–29.
 97. Zhang L, Issa Bhaloo S, Chen T, Zhou B, Xu Q. Role of resident stem cells in vessel formation and arteriosclerosis. *Circulation Research* 2018; 122(11):1608–24.
 98. Tang J-M, Wang J-N, Zhang L, Zheng F, Yang J-Y, Kong X et al. VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovascular Research* 2011; 91(3):402–11.
 99. Kramann R, Goettsch C, Wongboonsin J, Iwata H, Schneider RK, Kuppe C et al. Adventitial MSC-like cells are progenitors of vascular smooth muscle cells and drive vascular calcification in chronic kidney disease. *Cell Stem Cell* 2016;
 100. Campagnolo P, Cesselli D, Al Haj Zen A, Beltrami AP, Kränkel N, Katare R et al. Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation* 2010; 121(15):1735–45.
 101. Klein D, Benchellal M, Kleff V, Jakob HG, Ergün S. Hox genes are involved in vascular wall-resident multipotent stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Sci Rep* 2013; 3:2178 EP -.
 102. Nicosia RF. The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13(10):4113–36.

103. Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Witt TA, Holroyd EW, Spoon DB et al. Identification of a monocyte-predisposed hierarchy of hematopoietic progenitor cells in the adventitia of postnatal murine aorta. *Circulation* 2012; 125(4):592–603.
104. Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *The EMBO Journal* 2012; 31(4):842–55.
105. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 2015; 518(7540):547–51.
106. Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *Journal of Cell Science* 2004; 117(3):373. doi: 10.1242/jcs.00954.
107. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging role of CD44 in cancer stem cells: A promising biomarker and therapeutic target. *Stem Cells Translational Medicine* 2015; 4(9):1033–43.
108. Zöller M. CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells. *Frontiers in Immunology* 2015; 6:235.
109. Shvitiel S, Kollet O, Lapid K, Schajnovitz A, Goichberg P, Kalinkovich A et al. CD45 regulates retention, motility, and numbers of hematopoietic progenitors, and affects osteoclast remodeling of metaphyseal trabecules. *The Journal of Experimental Medicine* 2008; 205(10):2381–95.
110. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21(1):107–37. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946.
111. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 2014; 32(6):1380–9.
112. Yoder MC. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012; 2(7):a006692-a006692.

113. Kato K, Radbruch A. Isolation and characterization of CD34+ hematopoietic stem cells from human peripheral blood by high-gradient magnetic cell sorting. *Cytometry* 1993; 14(4):384–92. doi: 10.1002/cyto.990140407.
114. Hirsch S, Austyn JM, Gordon S. Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *The Journal of Experimental Medicine* 1981; 154(3):713–25.
115. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 2001; 32(5):1208–15. doi: 10.1161/01.STR.32.5.1208.
116. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119(1):7–35.
117. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy* 2002; 200(6):629–38.
118. Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V et al. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain : a Journal of Neurology* 2007; 130(12):3336–41.
119. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 1997; 151(3):671–7.
120. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000; 105(1):17–9. doi: 10.1172/JCI8774.
121. Groyer E, Nicoletti A, Ait-Oufella H, Khallou-Laschet J, Varthaman A, Gaston A-T et al. Atheroprotective effect of CD31 receptor globulin through enrichment of circulating regulatory T-Cells. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 50(4):344–50.
122. Leslie KO, Mitchell JJ, Woodcock-Mitchell JL, Low RB. Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung. *Differentiation* 1990; 44(2):143–9.

123. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology* 1986; 103(6 Pt 2):2787–96.
124. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology* 2005; 7(4):452–64.
125. Nicosia R, Ottinetti A. Nicosia RF, Ottinetti A Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. *Lab Invest* 63: 115-122. *Laboratory investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 1990; 63.
126. Polito A, Reynolds R. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *Journal of Anatomy* 2005; 207(6):707–16.
127. Volz KS, Jacobs AH, Chen HI, Poduri A, McKay AS, Riordan DP et al. Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle. *eLife* 2015; 4:e10036.
128. Leder L-D. The origin of blood monocytes and macrophages. *Blut* 1967; 16(2):86–98.
129. VOLKMAN A, GOWANS JL. THE ORIGIN OF MACROPHAGES FROM BONE MARROW IN THE RAT. *British Journal of Experimental Pathology* 1965; 46(1):62–70.
130. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 286(2):292–7.
131. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry* 2004; 88(4):844–56. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x.
132. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. Macrophage/Microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C- γ -dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(22):20026–32. doi: 10.1074/jbc.M109218200.

133. Matsuoka S. CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood* 2001; 97(2):419–25. doi: 10.1182/blood.V97.2.419.
134. Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM, Chung A, Mickanin C et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 1994; 120(9):2539.
135. Pisacane A, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cellular Oncology : the official Journal of the International Society for Cellular Oncology* 2007; 29. doi: 10.1155/2007/486579.
136. Ucuzian AA, Greisler HP. In vitro models of angiogenesis. *World Journal of Surgery* 2007; 31(4):654–63.
137. Nicosia RF, Zhu W-H. Rat aortic ring assay of angiogenesis. In: Augustin HG, Hrsg. *Methods in endothelial cell biology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. S. 125–44.
138. Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular Research* 2007; 74(2-3):172–83.
139. Vailhé B, Vittet D, Feige J-J. In Vitro models of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology* 2001; 81. doi: 10.1038/labinvest.3780252.
140. Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature Protocols* 2011; 7:89 EP -.
141. Masson V Vé, Devy L, Grignet-Debrus C, Bernt S, Bajou K, Blacher S et al. Mouse aortic ring assay: A new approach of the molecular genetics of angiogenesis. *Biological Procedures Online* 2002; 4:24–31.
142. Staton CA, Reed MWR, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology* 2009; 90(3):195–221.

143. Nicosia RF, Lin YJ, Hazelton D, Qian X. Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. *The American Journal of Pathology* 1997; 151(5):1379–86.
144. Weiner LP. Definitions and criteria for stem cells. In: Weiner LP, Hrsg. *Neural Stem Cells: Methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. S. 3–8.
145. Gonzalez MA, Bernad A. Characteristics of adult stem cells. In: López-Larrea C, López-Vázquez A, Suárez-Álvarez B, Hrsg. *Stem Cell Transplantation*. New York, NY: Springer US; 2012. S. 103–20.
146. Tintut Yin, Alfonso Zeni, Saini Trishal, Radcliff Kristen, Watson Karol, Boström Kristina et al. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003; 108(20):2505–10. doi: 10.1161/01.CIR.0000096485.64373.C5.
147. Passman JN, Dong XR, Wu S-P, Maguire CT, Hogan KA, Bautch VL et al. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1⁺ smooth muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105(27):9349. doi: 10.1073/pnas.0711382105.
148. Ergün S, Tilki D, Hohn H-P, Gehling U, Kilic N. Potential implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells. *Thromb Haemost* 2007; 98(11):930–9. doi: 10.1160/TH07-04-0318.
149. Psaltis Peter J., Simari Robert D. Vascular wall progenitor cells in health and disease. *Circulation Research* 2015; 116(8):1392–412. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305368.
150. Pacilli A, Pasquinelli G. Vascular wall resident progenitor cells: A review. *Experimental Cell Research* 2009; 315(6):901–14.
151. Raaijmakers MHGP, Scadden DT. Divided within: Heterogeneity within adult stem cell pools. *Cell* 2008; 135(6):1006–8. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.034.
152. Kiel MJ, Yilmaz OH, Morrison SJ. CD150⁺ cells are transiently reconstituting multipotent progenitors with little or no stem cell activity. *Blood* 2008; 111(8):4413–5.

153. La Garza A de, Sinha A, Bowman TV. Concise Review: Hematopoietic Stem Cell Origins: Lessons from Embryogenesis for Improving Regenerative Medicine. *Stem Cells Translational Medicine* 2017; 6(1):60–7.
154. Martinez-Agosto JA, Mikkola HKA, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes & Development* 2007; 21(23):3044–60. doi: 10.1101/gad.1602607.
155. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 2003; 9:653 EP -.
156. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y et al. A Role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000; 102(2):199–209. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00025-8.
157. Tilki D, Hohn H-P, Ergün B, Rafii S, Ergün S. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 2009; 15(11):501–9. doi: 10.1016/j.molmed.2009.09.004.
158. Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-Oncology* 2006; 8(3):261–79.
159. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglia function in brain tumors. *J. Neurosci. Res.* 2005; 81(3):447–55. doi: 10.1002/jnr.20485.
160. Alessandri G, Girelli M, Taccagni G, Colombo A, Nicosia R, Caruso A et al. Human vasculogenesis ex vivo: Embryonal aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors. *Laboratory Investigation* 2001; 81:875 EP -.
161. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 2000; 182(3):311–22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Ontogenese der Mikroglia.....	4
Abbildung 2 Lichtmikroskopische Darstellung des BRA	26
Abbildung 3: Darstellung der Zeitreihe.....	27
Abbildung 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) des BRA.....	30
Abbildung 5: Charakterisierung der CD44+ Zellen mittels Immunfluoreszenz	32
Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung des BRA gegen CD44 und Ki67	34
Abbildung 7: repräsentative Immunfluoreszenz-Doppelfärbung des BRA gegen glatte Muskelzellenmarker (alpha-SMA) und Stammzellmarker (CD44).....	36
Abbildung 8: Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen des BRA gegen CD44 und NG2	38
Abbildung 9: Charakterisierung der CD 45+ Zellen des BRA	40
Abbildung 10: Charakterisierung der CD 45+ Zellen mittels Immunfluoreszenz.....	42
Abbildung 11: repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung des BRA gegen Mikroglia/Makrophagenmarker Iba-1	44
Abbildung 12: repräsentative immunfluoreszenz-Doppelfärbung des BRA gegen Iba-1 und F4/80	45
Abbildung 13: a-c positive Kontrolle für CD31-Antikörper im ARA. e-f. negative Kontrolle für CD31-Antikörper.....	47
Abbildung 14: repräsentative immunfluoreszenz-Doppelfärbung des BRA gegen den Astrozytenmarker (GFAP) und den Mikroglia-/Makrophagenmarker (F4/80).....	48
Abbildung 15: positive Kontrolle für GFAP-Antikörper.	49

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper.....	19
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper	19
Tabelle 3 Semiquantitative Auswertung der Aussprossungen im BRA.....	28
Tabelle 4 Semiquantitative Auswertung der CD44+ Zellen.....	31
Tabelle 5 Semiquantitative Auswertung der CD45+ Zellen im BRA	39
Tabelle 6 Semiquantitative Erfassung der Iba-1+ Zellen im BRA	43

V. Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. med. Kürten sowie Herrn Prof. Dr. med. Ergün, Institut für Anatomie und Zellbiologie für die Überlassung der interessanten Fragestellung meiner Doktorarbeit, die freundliche Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit zur Durchführung der Dissertation ganz herzlich bedanken.

Für die Einarbeitung im Labor und für die nette und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während der gesamten Arbeit möchte ich Alla Ganscher, Eleonora Maier, Erna Kleinschroth herzlich danken.

Dr. Damiano Rovituro, Daniella Edler, Eleonora Maier und Tobias Königer danke ich für engagierte Beratung und das konstruktive Korrekturlesen der Arbeit und bei Erstellung der Dissertation.

Meiner Familie sowie aller Freunde danke ich für die großzügige Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

