

5 Ergebnisse

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden vier Endothelzellkulturen aus dem bovinen Corpus luteum cyclicum herangezogen. In anderen Untersuchungen der Arbeitsgruppe dienten diese Kulturen bereits als Modelle für die *in vitro* Gefäßbildung (Plendl et al., 1996b; Plendl, 1997; Budde, 1999; Fuchs-Schönleber, 1999; Schuster, 2002; Bahramsoltani, 2003; Bahramsoltani und Plendl, 2004; Lienau, 2003; Lienau et al., 2005). Während die Zellkultur *BCI AA* aus dem Corpus luteum cyclicum in Anbildung stammte, waren die Zellkulturen *BCI RN*, *BCI RA1* und *BCI RA2* aus dem Corpus luteum cyclicum in Rückbildung isoliert worden.

Obwohl diese mikrovaskulären Endothelzellen aus dem gleichen Organtyp, dem Corpus luteum, isoliert und unter identischen Bedingungen kultiviert worden waren, zeigten sie deutlich morphologisch-lichtmikroskopische Unterschiede. 3 der 4 Zellkulturen durchliefen eine charakteristische, für die jeweilige Kultur typische vaskuläre Entwicklung. Eine Zellkultur zeigte keine Potenz zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen.

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse bezüglich der Unterschiede dieser Zellkulturen auf morphologischer, funktioneller und antigener sowie molekularer Basis dargelegt. Durch dieses Screening wurde zum einen eine detaillierte Katalogisierung der spezifischen Charakteristika dieser Zellkulturen erarbeitet und zum anderen die Ursache für deren Heterogenität im adulten Organismus aufgeklärt.

5.1 Untersuchung der Morphologie und vaskulären Entwicklung der mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2*

Zur Beobachtung waren alle Zellen in 24-Lochplatten und jeweils einer Konzentration von 1×10^6 ausgesät worden. Die Inkubation der Zellen wurde im selben Untersuchungszeitraum, unter identischen Bedingungen (37°C, 5% CO₂, relative Luftfeuchtigkeit 97%) durchgeführt. Eine Induktion zur vaskulären Entwicklung wurde mit dem Selektivmedium P0 (siehe 2.1.4.3) herbeigeführt. Die Charakterisierung der Zellkulturen erfolgte innerhalb eines Zeitraums von 42 Tagen. Die Entwicklung der Zellkulturen *BCI AA* und *BCI RN* wurde auch über diesen Zeitraum hinaus beschrieben.

5.1.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung der mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2 in vitro*

5.1.1.1 Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur *BCI AA in vitro*

24 Stunden nach der Aussaat war der Kulturschalenboden lückenlos von polygonalen und länglichen Zellen bedeckt. Zu diesem Zeitpunkt konnte bereits ein für die Zellkultur *BCI AA* aus dem bovinen Corpus luteum im Stadium der Anbildung typisches Wachstumsmuster beobachtet werden: Um eine zentrale polygonale Zelle gruppierten sich peripher ungefähr 10 längliche Zellen (Abbildung 1).

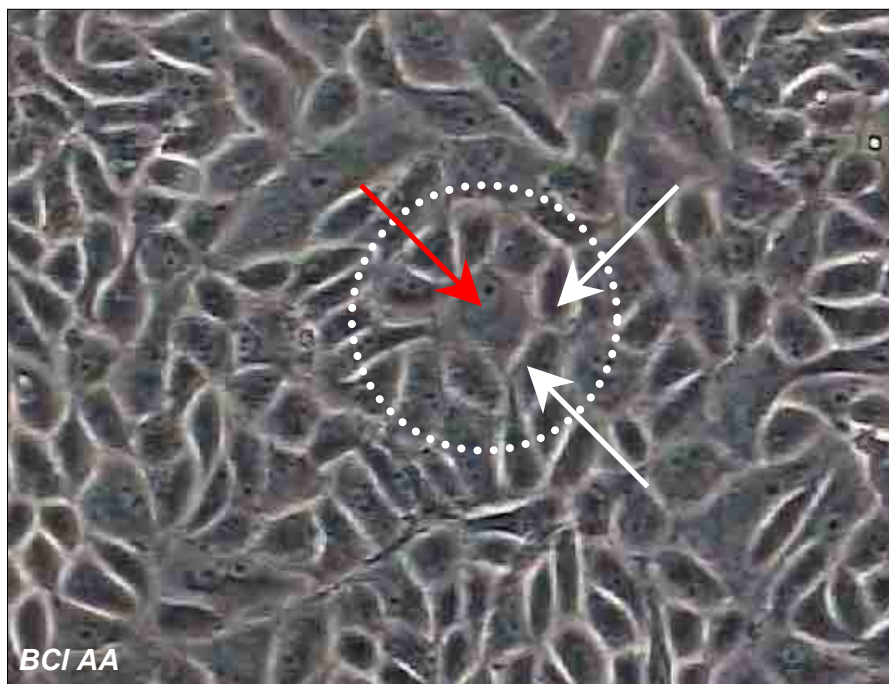


Abbildung 1

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI AA*.**

Typische Zellformation 24 Stunden nach der Einsaat. Eine zentrale, polygonale Zelle (roter Pfeil) umgeben von einem Ring länglicher Zellen (weiße Pfeile). Phasenkontrastmikroskop x 200

Diese typische zelluläre Gruppierung trat pro Gesichtsfeld (Vergrößerung x 200) etwa 100 mal auf. Im folgenden war immer wieder zu beobachten, dass die weitere vaskuläre Entwicklung von diesen spezifischen Zellgruppen ausging. Deswegen wurden diese Zellgruppen als „Starting Points“ betitelt. Innerhalb der folgenden 3 Tage der *in vitro* Kultivierung proliferierten die Zellen dieser Zellformationen intensiv, während benachbarte

Zellen sich vergleichsweise geringer vermehren. Am 7. Kultivierungstag waren die Endothelzellen der spezifischen Zellformationen zu Clustern proliferiert (Abbildung 2).

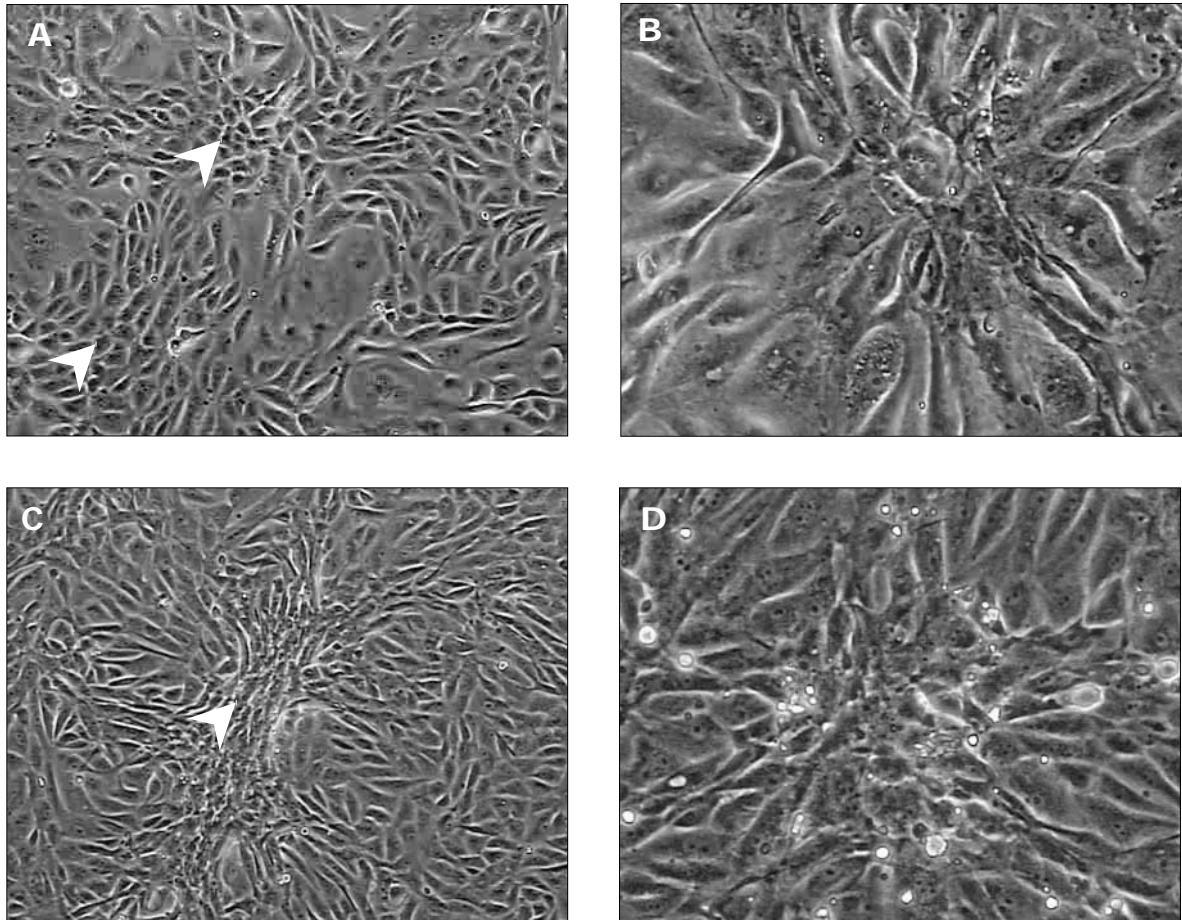


Abbildung 2

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum in Anbindung der Zellkultur BCI AA.**

A, B: 3 Tage nach der Einsaat proliferieren die Zellen der spezifischen Zellgruppierungen intensiv (Pfeilspitzen), während umgebende Zellen eine vergleichsweise geringere Vermehrungsrate aufweisen. C, D: Zellcluster am 7. Kultivierungstag (Pfeilspitze).

Phasenkontrastmikroskop B, D x 200, A, C x 100

Im weiteren Verlauf traten die Zellcluster über ca. 100 µm lange Zellausläufer einzelner Endothelzellen in Verbindung. Die langsamer proliferierenden Zellen des Monolayers, die zwischen den Zellansammlungen lagen, wurden dabei von diesen Zellausläufern überbrückt (Abbildung 3).

In den folgenden Tagen kam es zu einer massiven Vermehrung der überbrückenden Zellen, so dass die Cluster bis zum 14. Kultivierungstag über zahlreiche, parallel verlaufende „Zellstraßen“ miteinander vernetzt wurden. Solche Strukturen erreichten eine Breite von 50 µm bis 260 µm. Eine Beurteilung der Anzahl der beteiligten Zellen war phasenkontrastmikroskopisch nicht mehr möglich.

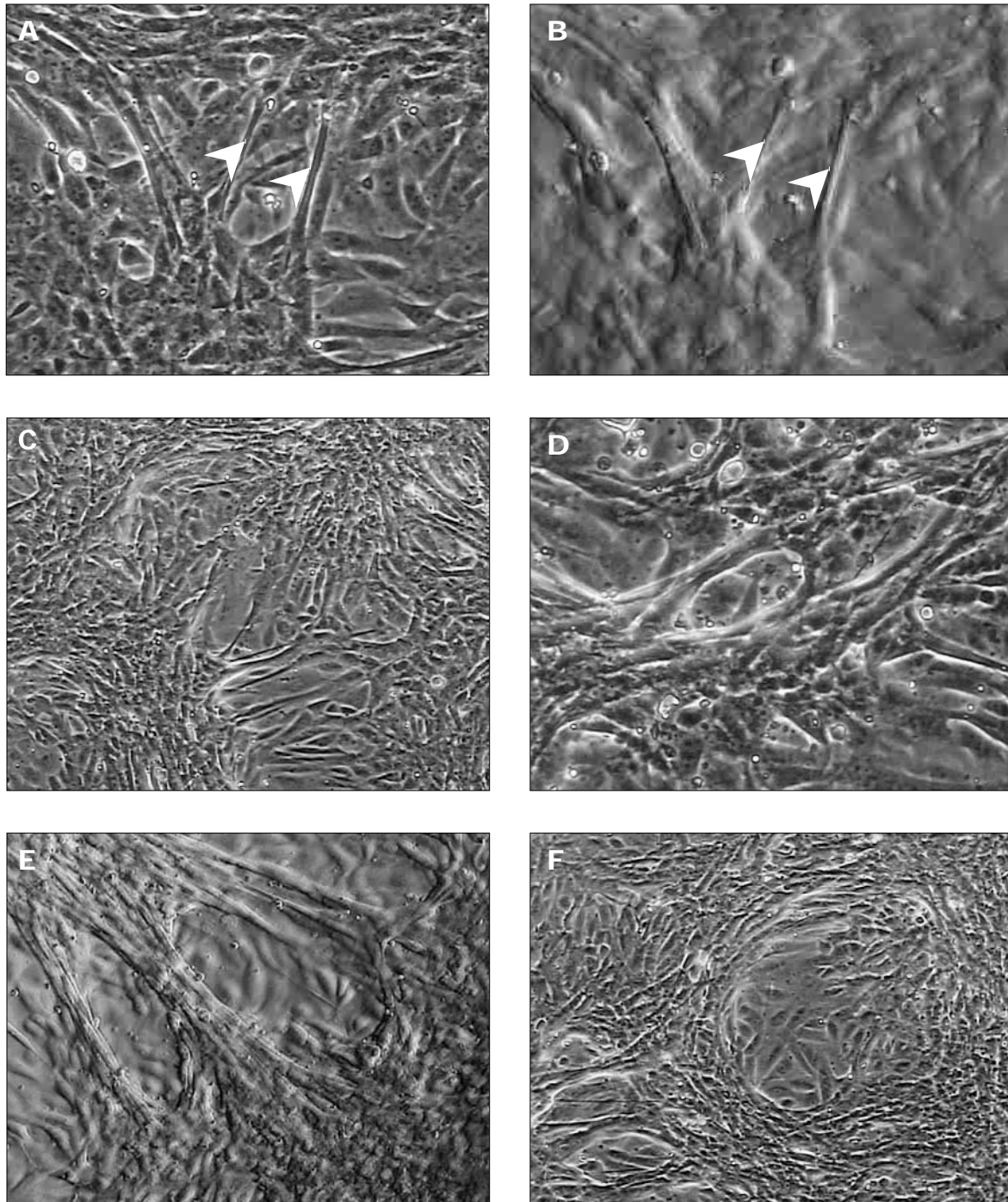


Abbildung 3

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI AA nach 10, 14, 21 und 28 Tagen.**

A, B (schräger Lichteinfall): 10 Tage nach Einsaat. Zellcluster stehen über lange Ausläufer miteinander in Kommunikation (Pfeilspitzen). C, D: 14 Tage nach Einsaat. Zellen des Monolayers gliedern sich ein (Pfeile). E: 21 Tage nach Einsaat. Durch Aneinanderlagerung neuer Zellreihen bildet sich ein Netzwerk parallel verlaufender Strukturen. D: 28 Tage nach Einsaat. Die Endothelzellen bilden ein dreidimensionales Netzwerk. Phasenkontrastmikroskop A, B, D x 200, C, E, F x 100

Das zelluläre Netzwerk befand sich teilweise in der dritten Dimension, die Zellcluster selbst behielten ihre Adhärenz am Kulturschalenboden.

Die Zellen des Monolayers zwischen den Clustern nahmen im weiteren Verlauf der Kultivierung zunehmend längliche Gestalt an und gliederten sich augenscheinlich in das Zellnetzwerk ein (Abbildung 3).

Durch weitere extensive Proliferation und Migration der Endothelzellen prägte sich im folgenden ein Netzwerk aus mehrzelligen, dreidimensionalen, kapillarähnlichen Strängen vom 28. bis zum 42. Tag der Kultivierung aus (Abbildung 4).

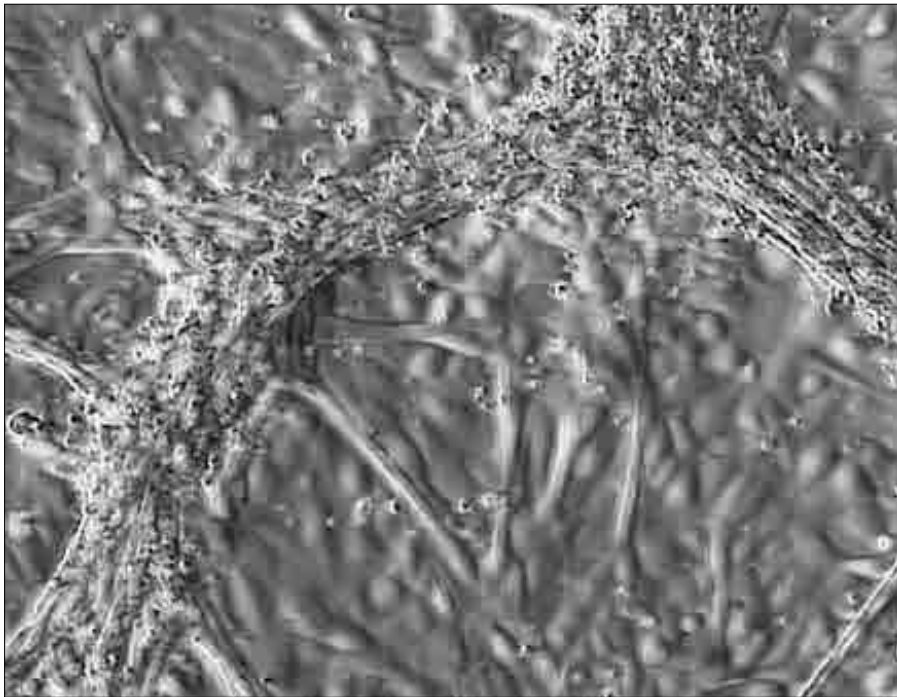


Abbildung 4

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI AA 42 Tage in Kultur.**

Ein extensives Netzwerk dreidimensionaler und kapillarähnlicher Strukturen aus Endothelzellen. Phasenkontrastmikroskop (schräger Lichteinfall) x 100

Wurden Endothelzellen dieser Zellkultur über den Zeitraum von 42 Tagen hinaus kultiviert, dann traten im Monolayer zunächst vereinzelt zellfreie Lücken auf. Daraufhin dehnten sich diese zellfreien Areale räumlich aus, bis schließlich am 63. Tag nur noch wenige Zellen unter dem jetzt in toto vom Kulturschalenboden abgehobenen, kommunizierenden System endothelialer Stränge auszumachen waren (Abbildung 5). Die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung erlaubte keine eindeutige Beurteilung des Verbleibs der Zellen des Monolayers. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Endothelzellen zum großen Teil in das Netzwerk eingliederten, da kaum tote Zellen im Medium zu finden waren.

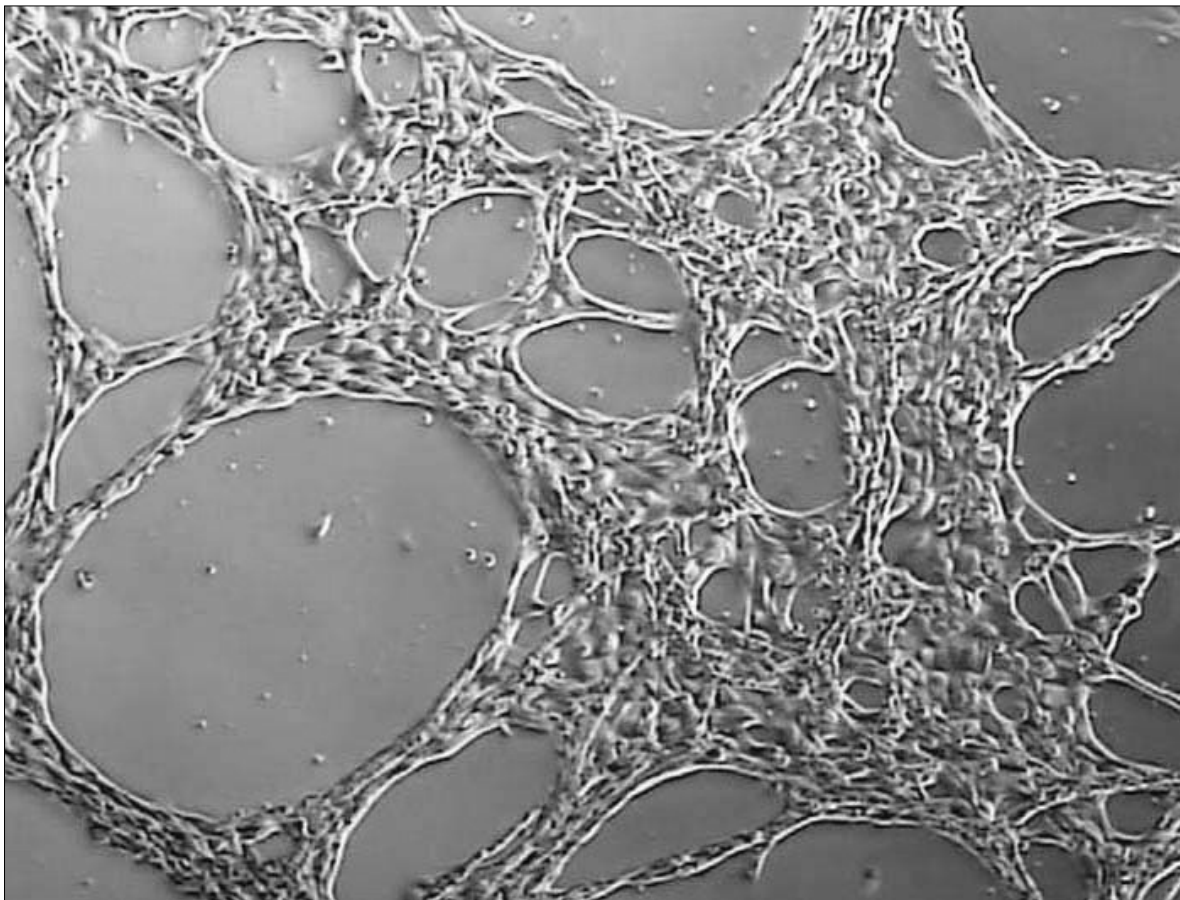


Abbildung 5

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI AA nach 63 Tagen.**

Kommunizierendes System kapillarähnlicher Strukturen.
Phasenkontrastmikroskop x 100

5.1.1.2 Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur *BCI RN in vitro*

Die Endothelzellkultur *BCI RN*, isoliert aus dem Corpus luteum im Stadium der Rückbildung, lag nach 24 Stunden als konfluenter Monolayer vor (Abbildung 6). Die Zellen waren zu 70% von spindelförmiger Gestalt, es traten auch ca 30% polygonale Zellen in Erscheinung. Im Verlauf der *in vitro* Kultivierung lagerten sich die länglichen Endothelzellen innerhalb des Zellverbandes linear einander an, wobei girlandenförmige Strukturen entstanden. Solche Gebilde waren regelmäßig peripher um Gruppen (1-5 Zellen) polygonaler Zellen angeordnet. Die polygonalen Zellen waren größeren Ausmaßes (70 µm breit, 180 µm lang) als die länglichen Zellen (50 µm breit, 100 µm lang). Zahlreiche granuläre intrazytoplasmatische Zelleinschlüsse kennzeichneten das Zellbild. Die Endothelzellkultur *BCI RN* verblieb bis zum 42. Kultivierungstag im 2-dimensionalen Monolayerstadium und zeigte keine weitere vaskuläre Entwicklung. Auch Langzeitkultivierungsexperimente führten zu keiner morphologischen Veränderung der Kultur (Abbildung 7).

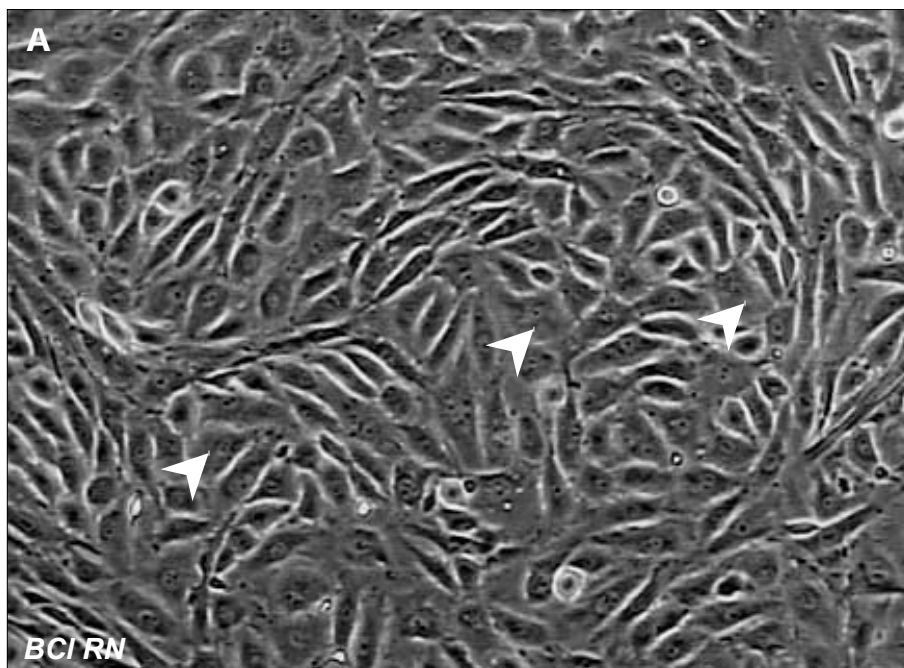
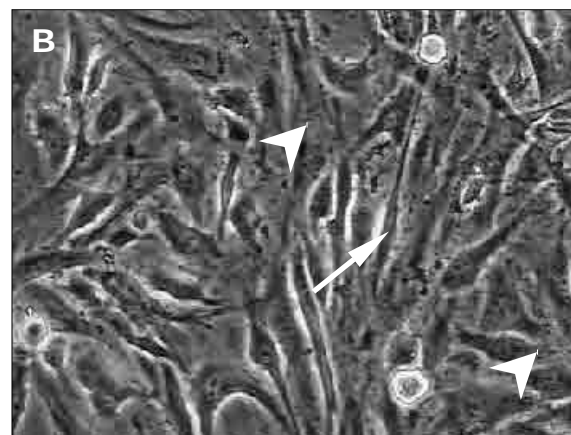


Abbildung 6

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur *BCI RN* nach 24 Stunden.**

A: Konfluenter Monolayer aus großen spindelförmigen und polygonalen (Pfeilspitzen) Zellen. B: Spindelförmige Zellen mit Zellausläufern (Pfeil). Granuläre intraplasmathe Zelleinschlüsse kennzeichnen das Zellbild (Pfeilspitzen).

Phasenkontrastmikroskop A x 100, B x 200



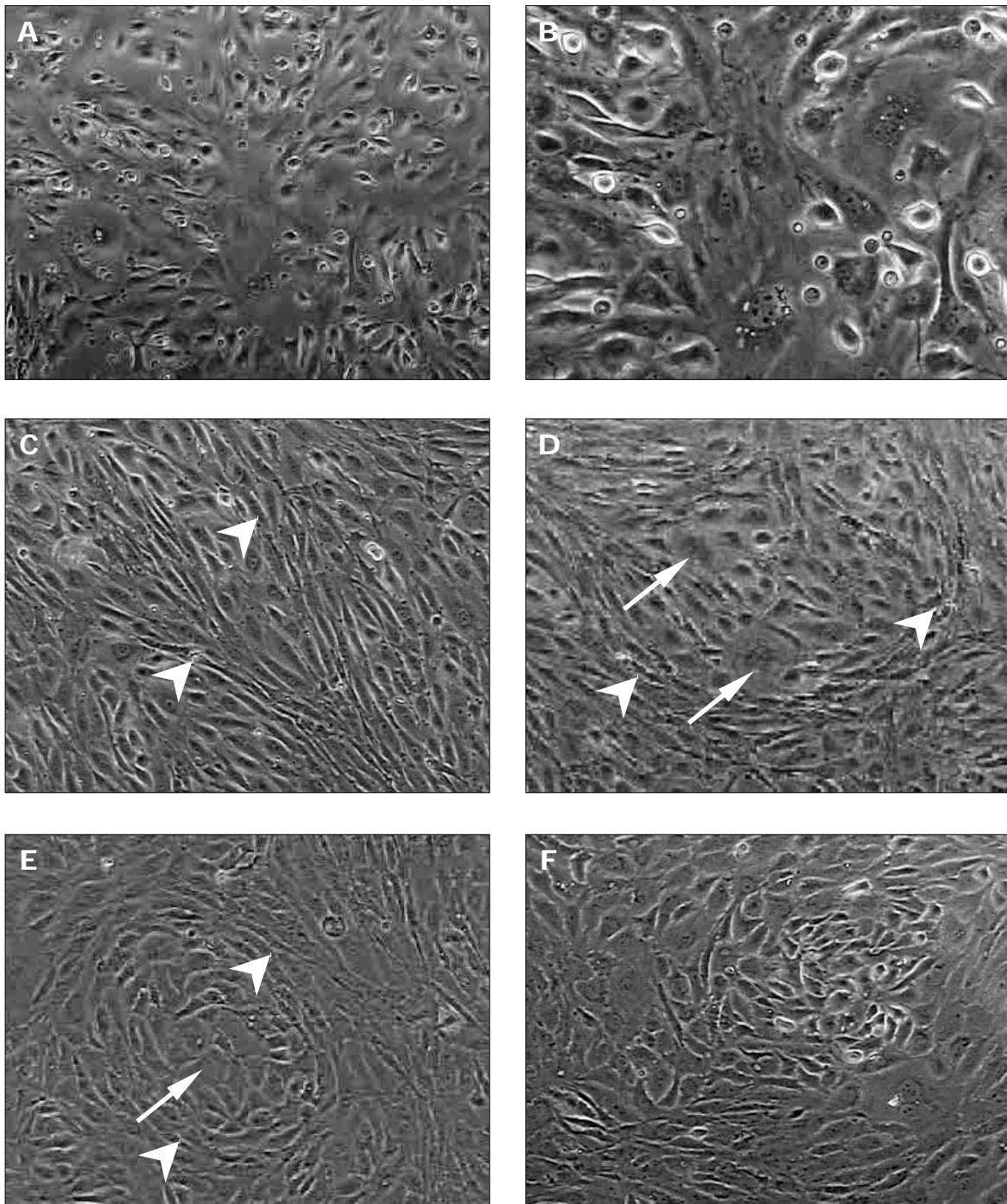


Abbildung 7

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RN nach 2, 14, 28, 42 Tagen.**

A, B (2 Tage *in vitro*): Polygonale und längliche Zellen mit unterschiedlicher Größe. C (14 Tage *in vitro*): Lineare Anordnung der Zellen innerhalb des Zellverbandes (Pfeilspitzen). D (14 Tage *in vitro*), E (28 Tage *in vitro*): Ausbildung girlandenförmiger Strukturen (Pfeilspitzen), die peripher um Gruppen polygonaler Zellen (Pfeile) angeordnet sind. F (42 Tage *in vitro*): Persistieren der Zellkultur im 2-dimensionalen Monolayerstadium, keine vaskuläre Entwicklung.

Phasenkontrastmikroskop A, C, D, E, F x 100, B x 200

5.1.1.3 Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur *BCI RA1 in vitro*

Die Endothelzellen der Zellkultur *BCI RA1* wurden aus dem bovinen Gelbkörper im Stadium der Rückbildung isoliert. Innerhalb von 3 Tagen nach der Einsaat war durch Proliferation der Endothelzellen die gesamte Fläche der Kulturschale von adhärennten Zellen konfluent bedeckt. Die überwiegend polygonalen Zellen ließen das für Endothelzellen typisch geltende „Kopfsteinpflaster-Muster“ beobachten (Abbildung 8).



Abbildung 8

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur *BCI RA1* nach 3 Tagen.**

Die gesamte Fläche der Kulturschale ist von adhärennten Zellen im "Kopfsteinpflaster-Muster" bedeckt. Phasenkontrastmikroskop x 100

Nachdem der Monolayer vollständige Konfluenz erreicht hatte, veränderten in der darauffolgenden Kultivierungszeit ca. 40% der Zellen ihre Form von polygonal zu länglich. Diese waren diffus verstreut im gesamten Zellrasen zu finden. Um den siebten Tag der Kultivierung lagerten sich die länglichen Zellen hintereinander an und arrangierten sich linear und zirkulär innerhalb des Zellverbands (Abbildung 9).

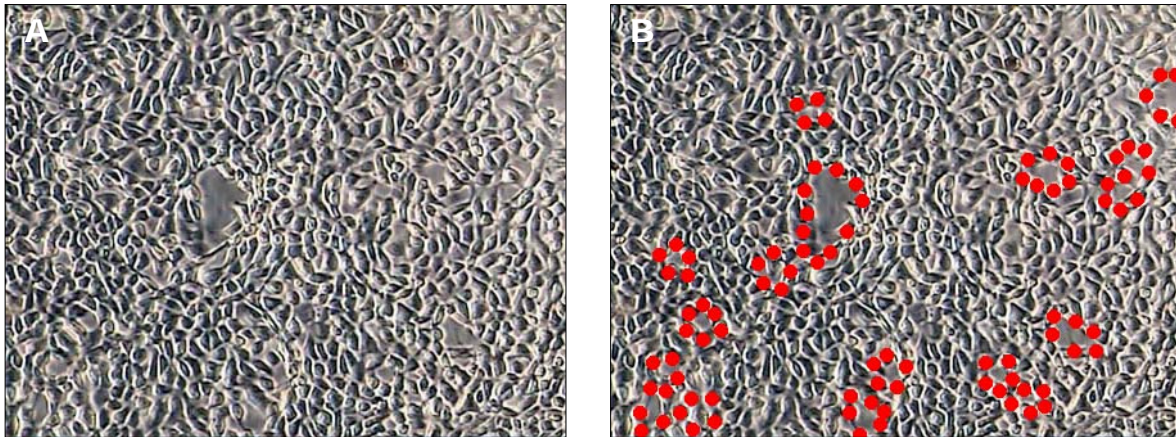


Abbildung 9

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RA1 nach 7 Tagen.**

A und B (identisches Gesichtsfeld): Längliche Zellen arrangieren sich linear und zirkulär innerhalb des Zellverbands. B: Die roten Punkte verdeutlichen das Wachstumsmuster der Zellen.

Phasenkontrastmikroskop x 100

Bis zum Tag 14 in Kultur nahm die Anzahl der länglichen, sich zirkulär anordnenden Zellen erheblich zu. Es konnte beobachtet werden, dass innerhalb dieser Ringstrukturen zellfreie Areale entstanden. Mit steigender Anzahl sich kreisförmig anordnender Zellen erschienen auch mehr zellfreie Areale (Durchmesser bis zu 100 μm) innerhalb dieser zellulären Ringformationen. Etwa 50% der zellfreien Areale wurden durch diagonal verlaufende Zellausläufer geteilt (Abbildung 10).

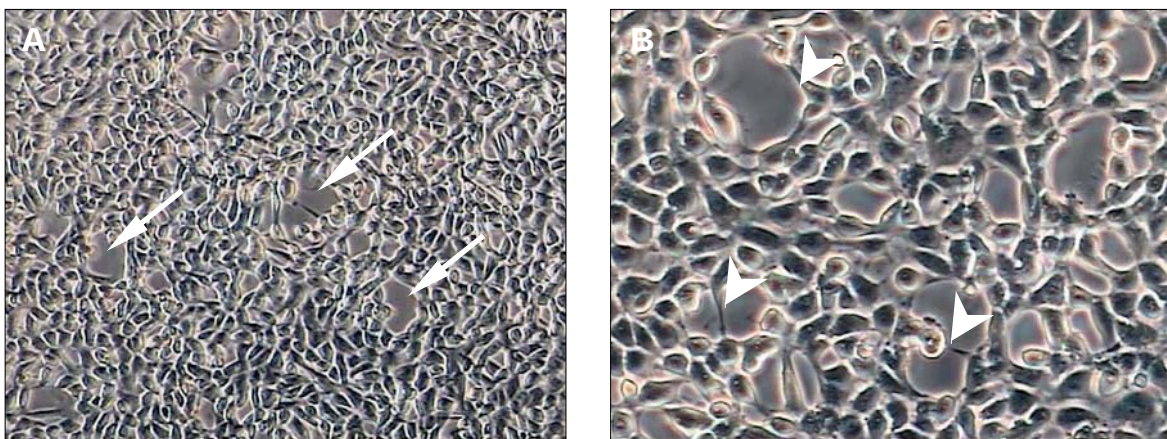


Abbildung 10

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RA1 nach 14 Tagen.**

A: Zellfreie Bereiche innerhalb sich zirkulär anordnender Zellen (Pfeile). B: Insertionen diagonal orientierter Zellausläufer unterteilen zellfreie ringförmige Areale (Pfeilspitzen). Phasenkontrastmikroskop A x 100, B x 200

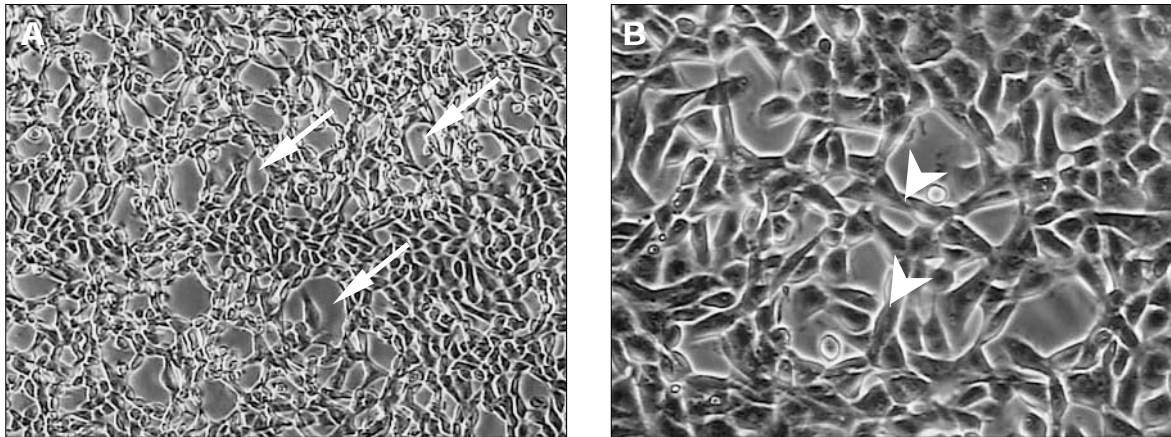


Abbildung 11

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RA1 nach 28 Tagen.**

A: Über 50% der Zellen sind in das wabenartige Muster eingegliedert, zellfreie Areale (Pfeile). B: Anordnung der Zellen ähnlich wie in einer Kordel (Pfeilspitzen). Phasenkontrastmikroskop A x 100, B x 200

Am 28. Tag der Inkubation waren über 50% der Zellen in ein wabenartiges Muster eingegliedert. Die Endothelzellen schienen dabei ähnlich wie in einer Kordel angeordnet zu sein, wobei je Strang ca. 2 bis 4 Zellen beteiligt waren (Abbildung 11). Nahezu alle Zellen der Kultur gliederten sich bis zum 42. Tag in das wabenartige Zellnetzwerk ein (Abbildung 12).

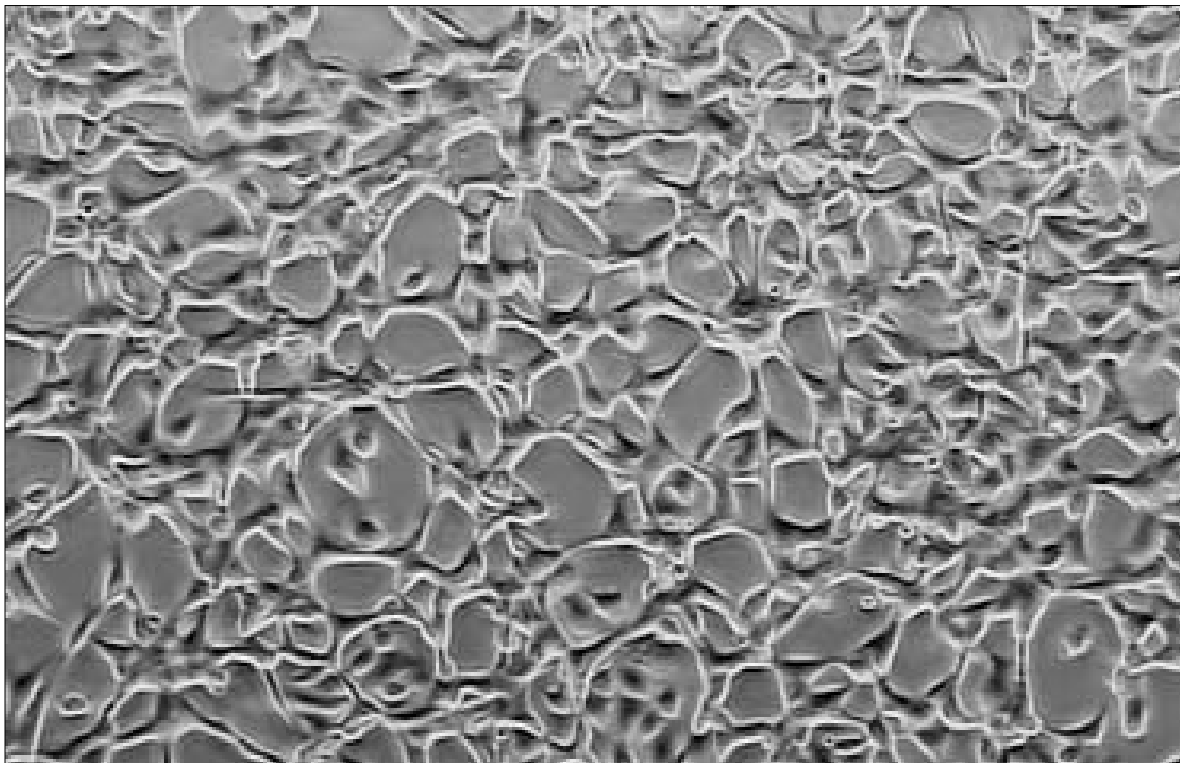


Abbildung 12

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RA1 nach 42 Tagen.**

Netzwerk aus Endothelzellen. Phasenkontrastmikroskop x 100

5.1.1.4 Vaskuläre Entwicklung der Endothelzellkultur *BCI RA2 in vitro*

Der endotheliale Zelltyp *BCI RA2* war aus dem bovinen Gelbkörper im Stadium der Rückbildung isoliert worden. Initial, 24 Stunden nach der Aussaat, war der Kulturschalenboden von polygonalen und länglichen Zellen zu 100% bedeckt und ein konfluenter Monolayer entstanden (Abbildung 13).

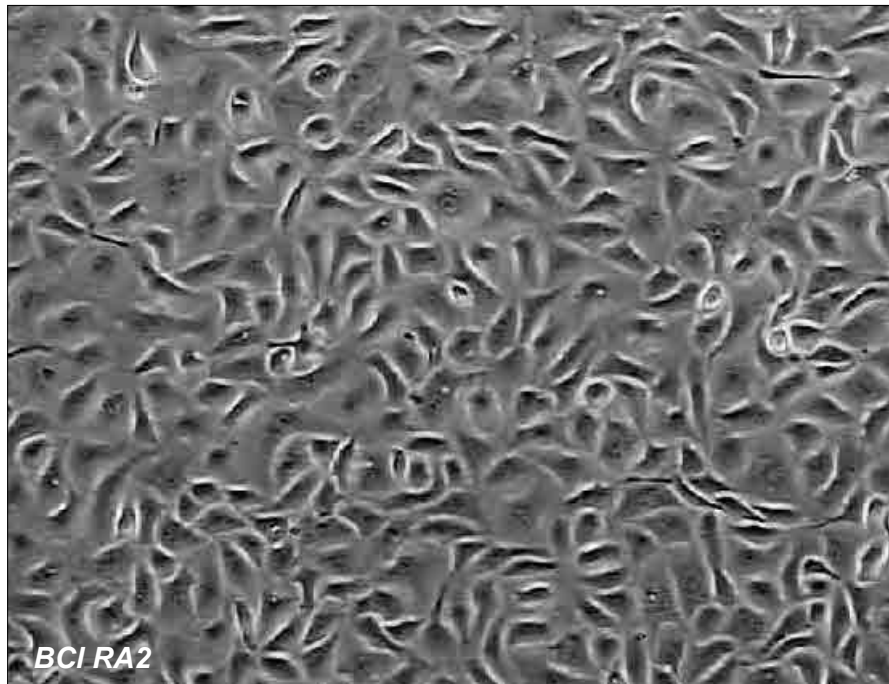


Abbildung 13

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur *BCI RA2* nach 24 Stunden.**

Der Kulturschalenboden ist von polygonalen und länglichen Zellen vollständig bedeckt (Konfluenz). Phasenkontrastmikroskop x 100

Im weiteren Verlauf der Untersuchung bis zum Tag 7 kam es zu einer Abkuglung sowie Ablösung von Zellen, die im Medium flotierten und beim Mediumwechsel abgenommen wurden (Abbildung 14).

Über lange Zellausläufer traten die verbliebenen, zumeist länglichen Zellen miteinander in Verbindung. In der folgenden Kultivierungszeit wurde ein lineares Aneinanderreihen der Zellen innerhalb des Zellrasens beobachtet.

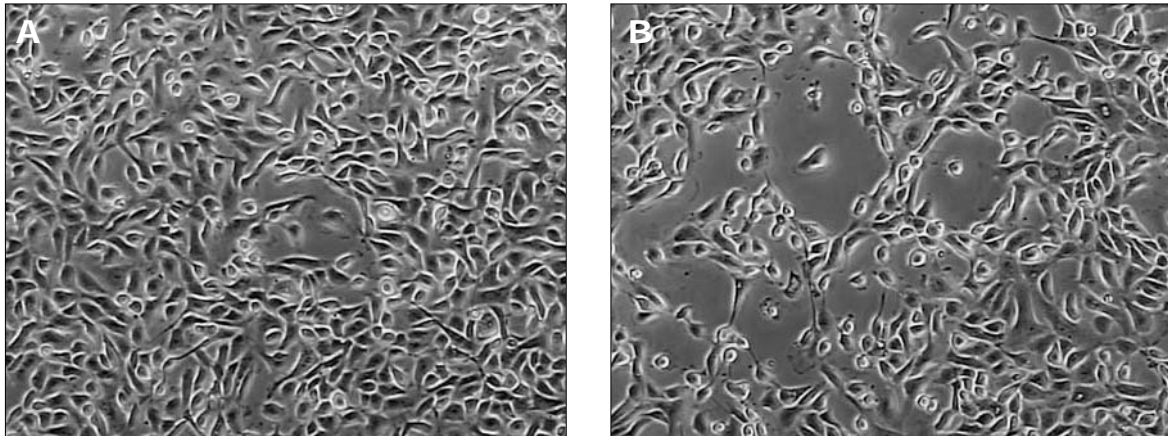


Abbildung 14

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RA2 nach 3 und 7 Tagen in Kultur.**

A: Reduzierte Zellzahl nach 3 Tagen *in vitro*. B (7 Tage *in vitro*): Kontaktaufnahme über Zellausläufer und lineares Aneinanderreihen von Zellen innerhalb des verbliebenen Zellrasens. Phasenkontrastmikroskop x 100

Die sich linear aneinanderreihenden Zellen vermehrten sich, so dass am 28. Tag *in vitro* über 50% der Zellen in endotheliale Stränge eingegliedert waren. Zum Teil hatten diese Zellstränge nur punktuell Kontakt zum Kulturschalenboden und flotierten frei im Medium (Abbildung 15).

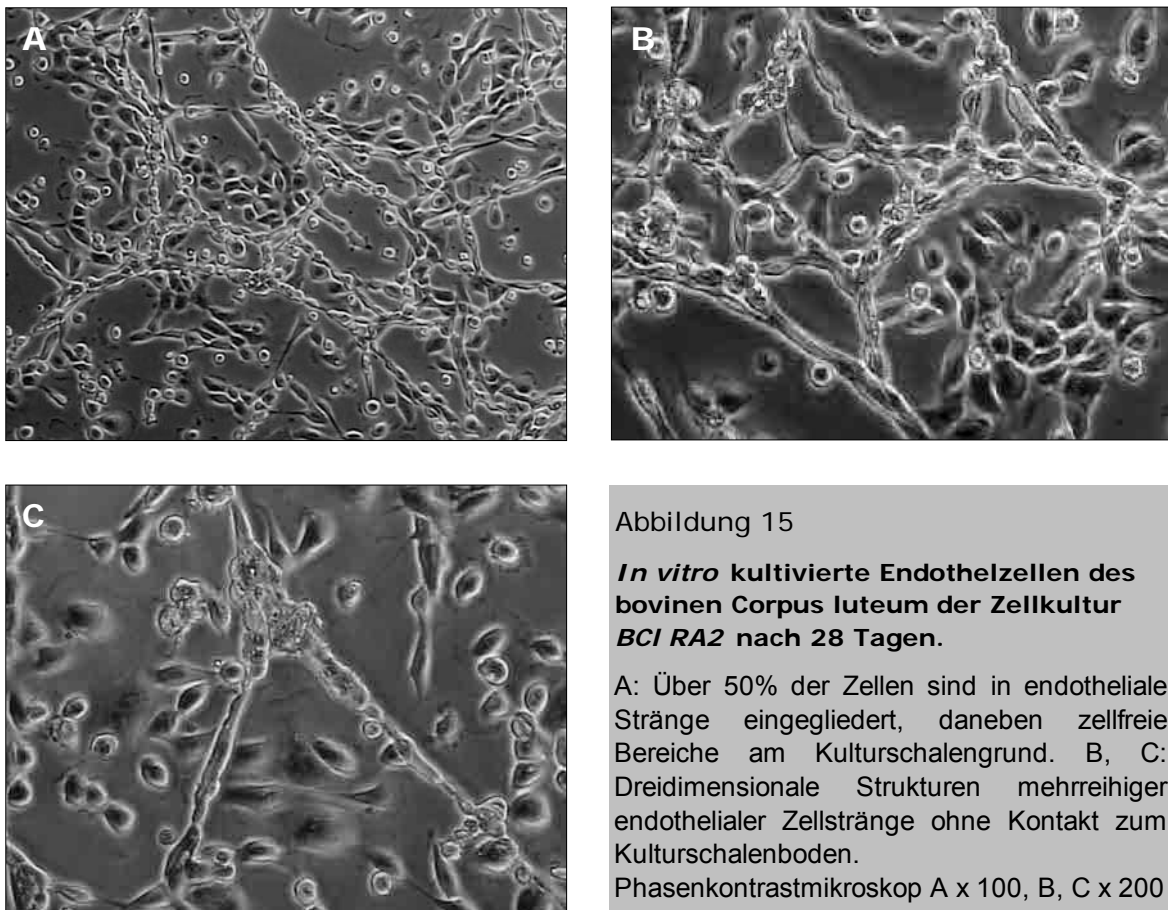


Abbildung 15

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RA2 nach 28 Tagen.**

A: Über 50% der Zellen sind in endotheliale Stränge eingegliedert, daneben zellfreie Bereiche am Kulturschalengrund. B, C: Dreidimensionale Strukturen mehrreihiger endothelialer Zellstränge ohne Kontakt zum Kulturschalenboden.

Phasenkontrastmikroskop A x 100, B, C x 200

Um so mehr Zellen sich in die zellulären Stränge eingliederten, desto mehr zellfreie Bereiche wurden am Kulturschalengrund festgestellt. Die Zellketten verzweigten sich zu einem ausgedehnten dreidimensionalen Netzwerk. Während der folgenden 14 Tage lagerten sich einzelne Zellen an die länglichen vernetzten Strukturen an und bildeten mehrlagige Zellstränge. Am 42. Kultivierungstag bestimmte ein weit verzweigtes dreidimensionales Netz kapillarähnlicher endothelialer Strukturen das Zellbild (Abbildung 16).

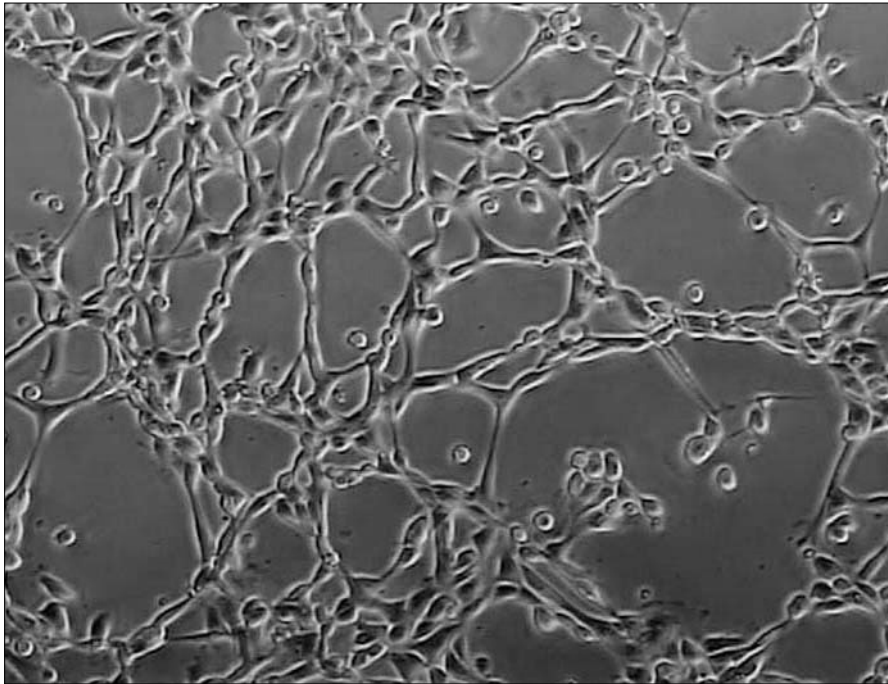


Abbildung 16

***In vitro* kultivierte Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Zellkultur BCI RA2 nach 42 Tagen.**

Ein weitverzweigtes dreidimensionales Netz kapillarähnlicher Strukturen bestimmt das Zellbild. Phasenkontrastmikroskop x 100

5.1.1.5 Tabellarischer Vergleich der Morphologie der verschiedenen mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* des bovinen Corpus luteum während der *in vitro* Kultivierung

		<i>Zellkulturtyp</i>			
		<i>BCI AA</i>	<i>BCI RN</i>	<i>BCI RA1</i>	<i>BCI RA2</i>
Tage der <i>in vitro</i> Kultivierung	1	konfluenten Monolayer, spindelförmige und polygonale Zellen, spezifische Zellgruppierungen diffus verteilt im Zellrasen	konfluenten Monolayer, spindelförmige und polygonale Zellen	konfluenten Monolayer, polygonale Zellen im Kopfsteinpflastermuster	konfluenten Monolayer, spindelförmige und polygonale Zellen
	14	Netzwerk aus mehrreihigen Zellstraßen	lineare Aneinanderreihung	lineare Aneinanderreihung, zirkuläre Anordnung, vereinzelt zellfreie Areale	lineare Aneinanderreihung, reduzierte Zellzahl
	28	dreidimensionales Netzwerk aus mehrreihigen Zellstraßen	planare, girlandenförmige Strukturen	über 50% der Zellen in wabenartiges Muster eingegliedert	über 50% der Zellen in endotheliale Stränge eingegliedert
	42	dreidimensionale Strukturen aus endothelialen, kapillarähnlichen Strängen	Sistieren in planaren Strukturen	annähernd alle Zellen in wabenartige, kapillarähnliche Stränge eingegliedert	dreidimensionale Struktur aus endothelialen, kapillarähnlichen Strängen

Tabelle 6: Morphologie der mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* des bovinen Corpus luteum während der *in vitro* Kultivierung.

5.1.2 Histologische Untersuchung der mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1* und *BCI RA2* aus dem bovinen Corpus luteum *in vitro*

Zur weiterführenden morphologischen Kontrolle der vaskulären Entwicklung wurden von den Kulturen histologische Präparate hergestellt, die nach Richardson und May-Grünwald-Giemsa-Methode gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht wurden.

5.1.2.1 Richardsonfärbung

Die Semidünnschnittpräparate, mit Methylenblau nach Richardson gefärbt, erlaubten eine effiziente Aussage über ein mehrschichtiges Wachstum, die Existenz extra- bzw. intrazellulärer Matrix, sowie die Entwicklung tubulärer Strukturen der Endothelzellkulturen.

5.1.2.1.1 Endothelzellkultur *BCI AA*

Die Zellen der Kultur *BCI AA* wuchsen nach 14 Tagen bereits in mehrschichtigen Lagen. Einige Zellen bildeten 1-2 unterschiedlich große, intrazelluläre Vakuolen aus. Intrazelluläre Vakuolen konnten auch am 28. Tag der Kultivierung nachgewiesen werden, ihr Aufkommen war vergleichsweise höher als nach 14 Tagen Inkubationsdauer. Vereinzelt traten lumenartige Strukturen auf. Solche, mit homogenem Material angefüllten Ringe, wurden von 1 bis 2 Zellen gebildet. (Abbildung 17).

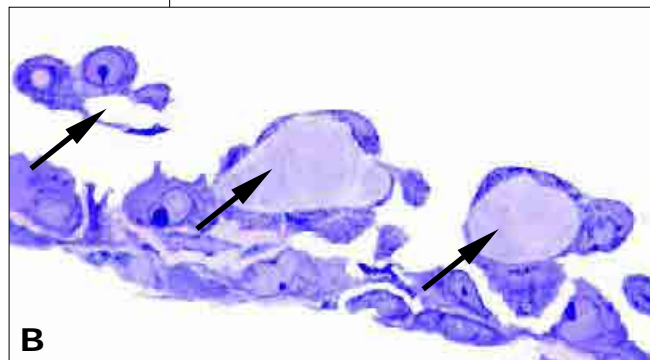
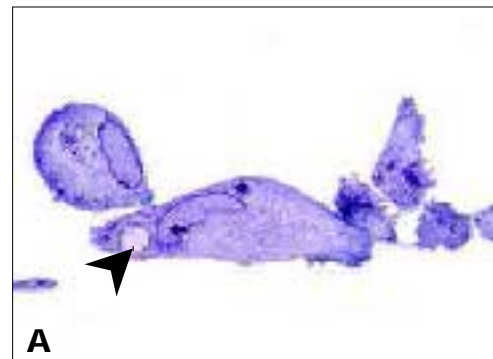


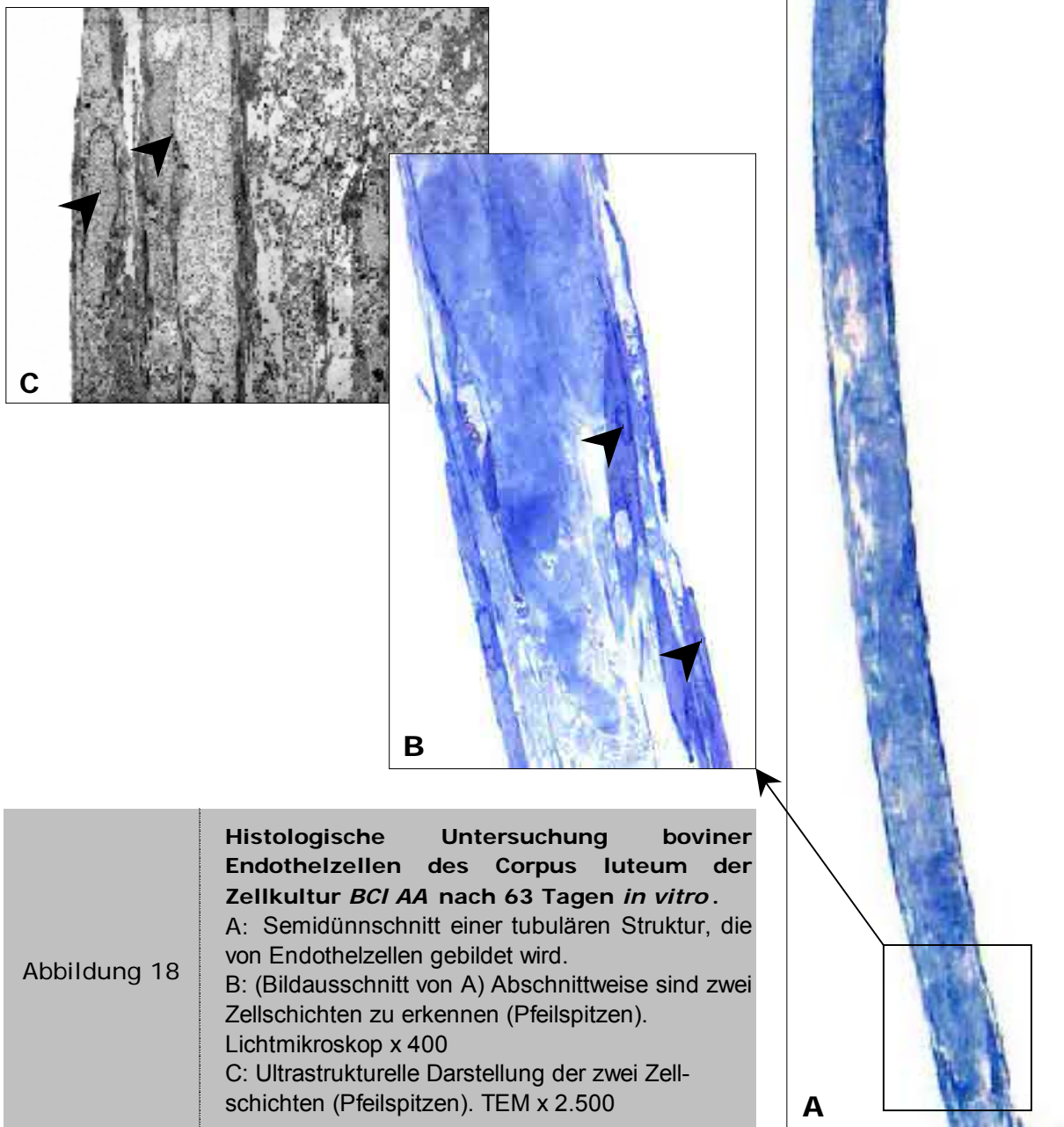
Abbildung 17

Histologische Untersuchungen boviner Endothelzellen des Corpus luteum der Kultur *BCI AA* nach 14 bzw. 42 Tagen *in vitro*.

A (14 Tage *in vitro*): Intrazelluläre Vakuole neben dem Kern (Pfeilspitze). B (42 Tage *in vitro*): Querschnitte durch tubuläre Strukturen (Pfeile). Lichtmikroskop x 400

Bei Präparaten, die nach 42 Inkubationstagen angefertigt wurden, ließen sich annähernd auf jedem Objektträger Quer- oder Längsschnitte unterschiedlich großer Tubuli aus Endothelzellen beobachten. An quergeschnittenen Tubuli konnten bis zu 8 Endothelzellen gezählt werden, welche ein Lumen umgaben. Längsanschnitte wiesen auf eine der Basalmembran gleichenden Verdichtung extrazellulären Materials hin, auf der die Zellen auflagen. In der Regel richteten sich die Zellkerne nach der abluminalen Seite aus.

Die Präparate, die am Tag 63 der Inkubation angefertigt wurden, demonstrierten lange tubuläre Strukturen, die von Endothelzellen flach ummantelt wurden. Die Zellkerne waren zentral im Zelleib lokalisiert und von länglicher Gestalt. Lichtmikroskopisch gesehen befand sich innerhalb dieser tubulären Gebilde eine homogene Masse aus Zelldetritus. Zellfragmente waren nicht im Lumen zu erkennen. Die Tubuli waren abschnittsweise von einer zweiten Zellschicht ummantelt (Abbildung 18, siehe auch Abbildung 35).



5.1.2.1.2 Endothelzellkultur *BCI RN*

Am Semidünnschnitt wurden die Ergebnisse der phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen (siehe 5.1.1.2) bestätigt. Die Zellen der Kultur *BCI RN* verblieben während des gesamten Untersuchungszeitraums in einschichtiger Lage (Abbildung 19).

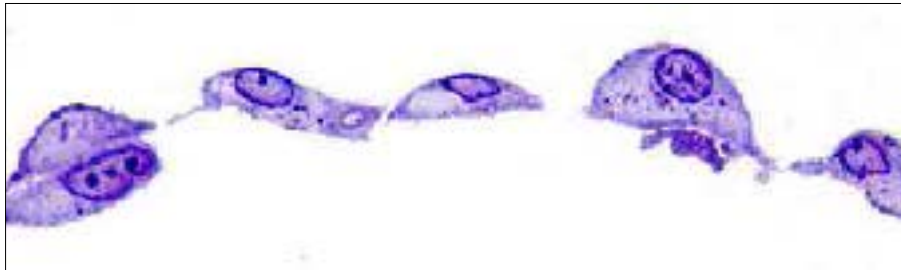


Abbildung 19

Histologische Untersuchungen boviner Endothelzellen des Corpus luteum der Zellkultur *BCI RN* nach 14 Tagen *in vitro*.
Einschichtiger Zellrasen. Lichtmikroskop x 400

Die Ausdehnung der Endothelzellen sowie ihre Form variierten stark und das Relief ihrer Oberfläche war teils bizarr geformt. Die Zellen zeigten ausgeprägte, dünne, pseudopodienartige Fortsätze auf ihren Oberflächen, mit denen sie teils untereinander in Verbindung standen. Intrazytoplasmatisch waren zahlreiche Granula vorzufinden (Abbildung 20).

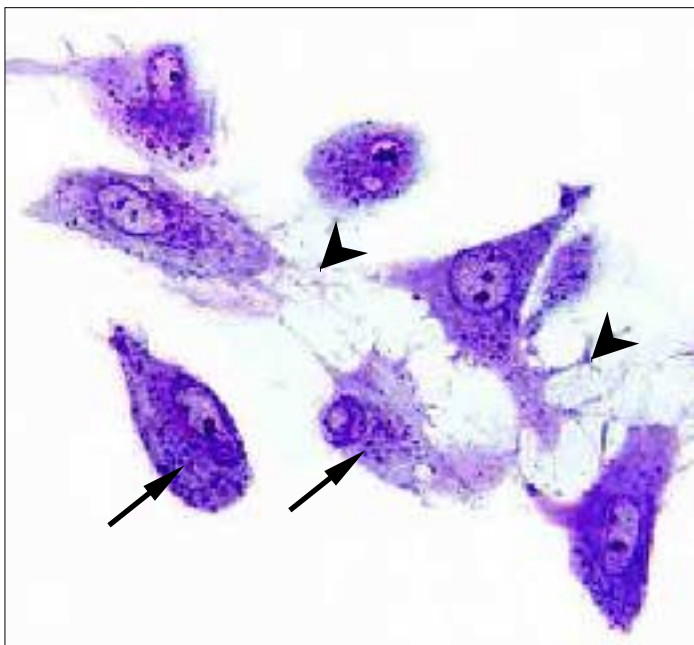


Abbildung 20

Histologische Untersuchungen boviner Endothelzellen des Corpus luteum der Zellkultur *BCI RN* nach 14 Tagen *in vitro*.

Polymorphe Zellen mit pseudopodienartigen Fortsätzen (Pfeilspitzen) und intrazytoplasmatischen Granula (Pfeile). Lichtmikroskop x 400

5.1.2.1.3 Endothelzellkultur *BCI RA1*

Abbildung 21 zeigt lichtmikroskopisch den Verlauf der Entwicklung lumenisierter endothelialer Strukturen *in vitro*. Zu Beginn bildete sich in einer Endothelzelle eine intrazytoplasmatische Vakuole (Abbildung 21/A). Im weiteren Verlauf nahm der Umfang dieser Vakuole zu. Dabei veränderte sich die Form des Zellkerns, er flachte ab. Im Semidünnschnitt zeigte sich die Zelle in Form eines Siegelrings (Abbildung 21/B). Verschmolzen die Wände intrazellulärer Vakuolen benachbarter Zellen, entstand wie in den Abbildung 21/C und 21/D dargestellt, eine lumenisierte Struktur, die von mehreren Zellen begrenzt wurde.

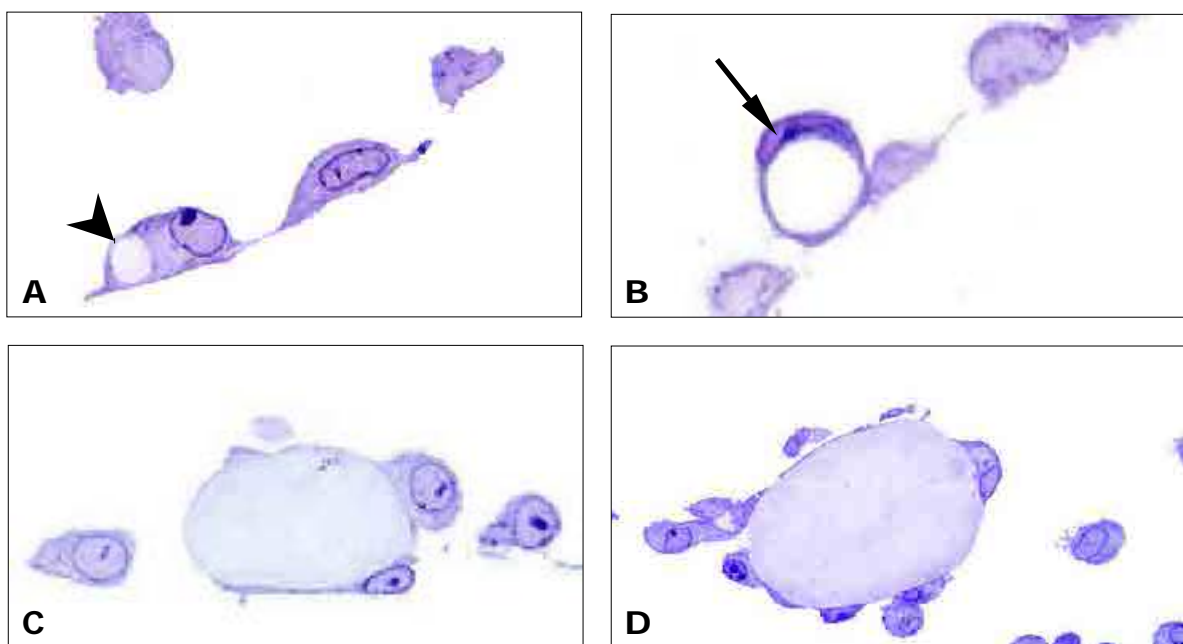


Abbildung 21

Histologische Untersuchungen boviner Endothelzellen des Corpus luteum der Zellkultur *BCI RA1* nach 28 Tagen in Kultur.

A: Intrazelluläre Vakuole (Pfeilspitze). B: infolge Umfangsvermehrung einer intrazellulären Vakuole siegelringförmige Endothelzelle (Pfeil). C, D: Endothelzellen begrenzen ein Lumen. Lichtmikroskop x 400

Mit Hilfe in Serie angefertigter Semidünnschnittpräparate war es möglich, das wabenartige Muster, welches im Kapitel 5.1.1.3 (phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen) beschrieben wurde, darzustellen. Dabei konnte innerhalb der Stränge des Endothelzellnetzes ein kontinuierliches, mit homogenem Material angefülltes Lumen erfasst werden (Abbildung 22).

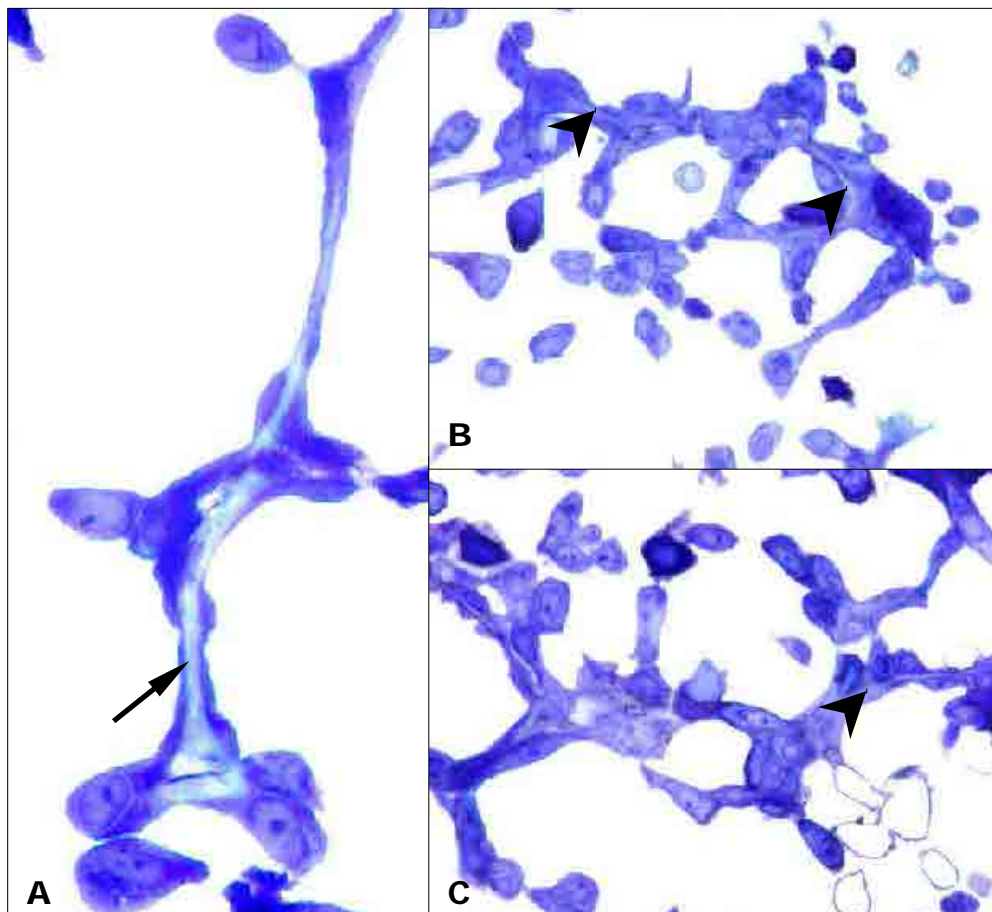


Abbildung 22

Histologische Untersuchungen boviner Endothelzellen des Corpus luteum der Kultur *BCI RA1* nach 42 Tagen *in vitro*.

A: Kontinuierliche lumenisierte Struktur innerhalb eines Zellstranges (Pfeil). B, C: Wabenartige Anordnung der Zellen, innerhalb der Zellstränge Lumina, angefüllt mit homogenem Material (Pfeilspitzen). Lichtmikroskop x 400

5.1.2.1.4 Endothelzellkultur *BCI RA2*

Die Zellen der Kultur *BCI RA2* wiesen bei den histologischen Untersuchungen nach 28 Tagen in Kultur intrazelluläre Vakuolen verschiedener Größe auf. Sowohl Quer- als auch Längsschnitte der tubulären Strukturen zeigten ein Lumen. Die Zellkerne richteten sich regelmäßig zur abluminalen Seite aus (Abbildung 23).

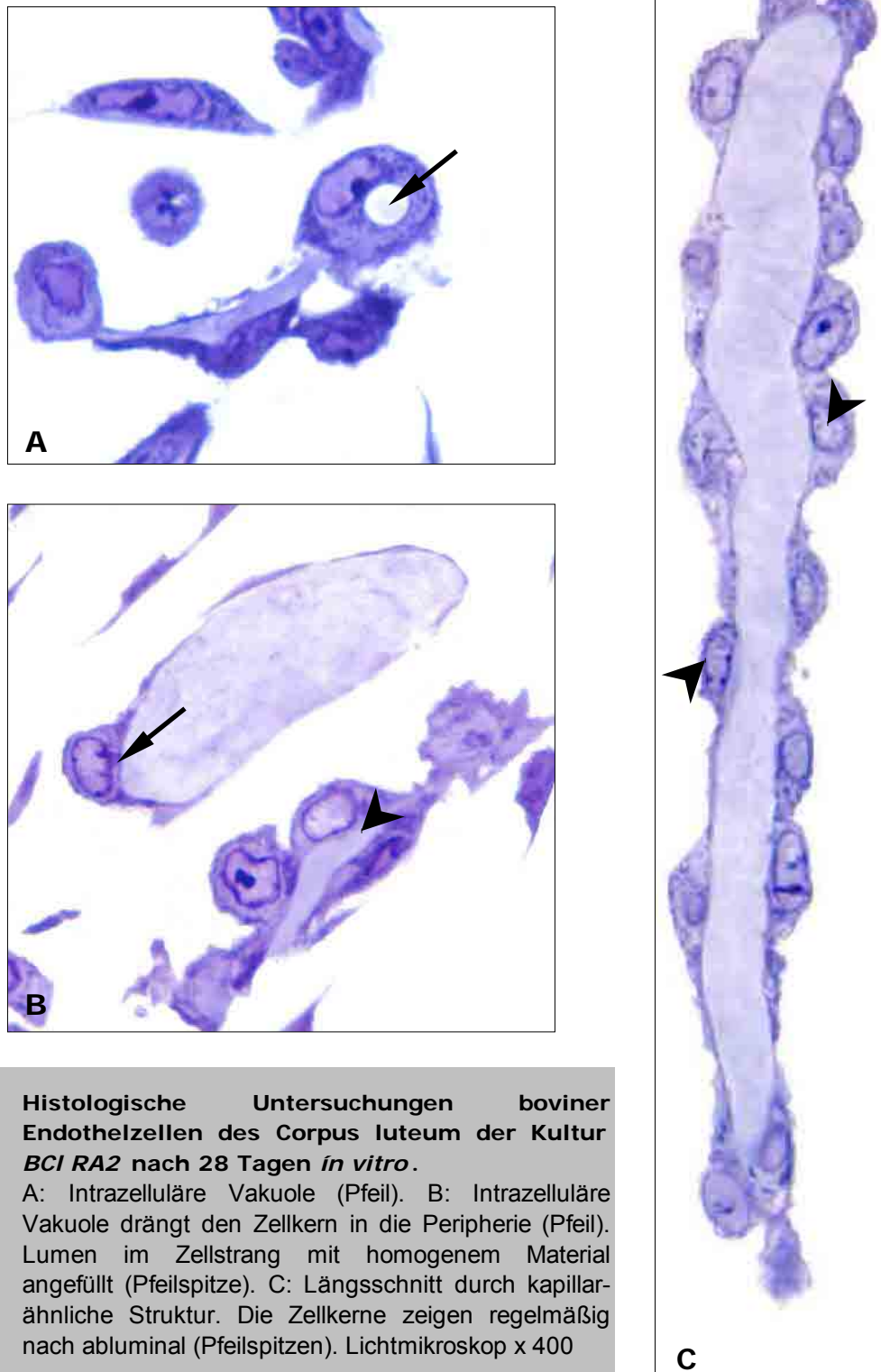


Abbildung 23

Histologische Untersuchungen boviner Endothelzellen des Corpus luteum der Kultur *BCI RA2* nach 28 Tagen *in vitro*.

A: Intrazelluläre Vakuole (Pfeil). B: Intrazelluläre Vakuole drängt den Zellkern in die Peripherie (Pfeil). Lumen im Zellstrang mit homogenem Material angefüllt (Pfeilspitze). C: Längsschnitt durch kapillar-ähnliche Struktur. Die Zellkerne zeigen regelmäßig nach abluminal (Pfeilspitzen). Lichtmikroskop x 400

5.1.2.2 May-Grünwald-Giemsa Färbung

Histologische Präparate nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt, ermöglichten eine Aussage über das Vorkommen von Apoptosen in den kultivierten Endothelzellen (*BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2*). Die Untersuchungen wurden an den drei Eckterminen 14, 28 und 42 Tage nach Einsaat durchgeführt.

Darüber hinaus erlaubte diese Methode eine Beurteilung über das Vorhandensein von Endothelzell-synthetisierter Matrix, sowie eine Interpretation über die Ausdehnung von Lumina innerhalb solider endothelialer Stränge.

5.1.2.2.1 Apoptosen

Apoptosen zeichnen sich durch eine Kondensation des Kernchromatins, eine hochgradige Schrumpfung der Zelle und die Entstehung von apoptotischen Körperchen aus. Es konnte zwischen frühen und späten Apoptosen differenziert werden (Abbildung 24). Als frühe Apoptose galt die Chromatinkondensation, die sich am Saum des Kerns einer Zelle als dunkler Rand zeigte. Späte Apoptosen wurden charakterisiert als vollständige Kondensation des Chromatins (dunkler Kern) und beginnende Zellschrumpfung mit einem Kern-Plasmaverhältnis zugunsten des Kerns sowie durch eine komplette Schrumpfung der Zelle. Es wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in den verschiedenen Kulturen und Stadien bestimmt (Tabellen 7 und 8). Zum anderen wurde auch untersucht, wo Apoptosen innerhalb des Zellrasens und während der vaskulären Entwicklung *in vitro* lokalisiert waren.

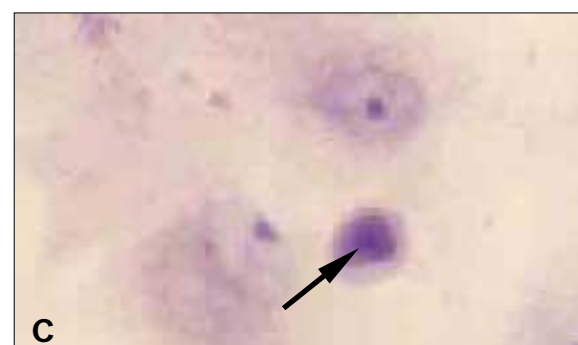
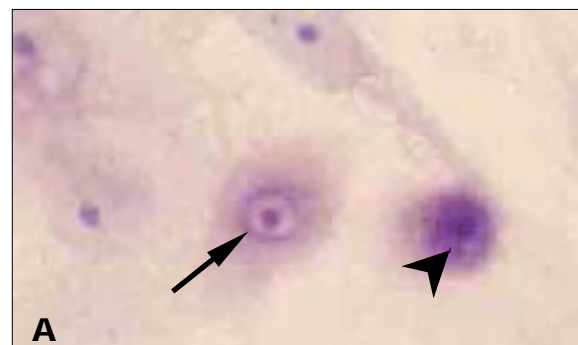


Abbildung 24

Histologische Darstellung von Apoptosen in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum *in vitro*.

A: Frühe Apoptose, Chromatinkondensation (Pfeil) und späte Apoptose (Pfeilspitze). B: Späte Apoptose, pyknotischer Kern (Pfeilspitze). C: Späte Apoptose, absolute Zellschrumpfung (Pfeil). Lichtmikroskop x 400

Zellkulturtyp	Prozentualer Anteil der Apoptosen					
	14 Tage in vitro		28 Tage in vitro		42 Tage in vitro	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät
<i>BCI AA</i>	1	1	2	0	1	1
<i>BCI RN</i>	3	2	2	0	3	1
<i>BCI RA1</i>	1	1	1	1	1	1
<i>BCI RA2</i>	2	2	3	2	2	1

Tabelle 7: Vergleichende Übersicht über den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen in den mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* des bovinen Corpus luteum während der vaskulären Entwicklung *in vitro*. In der Tabelle wird Bezug genommen auf die 2 unterschiedlichen Apoptosestadien (früh und spät).

Zellkulturtyp	Prozentualer Anteil der Apoptosen		
	14 Tage in vitro	28 Tage in vitro	42 Tage in vitro
<i>BCI AA</i>	2	2	2
<i>BCI RN</i>	5	2	4
<i>BCI RA1</i>	2	2	2
<i>BCI RA2</i>	4	5	3

Tabelle 8: Vergleichende Übersicht über den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen in den mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* des bovinen Corpus luteum während der vaskulären Entwicklung *in vitro*. In der Tabelle wird die Gesamtanzahl apoptotischer Zellen in Prozent dargestellt.

Die hier beschriebenen Beobachtungen beziehen sich jeweils auf die Stadien mit dem höchsten prozentualen Aufkommen von Apoptosen in den entsprechenden Endothelzellkulturen (siehe Tabellen 7 und 8).

Es zeigte sich ein spezifisches Verteilungsmuster apoptotischer Zellen in zwei Kulturtypen. Bei der Endothelzellkultur *BCI RA1* traten oft inmitten der zellfreien, runden Areale (siehe 5.1.1.3) apoptotische Zellen auf, während Apoptose in der Endothelzellkultur *BCI RA2* bevorzugt an endothelialen Strängen zu finden waren (Abbildung 25). Die Lokalisation apoptotischer Zellen in den Endothelzellen der beiden Kulturen *BCI AA* und *BCI RN* zeigte kein spezifisches Verteilungsmuster.

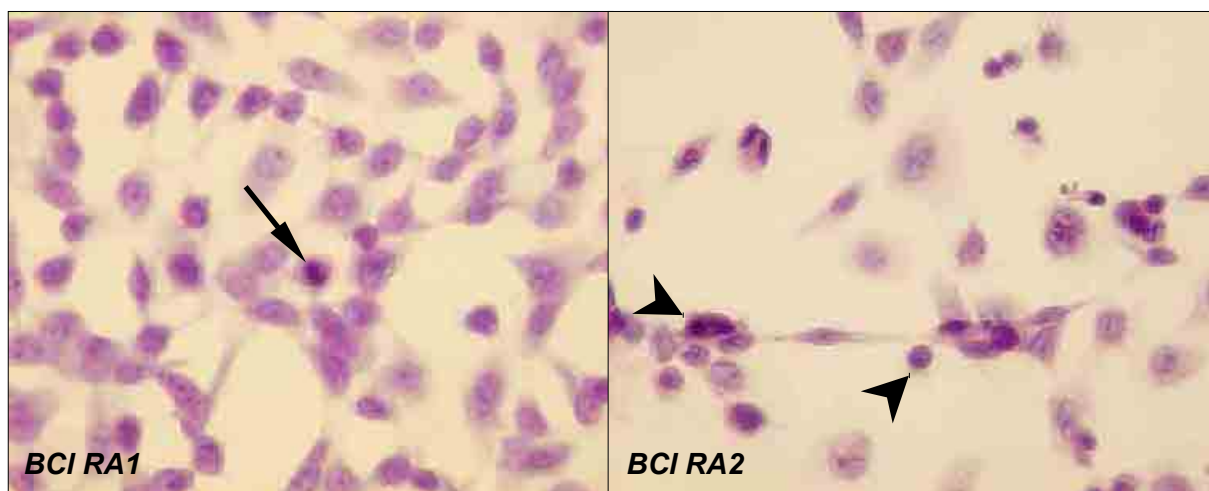


Abbildung 25

Histologische Darstellung von Apoptosen in Endothelzellkulturen des bovinen Corpus luteum nach 28 Tagen Inkubation im Selektivmedium PO *in vitro*.

Spezifisches Verteilungsmuster apoptotischer Zellen in Kultur *BCI RA1* innerhalb von Endothelzellringen (Pfeil) und in Kultur *BCI RA2* an linear angeordneten Endothelzellsträngen (Pfeilspitzen). Lichtmikroskop x 400

5.1.2.2.2 Lumenbildung in der Endothelzellkultur *BCI AA*

In dieser Kultur zeichnete sich nach 28 Tagen ein chronologischer Verlauf der Lumenisierung solider endothelialer Zellstränge ab (Abbildungen 26, 27).

Zunächst wurden einzelne, später Gruppen von Zellen mit intrazellulären Vakuolen beobachtet. Diese Gruppen waren stets in den Bereichen erhöhter Zelldichte (im Kapitel 5.1.1.1 beschrieben) vorzufinden. Hier vereinigten sich die benachbarten zentralen Zellen mit großen intrazellulären Vakuolen. Auf diese Weise entstanden kapillarähnliche endotheliale Tubuli, die sich in die Peripherie ausdehnten. Innerhalb solider endothelialer Stränge, welche von den beschriebenen Zellclustern ausstrahlten, trat eine Front von Zellen mit intrazellulären Vakuolen auf. Diese Entwicklung schritt von zentral nach peripher, bis schließlich nach 28 Tagen ein System kommunizierender endothelialer Röhren entstanden war.

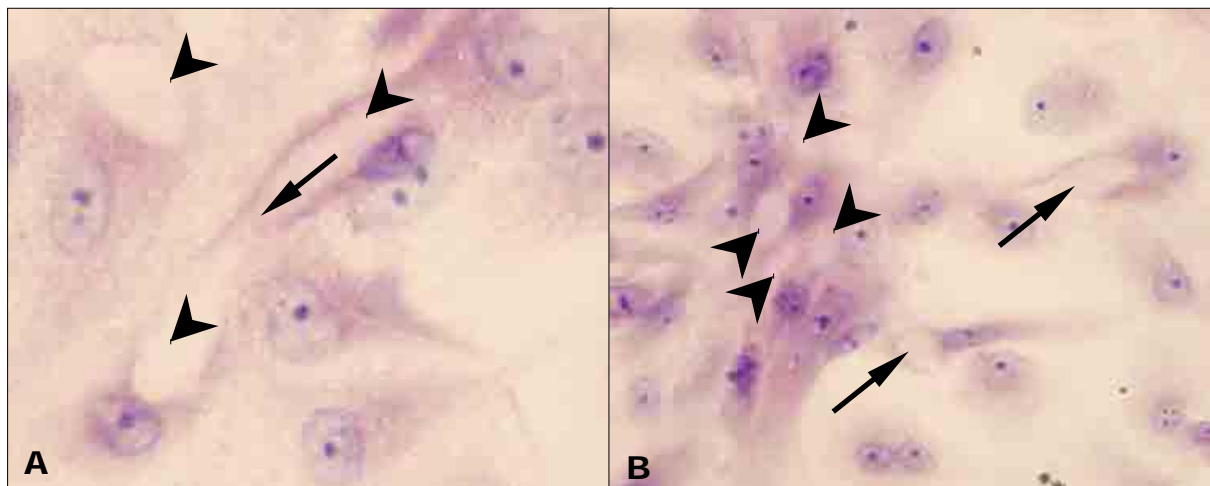


Abbildung 26

Histologische Untersuchungen an Endothelzellen des bovinen Corpus luteum *in vitro*.

Endothelzellen der Zellkultur *BCI AA* nach 28 Tagen Inkubation im Selektivmedium P0. A: Intrazelluläre Vakuolen in drei benachbarten Zellen (Pfeilspitzen), Zellmembran noch abgrenzbar (Pfeil). B: Lokalisation von vakuolisierten Zellen stets innerhalb von Zellgruppen (Pfeilspitzen). Beginnende Vakuolisierung den Zellgruppen benachbarter Endothelzellen (Pfeile).

Lichtmikroskop x 400

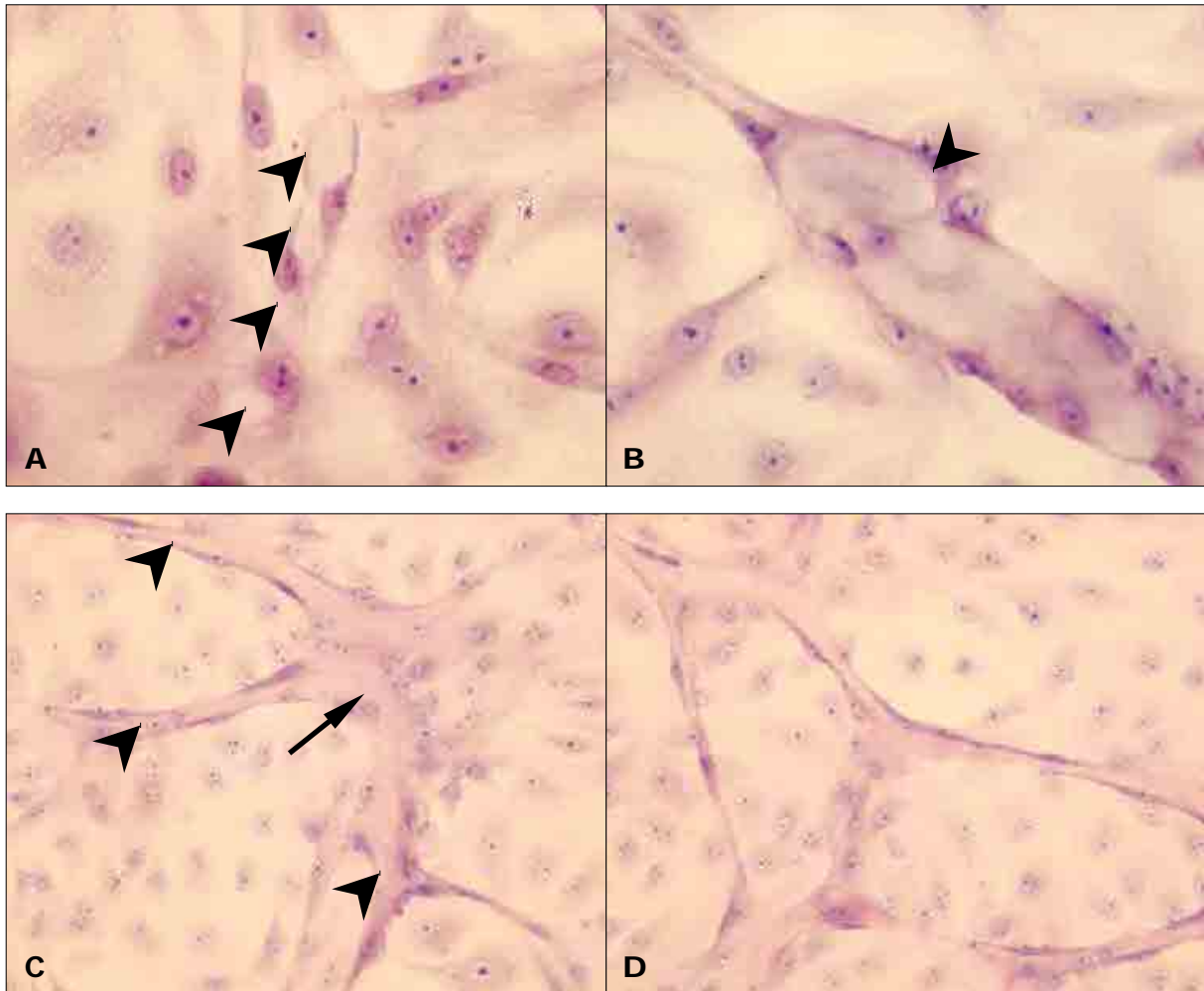


Abbildung 27

Histologische Untersuchungen an Endothelzellen des bovinen Corpus luteum *in vitro*.

Endothelzellen der Zellkultur *BCI AA* nach 28 Tagen Inkubation im Selektivmedium P0. A: Intrazelluläre Vakuolen in drei benachbarten Zellen (Pfeilspitzen). B: Kanalisierte Endothelzellstrang, beginnende Verzweigung (Pfeil). C: Vom Zellcluster (Pfeilspitze) ausgehende Lumenisierung endothelialer Stränge (Pfeilspitze). D: Kommunizierendes System endothelialer Tubuli. Lichtmikroskop x 400

5.1.2.2.3 Synthese faserartiger Strukturen

Die Zellen der Kultur *BCI AA* wiesen eine intensive Synthese faserartigem Materials auf. Faserartige Strukturen wurden sowohl intrazellulär als auch extrazellulär beobachtet. Der extrazelluläre Anteil war einerseits innerhalb tubulärer Strukturen vorzufinden, andererseits auch in unmittelbarer Umgebung der Zellen (Abbildung 28).

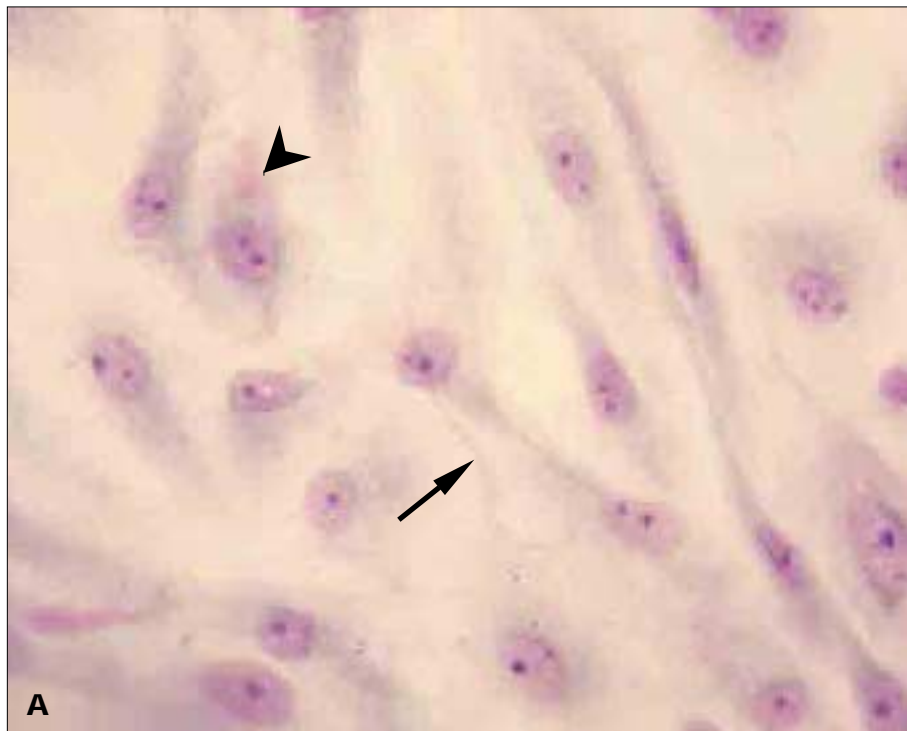


Abbildung 28

Histologische Untersuchungen an Endothelzellen des bovinen Corpus luteum *in vitro*.
Endothelzellen der Zellkultur BCl AA nach 28 Tagen Inkubation im Selektivmedium P0. Synthese von faserartigem Material. A: Lokalisation intrazellulär (Pfeilspitze), extrazellulär (Pfeil). B: Lokalisation intraluminal (Pfeilspitze). Lichtmikroskop x 400

5.1.2.2.4 Endothelzellkulturen *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2*

Bei keiner der drei anderen Kulturen (*BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2*) war am histologischen Präparat nach May-Grünwald-Giemsa die Ausbildung tubulärer Strukturen, sowie die Synthese fibrillärer Strukturen visualisierbar.

Durch die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen und die Untersuchungen an nach Richardson gefärbten Semidünnschnittpräparaten wurde jedoch Lumenbildung bei den Kulturen *BCI RA1* (siehe 5.1.2.1.3 bzw. 5.1.3.3) und *BCI RA2* (siehe 5.1.2.4 bzw. 5.1.3.4) nachgewiesen. Mittels transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen war eine Synthese fibrillärer Strukturen aller vier Endothelzellkulturen demonstrierbar (siehe 5.1.3.1, 5.1.3.2, 5.1.3.3, 5.1.3.4).

5.1.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2 in vitro*

Für die transmissionselektronenmikroskopische Analyse wurden die vier zu vergleichenden mikrovaskulären Endothelzellkulturen in 24-Lochplatten auf gelatinieren Glasplättchen unter identischen Bedingungen kultiviert. Als Nährmedium diente das P0-Selektivmedium (siehe 3.1.4.3). Die Untersuchungen der Ultrastruktur der Zellen erfolgten nach 14, 28 und 42 Tagen in Kultur.

5.1.3.1 Ultrastruktur der Endothelzellkultur *BCI AA*

Phasenkontrastmikroskopisch betrachtet bildeten diese Endothelzellen nach 14 Tagen in Kultur ein Netzwerk aus mehrreihigen Zellstraßen. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigten die Zellen zu diesem Zeitpunkt eine polymorphe Gestalt und unterschiedliche Größe. Auch die Zellkernform differierte von rund über oval bis länglich. Vereinzelt konnten zwei Kerne ausgemacht werden.

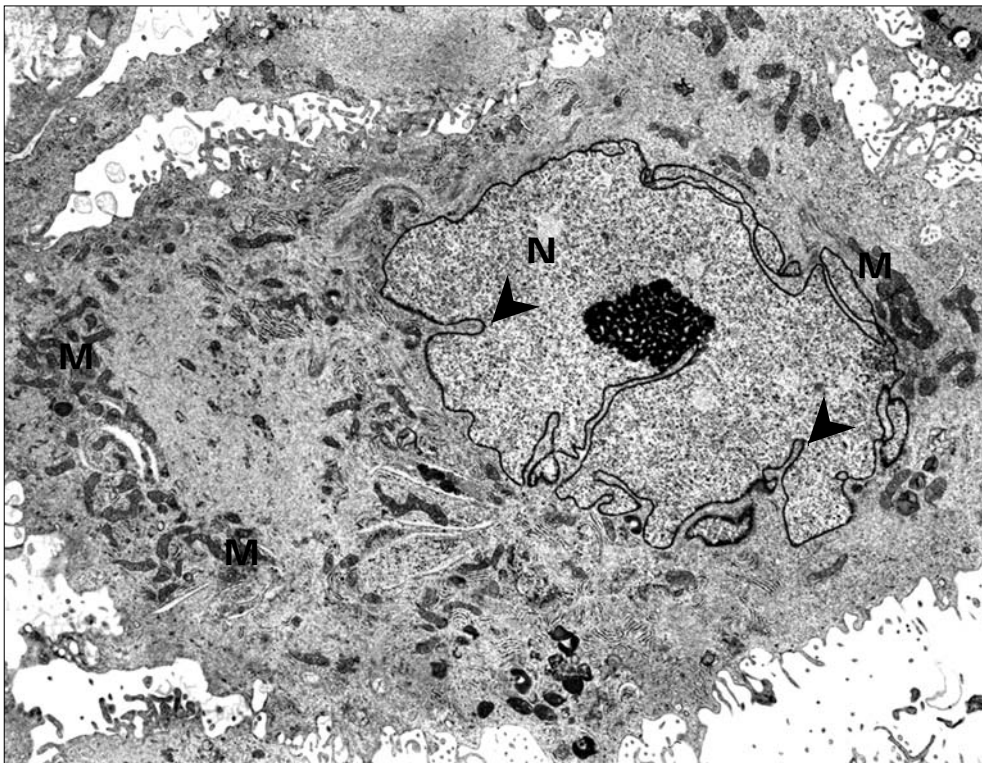


Abbildung 29

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI AA* nach 14 Tagen *in vitro*. Gelappter Zellkern (N) mit tiefen Einkerbungen (Pfeilspitzen), zahlreiche Organellen, insbesondere Mitochondrien (M). TEM x 2.500

Die euchromatischen Kerne enthielten oft mehrere (zwei bis drei) große Nukleoli. Tiefe Einfaltungen kennzeichneten das Profil der Zellkerne. An der Kernmembran waren Kernporen sowie deren Diaphragma deutlich zu erkennen.

Im feingranuliert erscheinenden Zytoplasma waren über den gesamten Zelleib hinweg Ribosomen und Polyribosomen sowie Glykogengranula verteilt. Ebenso zeigten sich zahlreiche Mitochondrien vom Crista-Typ. Die Mitochondrien waren insbesondere in Kernnähe und in der Peripherie unmittelbar an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 29). In Gruppen auftretende primäre, sekundäre sowie tertiäre Lysosomen unterschiedlicher Gestalt (rund, oval, keulenförmig) charakterisierten das Zellbild (Abbildung 30). Raues endoplasmatisches Retikulum war zahlreich vorhanden und kam gleichmäßig verteilt im Zytoplasma als auch vermehrt in Zellkernumgebung vor. Golgi-Felder waren ebenfalls in Zellkernnähe regelmäßig aufzufinden.

Vesikel und multivesikuläre Körperchen sowie „coated vesicles“ zeigten sich frei im Zytoplasma. An einigen Zellen traten pinozytotische Bläschen an der Zellmembran auf (Abbildung 31/A).

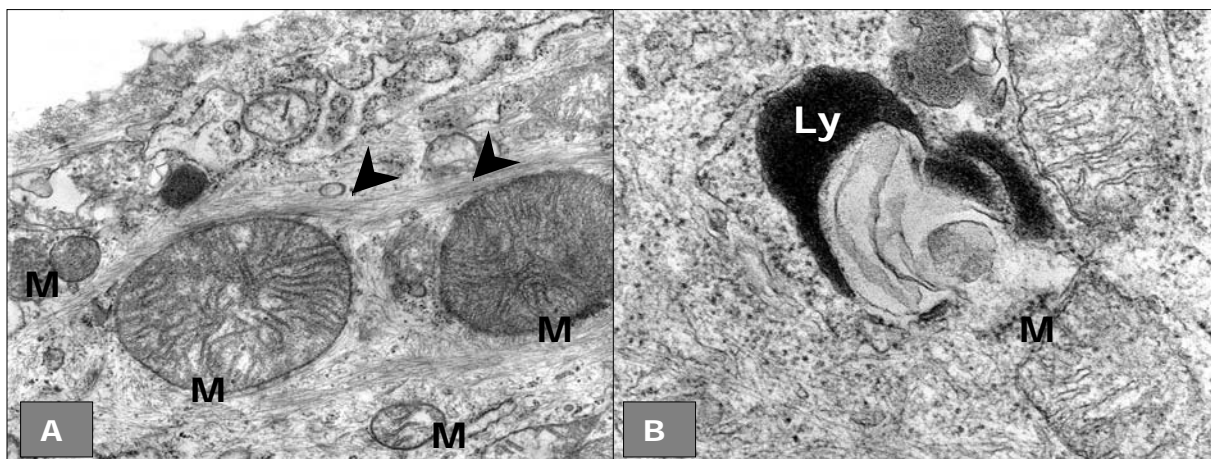


Abbildung 30

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur BCI AA nach 14 Tagen *in vitro*.

A: Mitochondrien vom Crista-Typ (M) und Mikrofilamente (Pfeilspitzen). B: Autophagolysosom (Ly) während des Abbaus eines Mitochondriums (M). TEM A x 16.000; B x 40.000

Die Kontaktstellen zwischen benachbarten Zellen traten in drei verschiedenen Formen auf: 1. Zwischen den aneinander grenzenden Zellen war ein erweiterter Interzellularspalt zu sehen, welcher durch in regelmäßigen Abständen angeordnete Desmosomen punktförmig eingegengt war. In diesen Interzellularspalt ragten zahlreiche Zellausläufer (Abbildung 31/B). 2. Es waren auch breitflächig aneinander gelagerte Zellen auszumachen, die nicht direkt in Kontakt standen. Solche Zellen umgaben einen länglichen Interzellularspalt, der mit reichlich longitudinal ausgerichtetem, fibrillärem Material angefüllt war. Mit dieser extrazellulären Mat-

rix standen die Zellen über Hemidesmosomen in Kontakt. 3. Zellen berührten sich auch über lange Zellausläufer, die sich teilweise weit überlappten. Ebenso waren auch lange Zellausläufer zu sehen, die senkrecht zueinander standen und an die phasenkontrastmikroskopisch beschriebenen „Zellbrücken“ erinnerten.

Insgesamt zeichnete sich das Profil der Plasmamembran dieser Zellen durch viele Zellfortsätze, wie Mikrovilli sowie Ausstülpungen und Invaginationen aus. Extrazellulär trat reichlich longitudinal ausgerichtetes, fibrilläres Material in Erscheinung. Die dann extrazellulärem Material aufliegende Zellfläche war glatt, die gegenüberliegende wies zahlreiche Protrusionen auf.

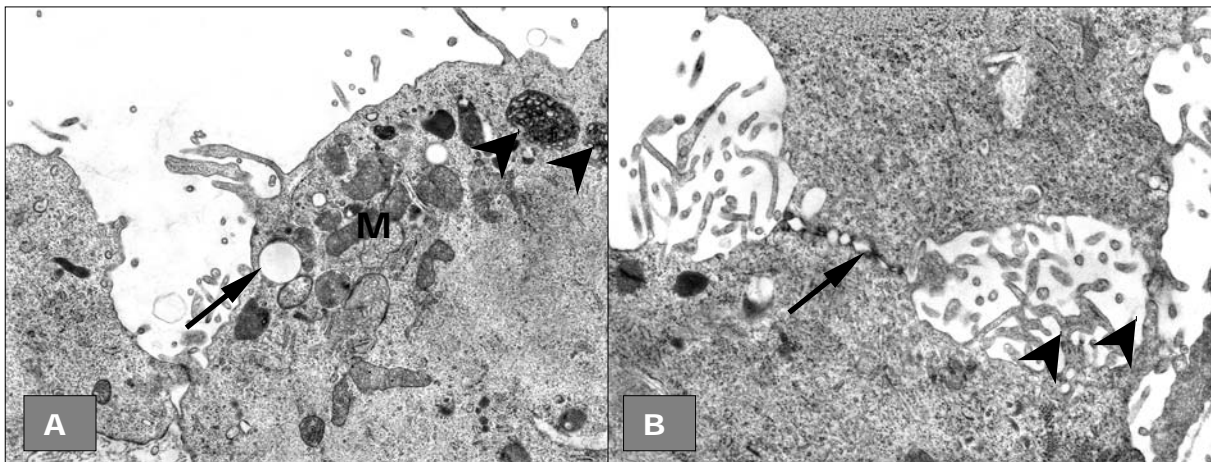


Abbildung 31

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur BCI AA nach 28 Tagen *in vitro*.

A: Endothelzellen mit Vakuolen (Pfeil), multivesikulären Körperchen (Pfeilspitzen) und zahlreichen Mitochondrien (M). B: Endothelzellen mit fingerförmigen Ausläufern (Pfeilspitzen), Desmosomen als Kontaktpunkte (Pfeil). TEM A x 8.000; B x 10.000

Bei der Untersuchung, die am 28. Tag der Kultivierung durchgeführt wurde, dominierte die Anzahl spindelförmiger Zellen. Ausläufer benachbarter Zellen überlappten sich breitflächig und griffen dabei fingerförmig ineinander, wobei nur ein schmaler Interzellularspalt auftrat. Punktuell angeordnete Kontaktstellen in diesen Bereichen wurden von Desmosomen und „tight junctions“ gebildet. Spindelförmige Zellen lagen oft in 2-3 Schichten übereinander. Zwischen solchen parallel angeordneten Zellen öffnete sich ein kontinuierlicher Interzellularspalt, der mit longitudinal ausgerichtetem, fibrillärem Material angefüllt war. Die Zellen standen über Halbdessmosomen mit dem fibrillärem Material in Kontakt. Einige Endothelzellen enthielten in ihrem Zelleib membranumgrenzte, unterschiedlich große Vakuolen, bis zu 8 Stück in einer Zelle, wovon kleinere optisch leer erschienen, größere Zelldetritus enthielten (Abbildung 32). Zum Teil konfluieren die Vakuolen. In diesem Stadium war die Anzahl der Organellen im Vergleich zum Tag 14 unverändert. Multilamelläre

Körperchen konnten jetzt ausgemacht werden. Des weiteren wurde beobachtet, dass Endothelzellen ihren Zellkörper kreisförmig gebogen hatten und ihre Zellenden sich vereinigten, wodurch zentral ein mit Matrix angefüllter Hohlraum umschlossen wurde (Abbildung 33).

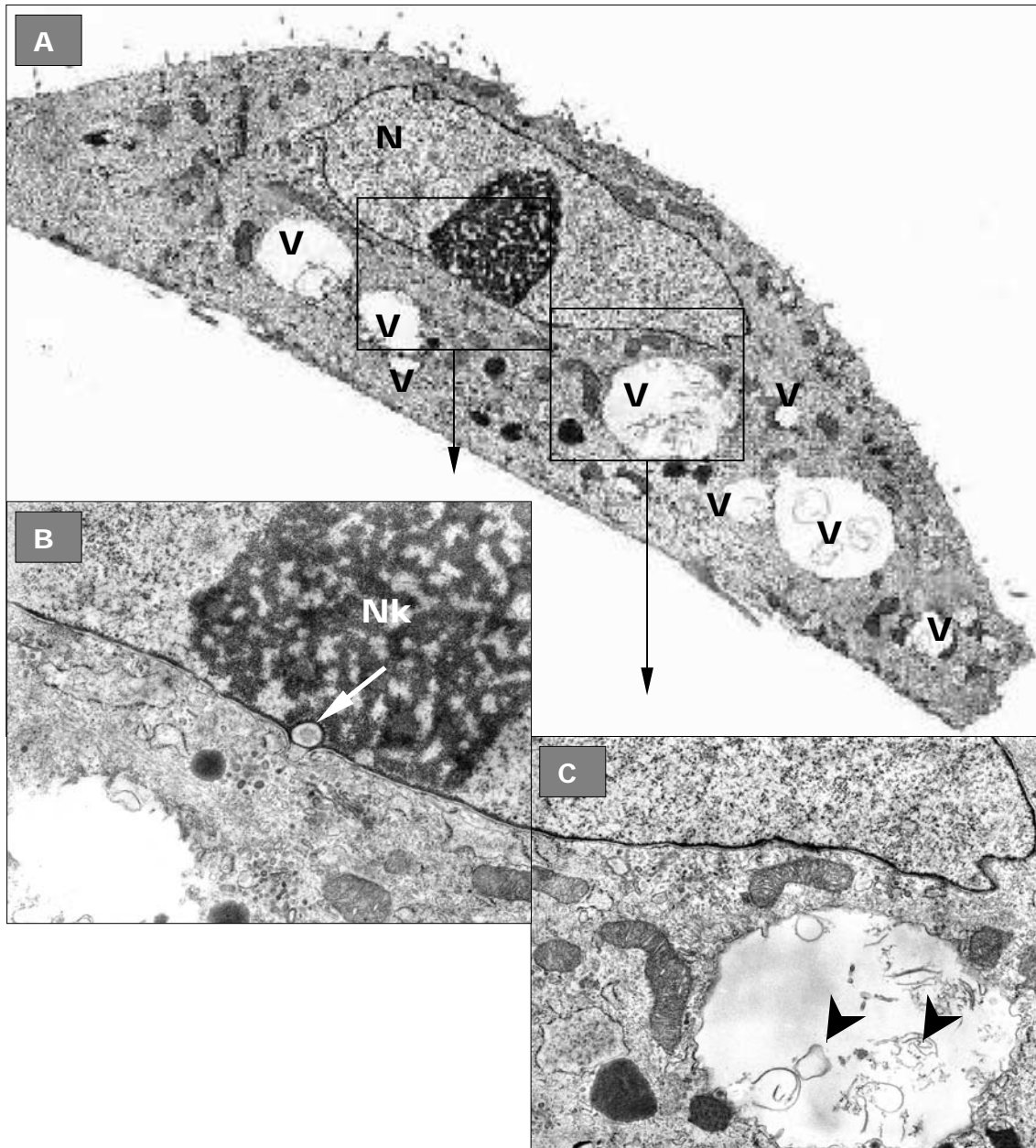


Abbildung 32

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur BCI AA nach 28 Tagen *in vitro*.

A: Endothelzelle mit unterschiedlich großen intrazellulären Vakuolen (V), Zellkern (N). B: Nahaufnahme der identischen Zelle, aktive Kernmembran, Nukleolus (Nk), Kernpore (Pfeil). C: Nahaufnahme einer Vakuole der identischen Zelle, Zellfragmente (Pfeilspitzen). TEM A x 2.000; B und C x 12.500

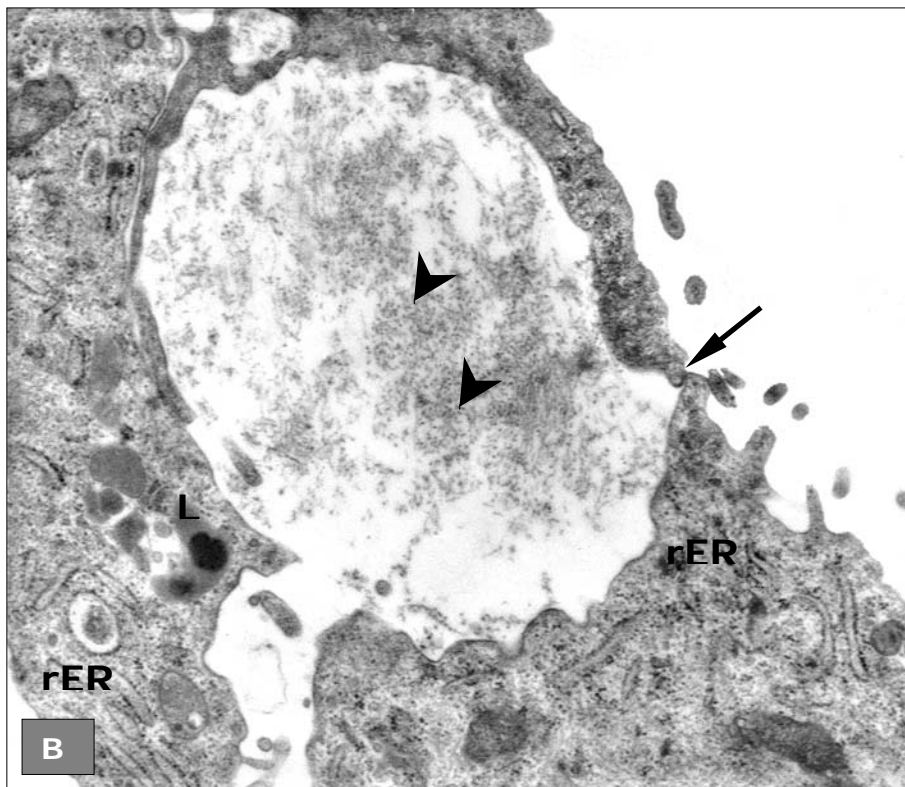
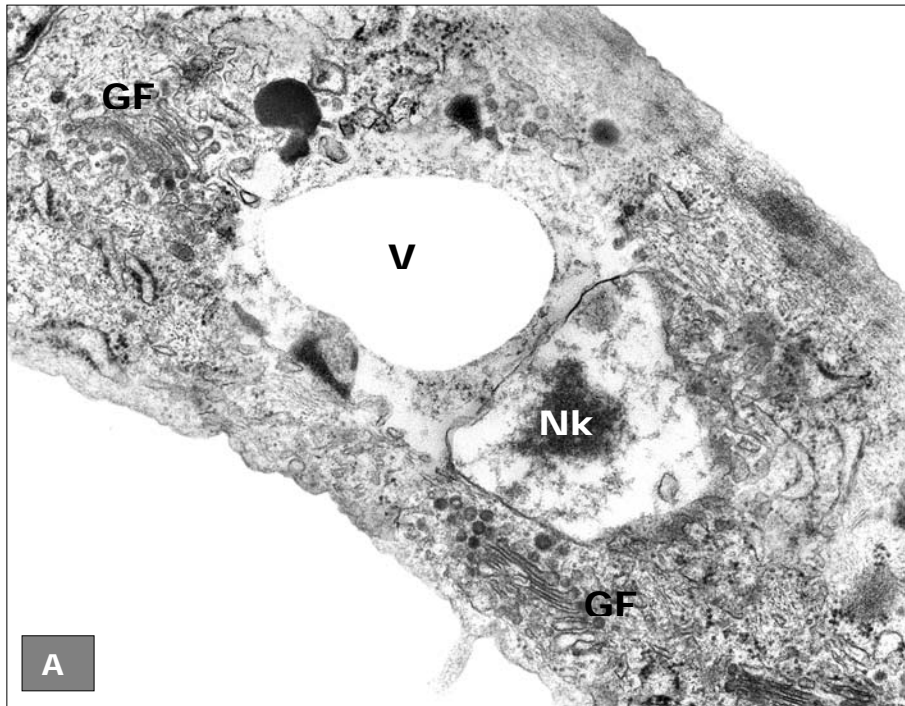


Abbildung 33

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI AA* nach 28 Tagen *in vitro*.

A: Endothelzelle mit einer intrazellulären Vakuole (V) und Golgi-Feldern (GF), Nukleolus (Nk). B: gebogener Endothelzellkörper umschließt Lumen, miteinander verankerte Zellenden (Pfeil), Zellfragmente (Pfeilspitzen), sekundäre Lysosomen (L), raues endoplasmatisches Retikulum (rER). TEM A x 16.000; B x 10.0500

Am Tag 42 konnten regelmäßig röhrenartige Hohlräume in Quer- und Längsschnitten der tubulären Strukturen beobachtet werden. Die Querschnitte zeigten Lumina, die von 1-3 Zellen gebildet waren, wobei die Zellkerne sich nach abluminal wölbten (Abbildung 34). In Längsschnitten konnte gezeigt werden, dass sich längliche benachbarte Zellen breitflächig überlappten und über Desmosomen in Kontakt standen. Die Zellen erzeugten somit eine geschlossene Hülle um das zentral entstandene Lumen. Wieder traten Kontakte zwischen dem intraluminalen Material und den umgebenden Zellen in Form von Halbdesmosomen auf. Auch in diesem Stadium war kein Unterschied in der Anzahl der Organellen im Vergleich zu den früheren Stadien festzustellen.

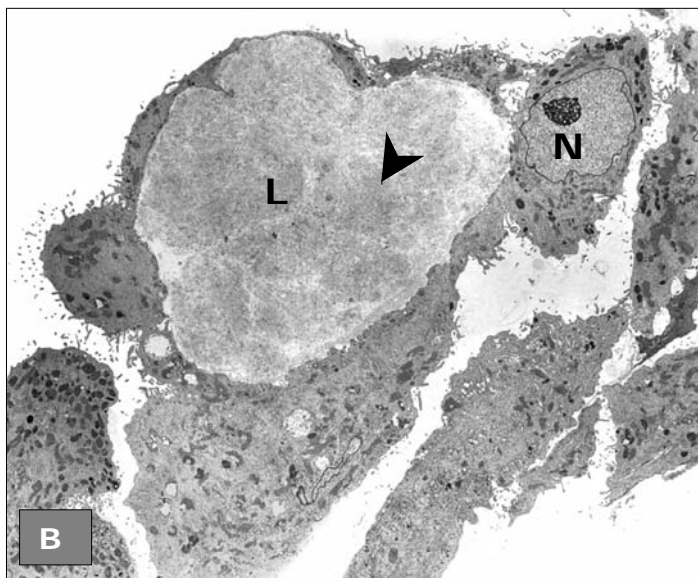
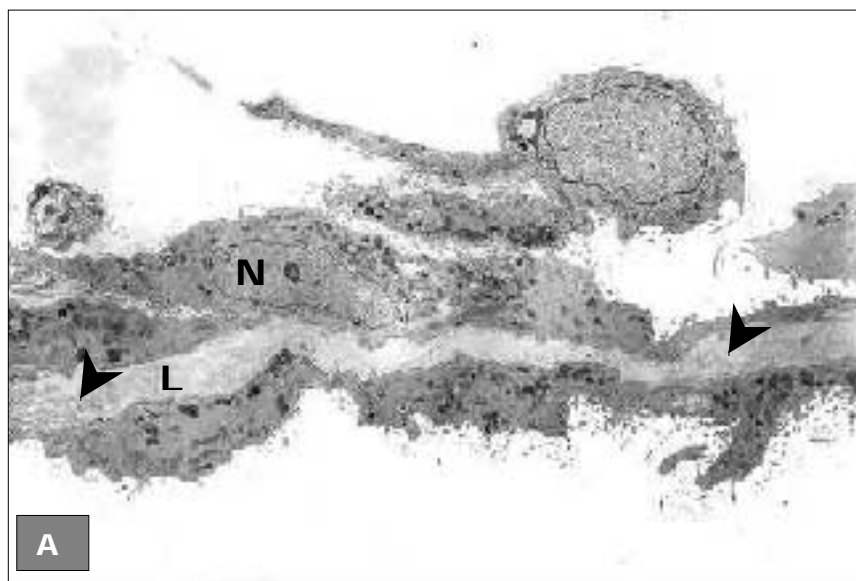


Abbildung 34

Ultrastrukturelle Darstellung
boviner Endothelzellen aus dem
Corpus luteum der Kultur *BCI AA*
nach 42 Tagen *in vitro*.

A: Längsschnitt, Lumen (L) angefüllt mit fibrillärem Material und Zellfragmenten (Pfeilspitzen), Zellkern (N) abluminal orientiert. B: Querschnitt, das Lumen (L) ist angefüllt mit fibrillärem Material und Zellfragmenten (Pfeilspitze), Zellkern (N) abluminal orientiert. TEM x 1.600

Die Präparate, die am Tag 63 der Inkubation angefertigt wurden, demonstrierten lange tubuläre Strukturen, die von Endothelzellen flach ummantelt wurden. Die Zellkerne waren zentral im Zelleib lokalisiert und von länglicher Gestalt. Innerhalb der tubulären Strukturen befanden sich Zellfragmente und fibrilläres Material. Abschnittsweise waren die Tubuli von einer zweiten Zellschicht umgeben (Abbildung 35, siehe auch Abbildung 18).



Abbildung 35

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur BCI AA nach 63 Tagen *in vitro*.

Ausschnitt aus der Wand einer tubulären Struktur. Endothelzellen mit länglichen, zentral ständigen Zellkernen (N). Zwei Zellschichten bilden die tubuläre Struktur (Pfeilspitzen). Pfeile markieren den Übergang zum luminalen (L) Bereich, welcher mit Zellfragmenten und fibrillärem Material angefüllt ist. TEM x 2.500

5.1.3.2 Ultrastruktur der Endothelzellkultur *BCI RN*

Zelltyp *BCI RN* lag nach 14 Tagen *in vitro* Kultivierung im konfluenten Monolayer vor. Die elektronenmikroskopische Darstellung zeigte Zellen von vorwiegend polygonaler bis länglicher Gestalt. In den Zellen war stets nur ein Zellkern. Es traten sowohl gelappte als auch gleichmäßig geformte Zellkerne auf. Die euchromatischen Kerne enthielten oft zwei bis drei Nukleoli. Kernporen waren deutlich zu erkennen.

Paraplasmatische Einschlüsse ließen das Zytoplasma feingranuliert erscheinen. Insgesamt zeichnete sich diese Endothelzellkultur durch einen sehr hohen Organellenreichtum aus (Abbildung 36). Das Zytoplasma war angefüllt von Mitochondrien vom Crista-Typ, rauem endoplasmatischem Retikulum (z.T. von dilatierter, vesikulärer Form), freien Ribosomen, Polyribosomen und Glykogendepots. Ausgeprägte Golgi-Felder lagen regelmäßig vor. Während primäre und sekundäre Lysosomen mit elektronendichtem homogenem Inhalt vereinzelt vorkamen, traten unter der Zelloberfläche zahlreiche Sekretvesikel, vor allem Pinozytosevesikel, aber auch multivesikuläre Körperchen sowie „coated vesicles“ auf. In der Peripherie durchzogen longitudinal ausgerichtete Bündel von Mikrofilamenten den Zellkörper.

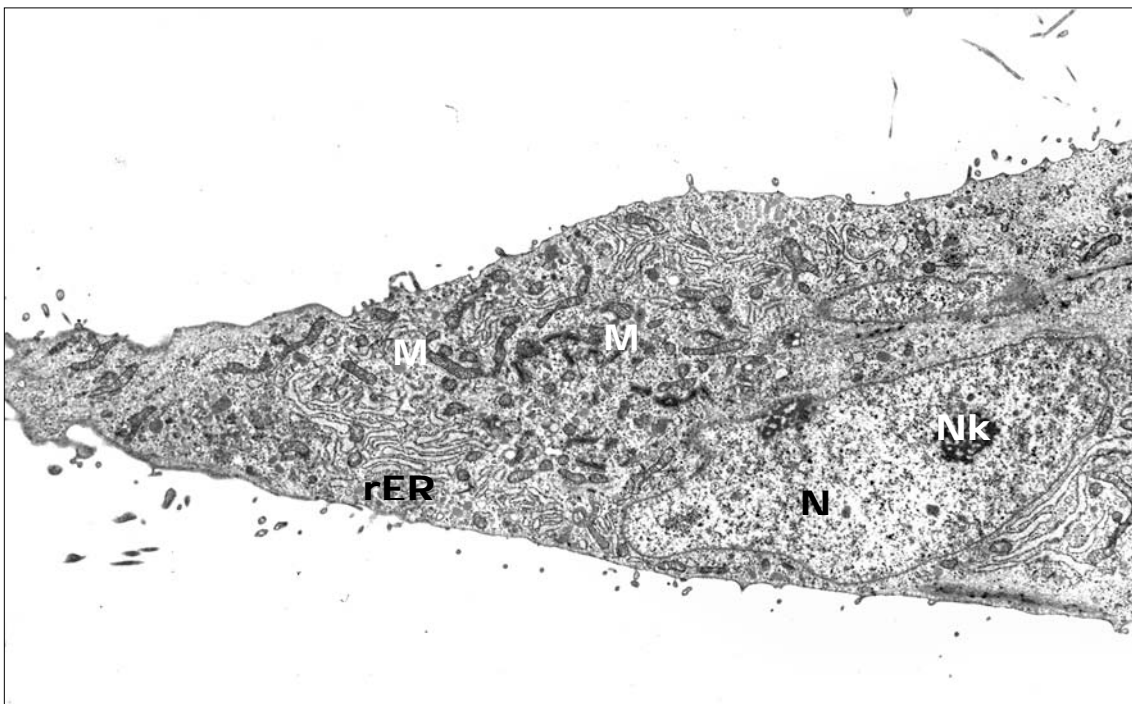


Abbildung 36

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RN* nach 14 Tagen *in vitro*.

Die Zelle ist reich an Organellen. Mitochondrien (M), raues endoplasmatisches Retikulum (rER), Nukleus (N), Nukleolus (Nk). TEM x 2.000

Die Plasmamembran präsentierte Zellfortsätze verschiedener Länge. Darunter kamen Mikrovilli auch von atypischer z.B. lanzenförmiger Form vor. Die aktive Zellmembran dieser Zellen war außerdem von zahlreichen Ein- und Ausstülpungen gekennzeichnet. In Kontakt traten die Zellen durch sich teilweise breitflächig überlappende Zellausläufer. Ein erweiterter Interzellularspalt zwischen benachbarten Zellen war in regelmäßigen Abständen von einzelnen Desmosomen unterbrochen (Abbildung 37). Die Zellen traten auch über gap junctions in Berührung. Im Extrazellulärbereich war fibrilläres Material, ähnlich dem intrazellulären, anzutreffen.

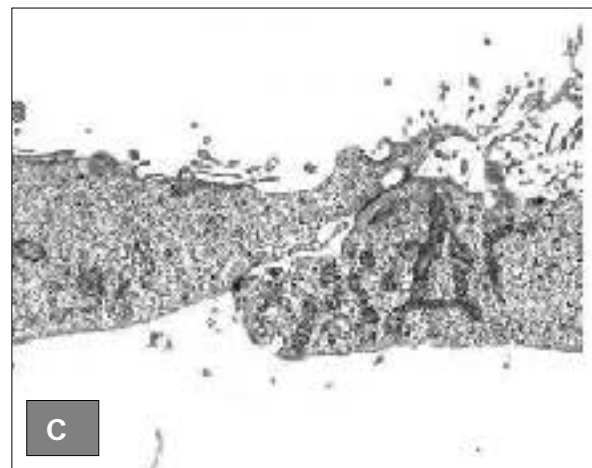
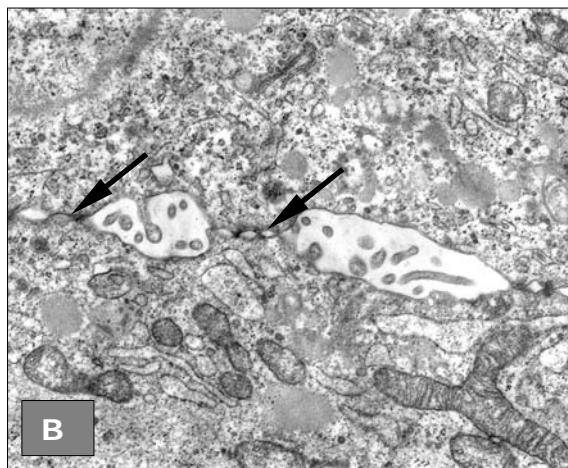
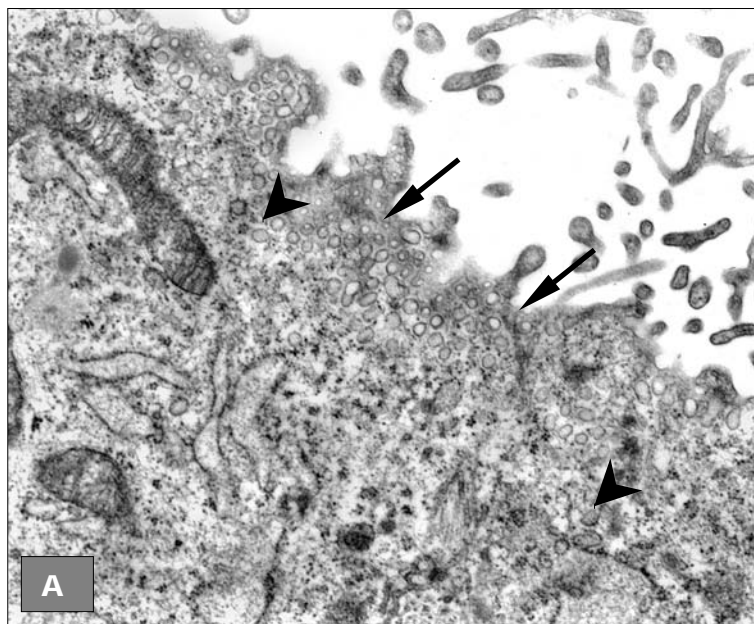


Abbildung 37

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RN* nach 14 Tagen *in vitro*.

A: Pinozytosevesikel (Pfeile) und intrazelluläre Vesikel (Pfeilspitzen). B: Zellkontakte Desmosomen (Pfeil). C: Sich überlappende Zellausläufer. TEM A x 16.000; B x 12.000; C x 4.000

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen vom Tag 28 der *in vitro* Kultivierung unterschieden sich hinsichtlich des Organellenreichtums der Zellen. Insbesondere die Anzahl der Mitochondrien vom Crista-Typ war deutlich reduziert. Auch Golgi-Komplexe waren seltener zu beobachten. Im Gegensatz dazu trat eine andere Organellenspezies auf. Diese Gebilde waren rund bis oval, von einer Membran umgrenzt und mit hellem, lipidartigem Inhalt (Abbildung 38). Sie traten herdförmig am äußeren Pol der Zellen auf und waren häufig von kleinen Vesikeln und Stapeln des rauen endoplasmatischen Retikulums umgeben. Weitere morphologische Besonderheiten waren zum Untersuchungszeitpunkt von 42 Tagen nicht zu verzeichnen, mit Ausnahme der Anzahl der Mitochondrien, die im Vergleich zu den vorausgehenden Stadien reduziert war.

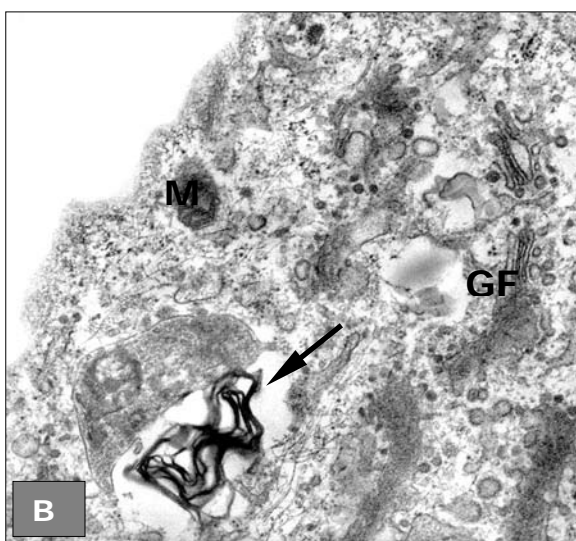
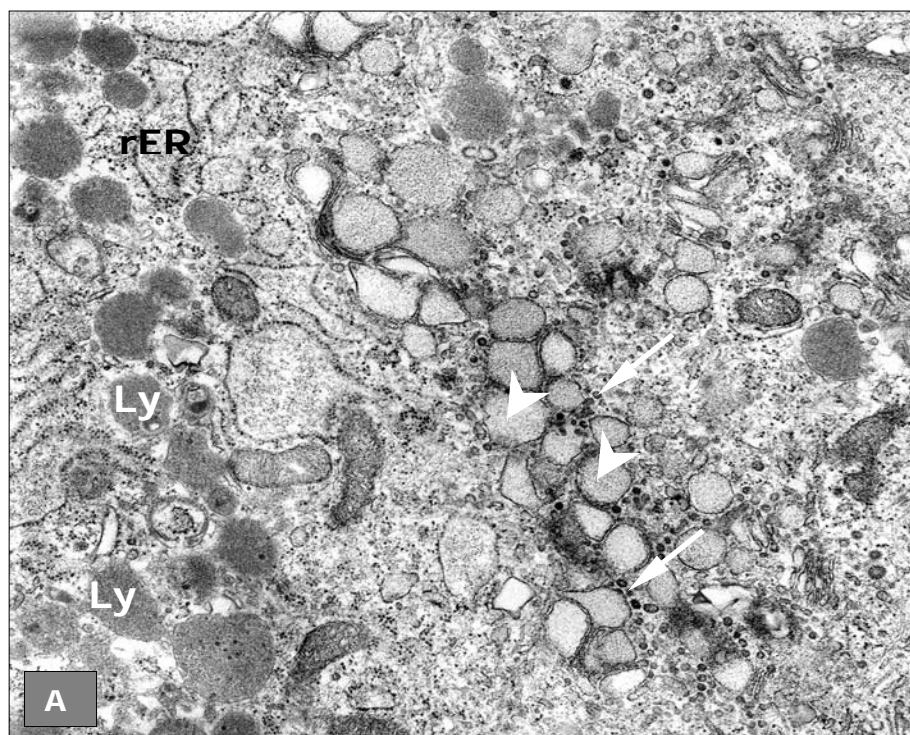


Abbildung 38

Ultrastrukturelle Darstellung boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RN* nach 28 und 42 Tagen *in vitro*.

A (28 Tage *in vitro*): Primäre und sekundäre Lysosomen (Ly), rauen endoplasmatisches Retikulum (rER), membranumgrenzte Strukturen mit lipidartigem Inhalt (Pfeilspitzen) umgeben von kleinen Vesikeln (Pfeile).

B (42 Tage *in vitro*): Multilamelläres Körperchen (Pfeil), Golgi-Felder (GF), Mitochondrium (M).

TEM A x 12.500; B x 16.000

5.1.3.3 Ultrastruktur der Endothelzellkultur *BCI RA1*

Diese Zellkultur bildete nach 14 Tagen *in vitro* ein Monolayer aus polygonalen und spindelförmigen Zellen. Im Monolayer waren im Anschluss an die Konfluenz vereinzelt zellfreie ringförmige Bereiche entstanden. Elektronenmikroskopisch zeigten die Zellen zu diesem Zeitpunkt eine polymorphe Gestalt. Die Zellkerne waren meist rund. Alle untersuchten Zellen verfügten nur über einen Zellkern. Die euchromatischen Kerne enthielten selten Nukleoli, manche Kerne jedoch verfügten über mehrere (zwei bis drei) große Nukleoli. Die Kernmembran war glatt und Kernporen waren deutlich zu erkennen (Abbildung 39 und 41).

Im granuliert erscheinenden Zytoplasma traten über den gesamten Zelleib hinweg sehr viele freie Ribosomen und Polyribosomen sowie Glykogengranula auf. In der Peripherie kamen vereinzelt Mitochondrien vom Crista-Typ und Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums vor. Golgi-Stapel, Pinozytosevesikel und freie Vesikel waren spärlich vorhanden, während Lysosomen mit elektronendichtem Inhalt zahlreich vertreten waren.

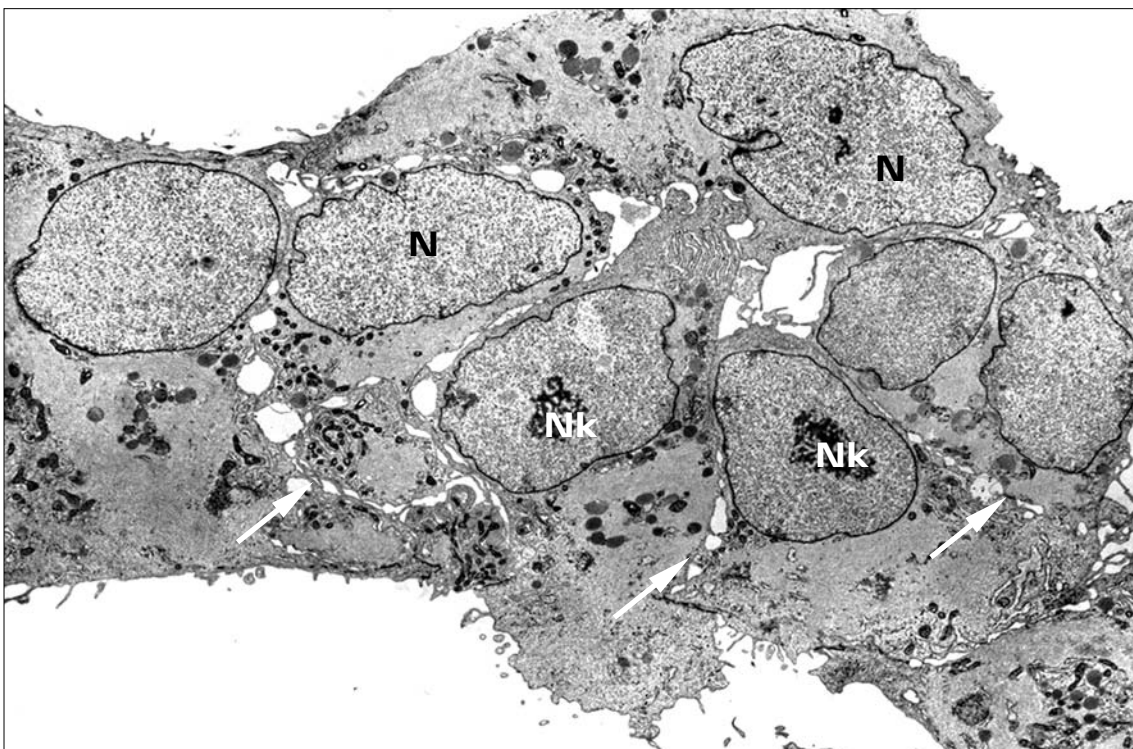


Abbildung 39

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RA1* nach 42 Tagen *in vitro*.

Endothelzellen mit heterochromatischen Kernen (N), einige Zellkerne mit Nukleolus (Nk), mäßig viele Zellorganellen im granulierten Zytoplasma, zahlreiche interzelluläre Kontaktstellen (Pfeile).

TEM x 2.000

Über ihre Oberfläche standen die Endothelzellen z.T. breitflächig in Kontakt. In diesen Kontaktbereichen waren die Zellen durch einzeln auftretende Desmosomen verankert. Mitunter waren auch „tight junctions“ zu erkennen.

Weitreichende Interzellularspalten zwischen länglichen, parallel angeordneten Zellen waren mit fibrillärem Material bzw. Zelldetritus angefüllt. Halbdesmosomen fixierten die Zellen an der Matrix im Interzellularspalt (Abbildung 40).

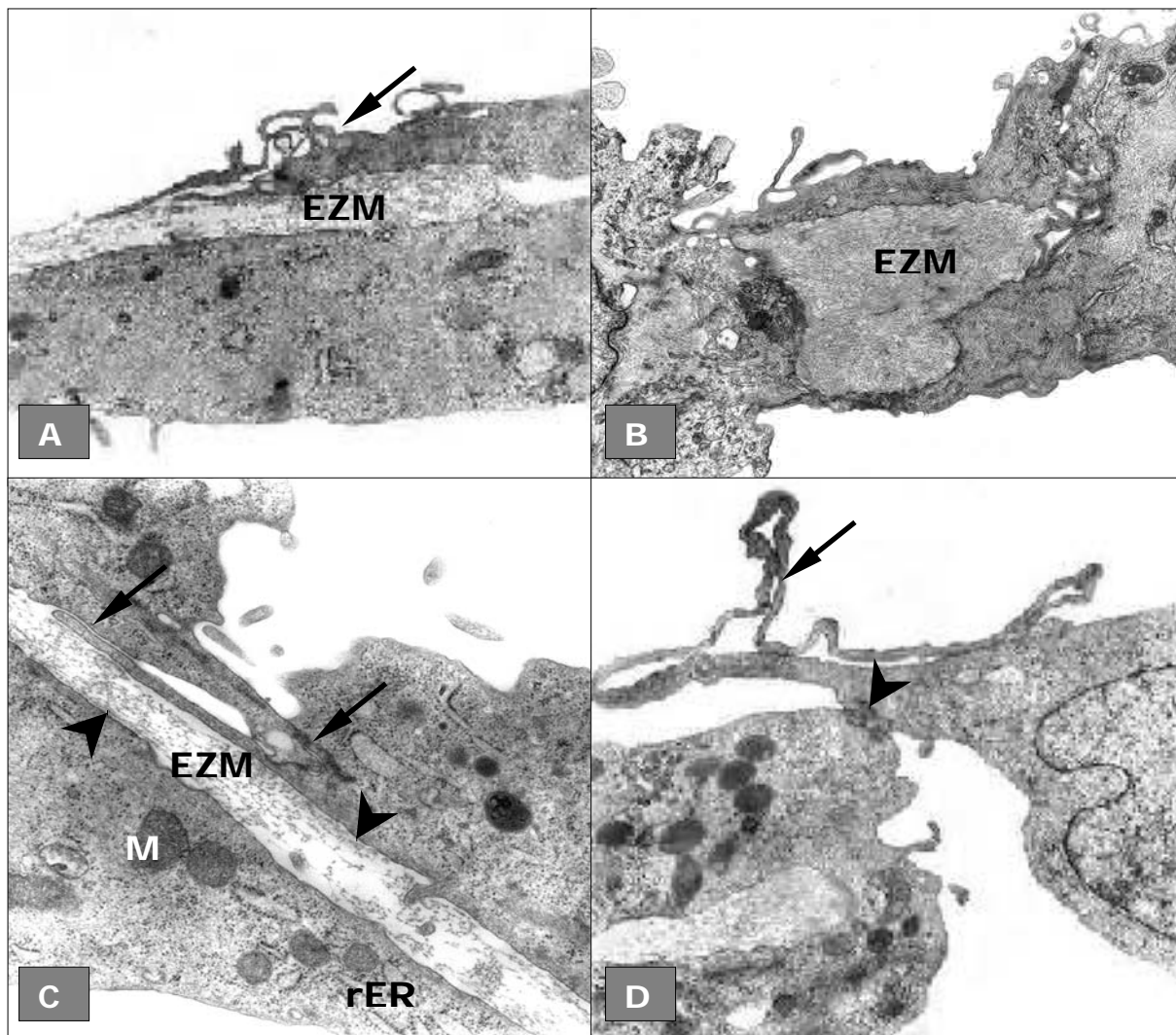


Abbildung 40

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RA1* nach 28 Tagen *in vitro*.

A: Kontaktstellen zwischen Nachbarzellen (Pfeil), dazwischen extrazelluläre Matrix (EZM). B: Extrazelluläre Matrix (EZM). C: Fingerförmiges Ineinandergreifen benachbarter Zellen (Pfeile), extrazelluläre Matrix (EZM) im Interzellularspalt (Pfeilspitzen), Mitochondrium (M), Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER). D: Zellausläufer (Pfeil), Desmosom (Pfeilspitze). TEM A und D x 10.000; B x 8.000; C x 16.000

Die Oberfläche dieser Zellen war durch zahlreiche Ausstülpungen und Invaginationen unregelmäßig geformt. In der Peripherie des Zellkörpers traten longitudinal ausgerichtete, fibrilläre Bündel des Zytoskeletts auf. Auch im Extrazellularraum waren reichlich Mikrofilamente anzutreffen.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen am 28. Tag der *in vitro* Kultivierung ergaben folgende ultrastrukturelle Veränderungen: Vorwiegend längliche Zellen lagen nun breitflächig in zwei Schichten übereinander. Ihre Zellkerne waren gelappt und die Anzahl ihrer Zellorganellen war deutlich erhöht. Vor allem in der Peripherie der Zellen waren Mitochondrien vom Crista-Typ und Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums zu beobachten. Golgi-Komplexe kamen regelmäßig vor. Andererseits waren weniger freie Ribosomen im Zytoplasma, dadurch erschien der Zelleib weniger granuliert. Lysosomen und pinozytotische Vesikel traten verteilt im gesamten Zelleib auf. Die Vesikel waren mit elektrodichtem, homogenem Inhalt gefüllt. Die Zellmembran zeigte nur noch vereinzelt lange, dünne Mikrovilli, war sonst aber glatt.

Nach 42 Kultivierungstagen erschienen die Kerne dieser Endothelzellen heterochromatisch, ihre Doppelmembran deutlich abgegrenzt und perinukleäre Zisternen waren auszumachen. Der Gehalt an Organellen hatte weiterhin zugenommen. Über den gesamten Zelleib waren Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum (rER) verteilt. Manche Zisternen des rER standen mit dem Zellkern in Kontakt. Des weiteren zeigten sich in hoher Anzahl Lysosomen sowie pinozytotische Vesikel, auch multivesikuläre Körperchen und „coated vesicles“.

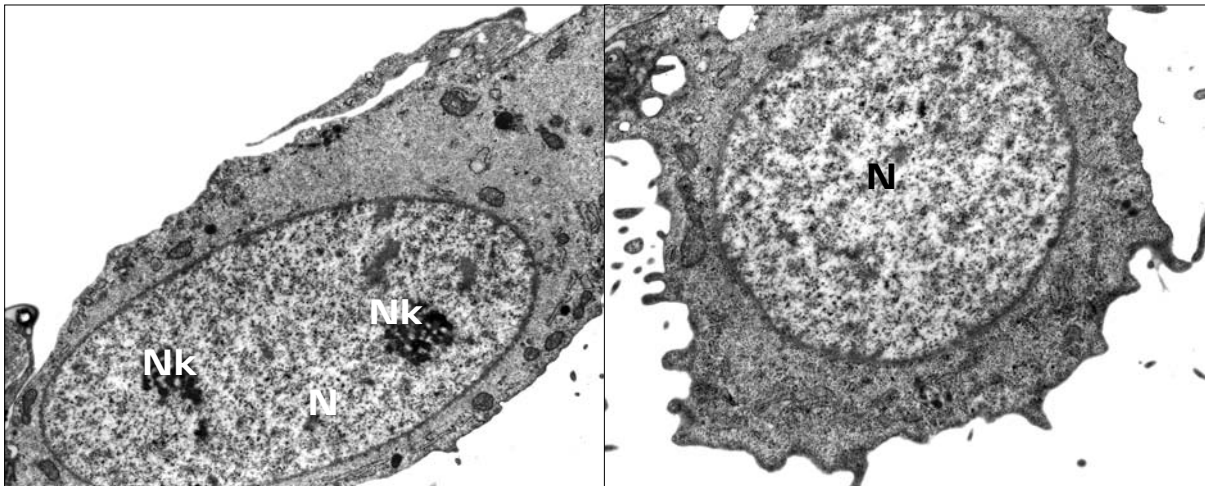


Abbildung 41

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur BCI RA1 nach 14 Tagen *in vitro*.

A: Längliche Endothelzelle mit Zellkern (N) und zwei Nukleoli (Nk). B: Endothelzelle mit Zellkern (N). In diesem Stadium sind wenige Zellorganellen im Zytoplasma der Zellen. TEM x 2.500

In diesem Stadium waren die Zellen in Tubuli organisiert. Die Endothelzellen ummantelten ein Lumen, welches mit longitudinal ausgerichtetem, extrazellulärem Material angefüllt war. Dabei waren die Zellkerne nach außen, also abluminal, orientiert. Die Unregelmäßigkeit der äußeren Plasmamembran begrenzte sich nun auf den vom Lumen abgewandten Pol der Zellen (Abbildung 42).

Das deutlich ausgeprägte Zellskelett bestand aus scherengitterförmig angeordneten Faserproteinen.

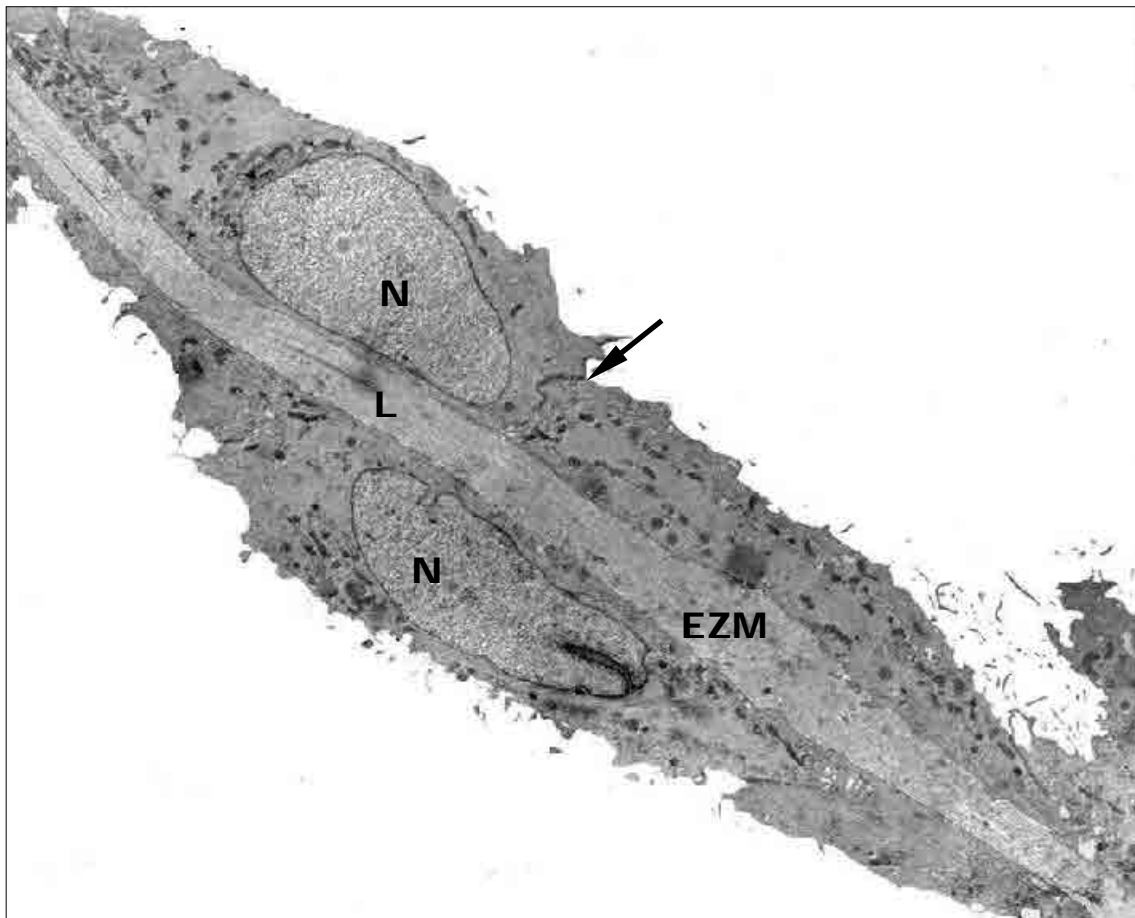


Abbildung 42

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RA1* nach 42 Tagen *in vitro*.

Endothelialer Tubulus mit Lumen (L), angefüllt mit extrazellulärer Matrix (EZM), Zellkerne (N) abluminal orientiert, Zellgrenze (Pfeil). TEM x 2.000

5.1.3.4 Ultrastruktur der Endothelzellkultur *BCI RA2*

Die Endothelzellen zeigten sich nach 14 Tagen *in vitro* Kultivierung im Monolayer. Die Anzahl der Zellen hatte sich um ca. 30 % reduziert, persistierende Endothelzellen waren langgestreckt und linear angeordnet. Das transmissionselektronenmikroskopische Bild dieses Zelltyps unterschied sich kaum vom Typ *BCI RA1*. Längliche und polymorph geformte Zellen mit runden und ovalen Kernen waren einzeln und in Ketten hintereinander liegend vorzufinden. Bis zu drei Nukleoli kamen in den euchromatinreichen Zellkernen vor, welche von einer glatten, deutlich ausgeprägten Kernmembran umhüllt waren (Abbildung 43).

Das Zytoplasma war fein granuliert. Über den gesamten Zelleib hinweg verteilten sich viele freie Ribosomen sowie Polyribosomen und Glykogengranula. Wenige Organellen, v.a. Mitochondrien vom Crista-Typ, befanden sich vorwiegend in Umgebung der Plasmamembran. Golgi-Felder und raues endoplasmatisches Retikulum waren spärlich zugegen. Entsprechend reduziert war auch die Anzahl der Lysosomen, von denen nur sekundäre mit elektrodichtem, homogenem Inhalt zu sehen waren.

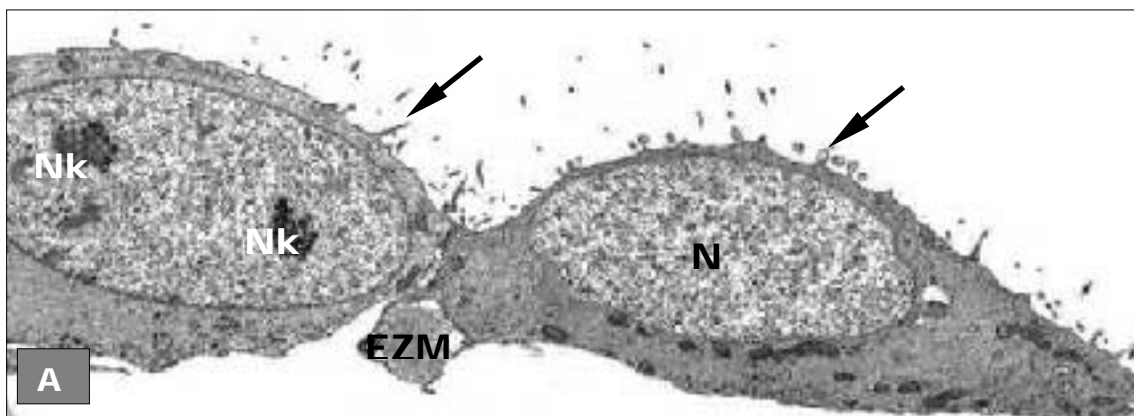


Abbildung 43

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RA2* nach 14 Tagen *in vitro*.

Längliche Zellen mit ovalen Kernen (N), Nukleolus (Nk), einseitige Ausstülpungen der Zellmembran (Pfeile), extrazelluläre Matrix (EZM). TEM x 1.600

Nebeneinander liegende Zellen nahmen punktuell über Desmosomen miteinander Kontakt auf, „tight junctions“ waren vereinzelt zu erkennen. Bereits in diesem frühen Stadium bildeten die Zellen der Kultur *BCI RA2* intrazelluläre Vakuolen aus (Abbildung 44).

Nach 28. Tagen in Kultur konnten parallel zueinander angeordnete Endothelzellketten beobachtet werden. Ein schmaler, interzellulärer Spalt schob sich zwischen die Endothelzellstränge. Der Spalt war mit fibrillärer, extrazellulärer Matrix angefüllt. Auch diese Zellen befestigten sich über Halbdesmosomen an dem Material im Interzellularspalt.

Ähnlich den Endothelzellen der Kultur *BCI RA1* war die Oberfläche dieser Zellen unregelmäßig und durch zahlreiche Ausstülpungen und Invaginationen, sowie Mikrovilli gekennzeichnet. Die Protusionen waren stets von dem mit fibrillärem Material angefüllten Spalt abgewandt. Im übrigen Extrazellularraum war ebenfalls fibrilläres Material anzutreffen.

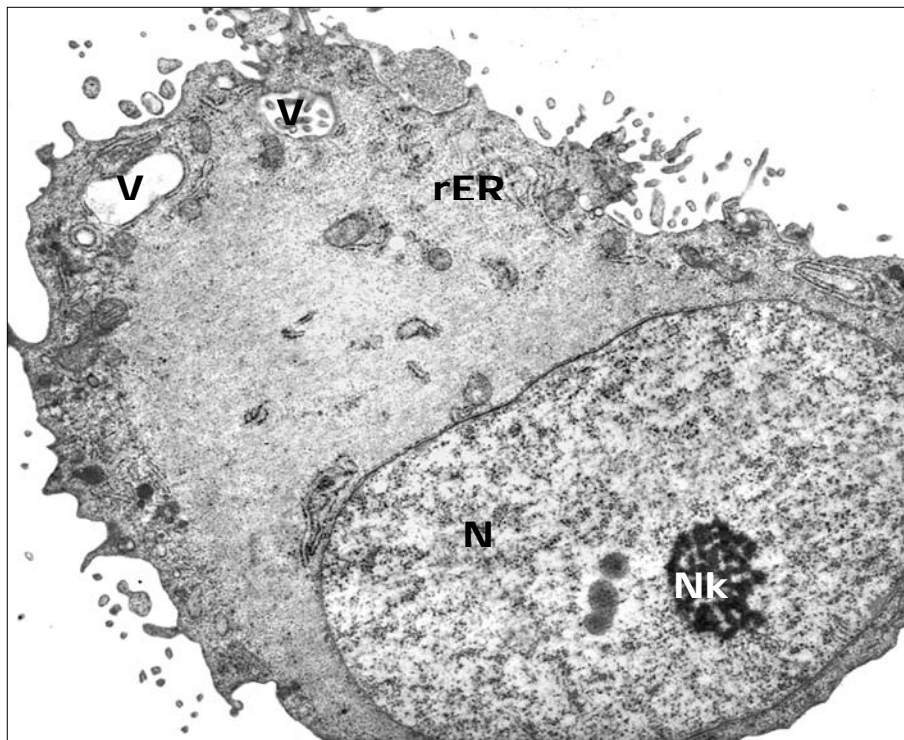


Abbildung 44

Ultrastruktur boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum der Kultur *BCI RA2* nach 14 Tagen *in vitro*.

Intrazelluläre Vakuolen (V), Zellkern (N), Nukleolus (Nk), wenige Organellen, raues endoplasmatisches Retikulum (rER). TEM x 5.000

5.2 Immunzytochemischer Nachweis von Stammzellantigenen bei Endothelzellen verschiedener Entwicklungsstadien des bovinen Corpus luteum *in vitro*

Die Präsenz von Markerproteinen, die sowohl von hämatopoietischen Stammzellen als auch von Endothelzellen und deren Progenitoren gebildet werden, wurde untersucht.

Die mikrovaskulären Endothelzellen aus den verschiedenen Stadien boviner Corpora lutea wurden auf gelatinisierte Glasplättchen ausgesät und mit DMEM⁺ (siehe 3.1.4.2) inkubiert. Die Absenz der im Selektivmedium (siehe 3.1.4.3) enthaltenen Komponenten zur Stimulation der Angiogenese, sollte eine mögliche Differenzierung der Zellen verzögern. Nach der 3-tägigen Inkubationszeit wiesen die Zellen eine unterschiedliche Dichte und Zellform auf (Tabelle 9).

<i>Zellkulturtyp</i>	<i>Morphologie</i>
<i>BCI AA</i>	Zellrasen aus vorwiegend länglichen und einzelnen polygonalen Zellen, fokal Bereiche mit höherer Zelldichte (konfluent)
<i>BCI RN</i>	Zellrasen aus polygonalen Zellen, zahlreiche zellfreie Areale (subkonfluent)
<i>BCI RA1</i>	Zellrasen aus runden Zellen, zahlreiche zellfreie Areale (subkonfluent)
<i>BCI RA2</i>	Zellrasen aus länglichen Zellen, zahlreiche zellfreie Areale (subkonfluent)

Tabelle 9: Morphologisches Erscheinungsbild der untersuchten Zellkulturen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro*.

5.2.1 Immunzytochemische Markierung mit anti-CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1)

Die Präsenz des Transmembran-Immunglobulins CD31 wurde in allen untersuchten Kulturen beobachtet (Abbildung 45). Mit dem monoklonalen anti-human-PECAM-1 Antikörper markiert, konnte eine diffuse Verteilung des Antigens an der gesamten Zytoplasmamembran der Zellen ausgemacht werden. Auch intrazelluläre Epitope banden den Antikörper. Die höchste Konzentration war jeweils in Zellkernnähe aufzufinden, wobei die Kernregion selbst keine Markierung aufwies. Traten die Zellen über Ausläufer in Kontakt, waren auch diese deutlich angefärbt.

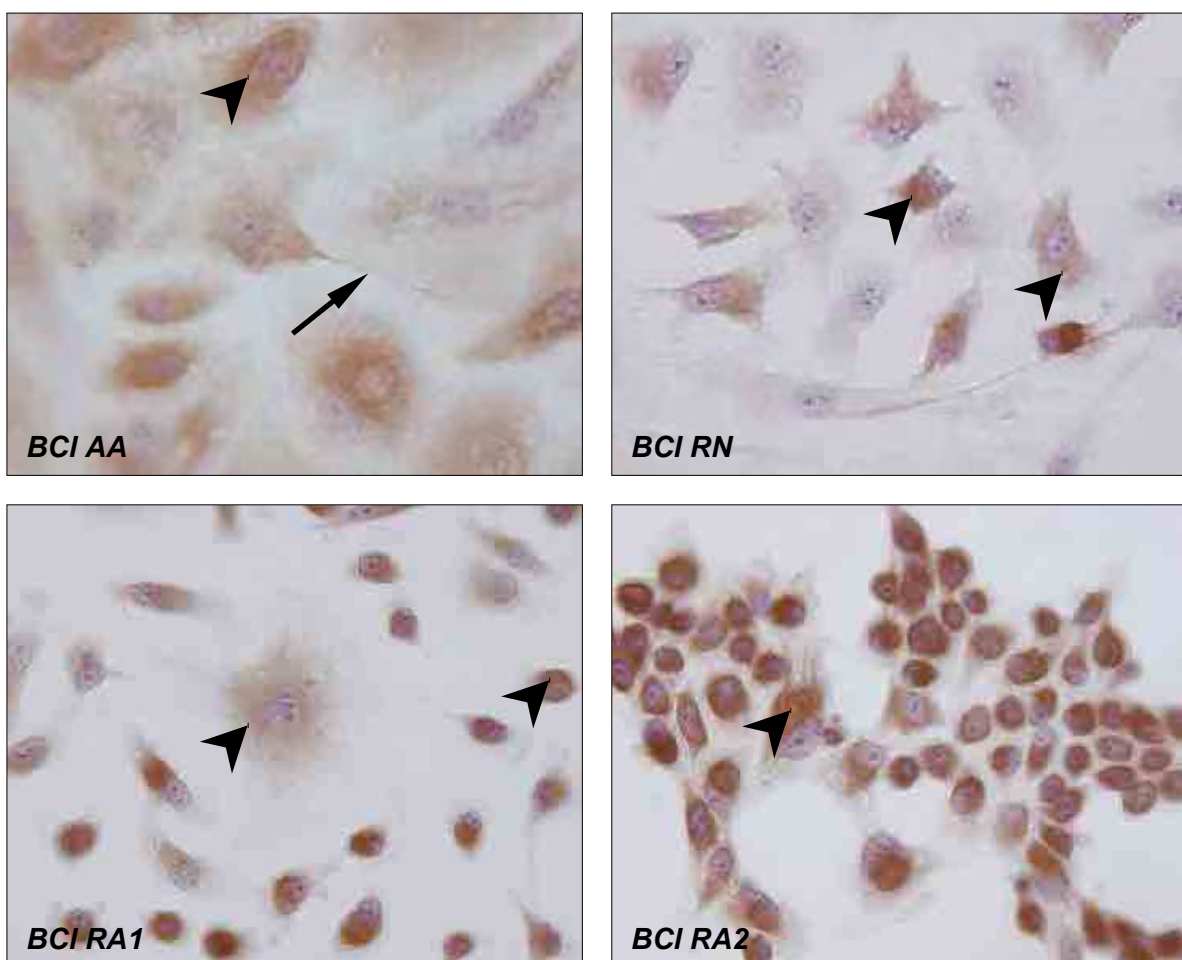


Abbildung 45

Immunzytochemischer Nachweis von CD31 in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung in serumreduziertem Medium DMEM⁺.

Das Transmembran-Immunglobulin CD31 ist in allen Kulturen (*BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2*) nachzuweisen. Diffuse Verteilung des Antigens intrazellulär und an der Zytoplasmamembran der Zellen (Pfeilspitzen), die Zellausläufer sind deutlich angefärbt (Pfeil). Lichtmikroskop x 400

Während die Zellen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* annähernd zu 100% positiv reagierten, waren bei den Kulturen *BCI AA* und *BCI RN* nur ca. 65 % der Zellen immunopositiv (Tabelle 10). Ein spezifisches Verteilungsmuster positiver Zellen der Kulturen *BCI AA* und *BCI RN* wurde nicht beobachtet.

Da die Kinetik des Expressionsmusters von PECAM-1 für die Interpretation der Ergebnisse ausschlaggebend ist, wurde die immunzytochemische Markierung der Zellen mit diesem Marker nach 7 Tagen Inkubation in dem angiogenesefördernden Medium P0 wiederholt. Die Präsenz des Transmembran-Immunglobulins CD31 wurde nach 7 Tagen Inkubation in den vier Kulturen *BCI AA*, *BCI RN* (Abbildung 46), *BCI RA2* und *BCI RA1* in annähernd 100% Zellen nachgewiesen.

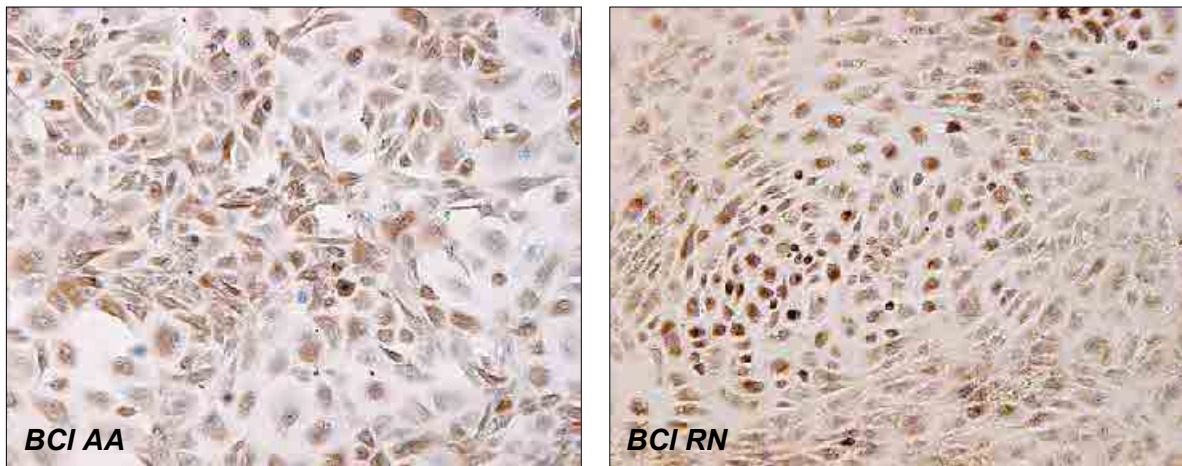


Abbildung 46

Immunzytochemischer Nachweis von CD31 in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 7 Tagen *in vitro* Kultivierung in angiogeneseförderndem Medium P0.

Das Transmembran-Immunglobulin CD31 ist in den Kulturen *BCI AA* und *BCI RN* in fast allen Zellen nachzuweisen. Lichtmikroskop x 100

5.2.1.1 Kontrollen

Parallel zu den immunzytochemischen Untersuchungen wurden stets Kontrollen des Detektionsystems durchgeführt. Anstelle eines Sekundärantikörpers wurden die Zellen hierfür mit Mausserum bzw. mit PBS-Puffer inkubiert. Die Kontrollen zeigten keine unspezifischen Bindungen (Abbildung 47).

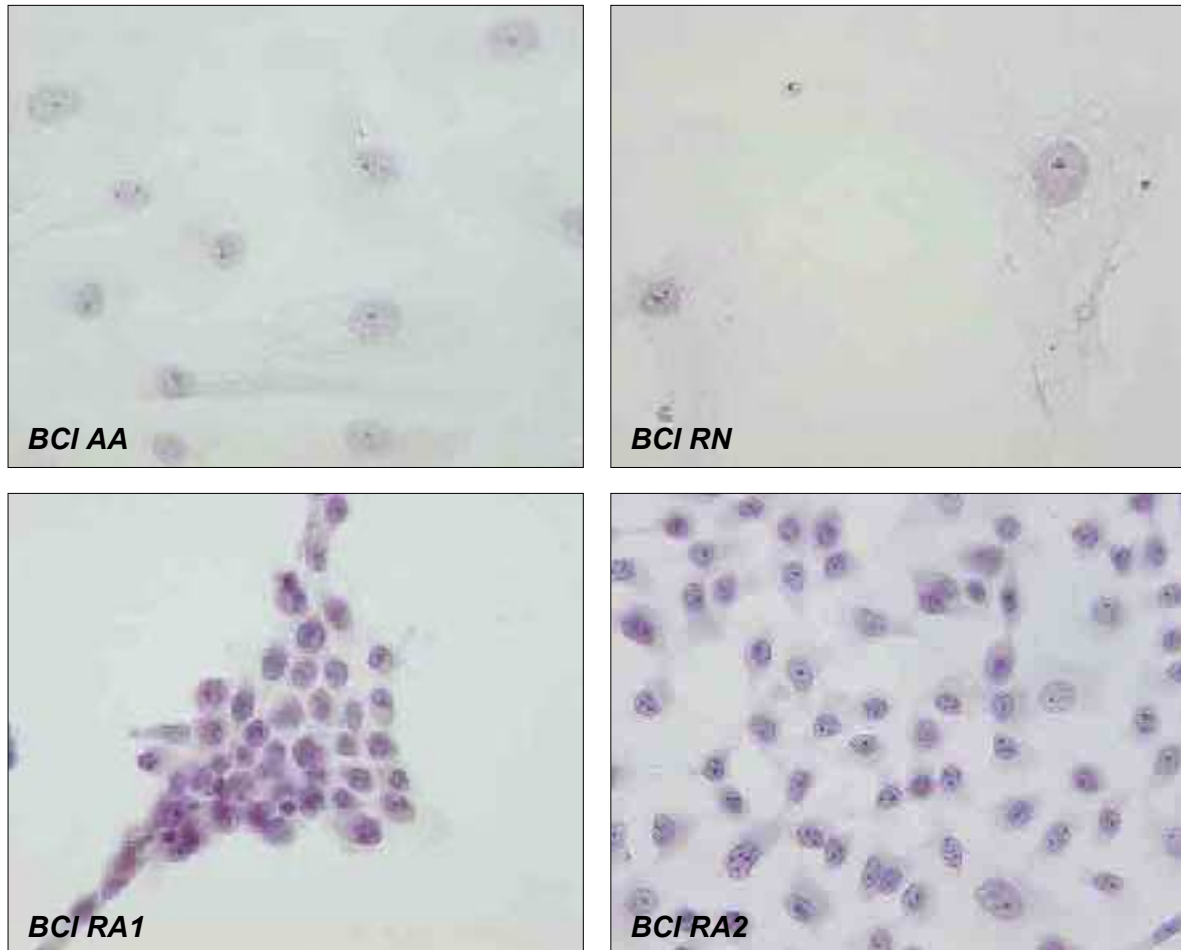


Abbildung 47

Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung in serumreduziertem Medium DMEM⁺. Die Zellen zeigen keine unspezifischen Bindungsreaktionen. Lichtmikroskop x 400

5.2.2 Immunzytochemische Markierung mit anti-CD34

Das Oberflächen-Glykophosphoprotein CD34 konnte lediglich an Zellen der Kultur *BCI AA* nachgewiesen werden. Wie der Abbildung 48 entnommen werden kann, wurden bei dieser Zellkultur sowohl intrazelluläre Domänen des Moleküls, als auch Zelloberflächenepitope von dem Antikörper markiert. Insbesondere interdigitierende Zellausläufer waren stark angefärbt. Unter den ca. 40% immunpositiven Zellen (Tabelle 10) dieser Kultur waren schwächer und

stärker reagierende Zellen aufzufinden. Die Markierung der Zellen zeichnete ein auffälliges, wiederkehrendes Verteilungsmuster ab. Die Zellen, welche eine intensivere Markierung zeigten, befanden sich in den im morphologischen Teil der Arbeit beschriebenen „Starting Points“, den Zellarealen mit höherer Zelldichte und zahlreichen Mitosen, von denen die vaskuläre Entwicklung ausging.

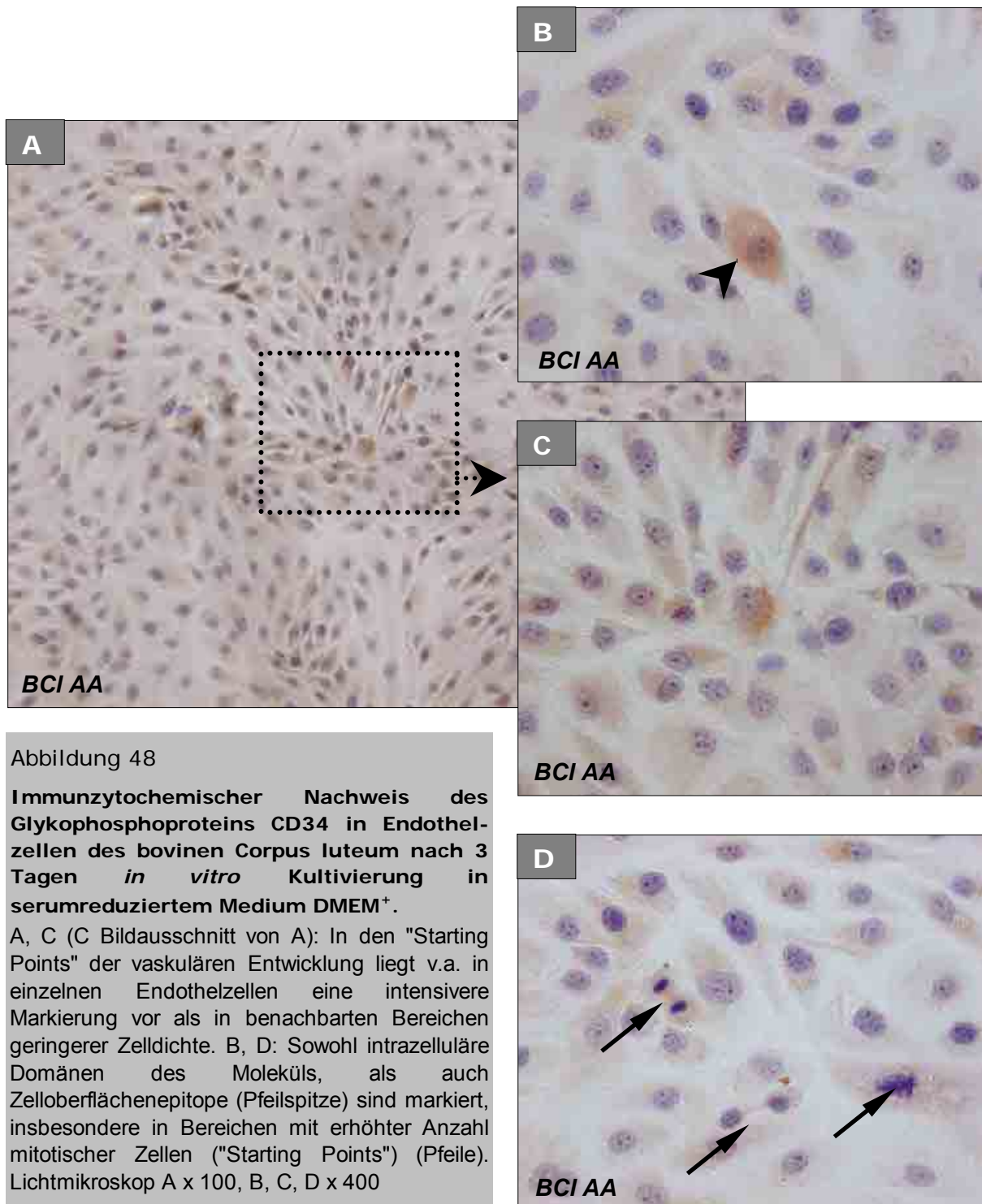


Abbildung 48

Immunzytochemischer Nachweis des Glykophosphoproteins CD34 in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung in serumreduziertem Medium DMEM⁺.

A, C (C Bildausschnitt von A): In den "Starting Points" der vaskulären Entwicklung liegt v.a. in einzelnen Endothelzellen eine intensivere Markierung vor als in benachbarten Bereichen geringerer Zelldichte. B, D: Sowohl intrazelluläre Domänen des Moleküls, als auch Zelloberflächenepitope (Pfeilspitze) sind markiert, insbesondere in Bereichen mit erhöhter Anzahl mitotischer Zellen ("Starting Points") (Pfeile).
Lichtmikroskop A x 100, B, C, D x 400

5.2.2.1 Kontrollen

Zur Kontrolle wurden anstelle eines Antikörpers mit Mausserum bzw. mit PBS-Puffer inkubiert. Die Kontrollen erwiesen geringgradig unspezifische Niederschläge des biotinylierten Sekundärantikörpers im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 49). Die spezifischen Bindungen konnten davon deutlich differenziert werden. Eine vierfache Wiederholung der Tests gewährleistete Sicherheit der Ergebnisse.

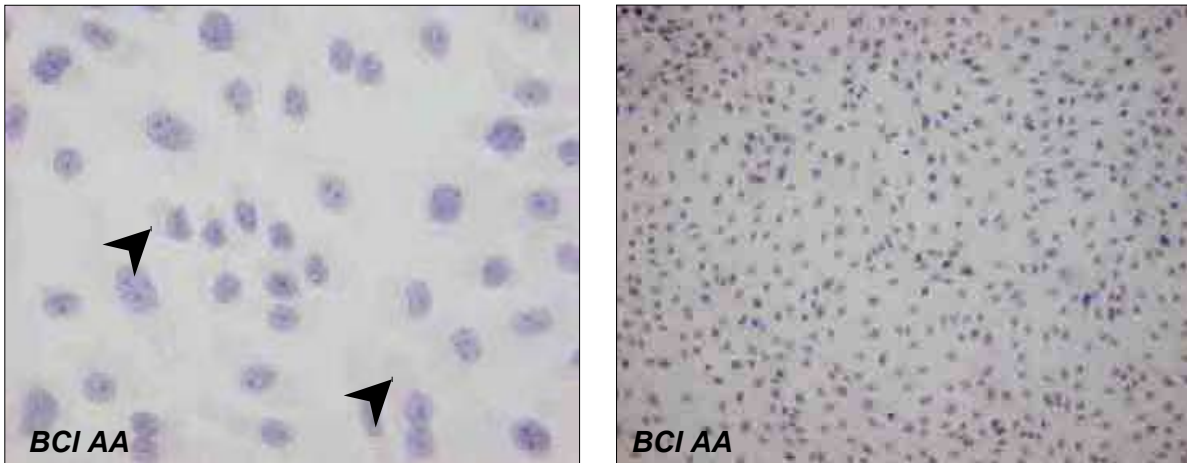


Abbildung 49

Darstellung der Kontrollen in den Endothelzellen des bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI AA* nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung im serumreduzierten Medium DMEM⁺.
Geringgradig unspezifische Reaktionen sind im Zytoplasma der Zellen lokalisiert (Pfeilspitzen). Lichtmikroskop x 400

5.2.3 Immunzytochemische Markierung mit anti-CD117 (c-kit)

CD117, der Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptor des Wachstumsfaktors Stammzellfaktor (SCF), konnte in allen Zellkulturen nachgewiesen werden (Tabelle 10). Jedoch traten erhebliche Unterschiede in der Intensität der Markierung und im Verteilungsmuster positiver Zellen innerhalb des Zellverbands sowie in der zellulären Lokalisation dieses Moleküls auf.

Annähernd alle Zellen der Kultur *BCI AA* zeigten Bindung des polyklonalen Antikörpers anti-human-CD117 (Abbildung 50). Die höchste Intensität fand sich fokal in Loci mit hoher Zelldichte („Starting Points“). Innerhalb solcher Bereiche waren regelmäßig stark positive, mitotische Zellen aufzufinden. Die benachbarten Zellen zwischen den zellverdichten Arealen zeigten schwächere Anfärbung. Markierungen wurden sowohl an zytoplasmatischen als auch an membranösen Epitopen beobachtet. Die Reaktion an der Zellmembran war punktförmig und diffus an den Oberflächen der Zellen sichtbar.

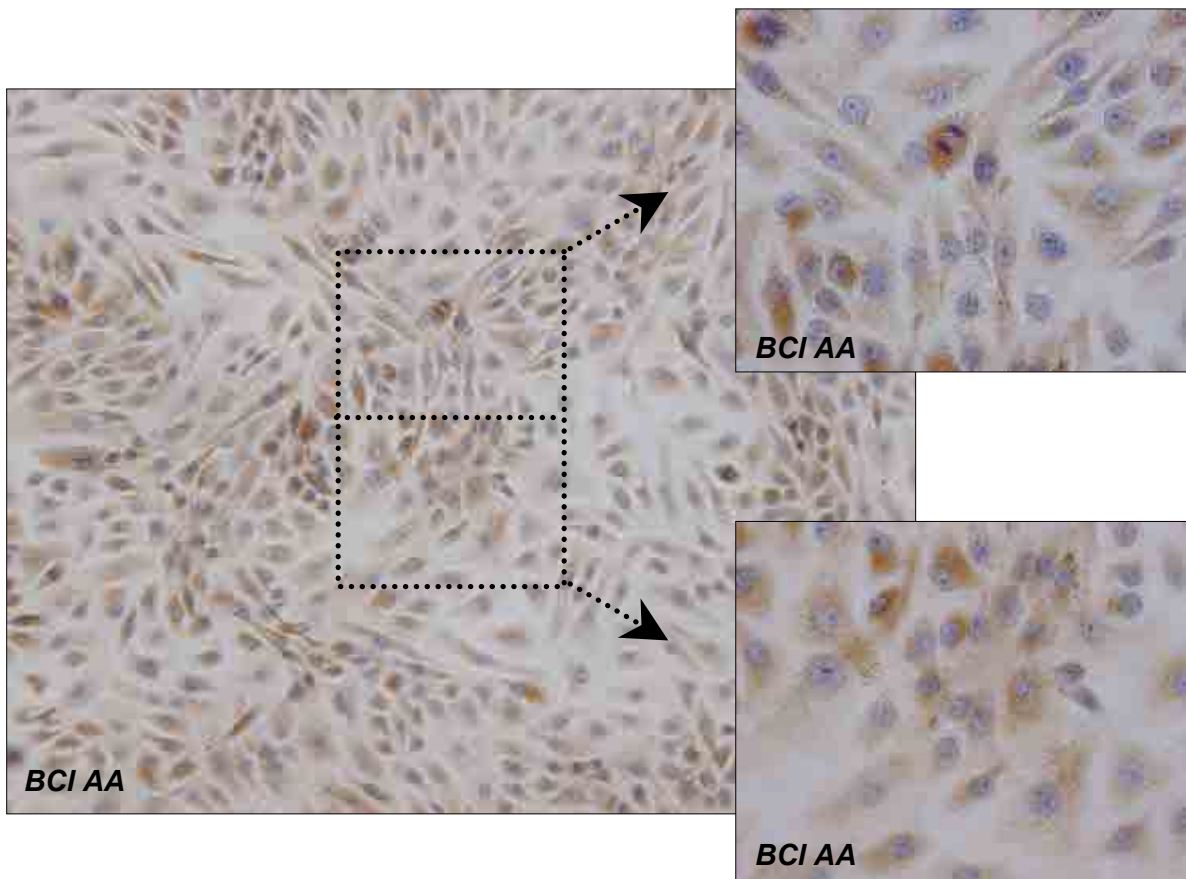


Abbildung 50

Immunzytochemischer Nachweis des Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptors CD117 in Endothelzellen der Kultur *BCI AA* des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung in serumreduziertem Medium DMEM⁺.

Die höchste Intensität der Markierung zeigt sich in den "Starting Points", innerhalb dieser Loci sind regelmäßig stark positive, mitotische Zellen aufzufinden. Lichtmikroskop links x 100, rechts x 400

Die markierten Zellen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RN* ließen kein spezielles Verteilungsmuster des Antigens innerhalb der Zellrasen erkennen. Es fand überwiegend eine schwache, paranukleäre, zytoplasmatische Reaktion statt. Einzelne Zellen zeigten eine Reaktion, die punktuell und diffus lokalisiert war (Abbildung 51).

Epitope des Stammzellfaktor-Rezeptors wurden auch bei Zellen der Kultur *BCI RA2* nachgewiesen. Diese Zellen zeigten ausschließlich zytoplasmatische Reaktivität. Die Intensität konzentrierte sich in paranukleären Bereichen, andere Teile des Zellkörpers waren schwach markiert (Abbildung 51). Eine vergleichende Übersicht über den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der Kulturen wird in Tabelle 10 dargestellt.

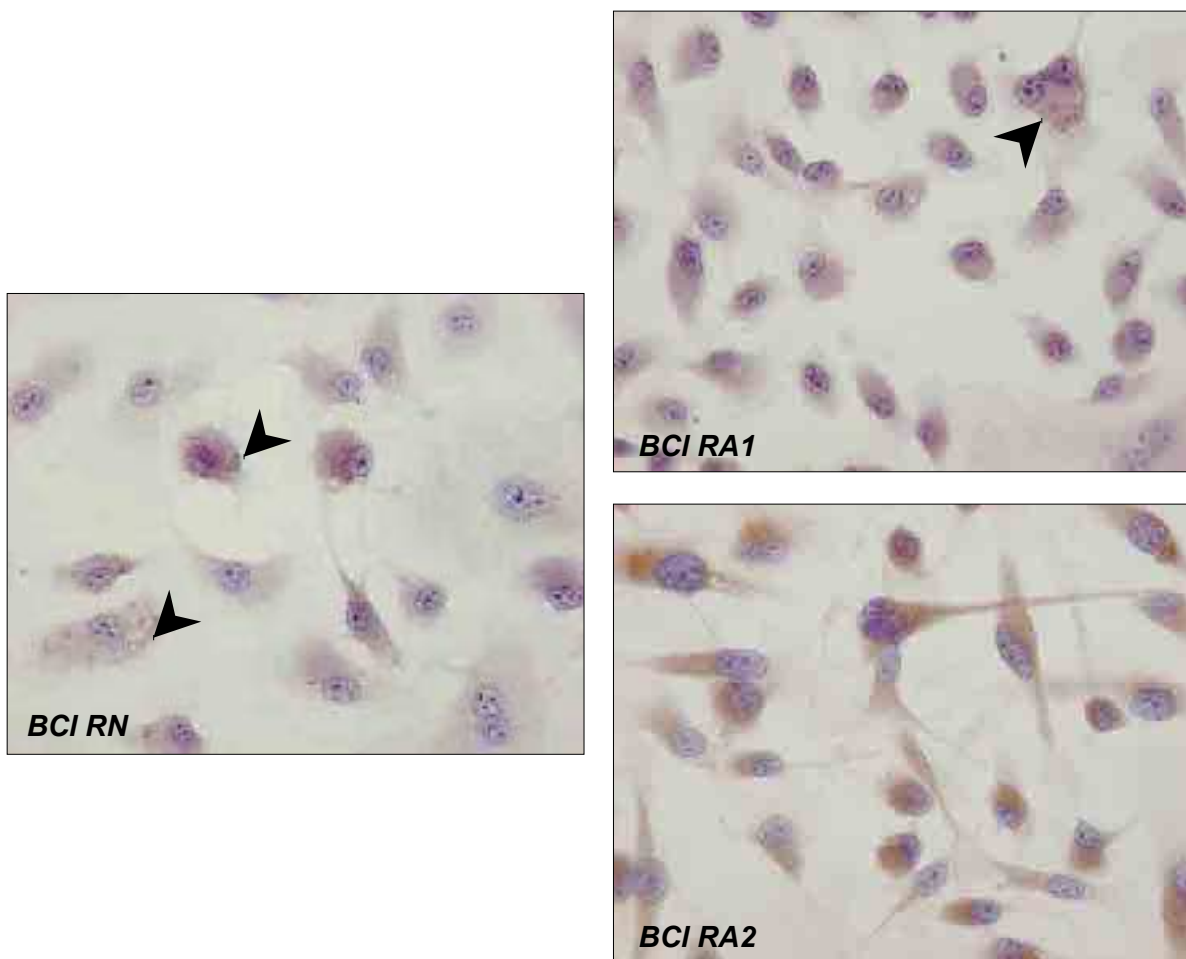


Abbildung 51

Immunzytochemischer Nachweis des Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptors CD117 in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung in serumreduziertem Medium DMEM⁺.

Schwache, paranukleäre, zytoplasmatische Reaktionen in den Zellen der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RN*, einzelne Zellen zeigen punktförmige Immunopositivität (Pfeilspitzen). Kultur *BCI RA2* zeigt ausschließlich zytoplasmatische Reaktivität, mit höchster Konzentration in paranukleären Bereichen. Lichtmikroskop x 400

5.2.3.1 Kontrollen

Zum Ausschluss unspezifischer Ergebnisse wurden parallel zu den Testreihen Kontrollansätze durchgeführt. Anstelle des Erst-Antikörpers fand eine Inkubation der fixierten Zellen mit PBS-Puffer bzw. Kaninchenserum statt. Sehr geringfügige zytoplasmatische Reaktionen waren in den Endothelzellen der Zellkultur *BCI AA* zu finden. In den Kulturen *BCI RN*, *BCI RA1* und *BCI RA2* waren unspezifische Reaktionen auszumachen (Abbildung 52).

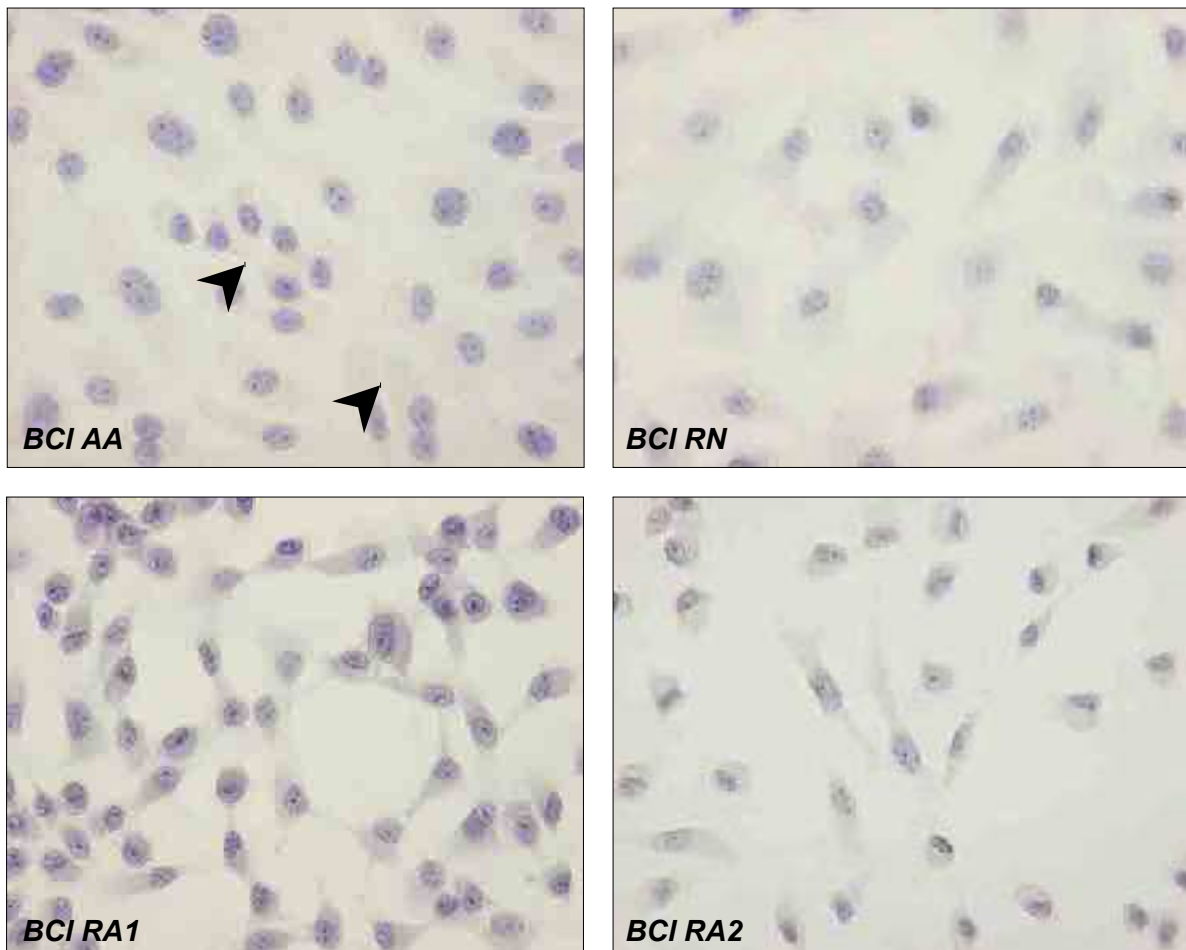


Abbildung 52

Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung in serumreduziertem Medium DMEM⁺.

Keine unspezifischen Reaktionen treten bei den Zellen der Kulturen *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* auf. Minimale zytoplasmatische Reaktionen in den Endothelzellen der Zellkultur *BCI AA* (Pfeilspitzen). Lichtmikroskop x 400

5.2.4 Immunzytochemische Markierung mit anti-Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2 (VEGF-R2, KDR)

Domänen des Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptors KDR konnten bei allen untersuchten Zellkulturtypen nachgewiesen werden. Das Verteilungsmuster des Antigens war in den Kulturen unterschiedlich ausgeprägt (Abbildungen 53 und 54). Aus Tabelle 10 wird ersichtlich, welchen prozentualen Anteil die positiven Zellen innerhalb der verschiedenen Kulturen einnahmen.

Immunopositivität zeigten ca. 60% der Zellen der Kultur *BCI AA* für den polyklonalen Antikörper VEGF-R2. Die höchste Intensität der Markierung fand sich fokal in Loci mit hoher Zelldichte. Innerhalb solcher Bereiche waren stark positive mitotische Zellen aufzufinden („Starting Points“). Die benachbarten Zellen zwischen den zellgedichten Arealen zeigten eine schwächere Anfärbung. Markierungen wurden sowohl an zytoplasmatischen als auch an membranösen Epitopen beobachtet. Die Reaktion war punktförmig und diffus an den Oberflächen der Zellen verteilt.

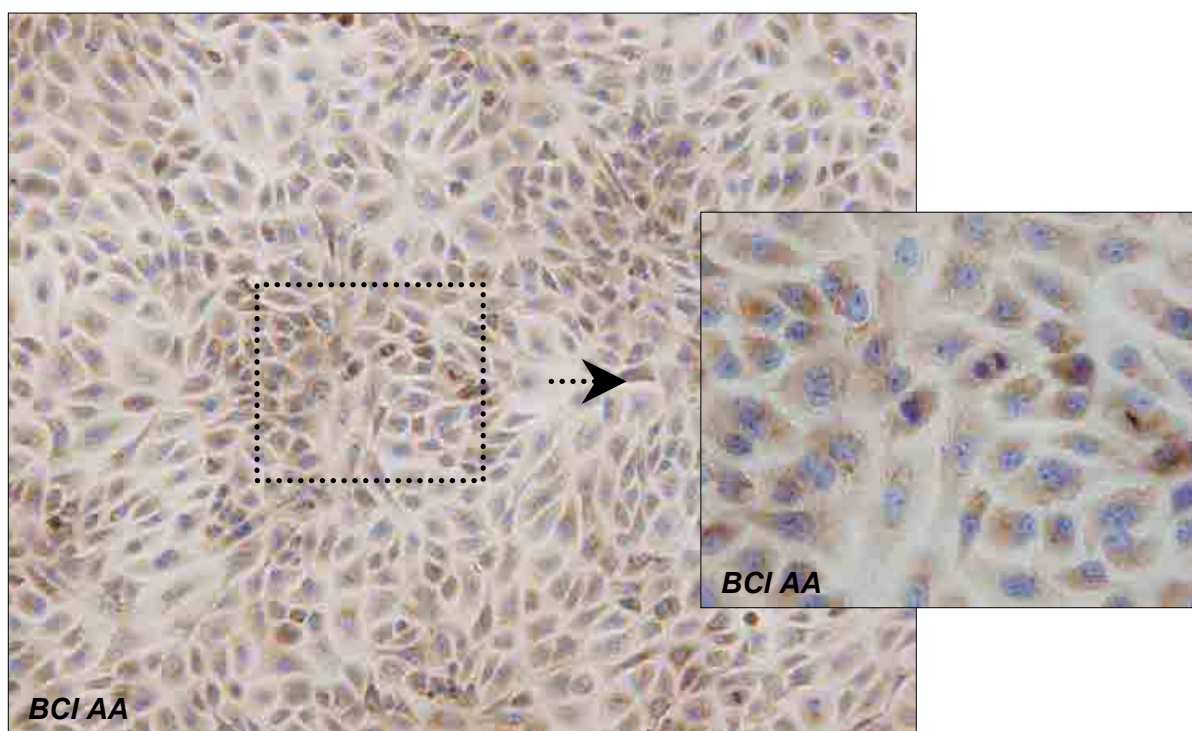


Abbildung 53

Immunzytochemischer Nachweis des Transmembran Tyrosin-Kinase-Rezeptors VEGF-R2 in Endothelzellen der Kultur *BCI AA* des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung im serumreduzierten Medium DMEM⁺.

Die höchste Intensität der Markierung ist in den Zellen der "Starting Points", innerhalb solcher Bereiche sind regelmäßig stark positive mitotische Zellen aufzufinden. Benachbarte Zellen zwischen den zellgedichten Arealen zeigen eine schwächere Anfärbung. Lichtmikroskop links x 100, rechts x 400

Die Zellen der Kulturen *BCI RA1*, *BCI RA2* und *BCI RN* ließen nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung kein spezifisches Verteilungsmuster positiver Zellen erkennen (Abbildung 54). Während die Zellen der Kultur *BCI RN* schwächere Bindungsreaktionen mit dem Antikörper zeigten, reagierten eine höhere Anzahl der Zellen dieser Kultur als vergleichsweise der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2*, welche dafür intensiver gefärbt waren (Tabelle 10). Insgesamt fanden bei diesen Kulturen zytoplasmatische Reaktionen statt, die teilweise paranukleär intensiver waren.

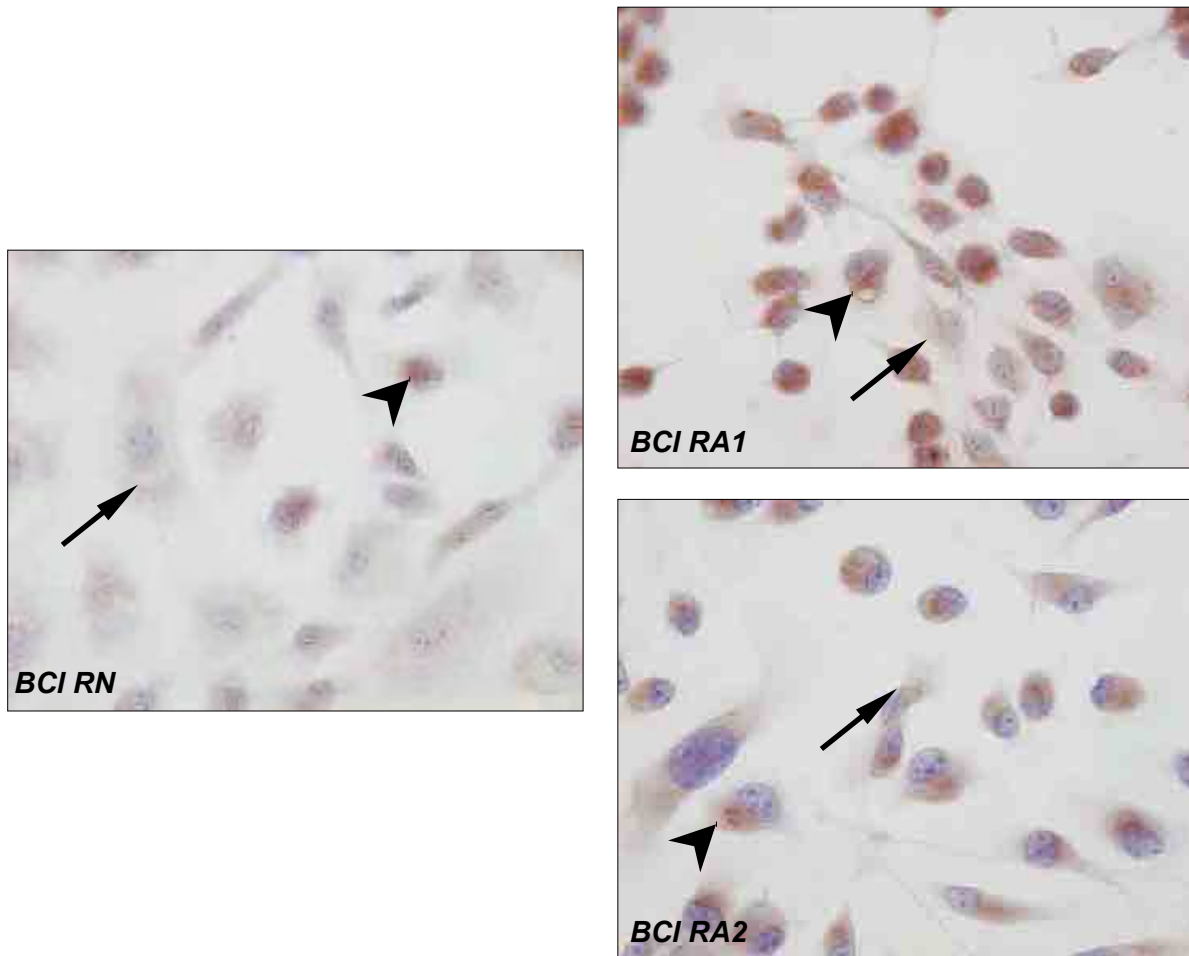


Abbildung 54

Immunzytochemischer Nachweis des Transmembran Tyrosin-Kinase-Rezeptors VEGF-R2 in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung im serumreduzierten Medium DMEM⁺.

Die Kulturen *BCI RA1*, *BCI RA2* und *BCI RN* zeigen kein spezifisches Verteilungsmuster positiver Zellen. Es zeigen sich zytoplasmatische (Pfeile) und paranukleäre Immunopositivität (Pfeilspitzen). Lichtmikroskop x 400

5.2.4.1 Kontrollen

Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen wurden parallel zu den Testreihen Kontrollansätze durchgeführt. Anstelle des Erst-Antikörpers fand eine Inkubation der Zellen mit PBS-Puffer bzw. Kaninchenserum statt. Keine der 4 Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1* und *BCI RA2* ließ unspezifische Bindungen beobachten (Abbildung 55).

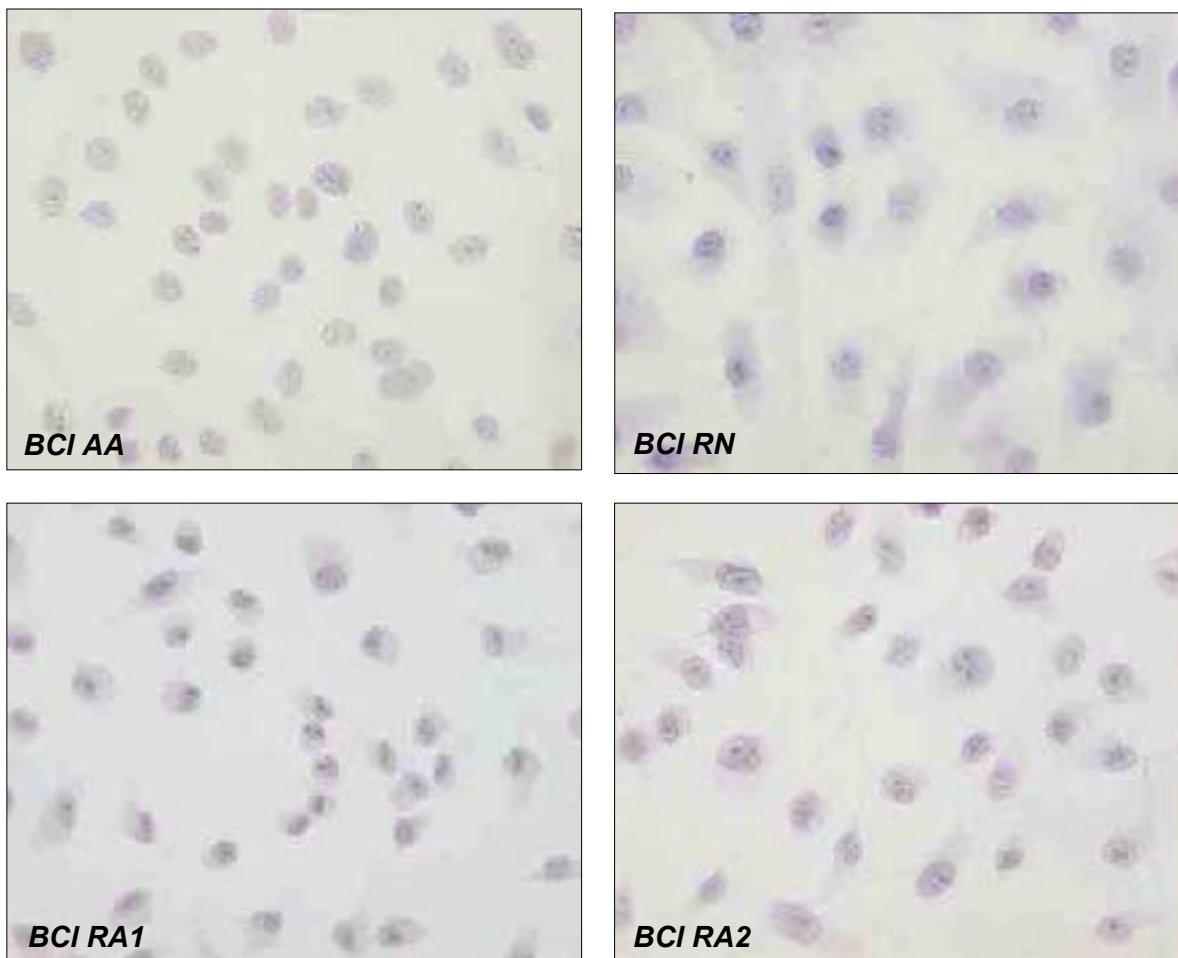


Abbildung 55

Darstellung der Kontrollen in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 3 Tagen *in vitro* Kultivierung in serumreduziertem Medium DMEM⁺.

Die Zellen zeigen keine unspezifischen Reaktionen. Lichtmikroskop x 400

5.2.5 Tabellarische Übersicht der immunzytochemischen Untersuchungen mit Stammzellmarkern

<i>Zellkulturtyp</i>	<i>Prozentualer Anteil markierter Zellen</i>			
	<i>CD31</i>	<i>CD34</i>	<i>CD117</i>	<i>VEGF-R2</i>
<i>BCI AA</i>	65%	40%	90%	60%
<i>BCI RN</i>	65%	0%	67%	60%
<i>BCI RA1</i>	98%	0%	80%	40%
<i>BCI RA2</i>	93%	0%	71%	40%

Tabelle 10: Vergleichende Übersicht über den prozentualen Anteil der positiven Zellen bei den mikrovaskulären Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* des bovinen Corpus luteum.

5.3 Immunzytochemischer Nachweis der Zelladhäsionsmoleküle anti-Integrin $\beta 1$ (CD29) und anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD51/61) mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum

Es wurde ermittelt, ob auf den Endothelzellen der vier zu vergleichenden Kulturen die Integrine $\beta 1$ (CD29) und $\alpha_v\beta_3$ (CD51/61) nachzuweisen sind. Diese werden sowohl von Endothelzellen als auch von hämatopoietischen Stammzellen exprimiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen diesen Rezeptorproteinen und der Fähigkeit der Endothelzellen in kapillarähnliche, dreidimensionale Strukturen zu differenzieren, besteht.

Die mikrovaskulären Endothelzellen wurden hierfür auf gelatinierten Glasplättchen in 24-Lochplatten ausgesät. Als Nährmedium wurde das die Angiogenese stimulierende P0 (siehe 3.1.4.3) benutzt. Nach 28 bzw. 42 Tagen in Kultur wurden die Endothelzellen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

5.3.1 Immunzytochemische Markierung mit anti-Integrin $\beta 1$ (CD29)

In unterschiedlicher Intensität konnte das Integrin CD29 in allen Endothelzellkulturen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den nach 28 und 42 Tagen untersuchten Kulturen. Die Endothelzellen der Kultur *BC/AA* wiesen eine intensive Markierung an ihren Membranen auf. Insbesondere die kommunizierenden Zellgrenzen waren deutlich angefärbt. Es bestand kein spezifisches Verteilungsmuster des Integrins im Zellrasen. Diese Markierung visualisierte die ausgeprägte Dreidimensionalität der tubulären Strukturen der Endothelzellen (Abbildung 56). Mittels der im Kapitel Methoden (4.5.5) beschriebenen Fokussierungstechnik wurde ein kurzer Film angefertigt, welcher die Dreidimensionalität der Kultur *BC/AA* deutlich demonstriert. Dieser Film wurde auf die CD-ROM gebrannt, die als Bestandteil der vorliegenden Arbeit beigelegt ist.

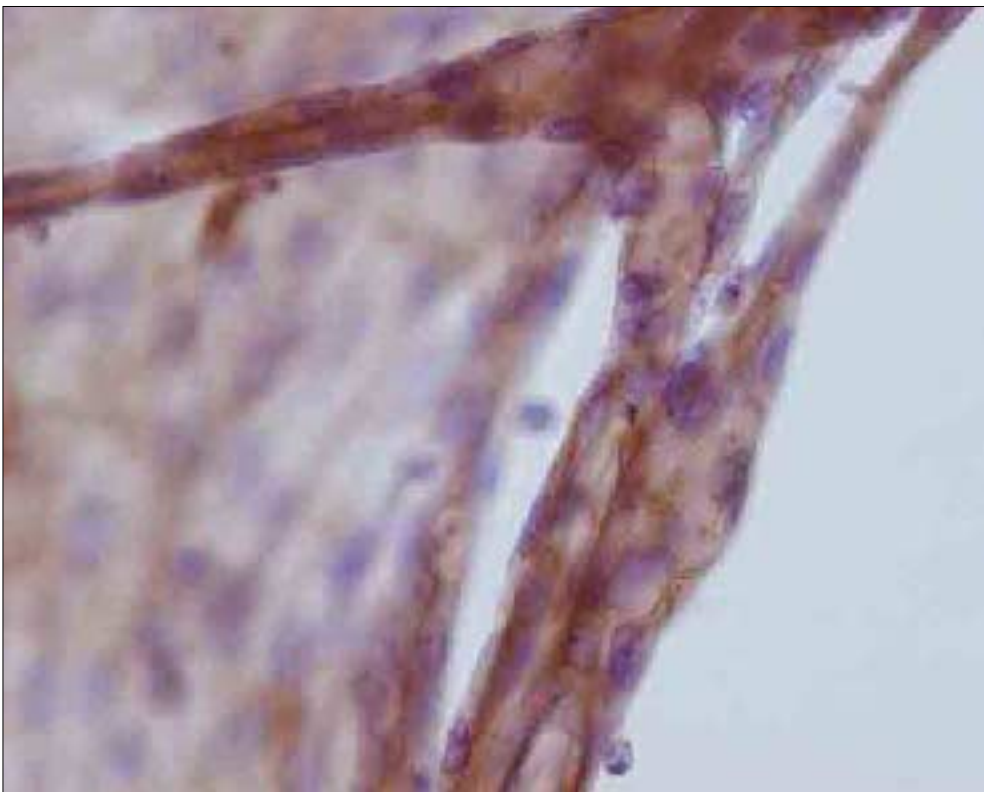
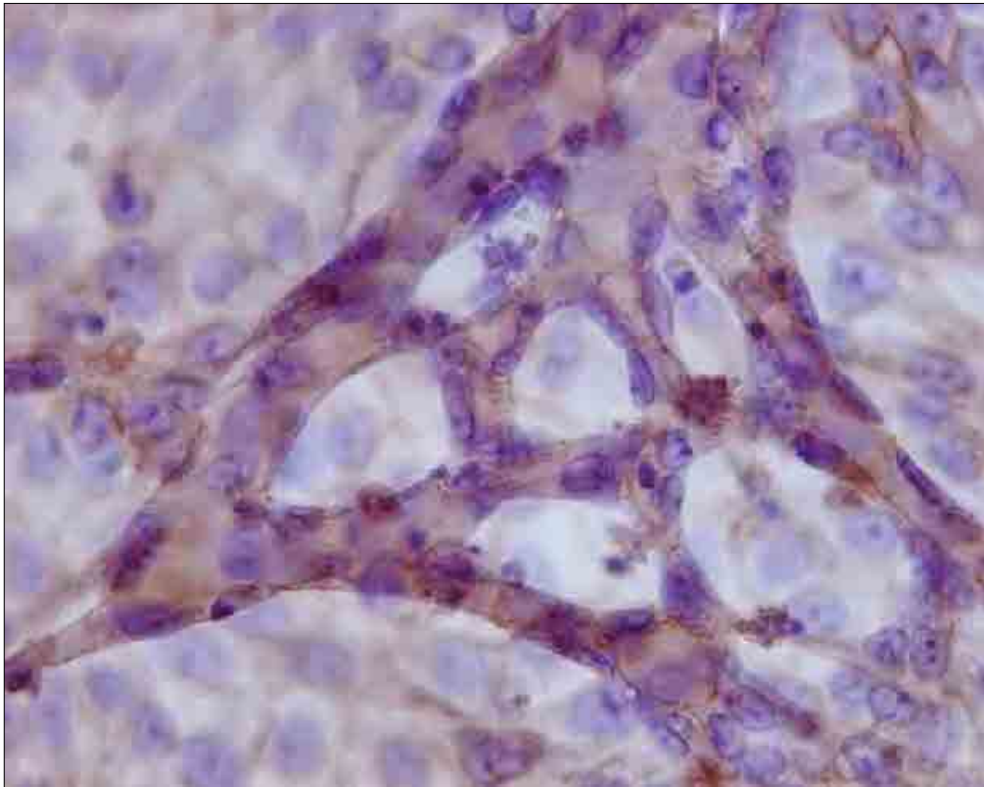


Abbildung 56

Immunzytochemischer Nachweis des Integrins CD29 in Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI AA* nach 42 Tagen *in vitro*.
Deutliche Markierung der dreidimensionalen, kapillar-ähnlichen Strukturen. Lichtmikroskop x 400

Ebenso immunopositiv reagierten die Zellen der Kultur *BCI RN*. Die Präsenz des Integrins war auf der Oberfläche der Zellen deutlich erkennbar. Wiederum zeigten besonders Zellkontakte eine starke Reaktion (Abbildung 57).

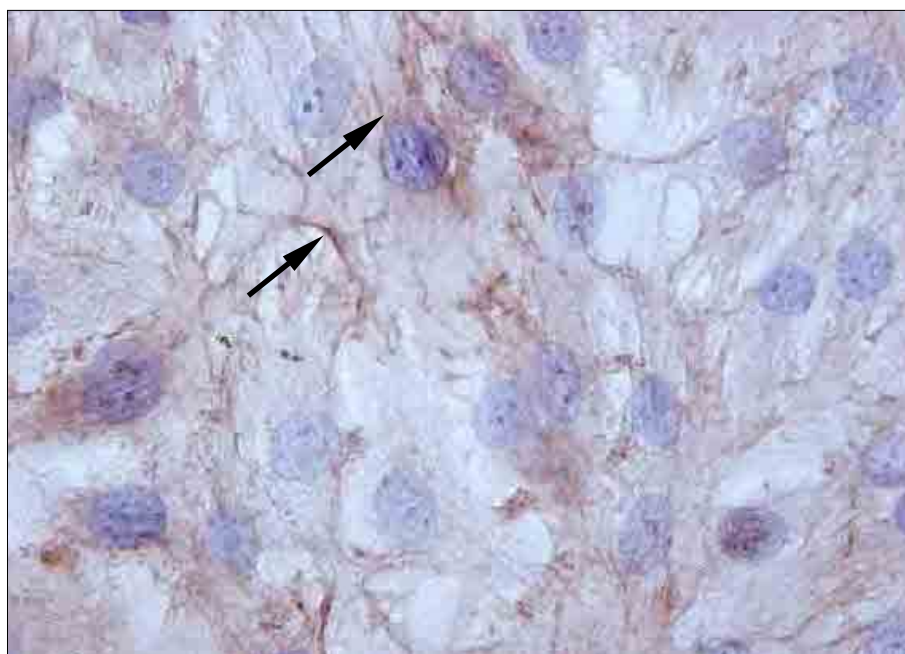
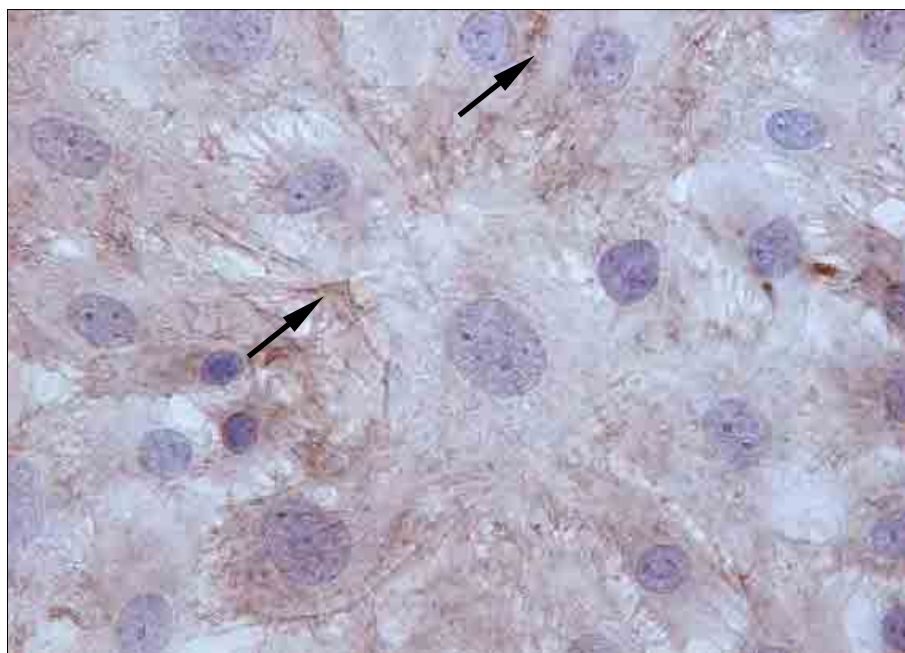


Abbildung 57

Immunzytochemischer Nachweis des Integrins CD29 in Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI RN* nach 42 Tagen *in vitro*.

Präsenz des Integrins auf der Oberfläche der Zellen, besonders an interzellulären Kontakten (Pfeile). Lichtmikroskop x 400

Unterschiede in der Intensität der Anfärbung zeigten sich in Endothelzellkultur *BCI RA1*. Grundsätzlich war das Integrin auf allen Zellen der Kultur nachzuweisen, jedoch beschränkten sich starke Anfärbungen auf die an Ringstrukturen beteiligten Zellen (Abbildung 58).

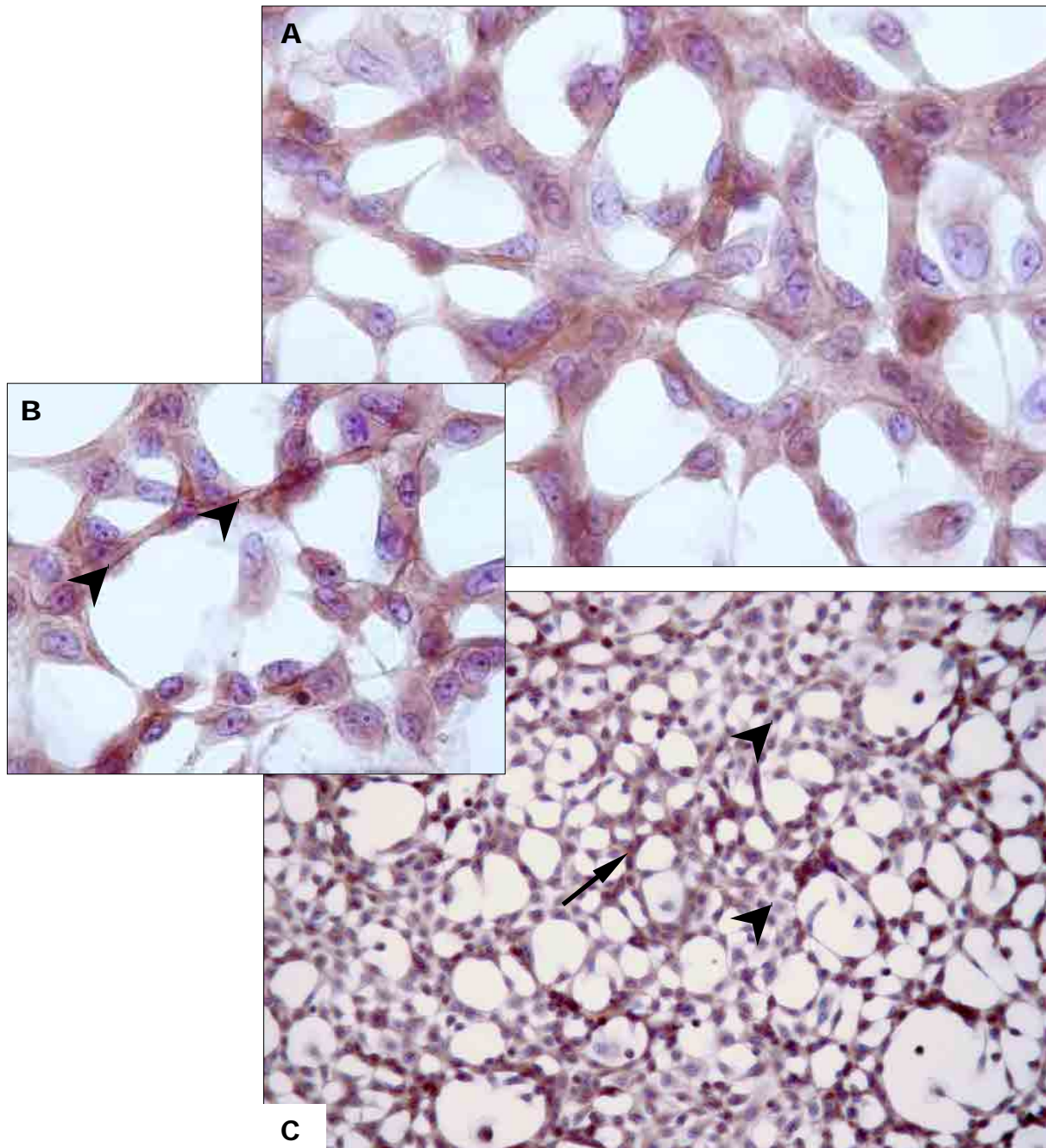


Abbildung 58

Immunzytochemischer Nachweis des Integrins CD29 in Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI RA1* nach 28 Tagen *in vitro*.

A: Die Zellen des dreidimensionalen Netzwerks sind deutlich markiert. B: Ein internes Lumen zeichnet sich innerhalb der deutlich markierten Zellen ab (Pfeilspitzen). C: Spezifisches Verteilungsmuster des Integrins im Zellrasen, stark angefärbte Zellen (Pfeil), schwach angefärbte Zellen (Pfeilspitzen). Lichtmikroskop x 400

Die Zellen der Zellkultur *BCI RA 2* zeigten unterschiedliche Präsenz des Integrins CD29 auf ihrer Membran. Die Endothelzellen, welche in tubulären Strukturen angeordnet waren, wiesen eine deutliche Markierung auf, wobei Zellgrenzen klar zu sehen waren. Dadurch trat das Lumen innerhalb der dreidimensional angeordneten Stränge sehr deutlich zutage. Zellen, welche nicht in die Stränge eingegliedert waren, zeigten schwache oder keine Immunreaktion (Abbildung 59).

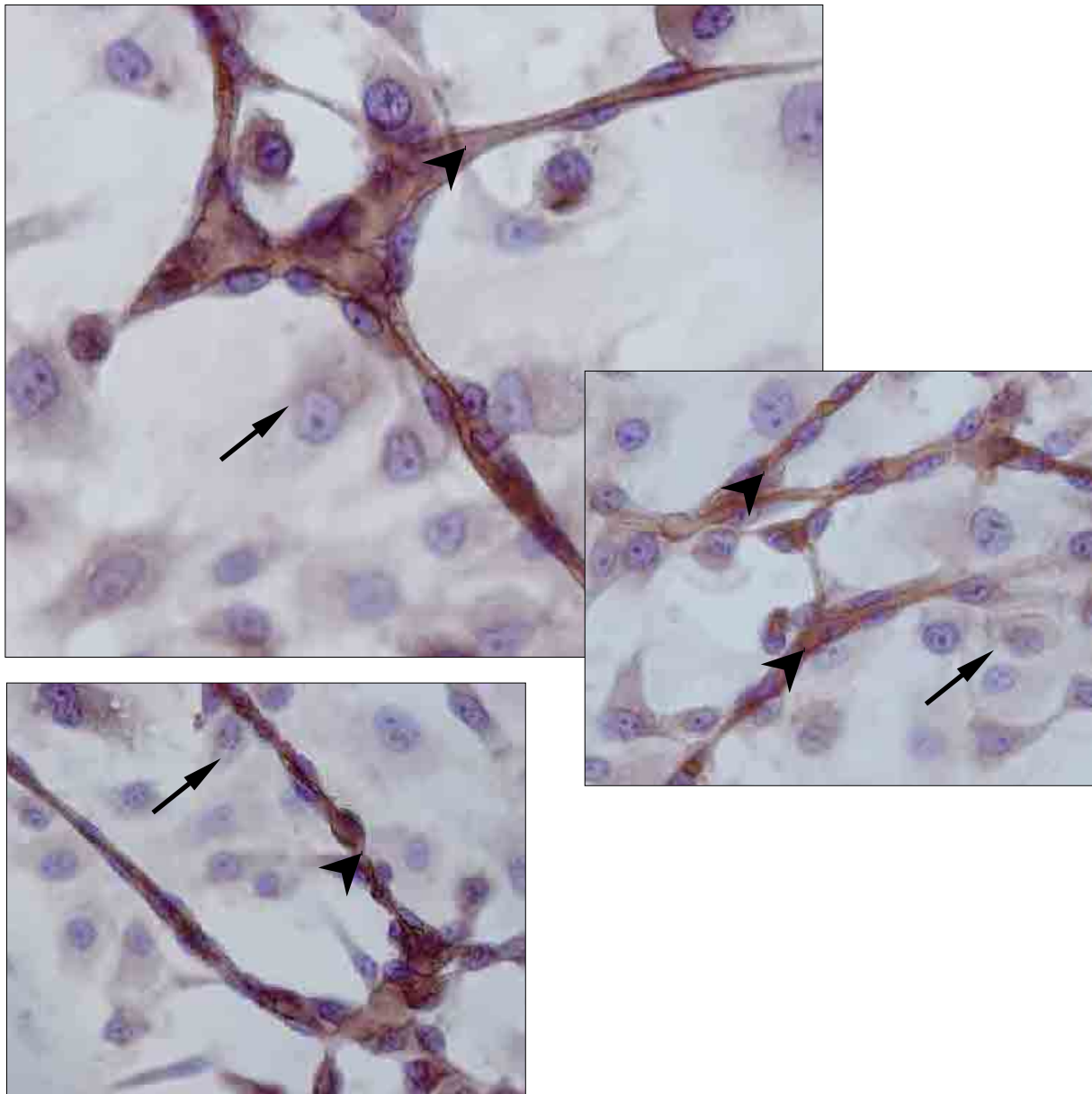


Abbildung 59

Immunzytochemischer Nachweis des Integrins CD29 in Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI RA2* nach 28 Tagen *in vitro*.

Dreidimensionale Anordnung tubulärer, deutlich markierter Strukturen mit Lumen (Pfeilspitzen). Die Zellen des Monolayers am Kulturschalengrund sind schwach angefärbt (Pfeile). Lichtmikroskop x 400

5.3.2 Immunzytochemische Markierung mit anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD51/61)

Eine deutliche Bindung des Antikörpers gegen das Integrin CD 51/61 war auf den Zellen der Kultur *BCI AA* zu beobachten. Sowohl tubuläre Strukturen als auch Zellen des Monolayers am Kulturschalenboden waren markiert. Insbesondere die kommunizierenden Zellgrenzen waren mit dem Integrin gut darstellbar (Abbildung 60).

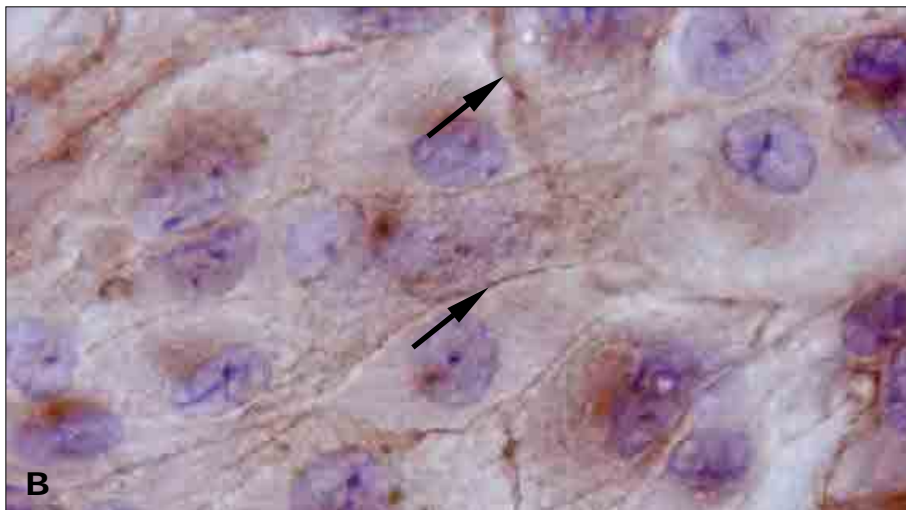


Abbildung 60

Immunzytochemischer Nachweis des Integrins CD51/61 in Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI AA* nach 42 Tagen *in vitro*.

A: Endothelzellen der kapillarähnlichen Strukturen als auch die Zellen am Kulturschalengrund sowie Zellkontakte (B; Pfeile), sind deutlich markiert. Lichtmikroskop x 400

In den Zellen der Kultur *BCI RN* reagierten nach 28 Tagen nur zytoplasmatische Epitope mit dem Antikörper anti-CD51/61. Nach 42 Tagen *in vitro* zeigte sich das typische Verteilungsmuster des Integrins auf der Oberfläche der Zellen, mit deutlicher Reaktivität der interzellulären Kontakte (Abbildung 61).

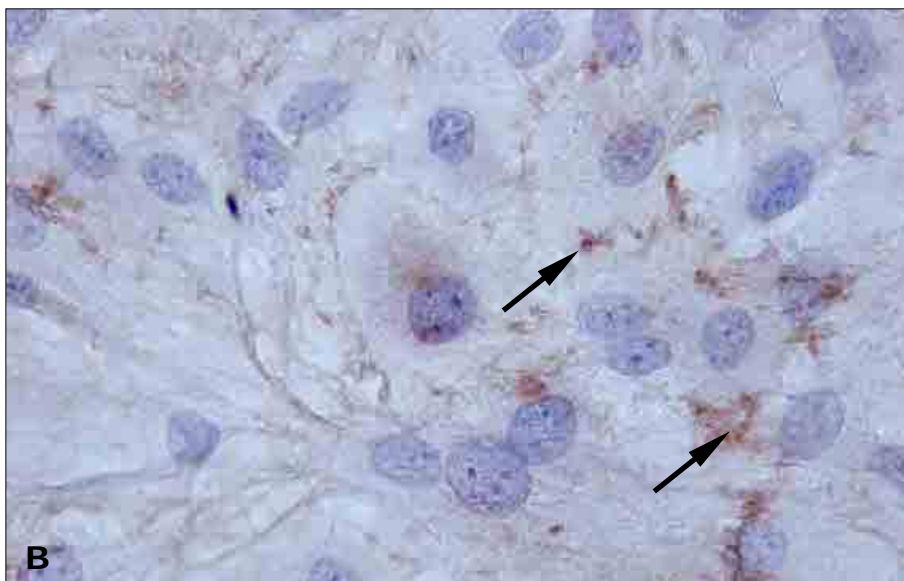
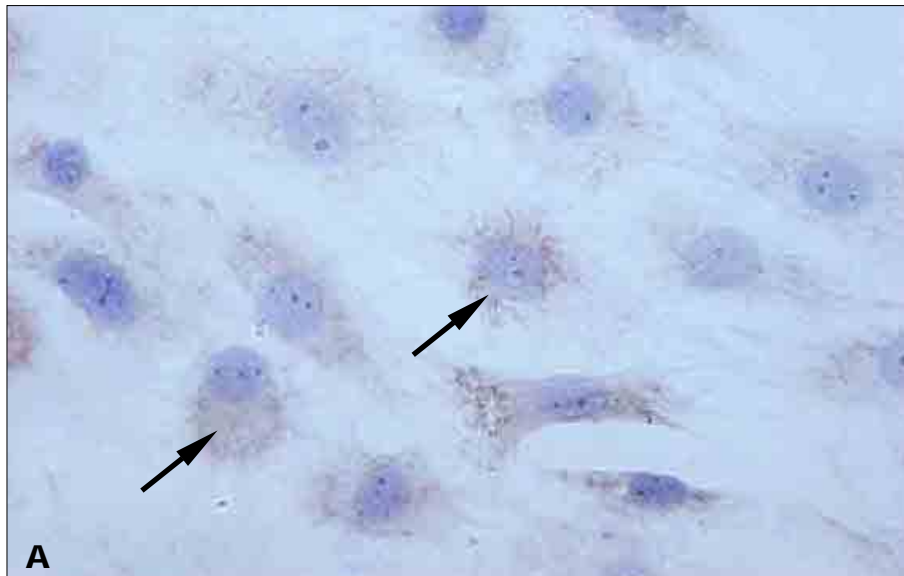


Abbildung 61

Immunzytochemischer Nachweis des Integrins CD51/61 in Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum der Kultur *BCI RN* nach 28 und 42 Tagen *in vitro*.

A: Nach 28 Tagen Inkubation sind zytoplasmatische Epitope nachzuweisen (Pfeile). B: Nach 42 Tagen ist die Oberfläche der Zellen markiert, besonders deutliche Anfärbung an Zellkontakten (Pfeile). Lichtmikroskop x 400

Die geringste Bindung des anti-CD51/61 zeigten die Zellen der Kultur *BCI RA1*. Eine schwache Markierung der meisten Zellen war zu beobachten, wobei einzelne, in das wabenartige Netzwerk eingegliederten Zellen intensiver angefärbt waren. Im Gegensatz dazu waren die tubulären Strukturen der Zellkultur *BCI RA2* regelmäßig stark angefärbt. Des Weiteren zeigten auch die Zellen des Monolayers dieser Kultur eine positive Reaktion mit dem Antikörper (Abbildung 62).

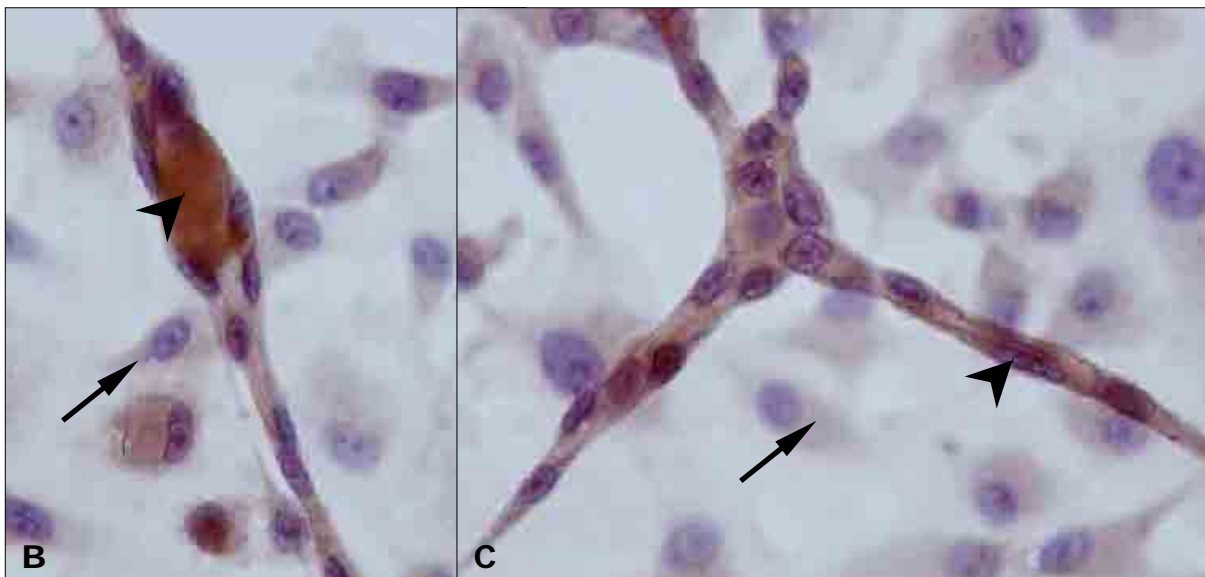
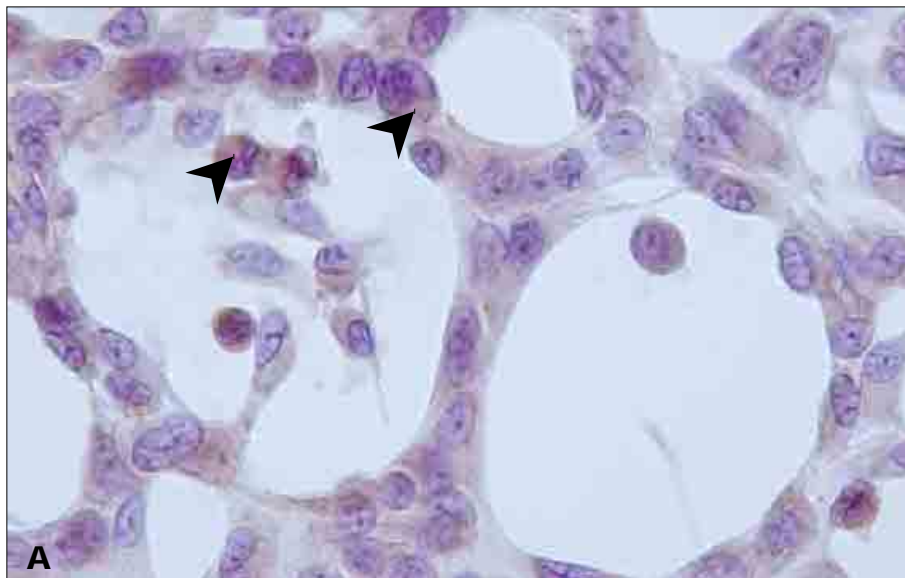


Abbildung 62

Immunocytochemischer Nachweis des Integrins CD51/61 in Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum der Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* nach 28 Tagen *in vitro*.

A: Schwache Markierung der Zellen von Kultur *BCI RA1*, nur einzelne Zellen sind deutlich angefärbt (Pfeilspitzen). B, C: Intensive Markierung der endothelialen Zellen im Bereich der Tubuli (Pfeilspitzen) von Kultur *BCI RA2*. Die Zellen ohne Beteiligung an vaskulären Strukturen waren nur schwach positiv (Pfeile). Lichtmikroskop x 400

5.3.3 Kontrollen

Mit den immunzytochemischen Untersuchungen gingen stets Kontrollen einher. Anstelle eines Sekundärantikörpers wurden die Zellen hierfür mit Mausserum bzw. mit PBS-Puffer inkubiert. Die Kontrollen erwiesen keine unspezifischen Bindungen.

5.4 Untersuchung der Genexpression der Rezeptoren des Vascular Endothelial Growth Factor VEGF-R1 und -2 *in vitro* kultivierter Endothelzellen des bovinen Corpus luteum

Die konventionelle RT-PCR wurde mit Primerpaaren durchgeführt, die gegen die VEGF-bindenden Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 gerichtet waren. Die Sequenzen der Primer sind im Kapitel 3.4.4 angegeben. Es konnte ein qualitativer Nachweis der PCR-Produkte auf Transkriptebene demonstriert werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte erschienen Primer-spezifische Banden. Die Spezifität der Bande kann anhand ihrer Größe im Vergleich mit dem Größenabstand (DNA-Leiter) ermittelt werden. Die RT-PCR-Untersuchungen wurden in multiplen, unabhängigen, experimentellen Parallelansätzen durchgeführt.

Das erwartete PCR-Produkt des VEGF-R1 betrug 351 bp (Abbildung 63).

Die Expression der VEGF-R1-mRNA konnte, wenn auch mit unterschiedlichem Niveau, in den Zellen der Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2* nachgewiesen werden. Die stärkste Expression zeigte Kultur *BCI RA2*. Mit geringerem Level, aber deutlich sichtbar, war die Expression der VEGF-R1-mRNA in den Kulturen *BCI AA* und *BCI RA1* nachzuweisen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war in den Zellen der Kultur *BCI RN* VEGF-R1-mRNA nicht nachweisbar.

Die Sequenzierung des Fragments ergab eine Homologie von 99% zu der entsprechenden Teilsequenz aus der NCBI-Datenbank.

Das erwartete PCR-Produkt des VEGF-R2 betrug 250 bp. Eine starke Expression zeigte sich in den Zellen der Kulturen *BCI AA* und *BCI RN*. Im Gegensatz dazu zeigten die Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* nur ein sehr geringes Level an VEGF-R2-mRNA-Expression (Abbildung 64).

Die Sequenzierung des Fragments ergab eine Homologie von 100% zu der entsprechenden Teilsequenz aus der NCBI-Datenbank.

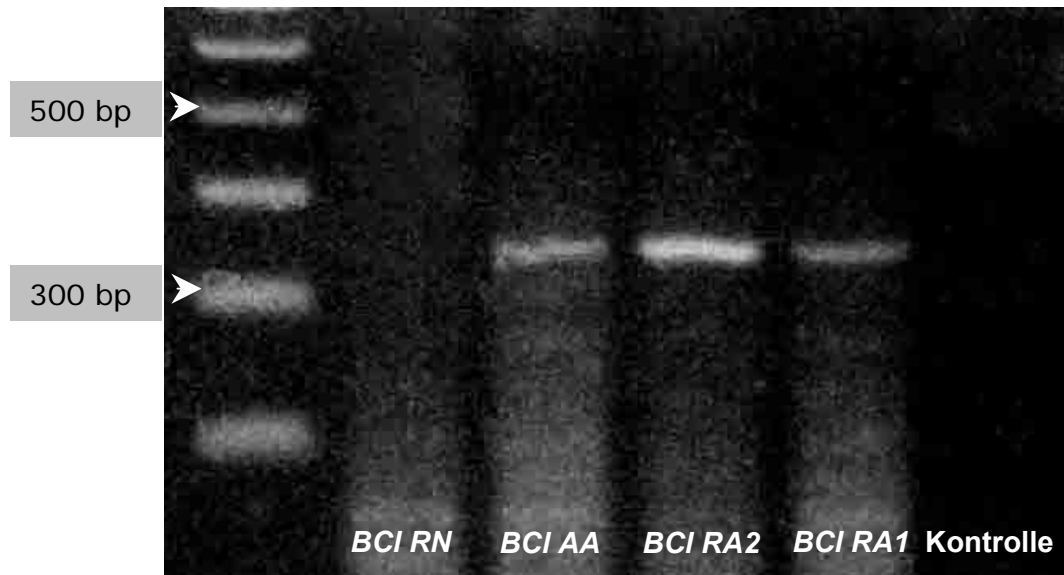


Abbildung 63

Expression des Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor-1 in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 30 Tagen *in vitro*. Während in den Kulturen *BCI AA*, *BCI RA1* und *BCI RA2* die Expression der VEGF-R1 mRNA deutlich nachweisbar war, zeigten die Zellen der Kultur *BCI RN* keine Expression dieses Rezeptors.

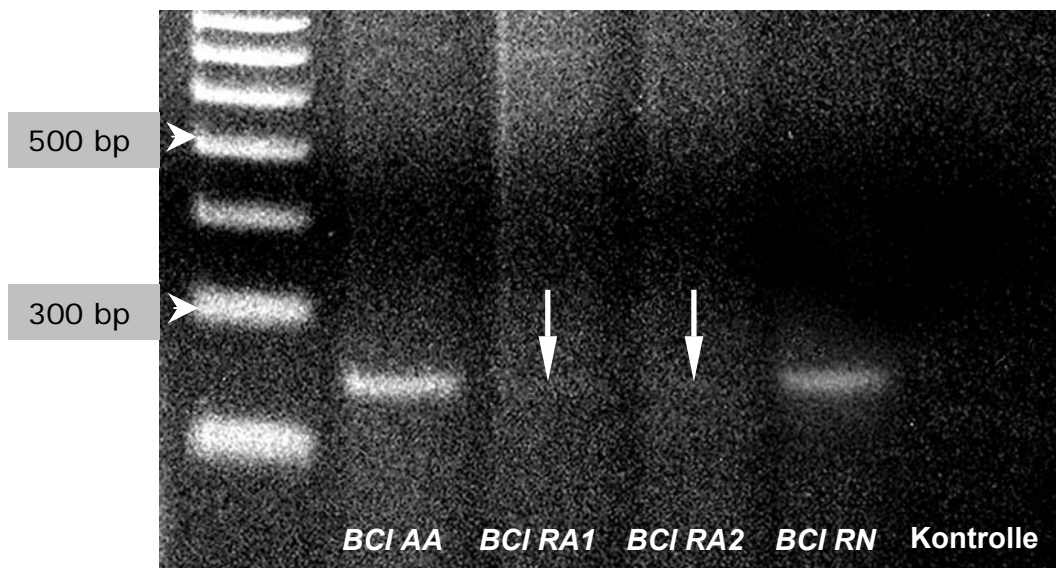


Abbildung 64

Expression des Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor-2 in Endothelzellen des bovinen Corpus luteum nach 30 Tagen *in vitro*. Die Expression der VEGF-R2 mRNA war in den Zellen der Kulturen *BCI AA* und *BCI RN* eindeutig nachweisbar. Die Kulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* zeigten eine minimale Expression der VEGF-R2-mRNA (Pfeile).