

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der Endothelzellen in vitro

Es wurden Endothelzellen verwendet, die aus dem Corpus luteum in Blüte und in Rückbildung isoliert wurden.

#### 4.1.1. Identifizierung der Endothelzellen

Verwendet wurden nur Zellkulturen, die mit allen drei verwendeten Markern positiv reagierten.

Bei Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein durch die Endothelzellen konnte eine feingranuläre, rote Fluoreszenz im Zytoplasma festgestellt werden.

Als zweiter Marker wurde das Lektin *Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin I verwendet. Bei Bindung dieses Lektins war im Kern eine intensive, im Zytoplasma eine granuläre, grüne Fluoreszenz zu sehen.

Die Lokalisation des von Willebrand-Faktors wurde mittels eines spezifischen Antikörpers untersucht. Bei positiver Antikörperbindung zeigten die Endothelzellen eine grüne, granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma (Abb. 1).

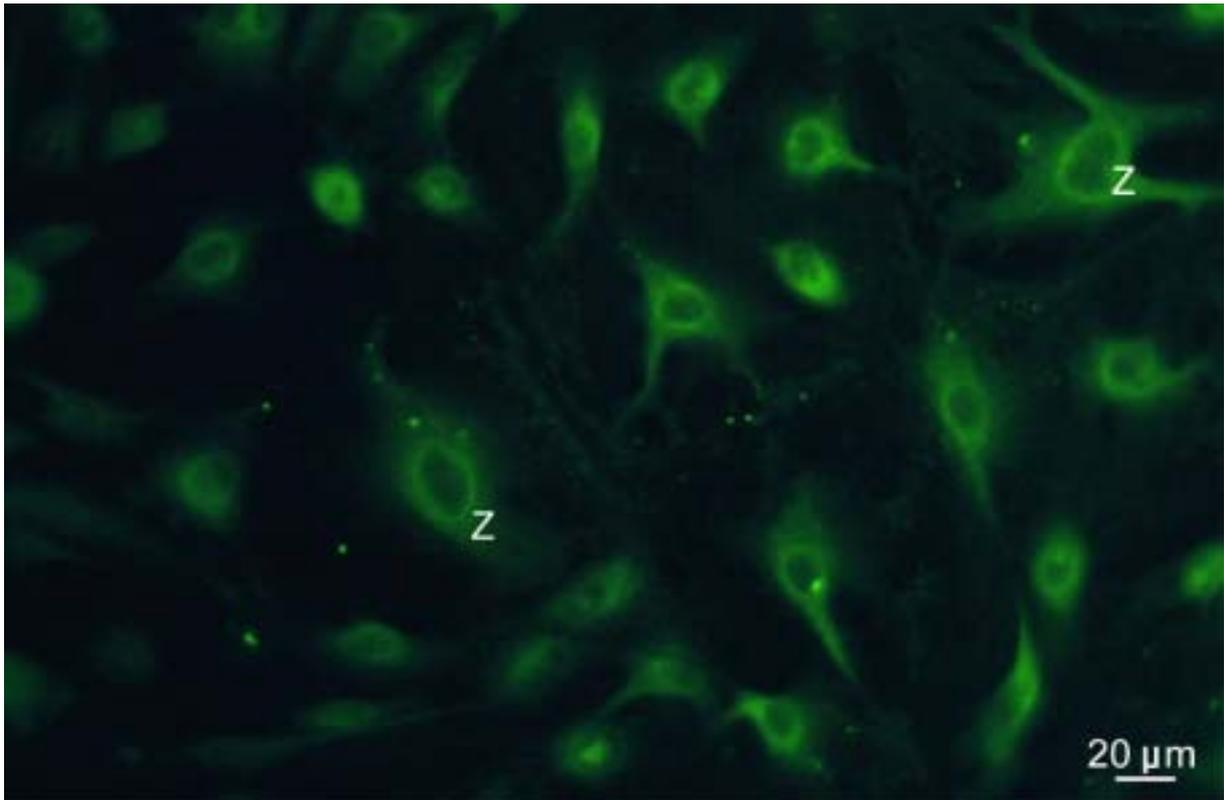


Abb. 1: Markierung von in vitro kultivierten Endothelzellen mit einem Antikörper gegen von Willebrand-Faktor. Intensive Fluoreszenz im Zytoplasma (Z). Fluoreszenzmikroskop.

#### 4.1.2. Morphologie und Wachstum der Endothelzellen

Nach Einsaat der Zellen verteilten sich diese auf der Kulturschalenoberfläche, wobei oft die Zelldichte in den Randbezirken höher als in der Mitte der Schale war. Die Zellen wiesen in diesem Stadium eine kugelige Form und einen Durchmesser von 10-20  $\mu\text{m}$  auf. Sie schwammen teils als Einzelzellen, teils in kleineren Zellverbänden frei im Kulturmedium (Abb. 2).

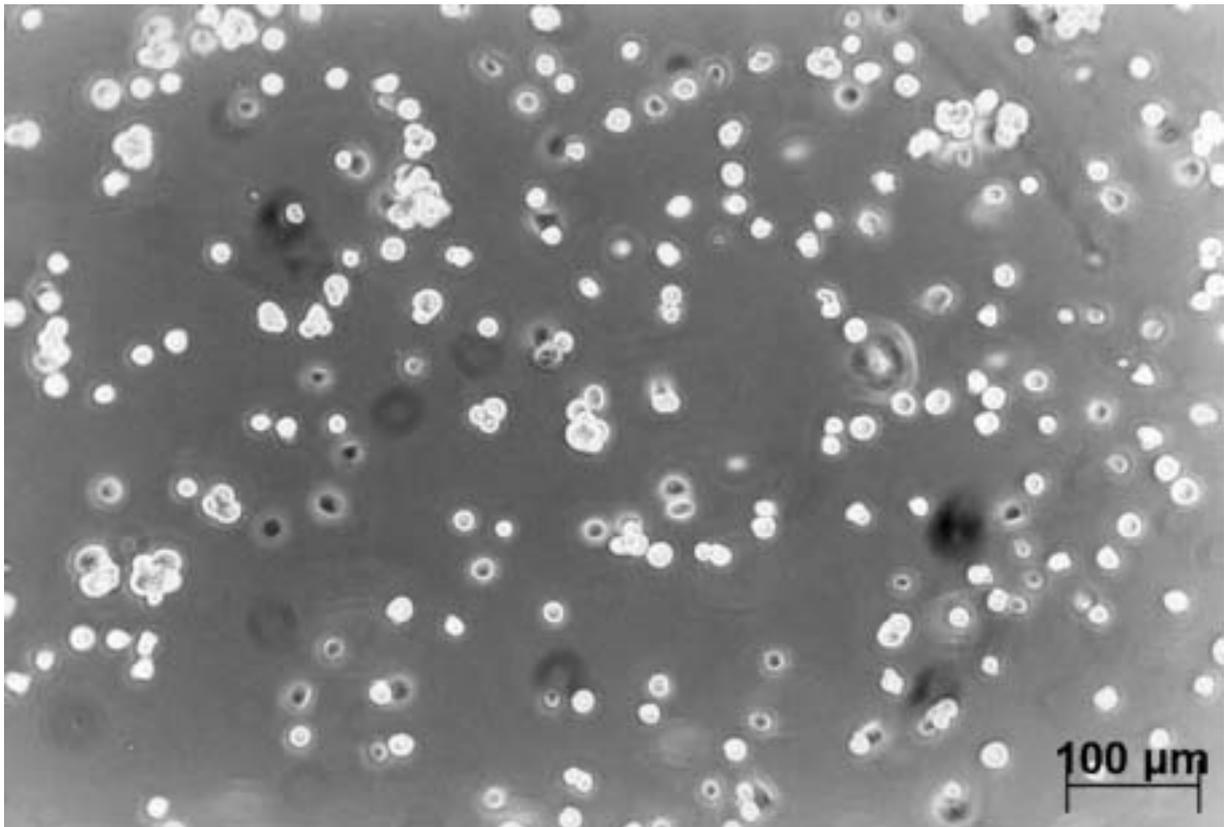


Abb. 2: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, unmittelbar nach der Aussaat. Runde, nicht adhärenente Zellen. Phasenkontrastmikroskop.

Nach 20 Minuten konnte bei ungefähr 20 % der Zellen eine Adhärenz am Schalenboden festgestellt werden. Diese Zellen wirkten abgeflacht, ihr Zytoplasma breitete sich zu den Seiten hin aus und wies einen unregelmäßigen Rand auf (Abb. 3).

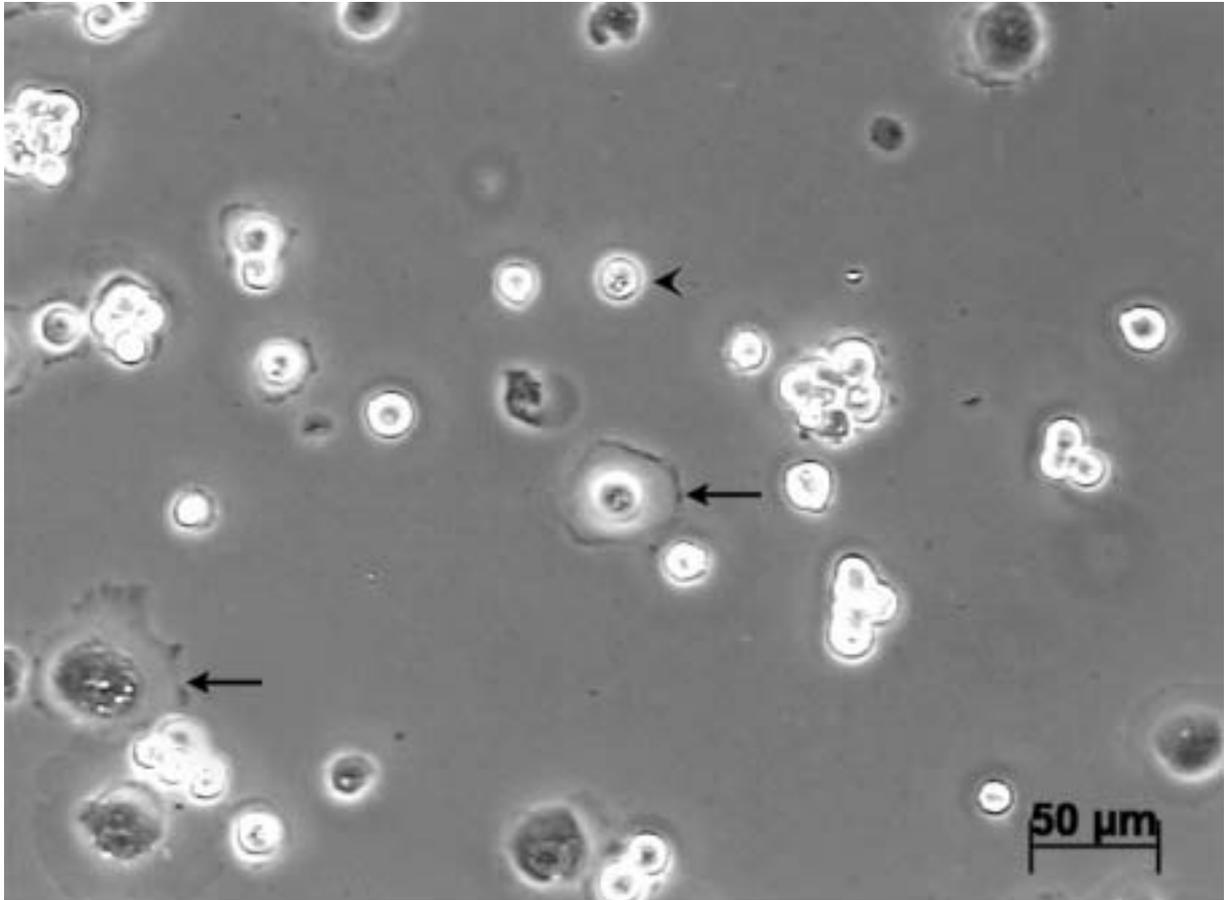


Abb. 3: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. 20 Minuten nach der Aussaat. Runde, nicht adhärenente Zellen (◄) und abgeflachte, adhärenente Zellen (←). Phasenkontrastmikroskop.

Eine Stunde nach der Aussaat waren nur noch etwa 50 % der Zellen frei im Medium beweglich, die restlichen Zellen hatten sich am Boden der Kulturschalen festgesetzt (Abb. 4).

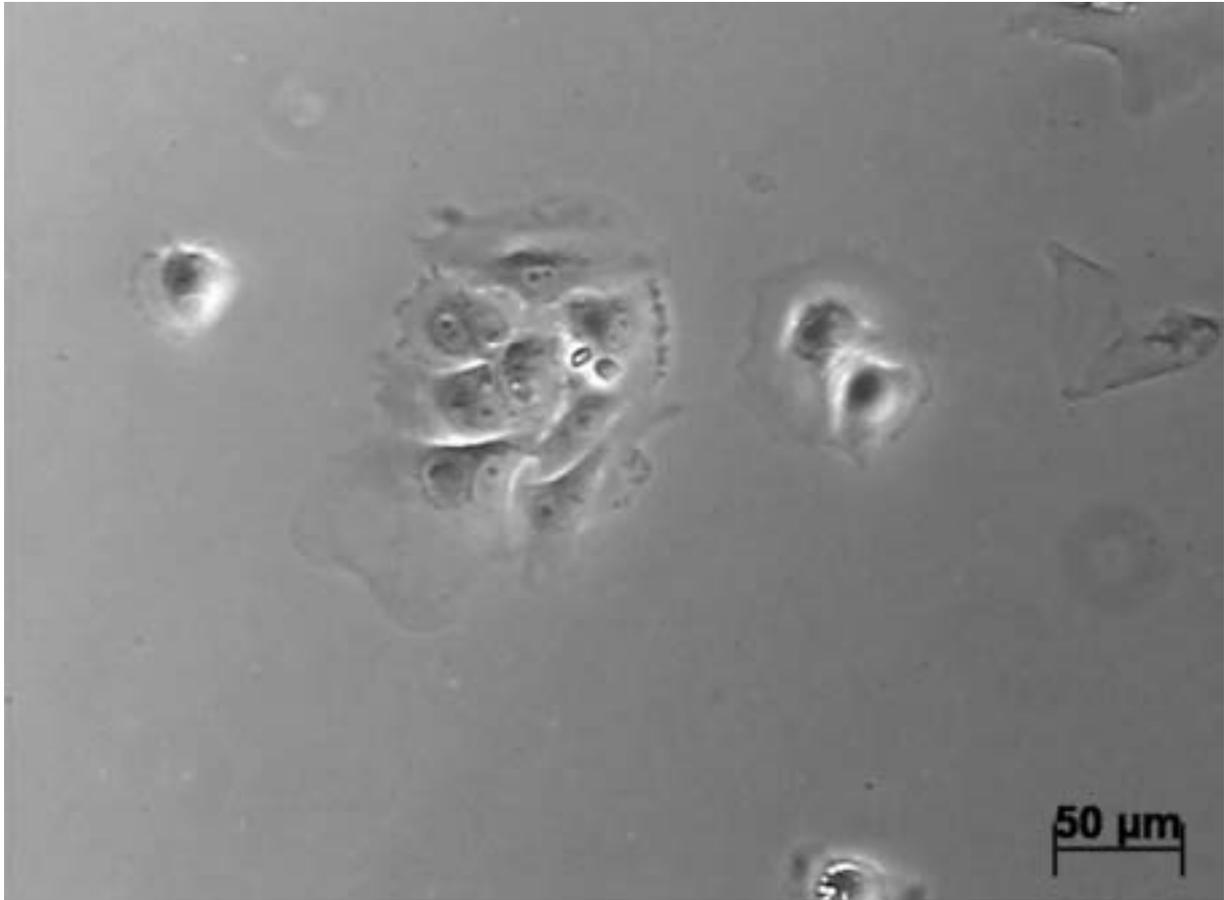


Abb. 4: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. 1 Stunde nach der Aussaat. Adhärenz Zellen. Phasenkontrastmikroskop.

24 Stunden nach der Aussaat waren fast alle Zellen adhärenent. Nur noch wenige schwammen frei im Medium. In den äußeren Bereichen der Kulturschalen lagen die Zellen oftmals dichter als in den inneren. Lagen die Zellen näher beieinander, traten, wie in Abb. 5 dargestellt, drei typische Zellformen auf.

- a) Zum einen waren noch rundliche Zellen ohne Ausläufer zu sehen; teilweise konnten diese auch mehrere, kurze Fortsätze aufweisen.
- b) Außerdem gab es Zellen, die einen eher dreieckig bis polygonalen Zellkörper mit meist nur einem ausgeprägten Ausläufer besaßen, dessen Länge bis zum zweifachen des Durchmessers des Zelleibes betrug und am Ende plattenförmig verbreitert war. Diese Zellen maßen im Bereich des Zelleibes 30-50  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und erreichten mit ihren Fortsätzen eine Länge von bis zu 150  $\mu\text{m}$ .
- c) Schließlich nahmen Zellen auch eine spindelförmige, einer stark in die Länge gezogenen Raute ähnelnde Form an. Die langen Enden dieser „Raute“ waren wiederum leicht verbreitert. Diese Zellen maßen zwischen 80 und 120  $\mu\text{m}$  in der Länge.

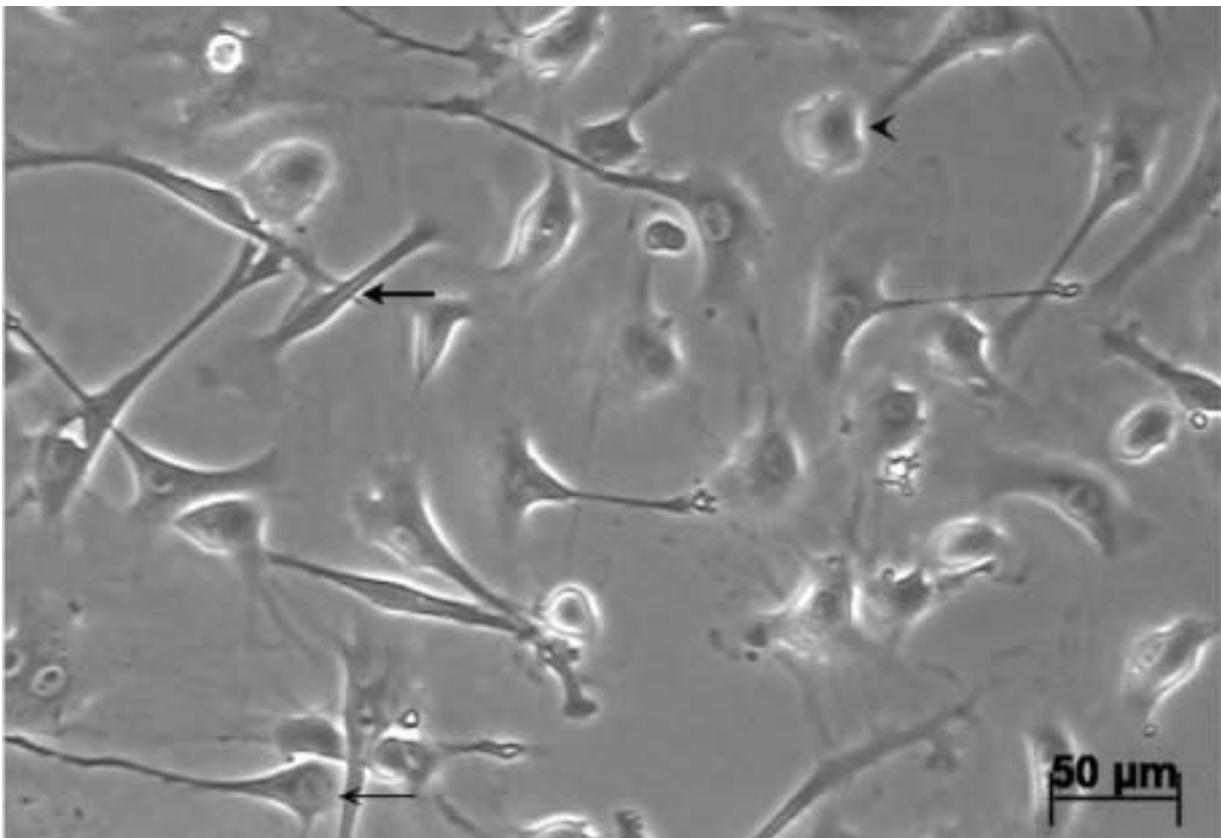


Abb. 5: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 24 Stunden nach der Aussaat. Adhärenent Zellen weisen unterschiedliche Formen auf: a) rundliche Zellen ( $\blacktriangleleft$ ), b) Zellen mit langen Ausläufern ( $\blackleftarrow$ ), c) spindelförmige Zellen ( $\blackleftarrow$ ). Phasenkontrastmikroskop.

Zellen der inneren Bereiche der Zellkulturschalen, in denen die Zellen nicht so dicht lagen, bildeten lange Ausläufer (bis zu 250  $\mu\text{m}$ ), die an den Enden plattenähnlich verbreitert waren. Insgesamt konnten solche Zellen über 300  $\mu\text{m}$  lang werden (Abb 6).

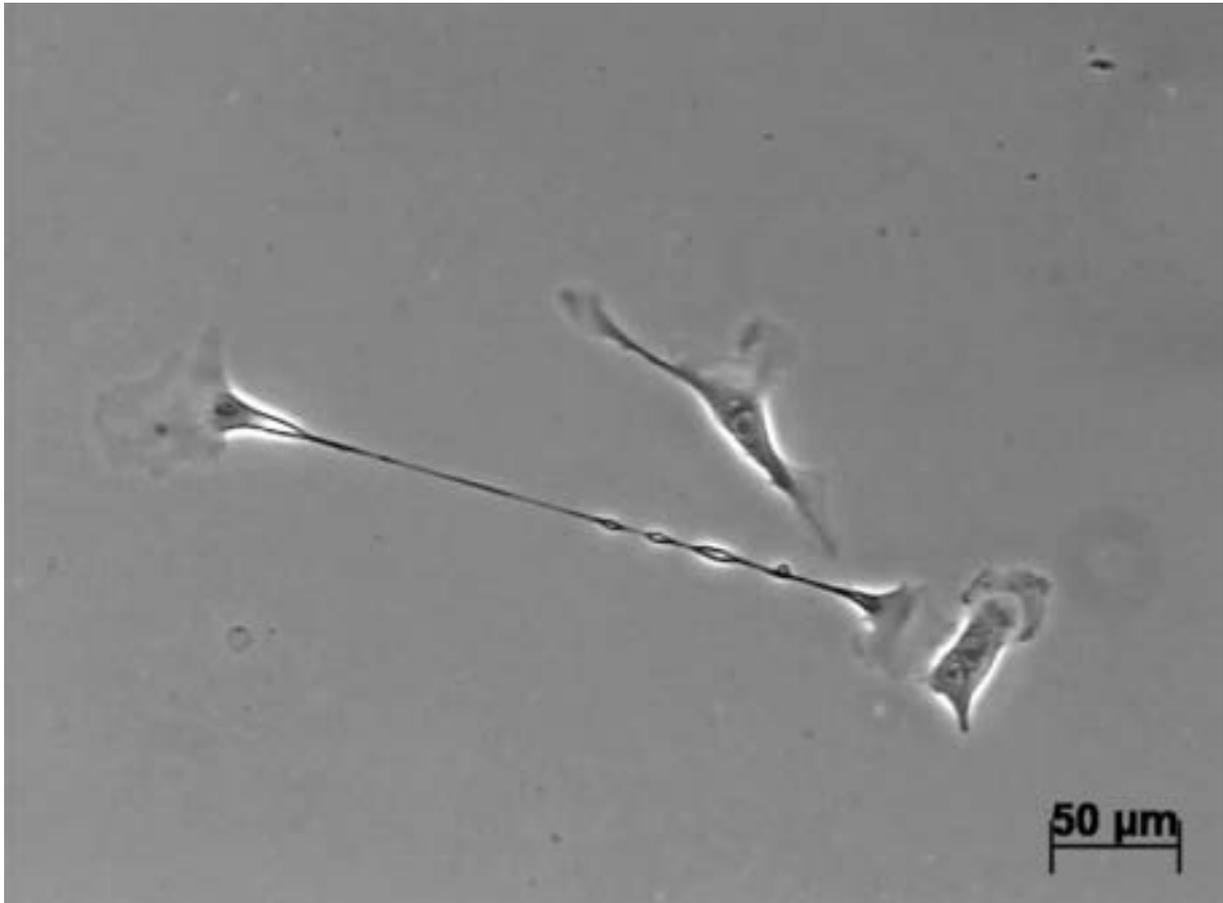


Abb. 6: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 24 Stunden nach der Aussaat. In Bereichen mit geringer Zelldichte weisen die Endothelzellen lange Ausläufer auf. Phasenkontrastmikroskop.

Die beschriebenen Ausläufer traten meist mit anderen Zellen in Verbindung, wobei sie allerdings oft näher gelegene Zellen nicht berührten, sondern sich, wie in Abb. 7 zu sehen, in Richtung weiter entfernt gelegener Zellen streckten.

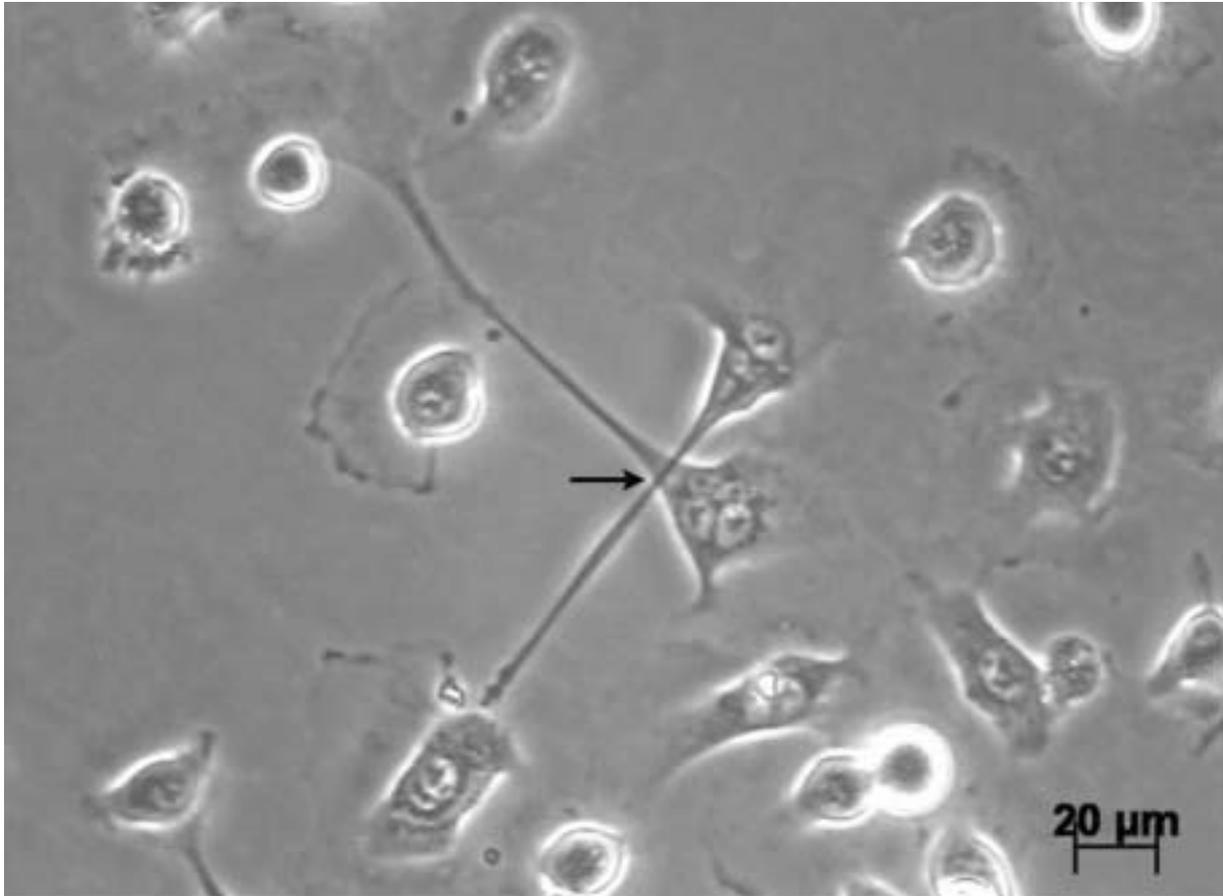


Abb. 7: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte. 24 Stunden nach der Aussaat. Sich überkreuzende Ausläufer zwischen Zellen (  $\longrightarrow$  ). Phasenkontrastmikroskop.

In den Zellen waren die Zellkerne deutlich zu erkennen, desgleichen mehrere Nukleoli. Die Zellen hatten 24 Stunden nach der Aussaat schon mit der Teilung begonnen und Mitosen waren gut sichtbar (Abb. 8).

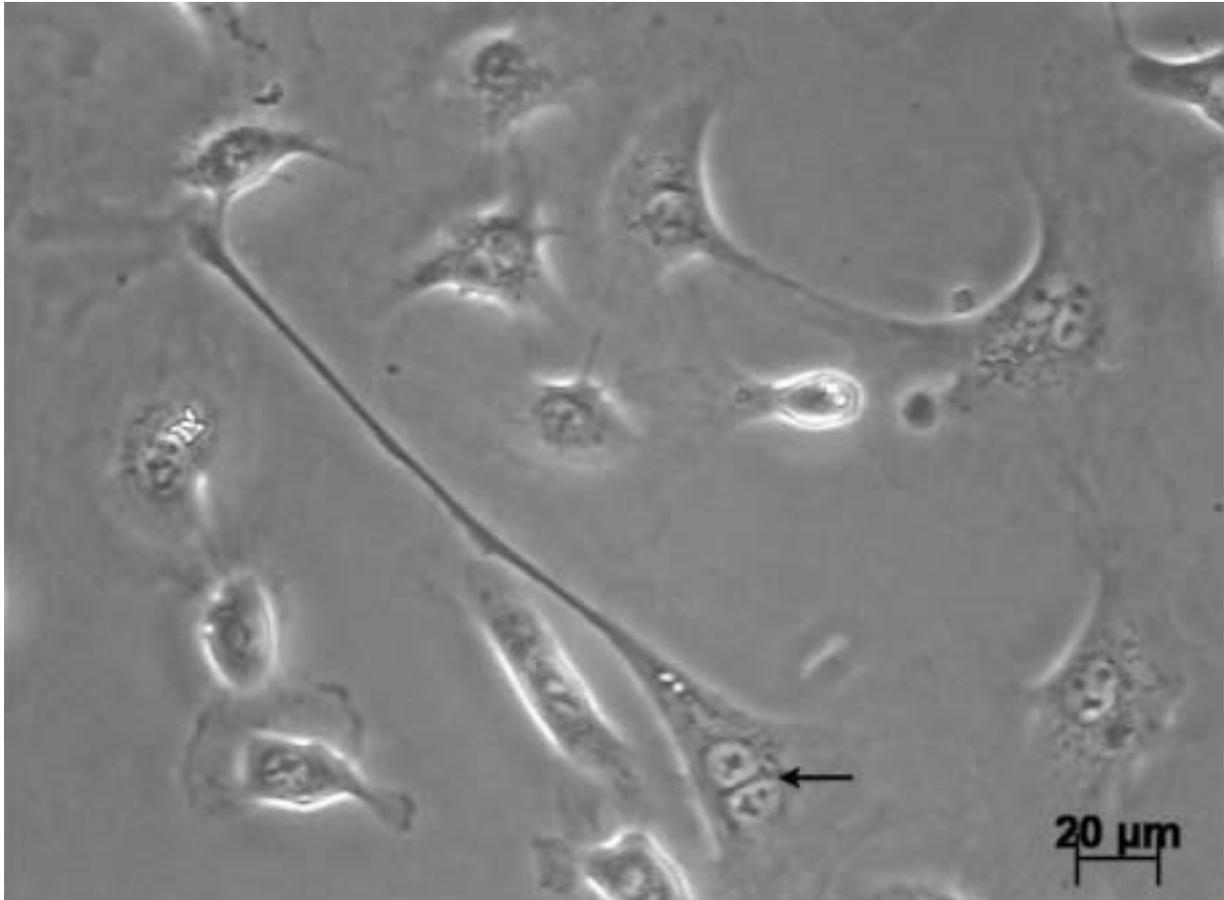


Abb. 8: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte. 24 Stunden nach der Aussaat. Mitose (←). Phasenkontrastmikroskop.

Wurden die Zellen frisch aufgetaut, so erfolgte nach 24 Stunden ein Wechsel des Nährmediums und damit die Entfernung der noch nicht adhärenen Zellen.

Die Zellen wiesen in ihrem Erscheinungsbild die bereits erwähnten Formen auf, teilweise wurden auch Zellen mit sehr unregelmäßig gestaltetem Zelleib und mehreren, unterschiedlich langen Ausläufern beobachtet. In der Mehrzahl der Kerne waren zwei oder mehr Nukleoli zu erkennen. Mitosen traten regelmäßig auf (Abb. 9).

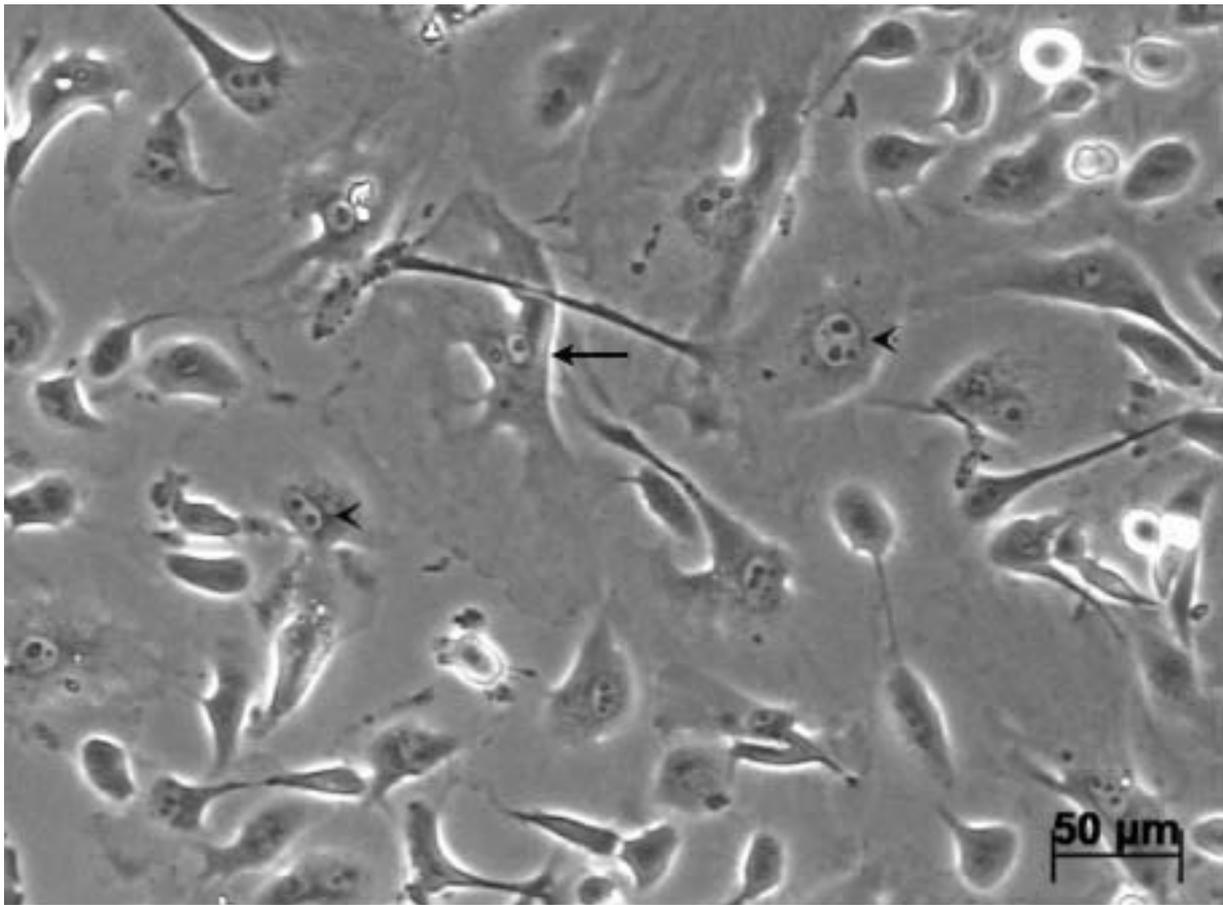


Abb. 9: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte. 48 Stunden nach der Aussaat. Zellen mit Mitosen ( ← ) und deutlich sichtbaren Nukleoli ( ◄ ). Phasenkontrastmikroskop.

Im Verlauf der nächsten 5-10 Tage kam es zur massiven Vermehrung der Zellen. Bei einer Einsaat von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kulturschale war innerhalb einer Woche fast die gesamte Fläche der Kulturschale mit Endothelzellen bedeckt, wobei sich die Ausläufer in dem Maße zurückbildeten, in dem sich die Zellen zunehmend enger aneinander lagerten. Schließlich nahmen die Zellen eine polygonale Form an und bildeten so ein Monolayer aus, das aufgrund seiner Morphologie als „Kopfsteinpflaster“ (englisch: Cobblestone) bezeichnet wird. Konnten anfangs noch zellfreie Räume festgestellt werden, erreichten die Zellen je nach zuvor ausgesäter Zelldichte innerhalb von ein bis zwei Wochen das Stadium der Konfluenz (Abb. 10).

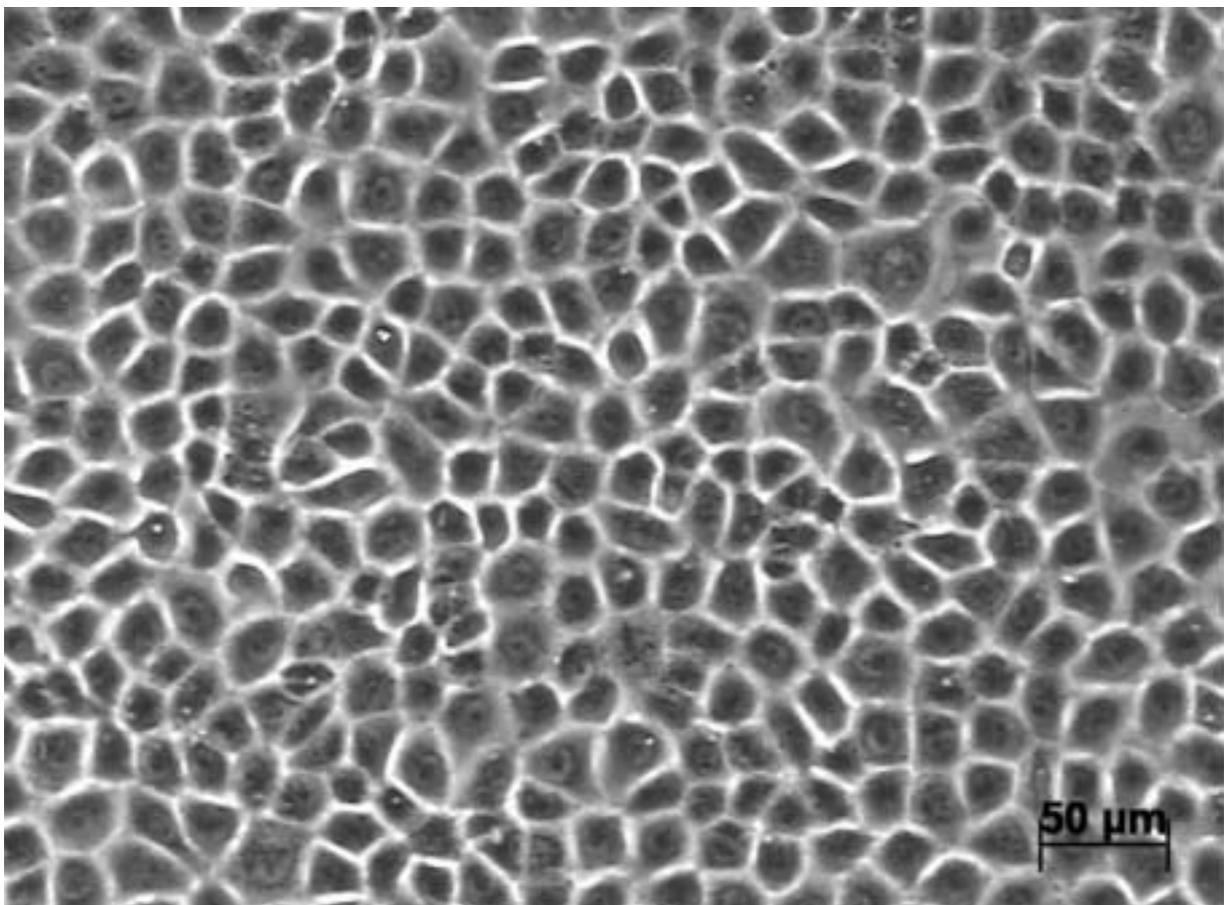


Abb. 10: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte, 2 Wochen in Kultur. Dichtgepackte Zellen im sogenannten Kopfsteinpflastermuster. Phasenkontrastmikroskop.

Wurden die Zellen in 6-Loch-Platten vier oder mehr Wochen in der Kultur belassen, blieb die Konfluenz bestehen. Einzelne Zellen rundeten sich ab, um wie in Abb. 11 zu sehen auf der Oberfläche des Monolayers kleine, kugelige Häufchen zu bilden. Mit diesem Schritt ging meist eine Formveränderung der Endothelzellen einher, die morphologisch den Beginn der Angiogenese anzeigte.

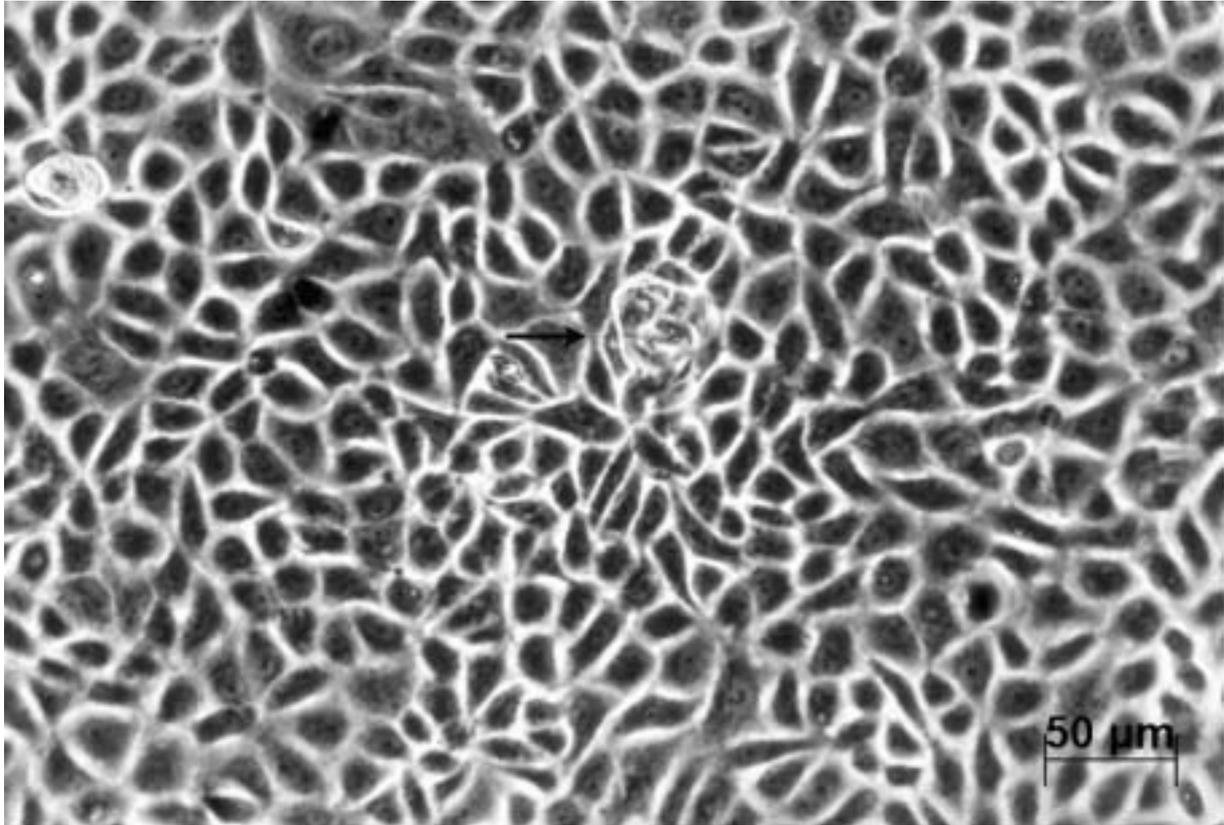


Abb. 11: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte, 6 Wochen in Kultur. Abkuglung von Zellen und Bildung von Zellhäufchen über dem Monolayer (→). Phasenkontrastmikroskop.

Kulturen, die von Anfang an mit dem Selektivmedium versorgt wurden, zeigten eine stärkere Vermehrung als Kulturen, die nur das Nährmedium DMEM<sup>+</sup> erhielten. Letztere wiesen bei Konfluenz eine durchschnittlich um circa ein Drittel geringere Zellzahl, dafür jedoch Zellen mit größerem Durchmesser auf.

Wurden unter  $1 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät, bestand zwischen den einzelnen Zellen ein sehr großer Abstand und die beschriebenen Zellformen traten nicht auf. Stattdessen breitete sich das Zytoplasma der Zelle verstärkt zur Seite hin aus. Innerhalb der Zellen traten Strukturen auf, die sich von der Mitte her in die Peripherie bäumchenartig verzweigten. Obwohl in diesen Zellen einzelne Mitosen zu sehen waren, konnte auch nach einigen Wochen in Kultur weder die Bildung eines Kopfsteinpflastermusters noch Konfluenz der Zellen erreicht werden. Solche Zellkulturen wurden für weitere Untersuchungen nicht verwendet (Abb. 12).

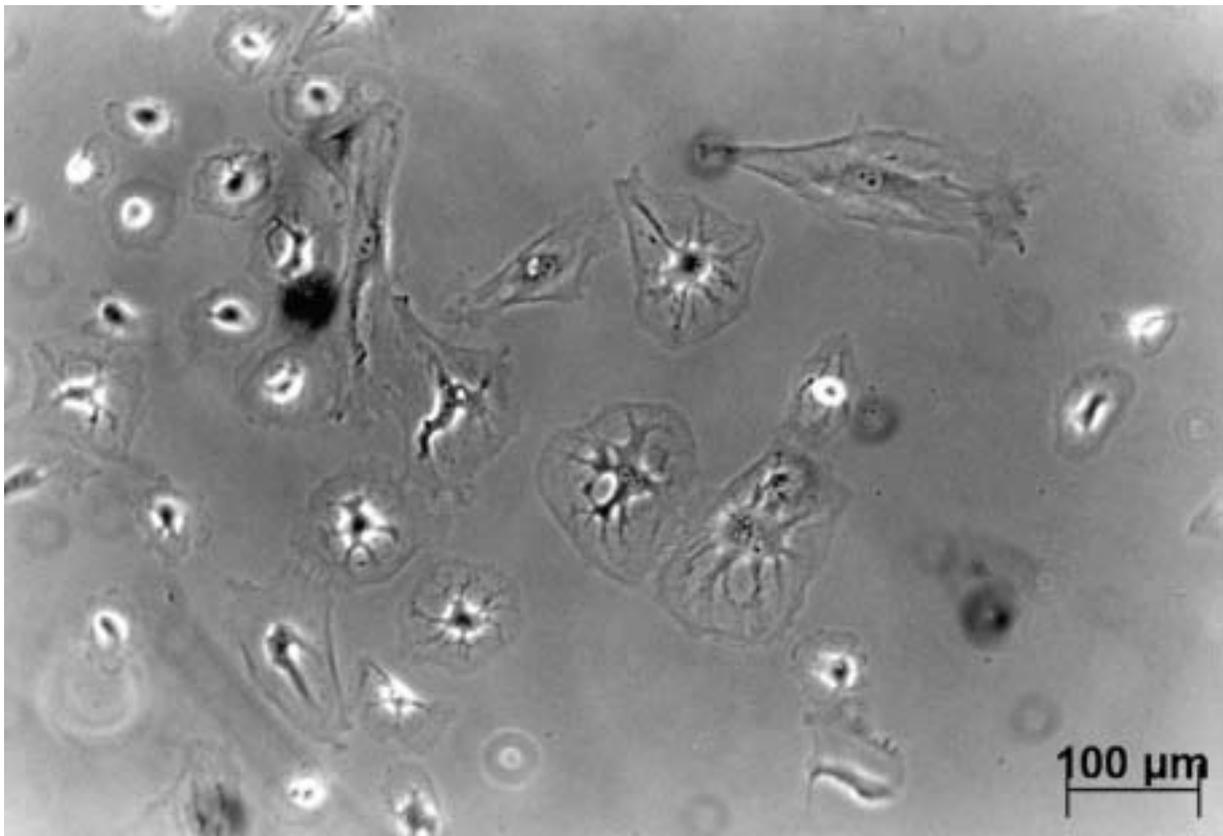


Abb. 12: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte, 48 Stunden nach Aussaat in geringer Dichte. Die Zellen weisen ein stark ausgebreitetes Zytoplasma mit bäumchenartig verzweigten Strukturen auf. Phasenkontrastmikroskop.

### 4.1.3. Angiogenese in vitro

Durch Inkubation der Zellkulturen in dem angiogene Faktoren enthaltenden Selektivmedium wurde eine Veränderung des Wachstums bewirkt, die in der Ausbildung länglicher, gefäßähnlicher Strukturen resultierte und als in vitro-Angiogenese bezeichnet wird. Während dieses Vorgangs waren alle Phasen der Angiogenese, die Migration und Proliferation der Endothelzellen sowie die Ausbildung von Strängen zu beobachten. In einigen Kulturen konnte nach mehreren Monaten eine Rückbildung der endothelialen Strukturen beobachtet werden.

Es zeigte sich, dass die Zeitspanne zwischen der Aussaat der Zellen und dem Eintreten der in vitro-Angiogenese von verschiedenen Faktoren abhängig war.

Wurden Endothelzellen gesplittet, die seit mehr als einem Monat in Kultur waren und bereits seit mehr als zwei Wochen mit der in vitro-Angiogenese begonnen hatten, dann zeigten die neu ausgesäten Zellen innerhalb kürzester Zeit wieder in vitro-Angiogenese. Wurden Kulturen, die schon länger als vier Monate nicht mehr geteilt worden waren und in dieser Zeit eine ausgeprägte in vitro-Angiogenese gezeigt hatten, gesplittet, bildeten die neuen Passagen zwar ein konfluentes Kopfsteinpflastermuster, blieben aber mehrere Wochen bis Monate in diesem Stadium ohne in vitro-Angiogenese durchzuführen.

Für die Beobachtung der Angiogenese wurden 24-Loch-Platten gewählt, die mit Glasplättchen versehen wurden. Die in vitro-Angiogenese konnte am häufigsten in den Randbereichen der Kulturschalen beobachtet werden. Sie trat in Kulturen, die keine Glasplättchen enthielten, früher auf als in solchen, die mit Plättchen versehen waren.

Eine Übersicht über den Beginn der Angiogenese in den Kulturen gibt die folgende Tabelle. Bewertet wurde jeweils der Tag, an dem in mindestens 50 % der untersuchten Kulturen erstmals deutlich netzartige Strukturen zu sehen waren.

Tabelle 4: Übersicht über die Dauer bis zur Ausbildung endothelialer Strukturen in den Endothelzellkulturen aus dem Corpus luteum in Rückbildung und in Blüte.

<b>Kultur</b>	<b>Passage</b>	<b>Tage zw. Aussaat und Ausbildung netzartiger Strukturen</b>
Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte	10	26
	11	64 (vorhergehende Passage 4,5 Monate in Kultur)
Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung	7	19
	8	70 (vorhergehende Passage 5 Monate in Kultur)
	10	15
	11	13
	11	50 (vorhergehende Passage 5,5 Monate in Kultur)

#### 4.1.3.1. Formveränderung der Endothelzellen

Initial begannen sich einzelne Zellen im Monolayer zu strecken und längliche Fortsätze auszubilden. Die Zellen nahmen eine spindelförmige, in die Länge gezogene Form an. Diese Veränderungen konnten schon eine Woche nach Erreichen der Konfluenz beobachtet werden (Abb. 13).

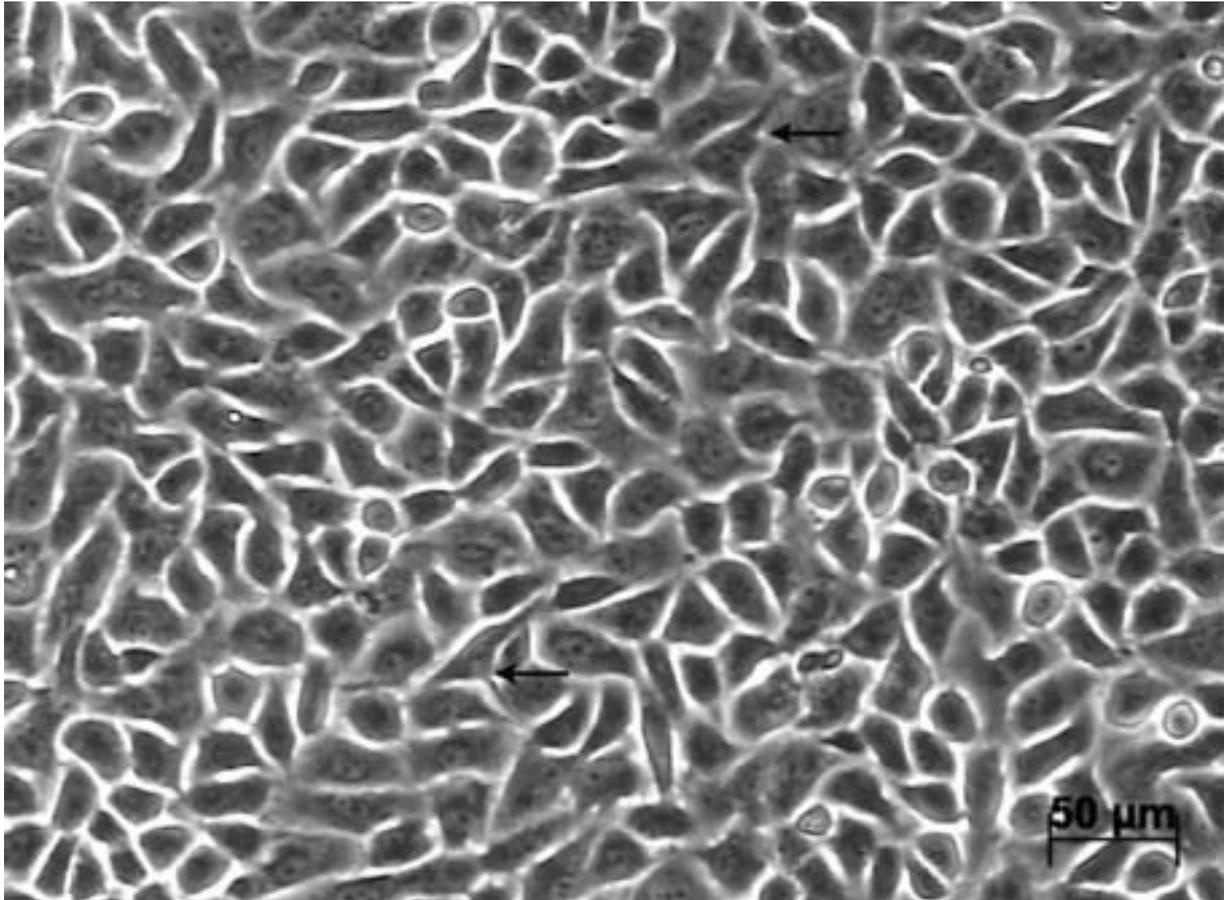


Abb. 13: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 4 Wochen in Kultur. Dicht gepackte Zellen im Kopfsteinpflastermuster. Vereinzelt Ausbildung länglicher Fortsätze (←). Phasenkontrastmikroskop.

#### 4.1.3.2. Aneinanderreihung der Endothelzellen und Ringbildung

Bereits einige Tage nach Auftreten der ersten spindelförmigen Zellen kam es stellenweise zur Aneinanderreihung von zwei oder mehr dieser länglichen Zellen, wobei deren Zellkörper seitlich versetzt aneinander zu liegen kamen (Abb. 14).

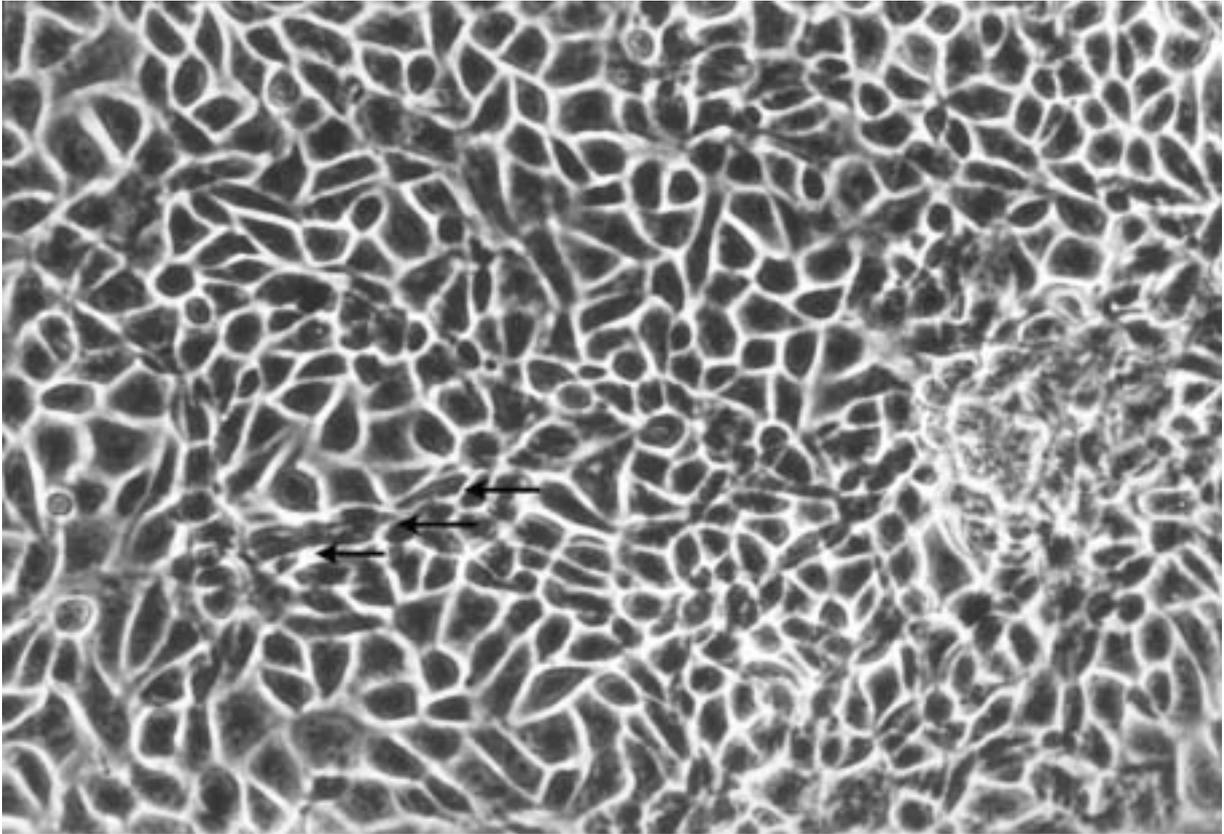


Abb. 14: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte, 5 Wochen in Kultur. Längliche Zellen reihen sich aneinander (←). Phasenkontrastmikroskop.

Innerhalb der Zellkulturen im Kopfsteinpflastermuster bildeten sich kleine ringförmige oder auch polyedrische Strukturen heraus. Diese Ringe bestanden aus einzelnen Zellen, die nahe beieinander lagen (Abb. 15) oder dünne, langgezogene Fortsätze zwischen sich ausbildeten (Abb. 16).

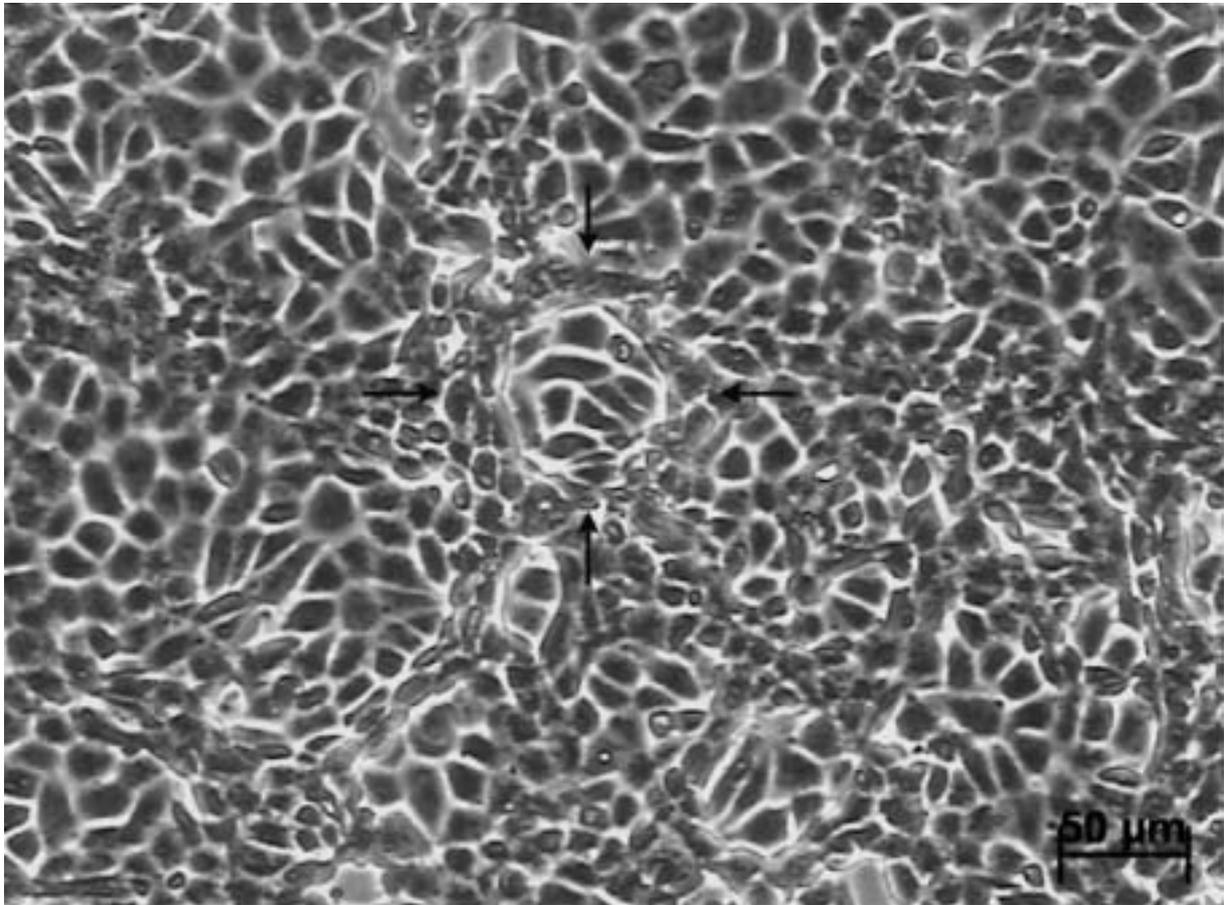


Abb. 15: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte, 10 Wochen in Kultur. Durch Umformung und Umordnung der Zellen entstehen ringförmige Strukturen (←→) im Kopfsteinpflastermuster. Phasenkontrastmikroskop.

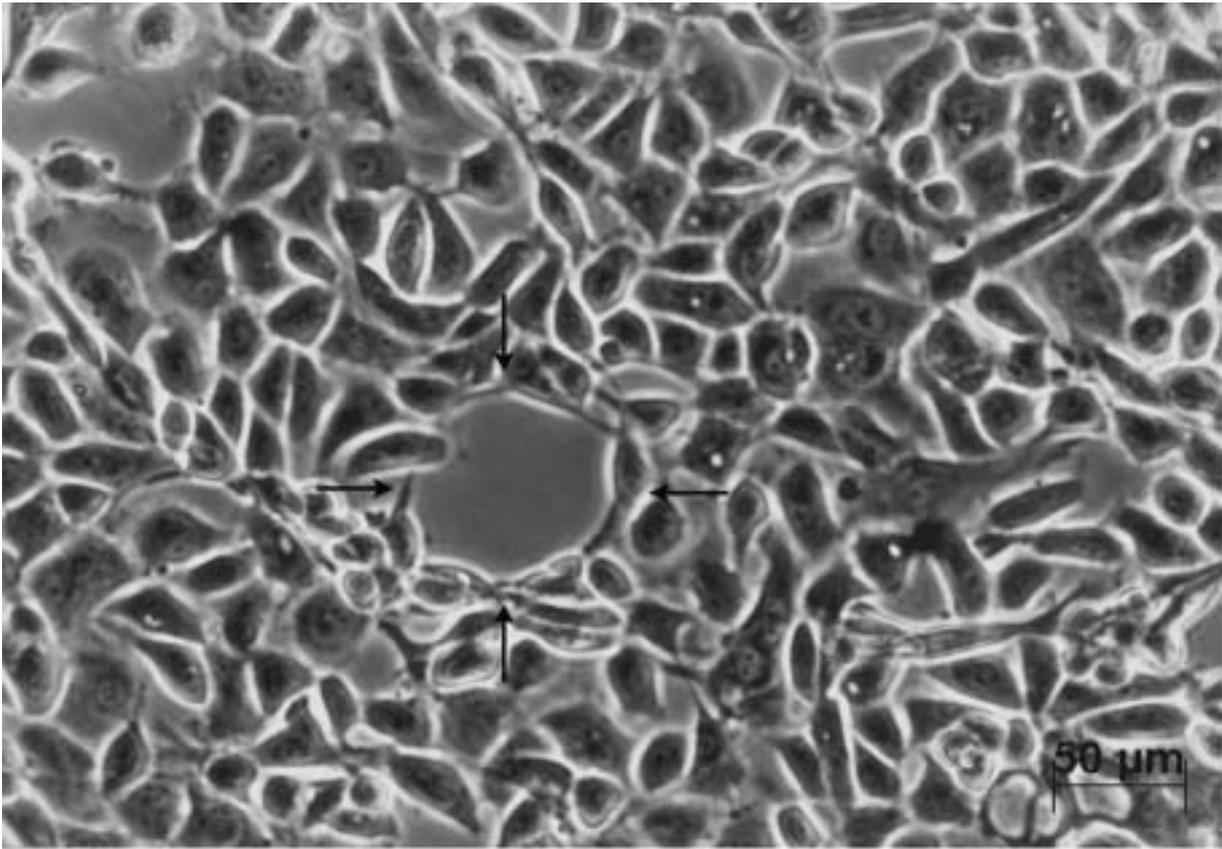


Abb. 16: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 9 Wochen in Kultur. Einige Zellen ordnen sich zu einer ringförmigen Struktur um (←). Die Zellen sind teilweise durch Fortsätze verbunden. Phasenkontrastmikroskop.

#### 4.1.3.3. Vernetzung der Endothelzellen

Die Zellen, welche die oben beschriebenen ringförmigen Strukturen bildeten, streckten sich immer mehr in die Länge. Zwischen ihnen entstand im Folgenden eine enge Verbindung, so dass teilweise die Grenzen zwischen den einzelnen Zellen lichtmikroskopisch nicht mehr zu erkennen waren. Die Strukturen traten damit deutlich als Ringe oder Vielecke hervor. Anfänglich waren diese Strukturen nur vereinzelt zu sehen. Innerhalb oft nur eines Tages entstanden aber so viele dieser Ringe, dass sich ein netz- oder wabenartiges Muster herauskristallisierte. Diese Phase trat 2-3 Wochen nach Erreichen der Konfluenz ein.

Bei einigen Kulturen blieb ein Großteil der Zellen im Kopfsteinpflastermuster lange Zeit vollständig und relativ dicht gepackt erhalten und bildete gleichsam eine Grundlage unter dem sich darüber ausbreitenden Netzwerk (Abb. 17). Aufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop, die beide Strukturen gleichzeitig scharf abbildeten, waren aufgrund der unterschiedlichen photographischen Ebenen ab diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich.

Bei anderen Kulturen kam es gleich zu Beginn zu einer Ausdünnung des Kopfsteinpflastermusters, so dass zwischen den kreisförmigen Strukturen vermehrt zellfreie Bereiche zu sehen waren. Manchmal befanden sich innerhalb der zellulären Ringstrukturen nur noch ein oder zwei einzelne Zellen oder es bildeten sich vollkommen zellfreie Bereiche aus (Abb. 18, 19).

Beide beschriebenen Formen konnten sowohl bei Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte als auch bei solchen aus dem Corpus luteum in Rückbildung beobachtet werden. Ein Zusammenhang mit der Passage war nicht erkennbar.

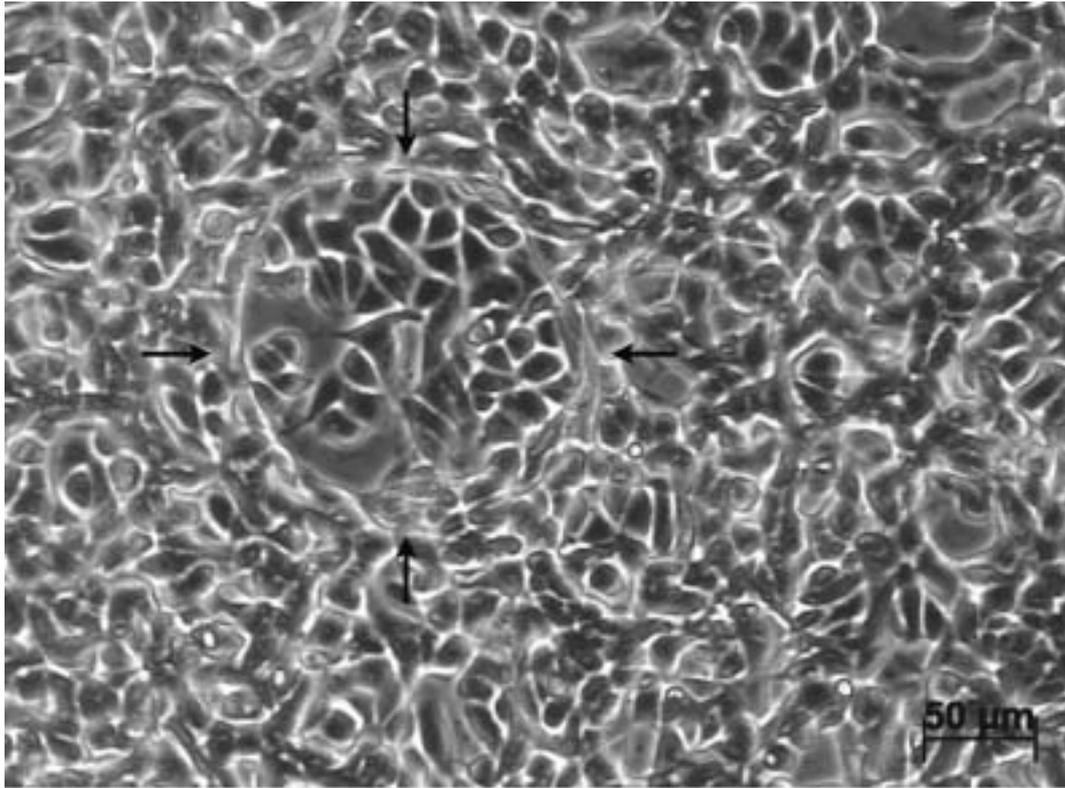


Abb. 17: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte, 13 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Über dem Monolayer verbinden sich Zellen zu ringartigen endothelialen Strukturen (←→). Phasenkontrastmikroskop.

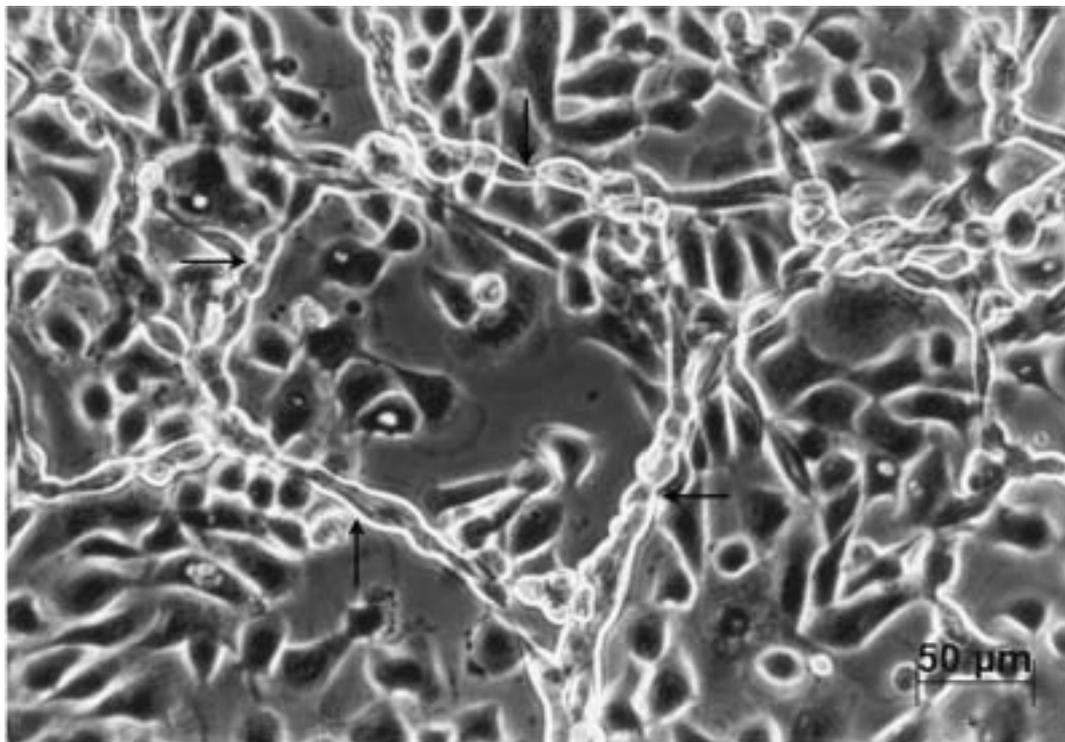


Abb. 18: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 17 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Über dem subkonfluenten Monolayer bilden aneinandergereihte Zellen ein endotheliales Maschenwerk (←→). Phasenkontrastmikroskop.

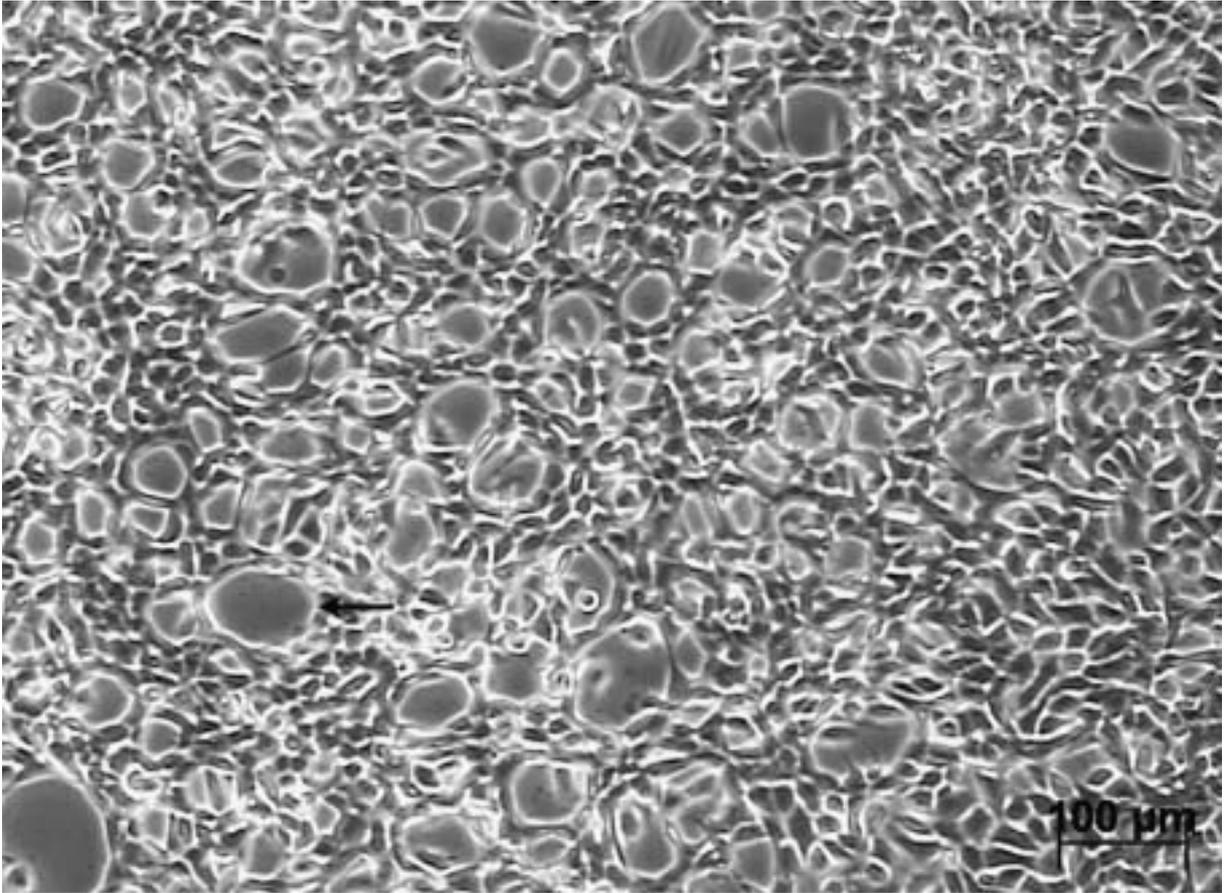


Abb. 19: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte, 13 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Die in kleinen Ringen angeordneten Zellen umschließen zellfreie Bereiche (←). Phasenkontrastmikroskop.

Wie in den Abb. 20, 21 und 22 gezeigt, bildeten, von den ringförmigen Strukturen ausgehend, eine oder auch mehrere Zellen einen langen Zellspross aus, der sich quer durch den Ring auf die andere Seite hin erstreckte und damit zur Ausbildung neuer Maschen des Netzwerkes führte.

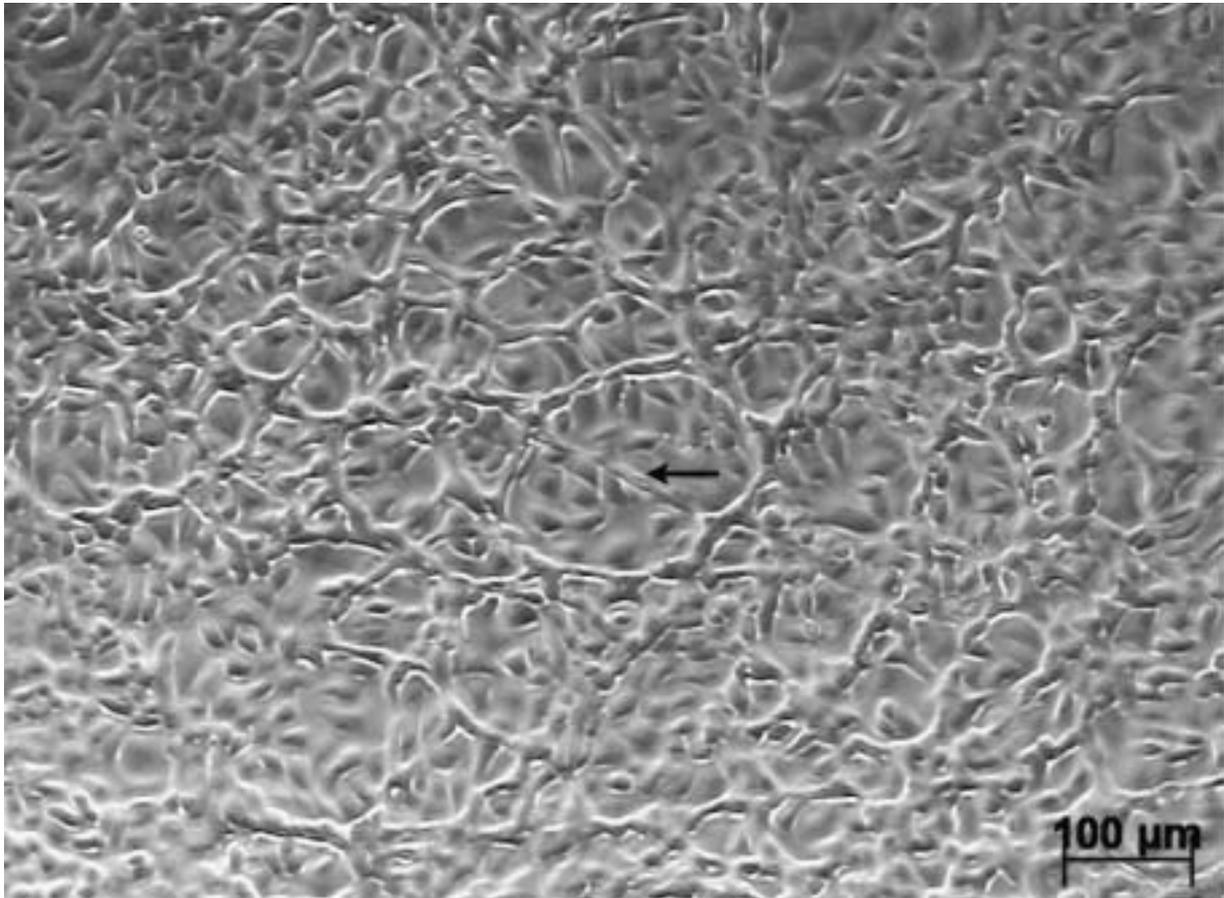


Abb. 20: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 13 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Große Maschen der endothelialen Strukturen werden durch Ausbildung von Zellsprossen ( ← ) geteilt. Phasenkontrastmikroskop.

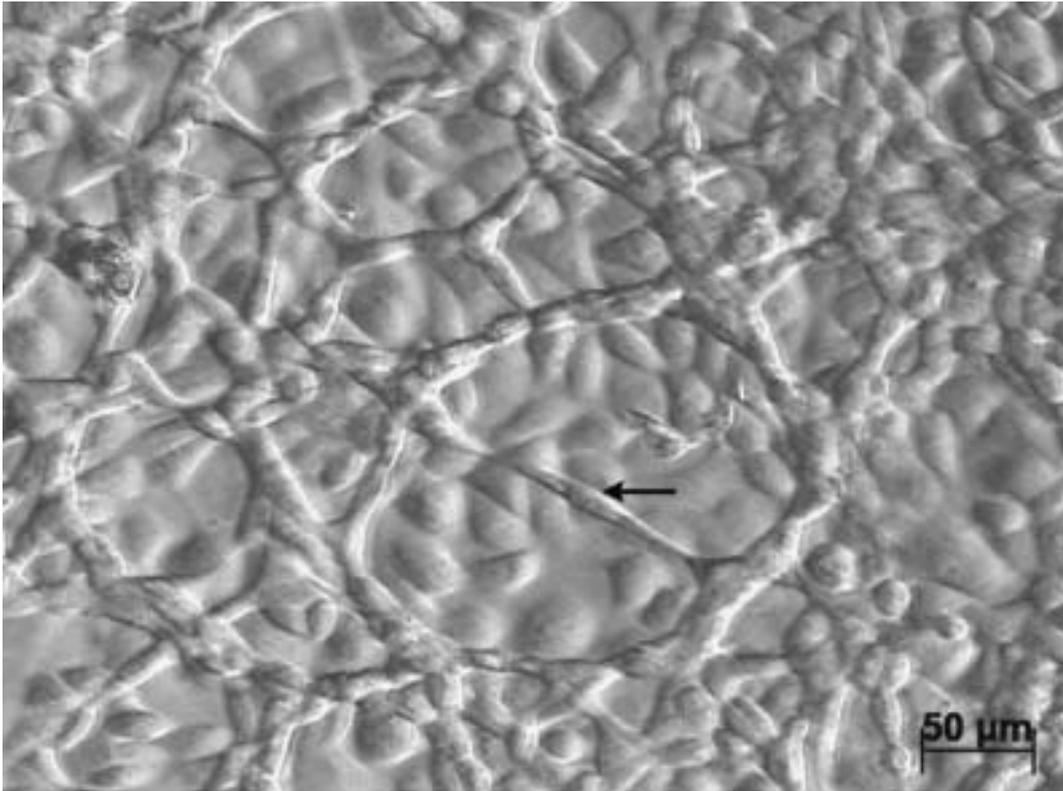


Abb. 21: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 13 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Zellspross ( ← ). Ausschnitt aus Abb. 20. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

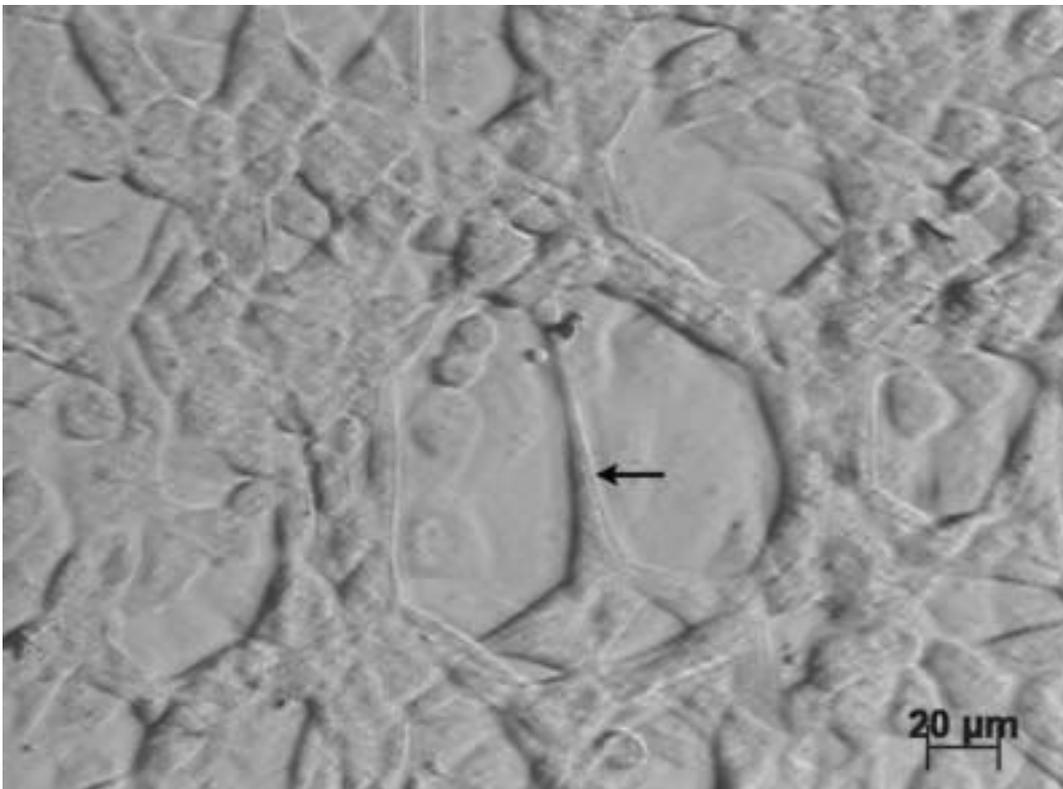


Abb. 22: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 4,5 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Eine endotheliale, ringförmige Struktur wird durch Ausbildung eines Zellsprosses ( ← ) geteilt. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

Bestand der neue Spross aus mehreren Zellen, dann waren diese gut voneinander abgrenzbar und lagen langgestreckt hintereinander. Die Anordnung der Zellen erweckte den Eindruck eines Speeres, der auf die andere Seite hin zielt (Abb. 23, 24, 25).

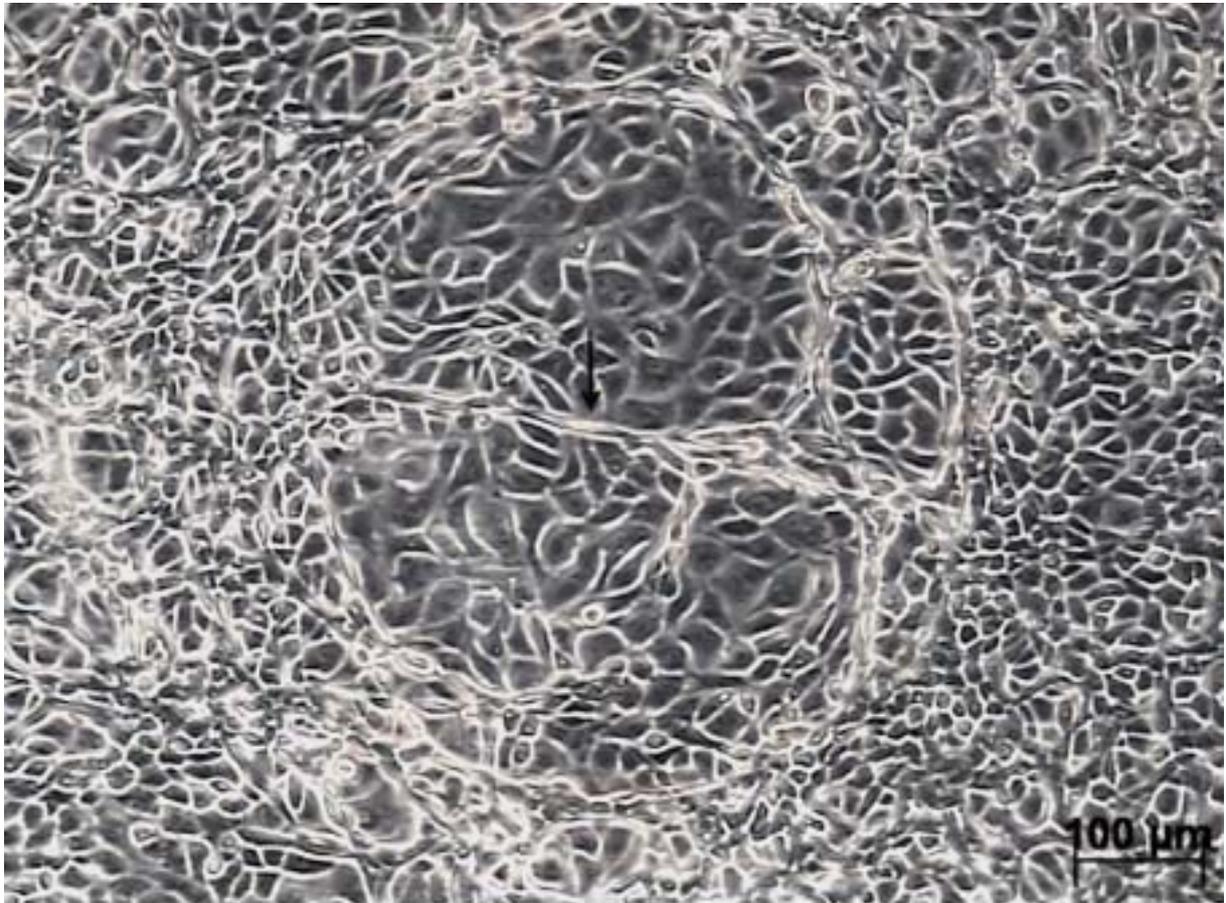


Abb. 23: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 13 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Durch Ausbildung eines langen, aus mehreren Zellen bestehenden Zellsprosses ( ← ) wird eine ringförmige Struktur unterteilt. Phasenkontrastmikroskop.

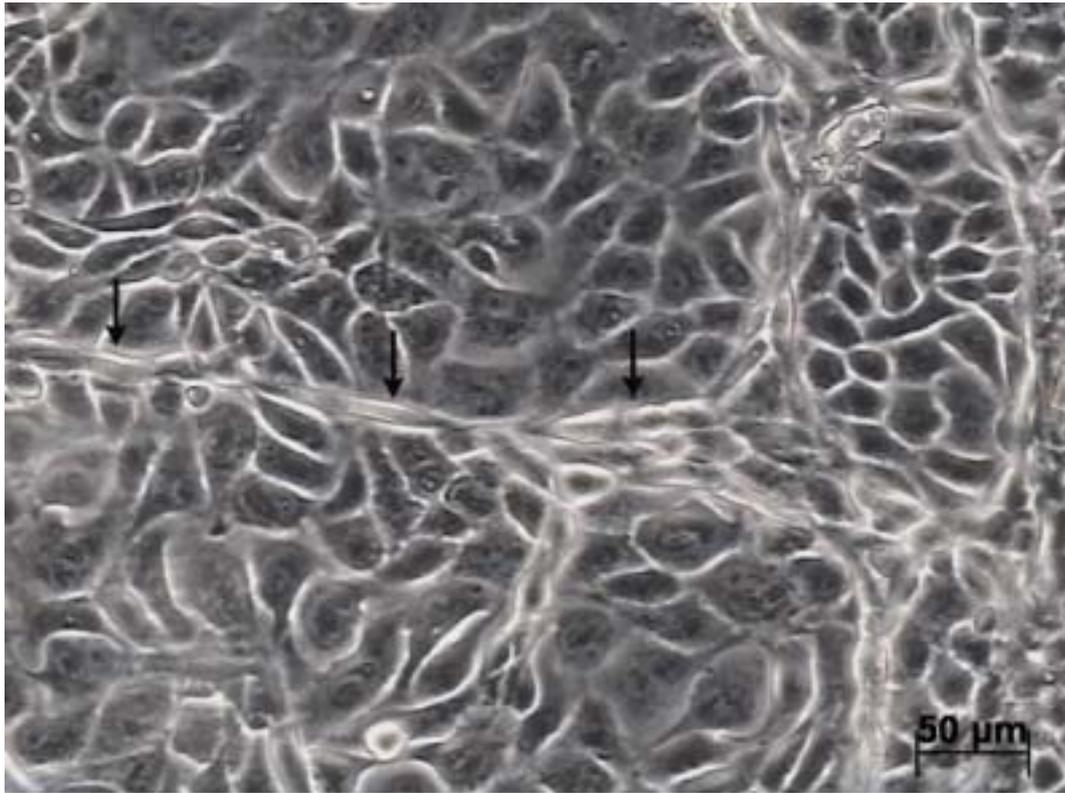


Abb. 24: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 13 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Zellspross aus mehreren, aneinandergereihten Zellen (←). Ausschnitt aus Abb. 23. Phasenkontrastmikroskop.

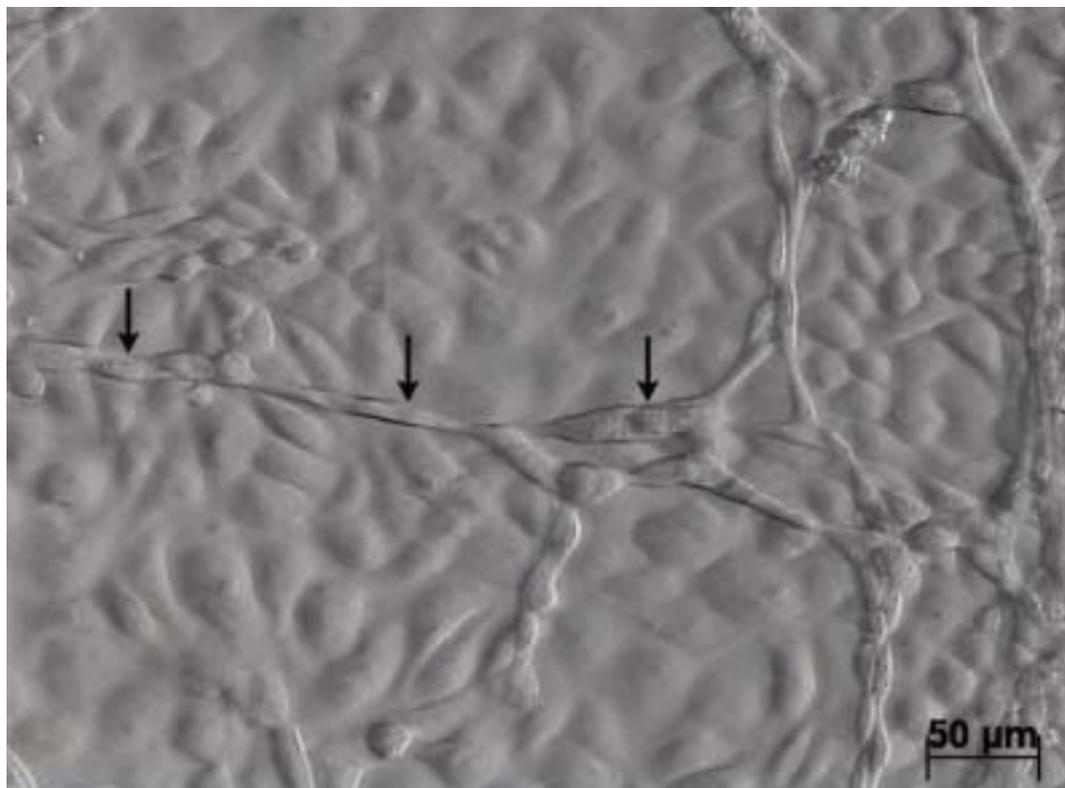


Abb. 25: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 13 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Zellspross aus mehreren, aneinandergereihten Zellen (←). Selbe Stelle wie Abb. 24. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

Die geschilderten Vorgänge der *in vitro*-Angiogenese resultierten in einem zellulären Netzwerk, das sich über die gesamte Kultur ausbreitete (Abb. 26-28).

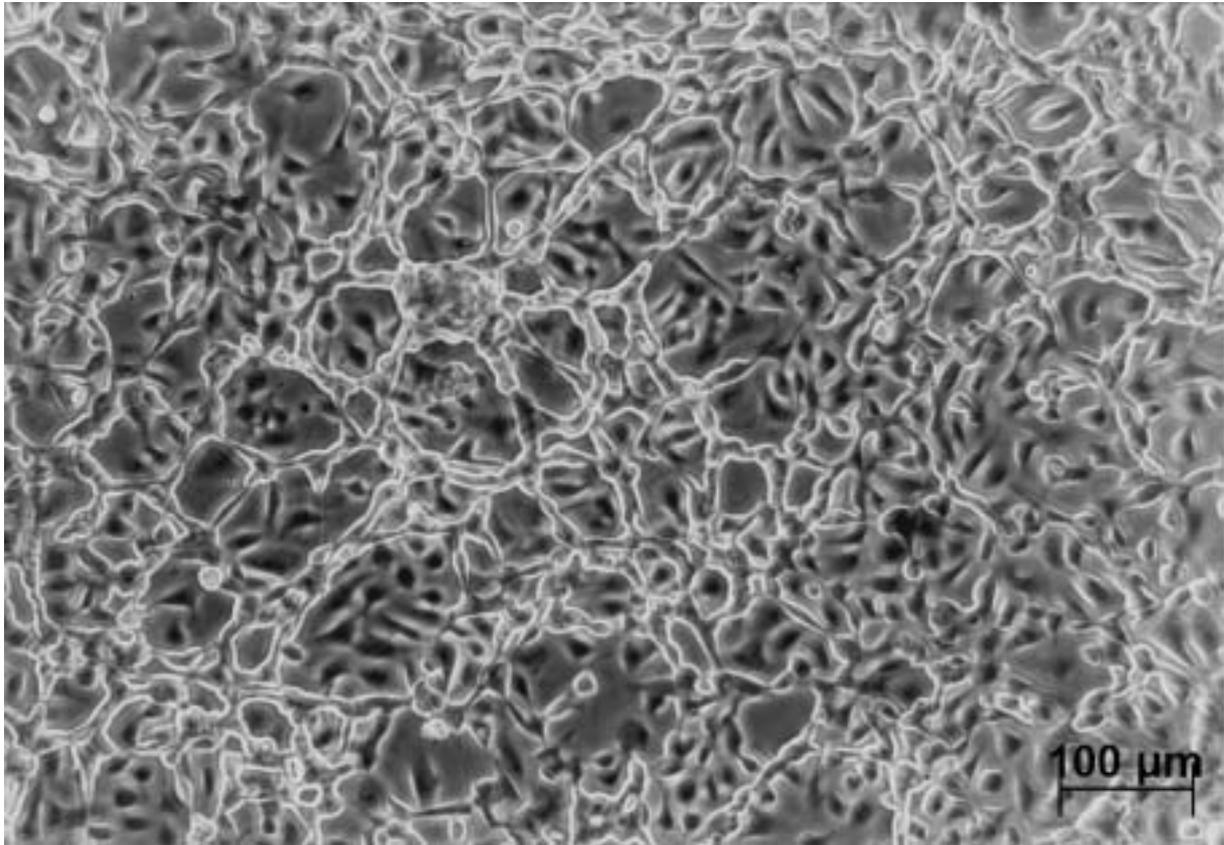


Abb. 26: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 13 Wochen in Kultur. *In vitro*-Angiogenese. Netzartige, endotheliale Strukturen über subkonfluentem Monolayer. Phasenkontrastmikroskop.



Abb. 27: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 10 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Netzartige, endotheliale Strukturen über konfluentem Monolayer. Phasenkontrastmikroskop.



Abb. 28: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 10 Wochen in Kultur. In vitro-Angiogenese. Netzartige, endotheliale Strukturen über konfluentem Monolayer. Selbe Stelle wie Abb. 27. Phasenkontrastmikroskop. (schiefe Beleuchtung).

#### 4.1.3.4 Bildung solider Zellstränge

6-8 Wochen nachdem in den Kulturen erste Anzeichen der in vitro-Angiogenese zu erkennen waren, bildeten sich stellenweise dickere, endotheliale Stränge heraus, die, wie in Abb. 29 zu erkennen, in der Breite aus mehreren Zellen bestanden. Zellen, die diese soliden Stränge bildeten, wiesen zuvor keine Besonderheiten auf.



Abb. 29: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 3,5 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Ausbildung solider Zellstränge ( ← ) Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

Parallel zur Bildung dieser soliden Stränge wurde in der Umgebung eine Abnahme des endothelialen Netzwerkes beobachtet (Abb. 30). Diese Veränderung schien manchmal der Ausbildung der kompakten Strukturen voraus zu gehen. Die Zellen in der Umgebung ordneten sich an den besagten Stellen wieder im Kopfsteinpflastermuster an.

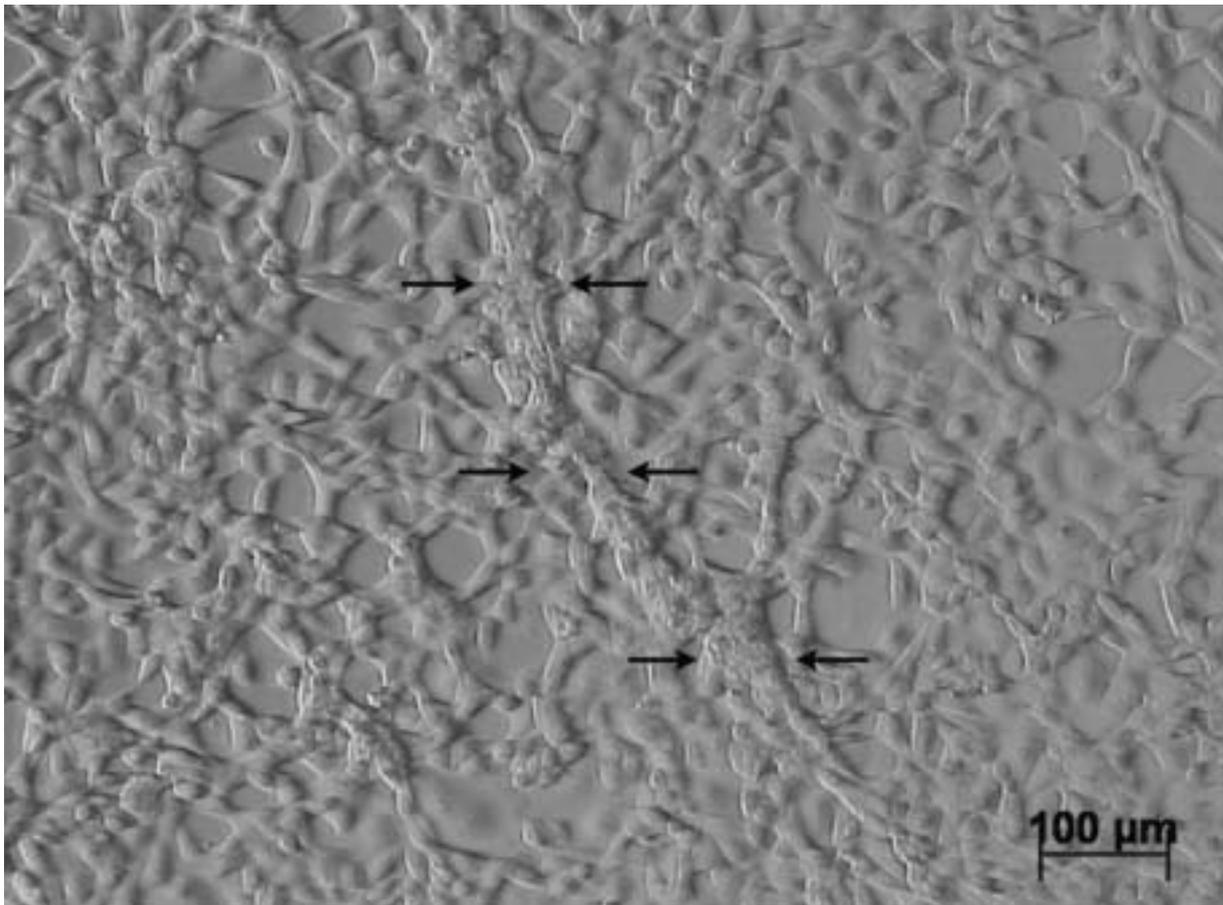


Abb. 30: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 5 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Solider Zellstrang ( ← → ) Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

Es bildeten sich sehr dicke, miteinander verbundene Zellstränge. Strukturen dieser Größenordnung waren mit bloßem Auge in den Kulturen zu erkennen (Abb. 31).

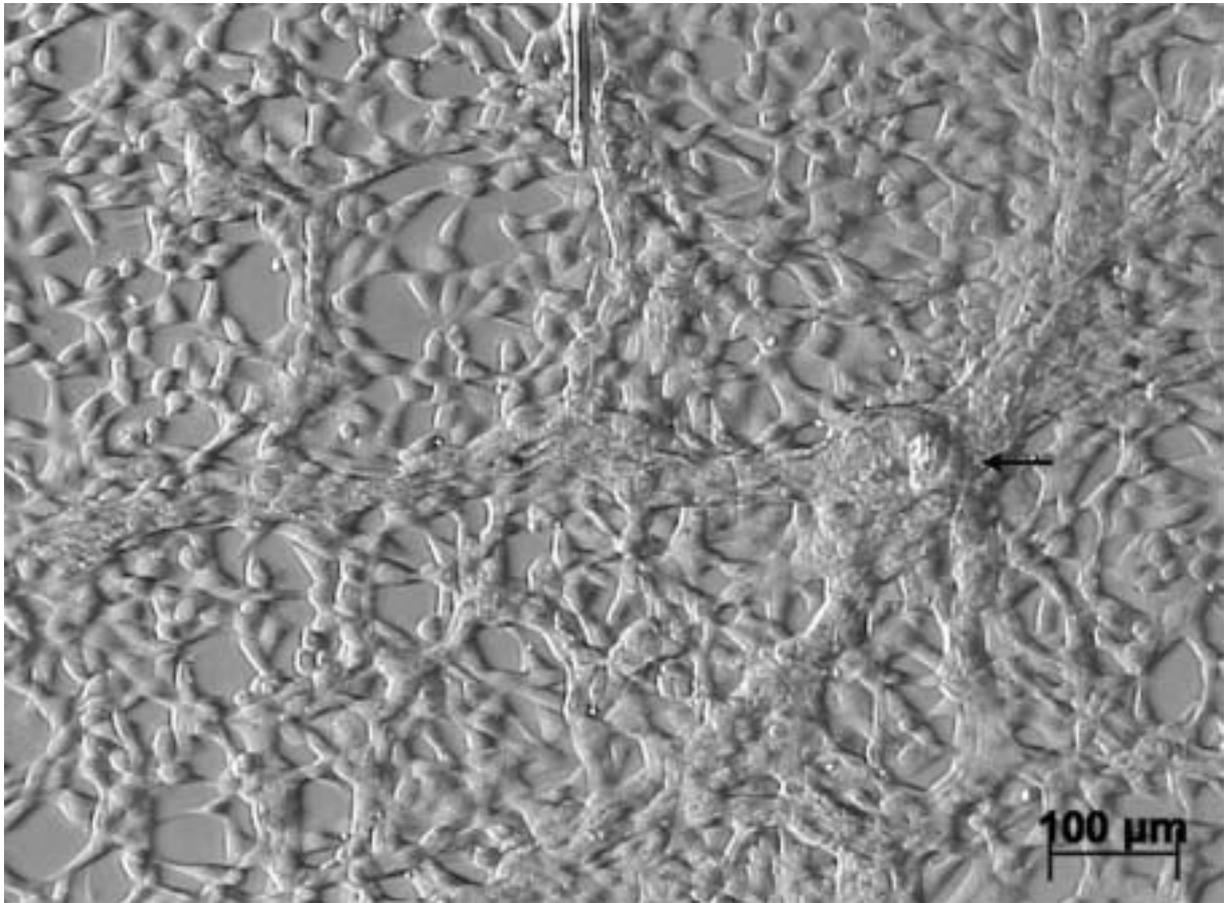


Abb. 31: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 6 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Mehrere dicke, solide Zellstränge, die von einer größeren, zentralen Zellanhäufung (←) ausgehen. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

In fortgeschrittenem Stadium, nämlich nachdem die Kulturen mehr als 3 Monate in vitro-Angiogenese gezeigt hatten, wurde innerhalb dieser dickeren Stränge eine schienenartige, längs ausgerichtete Struktur sichtbar, wie sie in den Abb. 32 bis 37 zu sehen ist. Der Abstand zwischen den beiden „Schienensträngen“ konnte bis zu 15  $\mu\text{m}$  betragen. Bei den seitlich dieser Stränge gelagerten Endothelzellen waren meist die Zellgrenzen nicht deutlich sichtbar, allerdings war eine Aufreihung der Zellen entlang der Strukturen deutlich zu erkennen.

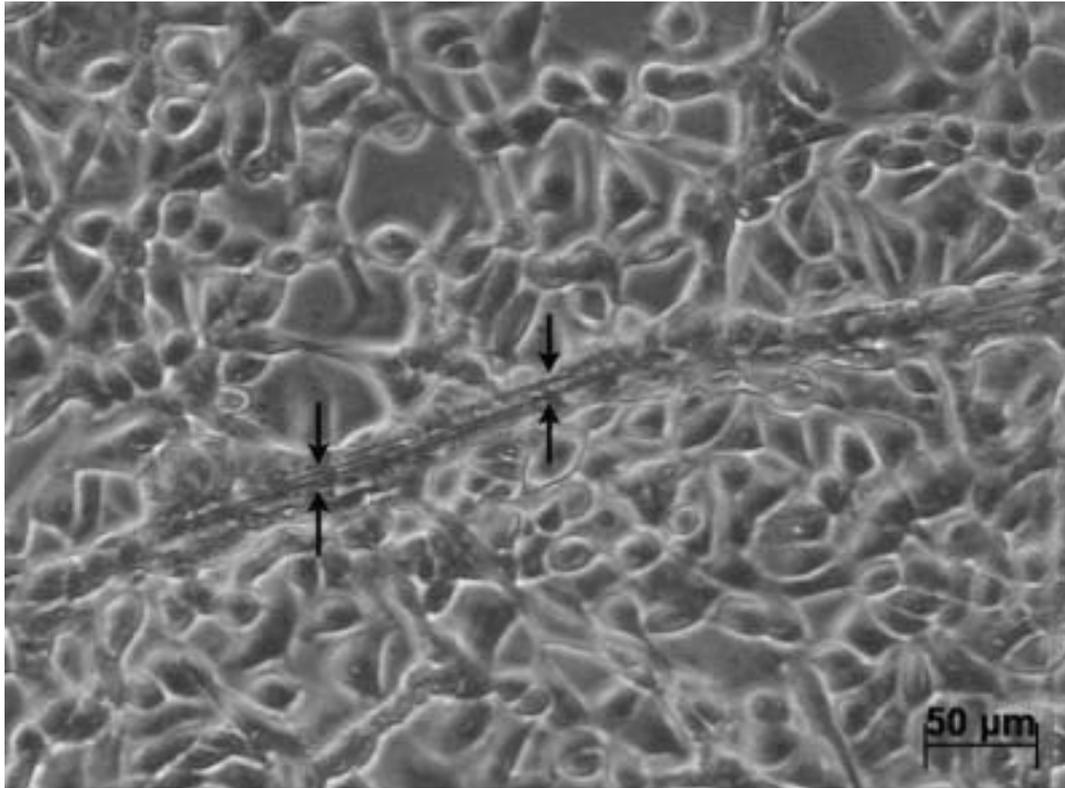


Abb. 32: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 6 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Innerhalb von soliden Zellsträngen wird eine dünne, schienenartige Struktur (←→) sichtbar. Phasenkontrastmikroskop.

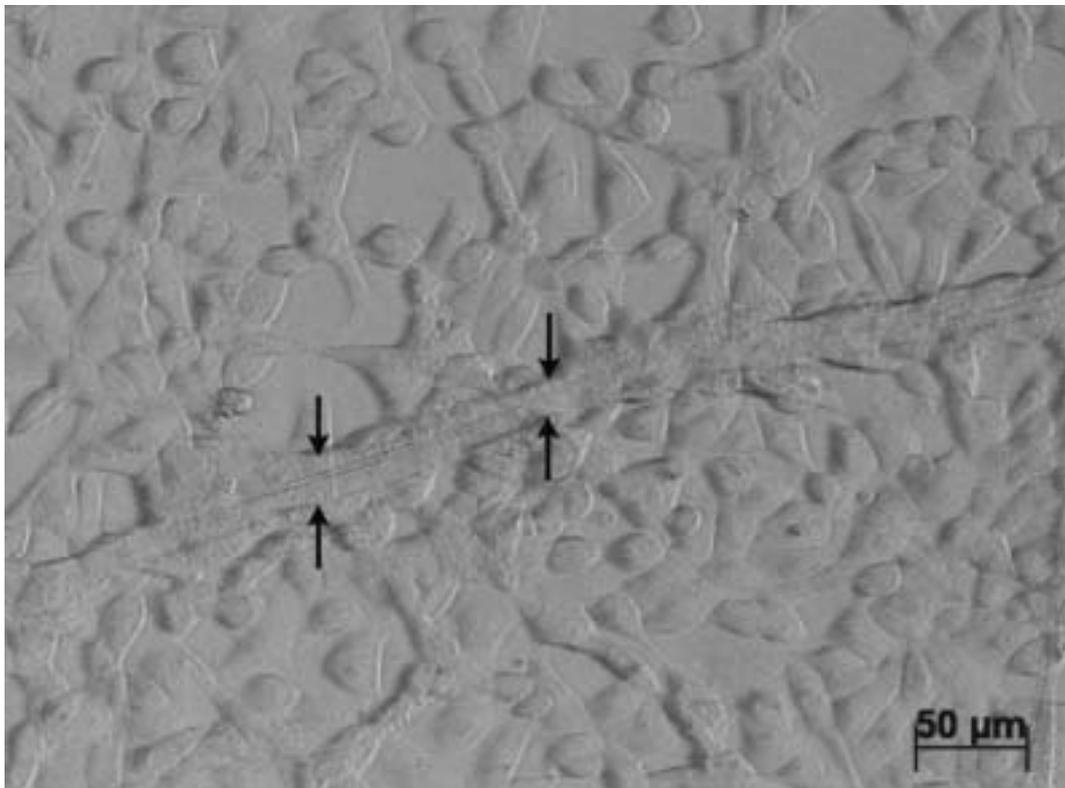


Abb. 33: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 6 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Innerhalb von soliden Zellsträngen wird eine dünne, schienenartige Struktur (←→) sichtbar. Aufnahme wie Abb. 32. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

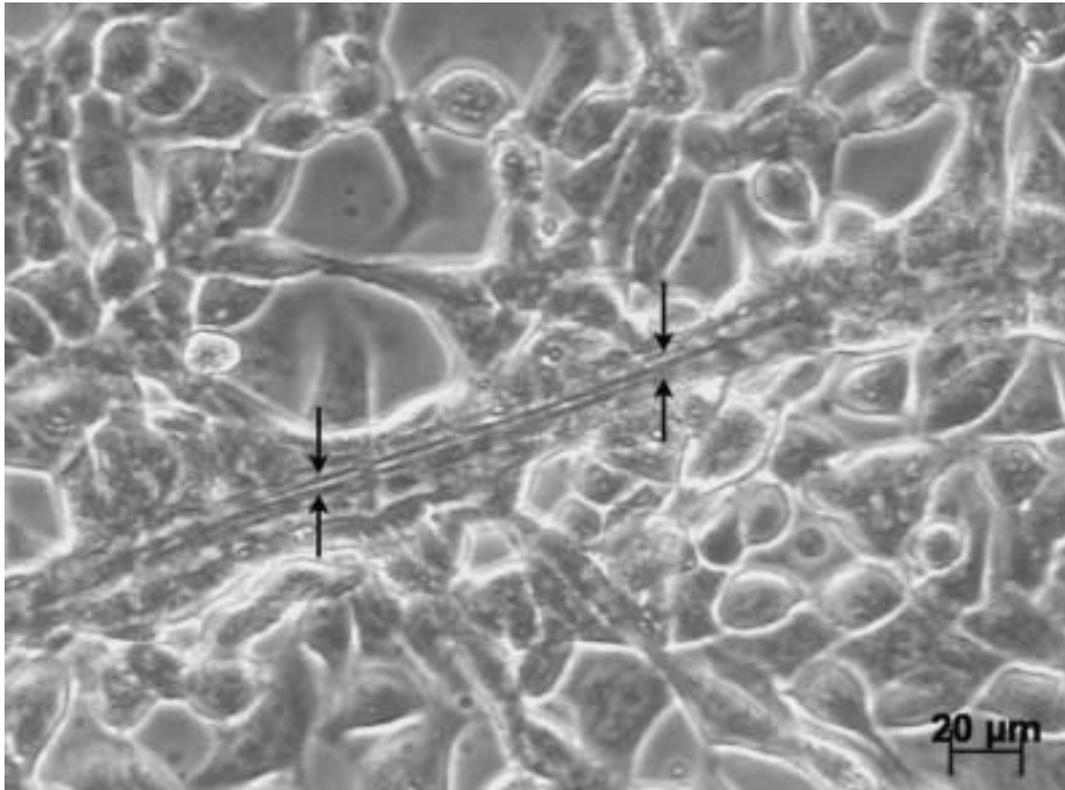


Abb. 34: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 6 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Innerhalb von soliden Zellsträngen wird eine dünne, schienenartige Struktur ( ← → ) sichtbar. Phasenkontrastmikroskop.

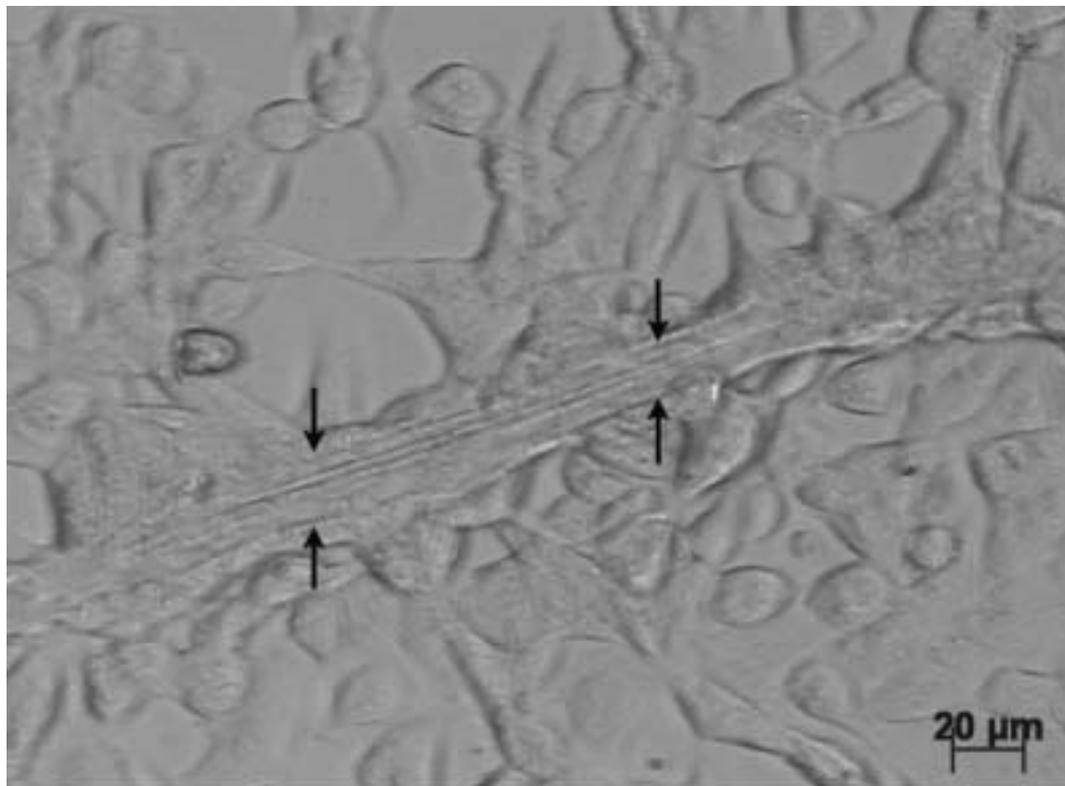


Abb. 35: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 6 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Innerhalb von soliden Zellsträngen wird eine dünne, schienenartige Struktur ( ← → ) sichtbar. Aufnahme wie Abb. 34. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

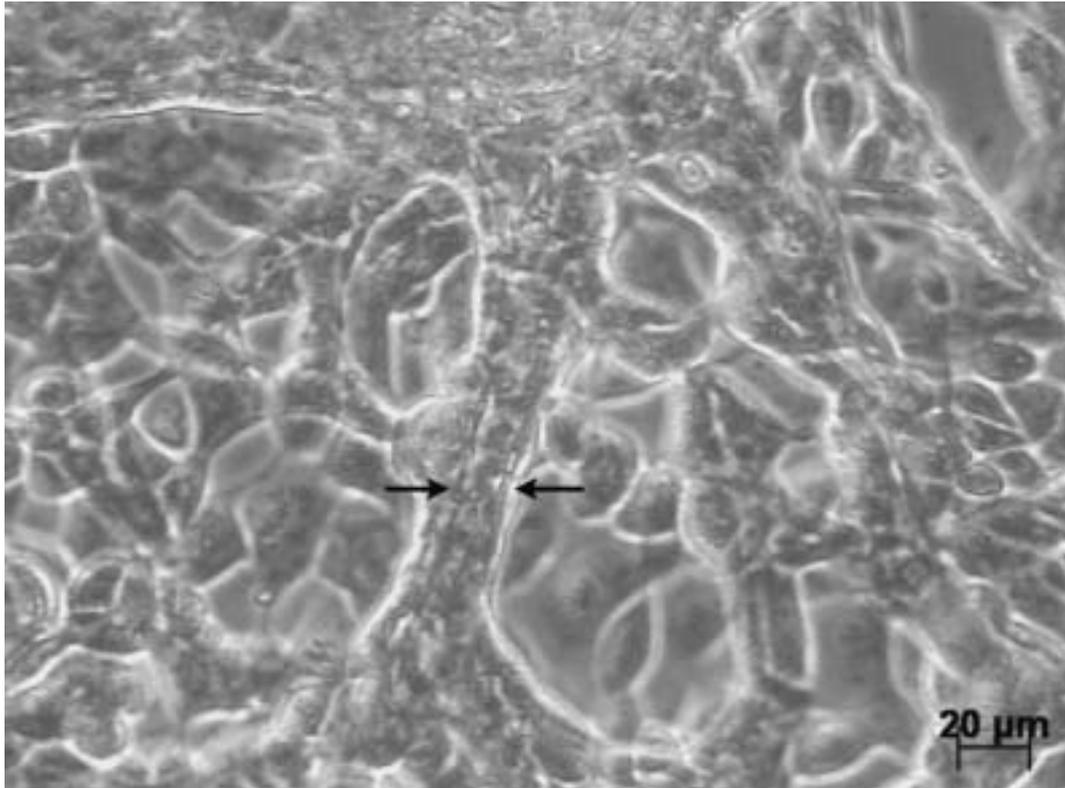


Abb. 36: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 6 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Innerhalb von soliden Zellsträngen wird eine dünne, schienenartige Struktur ( ← → ) sichtbar. Phasenkontrastmikroskop.

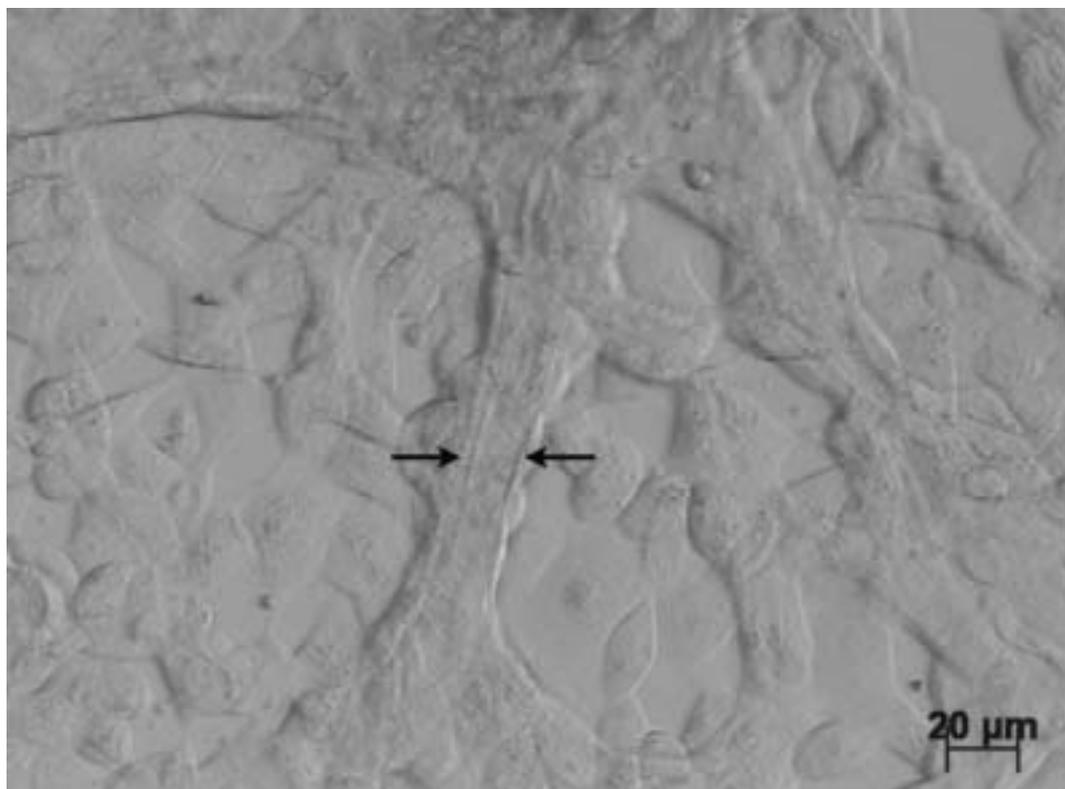


Abb. 37: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 6 Monate in Kultur. In vitro-Angiogenese. Innerhalb von soliden Zellsträngen wird eine dünne, schienenartige Struktur ( ← → ) sichtbar. Aufnahme wie Abb. 36. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung).

#### 4.1.4 Veränderungen in angiogenetischen Langzeitkulturen

##### 4.1.4.1. Rückbildung der angiogenetischen Strukturen

Nach sechs bis sieben Monaten in Kultur wurden die Stränge sukzessive dünner, ohne dass Veränderungen an den äußeren Bedingungen (Medium, CO<sub>2</sub>-Begasung, Temperatur) vorgenommen worden wären. Teilweise war nicht mehr festzustellen, wo sich die angiogenetischen Strukturen befunden hatten. Manchmal blieb auch noch ein schmaler Strang, der nur aus einzelnen, aneinandergereihten Zellen zu bestehen schien, zurück. Die Zellen ordneten sich wieder im Kopfsteinpflastermuster an.

Die Abb. 38 u. 31 (siehe S. 114) zeigen die gleiche Kultur, erkennbar an der Zellanhäufung. Zwischen den Aufnahmen liegen vier Wochen, in denen sich der größte Teil der soliden Zellstränge vollkommen zurückgebildet hat.

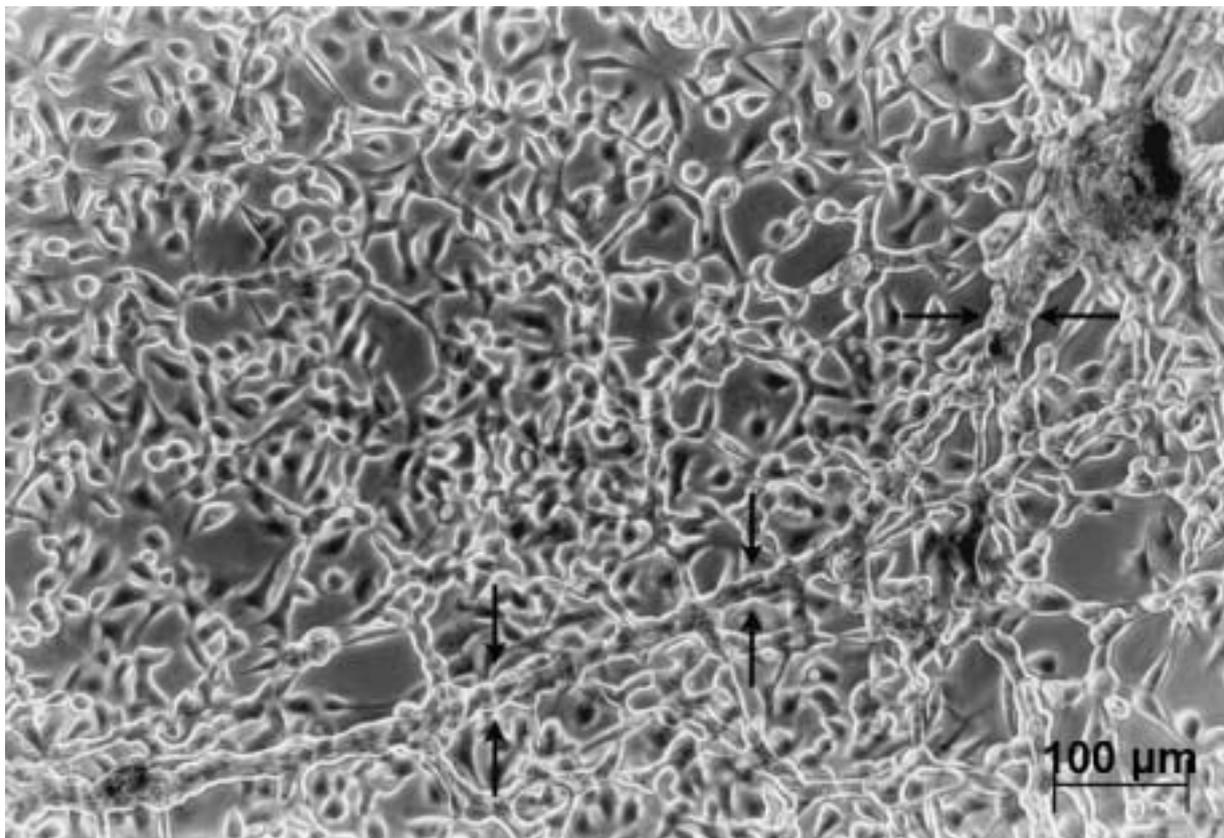


Abb. 38: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 7 Monate in Kultur. Rückbildung der in vitro-Angiogenese. Von ehemals dicken, soliden Zellsträngen sind nur noch dünne Reste ( ← ) zu sehen (Vergleich mit Abb. 31, S. 114). Phasenkontrastmikroskop.

#### 4.1.4.2. Ausbildung breitflächiger Netze durch die Endothelzellen

In einigen älteren Kulturen, die bereits in vitro-Angiogenese sowie deren Regression gezeigt hatten, konnte beobachtet werden, dass die Zellen, die wieder das Kopfsteinpflastermuster angenommen hatten, erneut begannen, netzartige Strukturen in einer Ebene über den restlichen Zellen auszubilden. Allerdings wurde hier das Maschenwerk nicht von einzelnen aneinander gereihten länglichen Zellen gebildet, sondern von breitflächigen Zellansammlungen wie in Abb. 39. Die Zellen innerhalb dieser Strukturen wiesen meist eine polygonale Form auf. Nur am Rand schienen längliche Zellen die deutliche Grenze zur Unterlage zu bilden.

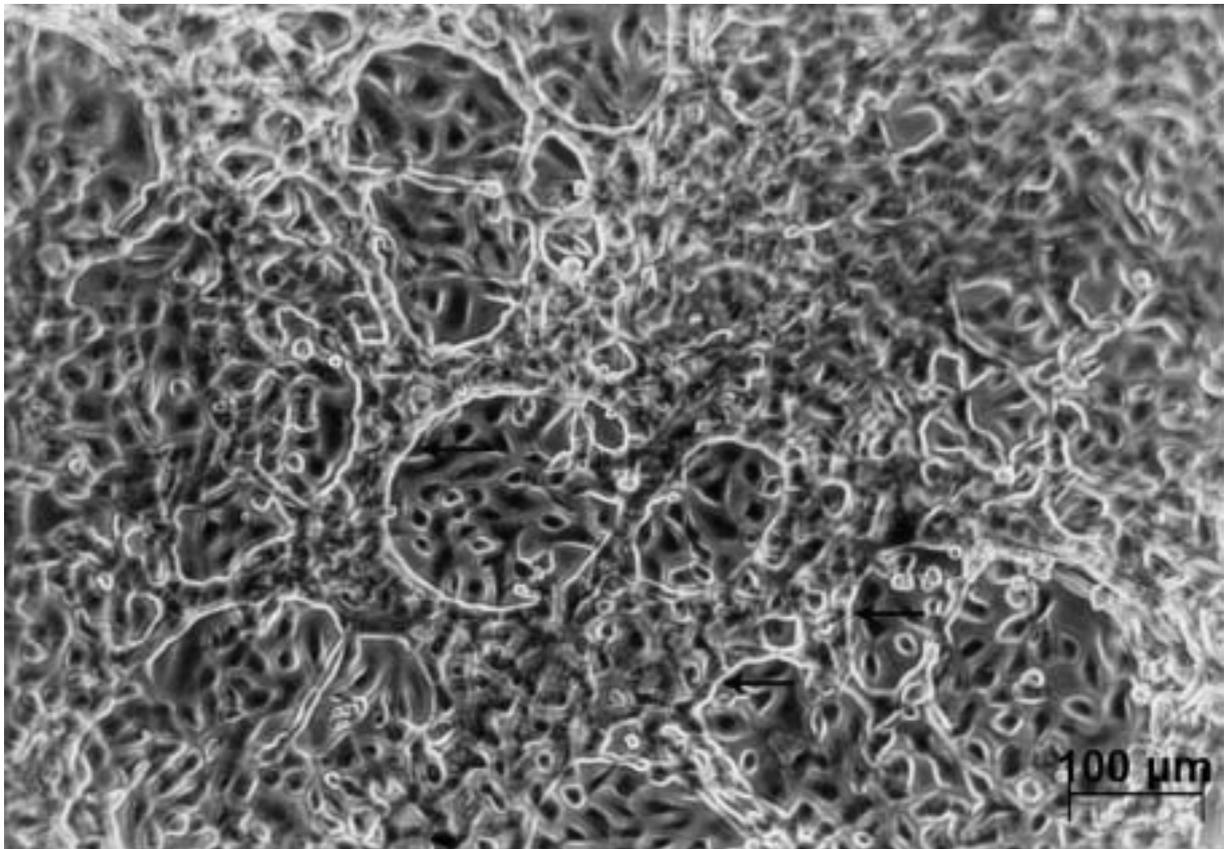


Abb. 39: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 7 Monate in Kultur. In vitro Angiogenese zurückgebildet. Breitflächige Zellnetze ( ← ) über Monolayer. Phasenkontrastmikroskop.

#### 4.1.5. Rückbildung der angiogenetischen Strukturen durch Entzug des Selektivmediums

Von einigen Kulturschalen wurde einen Monat nach der Aussaat und nachdem sich schon netzartige Strukturen herausgebildet hatten, das Selektivmedium entfernt und stattdessen nur noch das Nährmedium DMEM<sup>+</sup>, das keine angiogenen Faktoren enthielt, zugegeben. Dieses Vorgehen führte zur Rückbildung der endothelialen Strukturen. Zwei Monate nach Entzug des Selektivmediums hatten die meisten Zellen wieder eine polygonale Form angenommen und bildeten ein Kopfsteinpflastermuster. Es waren jedoch immer noch längliche Zellen zu sehen, die sich neben- und hintereinander reihten und dadurch strangähnliche Strukturen formten (Abb. 40).

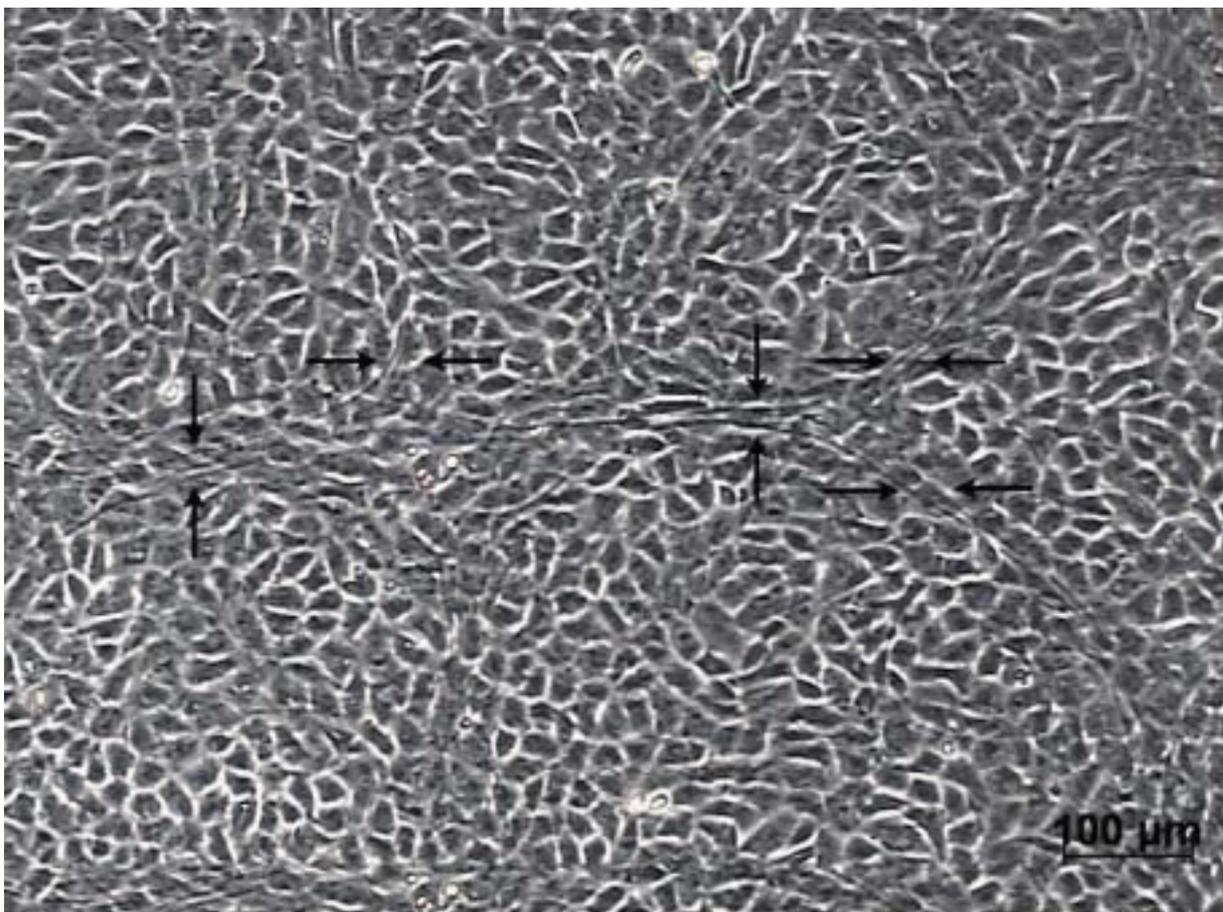


Abb. 40: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, 3,5 Monate in Kultur. Entzug des Selektivmediums nach Ausbildung von in vitro-Angiogenese. Nachfolgend innerhalb von 2 Monaten Rückbildung der endothelialen Strukturen und Umformung der Zellen zu Kopfsteinpflastermuster. Reste der angiogenetischen Strukturen als länglich angeordnete Zellen erkennbar ( ← ). Phasenkontrastmikroskop.

## 4.2. Immunhistochemische Untersuchungen der Endothelzellen

Für den Nachweis von Laminin wurden Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung verwendet.

Tabelle 5: Übersicht über die für die Markierung mit anti-Laminin verwendeten Endothelzellen.

<b>Zeitspanne der Kultivierung</b>	<b>Stadium der Angiogenese</b>	<b>morphologische Beschreibung</b>
6 Tage	präangiogen	Kopfsteinpflastermuster
	beginnende Angiogenese	Kopfsteinpflastermuster Zellen mit Ausläufern
6 Wochen	angiogen	Vernetzung, Ringbildung
7 Monate	angiogen	Vernetzung, ehemals solide Stränge

Bereiche, in denen der Antikörper gegen Laminin gebunden wurde, färbten sich durch eine Farbreaktion mit Diaminobenzidin braun an.

### 4.2.1. Markierung von präangiogenen Endothelzellen mit anti-Laminin

Lichtmikroskopisch formten die Zellen ein konfluentes Monolayer, wobei die Zellen im sogenannten Kopfsteinpflastermuster vorlagen. Es zeigte sich eine sehr schwache, granuläre Markierung im perinukleären Zytoplasma. Gelegentlich war eine stärkere, braune Anfärbung von kurzen, faserartigen Strukturen, die sich entweder zwischen den Zellen befanden oder die Zellen überlagerten, zu sehen.

## 4.2.2. Markierung von Endothelzellen verschiedener Stadien der Angiogenese mit anti-Laminin

### 4.2.2.1. Präangiogene Endothelzellen mit Ausläufern

In einigen der sechs Tage alten Kulturen traten neben dem Kopfsteinpflastermuster auch Zellen mit Ausläufern auf.

Eine schwache, bräunliche Granulierung war rund um den Kern zu sehen. Im Bereich der Zellausläufer war eine starke Bindung des Antikörpers zu beobachten. Die markierten Strukturen erschienen als lange, dünne Fasern, die sich stellenweise verzweigten und einzelne Zellen miteinander verbanden (Abb. 41).

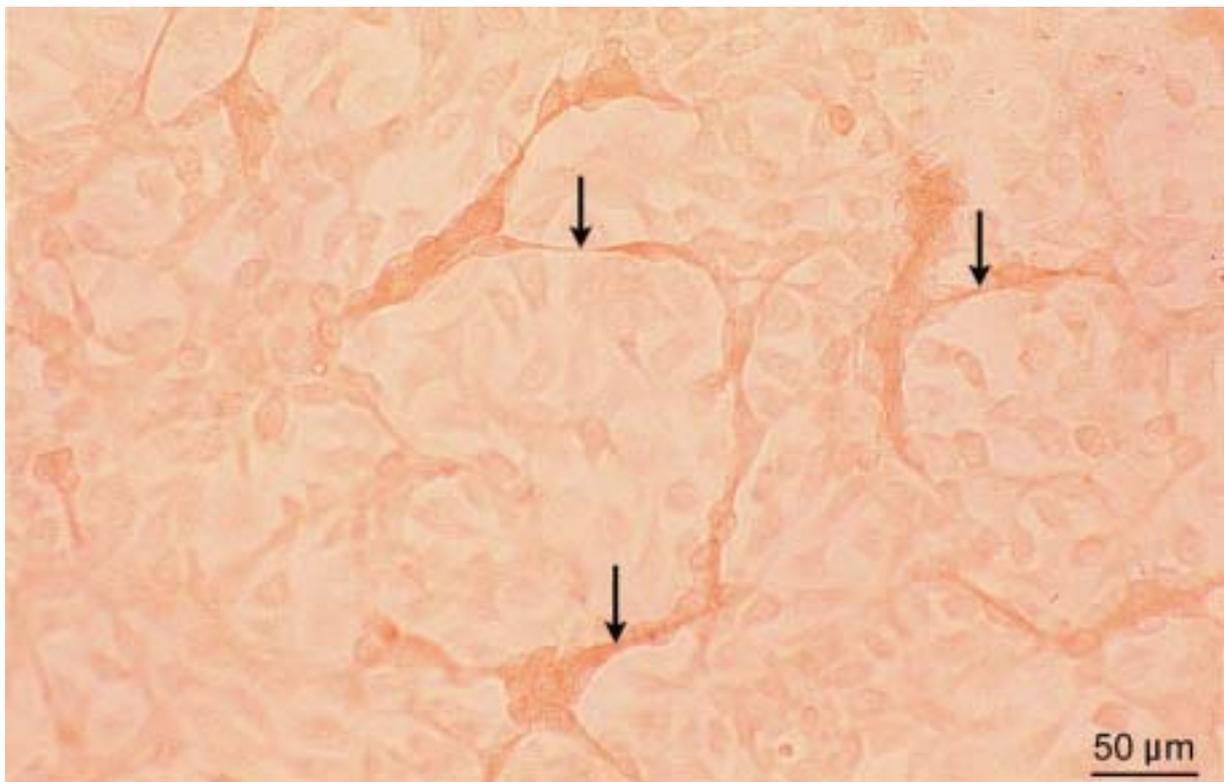


Abb. 41: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bindung von anti-Laminin markiert zwischen den Zellen faserartige Strukturen (  $\longrightarrow$  ), die sich verzweigen. Lichtmikroskop.

#### 4.2.2.2. Angiogene Endothelzellen

Die verwendeten Endothelzellen waren zwischen sechs Wochen und sieben Monaten in Kultur und zeigten lichtmikroskopisch deutliche in vitro-Angiogenese mit ausgeprägter Vernetzung der endothelialen Strukturen und deutlicher Ringbildung.

Eine schwache, granuläre Braunfärbung war wiederum im perinukleären Zytoplasma zu sehen. Die netzartigen Strukturen zeigten vor allem an den Rändern der endothelialen Maschen eine deutliche Markierung mit dem Antikörper (Abb. 42). Eine besonders intensive Bindung konnte im Bereich von Zellsprossen, die größere Maschen unterteilten, beobachtet werden. Diese Zellsprosse bestanden aus einer innen gelegenen, stark braun angefärbten Struktur mit einem Durchmesser von 2-6  $\mu\text{m}$ , an der entlang sich unmarkierte Endothelzellen aufreichten. (Abb. 43, 44).

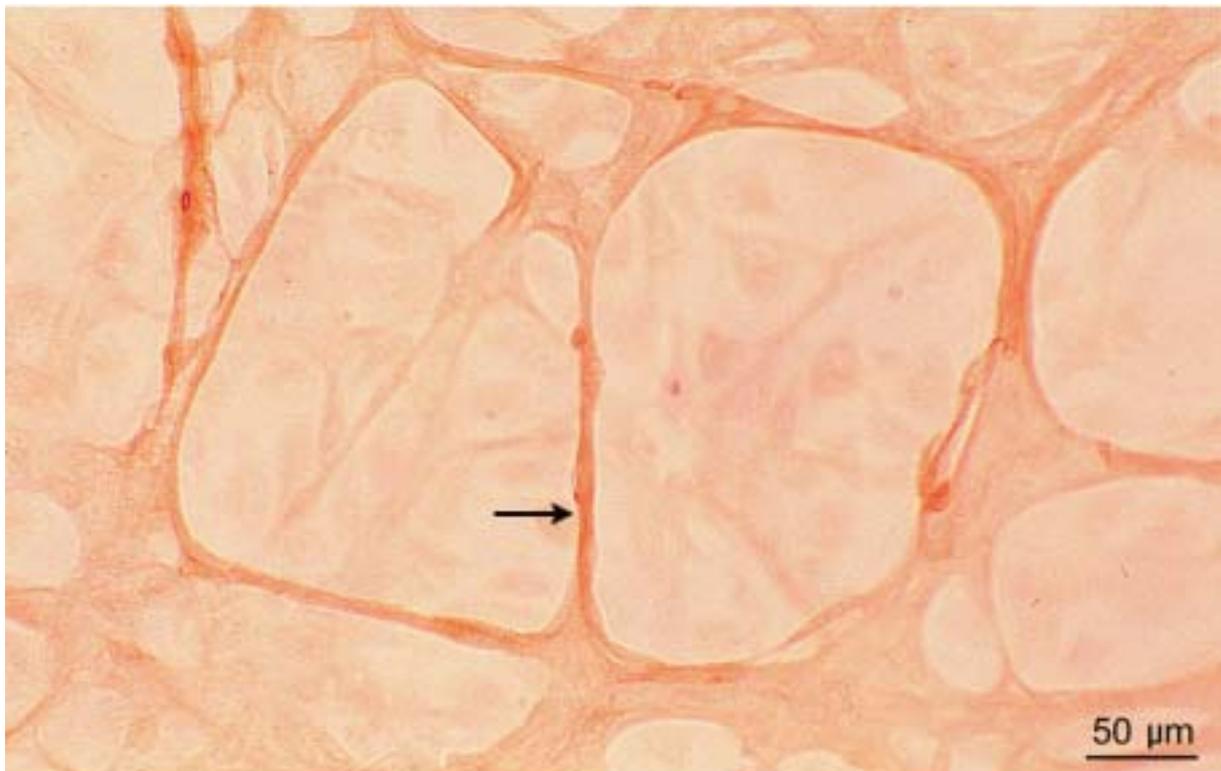


Abb. 42: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bindung von anti-Laminin markiert endotheliales Maschenwerk und Zellsprosse (  $\longrightarrow$  ). Lichtmikroskop.

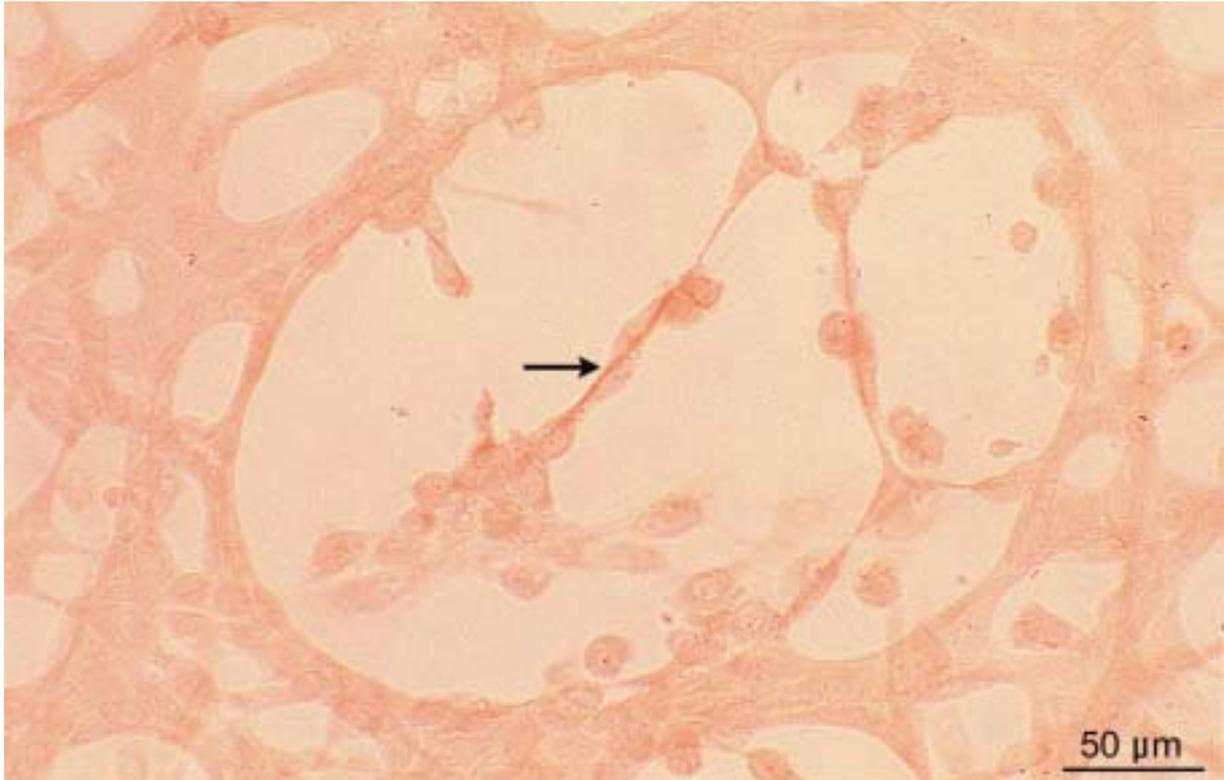


Abb. 43: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bindung von anti-Laminin markiert im Bereich von Zellsprossen eine zwischen den Zellen gelegene, faserartige Struktur ( → ). Lichtmikroskop.



Abb. 44: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bindung von anti-Laminin markiert im Bereich von Zellsprossen eine zwischen den Zellen gelegene längliche Struktur ( → ). Lichtmikroskop.

### 4.2.3. Negativkontrollen

Bei den Negativkontrollen war eine schwache granuläre Braunfärbung im Bereich rund um den Kern zu erkennen. Eine Markierung von faserartigen oder langgestreckten Strukturen, wie sie bei den mit Laminin markierten Endothelzellen im Kopfsteinpflastermuster beobachtet wurden, war nicht zu sehen. Auch die netzartigen Strukturen der Endothelzellen, die in vitro-Angiogenese zeigten, wurden nicht angefärbt (Abb. 45).

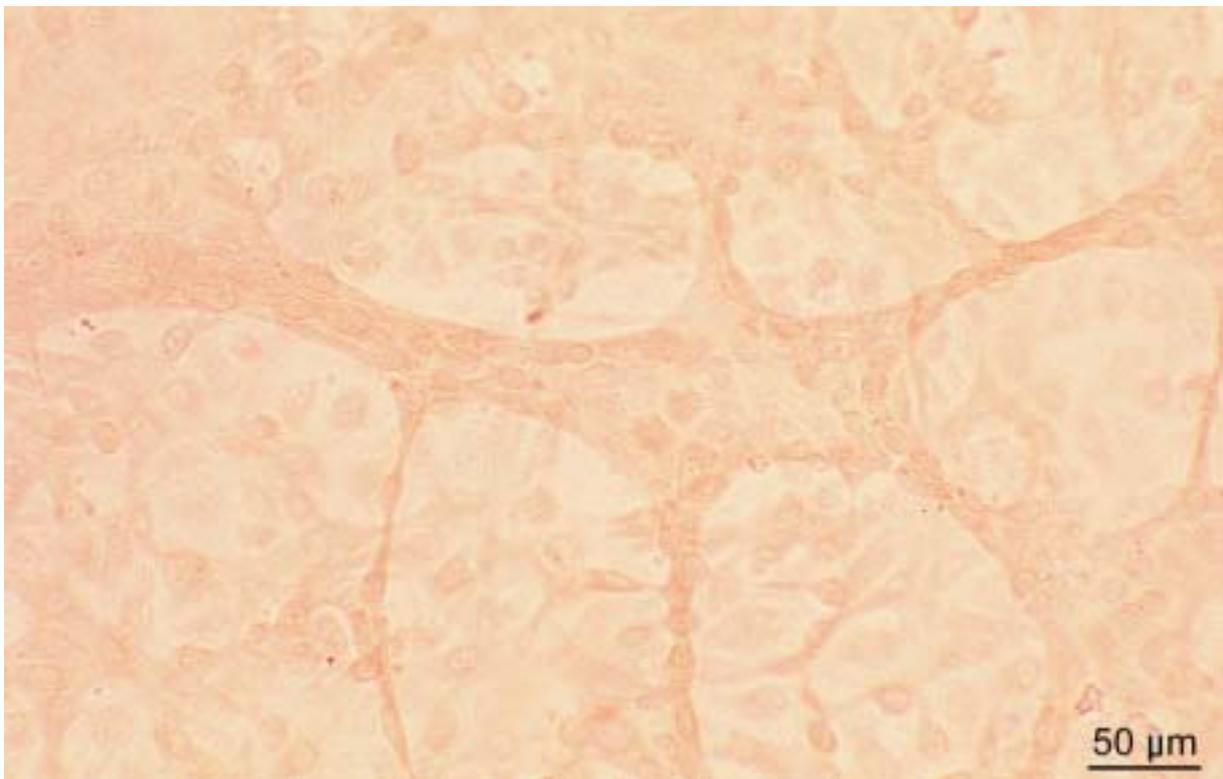


Abb. 45: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Anti-Laminin, Negativkontrolle. Lichtmikroskop.

### 4.3. Elektronenmikroskopie

#### 4.3.1. Endothelzellen in Suspension

Die Zellen nahmen nach Ablösen von der Unterlage mittels Trypsin eine rundliche Form an, wobei die Zellmembran meist mehrere kleine Ausstülpungen aufwies. Im Zytoplasma waren zahlreiche Organellen zu sehen, die sich zum Rand der Zelle hin orientierten. Dadurch entstand oftmals rund um den Zellkern ein organellenarmer oder sogar organellenfreier Raum. Ovale bis längliche Mitochondrien vom Crista-Typ waren in großer Zahl vorhanden. Vereinzelt traten auch Mitochondrien vom Tubulus-Typ auf. Zwischen den Mitochondrien befand sich raues Endoplasmatisches Retikulum wie auch Golgi-Felder. Die meist runden oder länglichen Zellkerne waren euchromatisch und konnten deutliche Einfaltungen aufweisen. Der Nukleolus war oft gut zu erkennen (Abb. 46, 47).

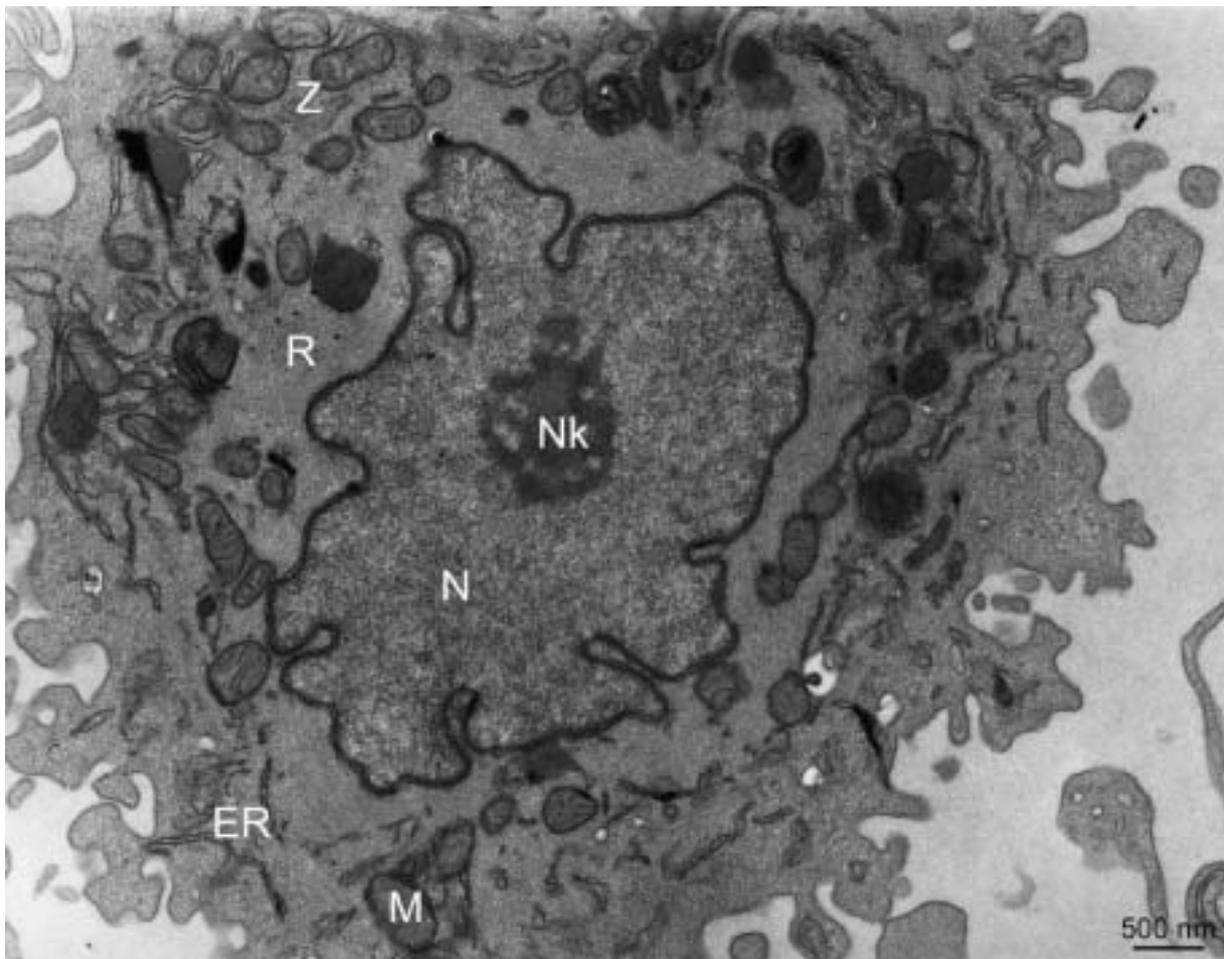


Abb. 46: Endothelzelle aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Stark gelappter Kern (N) mit deutlichem Nukleolus (Nk). Im Zytoplasma (Z) viele Mitochondrien (M) und raues Endoplasmatisches Retikulum (ER). Organellenfreier Raum (R) um Zellkern. TEM.

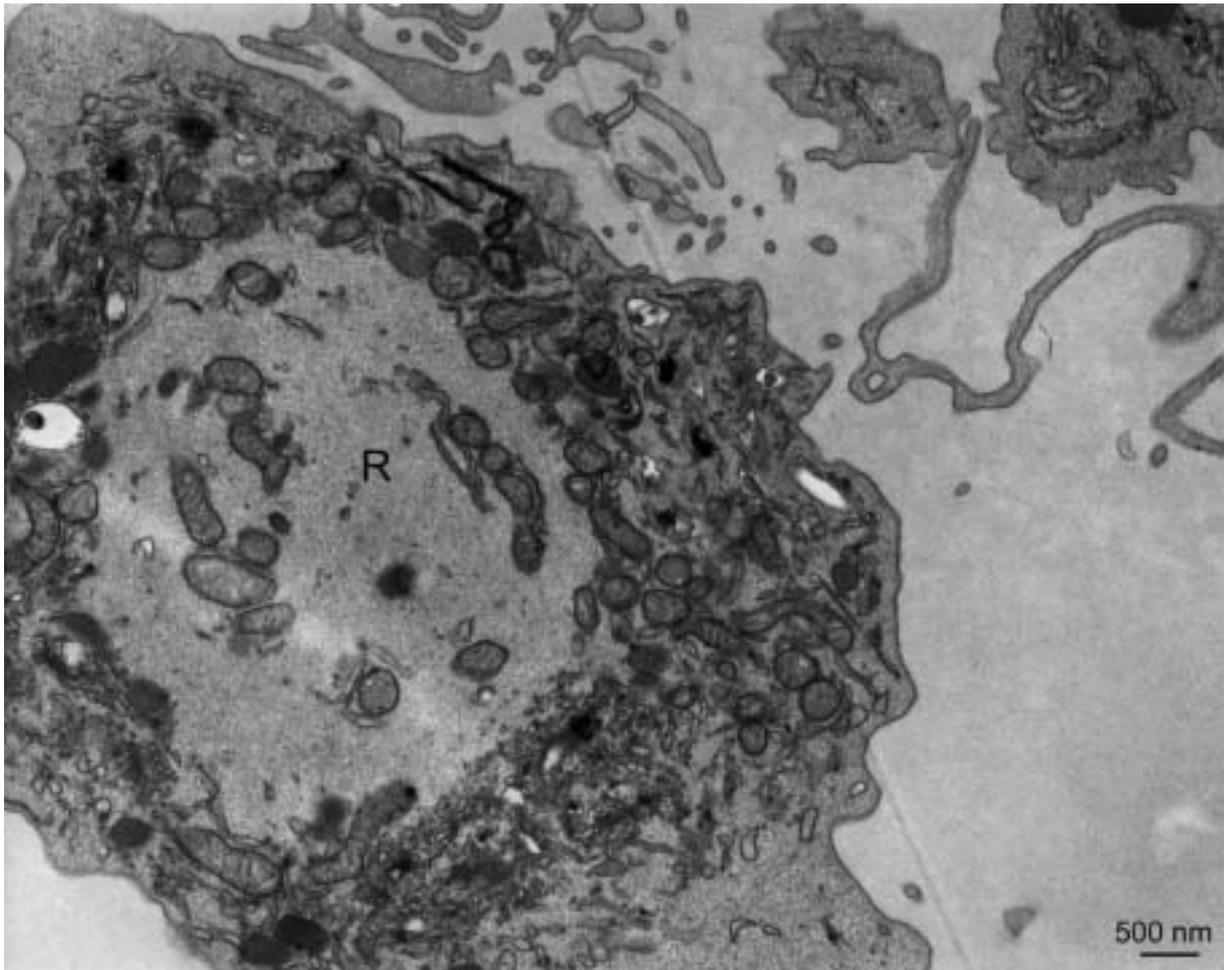


Abb. 47: Endothelzelle aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Zytoplasma am Rand der Zelle organellenreich, zentral organellenarmer Raum (R). TEM.

#### 4.3.2. Endothelzellen während der in vitro-Angiogenese

Stellenweise lagen die Zellen mit Ihren Zellmembranen dicht beieinander. Zwischen den Zellen bildeten sich „tight junctions“ und „gap junctions“ aus (Abb. 48, 49). Vereinzelt waren auch Desmosomen zu erkennen (Abb. 50).

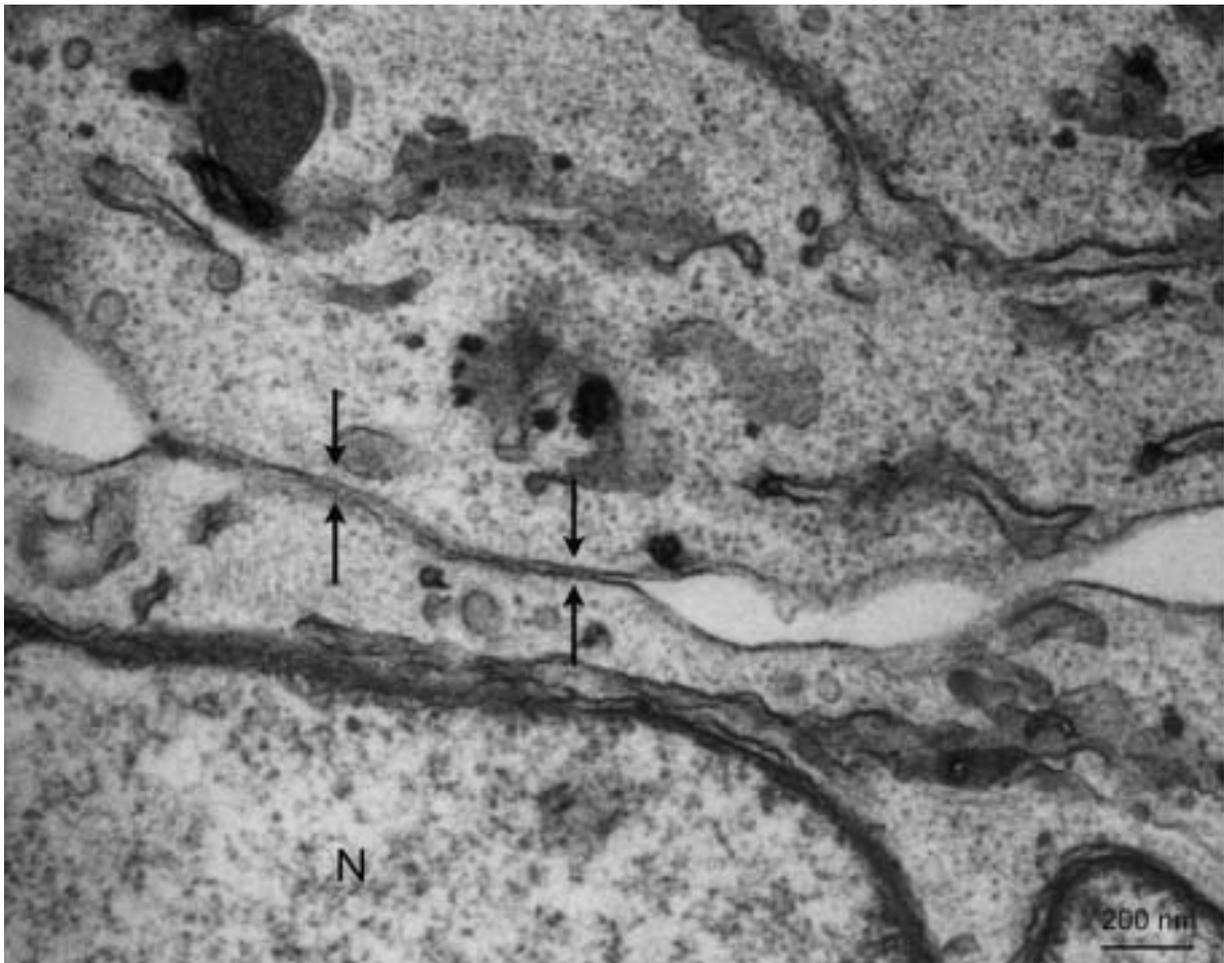


Abb. 48: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. „Gap junction“ ( ← → ) zwischen zwei Zellen. Nukleus (N). TEM.

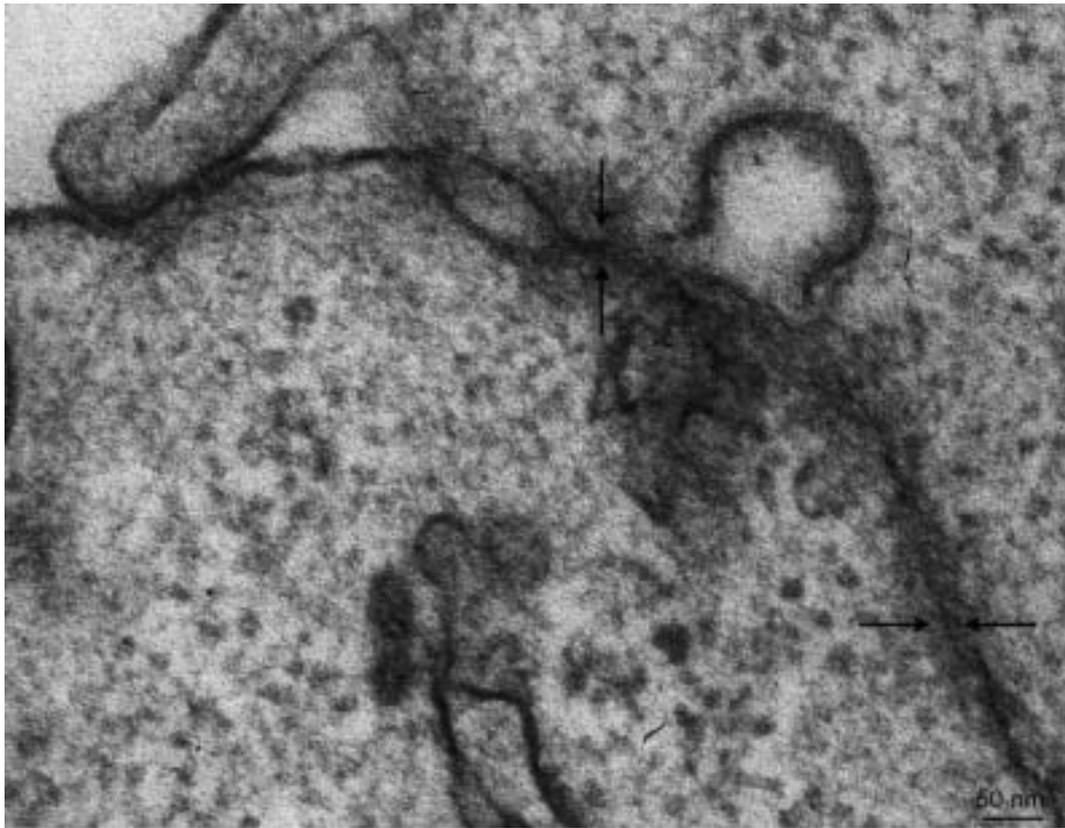


Abb. 49: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. „Tight junction“ (←→) zwischen zwei Zellen. TEM.

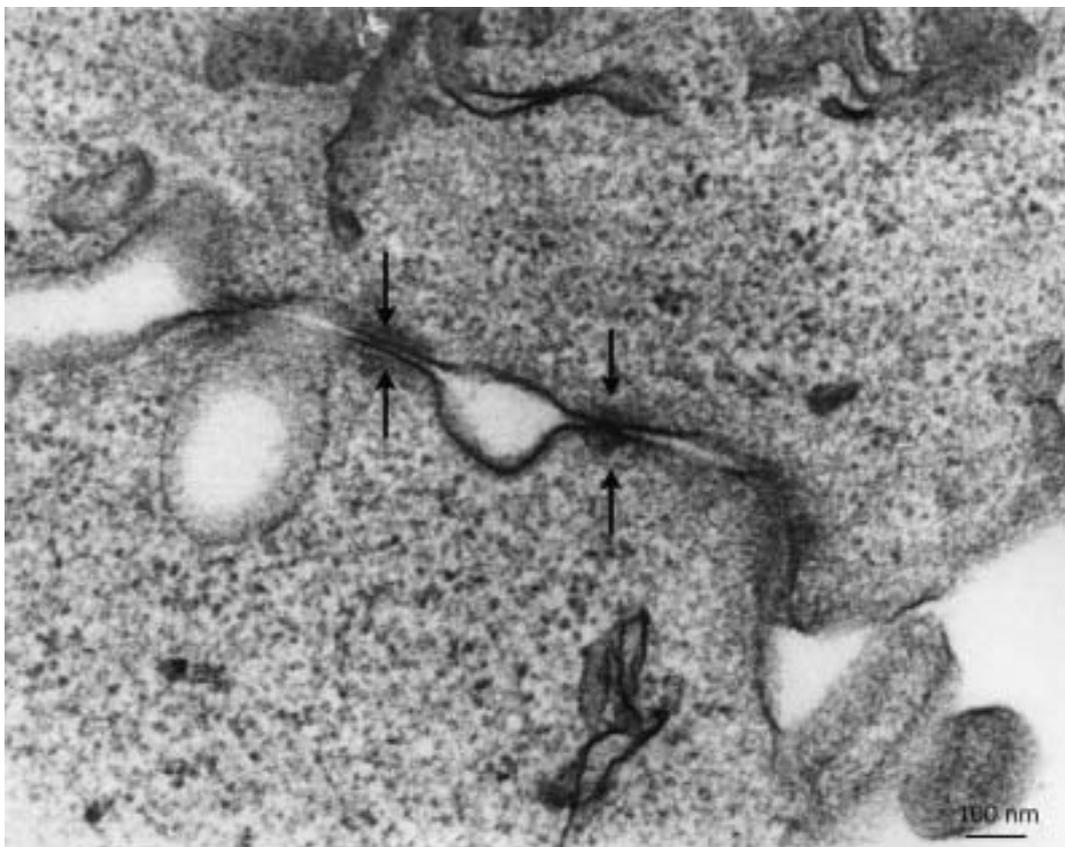


Abb. 50: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Desmosomen zwischen zwei Zellen (←→). TEM.

Bei einigen Zellen traten die Zellmembranen nur stellenweise in Kontakt. Zwischen den Zellen befanden sich kleine, rundliche oder auch ovale Spalträume (Abb. 51).

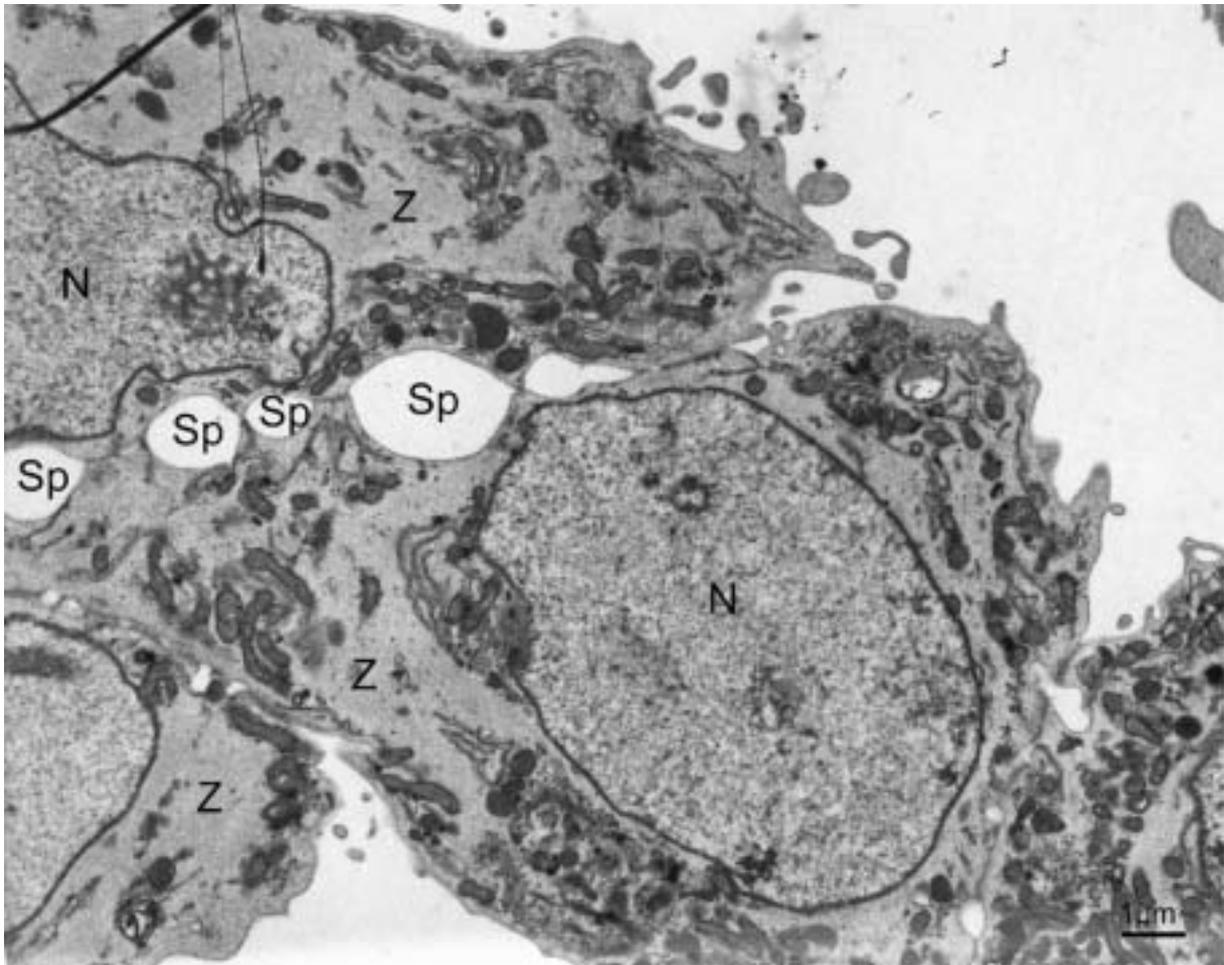


Abb. 51: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Spalträume (Sp) zwischen den Zellen. Nukleus (N), Zytoplasma (Z). TEM.

Innerhalb der beschriebenen Spalträume wurde häufig Material mit einer fibrillären Struktur gefunden (Abb. 52)

Dieses fibrilläre Material trat in den weiteren Stadien der Angiogenese in zunehmendem Maße auf und zeigte dabei eine typische Anordnung zu den Endothelzellen. Grundsätzlich trat dieses Material nicht ohne begleitende Zellen auf.

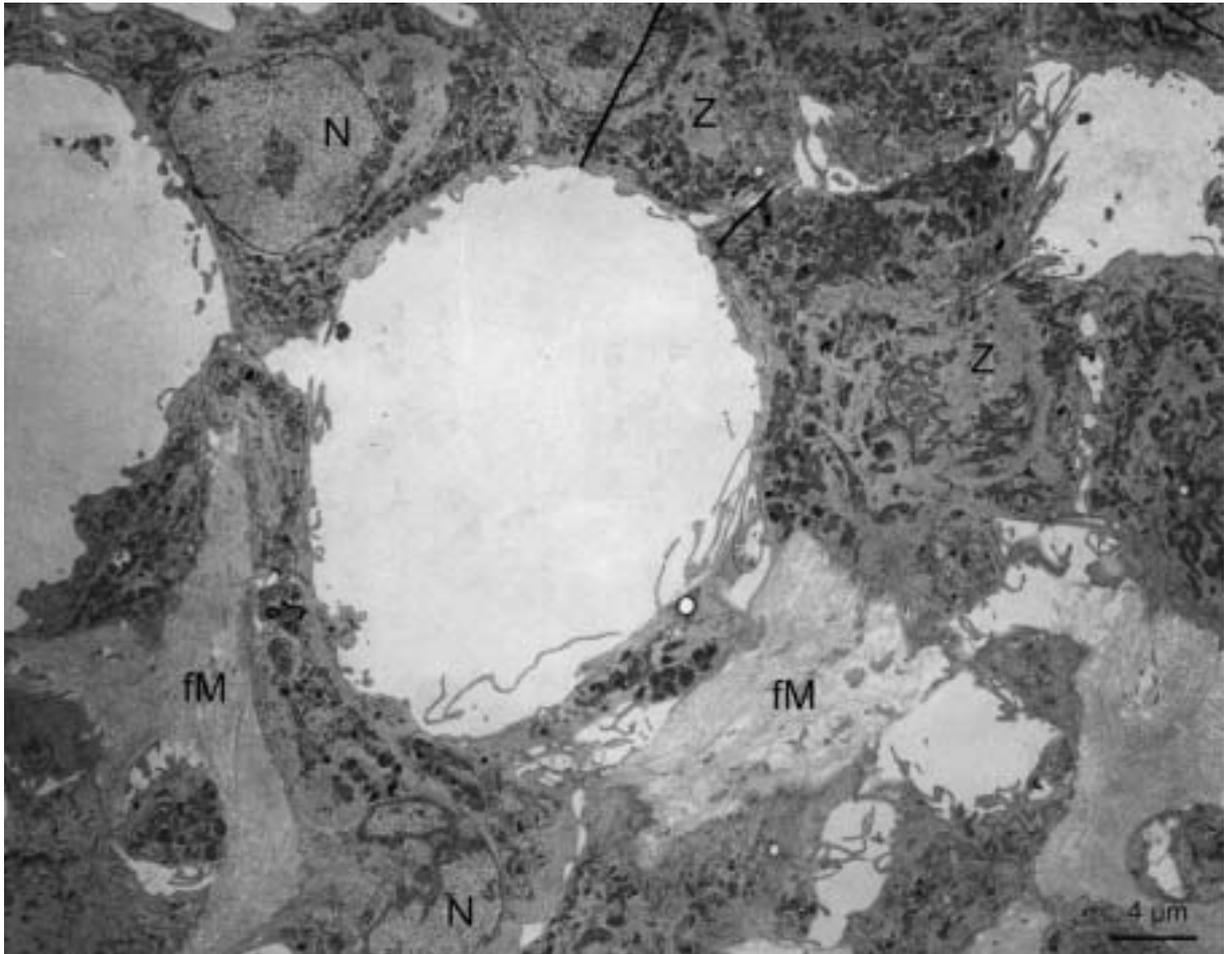


Abb. 52: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Fibrilläres Material (fM) zwischen den Zellen. Nukleus (N), Zytoplasma (Z). TEM.

Die lichtmikroskopisch beschriebene, ringförmige Anordnung der Endothelzellen wurde durch die transmissionselektronenmikroskopischen Beobachtungen bestätigt. Die Zellen dieser Ringe hatten eine rundliche Form mit runden oder ovalen Zellkernen. Rund um die Zellkerne war auch hier häufig der bereits beschriebene, organellenarme oder organellenfreie Raum zu sehen. An der Innenseite der Zellringe wiesen die Zellen lange (5-10  $\mu\text{m}$ ) und dünne, aber auch kürzere (1-2  $\mu\text{m}$ ) und dickere Ausstülpungen auf. Zwischen den Zellen bestanden stellenweise noch direkte Kontakte. Es bildeten sich jedoch vermehrt die beschriebenen Spalträume, die dann das fibrilläre Material enthielten. Mit der Vergrößerung der Spalträume kam es auch zur Vermehrung des fibrillären Materials. Ein Teil dieses Materials schien sich nicht direkt zwischen den Zellen auszuspannen, sondern streckte sich, wie in Abb. 53 zu sehen, an der Außenseite der Endothelzellringe entlang. Dadurch bildete das fibrilläre Material eine Art äußeren Ring um die innen gelegenen Endothelzellen.

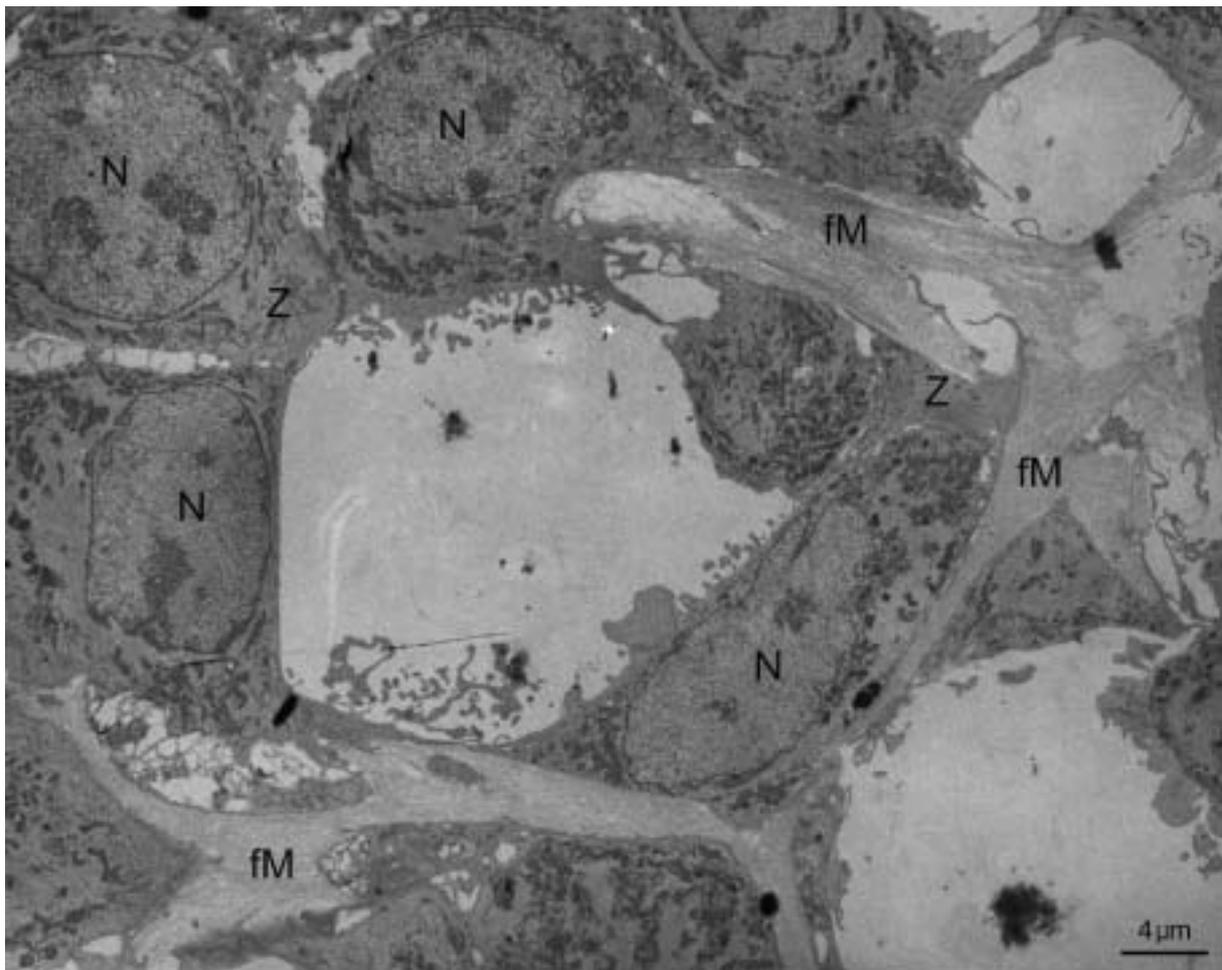


Abb. 53: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Ringförmig gelagerte Zellen. Zwischen den Zellen breitet sich fibrilläres Material (fM) aus und beginnt, einen Ring um die Zellen zu bilden. Nukleus (N), Zytoplasma (Z). TEM.

Das fibrilläre Material verband auch Zellen miteinander, die sich in den Zellringen auf gegenüberliegenden Seiten befanden. In Abb. 54 bilden vier Endothelzellen eine halbkreisförmige Anordnung, wobei nur die Kerne der beiden oben gelegenen Zellen angeschnitten sind. Der nach unten offene Halbkreis wird durch das fibrilläre Material geschlossen, das sich zwischen den beiden unteren, nur teilweise sichtbaren Zellen ausstreckt, im Durchschnitt 1  $\mu\text{m}$  breit ist und eine längs gerichtete Anordnung aufweist. Deutlich ist zu erkennen, dass das fibrilläre Material nicht frei im Raum liegt, sondern von langen Ausläufern der Zellen auf beiden Seiten umfasst wird.

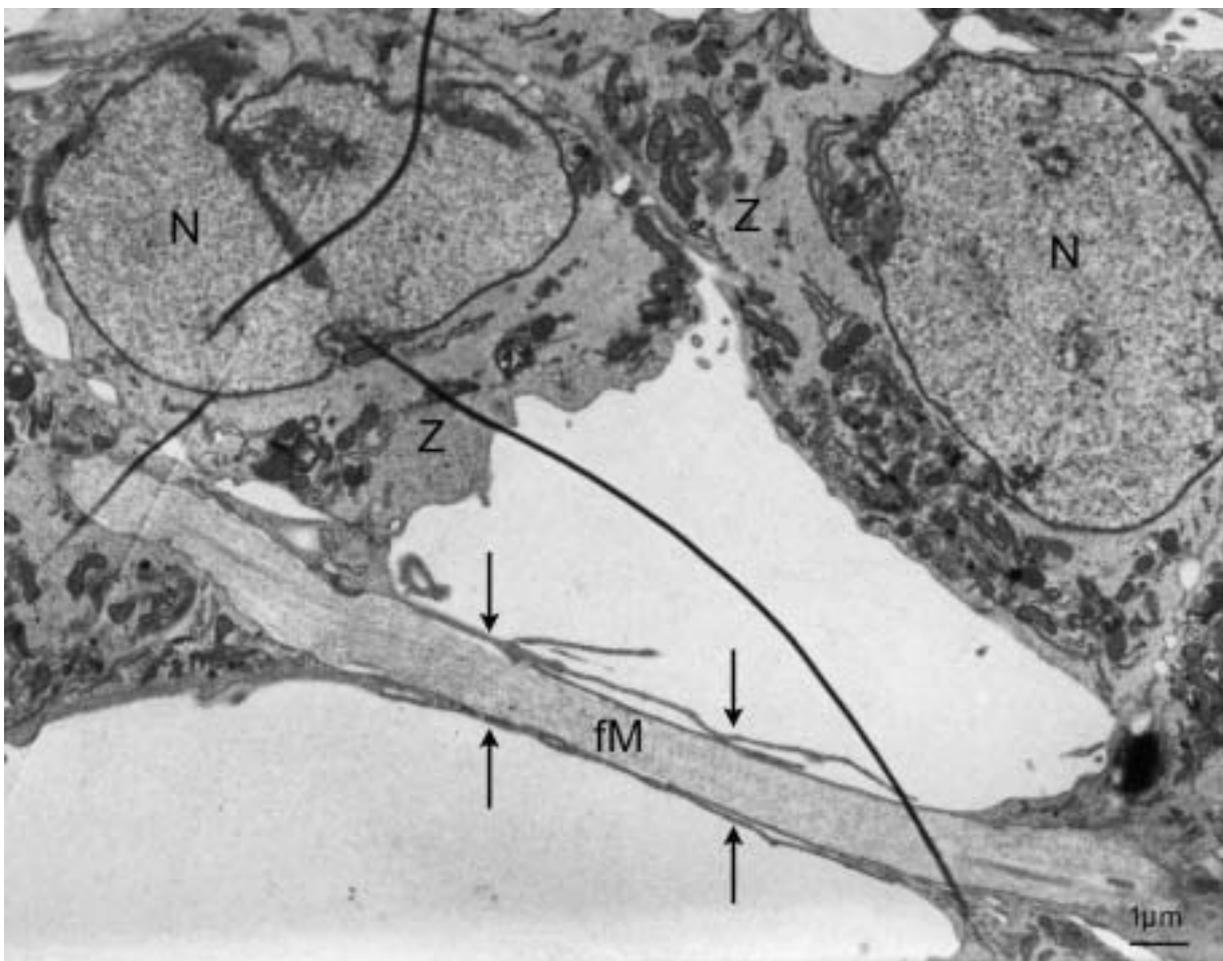


Abb. 54: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Zwischen zwei Zellen wird durch lange, dünne Zellausläufer ( ← ), die fibrilläres Material (fM) einschließen, eine Verbindung ausgebildet. Nukleus (N), Zytoplasma (Z). TEM.

Das fibrilläre Material, das den Abstand zwischen zwei Zellen überbrückte, war nicht nur im Bereich zwischen den Zellen zu finden, sondern es schien sich auch tief in die Zelle hineinzuziehen. In Abb. 55 ist zu sehen, dass sich der Ursprungsbereich der Strukturen in einer tiefen Einstülpung der Zelle befindet.

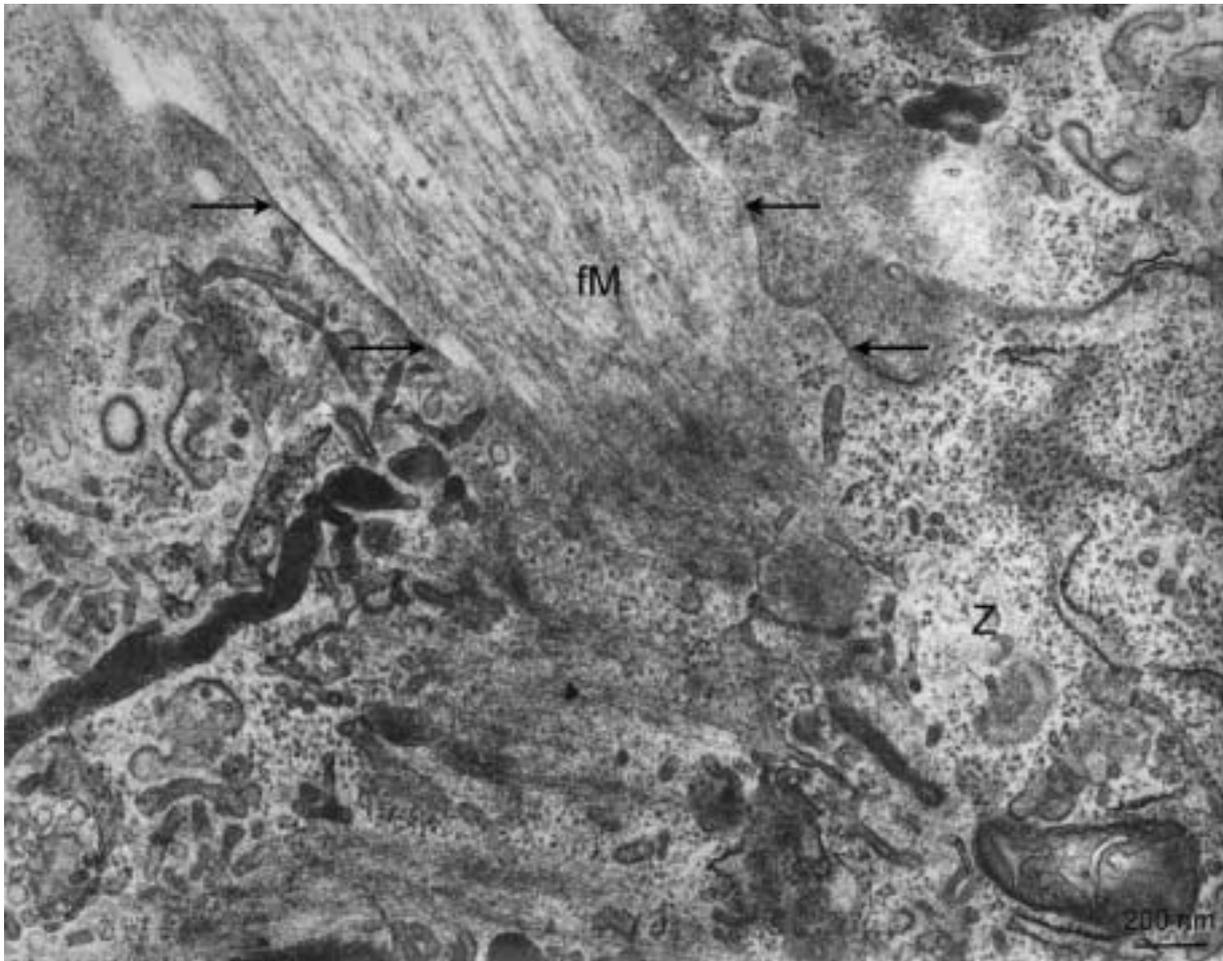


Abb. 55: Endothelzelle aus dem Corpus luteum in Rückbildung. In einer tiefen Einstülpung der Zellmembran ( ← ) liegt fibrilläres Material (fM). Zytoplasma (Z). TEM.

In diesen Bereichen war die Zellmembran stellenweise nicht mehr zu erkennen und es traten vermehrt kleine, bläschenförmige Invaginationen mit einem Durchmesser von 60-70 nm in der Zellmembran auf. Vesikel ähnlicher Größe wurden an solchen Stellen auch nahe der Zellmembran im Zytoplasma gefunden (Abb. 56, 57).

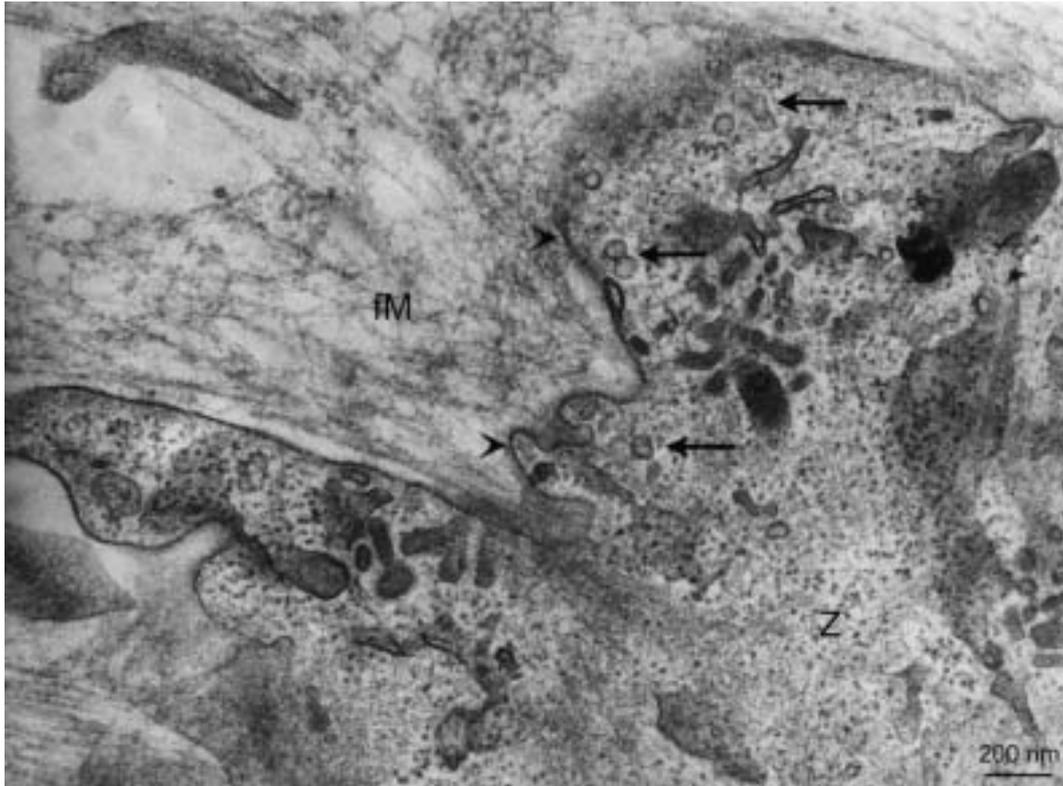


Abb. 56: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bläschenförmige Invaginationen und Vesikel (←) der Zellmembran (↘) nahe dem fibrillären Material (fM). Zytoplasma (Z). TEM.

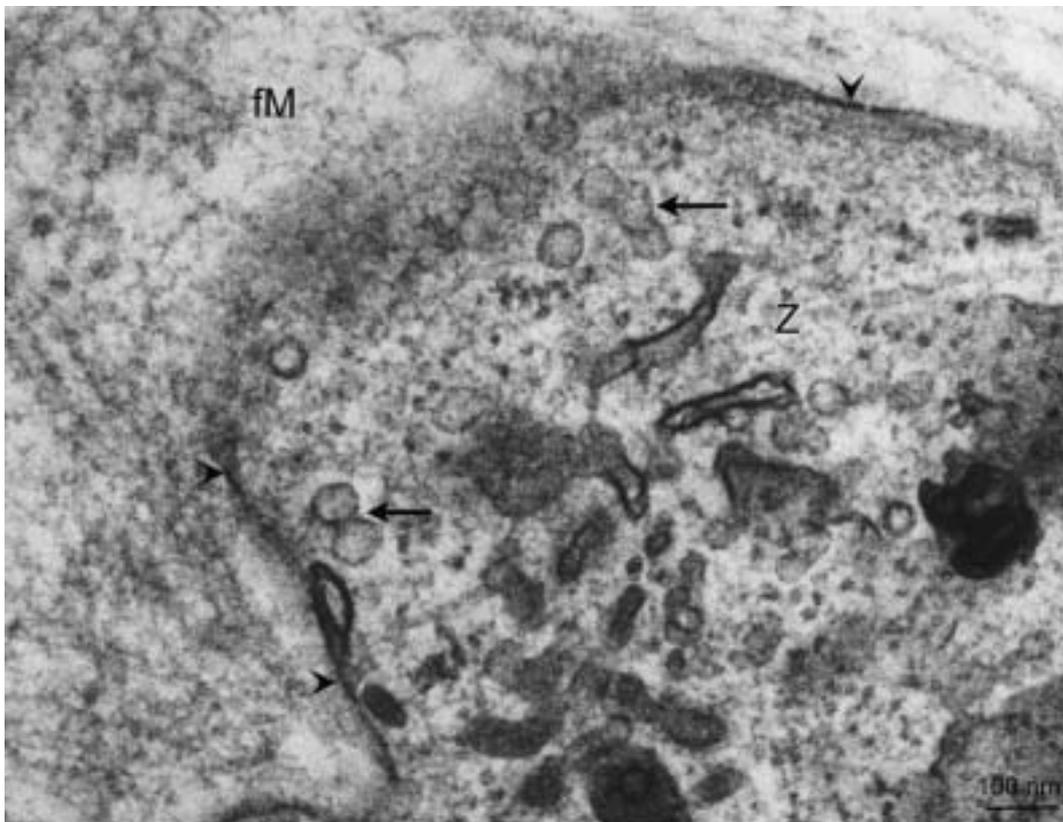


Abb. 57: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bläschenförmige Invaginationen und Vesikel (←) der Zellmembran (↘) nahe dem fibrillären Material (fM). Zytoplasma (Z). Ausschnitt aus Abb. 56. TEM.

Auch über längere Strecken hinweg konnte das oben beschriebene fibrilläre Material die Verbindung zwischen Zellen darstellen.

Im Abb. 58 ist im oberen Teil eine dreieckige Zelle zu sehen, die sich in zwei verschiedene Richtungen streckt. Sie zieht nach rechts oben und ist durch das fibrilläre Material, das hier zwischen 0,8 und 2  $\mu\text{m}$  misst, und die begleitenden, dünnen Ausläufer mit den Zellen im unteren Bereich des Bildes verbunden.

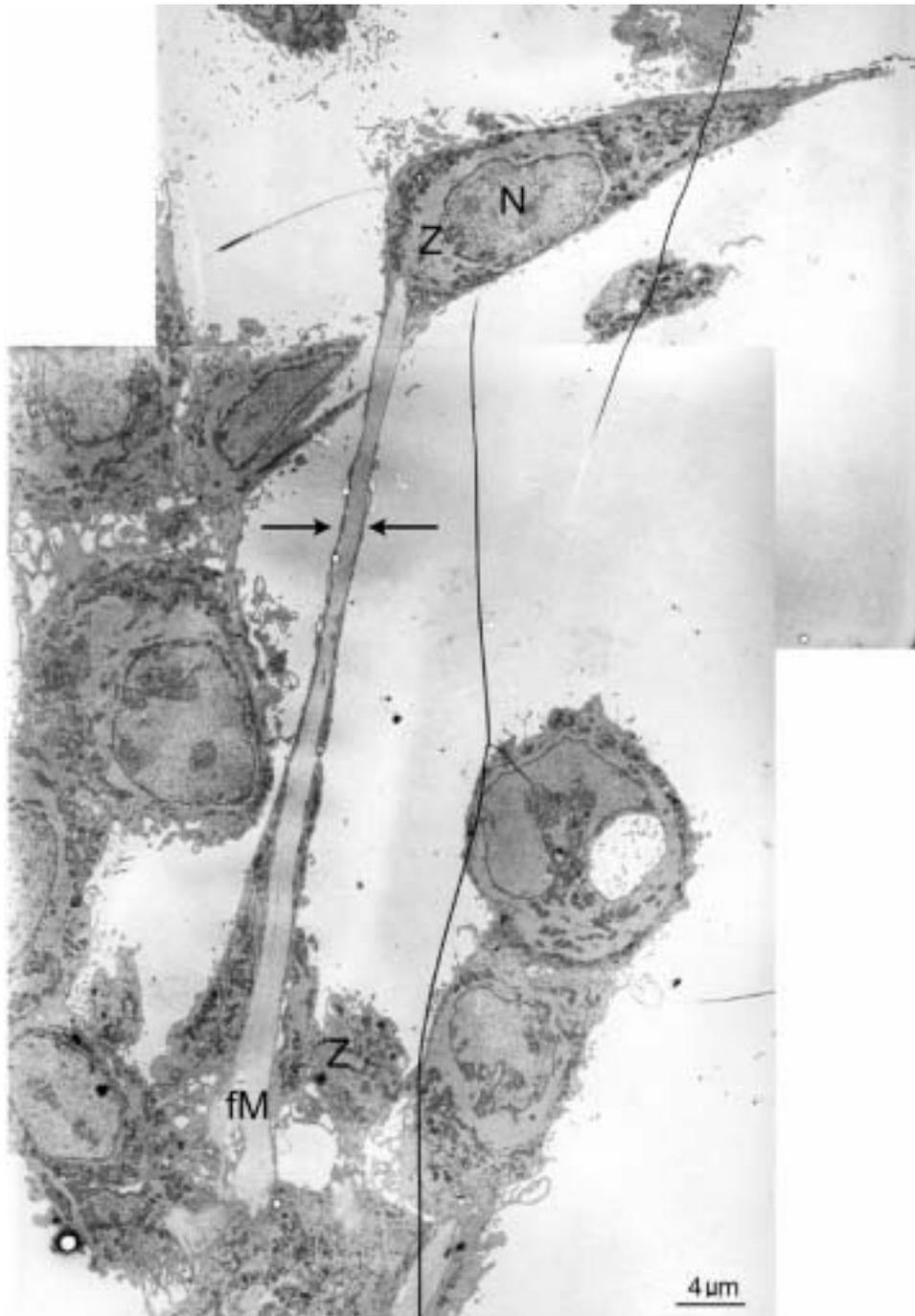


Abb. 58: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Lange, dünne Zellausläufer (←→), zwischen die fibrilläre Material (fM) gelagert ist, bilden eine Verbindung zwischen zwei Zellen. Nukleus (N). Zytoplasma (Z). TEM.

Die lichtmikroskopisch beobachteten soliden Stränge aus Endothelzellen konnten auch in den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden. Es traten Gruppierungen von Endothelzellen auf, bei denen sich langgestreckte Zellen aneinander reihten und Stränge bildeten. In der Mitte dieser Zellstränge befand sich ein Spaltraum, der mit fibrillärem Material gefüllt war (Abb. 59, 61). Die Zellkerne waren teilweise oval, größtenteils aber langgezogen und abgeplattet. Das Zytoplasma zeigte im Bereich der Zellkerne eine Vorwölbung nach der vom fibrillären Material abgewandten Seite der Zelle, die im Folgenden als Außenseite bezeichnet wird (Abb. 59). In Abb. 59 und 60 ist zu sehen, dass auf dieser Seite auch vermehrt kurze Ausstülpungen oder Falten auftraten, die sich teilweise zur Zelloberfläche zurückbogen und sich mit der Zellmembran zu verbinden schienen.

Auf der Seite der Zellen, die sich dem fibrillären Material zuwandte und im folgenden als Innenseite bezeichnet wird, war die Zellmembran glatt und gerade, streckenweise parallel zur Gegenseite verlaufend (Abb. 61).

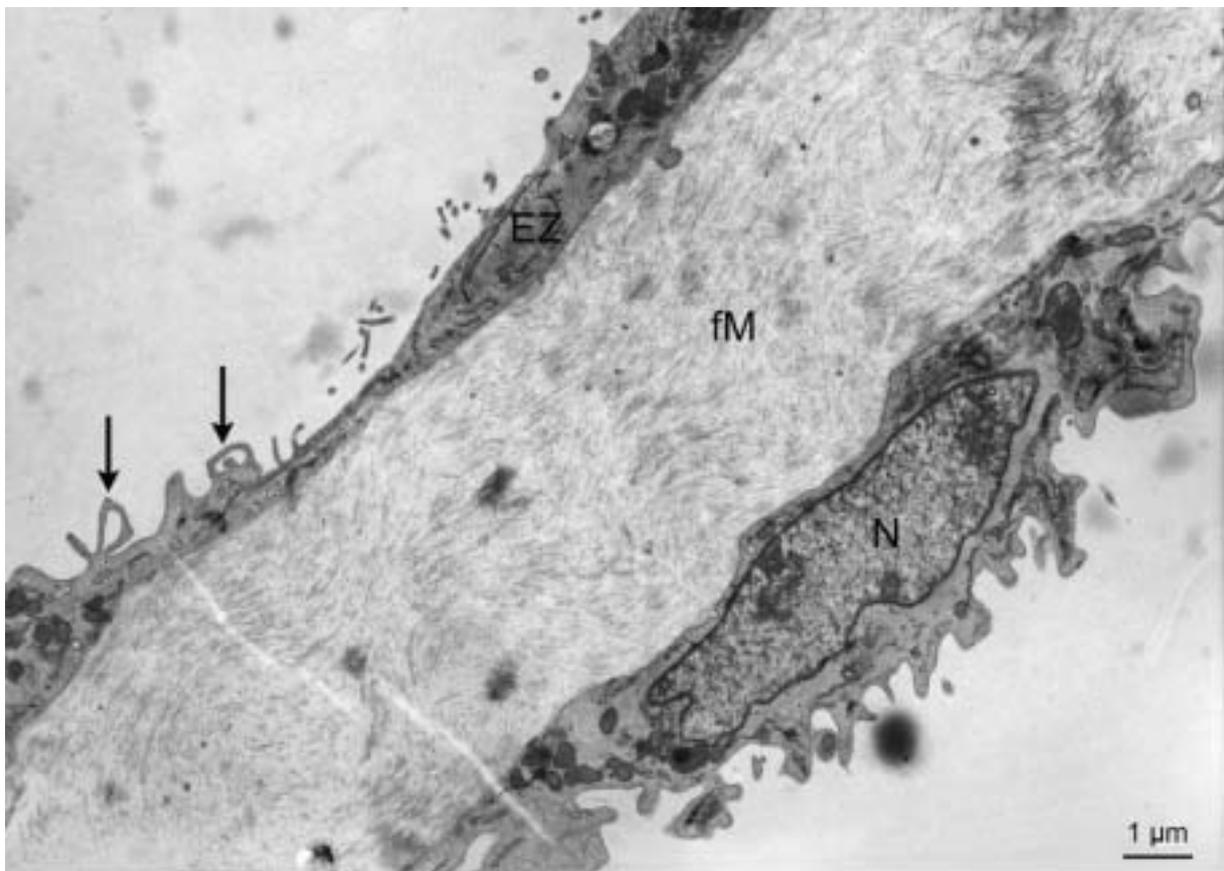


Abb. 59: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Zellstrang mit zentral gelegenem fibrillären Material (fM). Außen flache Endothelzellen (EZ) mit platten Kernen (N). Falten in der nach außen gerichteten Zellmembran ( ← ). TEM.

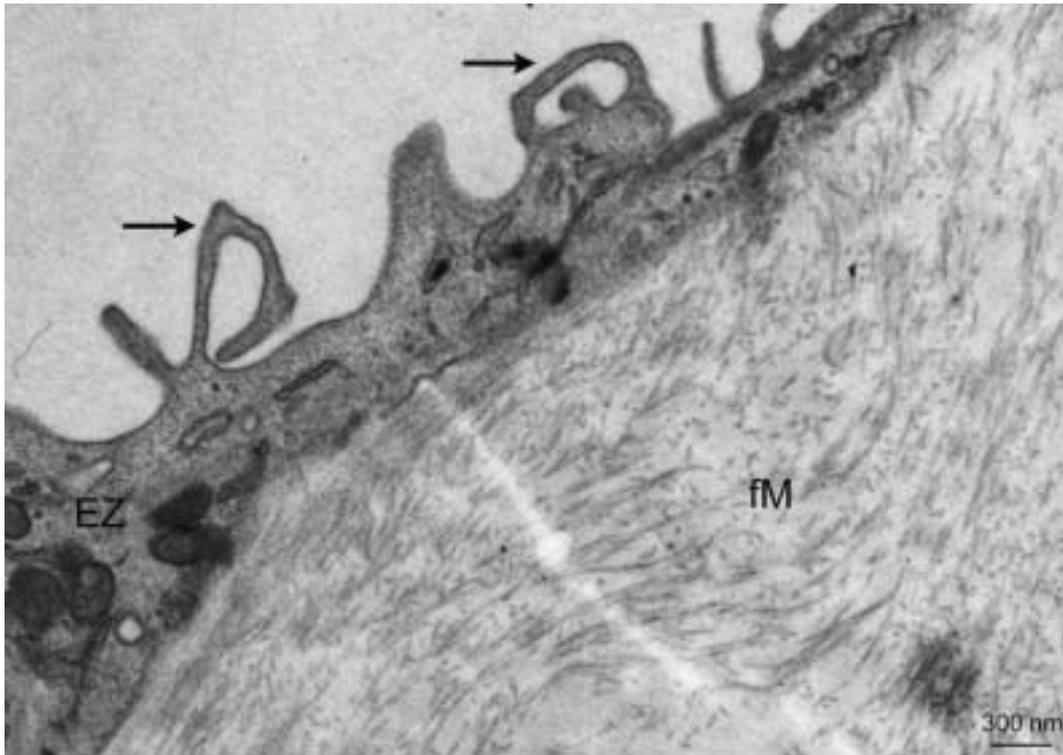


Abb. 60: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Zellstrang mit zentral gelegenem fibrillärem Material (fM). Außen flache Endothelzellen (EZ). Falten (→) in der nach außen gerichteten Zellmembran. Ausschnitt aus Abb. 59. TEM.

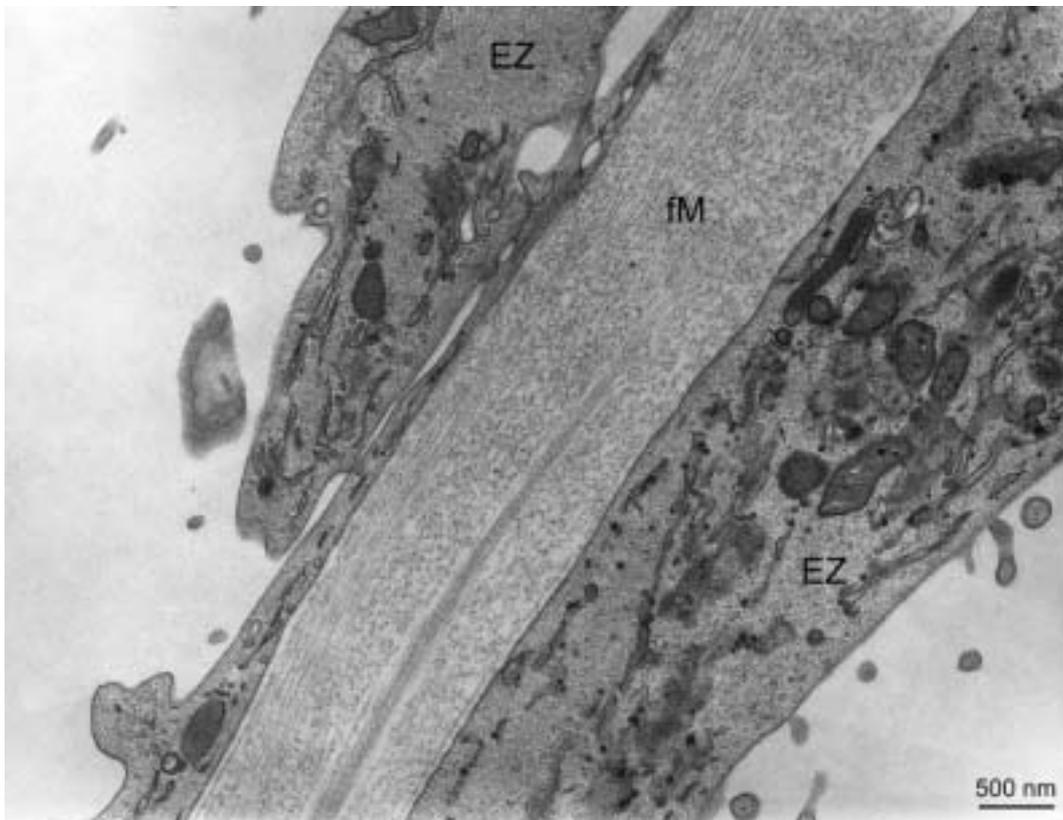


Abb. 61: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Zellstrang mit zentral gelegenem fibrillärem Material (fM) und außen flach anliegenden Endothelzellen (EZ). TEM.

An manchen Stellen wurde, wie in Abb. 62 und 63 zu erkennen, das fibrilläre Material nur auf einer Seite vom Zellkörper einer Zelle bedeckt. Von der Zelle der anderen Seite waren nur lange, dünne Ausläufer, die oft nur eine Duplikatur der Zellmembran darstellten, zu sehen. Das fibrilläre Material war in diesen Bereichen sehr schmal und maß zwischen 0,4 und 0,5  $\mu\text{m}$ .

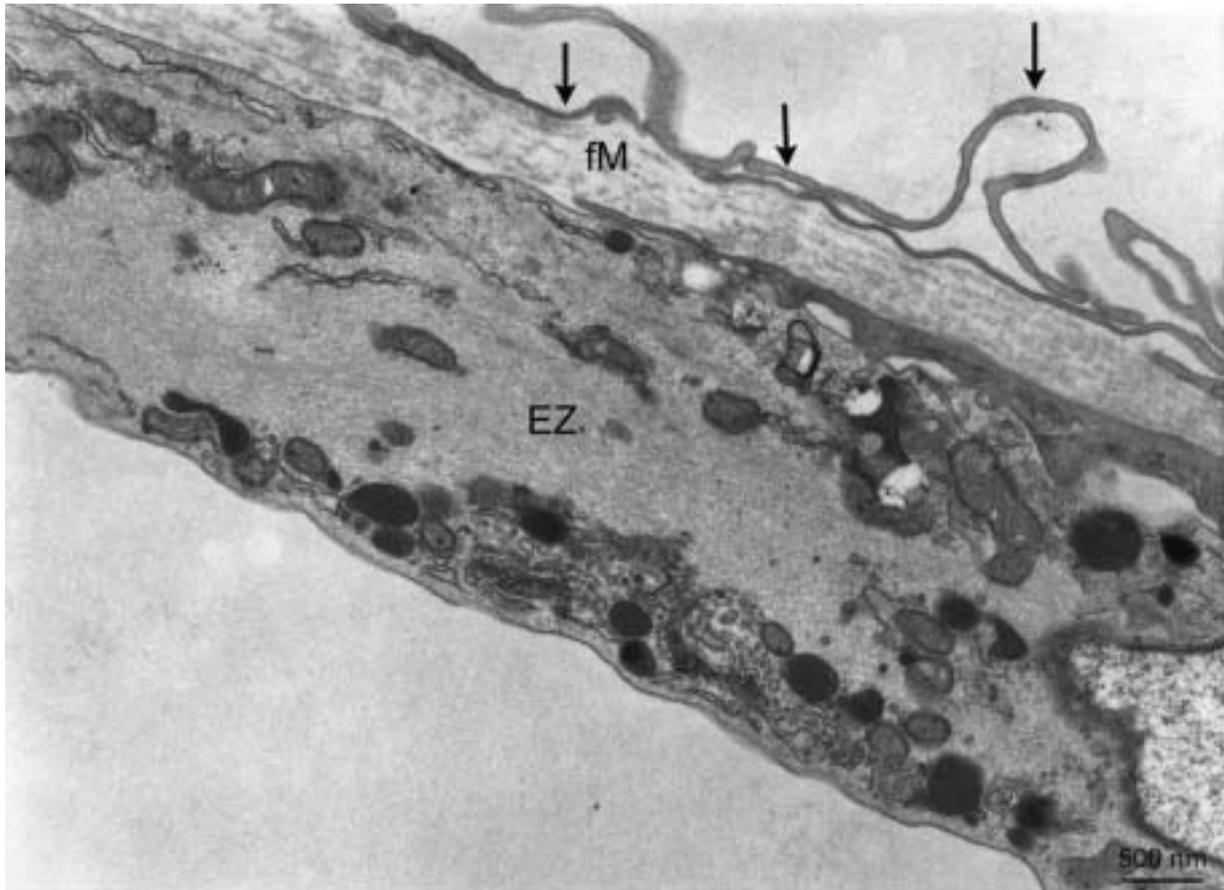


Abb. 62: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Lange dünne Zellausläufer (←) begrenzen das fibrilläre Material (fM) auf einer Seite; auf der anderen Seite liegt eine flache Endothelzelle (EZ). TEM.

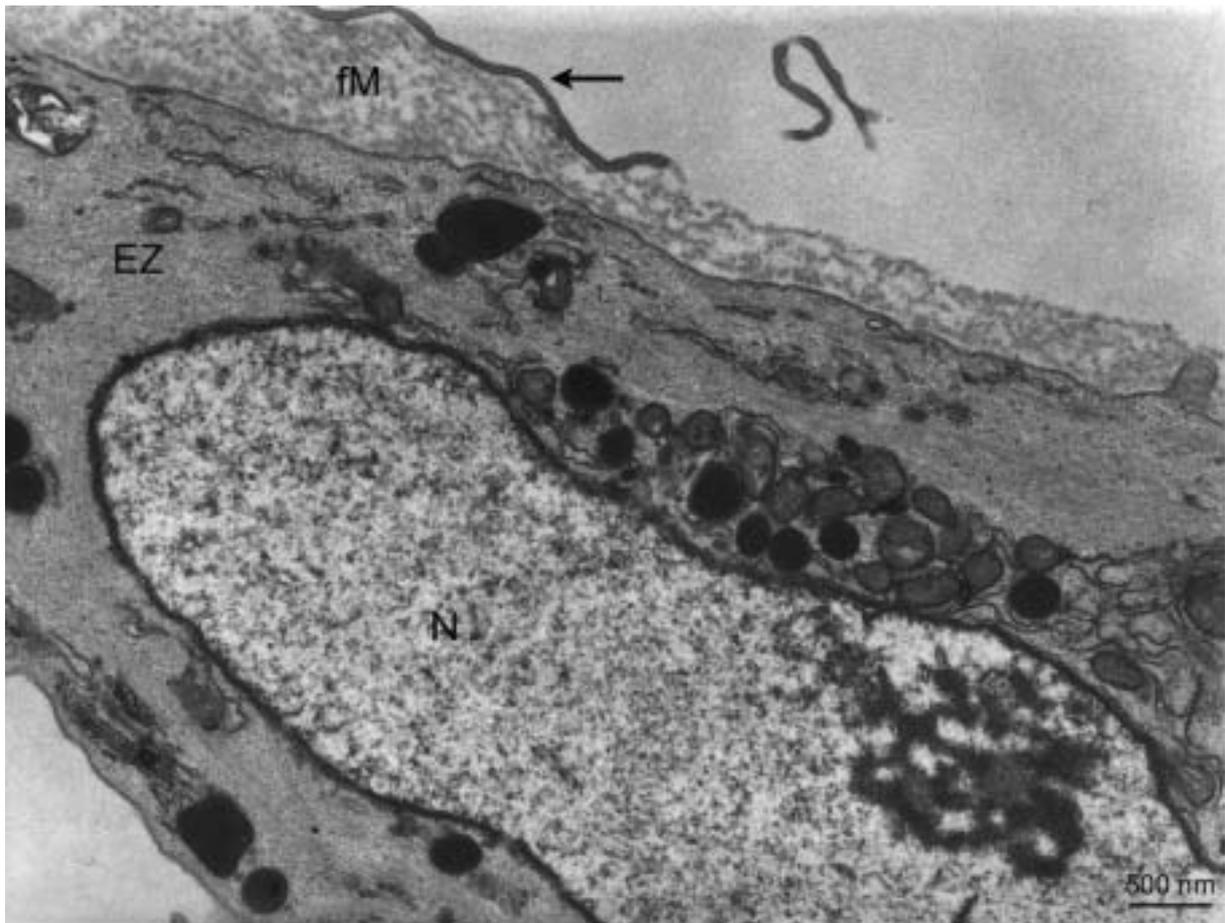


Abb. 63: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Auf einer Seite des fibrillären Materials (fM) befindet sich eine Endothelzelle (EZ) mit deutlichem Nukleus (N); auf der anderen Seite ist das Material nur teilweise von einem Zellausläufer ( ← ) bedeckt. TEM.

Je nach Schnittebene wirkte das fibrilläre Material unterschiedlich strukturiert. Wurden die Fasern eher quer getroffen ergab sich ein ungeordnetes, gekräuselteres Erscheinungsbild. In anderen Bereichen war die längsgerichtete, parallele Anordnung der Fasern zu den begleitenden Zellen oder Zellausläufern deutlich zu erkennen (Abb. 64).

Auch hier traten kleine, bläschenförmige Einstülpungen mit einem Durchmesser von 60-70 nm in der Zellmembran auf. Ähnliche Vesikel waren auch vollständig von der Zellmembran abgetrennt im Zytoplasma zu beobachten (Abb. 65, 66).

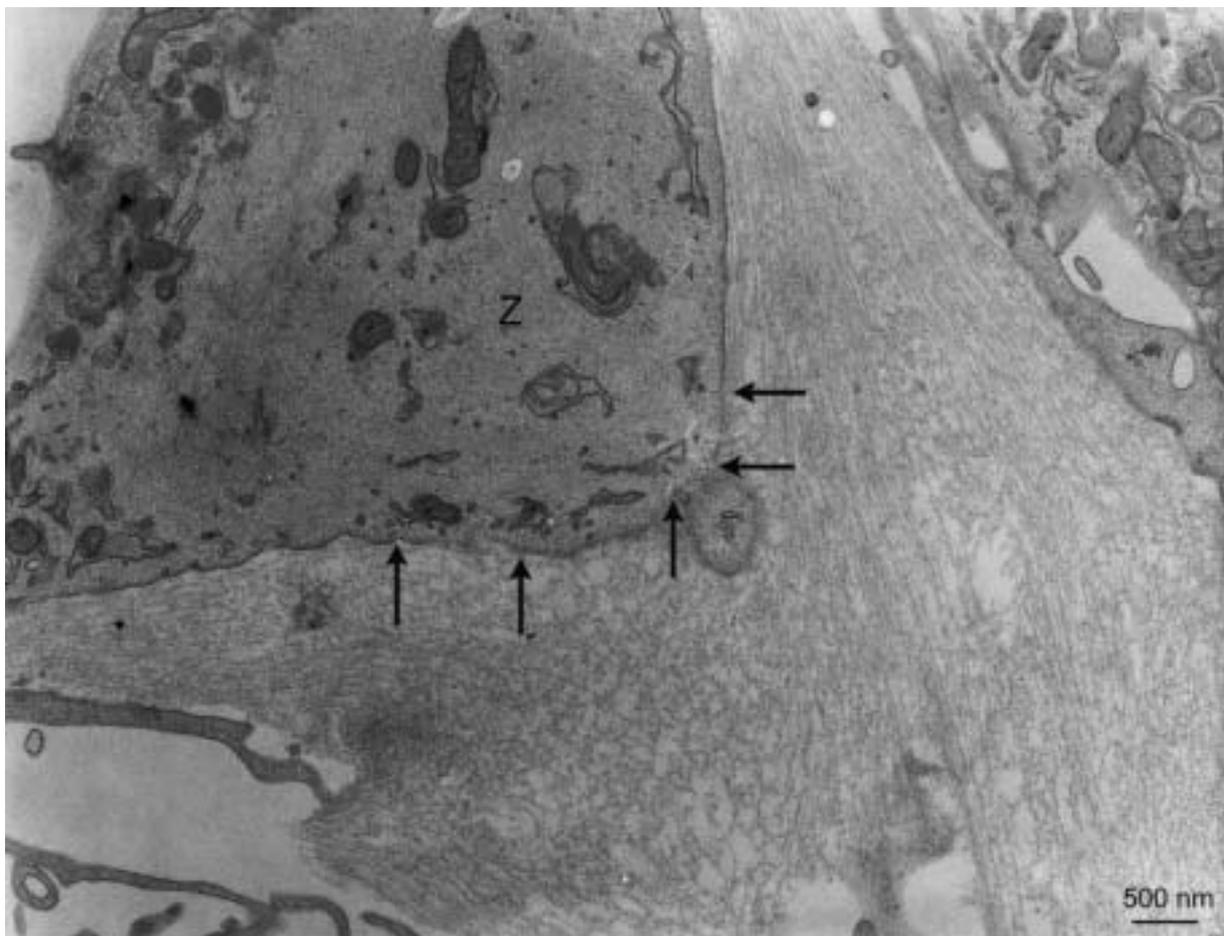


Abb. 64: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bläschenförmige Einschnürungen in der Zellmembran und Vesikel im Zytoplasma ( ← ). Zytoplasma (Z).TEM.

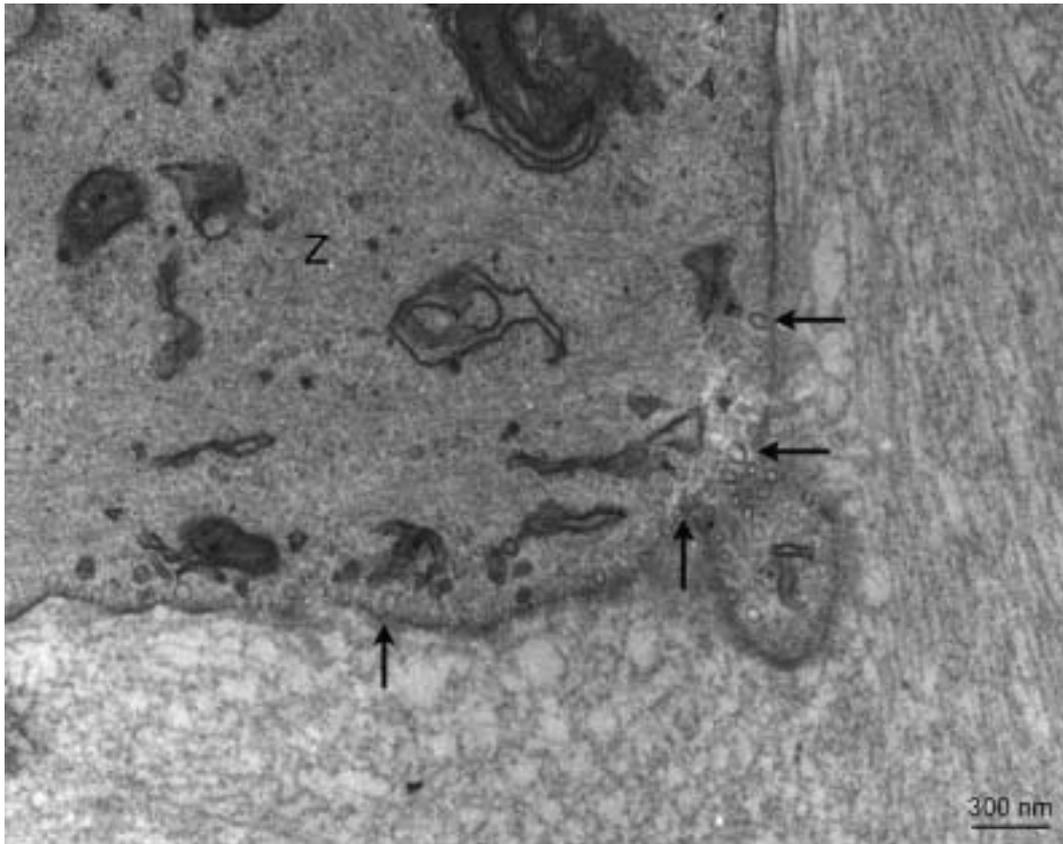


Abb. 65: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Bläschenförmige Einschnürungen der Zellmembran und Vesikel im Zytoplasma ( ← ). Zytoplasma (Z). Ausschnitt aus Abb. 64. TEM.

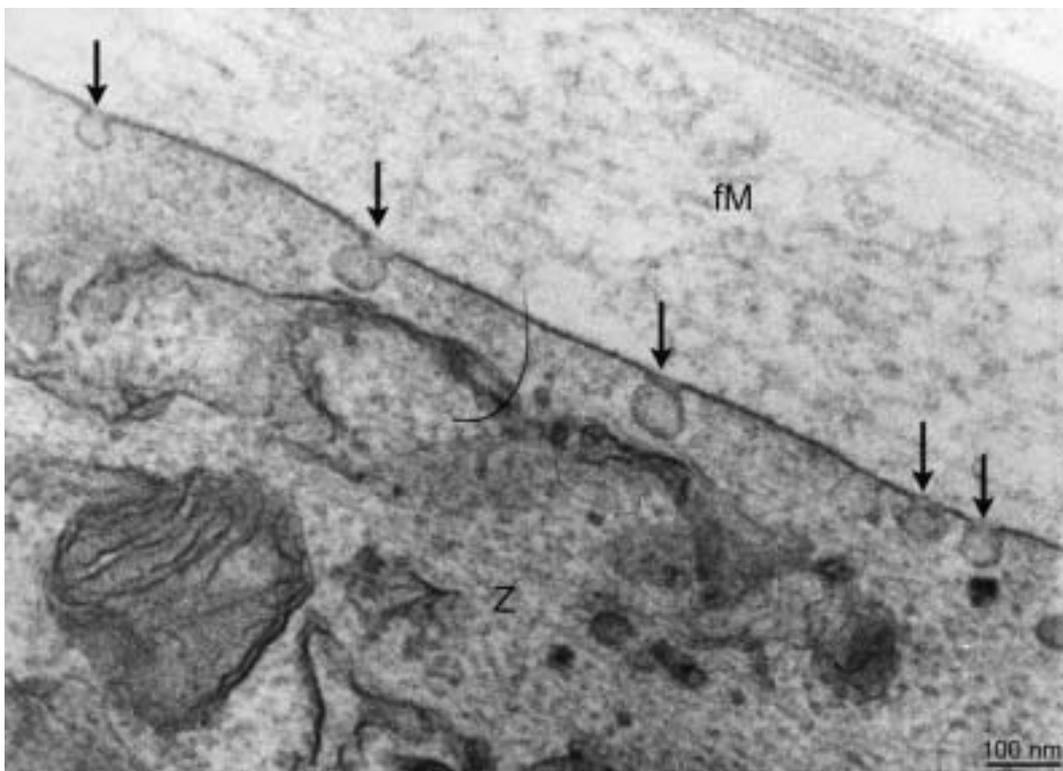


Abb. 66: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Auf der dem fibrilären Material (fM) zugewandten Zellseite bläschenförmige Einschnürungen in der Zellmembran und Vesikel im Zytoplasma ( ← ). Zytoplasma (Z). TEM.

In den beschriebenen Zellsträngen reihten sich manchmal auf jeder Seite des fibrillären Materials 10 und mehr Zellen der Länge nach aneinander. Der Zellkern wölbte sich von der Struktur weg zur Außenseite hin. Die Zellen einer Seite verbanden sich meist über lange und dünne, sich gegenseitig überlappende Ausläufer. Die Zellen der einen Seite lagen meist versetzt zu denen der anderen Seite. Das fibrilläre Material im Spalt bildeten eine mehrere  $\mu\text{m}$  dicke Schicht (Abb. 67).



Abb. 67: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Flache Endothelzellen (EZ) liegen einem Strang aus fibrillärem Material (fM) auf. TEM.

In Einzelfällen wurde beobachtet, dass die Zellen beider Seiten sich an beiden Enden der Zellstränge vereinigten und so das fibrilläre Material, das hier an einer Stelle eine Breite von 25  $\mu\text{m}$  erreichte, vollständig umschlossen (Abb. 68).



Abb. 68: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Flache Endothelzellen reihen sich an einem langen Strang aus fibrillärem Material auf. Aus vier Einzelbildern zusammengesetzt. TEM.

In Abb. 69 schließt eine Endothelzelle einen Hohlraum ein. Das bisher beschriebene fibrilläre Material ist darin nicht zu finden. Der Raum scheint bis auf mehrere etwa 0,5-1  $\mu\text{m}$  messende, längliche Strukturen leer zu sein. Da diese Zelle nur in einer Ebene angeschnitten ist, kann keine genaue Angabe über die Ausdehnung dieses Hohlraums gemacht werden.

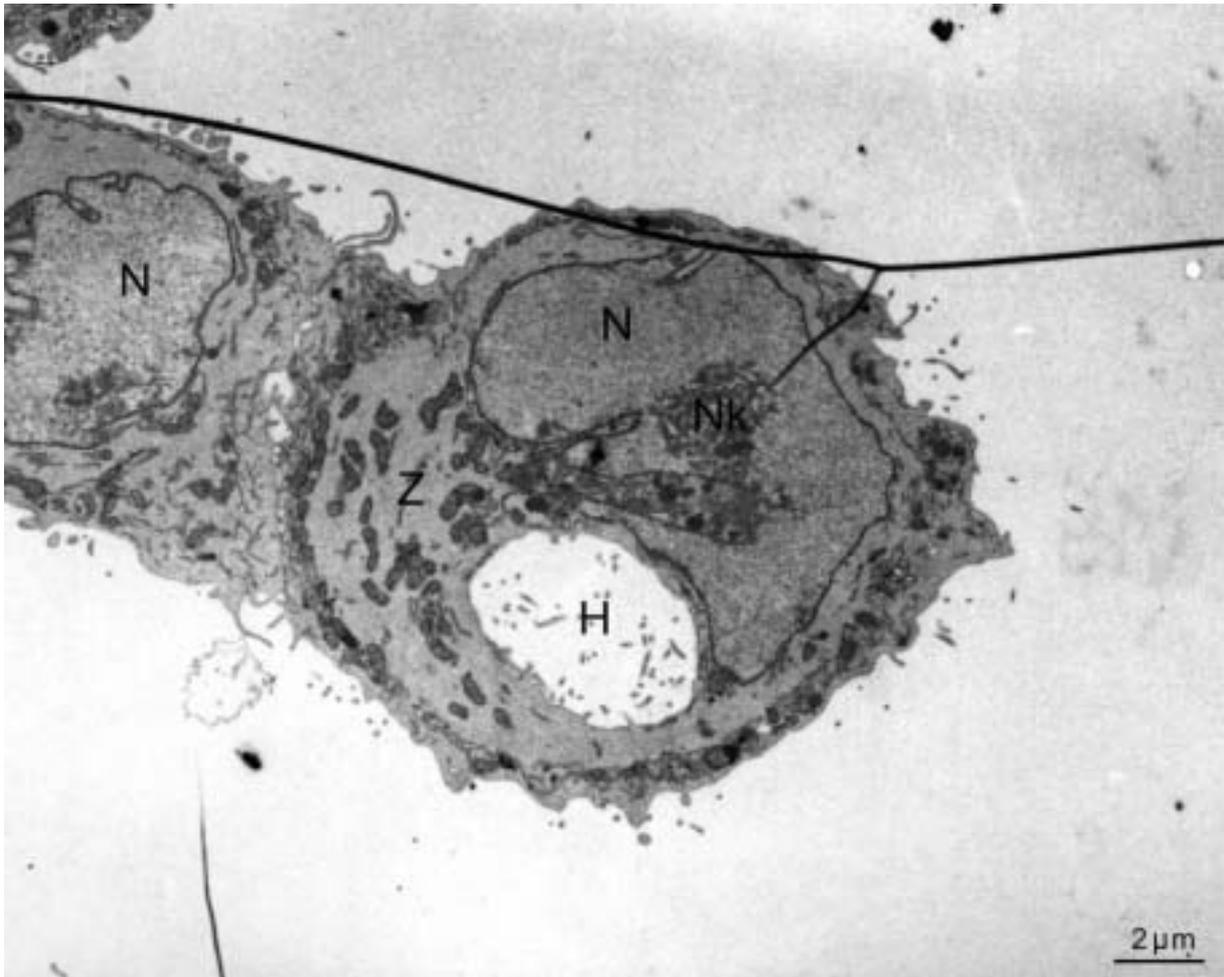


Abb. 69: Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung. Im Zytoplasma (Z) der Zelle befindet sich ein Hohlraum (H). Nukleus (N), Nukleolus (Nk). TEM.

#### 4.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In die molekularbiologischen Untersuchungen der Expression des VEGF, der Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie des GH-Rezeptors wurden zwei Gruppen von Endothelzellen einbezogen und in verschiedenen Stadien der Angiogenese untersucht.

Tabelle 6: Übersicht über die in der PCR verwendeten Zellkulturen

<b>Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte</b>	<b>Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung</b>	<b>Zeitspanne der Kultivierung</b>	<b>Stadium der Angiogenese</b>	<b>morphologische Beschreibung</b>
B1	R1	1 Monat	präangiogen	Kopfsteinpflastermuster
B2	R2	2 Monate	angiogen	Vernetzung, Ringbildung
B3	R3	5,5 Monate	angiogen	Ringbildung, solide Stränge
B4	-	5,5 Monate	post-angiogen	Rückbildung endothelialer Strukturen
-	R4	8 Monate		

Für die Versuche wurden die Zellen von einer Kulturfläche von 9,4 cm<sup>2</sup> verwendet. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte durch Auszählung im Hämocytometer (s. Punkt 3.6.1.). Die Konzentration und damit die Menge der insgesamt aus den Zellen isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt (s. Punkt 3.6.4.).

Tabelle 7: Übersicht über die Zellzahl und die insgesamt extrahierte RNA-Menge der für die PCR verwendeten Kulturen.

1	2	3	4	5	6	7
Zellart	Monate	Zellzahl in Mio.		RNA in µg		
	in Kultur	gesamt	pro cm <sup>2</sup>	gesamt	pro cm <sup>2</sup>	pro Mio. Zellen
<b>B1</b>	1	1,762	0,187	12,76	1,36	7,24
<b>B2</b>	2	4,220	0,449	4,97	0,53	1,18
<b>B3</b>	5,5	4,420	0,470	31,04	3,30	7,02
<b>B4</b>	5,5	1,750	0,186	26,69	2,84	15,25
<b>R1</b>	1	1,750	0,186	20,49	2,18	11,71
<b>R2</b>	2	3,200	0,340	5,03	0,54	1,57
<b>R3</b>	5,5	3,705	0,394	33,80	3,60	9,12
<b>R4</b>	8	2,081	0,221	21,08	2,24	10,13

Die Zellzahl pro cm<sup>2</sup> nahm im Verlauf der Angiogenese zu. Im Vergleich wiesen die Zellen, die die nach zwei Monaten in Kultur endotheliale Strukturen zeigten (B2, R2) eine fast um das zweifache höhere Zellzahl auf, als die Zellen, die einen Monat in Kultur waren und im Kopfsteinpflastermuster vorlagen (B1, R1). Im weiteren Verlauf der Angiogenese vermehrten sich die Zellen kaum noch, wie anhand der Zellzahlen der 5,5 Monate lang kultivierten Zellen (B3, R3) festzustellen ist (siehe Tabelle 7, Spalte 3).

Die Endothelzellkultur aus dem Corpus luteum in Blüte, die nach Entzug des Selektivmediums die endothelialen Strukturen zurückgebildet hatte (B4), wies eine sehr viel geringere Zellzahl auf, als die vergleichbare, 5,5 Monate alte angiogenetische Kultur (B3) (siehe Tabelle 7, Spalte 3).

Die aus den Zellen extrahierte RNA-Menge zeigte starke Schwankungen. Insbesondere die auffallend niedrigen Werte der Zellen, die 2 Monate in Kultur waren (B2, R2) könnten auf eine unvollständige Isolierung der RNA hinweisen.

Bei Vergleich der aus präangiogenen Endothelzellen (B1, R1) isolierten RNA-Menge mit der aus stark angiogenetischen Zellen (B3, R3) isolierten RNA-Menge war zu beobachten, dass im Verlauf der Angiogenese die Gesamtmenge und die Menge pro cm<sup>2</sup> Kulturfläche zwar zunahm (Tabelle 7, Spalte 5 und 6). Bezogen auf die Zellzahl kam es allerdings zu einer leichten Abnahme der extrahierten Gesamt-RNA (Tabelle 7, Spalte 7).

Für die weitere Verarbeitung in der Reversen Transkription wurde jeweils mit einer gleichbleibenden Menge von 2 µg Gesamt-RNA gearbeitet.

#### **4.4.1. Expression des VEGF**

Die RT-PCR des VEGF ergab ein PCR-Produkt von 296 bp (Abb. 70). Die Banden der Endothelzellen aus dem Gelbkörper in Blüte und in Rückbildung differierten nur geringfügig in der Stärke. Eine etwas stärkere Ausprägung zeigte die Expression des VEGF in den Zellen aus dem Corpus luteum in Blüte, die 1 (B1) bzw. 5,5 Monate (B3) in Kultur waren.

Die Sequenzierung des Fragments ergab eine Homologie von 100 % zu der entsprechenden bovinen Teilsequenz aus der Datenbank der National Center for Biotechnology Information des National Institute of Health, USA (NCBI). Das Segment wies über 254 Nukleotide auch eine vollkommene Übereinstimmung mit bovinem VEGF-B auf. Die letzten 42 Nukleotide am 3'-Ende unterschieden sich jedoch signifikant.

Der bisher identifizierte 3'-terminale Abschnitt des VEGF-B beträgt 802 bp und zeigt, nur durch drei kurze Sequenzen unterteilt, ansonsten zu 100 % Übereinstimmung mit VEGF. Ein 50bp-große Sequenz, in dem VEGF-B und VEGF keine Homologie aufweisen, befindet sich zwischen dem 1. und 2. Segment des VEGF-B.

Der erste Primer band an einen Abschnitt der DNA, in dem VEGF und VEGF-B Übereinstimmung zeigten. Der zweite Primer dagegen hybridisierte mit der DNA im Bereich der erwähnten 50bp-großen Sequenz, in der VEGF und VEGF-B sich unterscheiden.

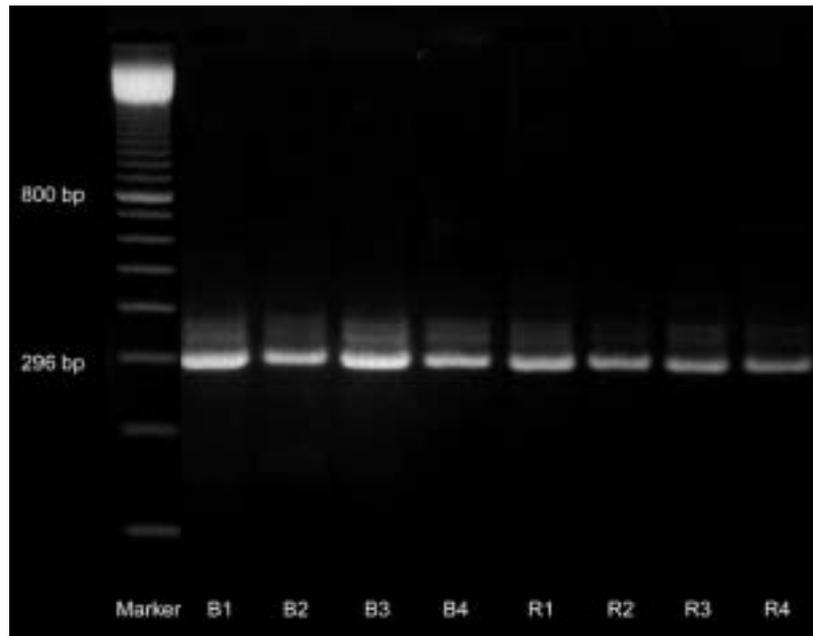


Abb. 70: Expression des Vascular Endothelial Growth Factor:  
Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte:  
präangiogen (B1), beginnende Angiogenese (B2),  
länger anhaltende Angiogenese (B3), Rückbildung  
endothelialer Strukturen durch Entzug des Selektiv-  
mediums (B4).  
Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung:  
präangiogen (R1), beginnende Angiogenese (R2),  
länger anhaltende Angiogenese (R3), Rückbildung  
endothelialer Strukturen in Langzeitkultur (R4).

#### 4.4.2. Expression des VEGFR-1

Bei der RT-PCR des VEGFR-1 trat ein Produkt von 351 bp auf (Abb. 71). Zwischen den Zellen des Corpus luteum in Blüte und in Rückbildung konnte bezüglich der Ausprägung der Banden kein Unterschied festgestellt werden. Auch in den Endothelzellen der verschiedenen Stadien der Angiogenese differierten die Banden kaum.

Einzig die Zellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, die noch keine Angiogenese zeigten (R1), wiesen eine gegenüber den übrigen Gruppen deutlich erhöhte Ausprägung der Banden auf. Die Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte vor Beginn der Angiogenese (B1) zeigte dagegen keine stärkere Bande.

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

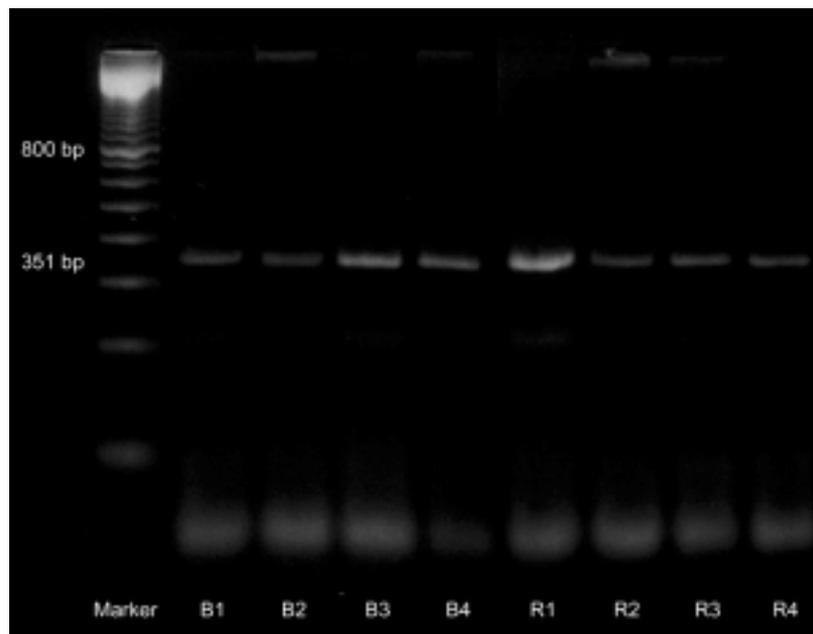


Abb. 71: Expression des VEGFR-1:  
 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte:  
 präangiogen (B1), beginnende Angiogenese (B2),  
 länger anhaltende Angiogenese (B3), Rückbildung  
 endothelialer Strukturen durch Entzug des Selektiv-  
 mediums (B4).  
 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung:  
 präangiogen (R1), beginnende Angiogenese (R2),  
 länger anhaltende Angiogenese (R3), Rückbildung  
 endothelialer Strukturen in Langzeitkultur (R4).

#### 4.4.3. Expression des VEGFR-2

Die RT-PCR für den VEGFR-2 ergab ein PCR-Produkt von 250 bp. Die Banden der Endothelzellen aus dem Gelbkörper in Blüte und in Rückbildung differierten nur geringgradig. Eine verstärkte Bande wiesen die Zellen des Corpus luteum in Blüte, die seit 5,5 Monaten kultiviert wurden (B3), auf.

Verglichen mit VEGFR-1 waren die Banden des VEGFR-2 geringgradig stärker ausgeprägt (Abb. 72).

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

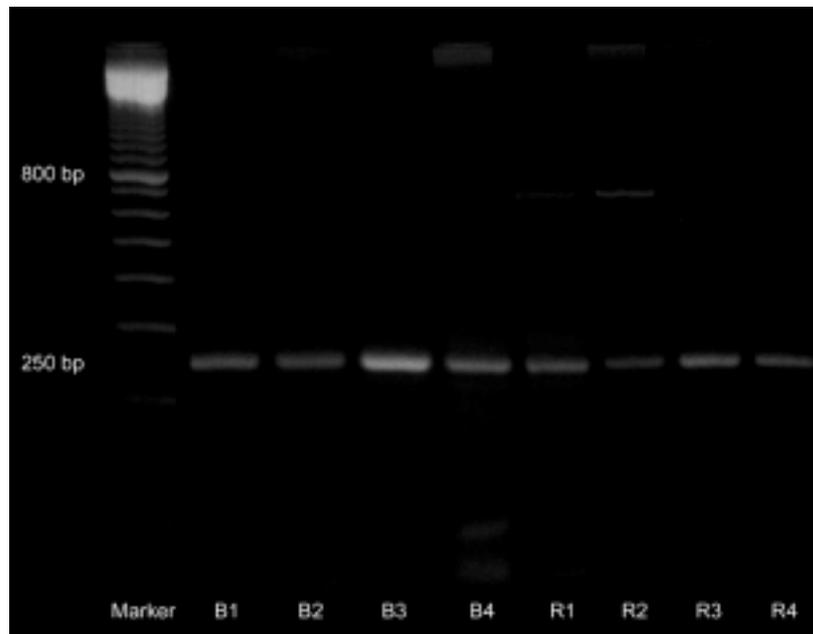


Abb. 72: Expression des VEGFR-2:  
 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte:  
 präangiogen (B1), beginnende Angiogenese (B2),  
 länger anhaltende Angiogenese (B3), Rückbildung  
 endothelialer Strukturen durch Entzug des Selektiv-  
 mediums (B4).  
 Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung:  
 präangiogen (R1), beginnende Angiogenese (R2),  
 länger anhaltende Angiogenese (R3), Rückbildung  
 endothelialer Strukturen in Langzeitkultur (R4).

#### 4.4.4. Expression des Wachstumshormon-Rezeptors

Die RT-PCR des Growth-Hormone-Rezeptors erbrachte das erwartete Produkt von 487 bp (Abb. 73). Dieses konnte in allen untersuchten Kulturen nachgewiesen werden. Die Expression war außerordentlich deutlich, so dass im Elektrophorese-gel zuerst eine zu starke Bande auftrat. Durch Verminderung der verwendeten cDNA auf etwa ein Drittel der zuvor verwendeten Menge (Reduzierung von 4 µl auf 1,3 µl cDNA) konnte eine exakte Bande abgebildet werden.

Hinsichtlich der Ausprägung der Banden wurde festgestellt, dass unter identischen Bedingungen die Zellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung grundsätzlich etwas stärkere Banden zeigten als die des Corpus luteum in Blüte. Innerhalb der beiden Gruppen aus dem bovinen Corpus luteum in Blüte und in Rückbildung waren jedoch kaum Unterschiede in den verschiedenen Wachstumsphasen der Zellen festzustellen.

Die Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte zeigten in den untersuchten Stadien keine deutlichen Unterschiede in der Expression von GHR. Auch die Endothelzellen, die nach Entzug des Selektivmediums die endothelialen Strukturen zurückgebildet hatten (B4), wiesen eine mit den restlichen Zellen übereinstimmende Bande auf.

Bei den Endothelzellen aus dem Gelbkörper in Rückbildung traten ebenfalls relativ gleichmäßige Banden auf. Eine leicht verstärkte Expression wiesen die Zellen auf, die 5,5 Monate in Kultur waren und in vitro-Angiogenese zeigten (R3). Die Bande der 8 Monate alten Langzeitkultur (R4) war dagegen schmaler und unterschied sich kaum von den beiden anderen Banden (R1 und R2).

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

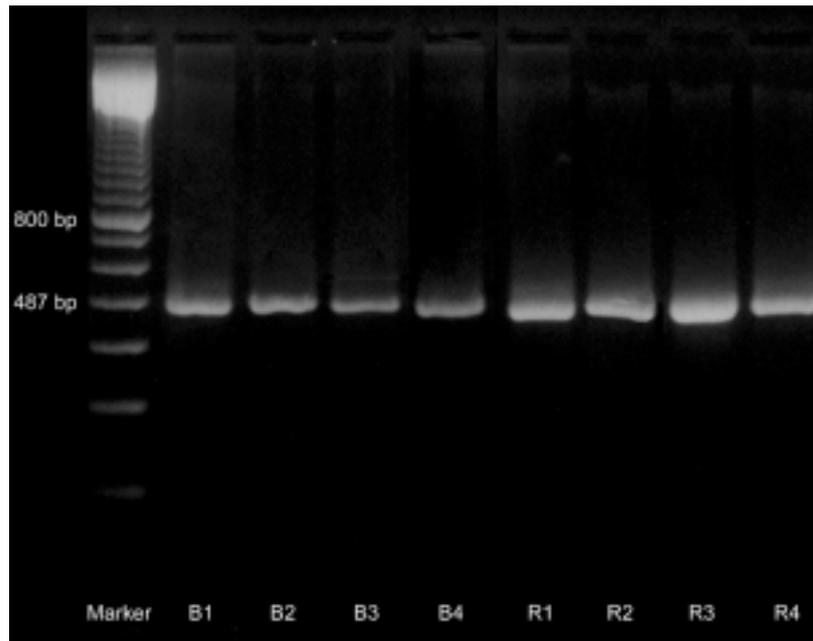


Abb. 73: Expression des Wachstumshormon-Rezeptors:  
Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte:  
präangiogen (B1), beginnende Angiogenese (B2), länger  
anhaltende Angiogenese (B3), Rückbildung endothelialer  
Strukturen durch Entzug des Selektivmediums (B4).  
Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung:  
präangiogen (R1), beginnende Angiogenese (R2), länger  
anhaltende Angiogenese (R3), Rückbildung endothelialer  
Strukturen in Langzeitkultur (R4).