

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
in Kooperation mit dem
Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mahtab Bahramsoltani
Tierärztin aus Hannover

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2792

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Weiß
Dritter Prüfer: Univ.-Prof. Dr. K. Müller

Deskriptoren: angiogenesis, antiangiogenesis, in vitro-model,
quantitation, morphometry

Tag der Promotion: 06. Februar 2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Dissertation, Freie Universität Berlin, 2003

ISBN 3-89820-670-X

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

This document is protected by **copyright**.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of Mensch & Buch Verlag.

© **MENSCH & BUCH VERLAG**, Berlin 2004

Nordendstr. 75, 13156 Berlin • 030 - 45 49 48 66

<http://www.menschundbuch.de> • info@menschundbuch.de

1	<u>Einleitung</u>	<u>8</u>
2	<u>Literaturübersicht</u>	<u>10</u>
2.1	Blutgefäße	10
2.1.1	Endothel	10
2.1.2	Perizyten	11
2.1.3	Basalmembran	12
2.2	Angiogenese und Antiangiogenese	13
2.2.1	Mechanismen der Blutgefäßbildung	13
2.2.1.1	Vaskulogenese	13
2.2.1.2	Angiogenese	14
2.2.1.2.1	Bildung des Endothelzellsprosses	15
2.2.1.2.2	Bildung eines Lumens	15
2.2.1.2.3	Intussuszeption	17
2.2.2	Regulation der Angiogenese	17
2.2.2.1	Proangiogene Faktoren	17
2.2.2.2	Wirkung der wichtigsten endogenen proangiogenen Faktoren	18
2.2.2.3	Antiangiogene Faktoren	20
2.2.2.4	Wirkung der wichtigsten endogenen antiangiogenen Faktoren	20
2.2.3	Physiologische Angiogenese	21
2.2.4	Pathophysiologische und pathologische Angiogenese	22
2.2.5	Therapeutische Einsatzmöglichkeiten der Angiogenese und Antiangiogenese	23
2.3	Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese	24
2.3.1	Forderungen für die Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese	24

2.3.2	Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in in vivo-Modellen	25
2.3.2.1	Cornea-Modell	26
2.3.2.2	Chorioallantoismembran-Modell	28
2.3.2.3	Mesenterialfenster-Modell	31
2.3.2.4	Dauerfenster-Modelle	33
2.3.2.5	Subkutanes Luftsack-Modell	35
2.3.2.6	Modelle mit Hautpräparationen	36
2.3.2.7	Sonographie-Modell	39
2.3.3	Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in ex vivo-Modellen	41
2.3.4	Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese in in vitro-Modellen	43
2.3.4.1	Quantifizierung der Migration von Endothelzellen	43
2.3.4.1.1	Die Boyden-Kammer	43
2.3.4.1.2	„Scratch Wound Assay“	45
2.3.4.1.3	„Radial Invasion of Matrix by Aggregated Cells“ (strahlenförmige Invasion aggregierter Zellen in eine Matrix)	45
2.3.4.2	Quantifizierung der Proliferation von Endothelzellen	46
2.3.4.2.1	Kolorimetrische Untersuchungen	46
2.3.4.2.2	Aufnahme von [³ H]Thymidin	47
2.3.4.2.3	Coulter Counter	48
2.3.4.3	Quantifizierung der durch Endothelzellen in vitro gebildeten Strukturen	48
2.3.4.3.1	Zweidimensionale Modelle der in vitro-Angiogenese	49
2.3.4.3.2	Dreidimensionale Modelle der in vitro-Angiogenese	50
3	<u>Zellen und Materialien</u>	53
3.1	Zellen	53

3.2	Lösungen für die Zellkultur	53
3.3	Kulturmedien	54
3.3.1	Zusammensetzung des Erhaltungsmediums (DMEM+)	54
3.3.2	Zusammensetzung des Selektivmediums (P0)	54
3.4	Lösliche pro- und antiangiogene Faktoren	55
3.5	Chemikalien	55
3.6	Lösungen für transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	56
3.6.1	Cacodylat-Puffer	56
3.6.2	Karnovsky-Lösung	57
3.6.3	Kontrastierungslösung	57
3.6.4	Epon	58
3.6.5	Richardson-Lösung	57
3.7	Antikörper	58
3.8	Apoptose Kit: ApoAlert Annexin V-EGFP	58
3.9	Verbrauchsmaterialien	58
3.10	Geräte und Software	59
<u>4</u>	<u>Methoden</u>	61
4.1	Zellkultur	61
4.1.1	Kultivierung der Endothelzellen	61
4.1.2	Kryokonservierung der Endothelzellen	61
4.2	Morphometrische Untersuchungen	62
4.2.1	Das Bildbearbeitungssystem Axiovision	62
4.2.2	Morphometrie der kapillarähnlichen Strukturen	64
4.3	Immunzytochemische Untersuchung zum Nachweis von Kollagen Typ IV	65

4.4	Nachweis von Apoptose bei kultivierten Endothelzellen	66
4.5	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	66
<u>5</u>	<u>Eigene Untersuchungen</u>	<u>68</u>
5.1	Angiogenese in vitro	68
5.1.1	Ablauf der angiogenen Kaskade	68
5.1.2	Definition "kapillarähnliche Strukturen"	70
5.1.3	Stadien der angiogenen Kaskade	71
5.1.3.1	Stadium 1: Konfluenten Monolayer	71
5.1.3.2	Stadium 2: Aussprossung, frühe Phase	72
5.1.3.3	Stadium 3: Aussprossung, späte Phase	73
5.1.3.4	Stadium 4: Lineare Aneinanderreihung, frühe Phase	73
5.1.3.5	Stadium 5: Lineare Aneinanderreihung, späte Phase	74
5.1.3.6	Stadium 6: Netzwerkbildung	75
5.1.3.7	Stadium 7: Dreidimensionale Organisation, frühe Phase	76
5.1.3.8	Stadium 8: Dreidimensionale Organisation, späte Phase	77
5.2	Validierung der Quantifizierung der Angiogenese in vitro	78
5.2.1	Semiquantitative Untersuchung der Angiogenese durch verschiedene Untersucher	79
5.2.2	Semiquantitative Untersuchung der Angiogenese in verschiedenen Bildausschnitten von Kulturschalen	82
5.3	Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro	87
5.3.1	Voruntersuchung zur Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro	87
5.3.2	Semiquantitative Untersuchung der Wirkung proangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro	93

5.4	Quantifizierung der Wirkung antiangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro	100
5.4.1	Voruntersuchung zur Quantifizierung der Wirkung antiangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro	100
5.4.2	Semiquantitative Untersuchung der Wirkung antiangiogener Faktoren auf die Angiogenese in vitro	108
5.5	Morphometrische Untersuchung der Angiogenese in vitro	113
5.5.1	Gemessene Größen	115
5.5.2	Aus den Messwerten berechnete Größen	121
5.6	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Angiogenese in vitro	126
5.6.1	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Endothelzellen in den Stadien 2 und 3 der Angiogenese in vitro	126
5.6.2	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Endothelzellen in den Stadien 5 und 6 der Angiogenese in vitro	129
5.6.3	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Endothelzellen in den Stadien 7 und 8 der Angiogenese in vitro	133
5.7	Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ IV im Ablauf der Angiogenese in vitro	138
5.7.1	Nachweis von Kollagen Typ IV im Stadium 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro	139
5.7.2	Nachweis von Kollagen Typ IV im Stadium 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro	140
5.7.3	Nachweis von Kollagen Typ IV im Stadium 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro	141
5.7.4	Nachweis von Kollagen Typ IV im Stadium 7 bzw. 8 der Angiogenese in vitro	142
5.7.5	Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises von Kollagen Typ IV im Ablauf der Angiogenese in vitro	143
5.8	Nachweis von Apoptose im Ablauf der Angiogenese in vitro	144
5.8.1	Nachweis von Apoptose im Stadium 1 bzw. 2 der Angiogenese in vitro	145

5.8.2	Nachweis von Apoptose im Stadium 3 bzw. 4 der Angiogenese in vitro	146
5.8.3	Nachweis von Apoptose im Stadium 5 bzw. 6 der Angiogenese in vitro	147
5.8.4	Nachweis von Apoptose im Stadium 7 bzw. 8 der Angiogenese in vitro	148
5.8.5	Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises von Apoptose im Ablauf der Angiogenese in vitro	149
6	<u>Diskussion</u>	150
6.1	Beurteilung der validierten Methode zur Quantifizierung der Angiogenese in vitro	151
6.1.1	Prüfung der Einschätzung der Stadien der Angiogenese in vitro durch verschiedene Untersucher	151
6.1.2	Prüfung der Homogenität des Ablaufs der Angiogenese in vitro in unterschiedlichen Kulturschalen	153
6.2	Beurteilung der Verwendbarkeit der etablierten Methode zur Quantifizierung der Wirkung proangiogener Faktoren	154
6.2.1	Quantifizierung der durch VEGF stimulierten Angiogenese im etablierten in vitro-Modell	155
6.2.2	Quantifizierung der durch FGF-2 stimulierten Angiogenese im etablierten in vitro-Modell	156
6.2.3	Quantifizierung der durch die Kombination von VEGF und FGF-2 stimulierten Angiogenese im etablierten in vitro-Modell	157
6.3	Beurteilung der Verwendbarkeit der etablierten Methode zur Quantifizierung der Wirkung antiangiogener Faktoren	158
6.3.1	Wirkung der antiangiogenen Faktoren Angiostatin und Suramin auf die Angiogenese in vitro	159
6.3.2	Quantifizierung der durch Angiostatin stimulierten Antiangiogenese im etablierten in vitro-Modell	161
6.4	Beurteilung der Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese im etablierten in vitro-Modell im Vergleich zu in vivo- und ex vivo-Modellen der Angiogenese	163
6.5	Beurteilung der Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese im etablierten in vitro-Modell im Vergleich zu anderen in vitro-Modellen der Angiogenese	166

6.6	Morphometrie kapillarähnlicher Strukturen im Ablauf der Angiogenese in vitro	169
6.7	Ultrastruktur der Endothelzellen im Ablauf der Angiogenese in vitro	171
6.8	Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ IV im Ablauf der Angiogenese in vitro	174
6.9	Vorkommen von Apoptose im Ablauf der Angiogenese in vitro	176
6.10	Synopsis	177
<u>7</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>179</u>
<u>8</u>	<u>Summary</u>	<u>182</u>
<u>9</u>	<u>Abkürzungen</u>	<u>185</u>
<u>10</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>187</u>
<u>11</u>	<u>Danksagung</u>	<u>221</u>

11 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Johanna Plendl für die Überlassung des Themas und die intensive, professionelle und liebevolle Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Vor allem möchte ich mich dafür bedanken, dass ich von ihr nicht nur im Zusammenhang mit dieser Arbeit sehr viel lernen durfte und dass mir diese Zeit durch sie in wundervoller Erinnerung bleiben wird.

Mein besonderer Dank gilt auch Hartmut Weiß und seinen Mitarbeiterinnen Gisela Arndt und Rose Schmitz für die intensive Unterstützung und unendliche Geduld bei der Erstellung und Bearbeitung der Statistik.

Für die zügige und perfekte Einarbeitung in die Routine der Zellkultur danke ich Ulrike Nebel und insbesondere Stefanie Schuster, die hierfür ihre in der Abschlußphase ihrer Arbeit geringe Zeit investierte.

Hana Hünigen danke ich für die erfahrene Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der verschiedenen Untersuchungen.

Bei Silke Buda bedanke ich mich für ihre unermüdliche und stets schnelle Hilfe bei sämtlichen Computerproblemen.

Für die professionelle Erstellung und Bearbeitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Monika Sachtleben.

Ilona Küster-Kreyhahn, Karin Schütz und Jasmin Lienau danke ich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der immunzytochemischen Untersuchungen. Außerdem danke ich Jasmin Lienau für ihr Mitwirken bei den Untersuchungen zur Validierung als zweite Untersucherin.

Bei Diemut Starke bedanke ich mich für die professionelle Erstellung der Zeichnung zur Darstellung der verschiedenen Mechanismen der Angiogenese.

Bei der Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Susanne Poersch danke ich für ihre Freundschaft und die professionelle Durchsicht der Manuskripte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Christian Barucker, Saskia Schuchardt, Claas Brockschmidt, Stefanie Wittwer, Andrea Dege und Wybren Abma für ihre Freundschaft und die Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite gestanden und mich immer wieder aufgemuntert haben.