

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung der Endothelzellen

Nach dem Auftauen erfolgte die Kultivierung der Zellen zunächst in mit Gelatine-Lösung (Bacto Gelatine, 1,5% in PBS) beschichteten 6-Lochplatten.

Für alle Untersuchungen wurden die Endothelzellen in gelatinierte Vertiefungen von 24-Loch-Platten ausgesät.

Transmissionselektronenmikroskopische und immunzytochemische Untersuchungen erfolgten an Zellen, die in den 24-Lochplatten auf sterilen, gelatinieren Glasplättchen (Deckgläser) angezüchtet worden waren.

Als Medium für die Kultivierung der Endothelzellen wurden das Erhaltungsmedium DMEM+ (siehe 3.4.1) und das Selektivmedium P0 (siehe 3.4.2) eingesetzt.

Diesen Medien wurden in den Untersuchungen zur Quantifizierung der Angiogenese und Antiangiogenese die löslichen pro- bzw. antiangiogenen Faktoren zugegeben.

Der Wechsel des Mediums erfolgte zweimal wöchentlich, alternierend nach drei und vier Tagen.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank in einem offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung.

Alle Arbeiten an den Zellen wurden in einer Reinraumwerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.1.2 Kryokonservierung der Endothelzellen

Für die Kryokonservierung wurden die Endothelzellen bis zur Konfluenz in 6-Loch-Platten kultiviert.

Dann wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden einige Tropfen Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und diese für 10 min im Brutschrank inkubiert.

Nachdem durch mikroskopische Kontrolle bestätigt war, dass sich alle Zellen vom Kulturschalenboden abgelöst hatten, wurde 0,5 ml Kulturmedium zu den Zellen gegeben und diese ca. 1 min trituiert. Anschließend wurde die so entstandene Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen, welches 10 ml DMEM+ enthielt, überführt und 5 min bei 1050 U zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in Kulturmedium, dem 10% Dimethylsulfoxid zugesetzt war, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Kryoröhrchen verteilt (1 – 1,5 ml pro Röhrchen) und zunächst in einem Styroporbehälter im Gefrierschrank auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

4.2 Morphometrische Untersuchungen

Die morphometrische Untersuchung der Angiogenese erfolgte an den sich in vitro bildenden *kapillarähnlichen Strukturen*, die als strangartige Strukturen mit einem Mindestdurchmesser von $28\text{ }\mu\text{m}$ definiert wurden (siehe 5.1.2).

Per definitionem war das Stadium 7 der Angiogenese in vitro dann erreicht, wenn die ersten *kapillarähnlichen Strukturen* erschienen (siehe 5.1.3.7).

Somit setzten die morphometrischen Untersuchungen in jedem Bildausschnitt bei Erreichen des Stadiums 7 ein.

Die Morphometrie wurde mit den Messwerkzeugen des Bildbearbeitungssystems Axiovision (3.0) durchgeführt.

4.2.1 Das Bildbearbeitungssystem Axiovision

Axiovision ist ein modular aufgebautes Bildbearbeitungs- und Analysesystem für die Lichtmikroskopie. Die Basisfunktionalität umfasst die Bildaufnahme, Bildverarbeitung und Bildarchivierung.

Als zusätzliches Modul wurde das interaktive Messen installiert. Dieses Modul ermöglicht in erstellten Aufnahmen die Vermessung von verschiedenen Objektparametern, wie beispielsweise Größe, Umfang oder Anzahl.

Die verfügbaren Messfunktionen befinden sich im Menü *Messen* (Abb. 14).

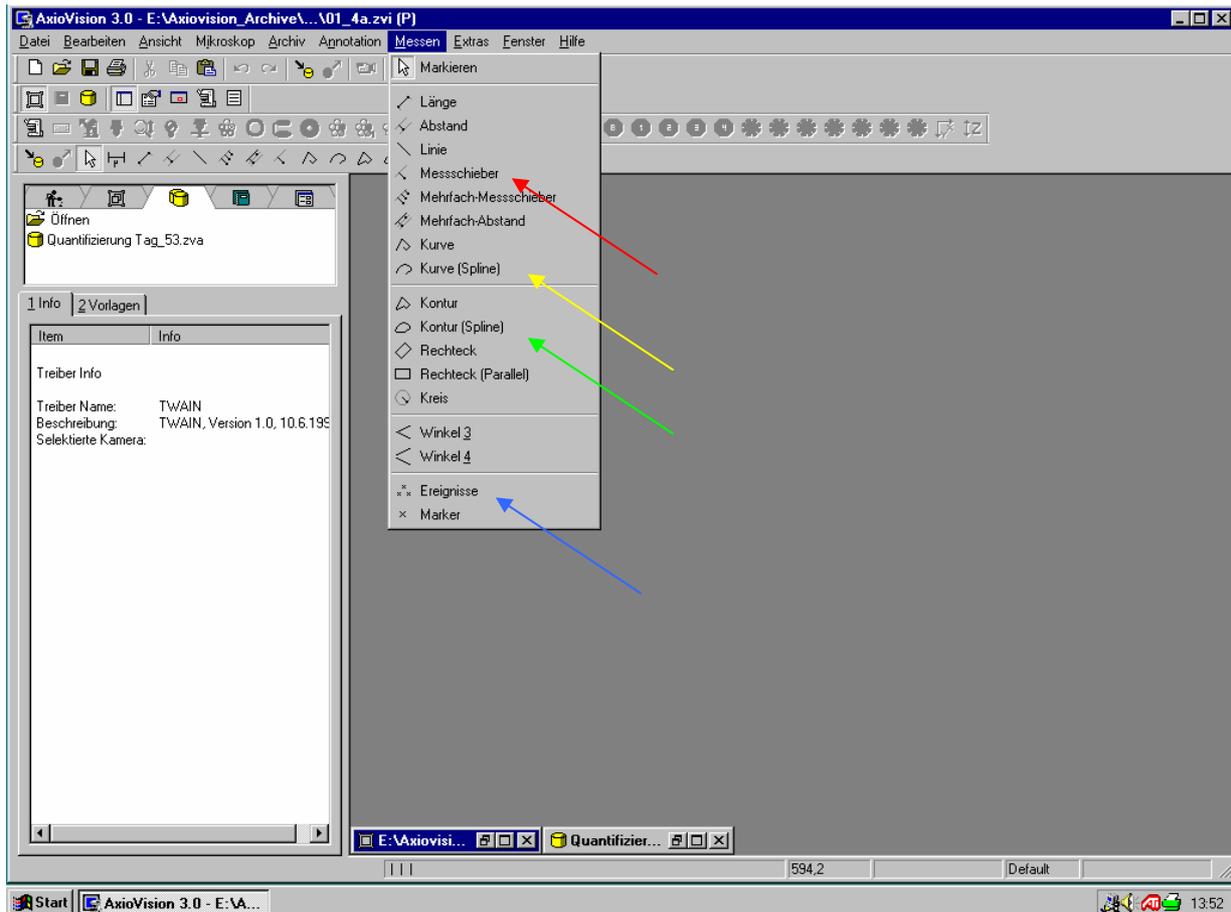
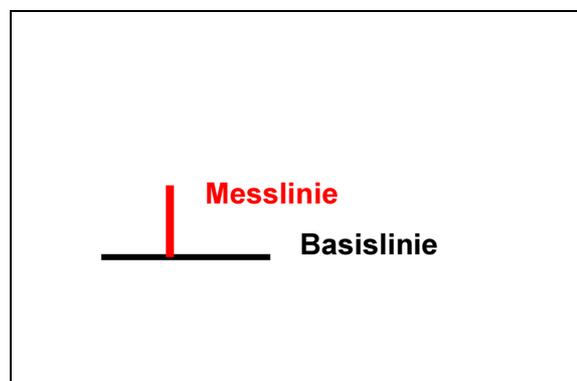


Abb.2 Oberfläche des Bildbearbeitungssystems Axiovision 3.0
Die zur Morphometrie eingesetzten Messwerkzeuge sind im Menü **Messen** mit Pfeilen gekennzeichnet.

Im Rahmen der morphometrischen Untersuchungen der Angiogenese in vitro wurden die Messwerkzeuge *Messschieber*, *Kurve (Spline)*, *Kontur (Spline)* und *Ereignisse* verwendet.

Der *Messschieber* dient zur Messung einer zu einer Basislinie senkrechten Strecke, die Messlinie. Hierfür wird zunächst die Basislinie gezeichnet. Anschließend kann durch die Festlegung des Endpunktes der Messlinie, die Länge derselben bestimmt werden. Das Messwerkzeug *Kurve (Spline)* ermöglicht die Messung der Länge einer beliebig geformten Linie.



Mit dem Messwerkzeug *Kontur (Spline)* kann ein beliebig geformtes Objekt im Bild umfahren werden. Gemessen wird dabei die Fläche, die das umfahrene Objekt einnimmt.

Mit dem Werkzeug *Ereignisse* kann die Anzahl markierter Punkte im Bild bestimmt werden.

4.2.2 Morphometrie der *kapillarähnlichen Strukturen*

Mit Hilfe der Messwerkzeuge des Bildbearbeitungssystems Axiovision (3.0) wurde die Fläche und die Länge der durch die Endothelzellen *in vitro* gebildeten *kapillarähnlichen Strukturen* gemessen.

Hierfür wurden in jedem Bildausschnitt zunächst diejenigen strangartigen Strukturen bestimmt, die als *kapillarähnliche Strukturen* definiert waren (siehe 5.1.2). Dabei wurden mit dem Werkzeug *Messschieber* die Abschnitte strangartiger Strukturen ermittelt, die einen Mindestdurchmesser von 28 μm aufwiesen und deren Anfang und Ende markiert.

Anschließend wurden die *kapillarähnlichen Strukturen* im Bild mit dem Messwerkzeug *Kontur* (*Spline*) umfahren und somit die Größe der Fläche dieser Strukturen bestimmt (*Abb.2*)



Abb.3 Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung, 63 Tage in Kultur, Morphometrie der Fläche einer kapillarähnlichen Struktur; Phasenkontrastmikroskop, 100 x, schräger Lichteinfall

Die Länge der *kapillarähnlichen Strukturen* wurde mit dem Messwerkzeug *Kurve (Spline)* gemessen.

Abschließend wurde mit Hilfe des Werkzeugs *Ereignisse* in jeder erstellten Aufnahme die Anzahl der Verzweigungspunkte der *kapillarähnlichen Strukturen* festgehalten.

4.3 Immunzytochemische Untersuchung zum Nachweis von Kollagen Typ IV

Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in 16 Vertiefungen von Kulturplatten auf gelatinisierten Glasplättchen ausgesät und im Selektivmedium P0 kultiviert.

Für die Untersuchungen wurden nach 14, 21, 35 und 56 Tagen die Endothelzellen in jeweils vier Vertiefungen verwendet.

Bei jeder Untersuchung dienten die Endothelzellen in zwei Vertiefungen als Proben 1 und 2. Zur Überprüfung der eindeutigen Bindung des Sekundärantikörpers wurden die Zellen in den beiden anderen Vertiefungen der Kulturplatte als Negativkontrollen mitgeführt.

Die Negativkontrolle 1 wurde mit Ziegennormalserum und die Negativkontrolle 2 mit PBS anstelle des primären Antikörpers inkubiert.

Von den Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und diese zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen 5 min bei 4-8°C mit eiskaltem Methanol-Aceton (1:1) fixiert. Nach Entfernen der Fixierlösung wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden die Zellen anschließend 20 min mit dem Proteinblocker bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Proteinblocker abgesaugt und in 2 Vertiefungen je 150 µl Primärantikörper (1:20 in PBS) gegeben. Die anderen beiden Vertiefungen erhielten das Ziegennormalserum (1:20 in PBS) bzw. PBS.

Nach 24 Stunden Inkubation im Dunkeln in einer feuchten Kammer bei 4-8°C wurde der Primärantikörper (bzw. Serum oder PBS) abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in jede Vertiefung 150 µl Sekundärantikörper (1:20 in PBS) gegeben und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Das Glasplättchen wurde mit einer Pinzette aus der Vertiefung entnommen und mit einem Tropfen Fluorostab auf einen Objektträger gebracht.

Die Beurteilung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit Fluoreszenzausrüstung (Nikon Optiphot 2). Die Fluoreszenz wurde mittels der am Mikroskop installierten Digitalkamera (Sony DXC 930P) und dem Bildbearbeitungssystem Lucia M dokumentiert.

4.4 Nachweis von Apoptose bei kultivierten Endothelzellen

Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in 16 Vertiefungen von Kulturplatten auf gelatinierten Glasplättchen ausgesät und im Selektivmedium P0 kultiviert.

Für die Untersuchungen wurden nach 14, 21, 35 und 56 Tagen die Endothelzellen in jeweils vier Vertiefungen verwendet.

Aus den Vertiefungen wurde zunächst das Medium entfernt und die Endothelzellen mit PBS gewaschen. Die Zellen in zwei Vertiefungen wurden mit eiskaltem Methanol-Aceton (1:1) fixiert (5 min bei 4-8°C) und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurde die angesetzte Mischung der Komponenten des Apoptosis Kit (150 µl Binding Buffer, 15 µl Annexin V-EGFP, 7,5 µl Propidium Iodide) in alle vier Vertiefungen verteilt, bis der Zellrasen gut bedeckt war. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 15 min bei 18°C. Abschließend wurde die Mischung aus den Vertiefungen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit einer Pinzette aus den Vertiefungen entnommen und mit einem Tropfen Fluorostab auf einen Objektträger gebracht.

Die Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop mit Fluoreszenzausrüstung (Nikon Optiphot 2, Nikon GmbH, Düsseldorf) beurteilt. Die Dokumentation erfolgte mittels einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (Sony DXC 930P, Sony Deutschland GmbH, Köln) und dem Bildbearbeitungssystem Lucia M Version 2.04 (Nikon GmbH, Düsseldorf).

4.5 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum in Rückbildung wurden in sechs Vertiefungen auf gelatinierten Glasplättchen ausgesät und im Selektivmedium P0 kultiviert. Für die Untersuchungen wurden nach 18, 40 und 60 Tagen die Endothelzellen in jeweils zwei Vertiefungen verwendet.

Aus den Vertiefungen wurde zunächst das Medium entfernt, dreimal für 10 min Cacodylat-Puffer (0,1 M) auf die Zellen gegeben und dieser wieder abgesaugt. Danach wurden die Zellen vier Stunden bei 4-8°C in Karnovsky-Lösung fixiert.

Nach Entfernung der Fixierlösung wurde dreimal für 10 min Cacodylat-Puffer (0,1 M) auf die Zellen gegeben und wieder abgesaugt. Zur Nachfixierung und Kontrastierung wurden die Zellen in einem Osmiumtetroxid/Kaliumferrocyanid-Gemisch zwei Stunden bei 4-8°C im Dunkeln inkubiert.

Die Lösung wurde entfernt und die Kulturplatte auf einen Schüttler gestellt. Es wurde erneut dreimal für 10 min Cacodylat-Puffer (0,1 M) auf die Zellen gegeben und wieder abgesaugt.

Anschließend wurde der Zellrasen in den Vertiefungen der Kulturplatte mit 1,5%iger, auf 60°C erwärmter Agarlösung überschichtet und 30 min bei 4-8°C gehärtet. Um den so entstandenen Agarblock von der Wand der Kulturschale zu lösen, wurden einige Tropfen Cacodylat-Puffer (0,1 M) zugegeben und der Agarblock mit dem Zellrasen aus der Vertiefung entnommen.

Der Agarblock wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend nacheinander 30 min in Propylenoxid, zwei Stunden im Propylen-Epon-Gemisch und sechs Stunden im reinen Epon inkubiert.

Der Agarblock wurde in 3 x 3 x 3 mm große Stücke geschnitten, die Stücke in eine Beem-Kapsel eingebettet und polymerisiert.

Mit dem Ultramikrotom wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen, bei 80°C getrocknet und 45 sec mit einigen Tropfen Richardson-Lösung gefärbt. Die Färbelösung wurde mit Aqua dest. abgespült, die Proben eingedeckelt und lichtmikroskopisch beurteilt.

Für die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden mit dem Ultramikrotom Ultradünnschnitte hergestellt, auf Kupfergrids aufgefangen und mit Ultrostain I und Ultrostain II kontrastiert.

Die Untersuchung und Dokumentation der Zellen erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop EM 10CR und einem Kodak Electron Microscope Film.