

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Etablierung von *in vitro*-Modellen der
Angiogenese muriner und humaner Endothelzellen sowie deren
Transfektion mit verschiedenen Plasmidkonstrukten**

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

vorgelegt von
Jasmin Lienau
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2763

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter: PD Dr. K. Borchers
Dritter Prüfer: Univ.-Prof. Dr. L.H. Wieler

Deskriptoren: neovascularization; endothelium; cell culture; transfection; plasmids

Tag der Promotion: 10.11.2003

*Meinen Eltern
und
Marco*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Angiogenese	3
2.1.1 Endothelzellen.....	3
2.1.2 Extrazelluläre Matrix.....	4
2.1.3 Entstehung der Blutgefäße: Vaskulogenese, Angiogenese und Intussuszeption	5
2.1.4 Apoptose	6
2.1.5 Angiogene Kaskade	7
2.1.5.1 Wachstum des Gefäßes	7
2.1.5.2 Stabilisierung des Gefäßes.....	9
2.1.6 Vaskuläres Remodeling	9
2.1.7 Regulierung der Angiogenese	9
2.1.7.1 Angiogenese-Stimulatoren	10
2.1.7.2 Angiogenese-Inhibitoren (Anti-Angiogenese).....	12
2.1.8 <i>In vitro</i> -Modelle der Angiogenese	12
2.1.8.1 Explantat-Kulturen	12
2.1.8.2 Zellkulturen	13
2.1.8.2.1 Zweidimensionale Modelle der <i>in vitro</i> -Angiogenese	14
2.1.8.2.2 Dreidimensionale Modelle der <i>in vitro</i> -Angiogenese	15
2.1.8.2.3 Kokulturmodelle der <i>in vitro</i> -Angiogenese.....	16
2.1.9 Tumorangiogenese	16
2.2 Grundlagen der Genexpression	18
2.2.1 Regulation der Transkription.....	18
2.2.1.1 Promotor	18
2.2.1.2 Proximale und distale Regulationselemente	19
2.2.1.3 Transkriptionsfaktoren	19
2.2.2 Prozessierung der Prä-mRNA	20
2.3 Gentransfer	21
2.3.1 Vektoren.....	21
2.3.1.1 Plasmid-Vektoren	21
2.3.1.2 Virale Vektoren	21

2.3.2	Effizienz des Gentransfers	21
2.3.3	Methoden des Gentransfers	24
2.3.3.1	Viraler Gentransfer (Virusinfektion)	24
2.3.3.2	Nicht-virale Methoden des Gentransfers (Transfektion).....	25
2.3.3.2.1	Lipofektion	28
2.3.3.2.2	Polyfektion mittels Dendrimeren.....	29
2.3.4	Nachweis der Genexpression mittels Reporter-Assays.....	31
2.3.4.1	CAT-Gen.....	31
2.3.4.2	LacZ-Gen	32
2.3.4.3	GFP-Gen.....	33
2.3.4.4	Luc-Gen	33
2.3.5	Anwendungsmöglichkeiten des Gentransfers	35
2.3.5.1	Gentransfer in der Grundlagenforschung und Biotechnologie	35
2.3.5.2	Gentherapie	35
2.3.6	Therapeutische Anti-Angiogenese zur Behandlung von Tumorerkrankungen	39
2.3.7	Endothelzell-spezifischer Gentransfer	41
2.3.7.1	Ets-1-Promotor.....	41
2.3.7.2	E-Selektin-Promotor	43
2.3.7.3	Flk-1-Enhancer	44
2.3.8	Verwendete Zelltyp-unspezifische, konstitutive, regulatorische Gensequenzen.....	3
2.3.8.1	CMV-Promotor.....	45
2.3.8.2	HLA-Intron.....	46
3	Materialien	47
3.1	Geräte	47
3.2	Verbrauchsmaterialien	48
3.3	Zellkulturmedien und Zusätze	48
3.4	Chemikalien/Reagenzien	49
3.5	Reagenzsysteme/Kits	50
3.6	Immunreagenzien.....	50
3.7	Plasmidkonstrukte	50
3.8	Zellen.....	51
3.9	Software	51
3.10	Lösungen, Medien.....	51
4	Methoden	53
4.1	Zellkultur.....	53
4.1.1	Verwendete Zellen	53
4.1.1.1	Murine mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Myokard (MHEC5).....	53

4.1.1.2	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut (HDMEC).....	54
4.1.2	Kultivierung der Endothelzellen	54
4.1.2.1	Kulturschalen	54
4.1.2.2	Kulturmedien.....	55
4.1.3	Subkultivierung.....	56
4.1.3.1	Subkultivierung muriner Endothelzellen	56
4.1.3.2	Subkultivierung humaner Endothelzellen	56
4.1.4	Kryokonservierung	56
4.1.5	Auftauen von Zellen	57
4.1.6	Bestimmung der Zellzahl	57
4.2	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Endothelzellen <i>in vitro</i>	57
4.3	Immunhistochemische Untersuchung humaner Endothelzellen <i>in vitro</i> zum Nachweis von Kollagen IV	58
4.4	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen <i>in vitro</i> mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung	59
4.5	Transiente Transfektion mikrovaskulärer Endothelzellen	60
4.5.1	Verwendete Plasmidkonstrukte	60
4.5.2	Transfektionsreagenz.....	61
4.5.3	Kultivierung der Zellen für die Transfektion	61
4.5.4	Durchführung der Transfektion	61
4.5.5	Nachweis der Expression und Bestimmung der Transfektionseffizienz	62
4.5.5.1	Lyse der transfizierten Zellen.....	62
4.5.5.2	Luciferase-Assay	63
4.5.5.3	Proteinbestimmung nach Pierce (Bicinchoninic Acid, BCA).....	63
4.5.5.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	64
4.5.6	Kontrollen zu den Transfektionsversuchen.....	64
4.5.7	Statistik.....	64
5	Ergebnisse.....	65
5.1	Stadien der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	65
5.2	Murine mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Myokard (MHEC5)	67
5.2.1	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung muriner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	67
5.2.2	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung muriner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	72
5.2.3	Transfektion muriner mikrovaskulärer Endothelzellen.....	76
5.2.3.1	Optimierung der Transfektion muriner Endothelzellen	77
5.2.3.1.1	Optimierung der Konzentration der Plasmid-DNA.....	77
5.2.3.1.2	Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte	78

5.2.3.1.3	Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex.....	79
5.2.3.2	Pilotstudie zur Transfektion muriner Endothelzellen	80
5.2.3.3	Effizienz verschiedener Promotoren im murinen <i>in vitro</i> -Modell der Angiogenese... 84	
5.2.3.3.1	Promotor-spezifische Luciferase-Expression nach Transfektion muriner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Proliferation)	84
5.2.3.3.2	Ergebnisse der Transfektion muriner Endothelzellen im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Bildung kapillarähnlicher Strukturen).....	86
5.2.3.4	Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-Selektin-Promotoraktivität	87
5.2.4	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung transfizierter muriner Endothelzellen.....	91
5.2.4.1	<i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Proliferation)	91
5.2.4.2	<i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Bildung kapillarähnlicher Strukturen)	92
5.2.4.3	Morphologie und Wachstum scheintransfizierter muriner Endothelzellen (Kontrollen)	93
5.2.5	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung transfizierter muriner Endothelzellen.....	94
5.2.5.1	Ultrastruktur muriner Endothelzellen während der Transfektion	94
5.2.5.2	Ultrastruktur muriner Endothelzellen nach der Transfektion	94
5.2.5.3	Ultrastruktur scheintransfizierter muriner Endothelzellen (Kontrollen)	96
5.3	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut.....	97
5.3.1	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung humaner Endothelzellen <i>in vitro</i>	97
5.3.1.1	Morphologie und Wachstum humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	97
5.3.1.2	Mikroskopisches Bild nach dem enzymatischen Ablösen humaner Endothelzellen von der Kulturschale	106
5.3.2	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	107
5.3.2.1	May-Grünwald-Giemsa-Färbung	107
5.3.2.2	Färbung nach Richardson	110
5.3.3	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	113
5.3.4	Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> mit anti-Kollagen IV.....	118
5.3.4.1	Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im <i>Stadium 1 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV.....	119
5.3.4.2	Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im <i>Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV.....	120
5.3.4.3	Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV.....	121
5.3.4.4	Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV.....	122
5.3.4.5	Kontrollen.....	124

5.3.5	Transfektion humaner mikrovaskulärer Endothelzellen.....	126
5.3.5.1	Optimierung der Transfektion humaner Endothelzellen	127
5.3.5.1.1	Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte	127
5.3.5.1.2	Optimierung der Konzentration der Plasmid-DNA.....	129
5.3.5.1.3	Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex.....	130
5.3.5.2	Effizienz verschiedener Promotoren im humanen <i>in vitro</i> -Modell der Angiogenese.....	132
5.3.5.2.1	Promotor-spezifische Luciferase-Expression nach Transfektion humaner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Proliferation) ...	132
5.3.5.2.2	Promotor-spezifische Luciferase-Expression nach Transfektion humaner Endothelzellen im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (dreidimensionale Organisation kapillarähnlicher Strukturen).....	134
5.3.5.3	Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-Selektin-Promotoraktivität	136
5.3.6	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung transfizierter humaner Endothelzellen....	139
5.3.6.1	<i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Proliferation)	139
5.3.6.2	<i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Bildung kapillarähnlicher Strukturen)	140
5.3.6.3	Morphologie und Wachstum scheintransfizierter humaner Endothelzellen (Kontrollen)	140
5.3.7	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung transfizierter humaner Endothelzellen.....	141
5.3.7.1	Ultrastruktur humaner Endothelzellen während der Transfektion	141
5.3.7.2	Ultrastruktur humaner Endothelzellen nach der Transfektion	143
5.3.7.3	Ultrastruktur scheintransfizierter humaner Endothelzellen (Kontrollen)	144
6	Diskussion	145
6.1	<i>In vitro</i> -Angiogenese mikrovaskulärer Endothelzellen.....	145
6.1.1	Zweidimensionales <i>in vitro</i> -Modell der Angiogenese muriner mikrovaskulärer Endothelzellen.....	146
6.1.2	Dreidimensionales <i>in vitro</i> -Modell der Angiogenese humaner mikrovaskulärer Endothelzellen.....	151
6.1.2.1	Morphologie humaner mikrovaskulärer Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	153
6.1.2.2	Ultrastruktur humaner mikrovaskulärer Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	160
6.1.3	Lumenbildung während der Angiogenese <i>in vitro</i>	161
6.1.4	Polarität der Endothelzellen während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	163
6.2	Transfektion mikrovaskulärer Endothelzellen	166
6.2.1	Mikroskopische Untersuchung transfizierter Endothelzellen	166
6.2.1.1	Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung transfizierter Endothelzellen.....	166
6.2.1.2	Ultrastruktur transfizierter Endothelzellen.....	167
6.2.2	Optimierung der Transfektion muriner und humaner Endothelzellen	172

6.2.3	Schwankungen der Transfektionseffizienz und mögliche Ursachen	174
6.2.4	Transfektion muriner und humaner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	176
6.2.5	Transfektion muriner und humaner Endothelzellen im <i>Stadium 3 bzw. 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	179
6.2.6	Steigerung bzw. Reduktion der Aktivität des E-Selektin-Promotors durch zusätzliche Enhancer-/Intron-Sequenzen.....	181
6.3	Ausblick.....	183
7	Zusammenfassung	185
8	Summary.....	188
9	Literaturverzeichnis	191

Abbildungsverzeichnis

1	Schema I des DNA-Transfers in den Nucleus der Zielzelle.....	22
2	Schema II des DNA-Transfers in den Nucleus der Zielzelle.....	23
3	Luciferase-Reaktion (modifiziert nach Aflalo, 1991)	34
4	Murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 1 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 2 Tage in Kultur	67
5	Murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 7 Tage in Kultur	68
6	Murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 19 Tage in Kultur	69
7	Murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 16 Tage in Kultur	69
8	Murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 19 Tage in Kultur	70
9	Murine Endothelzellen aus dem Myokard, (A) 42 Tage in Kultur, (B) 35 Tage in Kultur	71
10	Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 15 Tage in Kultur	73
11	Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 70 Tage in Kultur	73
12	Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 30 Tage in Kultur	74
13	Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 80 Tage in Kultur	74
14	Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 30 Tage in Kultur	75
15	Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 30 Tage in Kultur	75
16	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmid-DNA-Konzentration (pJWM115).....	78
17	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte.....	79
18	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex.....	80
19	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor in 5 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , (A) vor Normierung, (C) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysat (B).....	83
20	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , (A) vor Normierung, (B) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysat.....	85
21	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor sowie Kontrollwerte in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	87

22	Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-sel-Promotoraktivität in 4 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , (A, C) Luciferase-Aktivität vor Normierung, (B, D) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zellysat (s. auch Seite 90).....	89
23	Steigerung bzw. Senkung der E-sel-Promotoraktivität durch Enhancer-/Intron-Sequenzen.....	90
24	Murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex.....	91
25	Murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> direkt vor der Zellyse	92
26	Scheintransfizierte murine Endothelzellen aus dem Myokard im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Kontrollen) während der Inkubation (A) und direkt vor der Zellyse (B)	93
27	Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex.....	94
28	Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle aus dem Myokard direkt vor der Zellyse	95
29	Ultrastrukturelle Darstellung einer scheintransfizierten murinen Endothelzelle aus dem Myokard direkt vor der Zellyse (Kontrolle).....	96
30	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 1 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 2 Tage in Kultur	98
31	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, 6 Tage nach Aussaat in geringer Dichte	98
32	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 4 Tage in Kultur	99
33	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 5 Tage in Kultur	100
34	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, (A, B, C) 9 Tage in Kultur, (D) 7 Tage in Kultur	101
35	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 15 Tage in Kultur (Bild aus dem Randbereich der Kulturschale)	102
36	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, 15 Tage in Kultur (Bild aus dem Zentrum der Kulturschale).....	102
37	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 50 Tage in Kultur	103
38	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 38 Tage in Kultur	104
39	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , 42 Tage in Kultur	104
40	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, 14 Wochen in Kultur.....	105
41	Mikroskopisches Bild nach dem enzymatischen Ablösen humaner Endothelzellen von der Kulturschale.....	106
42	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Bild aus dem Zentrum der Kulturschale)	107

43	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Bilder aus dem Zentrum der Kulturschale)	108
44	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Bild aus dem Zentrum der Kulturschale)	109
45	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	110
46	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	111
47	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	112
48	Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	112
49	Ultrastrukturelle Darstellung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 4 Wochen in Kultur	114
50	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 16 Wochen in Kultur	114
51	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 5 Wochen in Kultur	115
52	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 16 Wochen in Kultur	116
53	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 16 Wochen in Kultur	116
54	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> , 16 Wochen in Kultur	117
55	Ultrastrukturelle Darstellung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i> (Ausschnitt), 5 Wochen in Kultur	117
56	Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 1 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV	119
57	Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV	120
58	Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV	121
59	Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV (identischer Ausschnitt aus dem Zentrum der Kulturschale)	122
60	Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit anti-Kollagen IV (Ausschnitte aus dem Randbereich der Kulturschale)	123
61	Inkubation humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 1 (A)</i> und <i>Stadium 4 (C) der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit Ziegen-0-Serum (Kontrolle).....	124
62	Inkubation humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 1 (A)</i> und <i>Stadium 4 (C) der angiogenen Kaskade in vitro</i> mit PBS-Puffer (Kontrolle).....	125

63	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte, (A, B) vor Normierung, (C, D) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate ..	128
64	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmid-DNA-Konzentration (pJWM115), (A) vor Normierung, (B) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate.....	130
65	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex, (A) vor Normierung, (B) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate.....	131
66	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion humaner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , (A, B) vor Normierung, (C, D) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate	133
67	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor sowie Kontrollwerte in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion humaner Endothelzellen im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	135
68	Beispielhafter Vergleich der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten humaner Endothelzellen in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	135
69	Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-sel-Promotoraktivität in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion humaner Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> , (A, B) Luciferase-Aktivität vor Normierung, (C, D) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate	137
70	Steigerung bzw. Senkung der E-sel-Promotoraktivität durch Enhancer-/Intron-Sequenzen.....	138
71	Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex (A) und direkt vor der Zellyse (B)	139
72	Scheintransfizierte humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i> (Kontrollen) während der Inkubation (A) und direkt vor der Zellyse (B)	140
73	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex.....	141
74	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex.....	142
75	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex.....	142
76	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut direkt vor der Zellyse	143
77	Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Scheintransfektion.....	144

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über nicht-virale Methoden des Gentransfers.....	27
2	Übersicht über gentherapeutische Behandlungsstrategien im Bereich der Tumorforschung (modifiziert nach Blaese, 1999).....	37
3	Übersicht über die verwendeten Kulturschalen mit Größe und Verwendungszweck	54
4	Übersicht über die verwendeten Plasmidkonstrukte	61
5	Stadien der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	65
6	Kontrollwerte der Optimierung der Plasmid-DNA-Konzentration pro Kulturschale.....	77
7	Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte	79
8	Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex.....	80
9	Übersicht über die Versuchsparameter der einzelnen Messungen der Pilotstudie	81
10	Kontrollwerte aus 5 Luciferase-Assays	82
11	Kontrollwerte aus 3 Luciferase-Assays	86
12	Kontrollwerte aus 4 Luciferase-Assays	88
13	Übersicht über die für die Markierung mit anti-Kollagen IV verwendeten humanen Endothelzellen.....	118
14	Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte	127
15	Kontrollwerte der Optimierung der Plasmid-DNA-Konzentration pro Kulturschale.....	129
16	Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex.....	131
17	Kontrollwerte aus 3 Luciferase-Assays	134
18	Kontrollwerte aus 3 Luciferase-Assays	138
19	Vergleich der ermittelten Transfektionsparameter im Rahmen der Optimierungsversuche im murinen (MHEC5) und humanen (HDMEC) Zellkulturmodell	173
20	Vergleich der Aktivitäten der untersuchten Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren nach Transfektion muriner (MHEC5) und humaner (HDMEC) Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	178
21	Vergleich der Aktivitäten der untersuchten Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren nach Transfektion muriner Endothelzellen (MHEC5) im <i>Stadium 3</i> und humaner Endothelzellen (HDMEC) im <i>Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	180
22	Vergleich der Aktivitäten der untersuchten Vektoren mit zusätzlichen Enhancer-/Intron-Sequenzen nach Transfektion muriner (MHEC5) und humaner (HDMEC) Endothelzellen im <i>Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro</i>	182

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EGM-2 MV	Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2
E-sel	E-Selektin
Ets-1k	kurzes Fragment des Ets-1-Promotors (6,592 Kb)
Ets-1l	langes Fragment des Ets-1-Promotors (5,737 Kb)
EZ	Endothelzellen
FBS	Fetales bovines Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flk-1	Fetal liver kinase-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1)
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HLA	Human Leukocyte Antigen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
MHEC5	Mouse Heart Endothelial Cell Clone 5
mRNA	Boten-RNA
Rep.	Replikat
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. J. Plendl für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die engagierte wissenschaftliche Betreuung während der gesamten Forschungstätigkeit. Ihre freundliche und humorvolle Art sowie ihre stetige Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. C. Kaletta und Herrn Dr. M. Teifel, Fa. Munich Biotech AG, möchte ich für die zur Verfügung gestellten Plasmidkonstrukte sowie für die kooperative Zusammenarbeit und ihre fachliche Kompetenz danken, mit der sie diese Arbeit unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau N. Bücheler, Fa. Munich Biotech AG, für die Einweisung in die Transfektionstechnik sowie ihre freundliche Unterstützung bedanken.

Frau Dr. H. Hünigen danke ich ganz herzlich für ihre Hilfestellung bei der Durchführung histologischer Untersuchungen sowie für die interessanten und kreativen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. L.H. Wieler vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen danke ich für die freundliche Unterstützung bei der mikrobiologischen Untersuchung der Zellkulturen.

Herrn Prof. Dr. H. Weiß und Frau Dr. G. Arndt vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung möchte ich für die fachliche Beratung bei der statistischen Auswertung danken.

Bei Frau M. Sachtleben möchte ich mich für die Unterstützung während der gesamten Zeit und besonders für die ausgezeichnete Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen bedanken.

Frau K. Schütz und Frau I. Küster-Krehan danke ich für die Hilfe bei der Durchführung histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen. Frau D. Starke möchte ich für die sachverständige Anfertigung der Vorlage für die Zeichnung danken. Frau Dr. S. Buda danke ich für die administrative Hilfe bei der Bewältigung von Computerproblemen.

Dank gebührt auch Frau Dr. S. Schuster, Frau U. Nebel sowie Frau M. Bahramsoltani für die Einarbeitung in die Zellkultur.

Bei allen genannten und nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie möchte ich mich nochmals für die große Unterstützung, die Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei der Fa. Munich Biotech AG und beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), die diese Arbeit mit finanziellen Mitteln unterstützt haben.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mich während der gesamten akademischen Ausbildung liebevoll unterstützt haben und meinem Freund Marco für die moralische und kreative Unterstützung sowie für seine grenzenlose Geduld.

Lebenslauf

Name: Jasmin Regina Helene Lienau
Geburtsdatum: 03. Oktober 1974
Geburtsort: Hamburg
Eltern: Regina Hermes und Klaus Lienau

Schulbildung: 1981-1985 Grundschule Eberhofweg Hamburg
1985-1994 Sophie-Barat-Schule Hamburg

Abitur: 15. Juni 1994

Studium der Tiermedizin: WS 94/95 - SS 2000
Freie Universität Berlin

Staatsexamen: 15. August 2000

Approbation: 29. September 2000

Anfertigung der Dissertation: Mai 2001 - August 2003

Wissenschaftliche Angestellte: Mai 2001 - Februar 2003
Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 02. September 2003

.....

Jasmin Lienau