

5 Ergebnisse

5.1 Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro*

Anhand der durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen muriner und humaner Endothelzellen wurde die angiogene Kaskade *in vitro* in 5 Stadien (*Stadium 0-4*) eingeteilt. Die Stadien konnten phasenkontrastmikroskopisch anhand des Zellbildes erfasst werden, wobei zum Nachweis eines zentralen Lumens innerhalb der kapillarähnlichen Strukturen weitere spezielle histologische Untersuchungen bzw. die Transmissionselektronenmikroskopie erforderlich waren.

Die einzelnen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* sind der Tab. 5 zu entnehmen.

Stadium der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	Morphologische Beschreibung der Endothelzellen
<i>Stadium 0</i>	Proliferation der Endothelzellen
<i>Stadium 1</i>	Subkonfluent bis konfluent zellulärer Monolayer
<i>Stadium 2</i>	Lineare Aneinanderreihung und Ringbildung
<i>Stadium 3</i>	Bildung kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen planar zur Kulturschalenoberfläche
<i>Stadium 4</i>	Organisation eines dreidimensionalen Netzwerkes kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen mit Remodeling

Tab. 5: Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro*

Die Stadien wurden anhand der durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen muriner und humaner Endothelzellen definiert.

Die Proliferation der Endothelzellen direkt nach Einsaat in die Kulturschalen wurde als *Stadium 0* definiert, da die Endothelzellen dieses Stadium unabhängig von einem angiogenen Stimulus durchlaufen. Dieses Stadium war für die Transfektionsexperimente besonders wichtig, da es dem Stadium der endothelialen Proliferation *in vivo* weitestgehend zu entsprechen schien. Das *Stadium 1*, ein subkonfluent bis konfluent Zellschicht ist das Stadium, von dem

aus die *in vitro*-Angiogenese der Endothelzellen bei Zugabe angiogener Wachstumsfaktoren startet. In den Kapiteln 5.2.1 und 5.2.2 sowie 5.3.1, 5.3.2 und 5.3.3 werden die einzelnen Stadien der angiogenen Kaskade muriner und humaner Endothelzellen näher beschrieben.

5.2 Murine mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Myokard (MHEC5)

5.2.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung muriner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro*

Die murinen Endothelzellen wurden zur Beobachtung der angiogenen Kaskade in einer Konzentration von $2-4 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Induktion der angiogenen Kaskade erfolgte durch Kultivierung in dem pro-angiogene Faktoren enthaltenden Selektivmedium P0 (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.10).

Innerhalb von zwei Tagen nach Einsaat war durch Proliferation der Endothelzellen (*Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro*) die gesamte Fläche der Kulturschale mit überwiegend länglichen Zellen bedeckt (*Stadium 1 der angiogenen Kaskade in vitro*, Abb. 4), wobei das „als typisch geltende“ Kopfsteinpflastermuster aus polygonalen Zellen nur stellenweise beobachtet werden konnte.

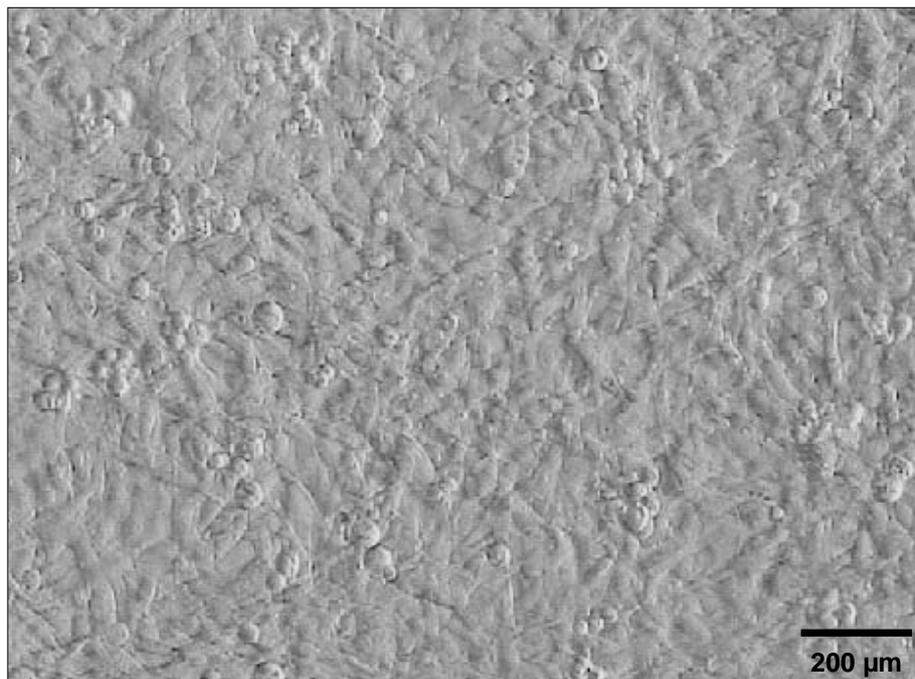


Abb. 4: Murine Endothelzellen aus dem Myokard im *Stadium 1 der angiogenen Kaskade in vitro*, 2 Tage in Kultur

Konfluenter Monolayer aus dicht gepackten, länglichen Zellen. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung)

Innerhalb der nächsten zwei Tage konnte an verschiedenen Stellen der Kulturschale eine lineare Aneinanderreihung länglicher Zellen beobachtet werden, wobei sich im weiteren Verlauf unterschiedlich große Ringe aus zirkulär aneinander gereihten Endothelzellen darstellten (*Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro*, Abb. 5). Die inneren Bereiche dieser Ringe waren dabei zum größten Teil zellfrei.

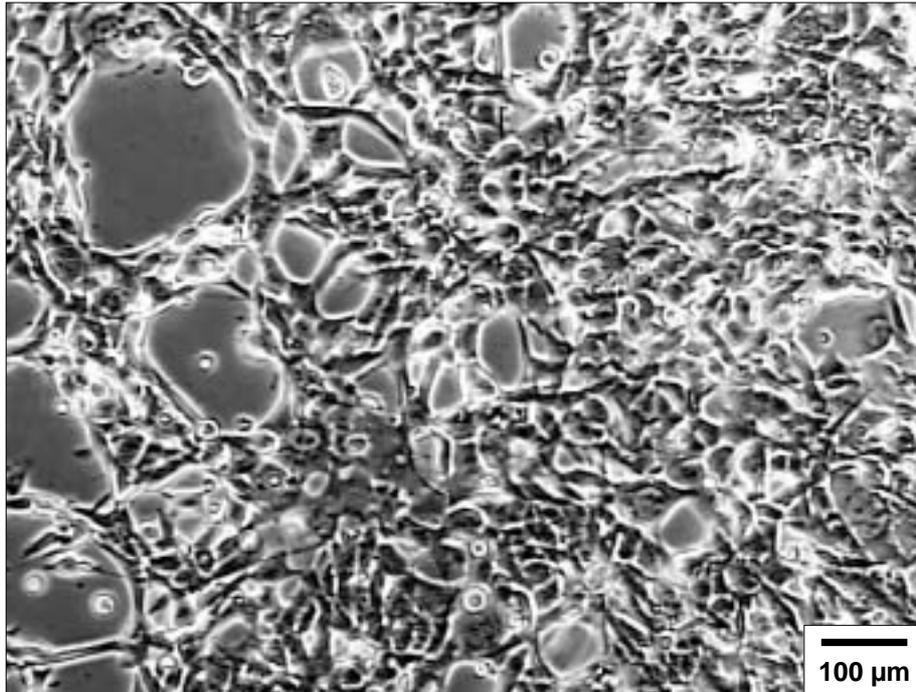


Abb. 5: Murine Endothelzellen aus dem Myokard im *Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro*, 7 Tage in Kultur
Lineare Aneinanderreihung und Ringbildung. Phasenkontrastmikroskop

14-20 Tage nach Einsaat zeigten sich in allen Kulturschalen miteinander verbundene endotheliale Zellstränge (*Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro*, Abb. 6), die „straßenartig“ die Kulturschalen durchzogen (Abb. 7). In der Breite bestanden diese Stränge aus 3-8 parallel orientierten Zellreihen (Abb. 8), der Durchmesser variierte je nach Anzahl der Zellreihen von 28 µm bis 150 µm. Die einzelnen Zellgrenzen waren nicht mehr deutlich zu erkennen. Zwischen den endothelialen Strängen waren längliche Zellen im subkonfluenten Zustand zu erkennen, die untereinander durch ihre Fortsätze in Verbindung standen und ein Maschenwerk zwischen den Strängen bildeten.

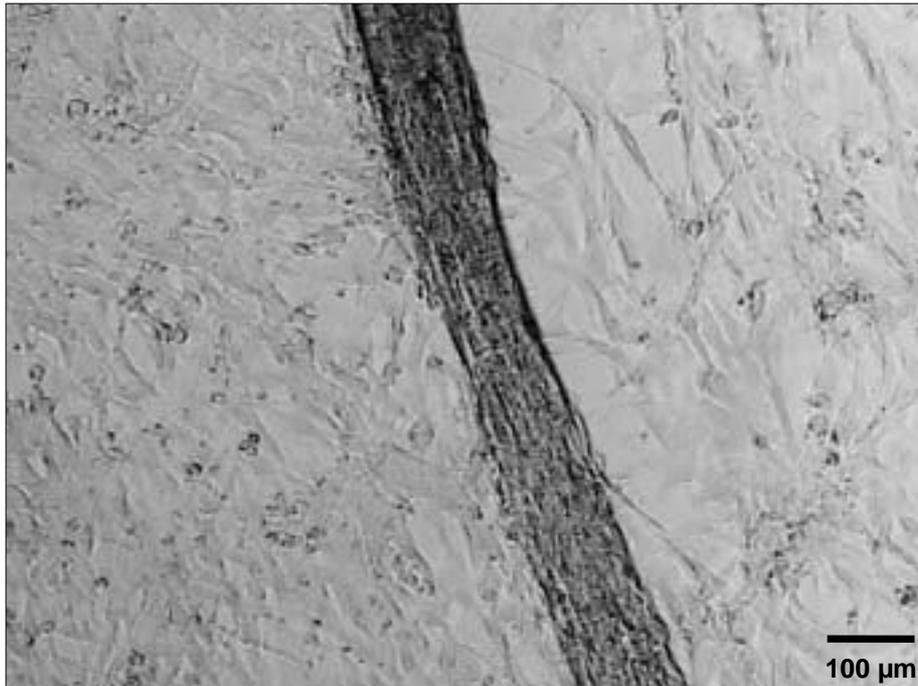


Abb. 6: Murine Endothelzellen aus dem Myokard im *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro*, 19 Tage in Kultur
Zellstrang über subkonfluentem Monolayer. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung)



Abb. 7: Murine Endothelzellen aus dem Myokard im *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro*, 16 Tage in Kultur
Miteinander verbundene Zellstränge über subkonfluentem Monolayer. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung)

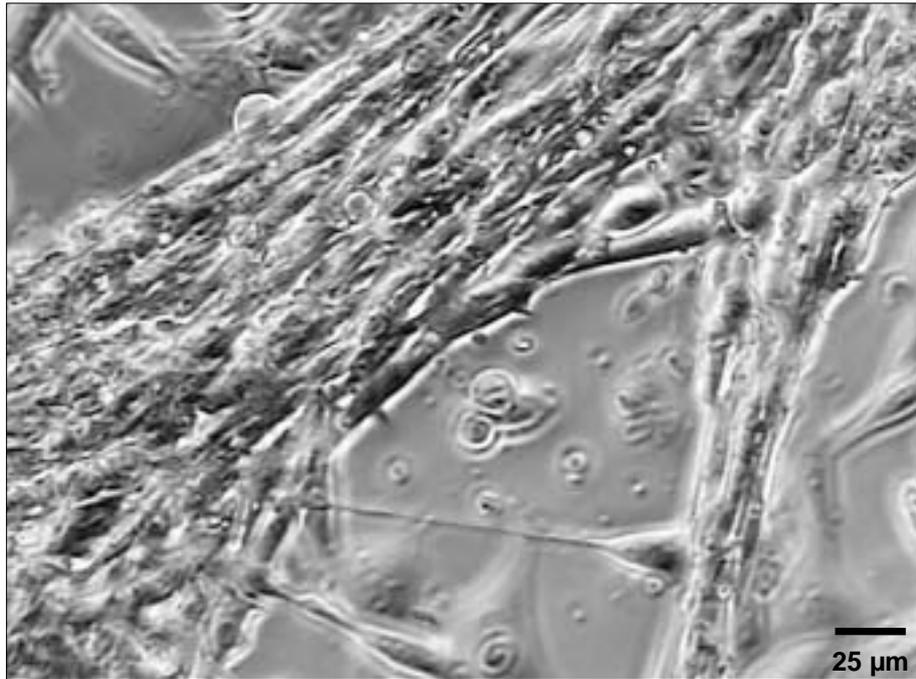


Abb. 8: Murine Endothelzellen aus dem Myokard im Stadium 3 der angiogenen Kaskade *in vitro*, 19 Tage in Kultur
Zellstrang aus mehreren Zellreihen mit abzweigendem dünnerem Strang.
Phasenkontrastmikroskop

Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro, die Organisation eines dreidimensionalen Netzwerkes kapillarähnlicher Strukturen, als Charakteristikum eines dreidimensionalen *in vitro*-Modells der Angiogenese, konnte nicht beobachtet werden. Stattdessen hoben sich in den folgenden 10 Tagen die Zellstränge aufgrund der zunehmenden Anlagerung von weiteren Endothelzellen von der Kulturschalenoberfläche ab und es kam stellenweise zur Ablösung. Auch die verbliebenen Reste dieser Stränge verloren nach einigen weiteren Tagen ihre Adhärenz. Anschließend wurden diese Areale der Kulturschale von umgebenden, adhärennten Endothelzellen durch Migration und Proliferation neu besiedelt.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnten netzartige endotheliale Strukturen beobachtet werden (Abb. 9), die ohne wesentliche mikroskopisch sichtbare Veränderungen das Bild über 6-8 Wochen dominierten. Ca. zwei Monate nach Erscheinen der ersten kapillarähnlichen Zellstränge und Ablösen dieser konnten in einigen Kulturen erneut kapillarähnliche Strukturen beobachtet werden.

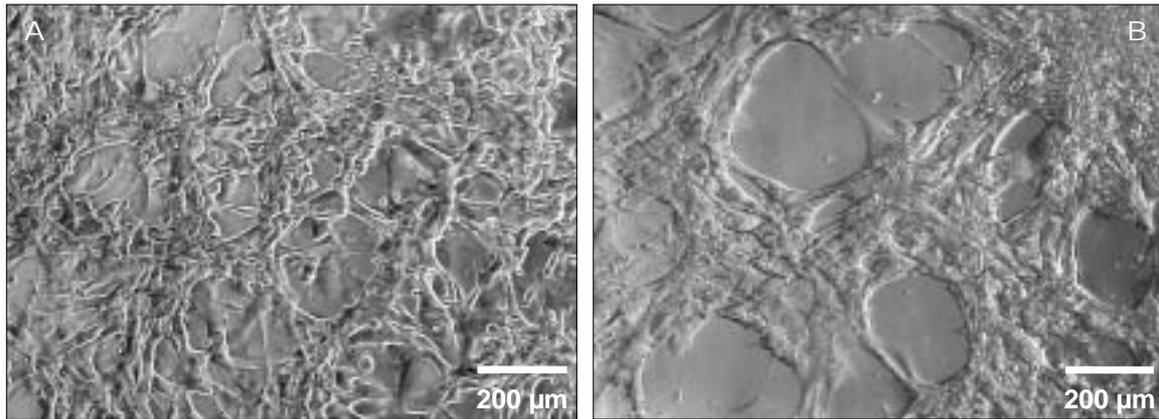


Abb. 9: Murine Endothelzellen aus dem Myokard, (A) 42 Tage in Kultur, (B) 35 Tage in Kultur
Netzartige endotheliale Strukturen. Phasenkontrastmikroskop ((B) schiefe Beleuchtung)

Die murinen Endothelzellen wurden in den Passagen 37-42 untersucht. Der zuvor beschriebene Ablauf der angiogenen Kaskade konnte nur in den Passagen 37-40 beobachtet werden. Bei höheren Passagen muriner Endothelzellen wurde die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen nicht beobachtet. Es zeigten sich lediglich netzartige endotheliale Strukturen (s. Abb. 9), die ohne wesentliche Umbauvorgänge das mikroskopische Bild über mehrere Wochen bestimmten.

5.2.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung muriner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro*

Transmissionselektronenmikroskopisch konnte in den murinen Zellkulturen ein zentrales Lumen innerhalb der kapillarähnlichen Strukturen nachgewiesen werden.

Die ovalen bis länglichen Zellen waren longitudinal angeordnet und lagen zum Teil dicht beieinander. Zwischen den Zellen waren stellenweise längliche (ca. 500 μm), schmale (bis 10 μm) oder auch ovale Spalträume ohne Zellkontakte zu erkennen (Abb. 10, 11 und 12). Zum Teil waren diese Interzellularspalten mit einem fibrillären Material gefüllt (Abb. 12). Die meist runden bis ovalen Zellkerne waren in der Regel stark gelappt (Abb. 13) und enthielten aufgelockertes, dispers verteiltes Chromatin. Nur an der Kernmembran fanden sich dichtere Bereiche. Der Nucleolus war oft gut zu erkennen. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis betrug 1:2 bis 1:3. Im Zytoplasma waren ovale bis längliche Mitochondrien vom Crista-Typ in großer Anzahl vorzufinden. Zwischen den Mitochondrien befanden sich Golgi-Felder und raues Endoplasmatisches Retikulum. Weibel-Palade-Körperchen wurden nicht gefunden. In einzelnen Zellen waren zahlreiche Vakuolen unterschiedlicher Größe (Durchmesser ca. 0,5-1 μm) zu erkennen, die leer erschienen und offensichtlich konfluieren (Abb. 10). Zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchung konnten diese Vakuolen innerhalb einer Zelle nicht mehr beobachtet werden. Einzelne Zellen wiesen dann eine große Vakuole (Durchmesser ca. 4-6 μm) auf, innerhalb derer fibrilläres Material sowie Zelldetritus zu sehen war, welche die Vakuolen zum Teil vollständig ausfüllten (Abb. 11 und 12).

Quer- bzw. Schrägschnitte durch kapillarähnliche Strukturen *in vitro* zeigten die Bildung eines zellfreien, mit fibrillärem Material angefüllten Lumens (Abb. 13, 14 und 15), welches oftmals nur von einer Zelle im Durchmesser begrenzt wurde (Abb. 13 und 14). Abb. 15 zeigt ein zentrales Lumen einer kapillarähnlichen Struktur, welches von drei Endothelzellen begrenzt wird, die sich vom Lumen wegwölben.

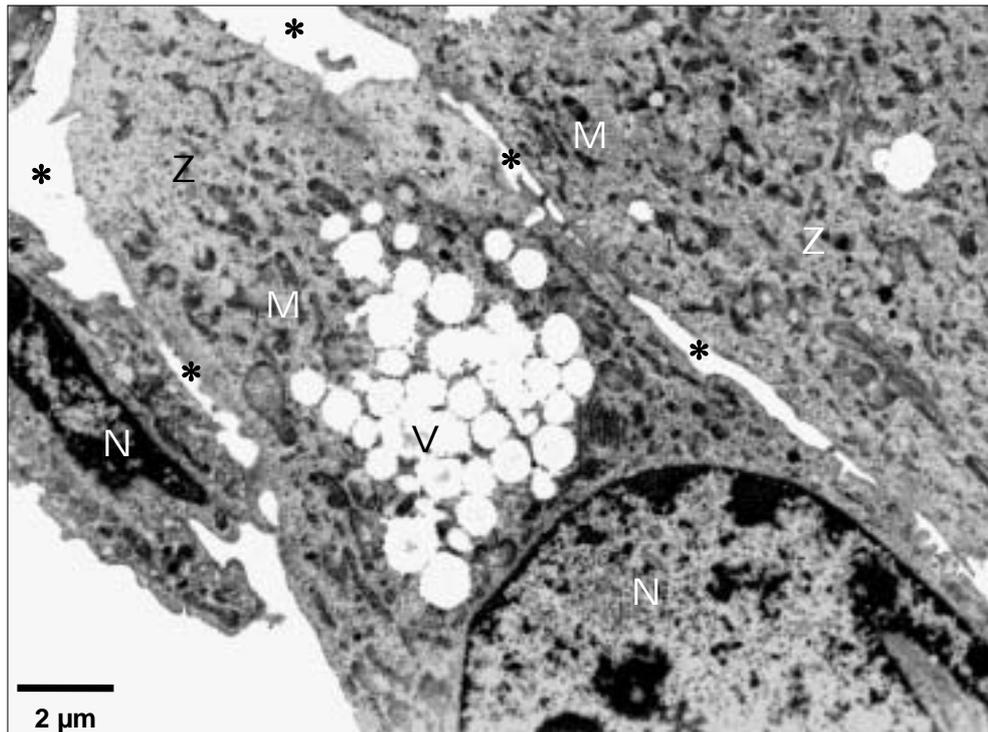


Abb. 10: Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 15 Tage in Kultur
Im Zytoplasma (Z) viele Mitochondrien (M) und zahlreiche Vakuolen (V). Interzelluläre Spalträume (*), Nucleus (N). TEM

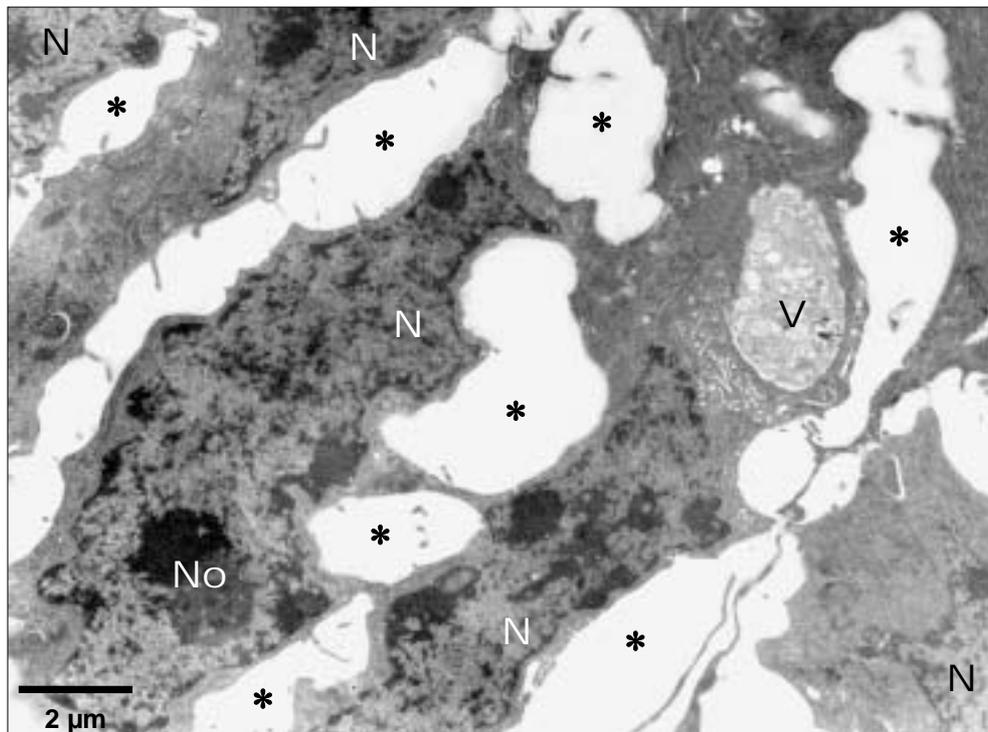


Abb. 11: Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 70 Tage in Kultur
Interzelluläre Spalträume (*), Nucleus (N), Nucleolus (No), Vakuole (V). TEM

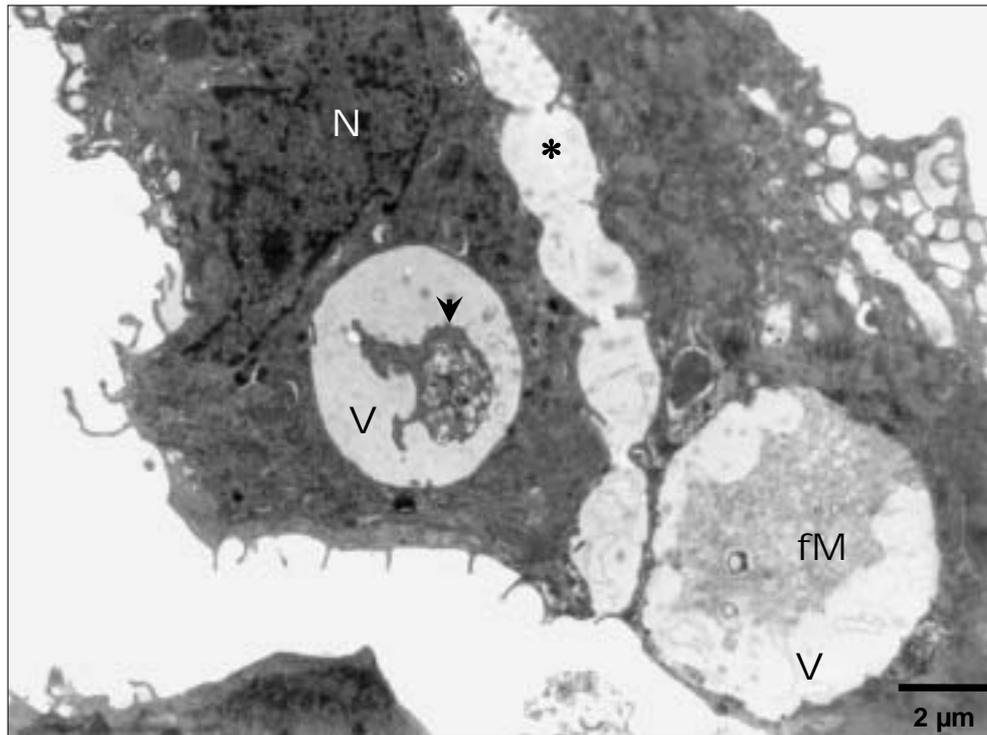


Abb. 12: Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 30 Tage in Kultur
Große intrazelluläre Vakuolen (V), angefüllt mit Zelldetritus (Pfeilspitze) sowie fibrillärem Material (fM). Interzellularspalt (*), Nucleus (N). TEM

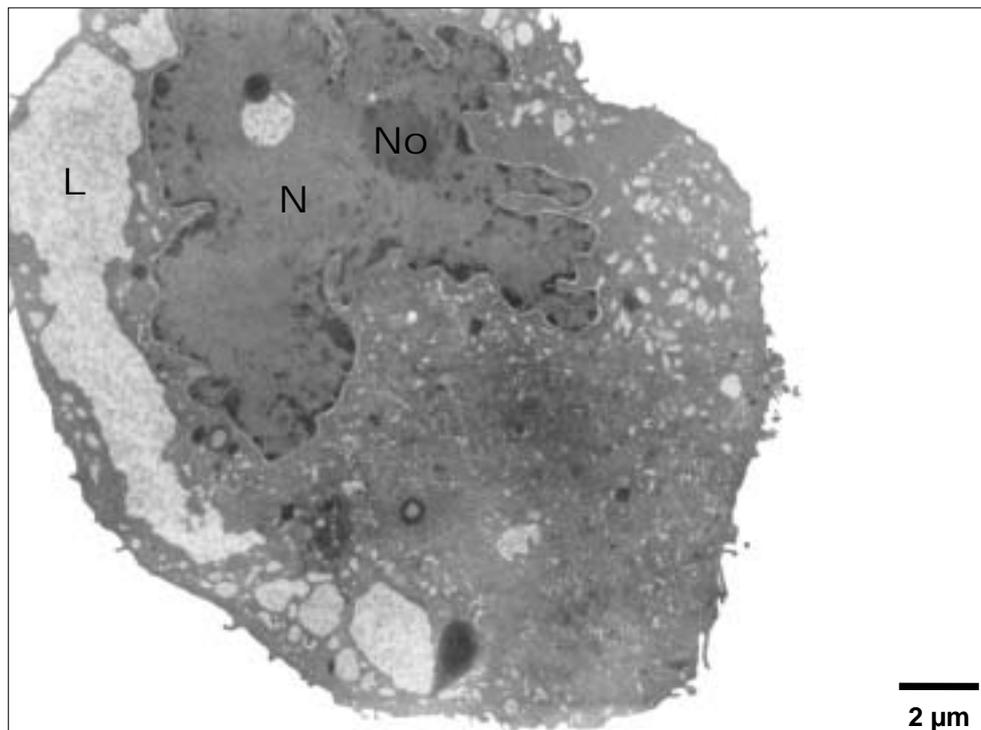


Abb. 13: Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 80 Tage in Kultur
Lumen (L) einer kapillarähnlichen Struktur, begrenzt von einer Endothelzelle, angefüllt mit fibrillärem Material. Nucleus (N), Nucleolus (No). TEM

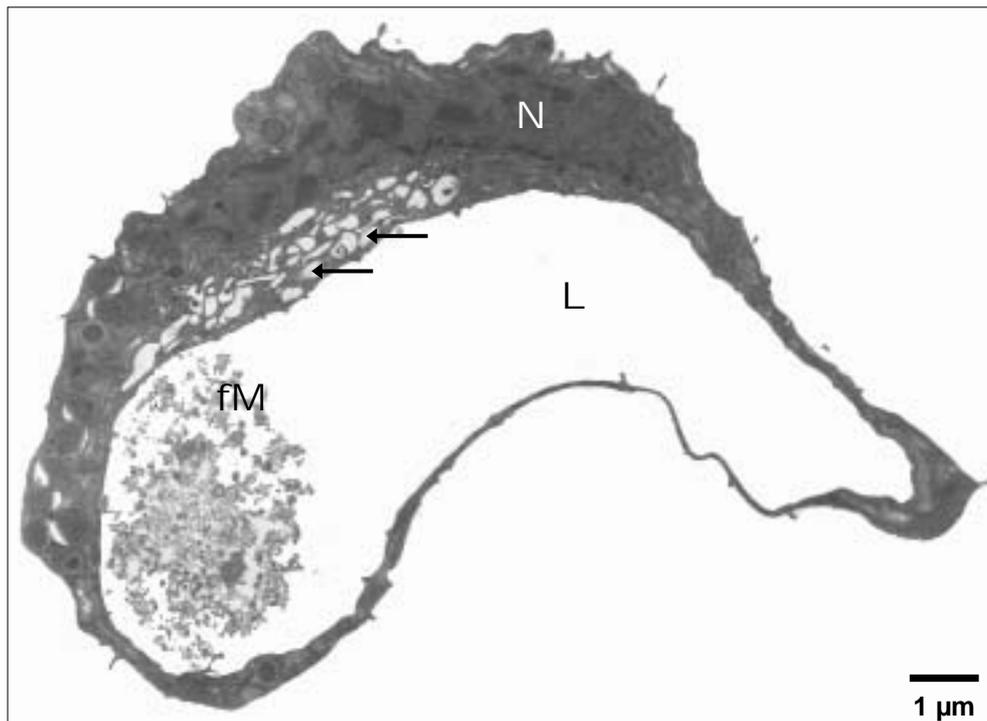


Abb. 14: Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 30 Tage in Kultur
Lumen (L) einer kapillarähnlichen Struktur, begrenzt von einer Endothelzelle, angefüllt mit nur wenig fibrillärem Material (fM). Nucleus (N), Vakuolen (Pfeile). TEM

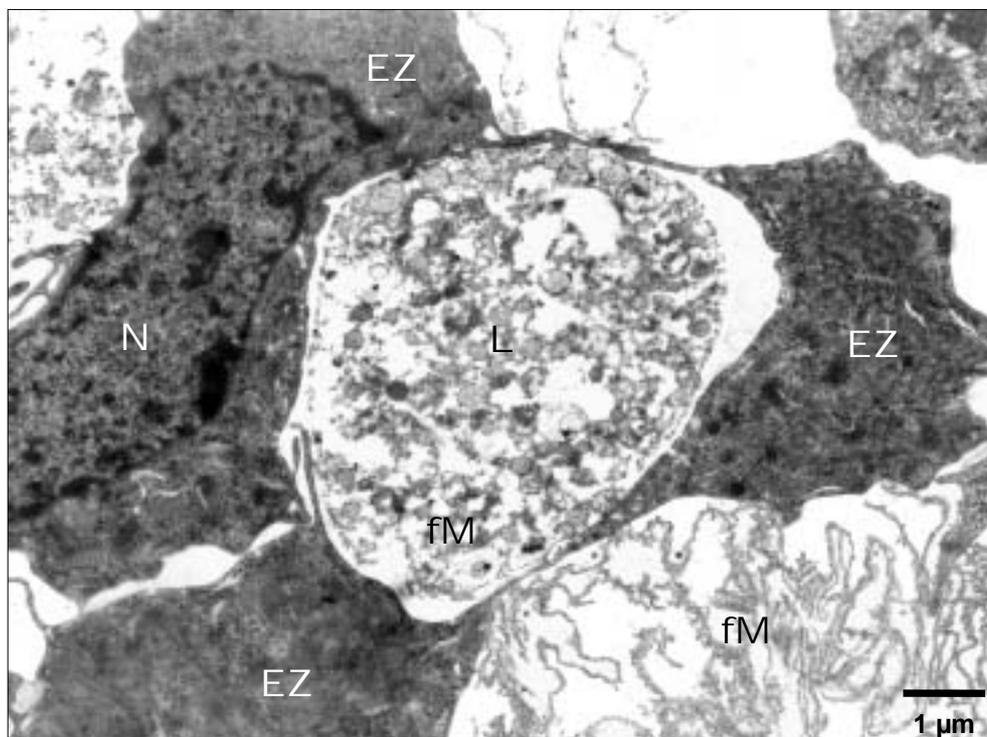


Abb. 15: Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 30 Tage in Kultur
Zentrales Lumen (L) einer kapillarähnlichen Struktur, begrenzt von drei Endothelzellen (EZ), angefüllt mit fibrillärem Material (fM). Nucleus (N). TEM

5.2.3 Transfektion muriner mikrovaskulärer Endothelzellen

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Transfektionen muriner mikrovaskulärer Endothelzellen vorgestellt. Die ersten Transfektionsversuche erfolgten im murinen Zellkulturmodell, da sich humane mikrovaskuläre Endothelzellen sehr viel schwieriger transfizieren lassen. Mit dem murinen Endothelzellklon (MHEC5) stand ein System zur Verfügung, an welchem die Transfektionsmethode erlernt und wichtige, die Transfektion beeinflussende Parameter analysiert werden konnten. Die murinen Endothelzellen zeigten sich bei den Versuchen als relativ gut zu transfizieren und erreichten hohe Expressionsraten der Luciferase.

Für die Transfektionsexperimente, welche sich in Vorversuche (Optimierungsversuche und Pilotstudie) sowie Hauptversuche gliederten, wurde die Polyfektion mittels Dendrimeren gewählt. Zur **Optimierung** der Transfektion mit dem polykationischen Transfektionsreagenz *SuperFect* wurde eine Serie von 3 Transfektionen durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.3.1). Zur Optimierung der Konzentration der Plasmid-DNA pro Kulturschale sowie zur Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex wurde nur das Plasmid mit dem konstitutiven CMV-Promotor (pJWM115) verwendet. Für die Bestimmung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte erschien es sinnvoll, Plasmide mit allen zur Verfügung stehenden Promotoren (CMV, Ets-1l, Ets-1k, E-sel) einzusetzen, um für jeden einzelnen Promotor den optimalen Zeitpunkt zur Auswertung des Luciferase-Assays zu bestimmen. Auf eine Optimierung des Verhältnisses von Plasmid-DNA-Konzentration zum Transfektionsreagenz wurde aufgrund von bereits durchgeführten Untersuchungen der Kooperationsfirma Munich Biotech AG verzichtet. Zur Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Plasmidkonstrukte siehe Kapitel 4.5.1.

In einer weiteren Vorversuchsreihe (**Pilotstudie**, s. Kap. 5.2.3.2) auf Basis der durch die Optimierung gewonnenen Ergebnisse wurden kultivierungsbedingte Parameter ermittelt und analysiert, um optimale Transfektionsbedingungen zu erhalten. In allen Optimierungsversuchen sowie in der Pilotstudie wurden Endothelzellen im Stadium der Proliferation (*Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro*) transfiziert. Im Anschluss an die Vorversuche erfolgte die eigentliche Charakterisierung verschiedener Plasmidkonstrukte auf Effizienz im murinen Zellkulturmodell der *in vitro*-Angiogenese (**Hauptversuche**, s. Kap. 5.2.3.3 und 5.2.3.4). Die Menge der exprimierten Luciferase in Relation zum Proteingehalt im Zelllysate (RLU/mg Protein) konnte dabei als ein direktes Maß für die Effizienz der jeweiligen Plasmidkonstrukte gewertet werden.

Die Transfektionsversuche erfolgten stets im Vierfachansatz. Bei jedem Transfektionsversuch wurden drei Negativ-Kontrollen, jeweils im Doppelansatz, mitgeführt (s. Kap. 4.5.6), die

ausschließen konnten, dass die resultierende Enzymaktivität auf der Aufnahme nackter Plasmid-DNA (K1), auf endogener Enzymaktivität (K2) bzw. auf einer Induktion durch das Transfektionsreagenz (K3) basierte (Tab. 6, 7, 8, 10, 11, 12 und Abb. 21).

5.2.3.1 Optimierung der Transfektion muriner Endothelzellen

Die Auswertungen dieser Versuchsreihe stützten sich nur auf die gemessene Luciferase-Aktivität (RLU-Werte bezogen auf Einsatz von 50 µl Zellysate), da zum Versuchszeitpunkt die Proteinbestimmung Hersteller-bedingt nicht auswertbare Ergebnisse aufgrund von Wechselwirkungen zwischen DTT (Bestandteil des Lysepuffers) und der BCA (Bicinchoninic Acid)-Arbeitslösung lieferte.

5.2.3.1.1 Optimierung der Konzentration der Plasmid-DNA

Murine Endothelzellen in der Passage 42 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 4 Wochen gesplittet und mit einer Aussaatdichte von $0,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in 24-Loch-Platten ausgesät, 20 Stunden kultiviert und mit 1-4 µg Plasmid-DNA (pJWM115) pro Kulturschale bei einem Verhältnis von 1 µl *SuperFect* pro µg Plasmid-DNA transfiziert. Die Zellen wurden 1 Stunde mit dem Transfektionsmix und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden inkubiert.

Abb. 16 zeigt, dass mit Erhöhung der Konzentration der Plasmid-DNA von 1 µg auf 2 µg pro Kulturschale eine deutliche Steigerung der RLU-Werte verbunden war, während kaum ein Unterschied in der Expression nach Erhöhung der Konzentration von 2 µg auf 3 µg zu verzeichnen war. Die deutliche Abnahme der Aktivität bei Einsatz von 4 µg Plasmid-DNA pro Kulturschale, einhergehend mit der mikroskopischen Kontrolle der Zellen, legte Anzeichen einer Schädigung (vermehrtes Ablösen) der Zellen durch die Transfektion dar (s. Kap. 5.2.4.1). Insgesamt waren Schwankungen innerhalb der einzelnen Ansätze zu verzeichnen. Für die weiteren Transfektionen wurde eine Plasmid-DNA-Konzentration von 2 µg pro Kulturschale gewählt, da mit dieser Konzentration sehr hohe RLU-Werte bei fehlenden mikroskopischen Anzeichen einer zellulären Schädigung durch die Transfektion erzielt wurden.

Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
K1	137	98	118
K2	115	135	125
K3	97	81	89

Tab. 6: Kontrollwerte der Optimierung der Plasmid-DNA-Konzentration pro Kulturschale

Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 1 µg nackter Plasmid-DNA (K1), nur in serumfreiem Medium (K2) bzw. in 1 µl *SuperFect* (K3) für 1 h inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert.

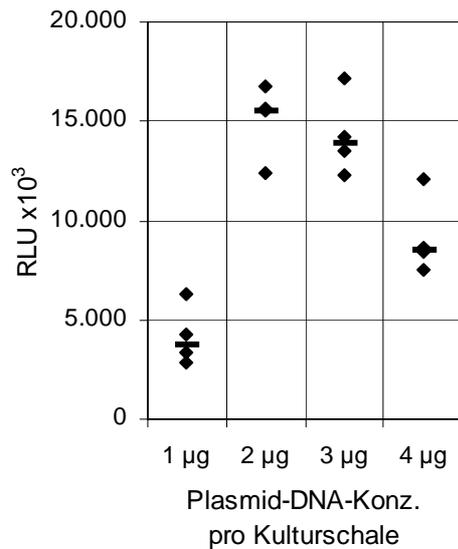


Abb. 16: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmid-DNA-Konzentration (pJWM115)

Murine Endothelzellen in der Passage 42 wurden nach einer 4-wöchigen Kultivierungsdauer in einer Konzentration von $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in 24-Loch-Platten ausgesät und 20 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 1-4 µg Plasmid-DNA (pJWM115) und 1-4 µl *SuperFect* wurde für 1 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zellysate wurde im Luminometer gemessen. Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) sowie der Median.

5.2.3.1.2 Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte

Murine Endothelzellen in der Passage 42 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 8 Wochen gesplittet und mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^4$ Zellen pro cm² in 24-Loch-Platten ausgesät, 20 Stunden kultiviert und mit 2 µg Plasmid-DNA (pJWM115, pCK5, pPS12, pPS6) pro Kulturschale bei einem Verhältnis von 1 µl *SuperFect* pro µg Plasmid-DNA 1 Stunde transfiziert. Die weitere Inkubation bis zur Auswertung der Transfektion betrug 24 und 30 Stunden.

Mit allen eingesetzten Vektoren, auch mit den Endothelzell-spezifische Promotoren (Ets-1, E-sel) enthaltenden Plasmiden, führte die Transfektion zur Expression der Luciferase. Abb. 17 zeigt, dass der optimale Zeitpunkt zur Auswertung des Luciferase-Assays vom eingesetzten Plasmid abhängig war. Während durch die Vektoren pJWM115 (CMV-luc) und pCK5 (Ets-1l-luc) ein Abfall der Luciferase-Expression bei Steigerung der Inkubationszeit von 24 Stunden auf 30 Stunden um das 1,26- bzw. 4,30-fache zu verzeichnen war, konnte durch die Erhöhung der Inkubationszeit um 6 Stunden bei den Vektoren pPS12 (Ets-1k-luc) und pPS6 (E-sel-luc) eine Steigerung der Expression um das 2,46- bzw. 2,02-fache erzielt werden. In den weiteren Transfektionsexperimenten wurde für die Plasmide pJWM115 und pCK5 eine 24-stündige Inkubationszeit und für die Plasmide pPS12 und pPS6 eine 30-stündige Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte eingehalten.

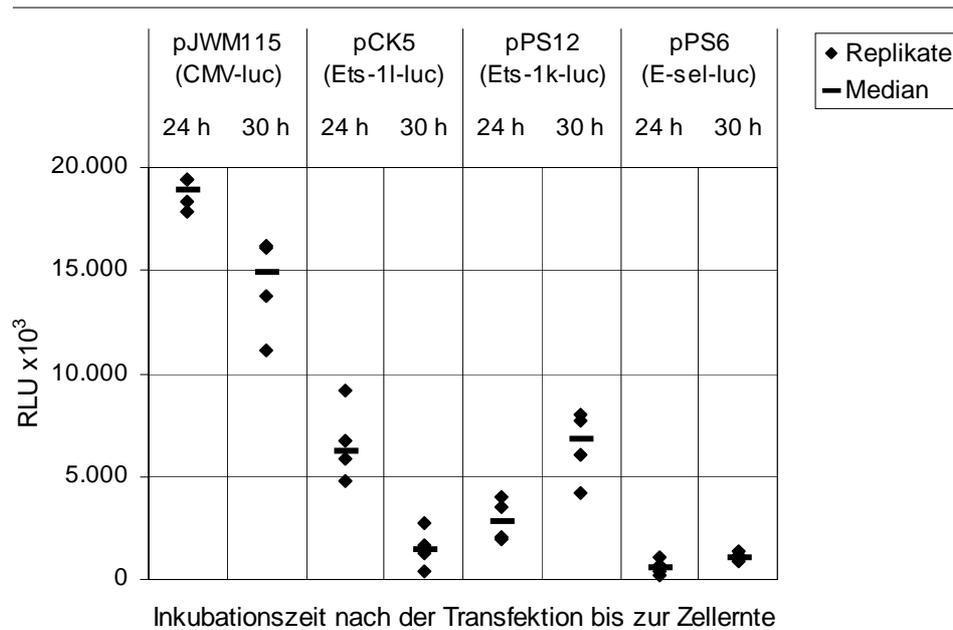


Abb. 17: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte

Murine Endothelzellen in der Passage 42 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 8 Wochen in einer Konzentration von $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in 24-Loch-Platten ausgesät und 20 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 2 µg Plasmid-DNA und 2 µl *SuperFect* wurde für 1 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 bzw. 30 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität im Zelllysat wurde im Luminometer gemessen. Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median.

Tab. 7: Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte

Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
K1	181	52	117
K2	55	715	385
K3	403	59	231

Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 2 µg nackter Plasmid-DNA (K1), nur in serumfreiem Medium (K2) bzw. in 2 µl *SuperFect* (K3) für 1 h inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert.

5.2.3.1.3 Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex

Zur Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex wurden murine Endothelzellen in der Passage 45 nach einer 1-wöchigen Kultivierungsdauer gesplittet und in einer Konzentration von $0,75 \times 10^4$ Zellen pro cm² in 24-Loch-Platten ausgesät, 20 Stunden kultiviert und 1-5 Stunden mit dem Transfektionskomplex aus 2 µg Plasmid-DNA (pJWM115) und 2 µl *SuperFect* pro Kulturschale inkubiert. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität.

Abb. 18 zeigt, dass die Luciferase-Assays zu allen Messzeitpunkten hohe RLU-Werte ergaben. In zwei Ansätzen (2 und 4 Stunden Inkubation) wurden 30 Mio. RLU (Maximalwert des Luminometers) detektiert. Insgesamt sind nur geringe Schwankungen innerhalb der Vierfachansätze zu vermerken. Bei einer 4- und 5-stündigen Inkubationszeit zeigte das mikroskopische Bild vor der Auswertung der Transfektion Zellschäden (s. Kap. 5.2.4.1). Bei allen weiteren Transfektionsversuchen wurde eine Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex von 2 Stunden eingehalten.

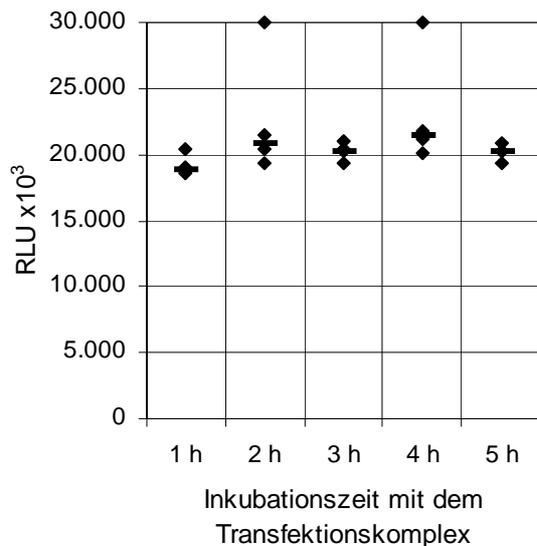


Abb. 18: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex

Murine Endothelzellen in der Passage 45 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 1 Woche in einer Konzentration von $0,75 \times 10^4$ Zellen/cm² in 24-Loch-Platten ausgesät und 20 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 2 µg Plasmid-DNA (pJWM115) und 2 µl *SuperFect* wurde für 1-5 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität im Zelllysat wurde im Luminometer gemessen. Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median.

Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
K1	588	95	342
K2	191	51	121
K3	55	116	86

Tab. 8: Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex

Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 2 µg nackter Plasmid-DNA (K1), nur in serumfreiem Medium (K2) bzw. in 2 µl *SuperFect* (K3) für 1 h inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert.

5.2.3.2 Pilotstudie zur Transfektion muriner Endothelzellen

Diese Versuchsreihe wurde mit Luciferase-Vektoren mit den Promotoren Ets-1l (pCK5), Ets-1k (pPS12) sowie E-sel (pPS6) durchgeführt. Murine Endothelzellen in der Passage 40 wurden nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer gesplittet, mit einer Aussaatdichte von $0,75 \times 10^4$ Zellen pro cm² einer 24-Loch-Platte ausgesät und 20 Stunden kultiviert. Bei allen Transfektionen (Messungen) wurden 2 µg Plasmid-DNA pro Kulturschale bei einem Verhältnis von 1 µl *SuperFect* pro µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen wurden 1-2 Stunden mit dem Transfektionskomplex und nach einem Mediumwechsel in Abhängigkeit vom Vektor

weitere 24 Stunden (pCK5) bzw. 30 Stunden (pPS12, pPS6) bis zur Zellernte inkubiert. In Tab. 9 sind die jeweiligen Versuchsparemeter der 5 Messungen in einer Übersicht dargestellt.

Parameter	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
Kultivierungsdauer der Zellen vor der Transfektion	4 Wochen	5 Wochen		6 Wochen	
Aussaatdichte der Zellen vor der Transfektion	0,75x10 ⁴ Zellen/cm ²				
Passage der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion	P41				
Plasmid-DNA-Konz. pro Kulturschale	2 µg				
Verhältnis <i>SuperFect</i> /Plasmid-DNA	1 µl/µg				
Inkubationsdauer mit dem Transfektionsmix	2 h	1 h		2 h	
Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor	pCK5 (Ets-1l-luc): 24 h pPS12 (Ets-1k-luc): 30 h pPS6 (E-sel-luc): 30 h				

Tab. 9: Übersicht über die Versuchsparemeter der einzelnen Messungen der Pilotstudie

Zur Inkubationsdauer der Zellen mit dem Transfektionskomplex ist folgendes anzugeben. Die erste Messung zeigte deutlich niedrigere RLU-Werte (Abb. 19 A) im Vergleich zum Versuch der Optimierung der Inkubationsdauer nach der Transfektion bis zur Zellernte (Abb. 17), in dem die gleiche Plasmid-DNA-Konzentration pro Kulturschale eingesetzt wurde, aber die Zellen kürzer mit dem Transfektionskomplex inkubiert wurden. Aus diesem Grund wurde durch Reduktion der Inkubationsdauer mit dem Transfektionskomplex von 2 Stunden auf 1 Stunde (Messung 2 und 3) im Hinblick auf eine Minimierung möglicher toxischer Schäden versucht, die Transfektionseffizienz zu steigern. Dieser Ansatz führte jedoch zu keiner Steigerung der Effizienz. Folglich wurde die Inkubationsdauer mit dem Transfektionskomplex wieder auf 2 Stunden festgesetzt (Messung 4 und 5).

Es fielen bei insgesamt niedrigeren Messwerten die großen Schwankungen in der Höhe der Messwerte sowohl innerhalb eines Versuches als auch von Versuch zu Versuch auf. Um mögliche Differenzen in der Anzahl der Zellen, die für den Luciferase-Assay eingesetzt wurden, auszugleichen, wurde die Proteinkonzentration in den Zelllysaten mit der Methode nach

Pierce als Maßstab für die Zellzahl bestimmt. Abb. 19 B zeigt deutlich Differenzen der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten, die für den Luciferase-Assay eingesetzt wurden. Es ergab sich keine eindeutige Korrelation hoher Luciferase-Werte mit hohen Proteinkonzentrationen im Zelllysat.

Der Median dieser 5 Assays betrug $9,22 \times 10^6$ RLU/mg Protein für pCK5 (Ets-1luc)-transfizierte Zellen, $24,04 \times 10^6$ RLU/mg Protein für Transfektionen mit dem Vektor pPS12 (Ets-1k-luc) und $30,93 \times 10^6$ RLU/mg Protein für Transfektionen mit dem Vektor pPS6 (E-seluc). Dies zeigt, dass, abgesehen von der Messung 1, mit dem kurzen Ets-1-Promotor-Fragment das Luciferase-Gen effizienter transkribiert werden konnte. Eine eindeutige Differenzierung bezüglich der Effizienzen der Plasmide pPS12 und pPS6 ist aufgrund der großen Schwankungen der Messwerte nicht möglich. Weiterhin war auffällig, dass mit dem Vektor pCK5 bei der ersten Messung eine um den Faktor 38,15 bis 98,10 höhere Transfektionseffizienz (RLU/mg Protein) im Vergleich zu den nachfolgenden Messungen 2-5 erzielt wurde, jedoch mit sehr großen Schwankungen innerhalb der vier Replikate.

Da die durchgeführte Normierung der RLU-Messwerte auf den Proteingehalt in den Zelllysaten nicht zu einer Korrektur der Schwankungen führte, wurden weitere Unterschiede zwischen den Messungen analysiert. Aus Tab. 9 wird ersichtlich, dass die Kultivierungsdauer der Zellen vor der Subkultivierung für die Transfektion zwischen 4 und 6 Wochen schwankte. Da eine vollständige Konfluenz der Zellen im Gegensatz zur logarithmischen Wachstumsphase kein definierter Zustand ist, wurde in den weiteren Versuchen versucht, die Kultivierungsdauer der Zellen vor der Subkultivierung so weit wie möglich zu standardisieren. Die Zellen wurden vor Aussaat für die Transfektion ca. 1 Woche kultiviert und somit niemals länger als 1-3 Tage im Zustand der Konfluenz belassen.

Messung	Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
1	K1	93	76	85
	K2	100	49	75
	K3	39	60	50
2	K1	55	40	48
	K2	63	51	57
	K3	59	79	69
3	K1	59	43	51
	K2	62	61	62
	K3	128	64	96
4	K1	67	60	64
	K2	175	57	116
	K3	95	53	74
5	K1	57	132	95
	K2	55	166	111
	K3	174	60	117

Tab. 10: Kontrollwerte aus 5 Luciferase-Assays

Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 2 µg nackter Plasmid-DNA (K1), nur in serumfreiem Medium (K2) bzw. in 2 µl *SuperFect* (K3) für 1 h (Messung 2 und 3) bzw. 2 h (Messung 1, 4 und 5) inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 30 h kultiviert.

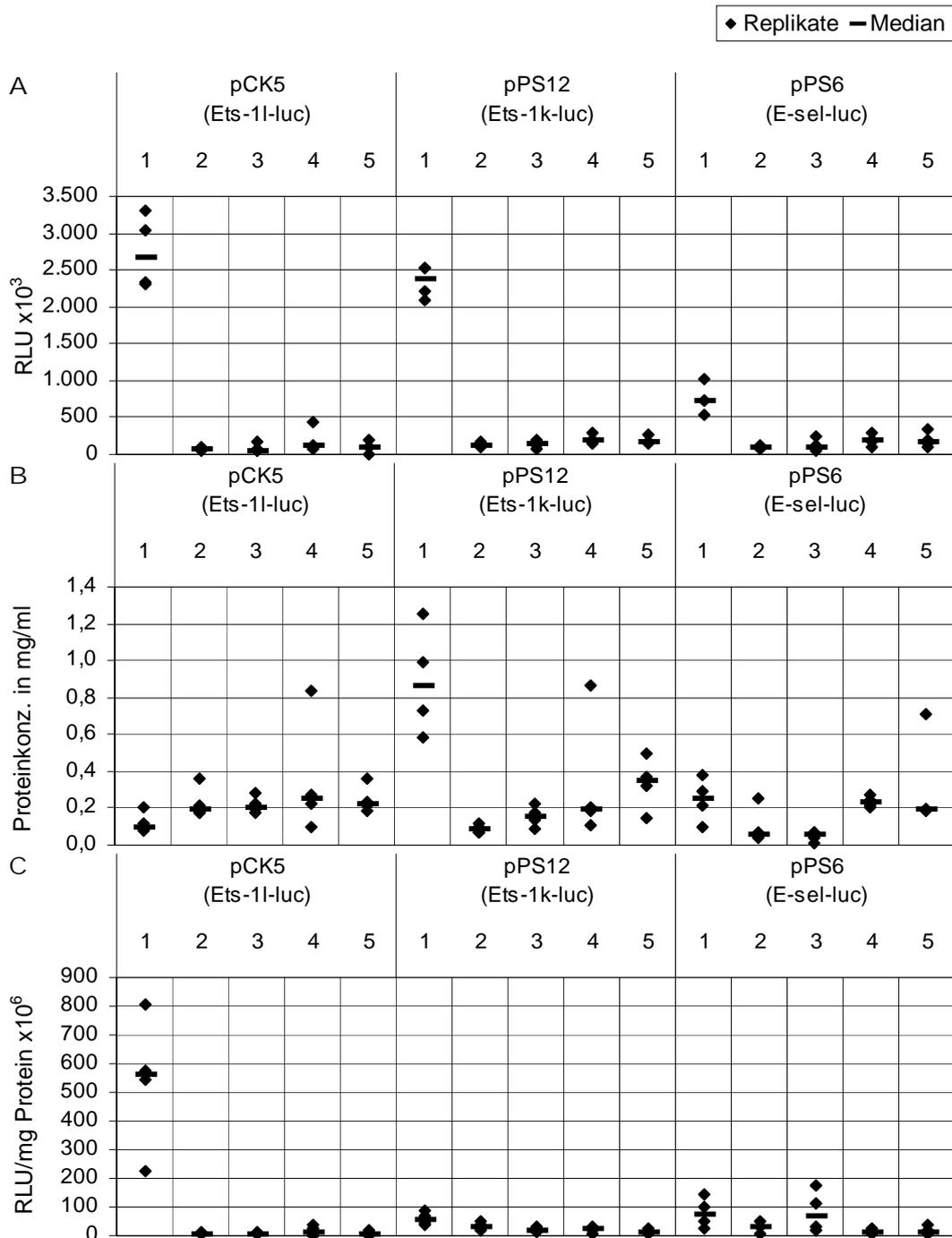


Abb. 19: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor in 5 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro*, (A) vor Normierung, (C) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zellysat (B)

Murine Endothelzellen in der Passage 40 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 4 Wochen (Messung 1), 5 Wochen (Messung 2 und 3) bzw. 6 Wochen (Messung 4 und 5) vor der Transfektion in einer Konzentration von $0,75 \times 10^4$ Zellen/cm² in 24-Loch-Platten ausgesät und 20 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 2 µg Plasmid-DNA und 2 µl *SuperFect* wurde für 1 h (Messung 2 und 3) bzw. für 2 h (Messung 1, 4 und 5) zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h (pCK5) bzw. für 30 h (pPS12, pPS6) kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zellysat wurde im Luminometer gemessen (A) und parallel der Proteingehalt in den Zellysaten bestimmt (B). Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median der 5 unabhängigen Experimente.

5.2.3.3 Effizienz verschiedener Promotoren im murinen *in vitro*-Modell der Angiogenese

Murine Endothelzellen aus dem Herzmuskel wurden unter standardisierten Bedingungen transfiziert, die durch Optimierungsversuche (s. Kap. 5.2.3.1) sowie im Rahmen der Pilotstudie (s. Kap. 5.2.3.2) ermittelt wurden. Eingesetzt wurden Reporter-gen-Vektoren mit den Promotoren CMV (pJWM115), Ets-1I (pCK5), Ets-1k (pPS12) sowie E-sel (pPS6).

5.2.3.3.1 Promotor-spezifische Luciferase-Expression nach Transfektion muriner Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* (Proliferation)

Murine Endothelzellen wurden nach 1-wöchiger Kultivierungsdauer (Passage 40 bzw. 41) gesplittet, mit einer Aussaatdichte von 2×10^4 Zellen pro cm^2 einer 24-Loch-Platte ausgesät und 20 Stunden kultiviert. Bei allen 3 Transfektionen wurden 2 μg Plasmid-DNA pro Kulturschale bei einem Verhältnis von 1 μl *SuperFect* pro μg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen wurden 2 Stunden mit dem Transfektionskomplex und nach einem Mediumwechsel in Abhängigkeit vom Vektor weitere 24 Stunden (pJWM115, pCK5) bzw. 30 Stunden (pPS12, pPS6) bis zur Zellernte inkubiert. Die im Luciferase-Assay gemessene Luciferase-Aktivität, genormt auf den Proteingehalt in den Zelllysaten, diente als Maß für die Transfektionseffizienz und damit für die Effizienz des Promotors.

Auffällig war, dass deutlich höhere RLU-Werte (Abb. 20) als in den Versuchen der Pilotstudie (Abb. 19) gemessen wurden, in denen ebenfalls 2 μg Plasmid-DNA pro Kulturschale zur Transfektion eingesetzt wurden. Die Schwankungen der RLU-Werte von Versuch zu Versuch waren geringer als in vorausgegangenen Versuchen.

Der Median dieser 3 Assays betrug $15,38 \times 10^8$ RLU/mg Protein für pJWM115 (CMV-luc)-transfizierte Zellen, $4,41 \times 10^8$ RLU/mg Protein für Transfektionen mit dem Vektor pCK5 (Ets-1I-luc), $3,47 \times 10^8$ RLU/mg Protein für Transfektionen mit dem Vektor pPS12 (Ets-1k-luc) und $1,84 \times 10^8$ RLU/mg Protein für pPS6 (E-sel-luc)-transfizierte Zellen. Beide Fragmente des Ets-1-Promotors besaßen demnach eine höhere Aktivität als der E-sel-Promotor. Eine weitere Differenzierung zwischen den Effizienzen der Vektoren pCK5 und pPS12 war aufgrund der Schwankungen in der Aktivität des pCK5-Vektors nicht möglich.

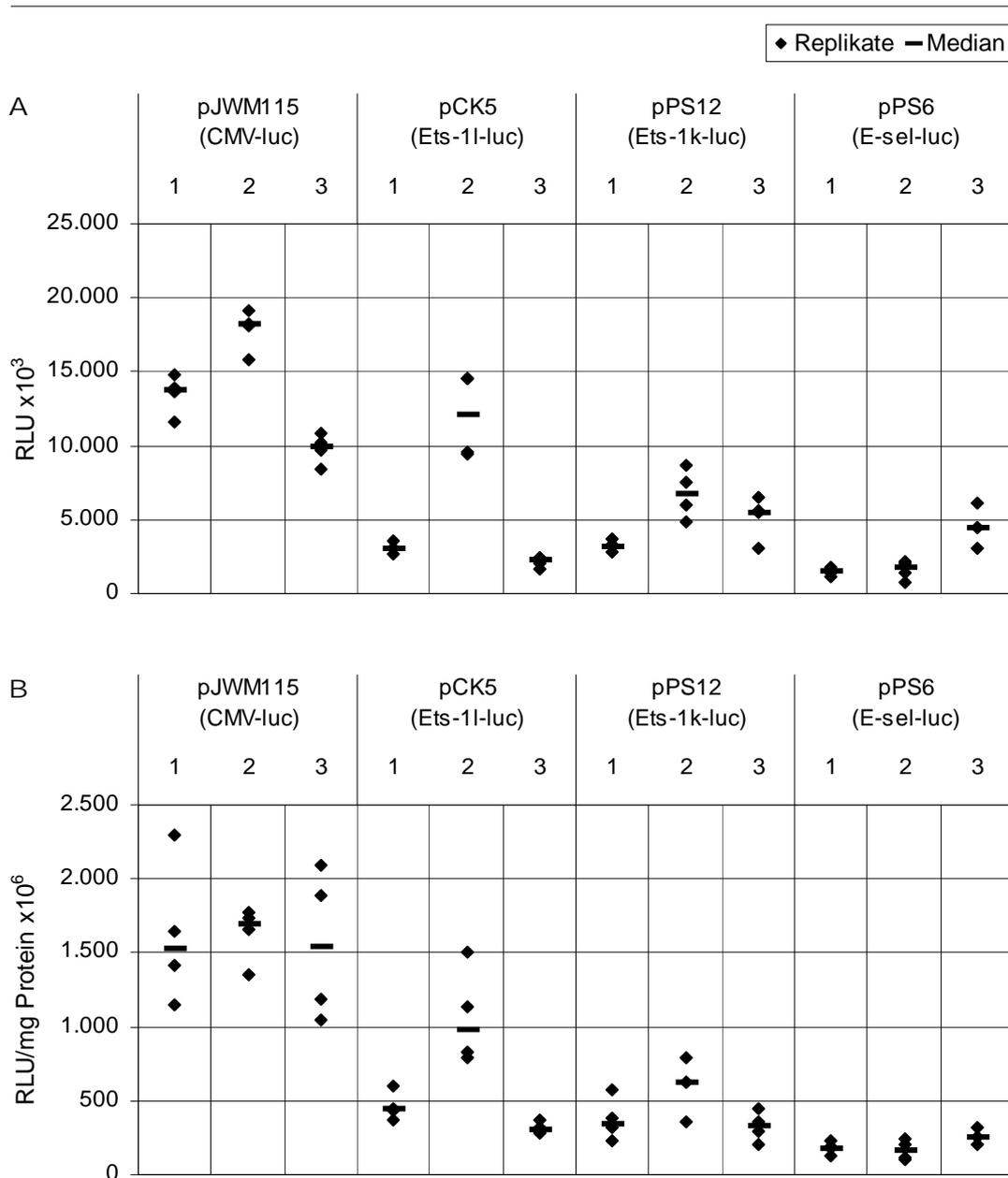


Abb. 20: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro*, (A) vor Normierung, (B) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate

Murine Endothelzellen in der Passage 40 (Messung 1 und 2) bzw. Passage 41 (Messung 3) wurden nach 1-wöchiger Kultivierungsdauer in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen/cm² in 24-Loch-Platten ausgesät und 20 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 2 µg Plasmid-DNA und 2 µl *SuperFect* wurde für 2 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h (pJWM115, pCK5) bzw. für 30 h (pPS12, pPS6) kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zelllysate wurde im Luminometer gemessen (A) und parallel der Proteingehalt in den Zelllysaten bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median der 3 unabhängigen Experimente.

Messung	Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
1	K1	284	122	203
	K2	65	133	99
	K3	127	86	107
2	K1	60	93	77
	K2	104	127	116
	K3	377	67	222
3	K1	62	89	76
	K2	79	53	66
	K3	95	67	81

Tab. 11: Kontrollwerte aus 3 Luciferase-Assays

Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 2 µg nackter Plasmid-DNA (K1), nur in serumfreiem Medium (K2) bzw. in 2 µl *SuperFect* (K3) für 2 h inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert.

5.2.3.3.2 Ergebnisse der Transfektion muriner Endothelzellen im *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro* (Bildung kapillarähnlicher Strukturen)

Diese Versuchsreihe, bestehend aus 3 Messungen, wurde analog zur Transfektion muriner Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* durchgeführt. Murine Endothelzellen in den Passagen 37, 38 und 39 wurden im Selektivmedium 2-3 Wochen bis zum *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro* kultiviert und dann transfiziert. Bei allen Transfektionen wurden 2 µg Plasmid-DNA (pJWM115, pCK5, pPS12, pPS6) pro Kulturschale bei einem Verhältnis von 1 µl *SuperFect* pro µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen wurden 2 Stunden mit dem Transfektionsmix und nach einem Mediumwechsel in Abhängigkeit vom eingesetzten Plasmid weitere 24 Stunden (pJWM115, pCK5) bzw. 30 Stunden (pPS12, pPS6) bis zur Zellernte unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die durch die transiente Transfektion induzierte Expression der Luciferase wurde im Luminometer gemessen.

Aus Abb. 21 wird ersichtlich, dass, mit Ausnahme der Messung 2 nach Transfektion mit dem pJWM115-Vektor (CMV-luc), keine Luciferase-Expression detektiert werden konnte, die gemessenen RLU-Werte (bezogen auf 50 µl Zelllysate) lagen im Bereich der Kontrollwerte. Aus diesem Grund erfolgte keine Normierung der RLU-Werte auf den Proteingehalt der Zelllysate.

Die Messung 2 nach Transfektion mit dem pJWM115-Vektor zeigte eine sehr geringe Expression der Luciferase. Die mikroskopische Kontrolle dieser Zellen zeigte bereits vor der Transfektion das Ablösen einiger Zellen bzw. kapillarähnlicher Strukturen durch den Waschprozess mit dem PBS-Puffer. Es hat hier also durch äußere Manipulation ein Ablösen von Zellen, unabhängig von der Transfektion, stattgefunden, welches zu einer Proliferation der Endothelzellen führte (s. Kap. 5.2.1).

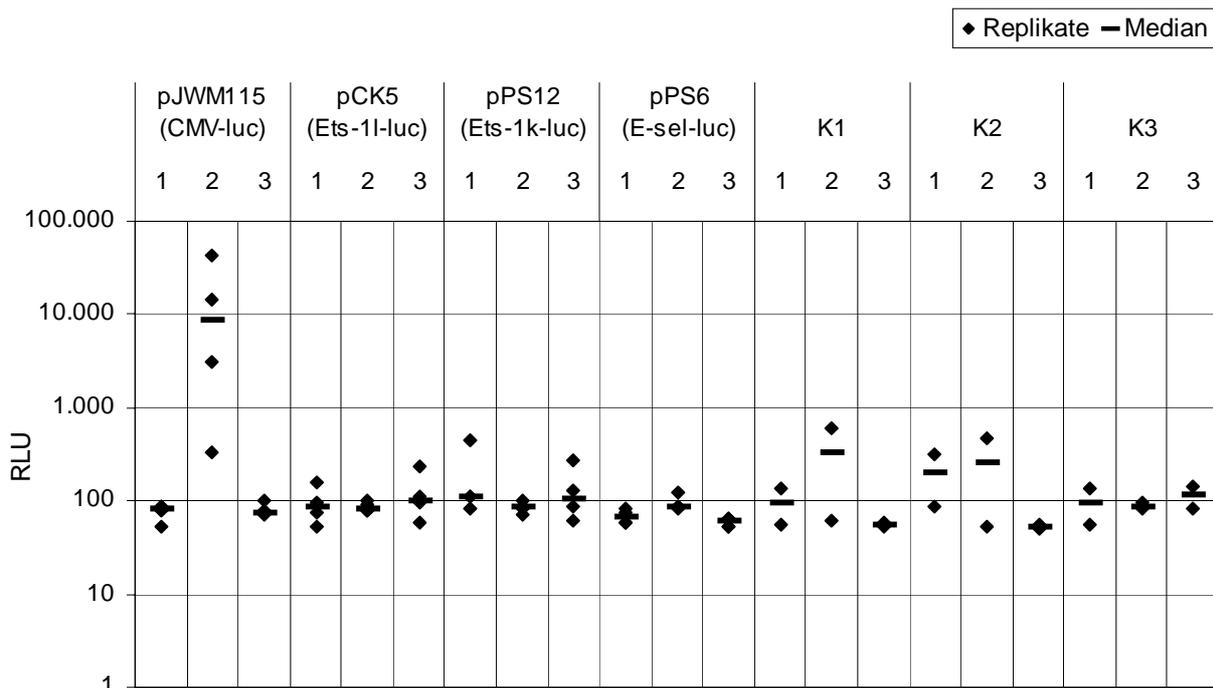


Abb. 21: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor sowie Kontrollwerte in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro

Murine Endothelzellen in der Passage 37 (Messung 1), Passage 38 (Messung 2) bzw. Passage 39 (Messung 3) wurden in 24-Loch-Platten im Selektivmedium 2-3 Wochen bis zum Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro kultiviert. Der Transfektionsmix aus 2 µg Plasmid-DNA und 2 µl *SuperFect* wurde für 2 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h (pJWM115, pCK5) bzw. 30 h (pPS12, pPS6) kultiviert. Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 2 µg nackter Plasmid-DNA (K1), in 2 µl *SuperFect* (K3) bzw. nur in serumfreiem Medium (K2) für 2 h inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zelllysat wurde im Luminometer gemessen. Logarithmisch dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median der 3 unabhängigen Experimente.

5.2.3.4 Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-Selektin-Promotoraktivität

Diese Studie umfasste vier unabhängige Transfektionsexperimente (Messungen) und wurde mit den Vektoren pPS6 (E-sel-luc), pPO18 (5xeps-E-sel-luc), pPO14 (E-sel-luc-flk-1) und pPO12 (E-sel-HLA-luc) durchgeführt, wobei der pPS6-Vektor als Kontrolle diente. Murine Endothelzellen in der Passage 39, 40 bzw. 41 wurden nach 1-wöchiger Kultivierungsdauer gesplittet, mit einer Konzentration von $2-2,25 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 einer 24-Loch-Platte ausgesät und 20 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden 2 Stunden mit dem Transfektionsmix aus 2 µg Plasmid-DNA und 2 µl *SuperFect* und nach einem Mediumwechsel für weitere 30 Stunden bis zur Zellernte inkubiert. Die im Luciferase-Assay gemessene Luciferase-Aktivität, genormt auf den Proteingehalt im Zelllysat, diente als Maß für die Transfektionseffizienz und

damit für den Einfluss der regulatorischen Gensequenzen auf die Expressionsstärke des E-sel-Promotors.

Der Median dieser 4 Assays betrug für Transfektionen mit dem Kontrollplasmid pPS6 (E-sel-luc) $1,74 \times 10^8$ RLU/mg Protein, für pPO18 (5x β s-E-sel-luc)-transfizierte Zellen $0,19 \times 10^8$ RLU/mg Protein, für pPO14 (E-sel-luc-flk-1)-transfizierte Zellen $0,23 \times 10^8$ RLU/mg Protein und für Transfektionen mit dem pPO12-Vektor (E-sel-HLA-luc) $6,84 \times 10^8$ RLU/mg Protein.

Der Vektor pPO12 erzielte also in allen drei Versuchen die höchsten Transfektionseffizienzen (Abb. 22). In Relation zum Kontrollplasmid pPS6 ergab sich eine Steigerung der auf den Proteingehalt genormten Luciferase-Aktivität (relative Luciferase-Aktivität) um den Faktor 2,05 bis 5,95 (Abb. 23). Für die Plasmide mit zusätzlichen Enhancern ergab sich eine Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität um den Faktor 5,21 bis 24,58 für pPO18 bzw. um den Faktor 2,91 bis 13,90 für pPO14 (Abb. 23).

Auffällig war, dass in der Messung 1 mit allen Vektoren (außer pPO14) geringere Effizienzen erzielt wurden als in den nachfolgenden Messungen 2-4 (Abb. 22). Die Endothelzellen in der Messung 1 wurden in einer höheren Konzentration 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät und befanden sich zum Zeitpunkt der Transfektion in einer höheren Passage.

Messung	Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
1	K1	67	131	99
	K2	83	90	87
	K3	120	99	110
2	K1	92	144	118
	K2	55	93	74
	K3	195	83	139
3	K1	115	94	105
	K2	140	86	113
	K3	122	65	94
4	K1	66	49	58
	K2	137	70	104
	K3	59	77	68

Tab. 12: Kontrollwerte aus 4 Luciferase-Assays

Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 2 μ g nackter Plasmid-DNA (K1), nur in serumfreiem Medium (K2) bzw. in 2 μ l *SuperFect* (K3) für 2 h inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 30 h kultiviert.

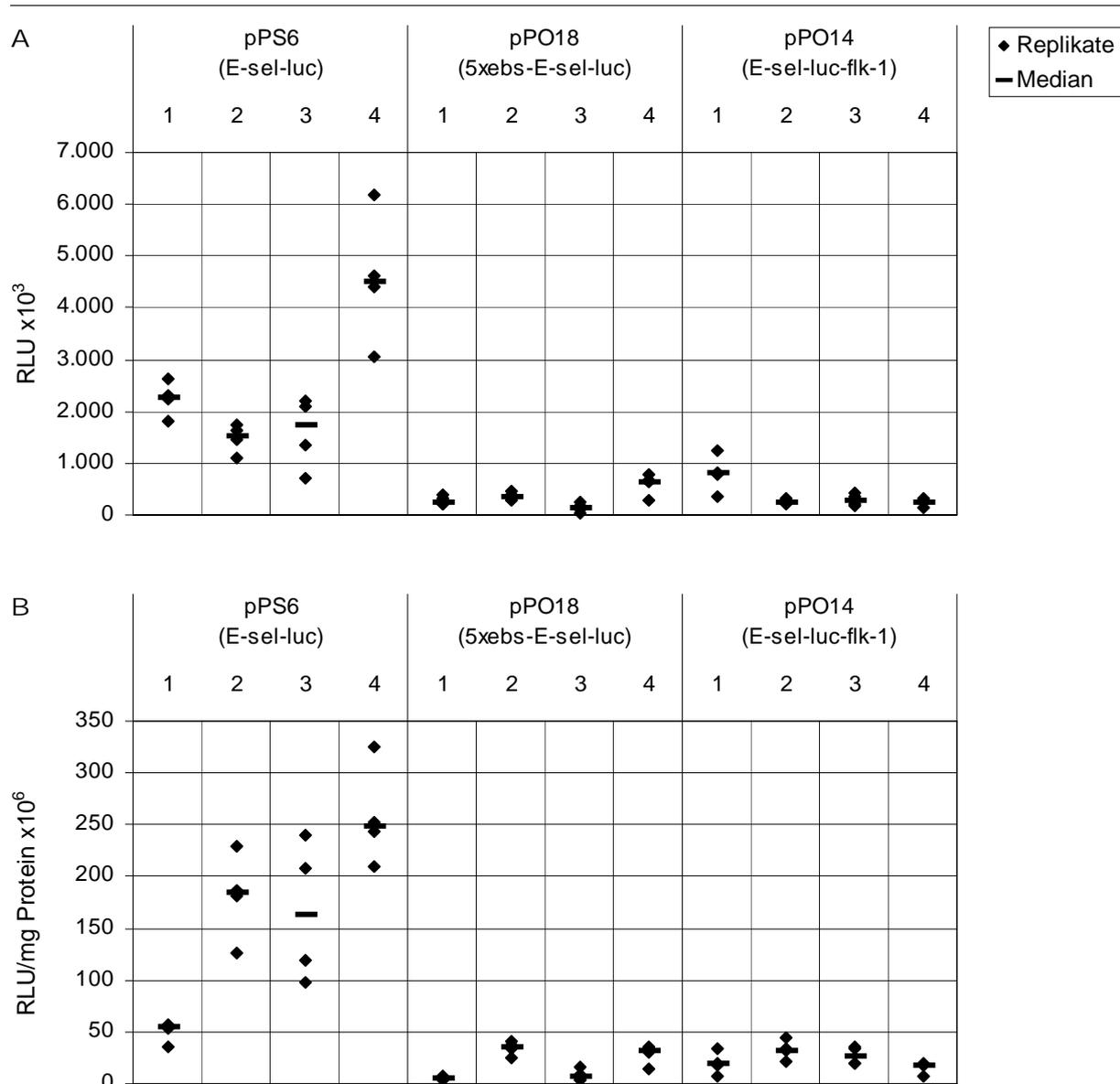


Abb. 22: Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-sel-Promotoraktivität in 4 Luciferase-Assays nach Transfektion muriner Endothelzellen im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro*, (A, C) Luciferase-Aktivität vor Normierung, (B, D) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate (s. auch Seite 90)

Murine Endothelzellen in der Passage 39 (Messung 2 und 3), Passage 40 (Messung 1) bzw. Passage 41 (Messung 4) wurden nach einer 1-wöchigen Kultivierungsdauer in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen/cm² (Messungen 2-4) bzw. $2,25 \times 10^4$ Zellen/cm² in 24-Loch-Platten ausgesät und 20 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 2 µg Plasmid-DNA und 2 µl *SuperFect* wurde für 2 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 30 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zelllysate wurde im Luminometer gemessen (A, C) und parallel der Proteingehalt in den Zelllysaten bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median der 4 unabhängigen Experimente.

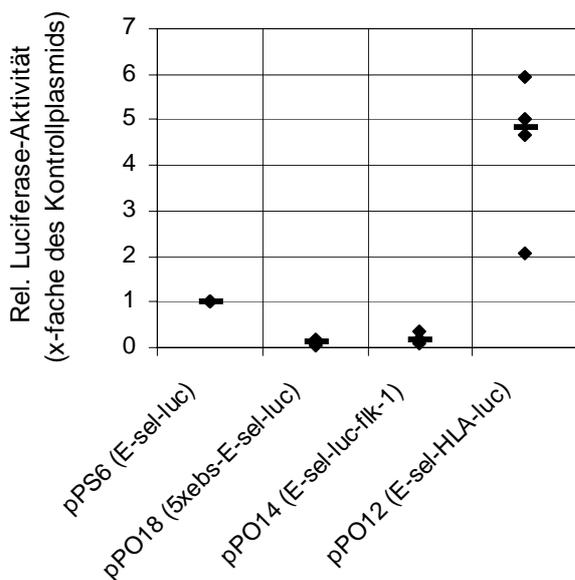
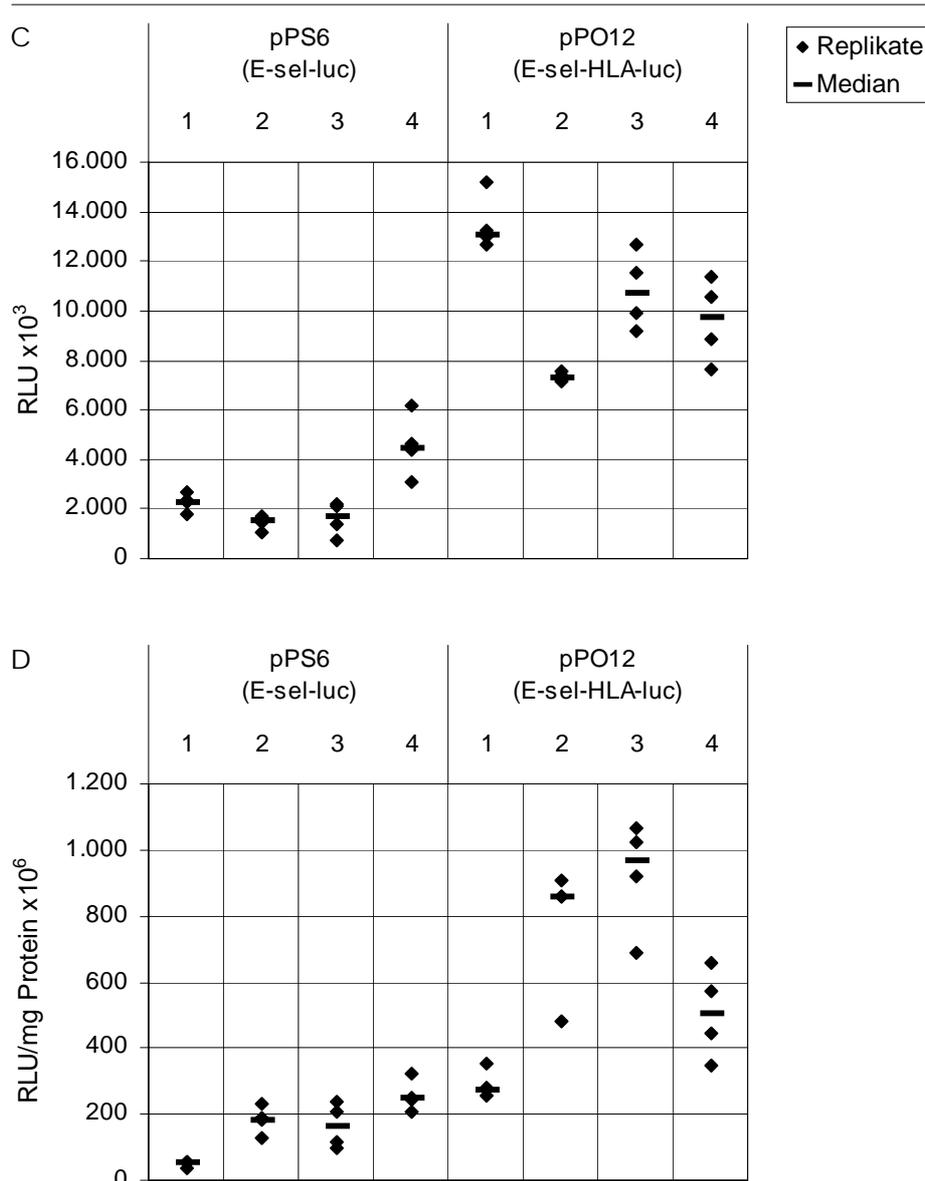


Abb. 23: Steigerung bzw. Senkung der E-sel-Promotoraktivität durch Enhancer-/Intron-Sequenzen

Die Aktivitäten des pPS6-Vektors (Kontrolle) der vier unabhängigen Experimente wurden gleich 1 und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Replikate (= Mediane der 4 unabhängigen Experimente) und der Median.

5.2.4 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung transfizierter muriner Endothelzellen

5.2.4.1 Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro* (Proliferation)

Die Endothelzellen wurden am Ende der Inkubation mit dem Transfektionskomplex sowie direkt vor der Zellyse mikroskopisch beurteilt.

Am Ende der Inkubation mit dem Transfektionskomplex waren deutlich dunkle, rundliche Vesikel zwischen den Zellen sichtbar (Abb. 24 A). Eine bevorzugte Lage der Vesikel war nicht festzustellen. Stellenweise lagen Vesikel eng an der Zellmembran der Endothelzellen (Abb. 24 D). Die Anzahl der Vesikel zwischen den Zellen erhöhte sich mit steigender Plasmid-DNA-Konzentration. Bereits 1 Stunde nach Inkubation der Zellen mit dem Transfektionskomplex konnten Vesikel im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden. Ein partielles Ablösen von Zellen wurde nur bei Einsatz von 4 µg Plasmid-DNA pro Kulturschale beobachtet.

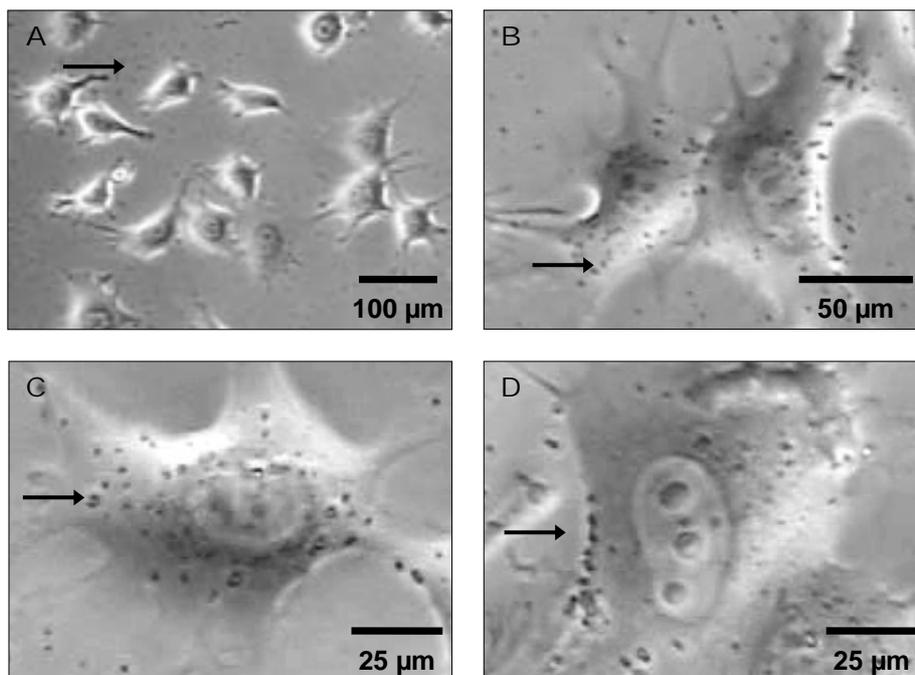


Abb. 24: Murine Endothelzellen aus dem Myokard im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro* während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex

Inter- und intrazelluläre Vesikel (Pfeile). Phasenkontrastmikroskop

Nach weiterer 24- bzw. 30-stündiger Inkubation bis zur Zellernte waren die oben beschriebenen Vesikel nicht mehr bzw. nur in Assoziation zu den Zellen extrazellulär zu sehen. Im Zytoplasma der Zellen wurden die beschriebenen Vesikel gesehen (Abb. 25). Ein partielles Ablösen von Zellen wurde nur bei längerer Inkubationsdauer (4 Stunden) mit dem Transfektionskomplex beobachtet.

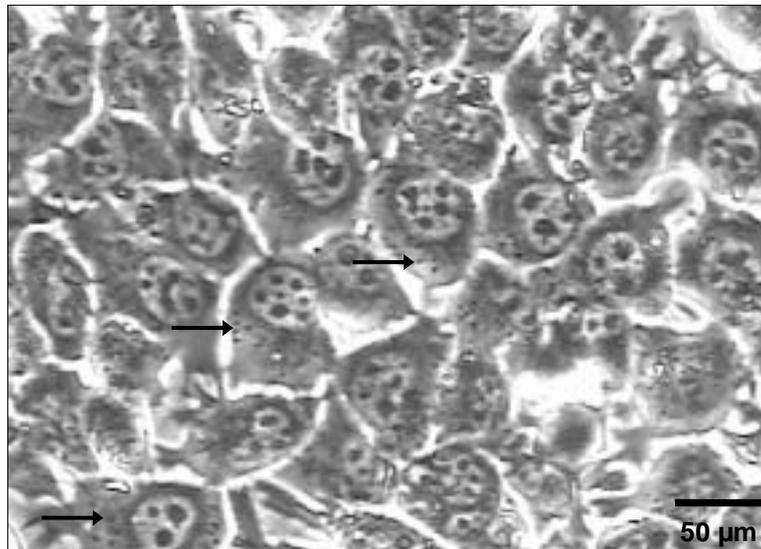


Abb. 25: Murine Endothelzellen aus dem Myokard im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro* direkt vor der Zellyse

Intrazelluläre Vesikel (Pfeile). Phasenkontrastmikroskop

5.2.4.2 Stadium 3 der angiogenen Kaskade *in vitro* (Bildung kapillarähnlicher Strukturen)

Die Endothelzellen wurden am Ende der Inkubation mit dem Transfektionskomplex sowie direkt vor der Zellyse mikroskopisch beurteilt.

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten waren vereinzelt Vesikel extrazellulär in Arealen geringerer Zelldichte sowie auch intrazellulär in einzelnen Zellen zu erkennen, die sich zwischen den kapillarähnlichen Strukturen befanden (s. Kap. 5.2.4.1). Die kapillarähnlichen Strukturen zeigten keine morphologische Veränderung.

5.2.4.3 Morphologie und Wachstum scheintransfizierter muriner Endothelzellen (Kontrollen)

Als Kontrollen wurden die Endothelzellen in nackter, nicht-komplexierter Plasmid-DNA, in dem Transfektionsreagenz bzw. nur in serumfreiem Medium inkubiert. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte am Ende der Inkubation sowie unmittelbar vor der Zellyse. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten zeigte das mikroskopische Bild weder extra- noch intrazellulär die zuvor beschriebenen Vesikel (Abb. 26 A, B).

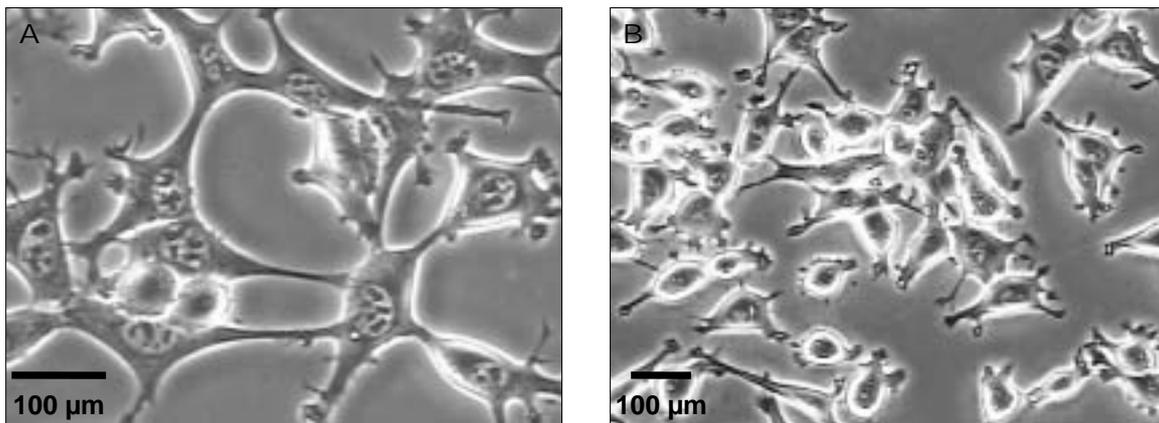


Abb. 26: Scheintransfizierte murine Endothelzellen aus dem Myokard im *Stadium 0* der angiogenen Kaskade *in vitro* (Kontrollen) während der Inkubation (A) und direkt vor der Zellyse (B)

Keine inter- bzw. intrazellulären Vesikel. Phasenkontrastmikroskop

5.2.5 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung transfizierter muriner Endothelzellen

5.2.5.1 Ultrastruktur muriner Endothelzellen während der Transfektion

Murine Endothelzellen wurden 20 Stunden vor der Transfektion mit einer Konzentration von 2×10^4 Zellen pro cm^2 auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Fixierung der Zellen für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte nach einer 2-stündigen Inkubation mit dem Transfektionskomplex.

Die Endothelzellen zeigten zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung keine morphologischen Auffälligkeiten gegenüber den scheintransfizierten Zellen (Kontrollen, s. Kap. 5.2.5.3). Die Zellmembran zeigte fingerartige Ausstülpungen (Abb. 27 A) und im Zytoplasma waren zahlreiche Mitochondrien sowie raues Endoplasmatisches Retikulum zu erkennen (Abb. 27 B).

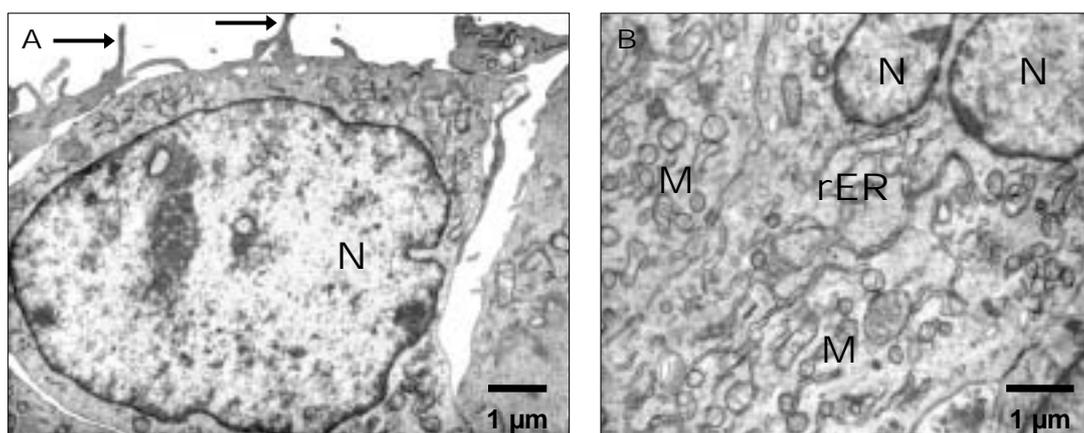


Abb. 27: Ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen aus dem Myokard während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex

(A) Fingerartige Ausstülpungen der Zellmembran (Pfeile), (B) zahlreiche Mitochondrien (M) und raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) im Zytoplasma. Nucleus (N). TEM

5.2.5.2 Ultrastruktur muriner Endothelzellen nach der Transfektion

Die murinen Endothelzellen wurden 2 Stunden mit dem Transfektionskomplex und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung.

Das transmissionselektronenmikroskopische Bild muriner Endothelzellen unterschied sich von dem während der Transfektion. Die Endothelzellen zeigten zahlreiche membranbegrenzte Vesikel (Durchmesser ca. 40-60 nm) im Zytoplasma, ohne sichtbare Assoziation zu Golgi-

Feldern (Abb. 28 A, B). Weiterhin konnten Vesikel an der Kernmembran gefunden werden, wobei sich die Kernmembran in diesem Bereich nicht deutlich abzeichnete (Abb. 28 A, C).

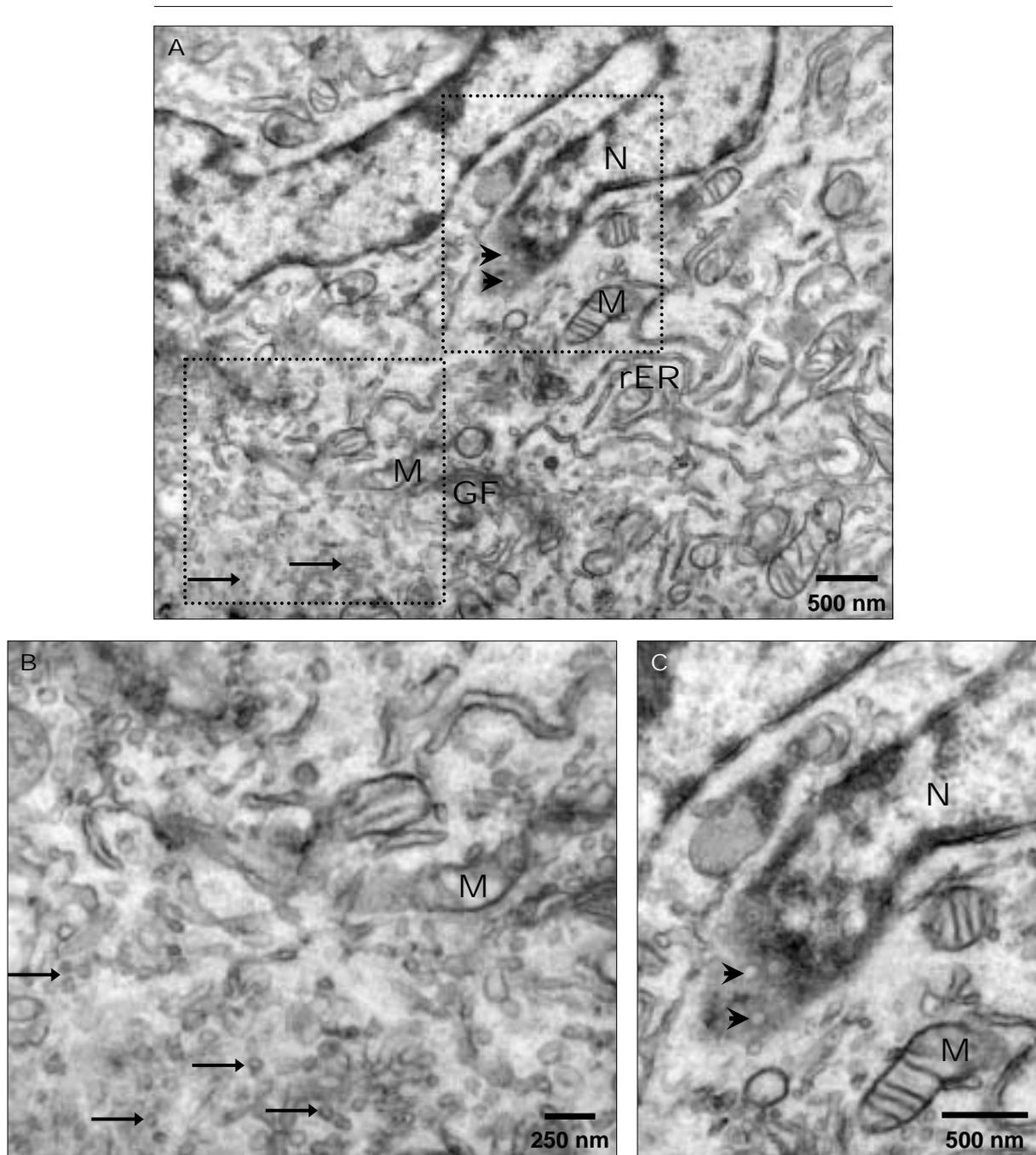


Abb. 28: Ultrastrukturelle Darstellung einer murinen Endothelzelle aus dem Myokard direkt vor der Zellyse

Vesikel (Pfeile) in großer Anzahl im Zytoplasma (A, B) ohne sichtbare Assoziation zu Golgi-Feldern (GF). Vesikel (Pfeilspitzen) an der Kernmembran (A, C). Nucleus (N), Mitochondrien (M), raues Endoplasmatisches Retikulum (rER). (B, C) Vergrößerte Ausschnitte aus (A). TEM

5.2.5.3 Ultrastruktur scheintransfizierter muriner Endothelzellen (Kontrollen)

Für die Kontrolluntersuchungen wurden auf Glasplättchen kultivierte murine Endothelzellen verwendet, die 2 Stunden mit serumfreiem Medium, also ohne Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz und weitere 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen inkubiert wurden.

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten konnten keine morphologischen Auffälligkeiten der Zellen dokumentiert werden. Im Zytoplasma zeigten sich zahlreiche Mitochondrien sowie raues Endoplasmatisches Retikulum (Abb. 29).

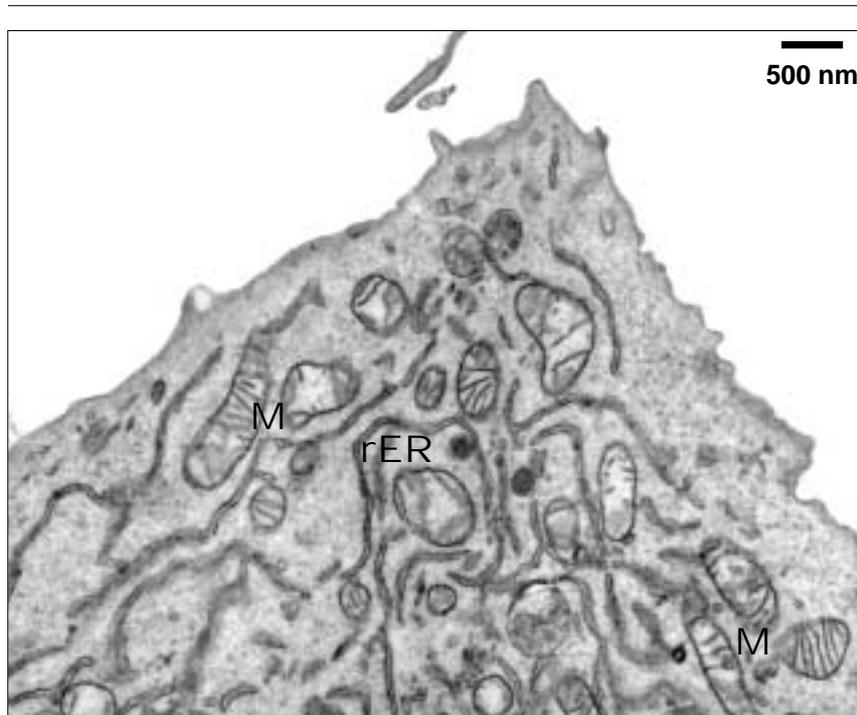


Abb. 29: Ultrastrukturelle Darstellung einer scheintransfizierten murinen Endothelzelle aus dem Myokard direkt vor der Zellyse (Kontrolle)

Keine Vesikel im Zytoplasma. Mitochondrien (M), raues Endoplasmatisches Retikulum (rER). TEM