

### 5.3 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut

#### 5.3.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung humaner Endothelzellen *in vitro*

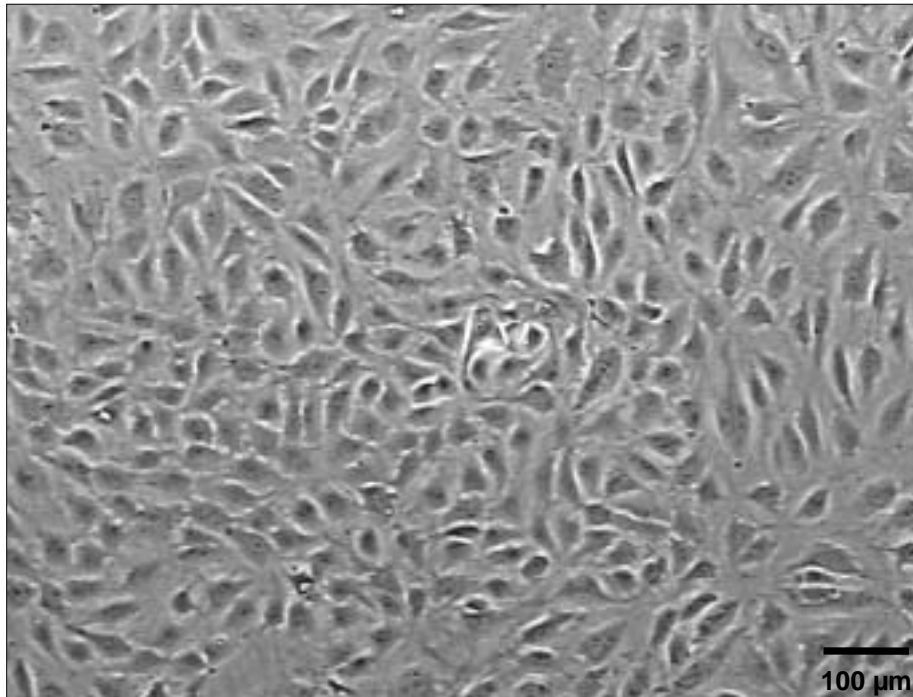
##### 5.3.1.1 Morphologie und Wachstum humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro*

Die mikrovaskulären Endothelzellen aus der Vorhaut von Neugeborenen wurden zur Beobachtung der angiogenen Kaskade in einer Konzentration von  $2-4 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 24-Loch-Platten ausgesät, die je nach Versuch mit Glasplättchen versehen wurden. Die Kultivierung der Zellen in dem pro-angiogene Faktoren enthaltenden Nährmedium EGM-2 MV (Zusammensetzung s. Kap. 3.10) führte zur Induktion der angiogenen Kaskade, wobei die humanen Endothelzellen alle in Kapitel 5.1 beschriebenen Stadien durchliefen. Am deutlichsten konnte die angiogene Kaskade in den Randbereichen der Kulturschale studiert werden.

Die Kultivierung der Endothelzellen im Erhaltungsmedium DMEM<sup>+</sup> bzw. im Basalmedium EBM-2, supplementiert mit 5% FBS, 0,1% Vitamin C und 0,1% Gentamicin/Amphotericin, führte zum Absterben der Kultur.

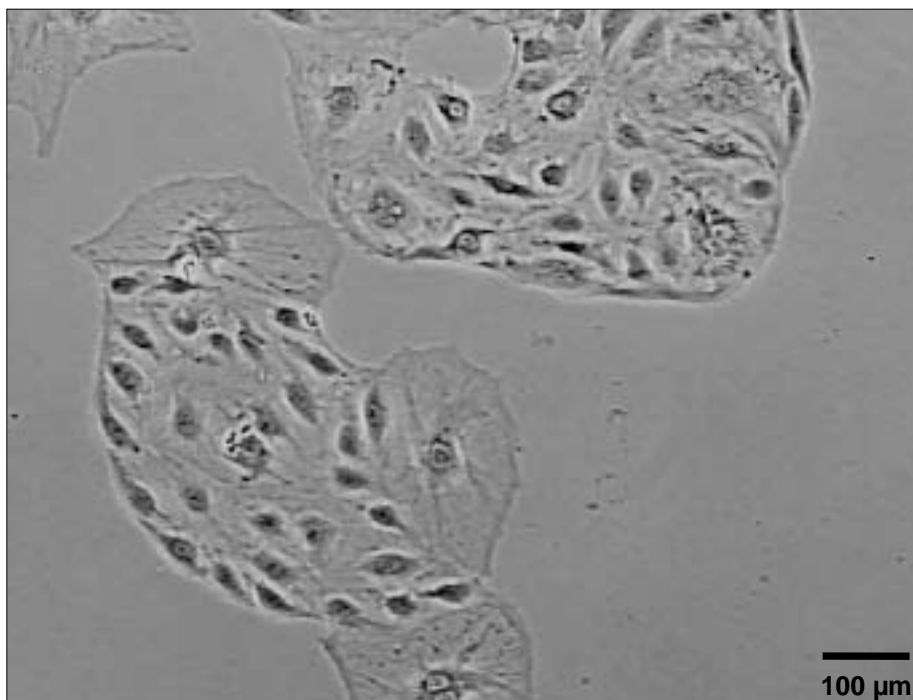
Innerhalb von zwei Tagen nach Einsaat war durch Proliferation der Endothelzellen (*Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro*) die Kulturschalenoberfläche zu 100% mit spindelförmigen bis länglichen Zellen bedeckt (*Stadium 1 der angiogenen Kaskade in vitro*, Abb. 30). Das „als typisch geltende“ Kopfsteinpflastermuster aus polygonalen Zellen konnte nur stellenweise beobachtet werden.

Wurden die Zellen in einer geringeren Konzentration ausgesät (weniger als  $2 \times 10^2$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ), so dass nur vereinzelt Zellen auf der Kulturschale zu sehen waren, zeigten die adherenten Zellen zum Teil sehr breite Zytoplasmasäume (Abb. 31), zum Teil spindelförmige bis längliche Zellformen mit langen Zellausläufern. Nach einigen Tagen hatten sich kleinere Inseln von spindelförmigen bis länglichen Endothelzellen gebildet, deren Ränder scharf abgegrenzt waren (Abb. 31). Diese Inseln vergrößerten sich und konfluieren teilweise. Nach ein bis zwei Wochen konnte die Bildung eines subkonfluenten Monolayers beobachtet werden. Diese Endothelzellen wurden nicht für weitere Untersuchungen verwendet.



**Abb. 30: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 1 der angiogenen Kaskade *in vitro*, 2 Tage in Kultur**

Konfluenten Monolayer aus spindelförmigen bis länglichen Zellen. Phasenkontrastmikroskop

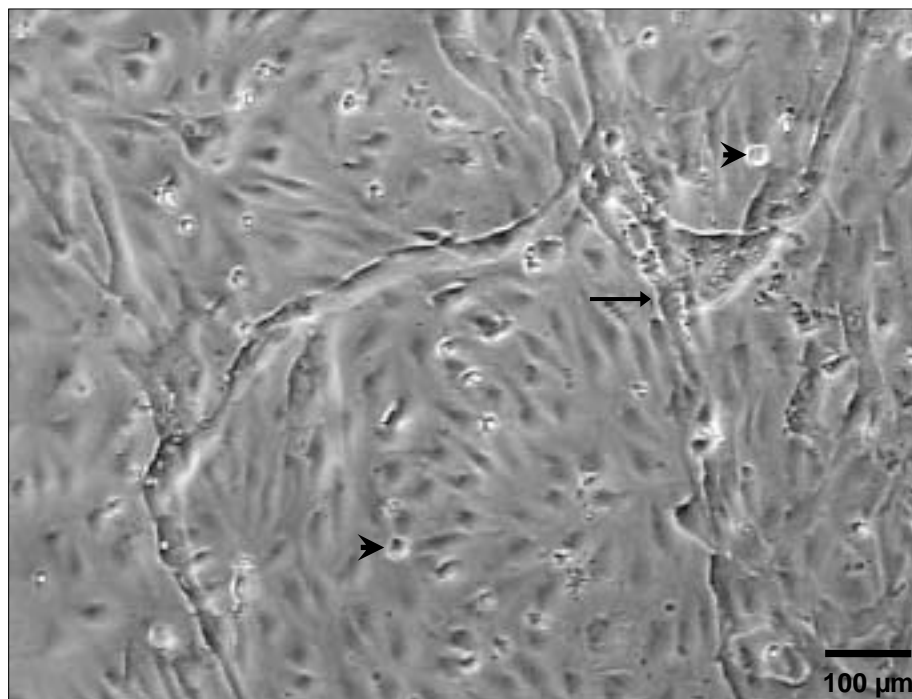


**Abb. 31: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, 6 Tage nach Aussaat in geringer Dichte**

Inseln von spindelförmigen Endothelzellen mit scharf abgegrenzten Rändern, an die sich Zellen mit breiten Zytoplasmasäumen anlagern. Phasenkontrastmikroskop

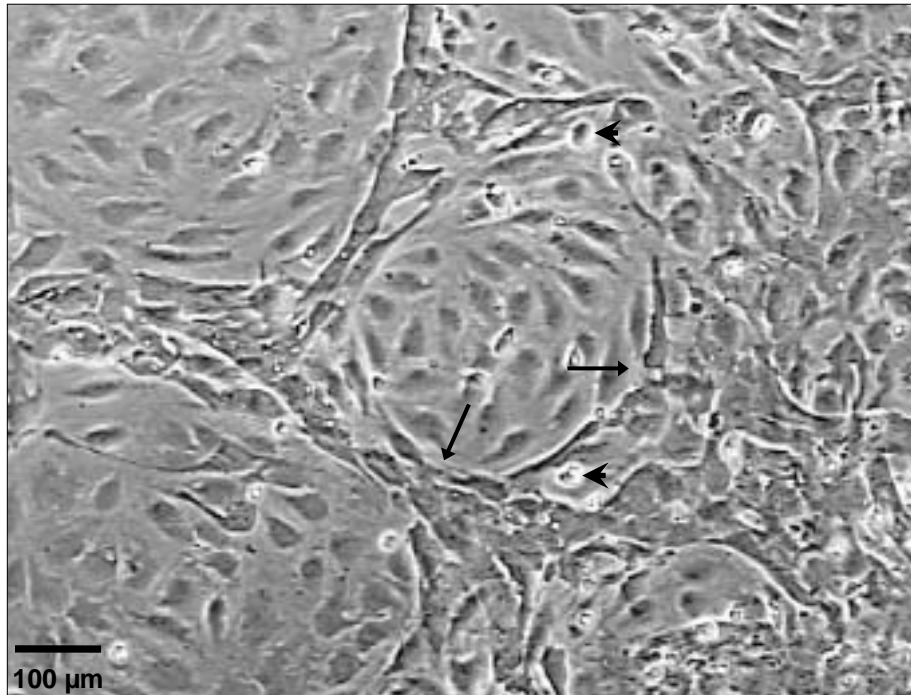
Nach Erreichen der Konfluenz kam es innerhalb eines Tages stellenweise zur linearen Aneinanderreihung von länglichen Zellen, wobei sich innerhalb weniger Tage ringförmige Zellstrukturen ausbildeten (*Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro*, Abb. 32 und 33). Am fünften Tag nach der Einsaat waren die länglichen aneinander gereihten Zellen bereits in deutlichen Ringen formiert, wobei der konfluente Monolayer aus spindelförmigen bis länglichen Zellen erhalten blieb. Auch in durch geringere Aussaatdichte (weniger als  $2 \times 10^2$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ) nur partiell konfluenten Zellkulturen konnte eine lineare Aneinanderreihung und Ringbildung beobachtet werden und zwar in solchen Arealen der Kulturschale, in denen die Zellen bereits in größeren Inseln formiert vorlagen.

Im *Stadium 2 der angiogenen Kaskade* war ein Abrunden einzelner Zellen zu beobachten (Abb. 32).



**Abb. 32: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro*, 4 Tage in Kultur**

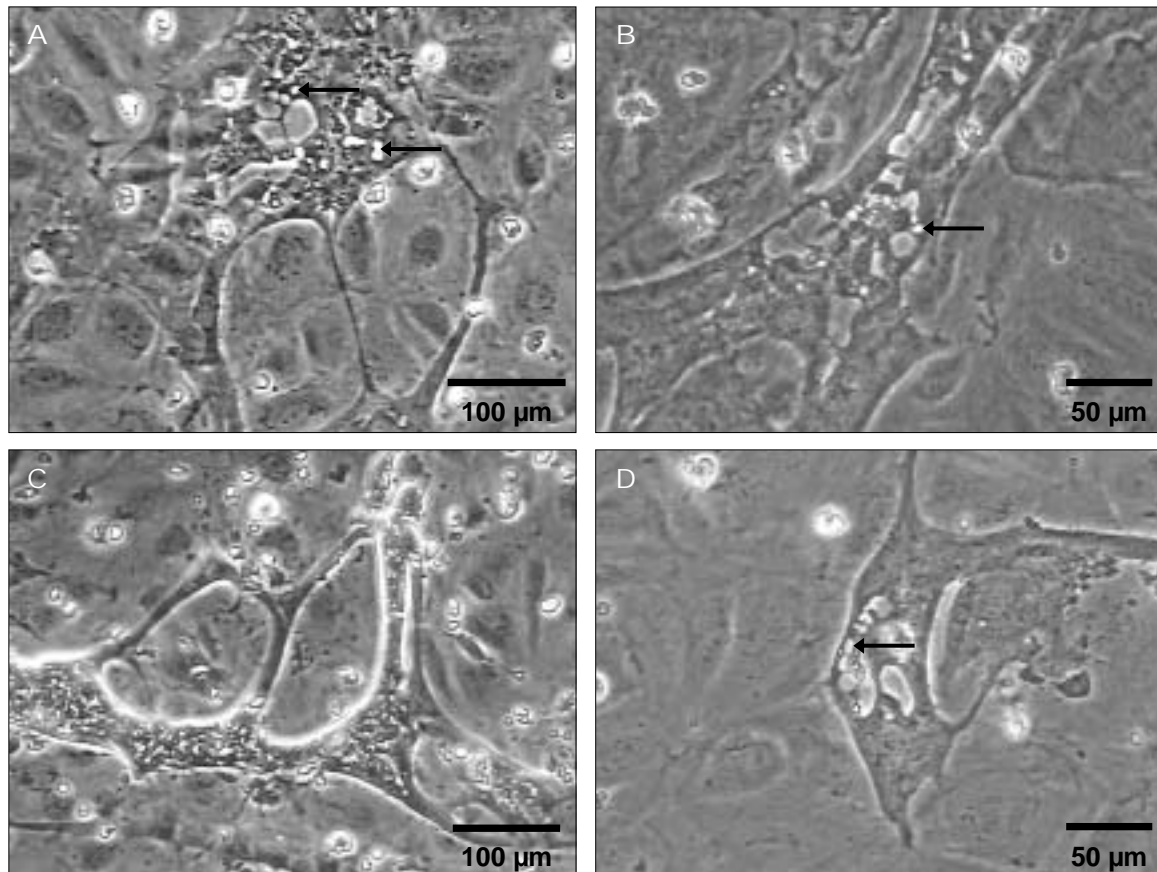
Lineare Aneinanderreihung von länglichen Zellen (Pfeil), abgerundete Zellen (Pfeilspitzen). Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung)



**Abb. 33: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro*, 5 Tage in Kultur**

Ringbildung durch lineare Aneinanderreihung von Endothelzellen (Pfeile), abgerundete Zellen (Pfeilspitzen). Phasenkontrastmikroskop

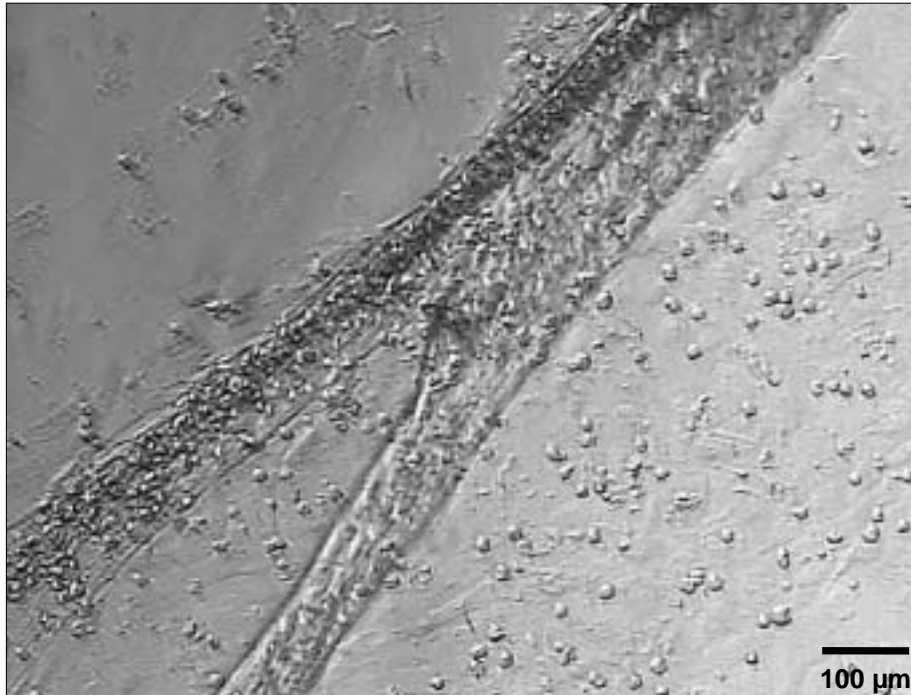
Im weiteren Verlauf der Kultivierung veränderte sich das mikroskopische Bild insoweit, als dass planare, zum Teil ringförmige Zellstrukturen ohne mikroskopisch deutlich erkennbare Zellgrenzen auf der unteren Zellschicht im Zentrum der Kulturschale zu erkennen waren. In diesen planaren Zellstrukturen waren Vakuolen zu sehen (Abb. 34). Es war weiterhin ein Ab-runden einzelner Zellen zu beobachten.



**Abb. 34: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, (A, B, C) 9 Tage in Kultur, (D) 7 Tage in Kultur**

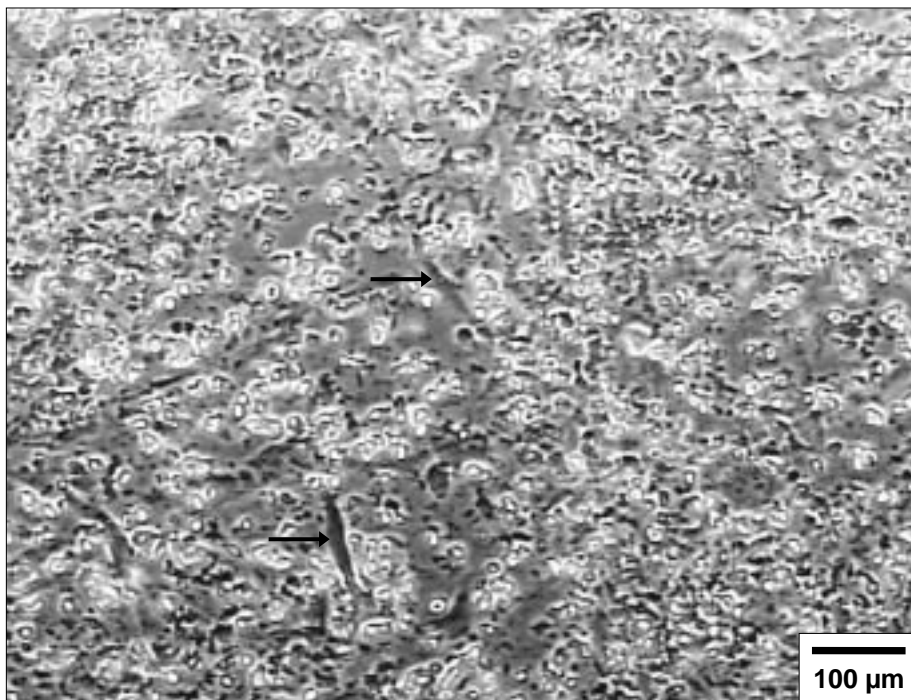
Planare Zellstrukturen mit Vakuolen (Pfeile) auf konfluentem Layer. Phasenkontrastmikroskop

10-15 Tage nach Einsaat konnten in einigen Kulturen in den Randbereichen der Kulturschale erste längliche kapillarähnliche Strukturen beobachtet werden (*Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro*, Abb. 35). Das Auftreten dieser Zellstrukturen ging zeitlich konform mit einem stellenweisen Ablösen des Zellteppichs vom Rand der Kulturschale. Die Zellen im Zentrum der Kulturschale waren zu diesem Zeitpunkt phasenkontrastmikroskopisch nicht mehr zu beurteilen, das mikroskopische Bild zeigte lediglich einen verschwommenen konfluenten Layer von Zellen, überlagert von rundlichen, adhärenen Strukturen, die auch nach einem Mediumwechsel erhalten blieben. Nur vereinzelt konnten längliche Zellen erkannt werden (Abb. 36).



**Abb. 35: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 3 der angiogenen Kaskade *in vitro*, 15 Tage in Kultur (Bild aus dem Randbereich der Kulturschale)**

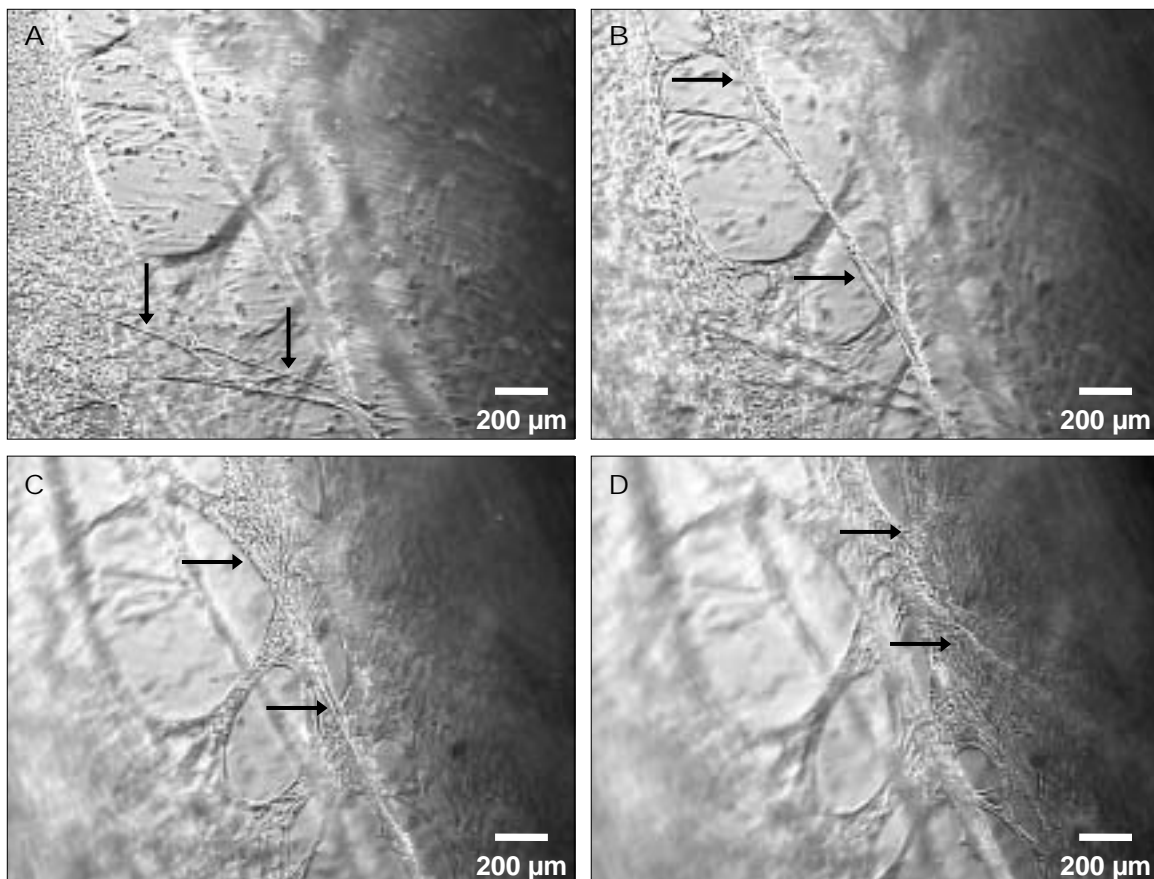
Adhärente kapillarähnliche Strukturen. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung)



**Abb. 36: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, 15 Tage in Kultur (Bild aus dem Zentrum der Kulturschale)**

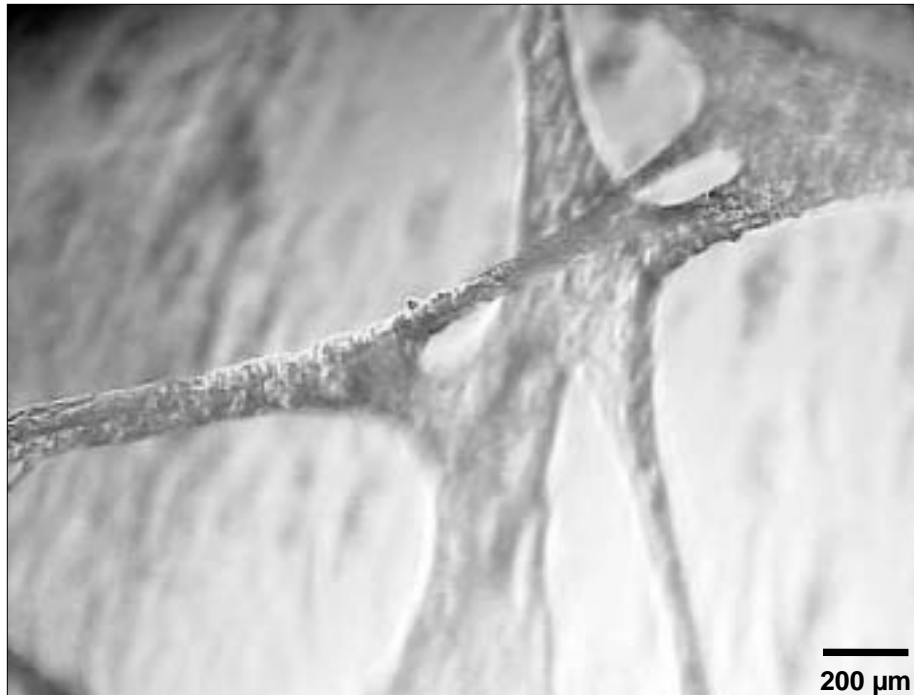
Layer ohne deutlich erkennbare zelluläre Grenzen, überlagert von rundlichen Strukturen, nur vereinzelt längliche Zellen zu erkennen (Pfeile). Phasenkontrastmikroskop

Im weiteren Verlauf der Kultivierung kam es schließlich zur fortschreitenden dreidimensionalen Organisation kapillarähnlicher Strukturen auf der unteren Zellschicht (*Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro*). Zum Teil waren Netzwerke von Zellsträngen zu beobachten (Abb. 37 und 38), auch zogen unterschiedlich breite Zellstränge weitestgehend frei beweglich über die Kulturschale und schienen nur durch vereinzelt abgehende Zellreihen in Richtung Kulturschalenboden bzw. Kulturschalenwand Befestigung zu finden (Abb. 39). Die kapillarähnlichen Strukturen erreichten dabei eine Länge von ca. 8,22 mm. Der Durchmesser variierte von 30  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$ . Stellenweise waren die kapillarähnlichen Strukturen bereits makroskopisch auf der Kulturschale zu erkennen. Im Randbereich der Kulturschale konnte ein vertikales Wachstum der Endothelzellen entlang der Kulturschalenwand beobachtet werden. So entstanden auch vertikale Zellschichten. Durch kontinuierliche mikroskopische Kontrolle der kapillarähnlichen Strukturen wurde deutlich, dass ein intensiver Auf-, Ab- und Umbau der kapillarähnlichen Strukturen erfolgte (Remodeling). Aufgrund der unterschiedlichen Zellebenen auf der Kulturschale, die bei der Photodokumentation nicht mehr gleichzeitig scharf erfassbar waren, waren oftmals mehrere Aufnahmen nötig (Abb. 37 A-D).



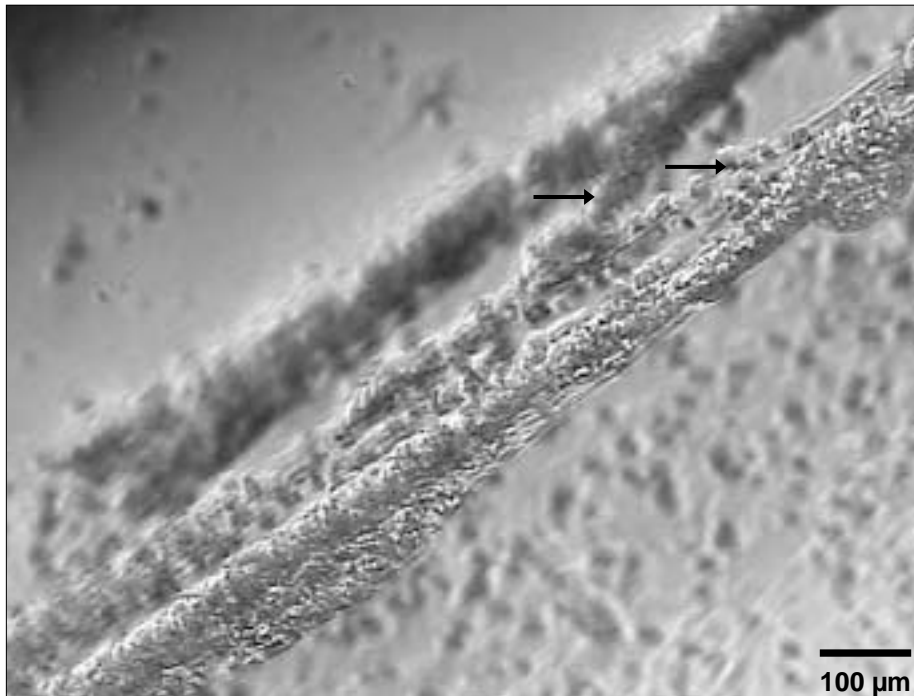
**Abb. 37: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro, 50 Tage in Kultur**

Dreidimensionales Netzwerk kapillarähnlicher Strukturen (A-D) in verschiedenen Ebenen fotografiert (Pfeile). Phasenkontrastmikroskop



**Abb. 38: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro*, 38 Tage in Kultur**

Dreidimensionales Netzwerk kapillarähnlicher Strukturen über der unteren Zelllage, die nur unscharf abgebildet ist. Phasenkontrastmikroskop (schiefe Beleuchtung)



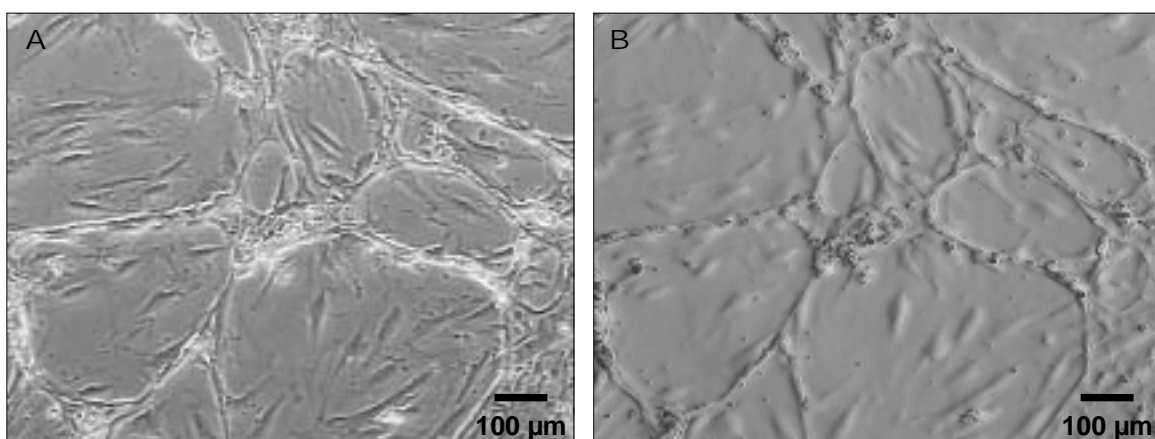
**Abb. 39: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro*, 42 Tage in Kultur**

Parallel verlaufende kapillarähnliche Strukturen in verschiedenen Ebenen, die untereinander durch abgehende Zellstränge (Pfeile) verbunden sind. Phasenkontrastmikroskop



Das fortwährende Bestehen dieser dreidimensionalen kapillarähnlichen Strukturen *in vitro* war von verschiedenen Faktoren abhängig. Prinzipiell zeigten die Zellen auf gelatinierten Glasplättchen ein stabileres Wachstum. Ein Aufrollen des Zellteppichs, wie es nach ca. 3-4 Monaten bei Kulturen beobachtet werden konnte, die in gelatinisierte Vertiefungen ohne Glasplättchen eingesät wurden, erfolgte in Kulturschalen mit Glasplättchen lediglich in den Randbereichen außerhalb des Glasplättchens. Durch den äußeren Rand des Glasplättchens schien der Zelllayer nach initialem Aufrollen erneut Halt zu finden. Zudem war ein rein mechanisches Ablösen der kapillarähnlichen Strukturen durch Manipulationen (z.B. beim Wechsel des Kulturmediums) aufgrund des dreidimensionalen Wachstums der Endothelzellen in mehreren Ebenen oft nicht zu vermeiden. Im Wesentlichen aber kam es nach 3-4 Monaten Kultivierung der Endothelzellen zu einem Verlust der Adhärenz des Zellteppichs auf einer Seite der Kulturschale und anschließendem Umschlagen zur anderen Seite. Die vollständige Ablösung dieses Zellteppichs erfolgte in der Regel erst nach weiteren 1-2 Wochen. Durch Migration und Proliferation der Endothelzellen wurden die nun zellfrei gewordenen Areale der Kulturschale innerhalb von 7 Tagen neu mit Zellen besiedelt, wobei eine Konfluenz nicht erreicht wurde. Innerhalb der nächsten zwei Wochen kam es zur linearen Aneinanderreihung länglicher Zellen mit Ausbildung von Netzwerken aus dünnen Zellsträngen (Abb. 40) auf einem subkonfluenten Zelllayer. Das Auftreten kapillarähnlicher Strukturen konnte im weiteren Verlauf nicht mehr beobachtet werden. Auch Endothelzellen, die im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro* gesplittet wurden, zeigten anschließend lediglich die Ausbildung eines Netzwerkes aus dünnen endothelialen Zellsträngen.

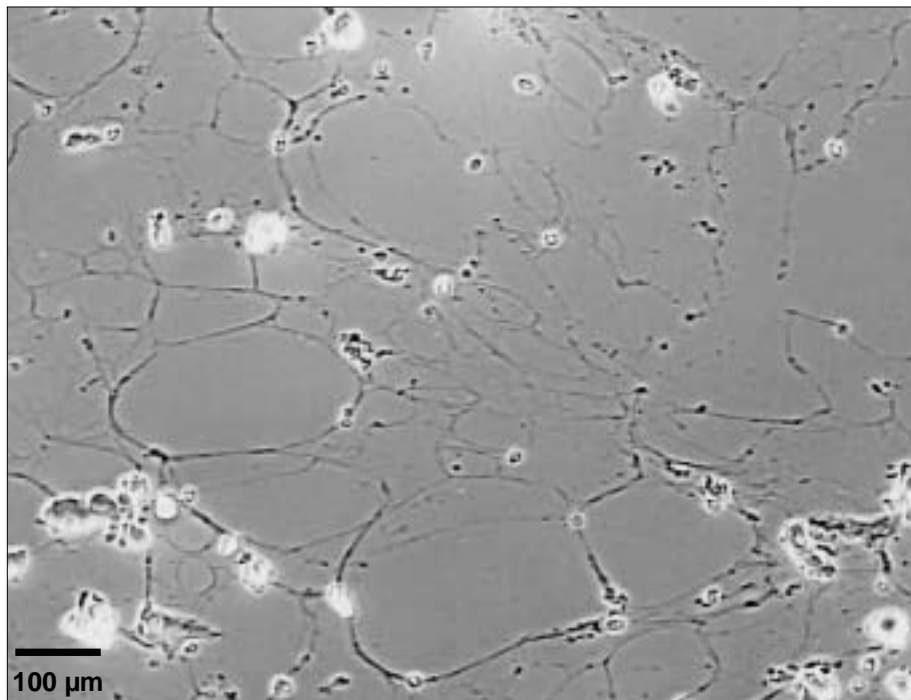
Die humanen Endothelzellen wurden in den Passagen 4-10 untersucht. Der charakteristische Ablauf der angiogenen Kaskade konnte nur in den Passagen 4-9 beobachtet werden. Humane Endothelzellen in der Passage 10 zeigten keine einheitliche Morphologie. Das mikroskopische Bild glich dem zuvor beschriebenen nach dem Ablösen der kapillarähnlichen Strukturen von der Kulturschale.



**Abb. 40: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut, 14 Wochen in Kultur**  
Lineare Aneinanderreihung länglicher Zellen mit Ausbildung netzartiger Strukturen. Phasenkontrastmikroskop, (B) identischer Bildausschnitt, schiefe Beleuchtung

### 5.3.1.2 Mikroskopisches Bild nach dem enzymatischen Ablösen humaner Endothelzellen von der Kulturschale

Im Rahmen der Subkultivierung bzw. der Kryokonservierung humaner Endothelzellen wurden diese mittels Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Eine anschließende mikroskopische Kontrolle zeigte auf der Kulturschale zurückbleibende dünne, faserartige, netzartig angeordnete Strukturen mit einzelnen anhaftenden, abgerundeten Zellen (Abb. 41).



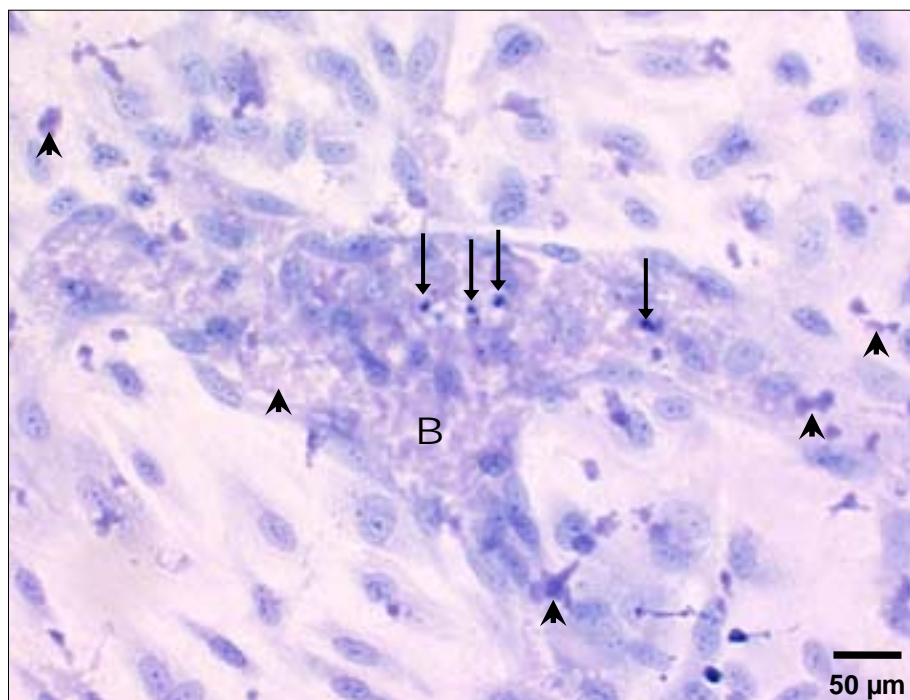
**Abb. 41: Mikroskopisches Bild nach dem enzymatischen Ablösen humaner Endothelzellen von der Kulturschale**

Dünne, faserartige, netzartig angeordnete Strukturen mit einzelnen noch anhaftenden, abgerundeten Endothelzellen. Phasenkontrastmikroskop

### 5.3.2 Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro*

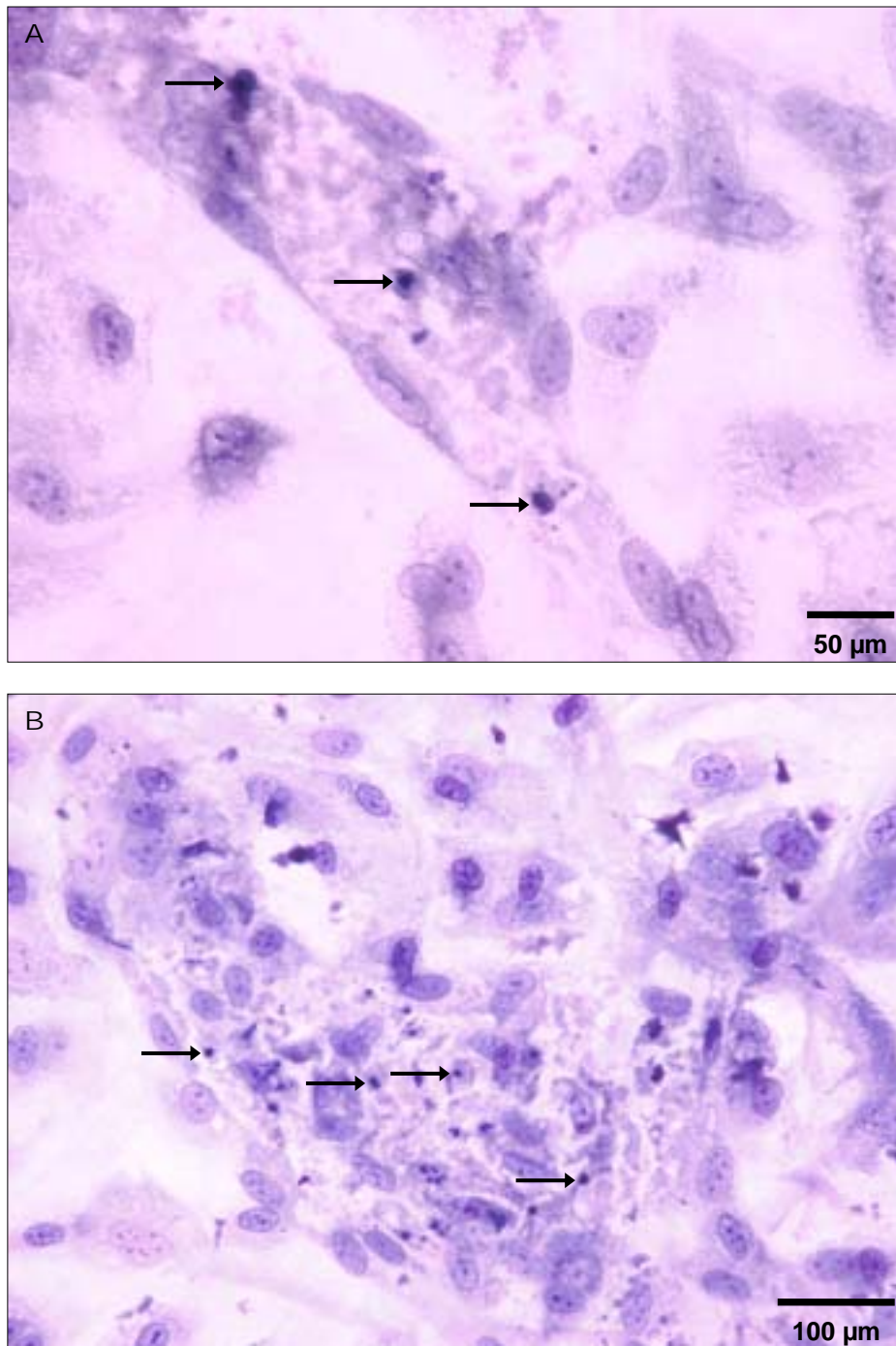
#### 5.3.2.1 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die Färbung nach May-Grünwald-Giemsa ermöglichte eine effizientere lichtmikroskopische Untersuchung der Endothelzellen im Zentrum der Kulturschale ab dem *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro* im Vergleich zur phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung. Dabei wurden planare, ovale bis längliche, aus linear aneinander gereihten Endothelzellen bestehende Strukturen beobachtet, die zentral einen Bereich umschlossen, der mit fibrillärem Material angefüllt war und einzelne morphologisch auffällige Zellen aufwies (Abb. 42, 43 und 44). Kennzeichen dieser Zellen waren Zellschrumpfung sowie intensiv gefärbte, pyknotische Kerne, die zum Teil fragmentiert waren (Abb. 44). Der subkonfluente bis konfluente Layer bestand aus länglichen Zellen, die ein schaumiges Zytoplasma sowie oftmals zwei Kerne aufwiesen. Intrazellulär sowie auch extrazellulär war dichtes fibrilläres Material zu erkennen, welches sich durch seine intensive Färbung deutlich darstellte (Abb. 42 und 44). Zum Teil schien es, als würde die Zelle gerade dieses fibrilläre Material ausschleusen (Abb. 44).



**Abb. 42: Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro* (Bild aus dem Zentrum der Kulturschale)**

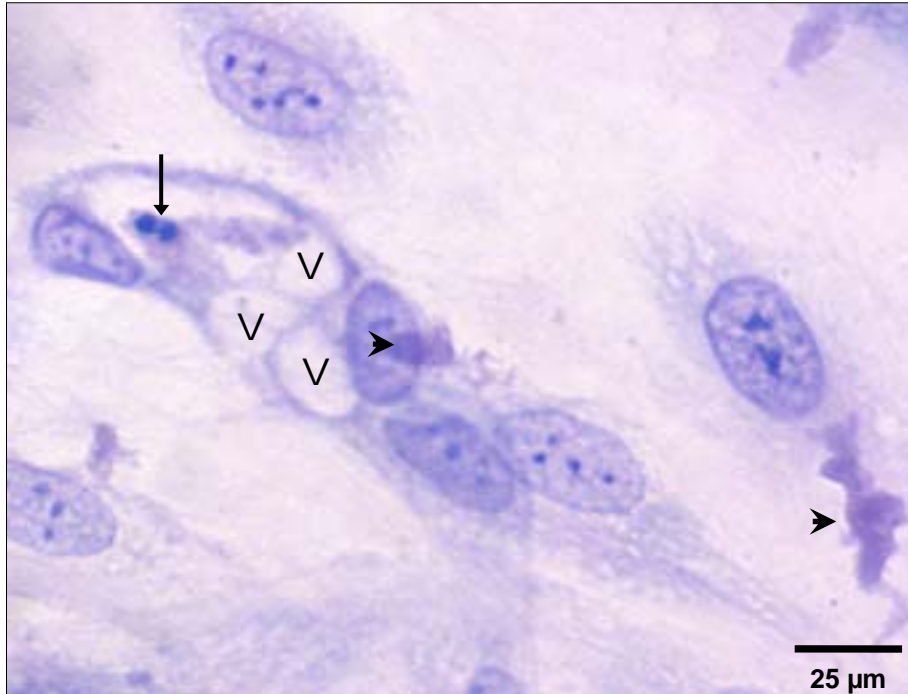
Linear aneinander gereichte Endothelzellen umschließen zentral einen mit fibrillärem Material angefüllten Bereich (B). Zellen mit intensiv gefärbten, pyknotischen Kernen (Pfeile), fibrilläres Material (Pfeilspitzen). May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Lichtmikroskop



**Abb. 43: Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 3 der angiogenen Kaskade *in vitro* (Bilder aus dem Zentrum der Kulturschale)**

Zahlreiche Zellen mit intensiv gefärbten, pyknotischen Kernen (Pfeile) im Zentrum planarer Strukturen aus linear aneinander gereihten Endothelzellen. May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Lichtmikroskop

Weiterhin auffällig waren große intrazelluläre Vakuolen. Abb. 44 zeigt Endothelzellen mit großen intrazellulären Vakuolen, wobei die Zellgrenzen der einzelnen Zellen nicht eindeutig zu definieren sind.



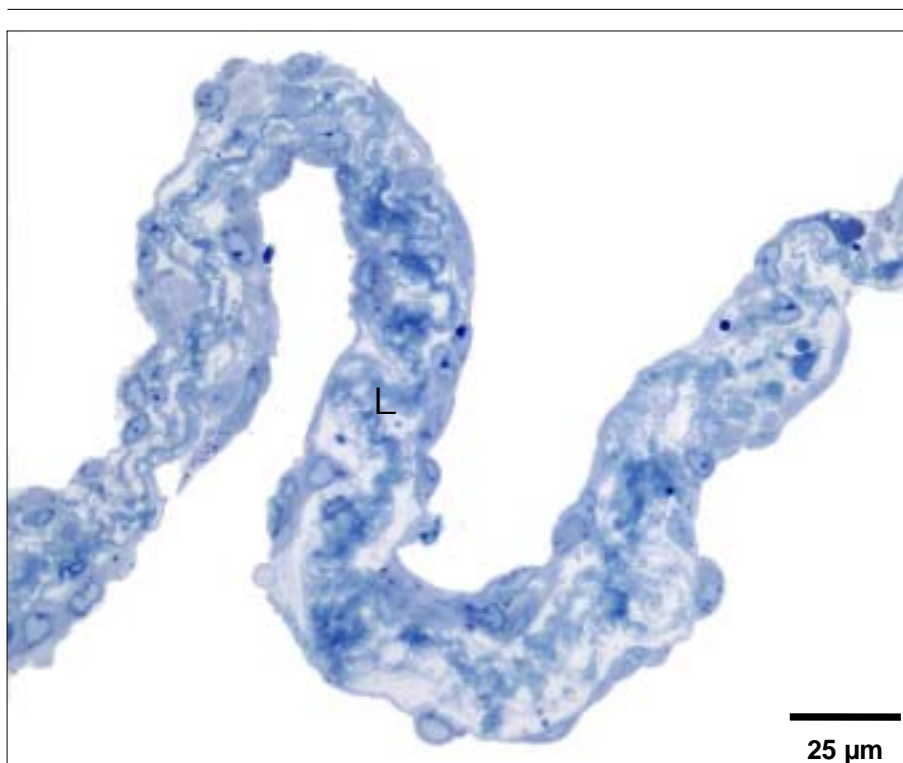
**Abb. 44: Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro* (Bild aus dem Zentrum der Kulturschale)**

Endothelzellen mit schaumigem Zytoplasma und großen, intrazellulären Vakuolen (V). Zelle mit pyknotischem, fragmentiertem Kern (Pfeil), fibrilläres Material (Pfeilspitzen). May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Lichtmikroskop

Die histologische Untersuchung der Endothelzellen im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade* war aufgrund der hohen Zelldichte und des dreidimensionalen Wachstums der Zellen nicht möglich.

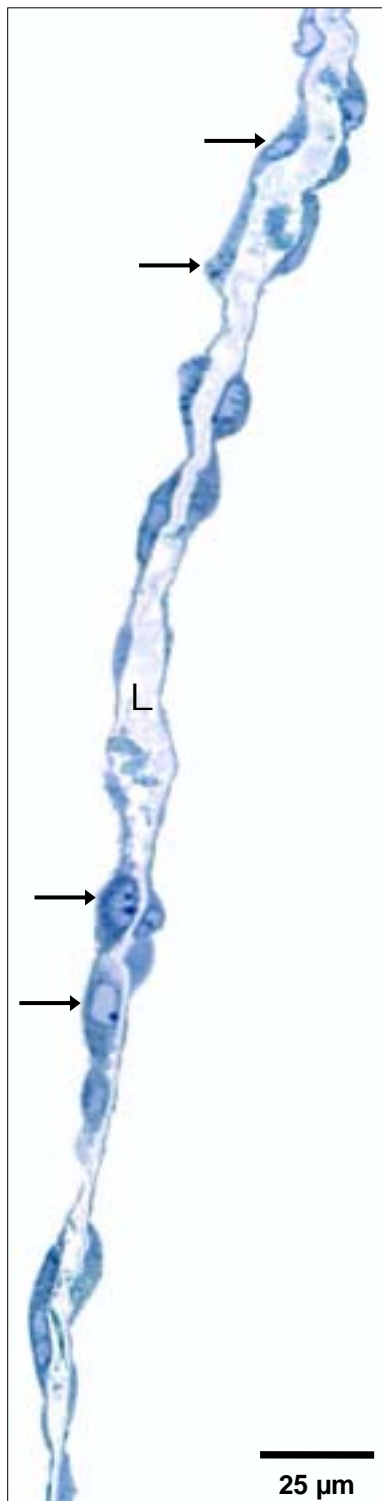
### 5.3.2.2 Färbung nach Richardson

Die lichtmikroskopische Untersuchung von histologisch gefärbten Semidünnschnitten (Färbung nach Richardson) zeigte im Zentrum der kapillarähnlichen Strukturen ein Lumen. Dabei wurden sowohl Unterschiede im Durchmesser der Lumina als auch unterschiedliche Mengen an fibrillärem Material in den Lumina festgestellt. Auf den Abb. 45 und 46 sind linear aneinander gereihte Endothelzellen auf zwei sich gegenüber liegenden Seiten dargestellt, die zentral ein Lumen umschließen. Das in Abb. 45 dargestellte Lumen hat im Vergleich zur Abb. 46 einen größeren Durchmesser und ist fast vollständig gefüllt mit fibrillärem Material sowie Zelldetritus. Im Lumen aus Abb. 46 ist fibrilläres Material in geringerer Quantität vorzufinden. Die das Lumen auskleidenden Endothelzellen wölbten sich in der Mehrzahl vom Lumen weg, nur vereinzelt konnte ein Hineinwölben der Endothelzellen ins Lumen beobachtet werden (Abb. 46).



**Abb. 45: Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro***

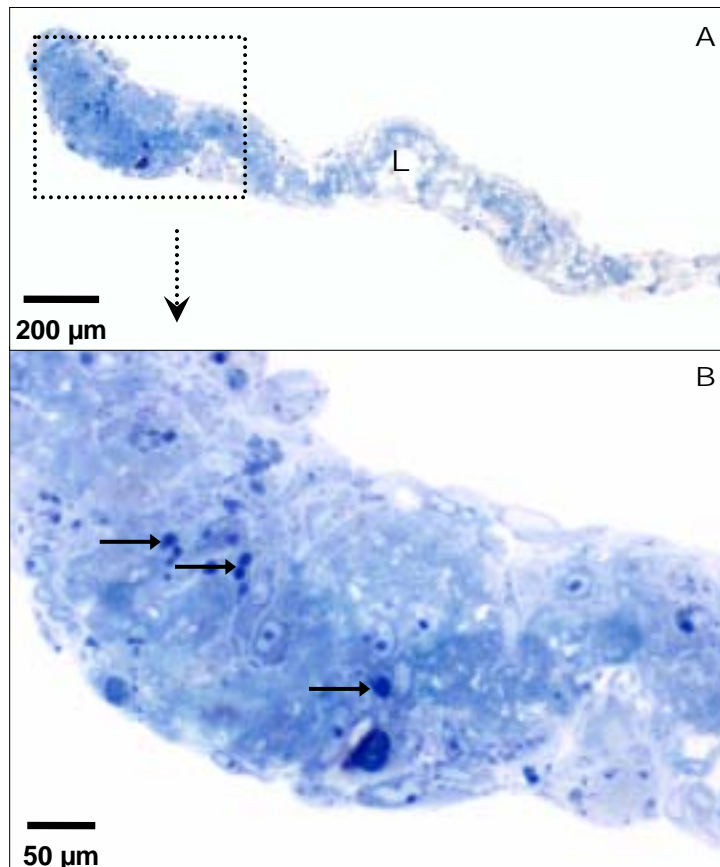
Linear aneinander gereihte Endothelzellen umschließen zentral ein Lumen (L), fast vollständig angefüllt mit fibrillärem Material und Zelldetritus. Semidünnschnitt längs durch eine kapillarähnliche Struktur, gefärbt nach Richardson. Lichtmikroskop



**Abb. 46: Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 4 der angiogenen Kaskade *in vitro***

Linear aneinander gereihete Endothelzellen umschließen zentral ein Lumen (L), angefüllt mit fibrillärem Material. Einzelne Endothelzellen wölben sich ins Lumen vor (Pfeile). Semidünnschnitt längs durch eine kapillarähnliche Struktur, gefärbt nach Richardson. Lichtmikroskop

Des Weiteren waren auch in den Lumina kapillarähnlicher Strukturen die im Kapitel 5.3.2.1 beschriebenen morphologisch veränderten Zellen mit intensiv gefärbten, pyknotischen Kernen zu beobachten.

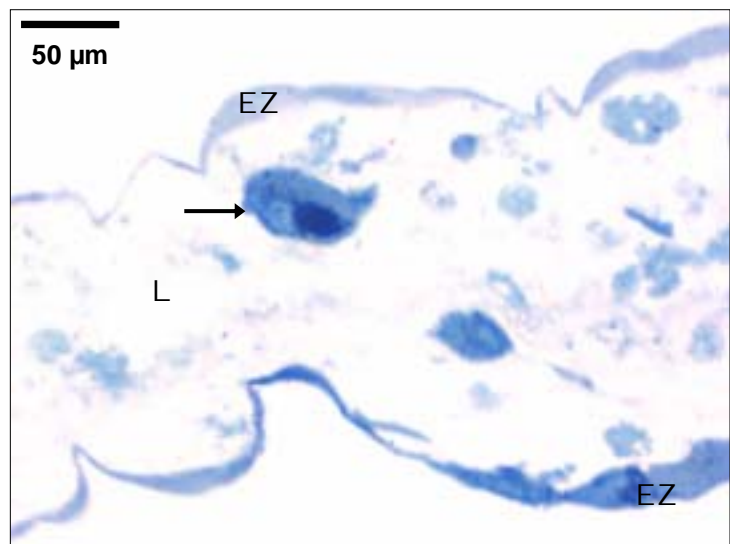


**Abb. 47: Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro**

Zellen mit intensiv gefärbten, pyknotischen Kernen (Pfeile) im Lumen (L) einer kapillarähnlichen Struktur. (B) Vergrößerter Ausschnitt aus (A). Semidünnschnitt längs durch eine kapillarähnliche Struktur, gefärbt nach Richardson. Lichtmikroskop

**Abb. 48: Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro**

Zelle mit intensiv gefärbtem Kern (Pfeil) im Lumen (L) einer kapillarähnlichen Struktur. Endothelzellen (EZ). Semidünnschnitt längs durch eine kapillarähnliche Struktur, gefärbt nach Richardson. Lichtmikroskop



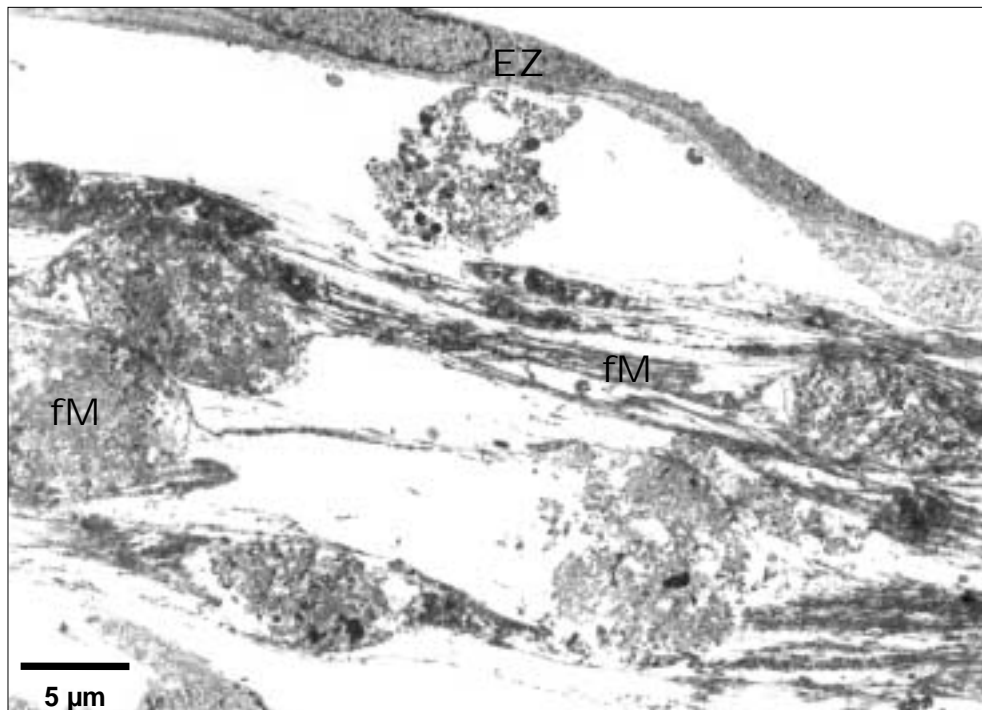


### 5.3.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro*

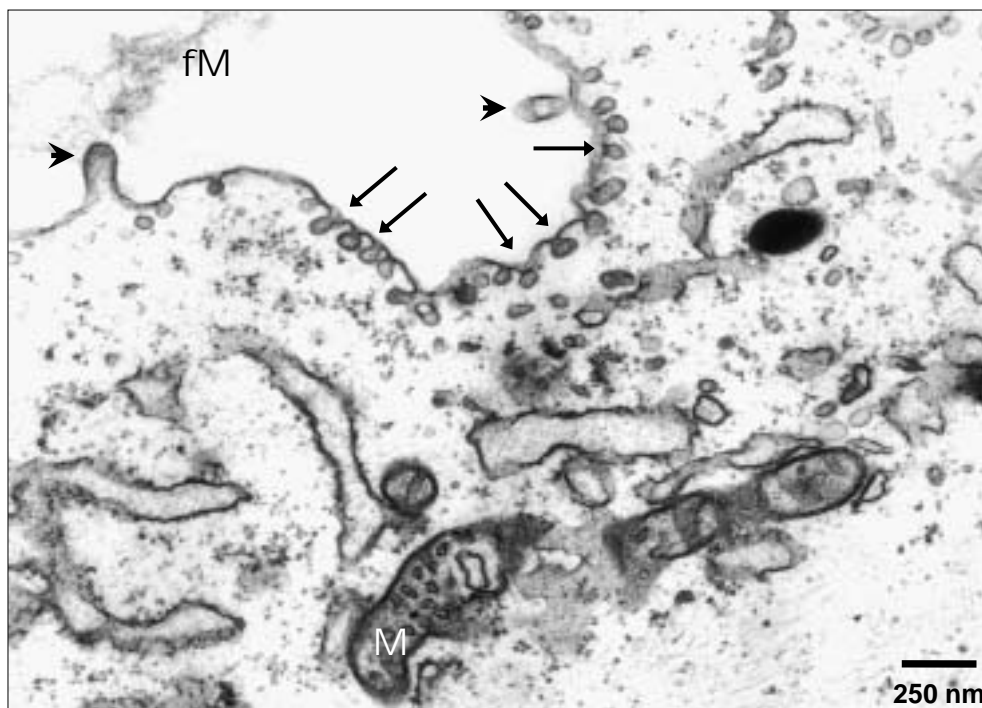
Die humanen Endothelzellen wurden bis zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten kultiviert und zum Nachweis eines zentralen Lumens innerhalb der kapillarähnlichen Strukturen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht.

Die ovalen bis lang gestreckten Endothelzellen waren überwiegend in Reihen linear angeordnet. Die länglichen Zellen wiesen in der Regel an mindestens einem Zellpol einen sehr langen, dünnen Zellausläufer auf. Zwischen den Zellen befand sich in großen Mengen fibrilläres Material, immer auf mindestens einer Seite von einer länglichen Zellen bzw. einem langen, dünnen Zellausläufer begrenzt (Abb. 49). Das fibrilläre Material wies eine unterschiedliche Strukturierung auf. Zum Teil waren längs gerichtete Fasern in paralleler Anordnung zu den Zellen bzw. Zellausläufern zu erkennen, zum Teil erschien das fibrilläre Material globulär (Abb. 49).

An der Zellmembran der Endothelzellen konnten stellenweise Ausstülpungen sowie vermehrt kleine, bläschenförmige Invaginationen mit einem Durchmesser von 50-100 nm beobachtet werden (Abb. 50 und 51) und zwar auf der dem Lumen zugewandten Seite. Die ovalen bis länglichen Kerne waren euchromatisch und teilweise deutlich gelappt. Die doppelte Kernmembran war in unregelmäßigen Abständen durch Kernporen unterbrochen (Abb. 51). Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis betrug 1:1 bis 1:3.

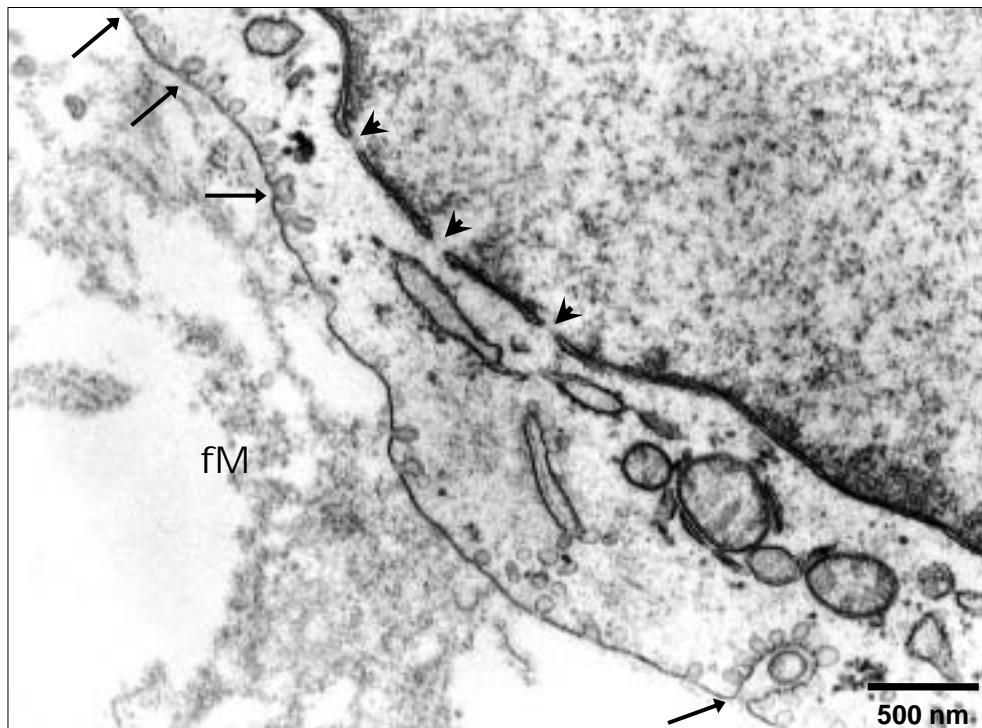


**Abb. 49: Ultrastrukturelle Darstellung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 4 Wochen in Kultur**  
Fibrilläres Material (fM), begrenzt von einer Endothelzelle (EZ). TEM



**Abb. 50: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 16 Wochen in Kultur**

Bläschenförmige Invaginationen (Pfeile) sowie Ausstülpungen (Pfeilspitzen) an der Zellmembran. Fibrilläres Material (fM) extrazellulär, Mitochondrium (M). TEM

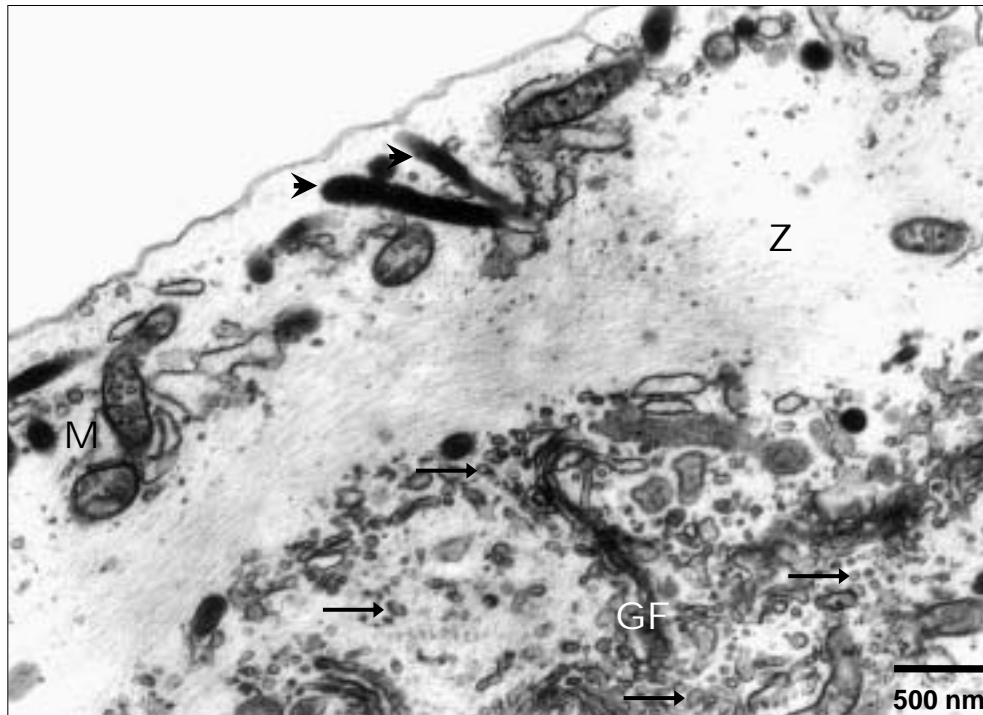


**Abb. 51: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 5 Wochen in Kultur**

Bläschenförmige Invaginationen (Pfeile) an der Zellmembran. Kernporen (Pfeilspitzen) in der Kernmembran. Fibrilläres Material (fM) extrazellulär. TEM

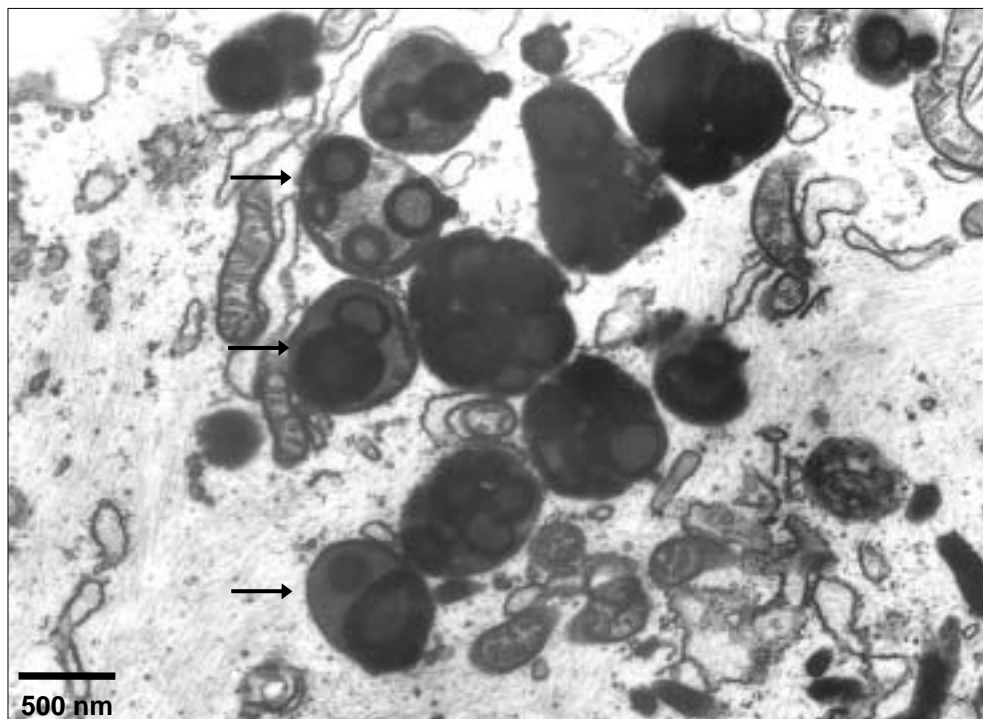
Im Zytoplasma der Endothelzellen waren zahlreiche Organellen zu finden (Abb. 52). Neben ovalen bis länglichen Mitochondrien vom Crista-Typ waren Golgi-Felder sowie raues Endoplasmatisches Retikulum in großer Anzahl vorhanden. In der Nähe der Golgi-Felder konnten zahlreiche runde bis ovale Vesikel mit einem Durchmesser von 40-80 nm beobachtet werden (Abb. 52). Auffällig in einzelnen Zellen waren membranbegrenzte, unterschiedlich große, rundliche Strukturen, die verschieden große Einschlüsse (Durchmesser ca. 170-470 nm), die ebenfalls von einer Membran begrenzt waren, aufwiesen (Abb. 53).

Als Endothelzell-spezifische Organellen konnten transmissionselektronenmikroskopisch Weibel-Palade-Körperchen dargestellt werden (Abb. 52 und 54). In Abb. 55 ist ein Ausschnitt einer schräg getroffenen kapillarähnlichen Struktur dargestellt. Sichtbar sind 4 Endothelzellen, die sich durch ihre Ausläufer gegenseitig überlappen und zentral ein Lumen umschließen. Die Endothelzellen wölben sich dabei vom Lumen weg. Im Lumen befinden sich Zelldetritus sowie unregelmäßig verteilt fibrilläres Material.



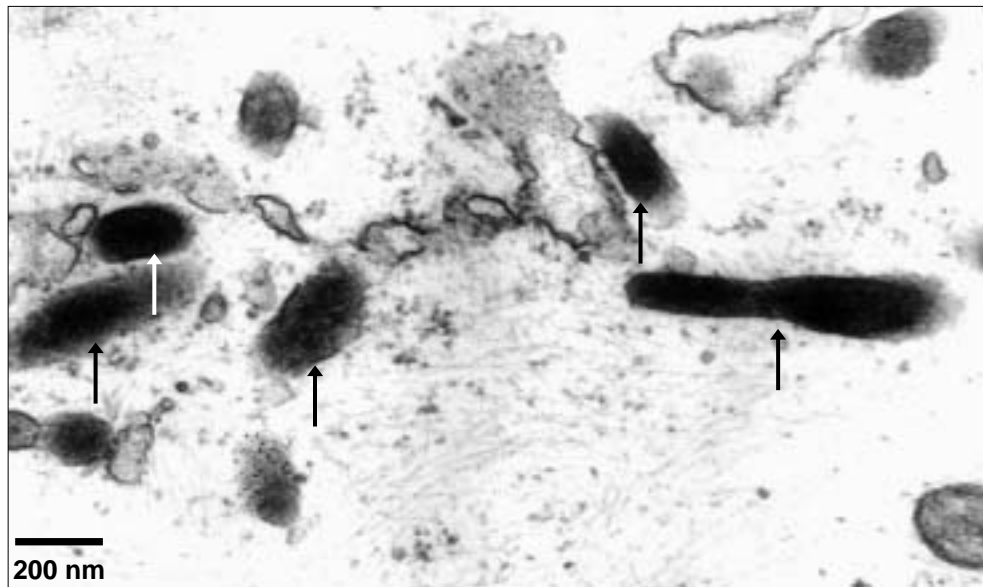
**Abb. 52: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 16 Wochen in Kultur**

Vesikel (Pfeile) in großer Anzahl im Zytoplasma (Z), Golgi-Feld (GF), Mitochondrien (M), Weibel-Palade-Körperchen (Pfeilspitzen). TEM



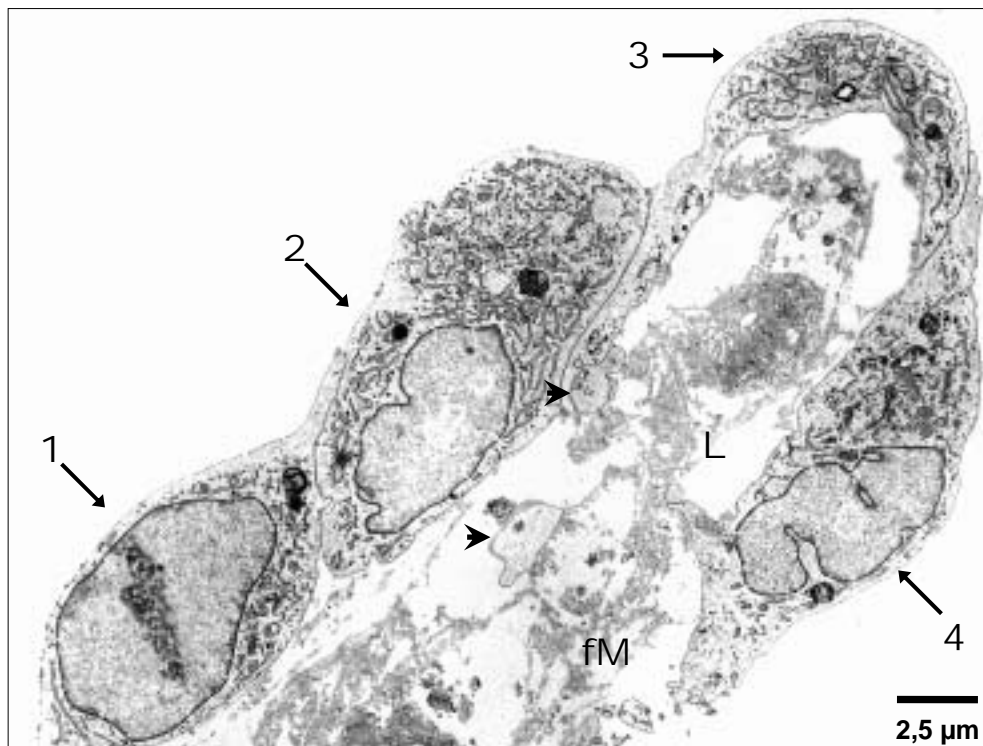
**Abb. 53: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 16 Wochen in Kultur**

Membranbegrenzte Strukturen (Pfeile) im Zytoplasma. TEM



**Abb. 54: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade *in vitro*, 16 Wochen in Kultur**

Weibel-Palade-Körperchen (Pfeile). TEM



**Abb. 55: Ultrastrukturelle Darstellung humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut während der angiogenen Kaskade *in vitro* (Ausschnitt), 5 Wochen in Kultur**

4 Endothelzellen (1-4) umschließen zentral ein Lumen (L), angefüllt mit fibrillärem Material (fM) sowie Zelldetritus (Pfeilspitzen). TEM

### 5.3.4 Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* mit anti-Kollagen IV

Humane Endothelzellen wurden auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten kultiviert und in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* immunhistochemisch untersucht. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie sollte ermittelt werden, ob die humanen Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro* Kollagen IV synthetisieren und in welchem Ausmaß in Bezug auf das Stadium der angiogenen Kaskade.

Eine Übersicht über die verwendeten humanen Endothelzellen mit Angabe der Kultivierungsdauer gibt Tab. 13.

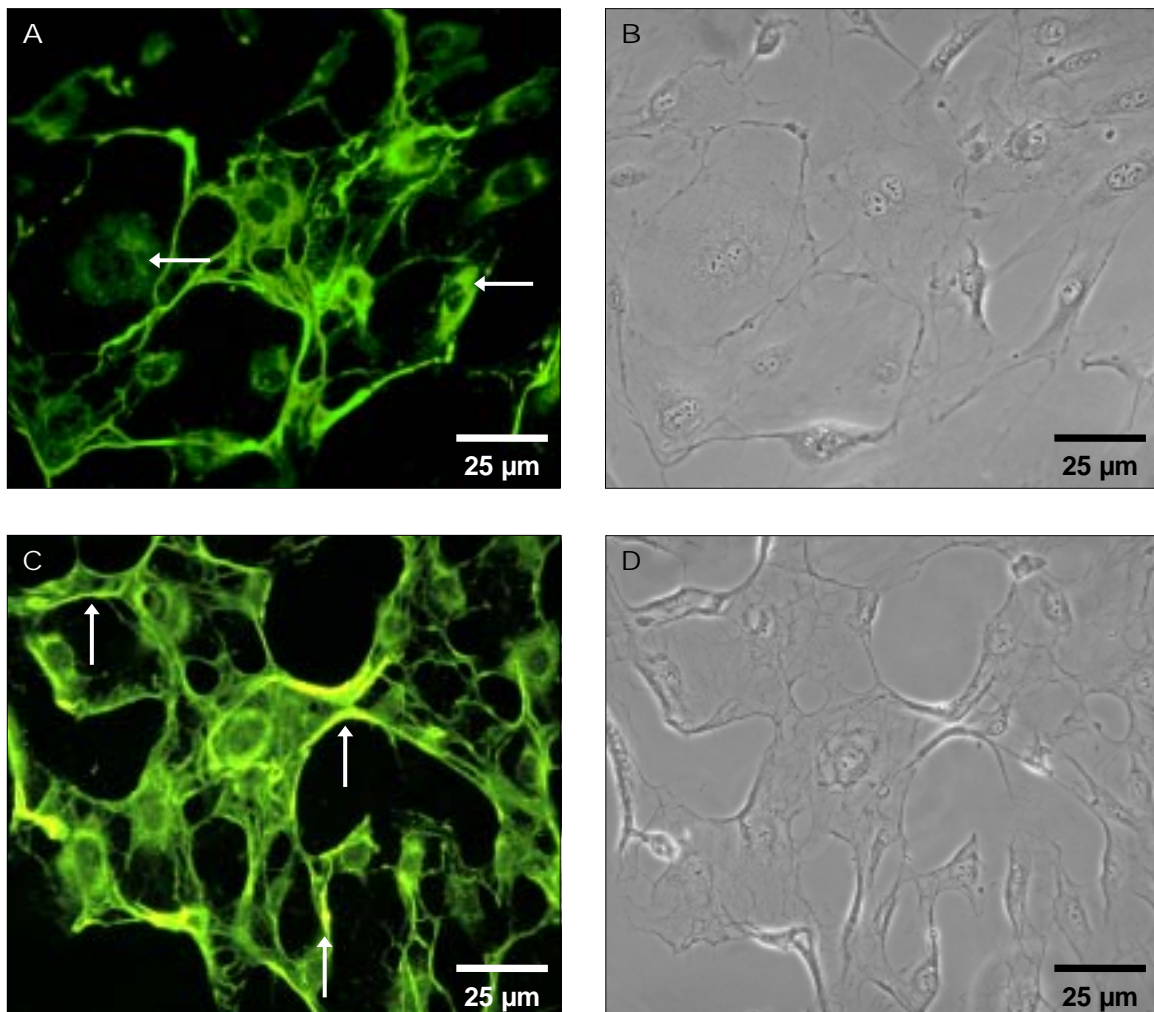
Stadium der angiogenen Kaskade <i>in vitro</i>	Zeitspanne der Kultivierung	Morphologische Beschreibung der Endothelzellen
<i>Stadium 1</i>	2 Tage	Subkonfluent bis konfluent Monolayer aus länglichen Endothelzellen
<i>Stadium 2</i>	9 Tage	Lineare und zirkuläre Aneinanderreihung von Endothelzellen
<i>Stadium 3</i>	24 Tage	Lineare und zirkuläre Aneinanderreihung von Endothelzellen, nur vereinzelt kapillarähnliche Strangbildung
<i>Stadium 4</i>	58 Tage	Ausgeprägte dreidimensionale kapillarähnliche Strangbildung im Randbereich der Kulturschale, Endothelzellen in den Zentren der Kulturschale nicht mehr zu differenzieren

**Tab. 13: Übersicht über die für die Markierung mit anti-Kollagen IV verwendeten humanen Endothelzellen**

Die Markierung mit anti-Kollagen IV wurde im Fluoreszenzmikroskop durch Anregung mit blauem Licht (490 nm) untersucht. Bereiche, in denen der Antikörper gegen Kollagen IV gebunden wurde, zeigten eine grüne Fluoreszenz. Zur optimalen Beurteilung wurden die Ausschnitte parallel phasenkontrastmikroskopisch untersucht.

### 5.3.4.1 Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im Stadium 1 der angiogenen Kaskade *in vitro* mit anti-Kollagen IV

Die humanen Endothelzellen formten einen subkonfluenten bis konfluenten Monolayer aus länglichen Zellen. In den Endothelzellen zeigte sich eine grüne Fluoreszenz im Zytoplasma, wobei der perinukleäre Bereich des Zytoplasmas intensiver markiert wurde (Abb. 56 A). Der Kern wies keine Markierung auf. Zwischen den Zellen zeigte sich ein stark fluoreszierendes Netzwerk langer, dünner, faserartiger Strukturen (Abb. 56 C).

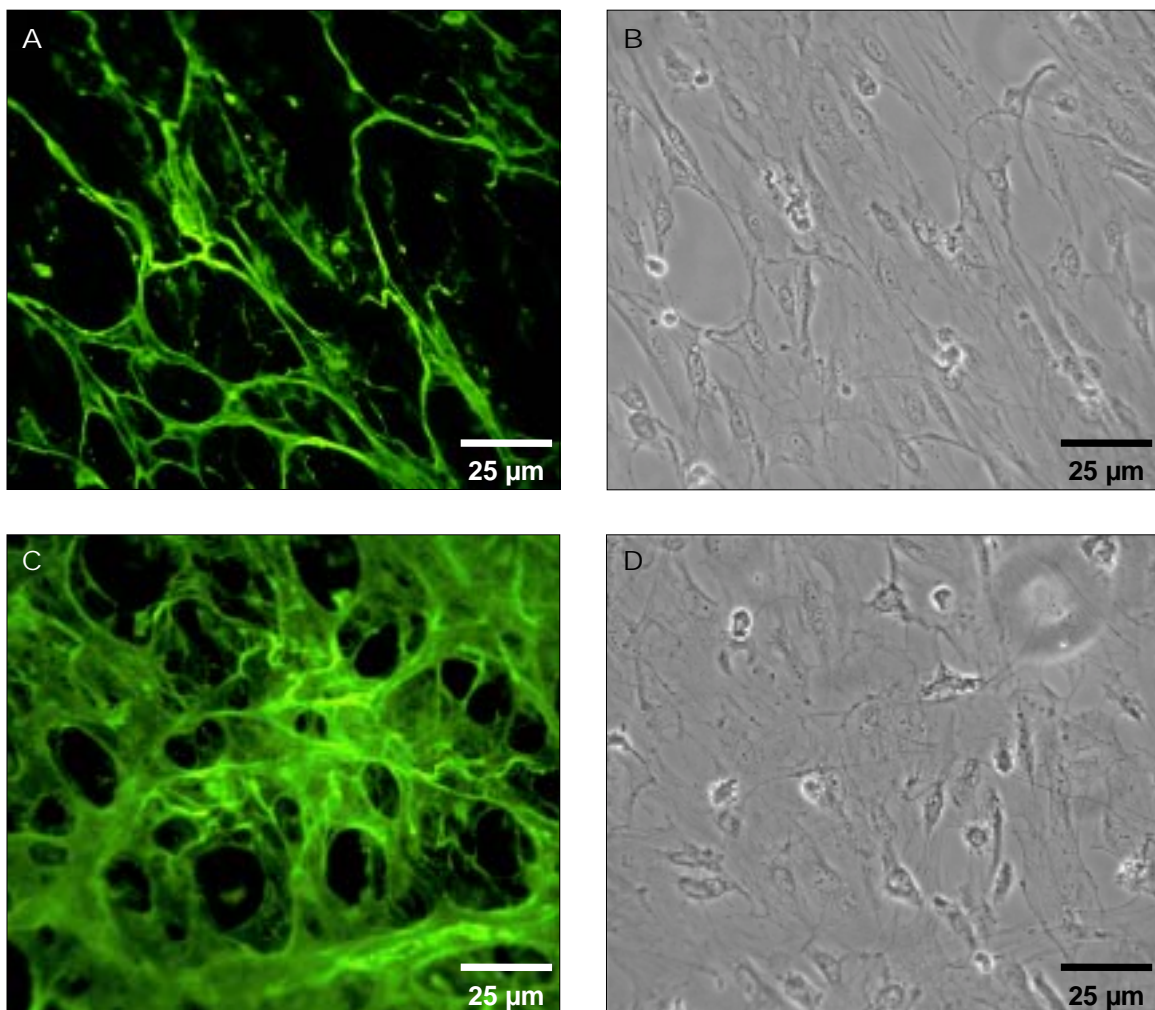


**Abb. 56:** Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 1 der angiogenen Kaskade *in vitro* mit anti-Kollagen IV

Bindung von anti-Kollagen IV markiert Zytoplasma der Endothelzellen (A, Pfeile) sowie faserartige Strukturen zwischen den Zellen (C, Pfeile). (A, B) und (C, D) identische Ausschnitte. (A, C) Fluoreszenzmikroskop, (B, D) Phasenkontrastmikroskop

### 5.3.4.2 Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im Stadium 2 der angiogenen Kaskade *in vitro* mit anti-Kollagen IV

Die humanen Endothelzellen zeigten eine lineare Aneinanderreihung in Kultur. In den Randbereichen der Kulturschale zeigten sich deutlich markierte, faserartige Strukturen (Abb. 57 A). Im Zentrum der Kulturschale konnte eine immunopositive, schwammartige Struktur beobachtet werden (Abb. 57 C). Eine Dreidimensionalität war eindeutig zu erkennen. Innerhalb dieser schwammartigen Struktur waren einzelne faserartige Bestandteile intensiver angefärbt.



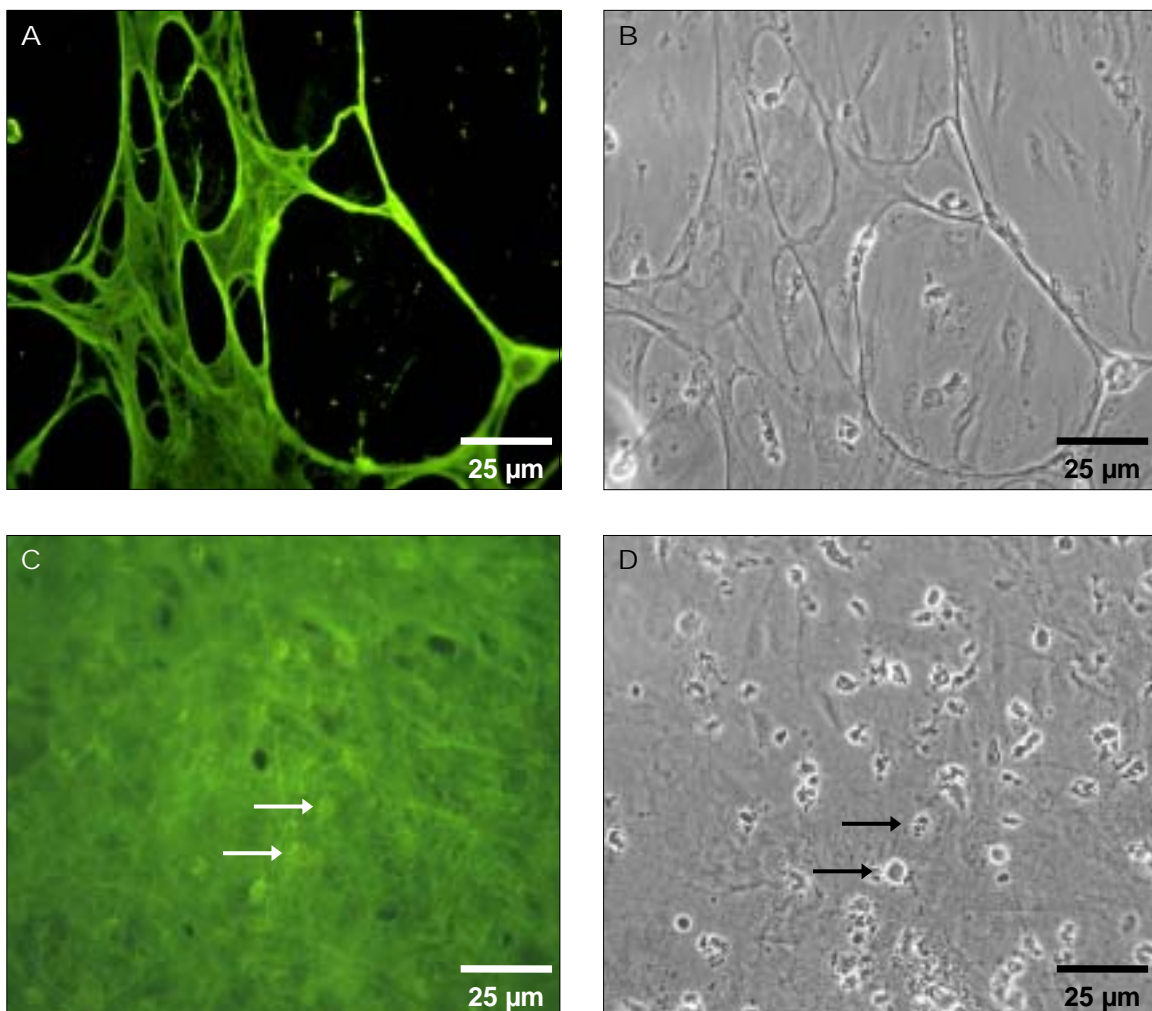
**Abb. 57: Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 2 der angiogenen Kaskade *in vitro* mit anti-Kollagen IV**

Bindung von anti-Kollagen IV markiert faserartige Strukturen zwischen den Endothelzellen (A), die im Zentrum der Kulturschale eine höhere Dichte aufweisen (C). (A, B) identischer Ausschnitt aus dem Randbereich der Kulturschale, (C, D) identischer Ausschnitt aus dem Zentrum der Kulturschale. (A, C) Fluoreszenzmikroskop, (B, D) Phasenkontrastmikroskop



### 5.3.4.3 Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im Stadium 3 der angiogenen Kaskade *in vitro* mit anti-Kollagen IV

Die Endothelzellen formten im Randbereich der Kulturschale stellenweise kapillarähnliche Zellstränge, eine lineare Aneinanderreihung von Zellen war deutlich ausgeprägt. Im Zentrum der Kulturschale dagegen waren klare Zellstrukturen nicht mehr zu differenzieren, das Zellbild erschien verschwommen. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte in den Randbereichen der Kulturschale deutlich markierte, faserartige Strukturen (Abb. 58 A). Im Zentrum der Kulturschale zeigte sich dagegen eine flächenhafte, mehrdimensionale, dichte, grüne Fluoreszenz (Abb. 58 C). Auch die aufgelagerten rundlichen Strukturen im Zentrum wiesen eine Markierung auf (Abb. 58 C). Auch die aufgelagerten rundlichen Strukturen im Zentrum wiesen eine Markierung auf (Abb. 58 C).

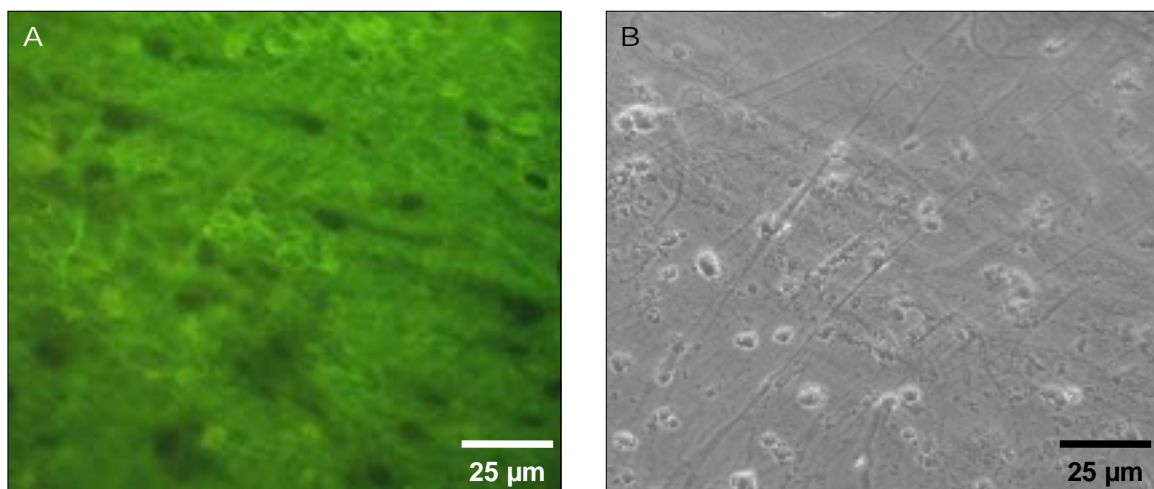


**Abb. 58: Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 3 der angiogenen Kaskade *in vitro* mit anti-Kollagen IV**

Bindung von anti-Kollagen IV markiert netzartige (A) bzw. schwammartige Strukturen (C). Aufgelagerte, rundliche Strukturen (Pfeile, C, D). (A, B) Identischer Ausschnitt aus dem Randbereich der Kulturschale, (C, D) identischer Ausschnitt aus dem Zentrum der Kulturschale. (A, C) Fluoreszenzmikroskop, (B, D) Phasenkontrastmikroskop

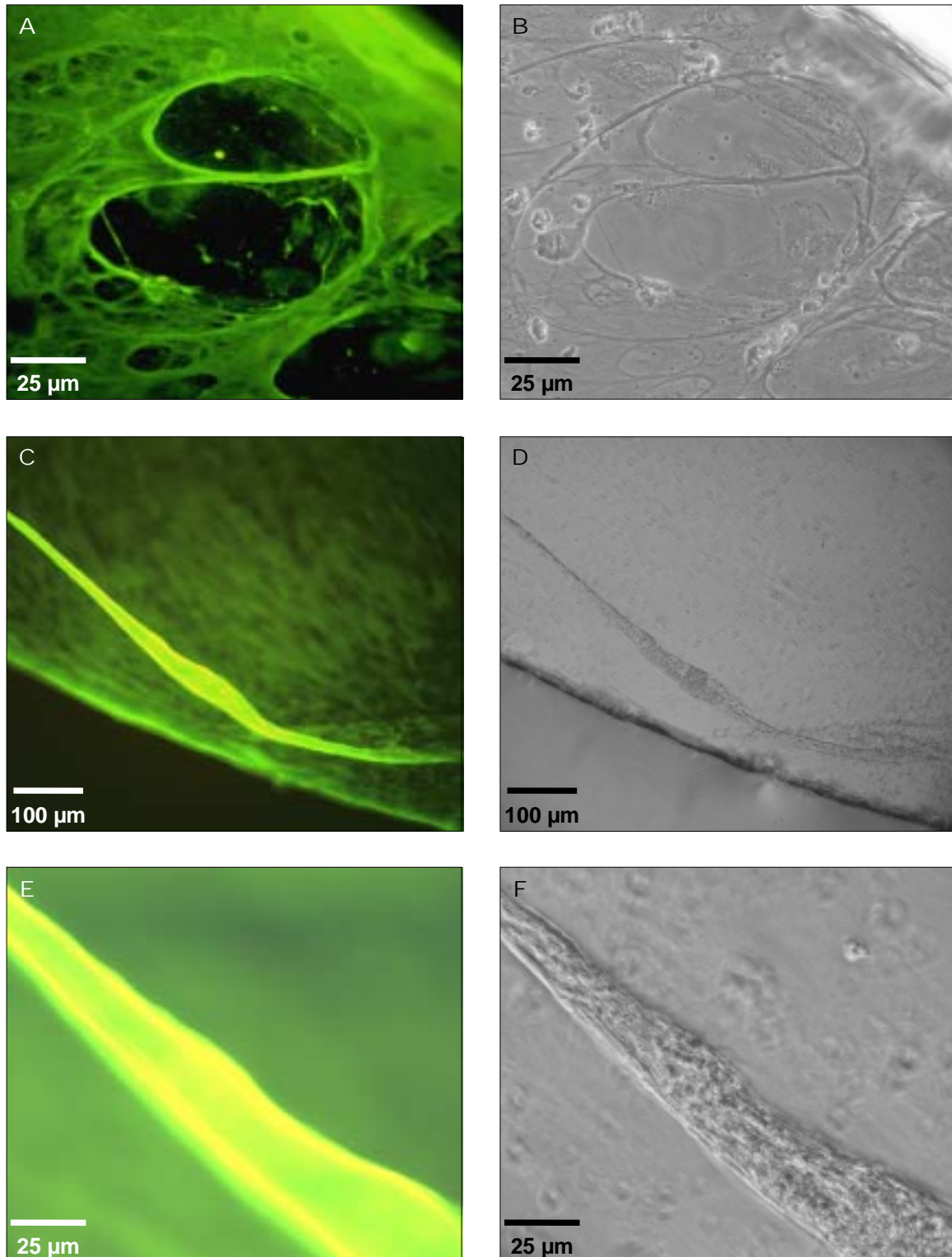
#### 5.3.4.4 Immunhistochemische Markierung von humanen Endothelzellen im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro* mit anti-Kollagen IV

Die verwendeten Endothelzellen befanden sich ca. 8 Wochen in Kultur und waren in den Randbereichen der Kulturschale deutlich in dreidimensionale kapillarähnliche Strukturen organisiert. Diese zeigten eine intensive grüne Fluoreszenz und ließen die Dreidimensionalität deutlich werden (Abb. 60), wobei eine genaue Differenzierung von Zellen nicht möglich war. Im Zentrum der Kulturschale war phasenkontrastmikroskopisch ein verschwommenes Zellbild zu erkennen, welches sich mittels der Fluoreszenzfärbung flächenhaft immunopositiv mit einzelnen unmarkierten, rundlichen Arealen darstellte (Abb. 59).



**Abb. 59: Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro* mit anti-Kollagen IV (identischer Ausschnitt aus dem Zentrum der Kulturschale)**

Bindung von anti-Kollagen IV markiert flächenhaft das Zentrum der Kulturschale. (A) Fluoreszenzmikroskop, (B) Phasenkontrastmikroskop



**Abb. 60: Markierung von humanen Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 4* der *angiogenen Kaskade in vitro* mit anti-Kollagen IV (Ausschnitte aus dem Randbereich der Kulturschale)**

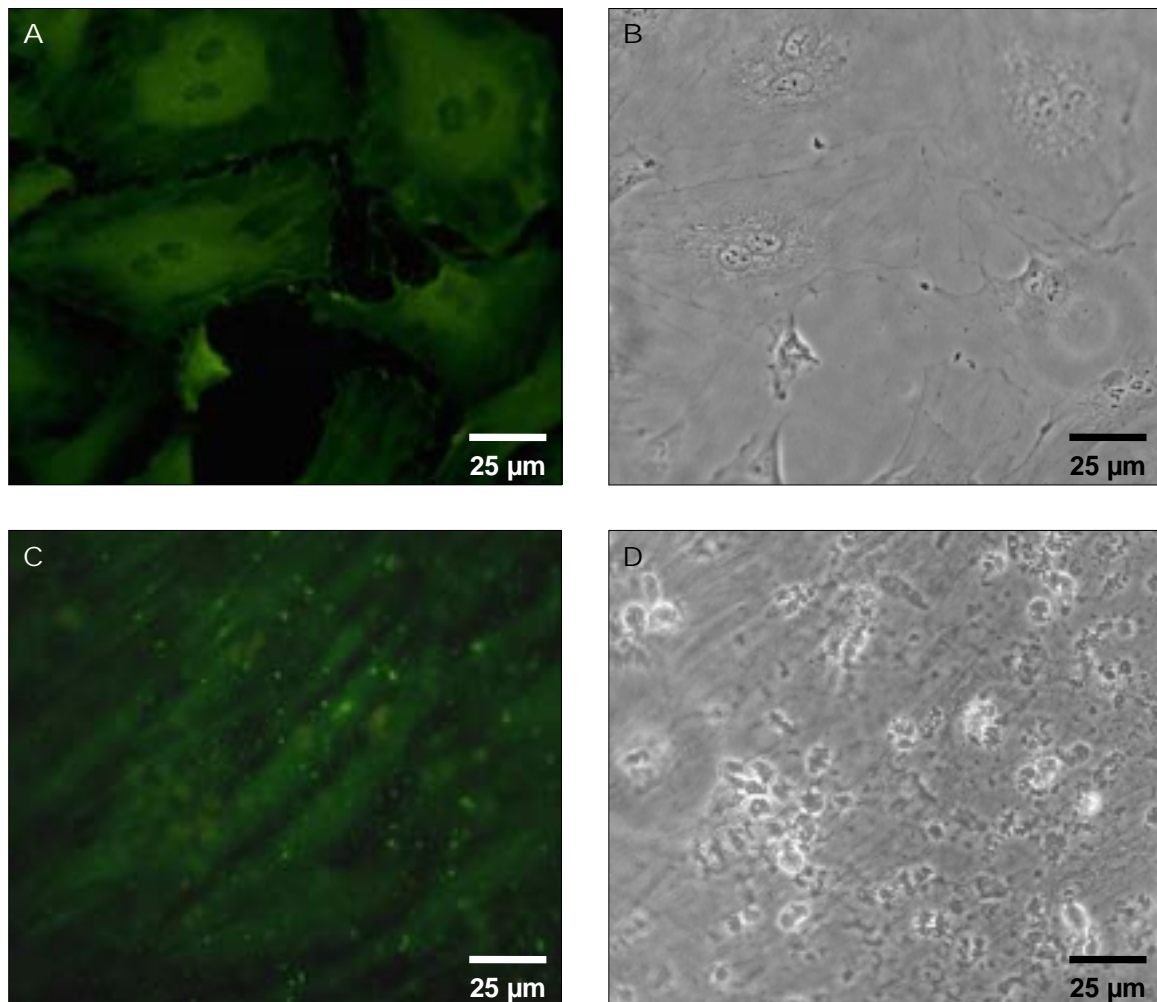
Bindung von anti-Kollagen IV markiert faserartige (A) bzw. kapillarähnliche Strukturen (C, E). (A, B), (C, D), (E, F) identische Ausschnitte. (A, C, E) Fluoreszenzmikroskop, (B, D, F) Phasenkontrastmikroskop

### 5.3.4.5 Kontrollen

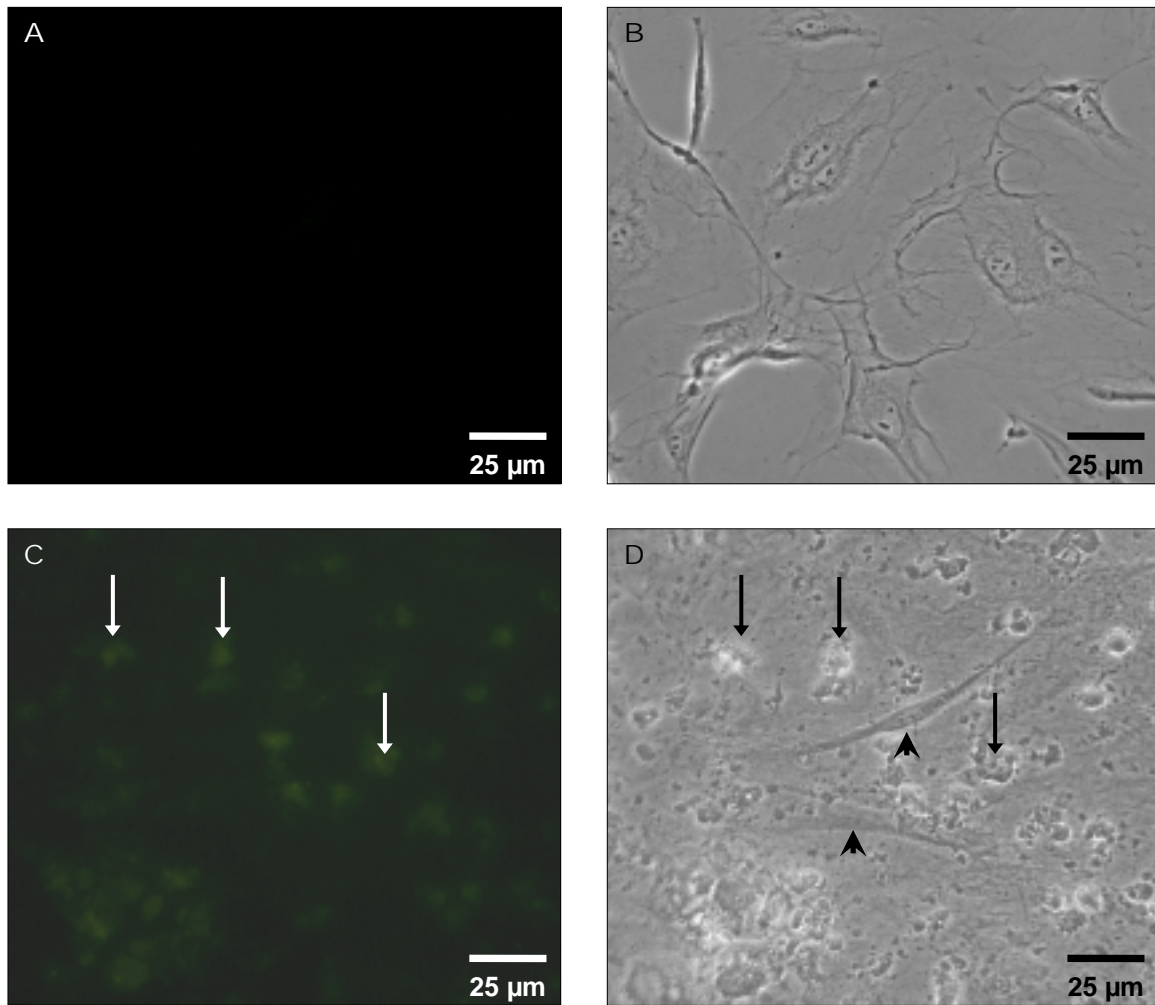
Als Kontrollen wurden humane Endothelzellen anstelle des Primärantikörpers mit Ziegen-0-Serum bzw. mit PBS-Puffer inkubiert.

Die Inkubation mit dem Ziegen-0-Serum führte zu einer sehr schwachen Markierung des Zytoplasmas der Endothelzellen (Abb. 61). Eine Markierung von faserartigen Strukturen war nicht zu erkennen, so dass positive Färbungen mit anti-Kollagen IV hiervon eindeutig zu unterscheiden waren.

Die Inkubation mit PBS-Puffer führte im *Stadium 1* der Endothelzellen zu keiner Färbung (Abb. 62). Ein leicht positiver Schatten von rundlichen, aufgelagerten, nicht-faserartigen Strukturen war erst ab *Stadium 2* zu erkennen.



**Abb. 61: Inkubation humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 1* (A) und *Stadium 4* (C) der angiogenen Kaskade *in vitro* mit Ziegen-0-Serum (Kontrolle)**  
Sehr schwache Markierung des Zytoplasmas. (A, B) und (C, D) identische Ausschnitte. (A, C) Fluoreszenzmikroskop, (B, D) Phasenkontrastmikroskop



**Abb. 62: Inkubation humaner Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im *Stadium 1* (A) und *Stadium 4* (C) der angiogenen Kaskade *in vitro* mit PBS-Puffer (Kontrolle)**

Keine Markierung im *Stadium 1* (A), ab *Stadium 2* (C) leicht positiver Schatten aufgelagerter, rundlicher Strukturen (Pfeile), Zellen (Pfeilspitzen, D). (A, B) und (C, D) identische Ausschnitte. (A, C) Fluoreszenzmikroskop, (B, D) Phasenkontrastmikroskop

### 5.3.5 Transfektion humaner mikrovaskulärer Endothelzellen

Die Transfektionsversuche im humanen Zellkulturmodell erfolgten in Anlehnung an die Versuche im murinen Zellkulturmodell (siehe Kapitel 5.2.3).

In einer Vorversuchsreihe erfolgte die **Optimierung** der Transfektion mit dem polykationischen, auf Dendrimeren basierenden Transfektionsreagenz SuperFect (siehe Kapitel 5.3.5.1). 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. Dagegen wurden alle Plasmide mit unterschiedlichen Promotoren (CMV, Ets-1l, Ets-1k, E-sel) bei der Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zelllyse eingesetzt, um für jeden einzelnen Promotor den optimalen Zeitpunkt zur Auswertung des Luciferase-Assays zu bestimmen. Auf eine Optimierung des Verhältnisses der Konzentration der Plasmid-DNA zum Transfektionsreagenz wurde aufgrund von dazu bereits durchgeführten Untersuchungen der Kooperationsfirma Munich Biotech AG verzichtet. Zur Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Plasmidkonstrukte siehe Kapitel 4.5.1.

Im Anschluss an die Versuche zur Optimierung der Transfektion erfolgte die Charakterisierung verschiedener Plasmidkonstrukte auf Effizienz im humanen Zellkulturmodell der *in vitro*-Angiogenese (**Hauptversuche**, s. Kap. 5.3.5.2 und 5.3.5.3). Die Menge des exprimierten Reportergens (Luciferase) wurde in Relation zum Proteingehalt im Zelllysate gesetzt (RLU/mg Protein) und als Effizienz der jeweiligen Plasmidkonstrukte gewertet.

Die Transfektionsversuche erfolgten stets im Vierfachansatz. Bei jedem Versuch wurden die im Kapitel 4.5.6 beschriebenen drei Negativ-Kontrollen im Doppelansatz mitgeführt. Durch fehlende Detektion einer Luciferase-Aktivität in den Kontrollzelllysaten (Tab. 14, 15, 16, 17, 18 und Abb. 67) konnte sichergestellt werden, dass die Expression des Reportergens nicht durch die Aufnahme nackter Plasmid-DNA (K1) verursacht wurde und dass die gemessene Aktivität nicht auf einer Hintergrundaktivität (K2) oder einer Induktion durch das Transfektionsreagenz (K3) basierte.

### 5.3.5.1 Optimierung der Transfektion humaner Endothelzellen

In allen Optimierungsversuchen wurden humane Endothelzellen im Stadium der Proliferation (*Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro*) transfiziert. Humane Endothelzellen in der Passage 8 wurden 1 Woche im Wachstumsmedium kultiviert, 24 Stunden vor der Transfektion gesplittet und mit einer Konzentration von  $1,75-2,1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 24-Loch-Platten ausgesät.

#### 5.3.5.1.1 Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte

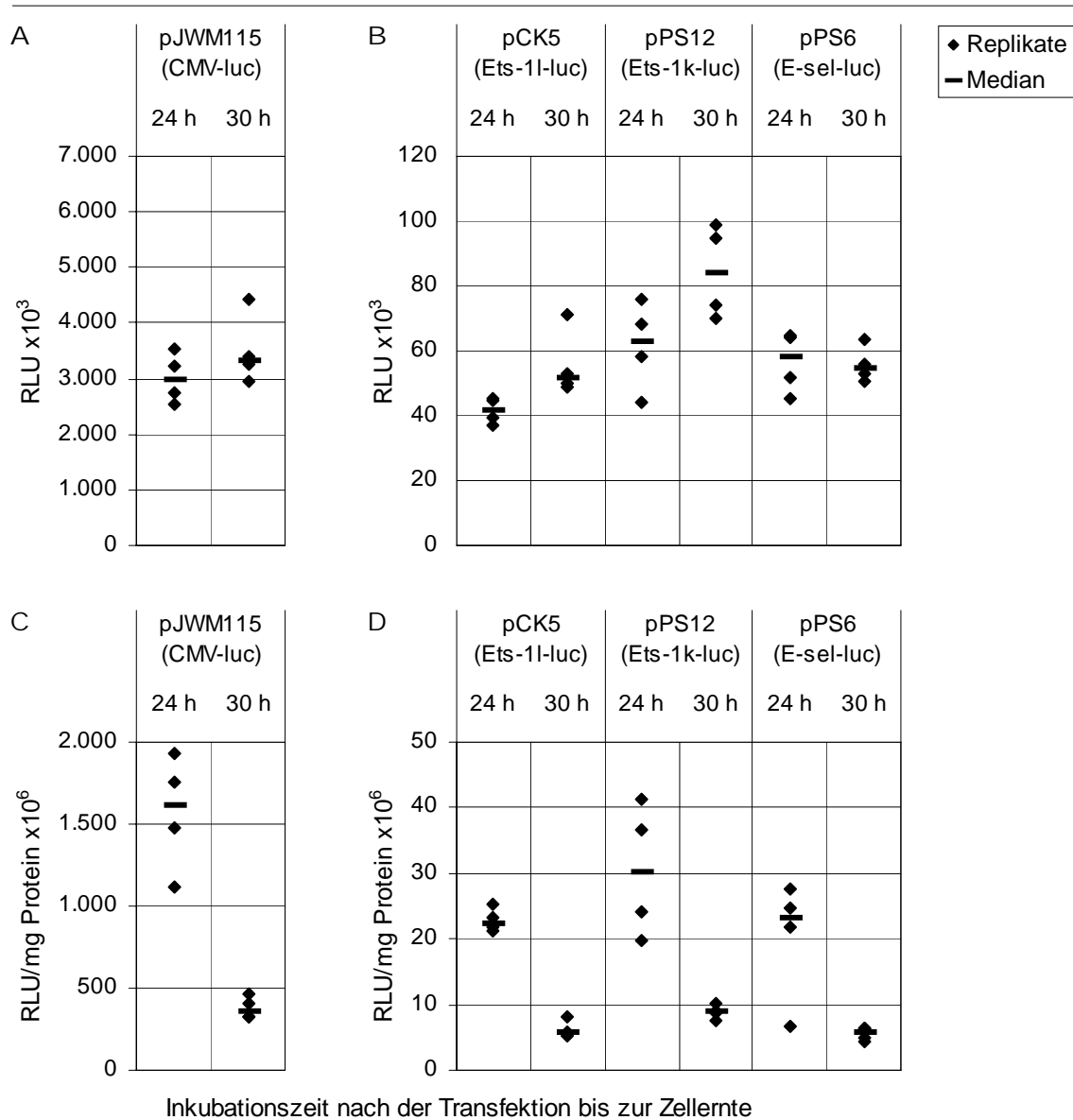
Humane Endothelzellen wurden 1 Stunde mit dem Transfektionskomplex aus 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (pJWM115, pCK5, pPS12, pPS6) und 2  $\mu\text{l}$  *SuperFect* pro Kulturschale inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach einer weiteren 24- bzw. 30-stündigen Inkubation unter Standardkulturbedingungen.

Mit allen eingesetzten Vektoren, auch mit den Endothelzell-spezifische Promotoren (Ets-1, E-sel) enthaltenden Plasmiden, konnte eine Expression der Luciferase detektiert werden. Aufgrund der großen Unterschiede in der Effizienz der Vektoren mit Endothelzell-spezifischen Promotoren (pCK5, pPS12, pPS6) und der Effizienz des pJWM115-Vektors mit dem konstitutiven CMV-Promotor erfolgte eine gesonderte graphische Darstellung (Abb. 63). Die relative Luciferase-Aktivität (nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysat) verringerte sich deutlich für alle Vektoren (pJWM115, pCK5, pPS12, pPS6) bei einer Verlängerung der weiteren Inkubationszeit bis zur Zellernte um 6 Stunden. In den weiteren Transfektions-experimenten wurde für alle Plasmide eine Inkubationszeit nach der Transfektion von 24 Stunden eingehalten.

Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
K1	80	116	98
K2	143	99	121
K3	128	119	124

**Tab. 14: Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte**

Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 2  $\mu\text{g}$  nackter Plasmid-DNA (K1), nur in serumfreiem Medium (K2) bzw. in 2  $\mu\text{l}$  *SuperFect* (K3) für 1 h inkubiert und nach einem Mediumwechsel für weitere 30 h kultiviert.



**Abb. 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**

Humane Endothelzellen in der Passage 8 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 1 Woche in einer Konzentration von  $1,75 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-Loch-Platten ausgesät und 24 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 in 50 µl Zelllysate wurde im Luminometer gemessen (A, B) und parallel der Proteingehalt in den Zelllysaten bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median.



### 5.3.5.1.2 Optimierung der Konzentration der Plasmid-DNA

Humane Endothelzellen wurden mit 0,25-4 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 für weitere 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen inkubiert.

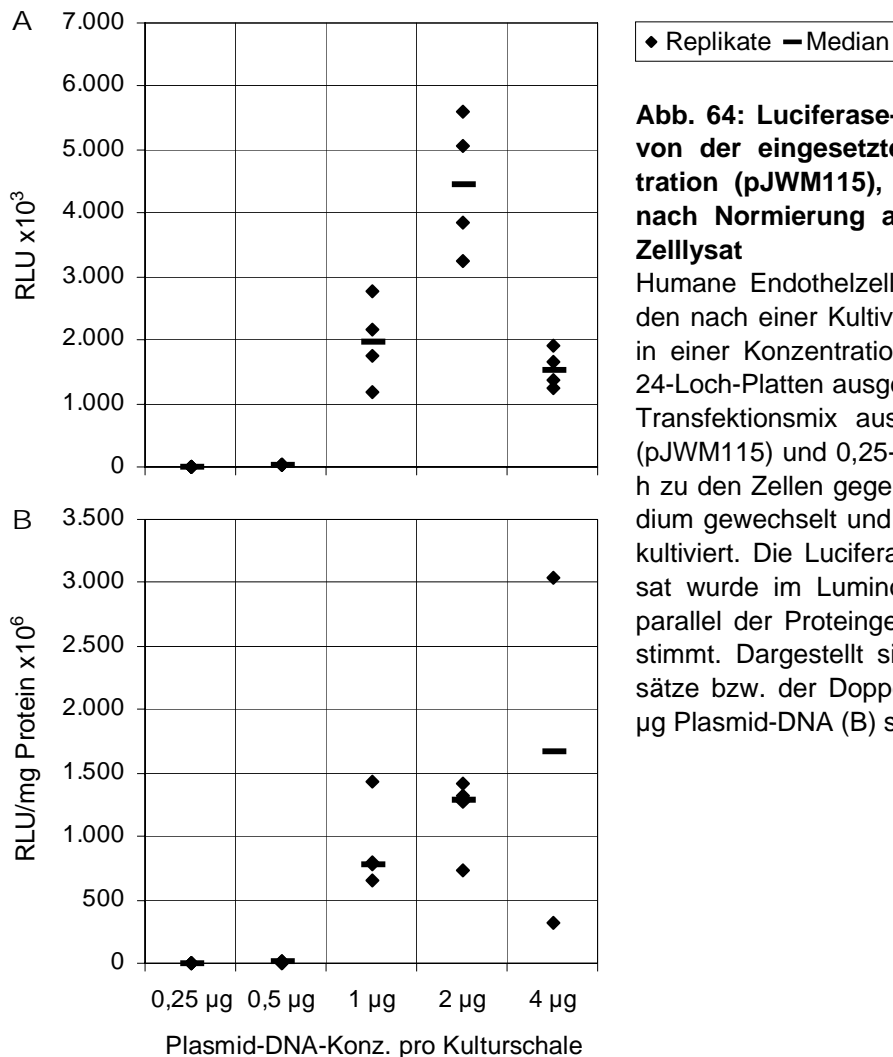
Bei Einsatz von 0,25 µg und 0,5 µg Plasmid-DNA pro Kulturschale konnte nur eine minimale Expression detektiert werden. Dagegen war ein deutlicher Anstieg in der Expression bei Einsatz von 1 µg zu verzeichnen (Abb. 64). Der zunächst linear erscheinende Anstieg der Luciferase-Aktivität bei Verdopplung der Plasmid-DNA-Konzentration von 1 µg auf 2 µg zeigte sich nach Normierung der Werte auf den Proteingehalt in den Zelllysaten nicht mehr für alle Replikate. Im Rahmen der mikroskopischen Kontrollen konnten bei Einsatz von 4 µg deutlich sichtbare Anzeichen einer Zellschädigung beobachtet werden (s. Kap. 5.3.6.1), welche zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität führten. Die Darstellung der Transfektionseffizienz (Abb. 64 B) bei Einsatz von 4 µg musste sich auf zwei Ansätze beschränken, da bei der Herstellung der Zelllysate ein Teil des Volumens verworfen wurde.

Für die weiteren Versuche wurde eine Plasmid-DNA-Konzentration von 1 µg pro Kulturschale gewählt, da die Luciferase-Aktivität bei dieser Menge an Plasmid-DNA im linearen Bereich lag und keine Anzeichen einer Zellschädigung durch die Transfektion beobachtet werden konnten.

Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
K1	142	79	111
K2	270	94	182
K3	77	81	79

**Tab. 15: 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. 64: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmid-DNA-Konzentration (pJWM115), (A) vor Normierung, (B) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate**

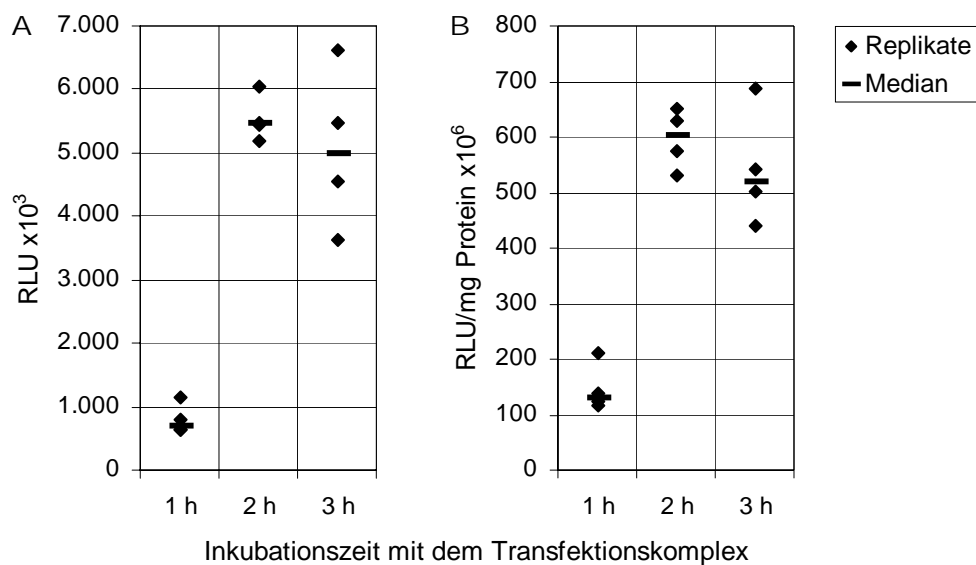
Humane Endothelzellen in der Passage 8 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 1 Woche in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-Loch-Platten ausgesät und 24 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 0,25-4 µg Plasmid-DNA (pJWM115) und 0,25-4 µl *SuperFect* wurde für 1 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zelllysate wurde im Luminometer gemessen (A) und parallel der Proteingehalt in den Zelllysaten bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Vierfachansätze bzw. der Doppelansatz bei Einsatz von 4 µg Plasmid-DNA (B) sowie der Median.

### 5.3.5.1.3 Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex

Humane Endothelzellen wurden 1-3 Stunden mit dem Transfektionsmix aus 1 µg Plasmid-DNA (pJWM115) und 1 µl *SuperFect* pro Kulturschale inkubiert. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation unter Standardkulturbedingungen erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität sowie parallel die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten.

Die Erhöhung der Inkubationszeit von 1 Stunde auf 2 Stunden zeigte einen deutlichen Anstieg der Luciferase-Expression, während eine weitere Erhöhung um eine Stunde keine Steigerung erzielte. Aus Abb. 65 wird ersichtlich, dass im Mittel durch eine Inkubationszeit von 2 Stunden die höchste Expression erzielt wurde. Da die Endothelzellen bereits nach einer 3-stündigen Inkubation mikroskopisch sichtbare, geringe Zeichen einer Zellschädigung zeigten

(s. Kap. 5.3.6.1), erschien es nicht angezeigt, längere Inkubationszeiten zu testen. Bei allen weiteren Transfektionsexperimenten wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden eingehalten.



**Abb. 65: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex, (A) vor Normierung, (B) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate**

Humane Endothelzellen in der Passage 8 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 1 Woche in einer Konzentration von  $2,1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-Loch-Platten ausgesät und 24 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 1 µg Plasmid-DNA (pJWM115) und 1 µl *SuperFect* wurde für 1-3 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h 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.

Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
K1	95	563	329
K2	71	67	69
K3	178	73	126

**Tab. 16: Kontrollwerte der Optimierung der Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex**

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.

### 5.3.5.2 Effizienz verschiedener Promotoren im humanen *in vitro*-Modell der Angiogenese

Die Promotorstudie erfolgte mit standardisierten Transfektionsparametern, die im Rahmen der Optimierungsversuche (s. Kap. 5.3.5.1) ermittelt wurden. Eingesetzt wurden Reporter-gen-Vektoren mit den Promotoren CMV (pJWM115), Ets-1l (pCK5), Ets-1k (pPS12) sowie E-sel (pPS6).

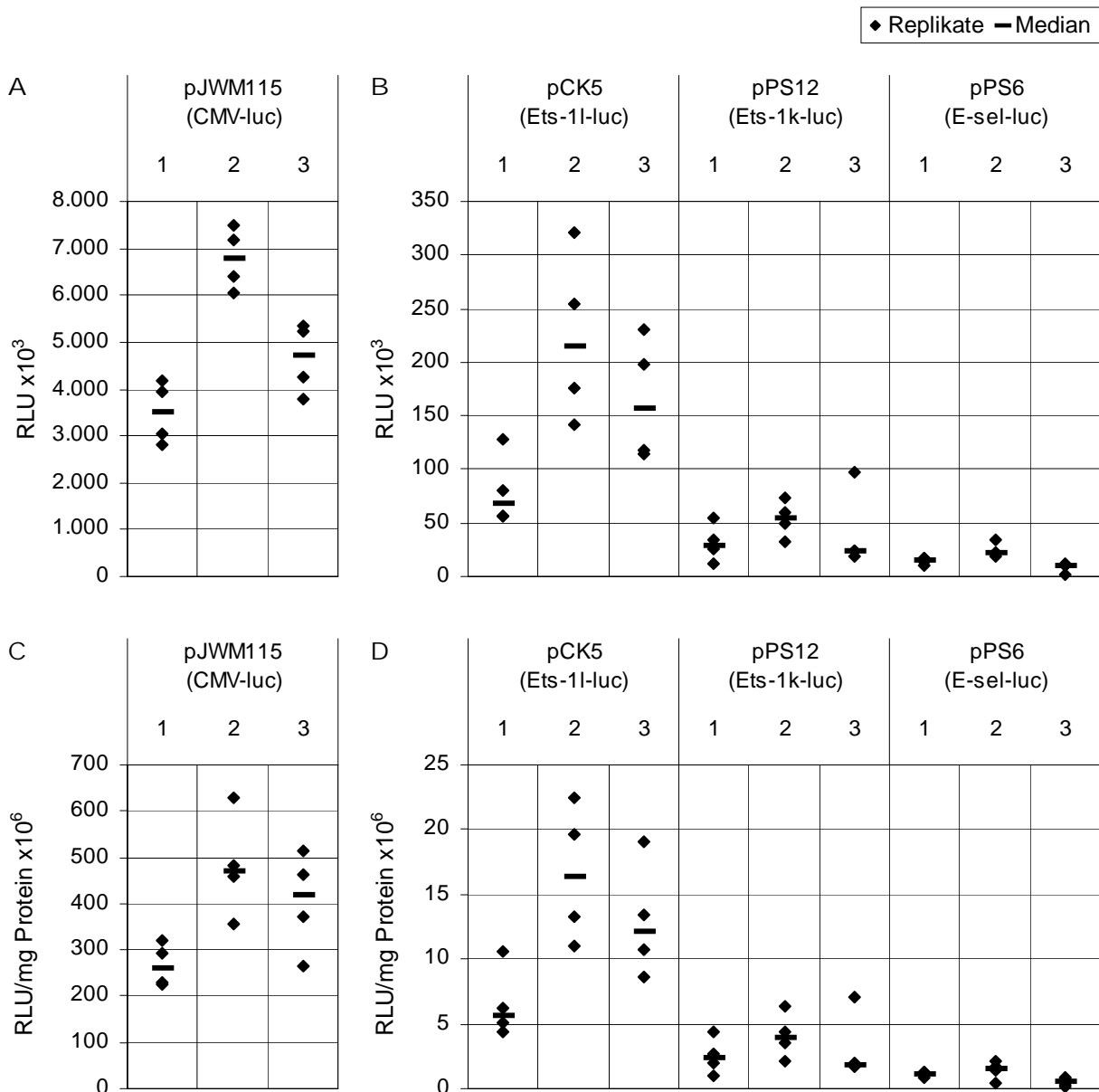
#### 5.3.5.2.1 Promotor-spezifische Luciferase-Expression nach Transfektion humaner Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* (Proliferation)

Humane Endothelzellen in den Passagen 7 und 8 wurden nach 1-wöchiger Kultivierungsdauer gesplittet, mit einer Aussaatdichte von  $1,7 \times 10^4$  bzw.  $2 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  einer 24-Loch-Platte ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Bei allen Transfektionen wurde  $1 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA pro Kulturschale bei einem Verhältnis von  $1 \mu\text{l}$  *SuperFect* pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen wurden 2 Stunden mit dem Transfektionskomplex und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden bis zur Zellernte unter Standardkulturbedingungen 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 Expressionsstärke des Promotors.

Da die Transfektionseffizienzen der Plasmide mit Endothelzell-spezifischen Promotoren (pCK5, pPS12, pPS6) um ein Vielfaches geringer waren als die des pJWM115-Vektors, erfolgte eine gesonderte graphische Darstellung. Der Median dieser 3 Assays betrug  $4,17 \times 10^8$  RLU/mg Protein für pJWM115 (CMV-luc)-transfizierte Zellen,  $12,11 \times 10^6$  RLU/mg Protein für Transfektionen mit dem Vektor pCK5 (Ets-1l-luc),  $2,35 \times 10^6$  RLU/mg Protein für Transfektionen mit dem Vektor pPS12 (Ets-1k-luc) und  $1,17 \times 10^6$  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, wobei mit dem langen Ets-1-Fragment wiederum deutlich höhere Effizienzen erzielt wurden als mit dem kurzen Fragment.

Obwohl weitestgehend standardisierte Transfektionsbedingungen in allen drei unabhängigen Versuchen (Messungen) herrschten, unterschieden sich dennoch die Ergebnisse der einzelnen Versuche voneinander. Auffällig war, dass bei Messung 2 mit allen Vektoren jeweils das Maximum innerhalb dieser Versuchsreihe erzielt wurde (Abb. 66). Mit den Vektoren pJWM115 und pCK5 wurde in der ersten Messung eine deutlich geringere Transfektionseffizienz im Vergleich zu den folgenden Messungen erzielt. Die einzig erfassbaren Unterschiede

zwischen diesen Messungen resultierten aus der höheren Passage der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion (Passage 9 versus 8) sowie aus der geringgradig höheren Aussaatdichte der Zellen vor der Transfektion ( $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> vs.  $1,7 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in der Messung 1.



**Abb. 66: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion humaner Endothelzellen im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro*, (A, B) vor Normierung, (C, D) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate**

Humane Endothelzellen in der Passage 7 (Messung 2 und 3) bzw. Passage 8 (Messung 1) wurden nach einer Kultivierungsdauer von 1 Woche in einer Konzentration von  $1,7 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> (Messung 2 und 3) bzw.  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> (Messung 1) in 24-Loch-Platten ausgesät und 24 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 1 µg Plasmid-DNA und 1 µl *SuperFect* wurde für 2 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zelllysate wurde im Luminometer gemessen (A, B) 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	64	143	104
	K2	121	76	99
	K3	124	70	97
2	K1	207	814	511
	K2	329	235	282
	K3	236	95	166
3	K1	150	109	130
	K2	178	108	143
	K3	754	298	526

**Tab. 17: Kontrollwerte aus 3 Luciferase-Assays**

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

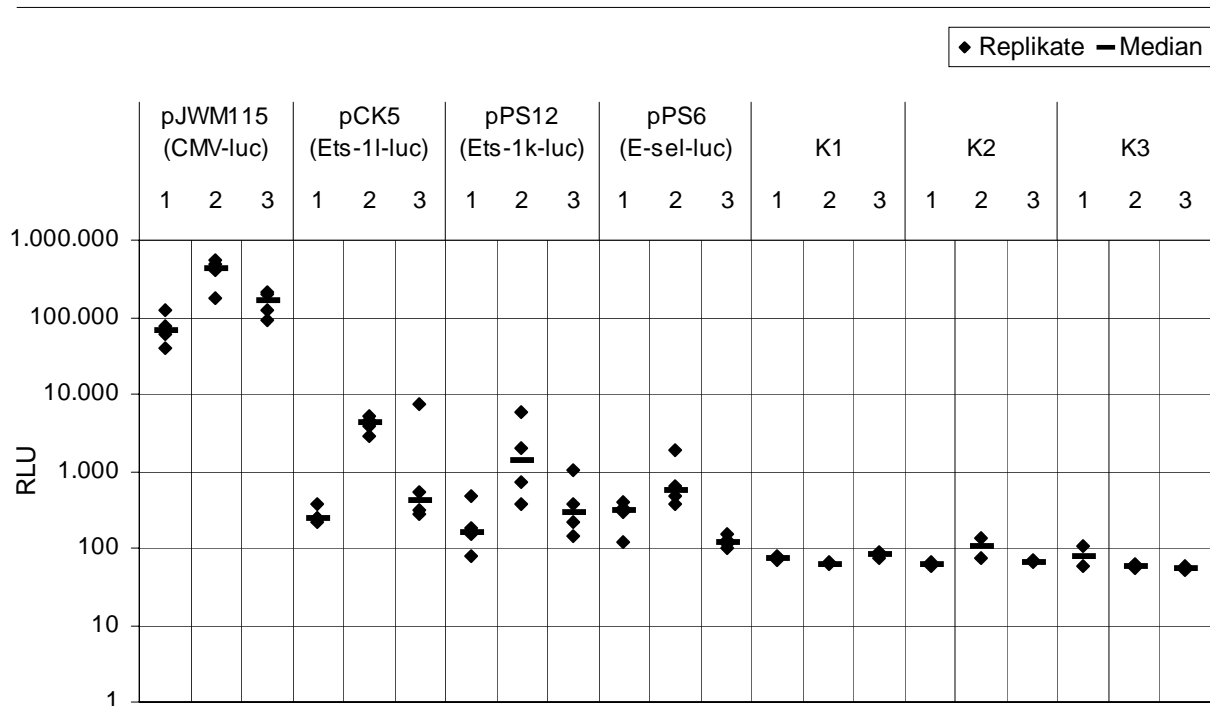
### 5.3.5.2.2 Promotor-spezifische Luciferase-Expression nach Transfektion humaner Endothelzellen im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro* (dreidimensionale Organisation kapillarähnlicher Strukturen)

Humane Endothelzellen in der Passage 7 wurden im Wachstumsmedium 4, 6 bzw. 8 Wochen bis zur Ausbildung dreidimensionaler Netzwerke kapillarähnlicher Strukturen kultiviert und dann transfiziert. Bei allen Transfektionen wurde 1 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 Transfektionskomplex und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen bis zur Zellernte inkubiert. Die durch die Transfektion induzierte Luciferase-Expression wurde im Lumimeter gemessen.

Aus Abb. 67 wird ersichtlich, dass die Transfektion humaner Endothelzellen im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro* zur Expression der Luciferase führte. Da die gemessenen RLU-Werte jedoch im Vergleich zu denen nach Transfektion humaner Endothelzellen im *Stadium 0* (s. Abb. 66) deutlich niedriger ausfielen bei höherer Zellzahl pro Kulturschale (Abb. 68), wurde auf eine Normierung der Luciferase-Aktivität auf den Proteingehalt in den Zelllysaten verzichtet.

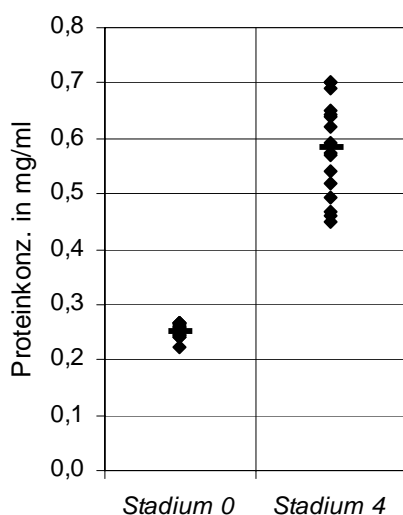
Bei allen drei Messungen dieser Versuchsreihe wurden mit dem pJWM115-Vektor (CMV-luc) die höchsten Effizienzen erzielt. Auffällig war, dass bei Messung 2 mit allen Vektoren jeweils das Maximum innerhalb dieser Versuchsreihe erzielt wurde. Der einzig erfassbare Unterschied zwischen diesen drei Messungen resultierte aus der Kultivierungsdauer der Endothelzellen vor der Transfektion. Die Endothelzellen bei Messung 2 wurden nach einer 4-wöchigen Kultivierungsdauer, also am Anfang von *Stadium 4*, in die Transfektionsexperimen-

te einbezogen, während die Endothelzellen bei Messung 1 und 3 bereits längere Zeit der Kultivierung in diesem Stadium verweilten (insgesamt 6-wöchige bzw. 8-wöchige Kultivierungsdauer).



**Abb. 67: Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom eingesetzten Promotor sowie Kontrollwerte in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion humaner Endothelzellen im Stadium 4 der angiogenen Kaskade *in vitro***

Humane Endothelzellen in der Passage 7 wurden in 24-Loch-Platten im Wachstumsmedium 4 Wochen (Messung 2), 6 Wochen (Messung 1) bzw. 8 Wochen (Messung 3) bis zum Stadium 4 der angiogenen Kaskade *in vitro* kultiviert. Der Transfektionsmix aus 1 µg Plasmid-DNA und 1 µl SuperFect wurde für 2 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Als Kontrollen wurden Endothelzellen in 1 µg nackter Plasmid-DNA (K1), in 1 µl SuperFect (K3) bzw. nur in serumfreiem Medium (K2) für 2 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zelllysate wurde im Luminometer gemessen. Logarithmisch dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4, Kontrollen: n = 2) und der Median der 3 unabhängigen Experimente.



**Abb. 68: Beispielhafter Vergleich der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten humaner Endothelzellen in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro***

Dargestellt sind jeweils die Replikate einer Messung (n = 16) und der Median.

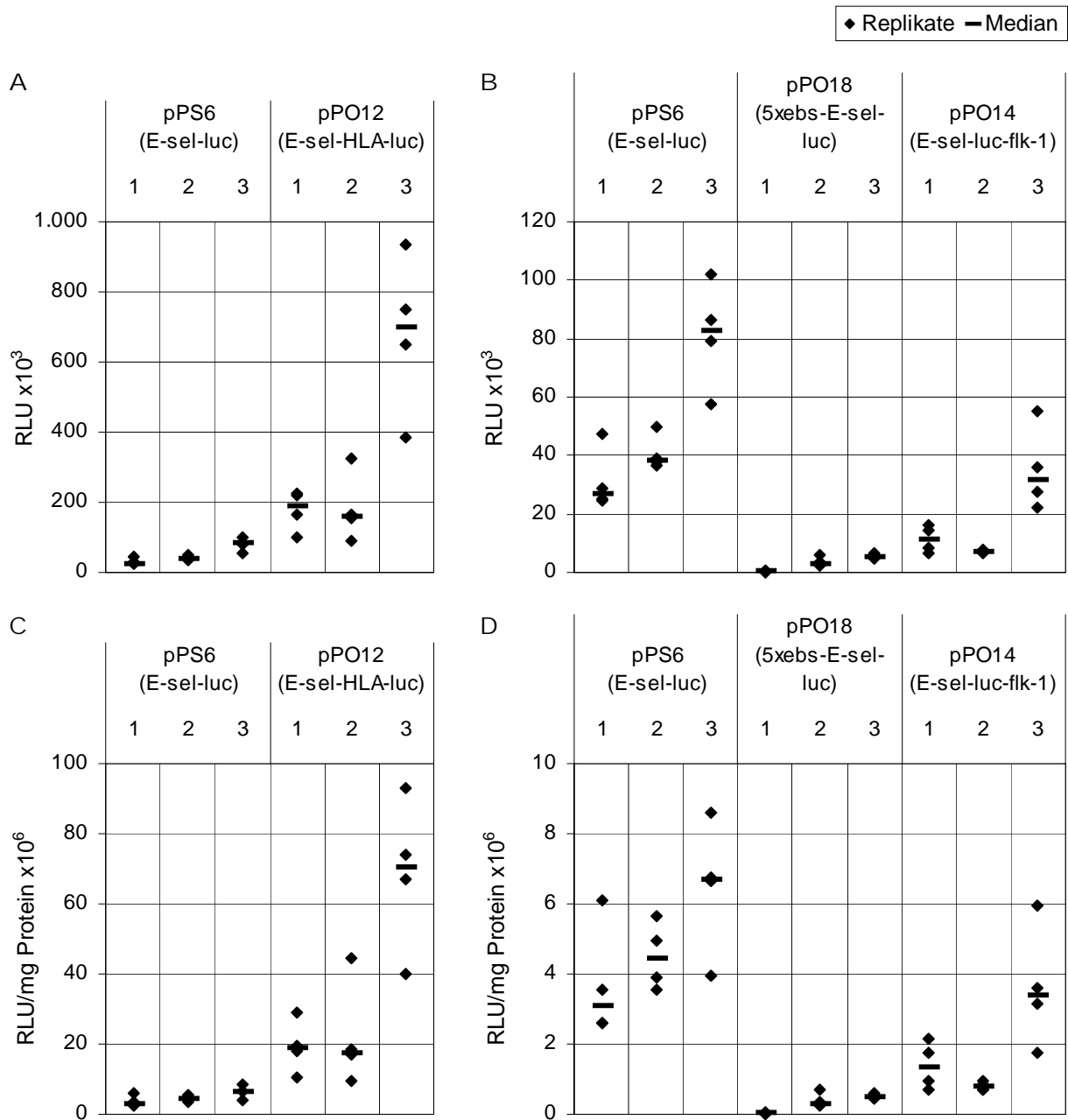
### 5.3.5.3 Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-Selektin-Promotoraktivität

Diese Studie umfasste 3 unabhängige Transfektionsexperimente (Messungen) und wurde mit den Vektoren pPS6 (E-sel-luc), pPO18 (5xebs-E-sel-luc), pPO14 (E-sel-luc-flk-1) und pPO12 (E-sel-HLA-luc) durchgeführt, wobei das Plasmid pPS6 als Kontrolle diente. Humane Endothelzellen in der Passage 7 wurden nach 5- bzw. 8-tägiger Kultivierungsdauer gesplittet, mit einer Aussaatdichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  einer 24-Loch-Platte ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Bei allen Transfektionen wurde  $1 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA pro Kulturschale bei einem Verhältnis von  $1 \mu\text{l}$  *SuperFect* pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen wurden 2 Stunden mit dem Transfektionskomplex und nach einem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die im Luciferase-Assay gemessene Luciferase-Aktivität, genormt auf den Proteingehalt in den Zelllysaten, diente als Maß für die Transfektionseffizienz und damit für den Einfluss der regulatorischen Gensequenzen auf die Expressionsstärke des E-sel-Promotors.

Der Median dieser 3 Assays betrug für Transfektionen mit dem Kontrollplasmid pPS6 (E-sel-luc)  $4,44 \times 10^6$  RLU/mg Protein, für pPO18 (5xebs-E-sel-luc)-transfizierte Zellen  $0,30 \times 10^6$  RLU/mg Protein, für pPO14 (E-sel-luc-flk-1)-transfizierte Zellen  $1,35 \times 10^6$  RLU/mg Protein und für Transfektionen mit dem pPO12-Vektor (E-sel-HLA-luc)  $18,80 \times 10^6$  RLU/mg Protein. In allen drei Experimenten wurden also die höchsten Transfektionseffizienzen mit dem pPO12-Vektor erzielt (Abb. 69). In Relation zum Kontrollplasmid ergab sich eine Steigerung der auf den Proteingehalt genormten Luciferase-Aktivität um den Faktor 4,00 bis 10,53 (Abb. 70). Transfektionen mit dem Vektor pPO14 resultierten in allen drei Messungen in einer höheren Effizienz als Transfektionen mit dem pPO18-Vektor, wenngleich beide, in Relation zum Kontrollplasmid, zu einer Reduzierung der auf den Proteingehalt genormten Luciferase-Aktivität führten, der Vektor pPO14 um den Faktor 1,98 bis 5,60 und der Vektor pPO18 um den Faktor 13,70 bis 74,97 (Abb. 70).

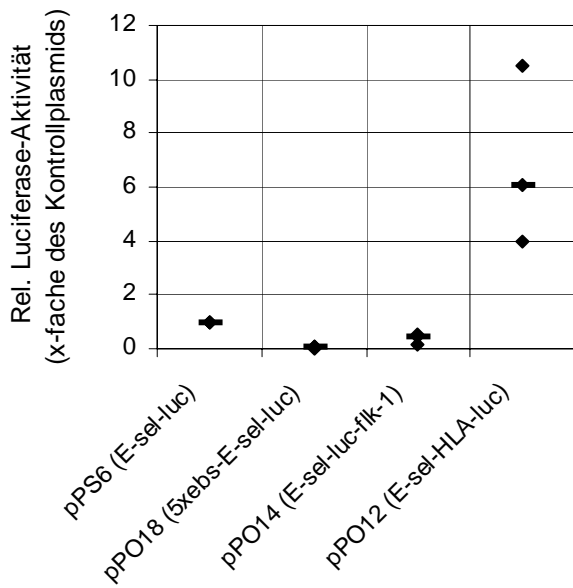
Auffällig war, dass bei Messung 3 mit allen eingesetzten Plasmiden die höchsten Effizienzen innerhalb dieser Versuchsreihe erzielt wurden (Abb. 69). Die Endothelzellen bei Messung 3 befanden sich vor Aussaat für die Transfektion kürzere Zeit in Kultur (5 Tage im Vergleich zu 8 Tagen bei Messung 1 und 2).





**Abb. 69: Einfluss regulatorischer Gensequenzen auf die E-sel-Promotoraktivität in 3 Luciferase-Assays nach Transfektion humaner Endothelzellen im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro*.** (A, B) Luciferase-Aktivität vor Normierung, (C, D) nach Normierung auf den Proteingehalt im Zelllysate

Humane Endothelzellen in der Passage 7 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen (Messung 3) bzw. 8 Tagen (Messung 1 und 2) in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-Loch-Platten ausgesät und 24 h kultiviert. Der Transfektionsmix aus 1 µg Plasmid-DNA und 1 µl *SuperFect* wurde für 2 h zu den Zellen gegeben, anschließend das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Luciferase-Aktivität in 50 µl Zelllysate wurde im Luminometer gemessen (A, B) und parallel der Proteingehalt in den Zelllysaten bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Replikate (n = 4) und der Median der 3 unabhängigen Experimente.



**Abb. 70: Steigerung bzw. Senkung der E-sel-Promotoraktivität durch Enhancer-/Intron-Sequenzen**

Die Aktivitäten des pPS6-Vektors (Kontrolle) der drei unabhängigen Experimente wurden gleich 1 und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Replikate (= Mediane der 3 unabhängigen Experimente) und der Median.

Messung	Kontrollen	Rep. 1 [RLU]	Rep. 2 [RLU]	Mittelwert [RLU]
1	K1	141	58	100
	K2	57	48	53
	K3	61	71	66
2	K1	86	130	108
	K2	63	51	57
	K3	57	49	53
3	K1	222	62	142
	K2	83	58	71
	K3	64	52	58

**Tab. 18: Kontrollwerte aus 3 Luciferase-Assays**

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

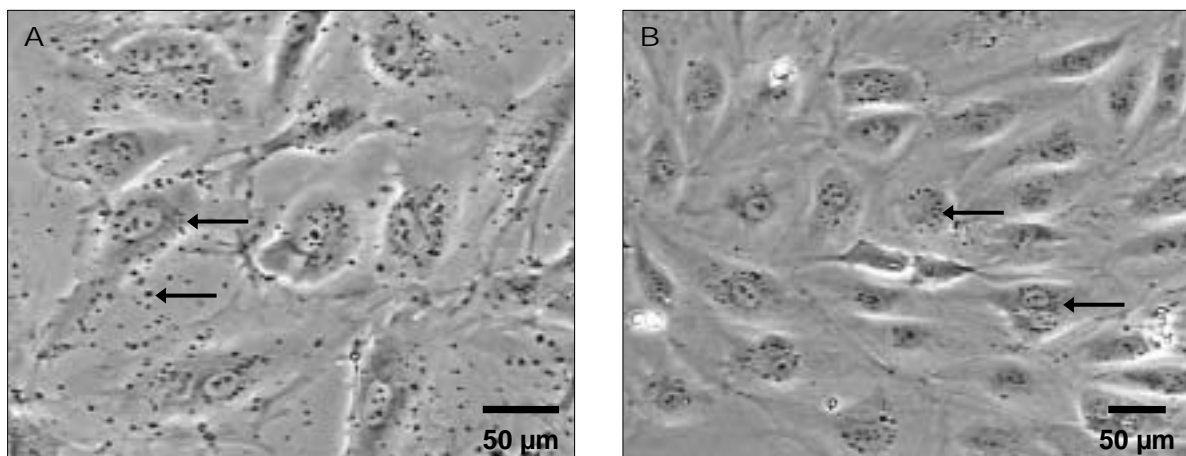
### 5.3.6 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung transfizierter humaner Endothelzellen

#### 5.3.6.1 Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro* (Proliferation)

Die Endothelzellen wurden am Ende der Inkubation mit dem Transfektionsmix sowie direkt vor der Zelllyse mikroskopisch beurteilt.

Am Ende der Inkubation mit dem Transfektionskomplex waren deutlich dunkle, rundliche Vesikel zwischen den Zellen sichtbar (Abb. 71 A). Die Anzahl der Vesikel zwischen den Zellen erhöhte sich mit steigender Plasmid-DNA-Konzentration. Auch im Zytoplasma der Zellen verteilt waren Vesikel zu erkennen (Abb. 71 A). Ein stellenweises Ablösen von Zellen wurde nur bei Einsatz von 4 µg Plasmid-DNA pro Kulturschale beobachtet.

Nach weiterer 24-stündiger Inkubation waren die oben beschriebenen Vesikel nicht mehr bzw. nur in Assoziation zu den Zellen extrazellulär zu sehen. In den Zellen konnte eine deutlich perinukleäre Lage der Vesikel ausgemacht werden (Abb. 71 B). Ein stellenweises bis großflächiges Ablösen von Zellen konnte nur bei längerer Inkubationsdauer (3 Stunden) mit dem Transfektionskomplex beobachtet werden.



**Abb. 71: Humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro* während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex (A) und direkt vor der Zelllyse (B)**

(A) Inter- und intrazelluläre Vesikel (Pfeile), (B) deutliche perinukleäre Lage der Vesikel (Pfeile). Phasenkontrastmikroskop

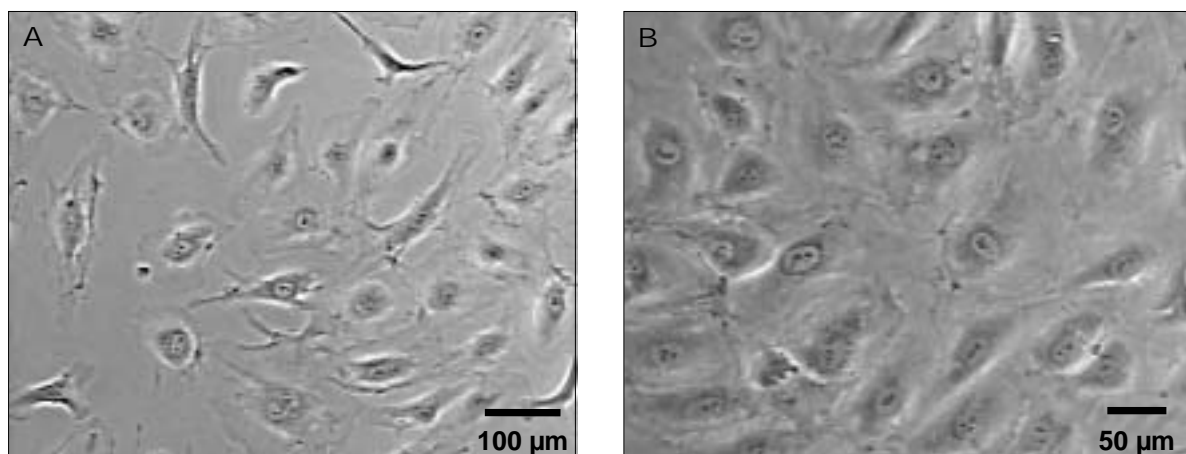
### 5.3.6.2 Stadium 4 der angiogenen Kaskade *in vitro* (Bildung kapillarähnlicher Strukturen)

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

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten waren Vesikel nur extrazellulär in Bereichen geringerer Zelldichte, insbesondere in den Randbereichen der Kulturschale, zu erkennen. Eine intrazelluläre Lokalisation von Vesikeln konnte aufgrund des Zellbildes in diesem Stadium der *in vitro*-Angiogenese (dreidimensionales Wachstum der Endothelzellen) nicht beurteilt werden. Mikroskopisch sichtbare Anzeichen einer Zellschädigung durch die Transfektion konnten nicht ausgemacht werden, das Zellbild blieb während und nach der Transfektion unverändert.

### 5.3.6.3 Morphologie und Wachstum scheintransfizierter humaner 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. 72 A, B).



**Abb. 72: Scheintransfizierte humane Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro* (Kontrollen) während der Inkubation (A) und direkt vor der Zellyse (B)**

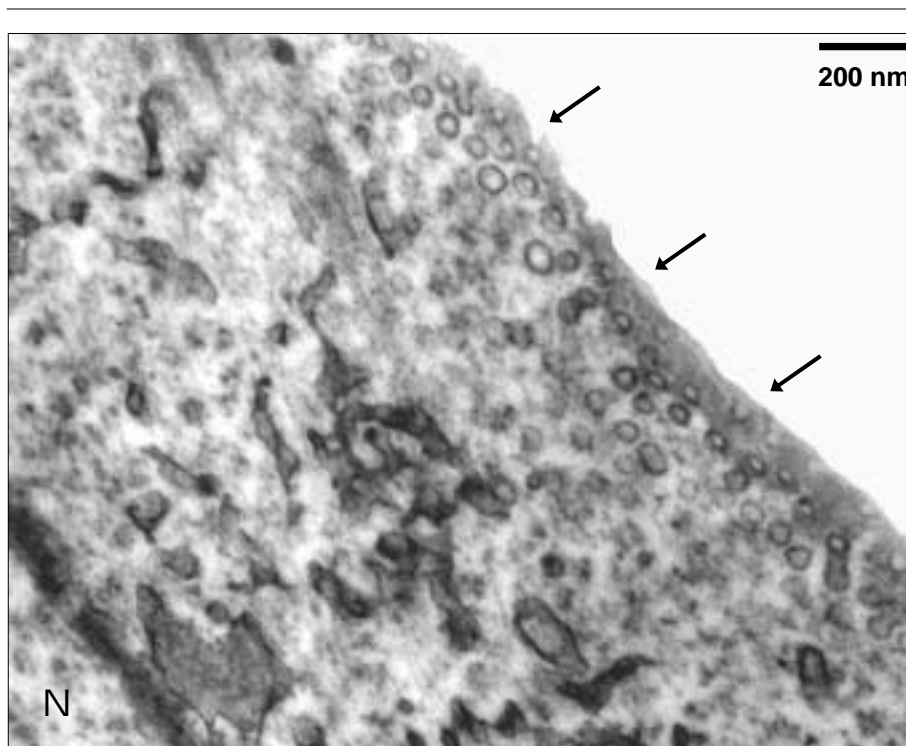
Keine inter- bzw. intrazellulären Vesikel. Phasenkontrastmikroskop

### 5.3.7 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung transfizierter humaner Endothelzellen

#### 5.3.7.1 Ultrastruktur humaner Endothelzellen während der Transfektion

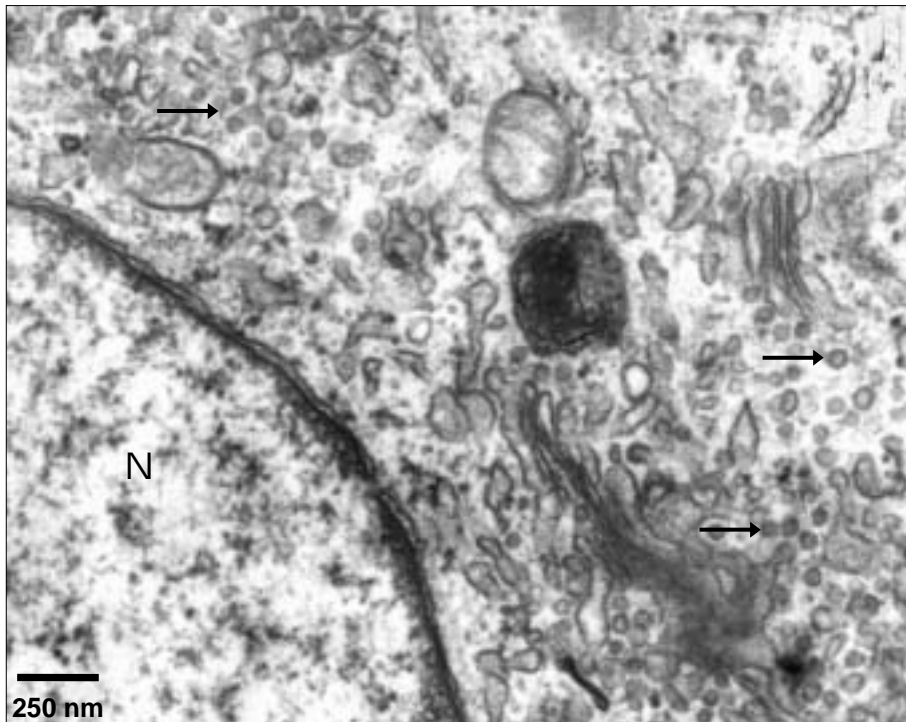
Humane Endothelzellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 24-Loch-Platten ausgesät und nach 2-stündiger Inkubation mit dem Transfektionskomplex für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung präpariert.

Die Endothelzellen zeigten zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung zahlreiche membranbegrenzte Vesikel (Durchmesser ca. 50-80 nm) an der Zellmembran (Abb. 73) sowie im Zytoplasma, ohne sichtbare Assoziation zu Golgi-Feldern (Abb. 74). Weiterhin konnten Vesikel an der Kernmembran gefunden werden (Abb. 75), wobei sich die Kernmembran in diesem Bereich nicht klar abzeichnete.



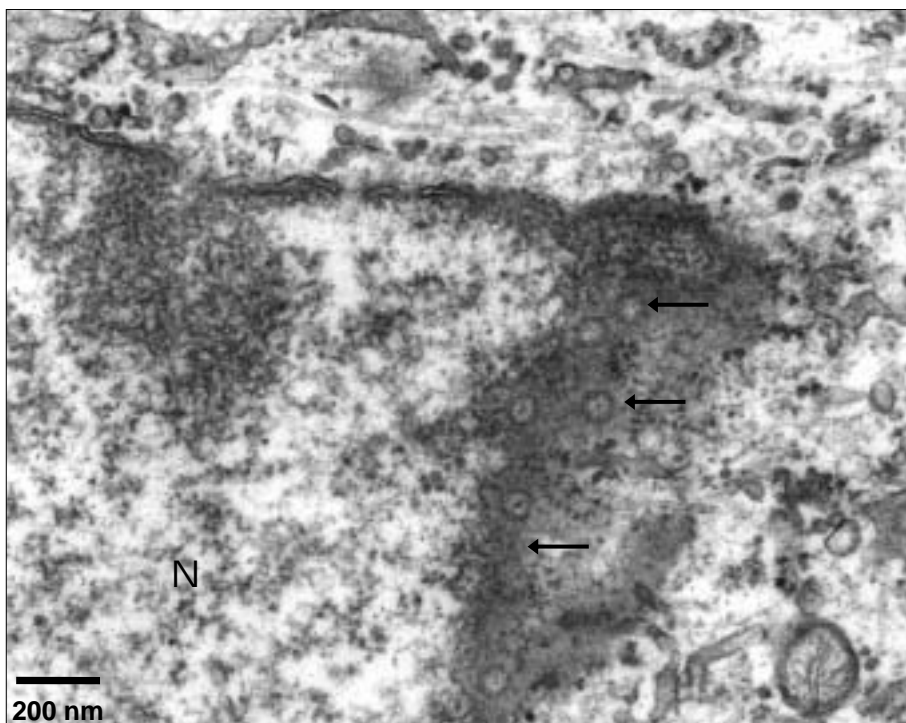
**Abb. 73: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex**

Vesikel (Pfeile) in großer Anzahl an der Zellmembran. Nucleus (N). TEM



**Abb. 74: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex**

Vesikel (Pfeile) in großer Anzahl im Zytoplasma ohne sichtbare Assoziation zu Golgi-Feldern. Nucleus (N). TEM



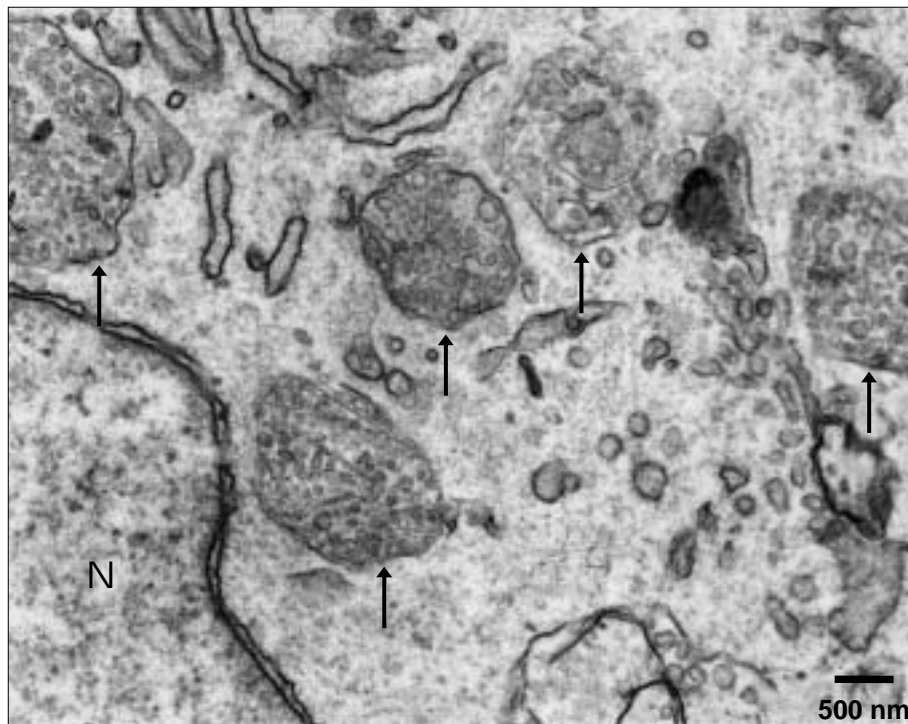
**Abb. 75: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Inkubation mit dem Transfektionskomplex**

Vesikel (Pfeile) an der Kernmembran. Nucleus (N). TEM

### 5.3.7.2 Ultrastruktur humaner Endothelzellen nach der Transfektion

Die Fixierung der auf Glasplättchen kultivierten humanen Endothelzellen für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte nach 2-stündiger Inkubation mit dem Transfektionskomplex und einer weiteren 24-stündigen Inkubation.

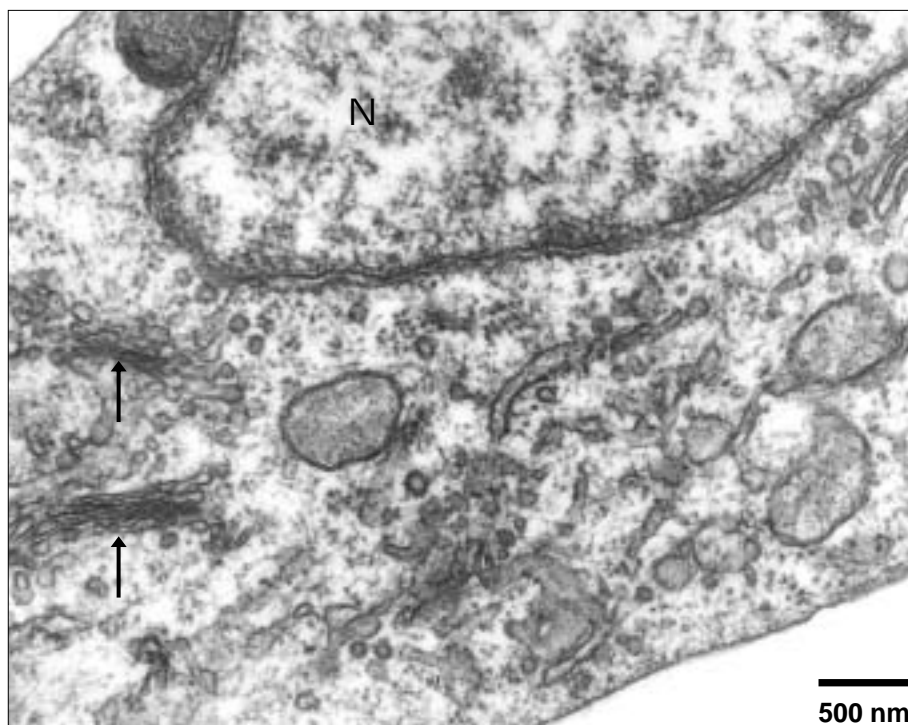
Das transmissionselektronenmikroskopische Bild humaner Endothelzellen nach der Transfektion unterschied sich von dem während der Transfektion. Besonderheiten an der Zell- bzw. Kernmembran wurden nicht gefunden. Auffällig nach der Transfektion waren spezifische, unterschiedlich große (ca. 1-1,5  $\mu\text{m}$ ), von einer Membran umhüllte Strukturen im Zytoplasma (Abb. 76). Diese beherbergten innerhalb ihrer Begrenzungsmembran eine Vielzahl 50-70 nm großer Vesikel.



**Abb. 76: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut direkt vor der Zellyse**  
Multivesikuläre Körper (Pfeile) im Zytoplasma. Nucleus (N). TEM

### 5.3.7.3 Ultrastruktur scheintransfizierter humaner Endothelzellen (Kontrollen)

Für die Kontrolluntersuchungen wurden auf Glasplättchen kultivierte humane Endothelzellen verwendet, die 2 Stunden mit serumfreiem Medium, also ohne Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz, sowie weitere 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen inkubiert wurden. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten konnten die in den Kapiteln 5.3.7.1 und 5.3.7.2 beschriebenen Auffälligkeiten transfizierter Zellen nicht beobachtet werden. Im Zytoplasma der scheintransfizierten Zellen zeigten sich auch Vesikel, aber in deutlich geringerer Anzahl als bei den transfizierten Zellen und in der Regel in deutlicher Assoziation zu Golgi-Feldern (Abb. 77).



**Abb. 77: Ultrastrukturelle Darstellung einer humanen Endothelzelle aus der neonatalen Vorhaut während der Scheintransfektion**

Keine Vesikel an der Zell- bzw. Kernmembran, Vesikel im Zytoplasma in deutlich geringerer Anzahl, hauptsächlich Golgi-Feld-assoziiert (Pfeile). Nucleus (N). TEM