

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Labor: Prof. Dr. J. Plendl

in Kooperation
mit dem Institut für Tieranatomie II
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Zelluläre und molekulare Mechanismen
der in vitro-Angiogenese:
Lichtmikroskopische, elektronenmikroskopische,
immunhistochemische und molekularbiologische
Untersuchungen

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

vorgelegt von
Stefanie Schuster
aus Passau

Berlin 2002

Journal-Nr.: 2610

Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. J. Plendl
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. H. Tönhardt

Tag der Promotion: 28.06.2002

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	3
2.1.	Blutgefäßsystem	3
2.1.1.	Arteriell System	3
2.1.2.	Kapillaren	4
2.1.3.	Venöses System	5
2.1.4.	Endothelzellen	5
2.1.5.	Basalmembran	5
2.2.	Wachstum und Blutgefäßbildung	6
2.2.1.	Blutgefäßbildung im Embryo	6
2.2.1.1.	Vaskulogenese im Embryo	6
2.2.1.2.	Angiogenese im Embryo	7
2.2.2.	Gefäßwachstum beim Adulten	7
2.2.2.1.	Angiogenese beim Adulten	7
2.2.2.1.1.	Physiologisches Gefäßwachstum	7
2.2.2.1.2.	Blutgefäßbildung im Rahmen pathologischer Prozesse	8
2.2.2.2.	Vaskulogenese beim Adulten	8
2.3.	Angiogenese	9
2.3.1.	Anfänge der Angiogeneseforschung	9
2.3.2.	Phasen der Angiogenese	10
2.3.2.1.	Aktivierung der Endothelzellen	12
2.3.2.2.	Lösung der periendothelialen Zellen und der interendothelialen Zellkontakte	12
2.3.2.3.	Abbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix	13
2.3.2.4.	Migration der Endothelzellen	13
2.3.2.5.	Proliferation der Endothelzellen	14
2.3.2.6.	Schlingenbildung	14
2.3.2.7.	Lumenbildung	14
2.3.2.8.	Veränderungen im periendothelialen Bereich	15
2.3.2.9.	Blutfluß und Differenzierung	16
2.3.2.10.	Regression von Gefäßen	17
2.3.2.11.	Phasen der Angiogenese im Kapillarspross	18
2.4.	Methoden der Angiogenese-Forschung	18
2.4.1.	In vivo-Modelle	18
2.4.2.	In vitro-Modelle	22

2.4.2.1.	Explantat-Kulturen	22
2.4.2.2.	Zellkulturen	22
2.5.	Angiogenese in vitro	24
2.6.	Regulierung der Angiogenese	25
2.6.1.	“Vascular Endothelial Growth Factor“-Familie	26
2.6.1.1.	Geschichte	26
2.6.1.2.	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	27
2.6.1.3.	Weitere Mitglieder der VEGF-Familie	28
2.6.1.3.1.	Placenta Growth Factor (PlGF)	28
2.6.1.3.2.	VEGF-B	28
2.6.1.3.3.	VEGF-C	29
2.6.1.3.4.	VEGF-D	30
2.6.1.3.5.	VEGF-E	30
2.6.1.4.	Rezeptoren des VEGF	30
2.6.1.4.1.	VEGFR-1	31
2.6.1.4.2.	VEGFR-2	31
2.6.1.4.3.	VEGFR-3	32
2.6.1.4.4.	Expression der Rezeptoren	32
2.6.1.4.5.	Bindung von VEGF	33
2.6.1.4.6.	Co-Rezeptoren: Neuropilin-1 und -2	33
2.6.1.5.	Funktionen und Wirkungen des VEGF	34
2.6.1.5.1.	VEGF in der embryonalen Entwicklung	34
2.6.1.5.2.	Physiologische VEGF-Expression beim Adulten	35
2.6.1.5.2.1.	VEGF bei der Modellierung und Stabilisierung neugebildeter GefäÙe	35
2.6.1.5.2.2.	VEGF in fenestriertem Endothel	36
2.6.1.5.2.3.	VEGF in Uterus und Plazenta	36
2.6.1.5.2.4.	VEGF im Ovar	37
2.6.1.5.3.	VEGF-Expression im Rahmen pathologischer Vorgänge	38
2.6.1.6.	Regulierung des VEGF und der VEGF-Rezeptoren	39
2.6.1.6.1.	Regulierung durch Hypoxie	39
2.6.1.6.2.	Regulierung durch Heparin und Heparansulfat-Proteoglykane	40
2.6.1.6.3.	Regulierung durch Zytokine und Genprodukte	41
2.6.2.	Weitere proangiogene Faktoren	41
2.6.2.1.	Angiopoietine	41
2.6.2.2.	Fibroblast Growth Factor	42
2.6.2.3.	Platelet Derived Growth Factor	43
2.6.2.4.	Scatter Factor / Hepatocyte Growth Factor	44

2.6.2.5.	Insulin-like Growth Factor	44
2.6.2.6.	Transforming Growth Factor- α und Epidermal Growth Factor	45
2.6.2.7.	Angiotropin und Angiogenin	45
2.6.2.8.	Vasoaktive Faktoren	45
2.6.3.	Bifunktionale Faktoren	46
2.6.3.1.	Transforming Growth Factor- β	46
2.6.3.2.	Tumor Necrosis Factor- α / Cachectin	47
2.6.4.	Antiangiogene Faktoren	48
2.6.4.1.	Thrombospondin	48
2.6.4.2.	Angiostatin und Endostatin	48
2.6.4.3.	Cartilage-Derived Inhibitor	49
2.7.	Wachstumshormon	49
2.7.1.	Geschichte	49
2.7.2.	Funktion und Regulierung des Wachstumshormons	49
2.7.3.	Wachstumshormon-Rezeptor	51
2.7.4.	Wachstumshormon-Bindungsproteine und Insulin-like Growth Factor	51
2.7.5.	Wirkung des Wachstumshormon auf die weiblichen Reproduktionsorgane	52
2.7.6.	Wachstumshormon und Angiogenese	53
2.8.	Molekularbiologische Methoden: RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion	56
2.8.1.	Genexpression	56
2.8.2.	RNA-Isolierung	57
2.8.3.	Reverse Transkription	57
2.8.4.	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	58
2.8.5.	Nachweis des PCR-Produktes	58
2.9.	Ovar des Rindes	58
2.9.1.	Anatomie	58
2.9.1.1.	Makroskopische Anatomie	58
2.9.1.2.	Mikroskopische Anatomie	59
2.9.2.	Ovarieller Zyklus des Rindes	59
2.9.2.1.	Follikulogenese	60
2.9.2.1.1.	Primordialfollikel	60
2.9.2.1.2.	Primärfollikel	60
2.9.2.1.3.	Sekundärfollikel	61
2.9.2.1.4.	Tertiärfollikel	61
2.9.2.1.5.	Graaf-Follikel	62

2.9.2.2.	Ovulation	63
2.9.2.3.	Corpus luteum	64
2.9.2.3.1.	Corpus haemorrhagicum	64
2.9.2.3.2.	Corpus luteum in Anbildung	64
2.9.2.3.3.	Corpus luteum in Blüte	65
2.9.2.3.4.	Corpus luteum in Rückbildung	66
2.9.2.3.5.	Corpus albicans	67
2.9.3.	Das Corpus luteum als Modell der Angiogenese	67

3.	Material und Methoden	68
-----------	------------------------------	-----------

3.1.	Verwendete Zellen	68
3.2.	Identifizierung der Endothelzellen	69
3.2.1.	In vitro-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein	70
3.2.2.	Lokalisation des von Willebrand-Faktors	70
3.2.3.	Markierung mit dem Lektin <i>Bandeiraea simplicifolia</i> Agglutinin I	71
3.3.	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	71
3.3.1.	Lösungen für die Elektronenmikroskopie	72
3.4.	Zellkultur	73
3.4.1.	Kulturbedingungen	73
3.4.2.	Kulturschalen	73
3.4.3.	Kulturmedien	73
3.4.3.1.	Zusammensetzung des Nährmediums DMEM ⁺	74
3.4.3.2.	Zusammensetzung des Selektivmediums	74
3.4.3.3.	Wachstumsfaktoren für das Selektivmedium	74
3.4.4.	Untersuchung der Morphologie der Endothelzellen	75
3.4.5.	Subkultivierung	75
3.4.6.	Kryokonservierung	75
3.4.7.	Zellzählung der in vitro kultivierten Zellen	76
3.5.	Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von Laminin	76
3.5.1.	Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen	77
3.6.	Molekularbiologische Untersuchungen	77
3.6.1.	Zellzählung	77
3.6.2.	Vermeidung von Kontaminationen durch Ribonukleasen und DNA	77
3.6.3.	Isolierung der Gesamt-RNA	78
3.6.4.	Bestimmung der RNA-Menge	79
3.6.5.	Reverse Transkription	79
3.6.6.	PCR	80

3.6.7.	Auswertung der PCR	82
3.6.7.1.	Lösungen für die Auswertung der PCR	83

4.	Ergebnisse	84
4.1.	Lichtmikroskopische Untersuchung der Endothelzellen in vitro	84
4.1.1.	Identifizierung der Endothelzellen	84
4.1.2.	Morphologie und Wachstum der Endothelzellen	86
4.1.3.	Angiogenese in vitro	97
4.1.3.1.	Formveränderung der Endothelzellen	99
4.1.3.2.	Aneinanderreihung der Endothelzellen und Ringbildung	100
4.1.3.3.	Vernetzung der Endothelzellen	103
4.1.3.4.	Bildung solider Zellstränge	112
4.1.4.	Veränderungen in angiogenetischen Langzeitkulturen	118
4.1.4.1.	Rückbildung der angiogenetischen Strukturen	118
4.1.4.2.	Ausbildung breitflächiger Netze durch die Endothelzellen	119
4.1.5.	Rückbildung der angiogenetischen Strukturen durch Entzug des Selektivmediums	120
4.2.	Immunhistochemische Untersuchung der Endothelzellen	121
4.2.1.	Markierung von präangiogenen Endothelzellen mit anti-Laminin	121
4.2.2.	Markierung von Endothelzellen verschiedener Stadien der Angiogenese mit anti-Laminin	122
4.2.2.1.	Präangiogene Endothelzellen mit Ausläufern	122
4.2.2.2.	Angiogene Endothelzellen	123
4.2.3.	Negativkontrollen	125
4.3.	Elektronenmikroskopie	126
4.3.1.	Endothelzellen in Suspension	126
4.3.2.	Endothelzellen während der in vitro-Angiogenese	128
4.4.	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	146
4.4.1.	Expression des VEGF	148
4.4.2.	Expression des VEGFR-1	150
4.4.3.	Expression des VEGFR-2	151
4.4.4.	Expression des Wachstumshormonrezeptors	152
5.	Diskussion	154
5.1.	Morphologie und Angiogenese in vitro kultivierter Endothelzellen	154
5.1.1.	Untersuchungen an präangiogenen Endothelzellen	154
5.1.1.1.	Lichtmikroskopische Untersuchung der präangiogenen Endothelzellen	154
5.1.1.2.	Ultrastruktur präangiogener Endothelzellen	158

5.1.2.	Zellkontakte	158
5.1.3.	Vergleich zwischen elektronenmikroskopischem Auftreten von fibrillärem Material und immunhistochemischem Nachweis von Laminin	159
5.1.4.	Untersuchungen an Endothelzellen während der in vitro-Angiogenese	160
5.1.4.1.	Migration der Endothelzellen	162
5.1.4.2.	Ringbildung und Vernetzung	163
5.1.4.3.	Ausbildung von Zellsprossen	165
5.1.4.4.	Ausbildung solider Stränge	166
5.1.4.5.	Differenzierung der Endothelzellen	167
5.1.4.5.1.	Ausbildung basalmembranähnlicher Strukturen und Polarisierung der Zellseiten	167
5.1.4.5.2.	Lumenbildung	169
5.1.4.6.	Endothelzellen ohne in vitro-Angiogenese	171
5.1.5.	Regression der endothelialen Strukturen	171
5.1.5.1.	Regression endothelialer Strukturen in Langzeitkulturen	171
5.1.5.2.	Regression endothelialer Strukturen durch Entzug des Selektivmediums	172
5.2.	PCR	173
5.2.1.	Zellzählung und RNA-Isolierung	173
5.2.2.	Expression des VEGF	174
5.2.3.	Expression der VEGF-Rezeptoren	176
5.2.4.	Expression des Wachstumshormon-Rezeptors	177
5.3.	Beurteilung von Angiogenese-Modellen	179
5.3.1.	In vivo-Modelle	179
5.3.2.	In vitro-Modelle	181
<hr/>		
6.	Zusammenfassung	184
<hr/>		
7.	Summary	186
<hr/>		
8.	Abkürzungen	188
<hr/>		
9.	Literaturverzeichnis	190
<hr/>		

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. J. Plendl möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Ihre intensive Betreuung während der gesamten Dauer der Arbeit sowie ihre ständige Aufmunterung haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, nicht nur ein anderes Institut sondern auch Berlin näher kennenzulernen.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz für die mir gewährte Unterstützung, seine wertvollen fachlichen Ratschläge und insbesondere für die Zeit, die er mir zur Verfügung gestellt hat, um diese Arbeit zu Ende zu führen.

Für die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Anatomie in Berlin möchte ich vor allem Herrn Prof. Dr. K.-D. Budras, aber auch allen anderen Mitarbeitern danken.

Besonders herzlich danke ich auch Frau G. Boie, Frau Dr. C. Dalke und Frau Dr. G. Krefft für ihre Unterstützung bei der PCR und Frau M. Sachtleben für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. H. Hünigen, Herrn Dr. C. Mülling, Herrn Dr. M. Zoelffel und Herrn M. Paproth bedanken, die ein nicht unerhebliches Maß an Arbeit und Zeit in die Installation des Dokumentationssystem der Zellkultur investiert haben.

Frau G. Rußmeier und Frau K. Schütz danke ich für ihre Hilfe bei der Anfertigung histologischer Schnitte und bei der Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen.

Bei Frau S. Buda und Herrn S. Baidl möchte ich mich für die Hilfe bei der Bewältigung diverser Computerprobleme - ob nun PC oder Mac - bedanken.

Besonders herzlich danke ich auch Frau K. Meng, Frau M. Bahramsoltani, Frau J. Lienau und Frau U. Nebel für die gute Zusammenarbeit in der Zellkultur. Ein besonderer Dank geht an Herrn F. Nützel - vor allem für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Für hilfreiche Tipps – nicht nur diese Arbeit betreffend – möchte ich mich bei Frau Dr. S. Kölle und Herrn Dr. F. Feder bedanken.

Allen genannten und nicht genannten Mitarbeitern der Institute in Berlin und München danke ich nochmals ausdrücklich für das freundliche Arbeitsklima und die angenehme Zusammenarbeit.

Außerdem bedanke ich mich auch bei der Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (bgvv), die diese Arbeit mit finanziellen Mitteln unterstützt hat.

Besonders danken möchte ich all meinen Freunden, die mir während der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite standen. Ein herzlicher Dank geht an Herrn R. Elbing, der sich insbesondere beim Transport von Zellkulturen mehrfach verdient gemacht hat.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern, meinen Schwestern und meinem Schwager für ihren Beistand und ihre tatkräftige Hilfe bedanken und auch dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten.

Lebenslauf

Name	Stefanie Schuster
Geburtsdatum, -ort	03.07.1967, Passau
Wohnsitz	Waldeckstr. 7, 81543 München
Eltern	Rosemarie Schuster, geb. Blechschmidt, Justizangestellte Friedrich Schuster, Bundesbahnhauptsekretär
Schulbildung	1973-1977 Grundschule Kaufering 1977-1986 Dominikus-Zimmermann-Gymnasium Landsberg
Abitur	27. Juni 1986
Berufliche Tätigkeit	1986-1988 Berufsausbildung zur Bankkauffrau 1988-1993 Beschäftigung als Bankkauffrau
Studium der Tiermedizin	WS 93/94 - WS 89/99 Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen	4. Februar 1999
Approbation	25. März 1999
Berufliche Tätigkeit	Mai 1999 bis Januar 2000 Assistentztierärztin (Großtierpraxis)
Anfertigung der Dissertation	Januar 2000 bis Februar 2002 Institut für Veterinär-Anatomie, FU Berlin
Wissenschaftliche Angestellte	seit Mai 2001 Institut für Tieranatomie II, LMU München

Selbständigkeitserklärung

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

München, 26.02.2002

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stefanie Schmitt'. The signature is written in a cursive style with a long horizontal flourish at the end.