

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.