

## **5. Diskussion**

Die Hauptaufgabe dieser Studie war die Darstellung der einzelnen Stadien der in vitro-Angiogenese. Dafür wurden Endothelzellkulturen aus dem bovinen Corpus luteum vor und während der Angiogenese licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

In einem weiteren Schritt sollte durch den immunhistochemischen Nachweis von Laminin, einer typischen Komponente der Basalmembran, gezeigt werden, dass die kultivierten Zellen während der in vitro-Angiogenese eine basalmembran-ähnliche Struktur ausbilden.

Für die molekularbiologische Charakterisierung wurde die Expression verschiedener Proteine untersucht. VEGF spielt eine wichtige Rolle im Verlauf der Angiogenese und wird von unterschiedlichen Zellen produziert. Mittels PCR sollte geklärt werden, ob die hier verwendeten Endothelzellen diesen Faktor exprimieren. Gleichzeitig sollte die Expression der beiden Hauptrezeptoren des VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2, untersucht werden. Einige Studien weisen darauf hin, dass das Wachstumshormon eine Rolle in der Angiogenese spielen könnte, daher sollte die Expression seines Rezeptors ebenfalls untersucht werden.

### **5.1. Morphologie und Angiogenese in vitro kultivierter Endothelzellen**

#### **5.1.1. Untersuchungen an präangiogenen Endothelzellen**

##### **5.1.1.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der präangiogenen Endothelzellen**

Bereits 24 Stunden nach Aussaat war der überwiegende Teil der Zellen adhärent und begann sich umzuformen. Die anfänglich runden Zellen nahmen eine längliche Form an und bildeten Ausläufer aus, die sich in Richtung anderer Zellen streckten. In Kulturen mit geringer Zelldichte (unter  $1 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ) traten solche gerichteten Zellausläufer nicht auf.

Die Ausbildung von Zellausläufern kann als Kontaktaufnahme zwischen den Endothelzellen gedeutet werden. Möglicherweise sind hier lösliche Botenstoffe beteiligt, welche die Kontakte zwischen den Zellen kontrollieren. Dafür kommen

beispielsweise FGF-1 und FGF-2, PDGF, IGF-I und TGF- $\beta$  in Frage, also Faktoren, die das Wachstumsverhalten und die Morphologie von Endothelzellen beeinflussen und auch von Endothelzellen selbst gebildet werden. Die Rezeptoren für einige dieser Wachstumsfaktoren, unter anderem für FGF-1 und FGF-2, PDGF und IGF-I werden ebenfalls von Endothelzellen *in vitro* exprimiert (Klagsbrun und D'Amore, 1991; Basilico und Moscatelli, 1992; Moses et al., 1995; Nicosia und Villaschi, 1999). Interessanterweise wurden die Kontakte nicht von allen Zellen und auch nicht zwischen beliebigen Zellen ausgebildet. Häufig war zu beobachten, dass sich Zellausläufer überkreuzten und sich in Richtung weiter entfernter Zellen erstreckten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beteiligten Botenstoffe nicht gleichermaßen auf alle Endothelzellen wirken, sondern dass eine selektive Kommunikation zwischen den Endothelzellen stattfindet, die möglicherweise durch Expression unterschiedlicher Rezeptoren gesteuert wird.

In Kulturen mit geringer Dichte bildeten sich keine derartigen Zellausläufer. Wahrscheinlich verhindert bei diesen Kulturen eine zu große Entfernung zwischen den Zellen, dass die Botenstoffe die Zellen erreichen.

Fehlender Kontakt mit anderen Endothelzellen beeinflusst offensichtlich auch das Wachstumsverhalten der Zellen. In Kulturen mit geringer Dichte wurden zwar Mitosen beobachtet, es kam allerdings auch nach mehreren Wochen nicht zur Konfluenz.

In Endothelzellkulturen, die in ausreichender Dichte (mindestens  $1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ ) ausgesät worden waren, traten vermehrt Zellteilungen auf und es bildete sich innerhalb von ein bis zwei Wochen ein konfluentes Monolayer, in dem die Zellen im sogenannten Kopfsteinpflastermuster vorlagen.

Diese Anordnung tritt häufig bei Endothelzellen auf, kann jedoch auch bei einigen anderen Zellarten beobachtet werden (Jaffe et al., 1973; Folkman et al., 1979; Plendl, 1997).

In der vorliegenden Studie bildeten sowohl die Endothelzellen des Corpus luteum in Blüte wie auch die des Corpus luteum in Rückbildung im präangiogenetischen Stadium ein konfluentes, lückenloses Monolayer.

Fuchs-Schönleber (1999) beobachtete dies auch bei Endothelzellen aus dem Gelbkörper in Anbildung. Bei Endothelzellen, die derselben Isolierung entstammten wie die hier untersuchten Zellen, stellte sie jedoch das Auftreten unvollständiger Konfluenz mit zellfreien Bereichen fest. Die Kultivierungsbedingungen stimmten in beiden Studien überein, so dass sie wahrscheinlich nicht die Ursache für die beschriebenen Unterschiede sind. Möglicherweise werden die Endothelzellen durch die in vitro-Kultivierung und das Passagieren beeinflusst und verändern so ihre Eigenschaften. Ein Verlust von antigenen und ultrastrukturellen Charakteristika wird insbesondere bei Zellisolaten aus Organen adulter Individuen beobachtet (Plendl, 1997).

Eine Vermehrung der Zellen war sowohl in Kulturen, die nur das Nährmedium erhalten hatten, wie auch in solchen, die mit dem Selektivmedium versorgt worden waren, zu beobachten. Ohne Selektivmedium zeigten die Zellen eine geringere Proliferation. Es wurden weniger Zellen pro Flächeneinheit gezählt, die einzelnen Zellen wiesen jedoch einen größeren Umfang auf.

Die höhere Proliferation der Selektivmedium-versorgten Zellen kann auf die beiden darin enthaltenen Komponenten, ECGS und S 180-konditioniertes Medium zurückgeführt werden. ECGS ist ein Extrakt aus bovinem Nervengewebe. Als Inhaltsstoffe werden vom Hersteller Growth Factor  $\alpha$  und  $\beta$  sowie Fibroblast Growth Factor genannt, wobei genauere Informationen zu diesen Faktoren von der Firma nicht zu erhalten waren. Bei dem aufgeführten Fibroblast Growth Factor scheint es sich jedoch nicht um FGF-2, sondern vor allem um FGF-1 zu handeln (Plendl, 1997; Papapetropoulos et al., 1999). FGF-1 wirkt, wenn auch schwächer als FGF-2, mitogen auf mikro- wie auch makrovaskuläre Endothelzellen (Klagsbrun und D'Amore, 1991). S 180-konditionierte Medium wird aus der Zellkultur eines murinen Fibrosarkoms gewonnen. Rosenthal et al. (1990) zeigten in diesem Medium die Bindung von anti-VEGF und wiesen in den murinen Zellen VEGF-mRNA nach. VEGF stellt den wichtigsten proangiogenen Wachstumsfaktor dar und bewirkt neben einer Proliferation der Zellen auch die Migration und Umformung in tubuläre Strukturen (Leung et al., 1989; Connolly et al., 1989; Pepper et al., 1992).

Bei den in dieser Studie untersuchten Kulturen handelte es sich um Endothelzellen in den Passagen 7 bis 11. Plendl (1997) stellte in bovinen Endothelzellkulturen deutliche Alterungserscheinungen, wie Vergrößerung, Ausbildung von Stressfasern, verstärkte Granulierung und Abkugelung ab Passage 7 bis 10 fest. Die geschilderten Erscheinungen wurden in den verwendeten Zellkulturen nicht beobachtet.

In vivo stellen Endothelzellen, mit Ausnahme der Endothelzellen des weiblichen Reproduktionstraktes, eine stabile Population mit einer niedrigen Mitoserate dar. Für Endothelzellen aus verschiedenen Geweben werden Turnover-Raten von  $1 \times 10^2$  bis  $1 \times 10^4$  Tagen angegeben (Denekamp, 1984), so dass die Lebenserwartung von Endothelzellen in vivo relativ hoch ist. Trotz erfolgreicher Kultivierung von Endothelzellen ist jedoch anzunehmen, dass die in vitro-Bedingungen bisher nicht vollkommen den in vivo-Verhältnissen entsprechen. Wahrscheinlich ist daher die in vitro-Kultivierung mit einer Senkung der Lebenserwartung der Endothelzellen verbunden. Eine Abnahme der Wachstumsrate und gleichzeitige Zunahme der Alterung wurde bei regelmäßiger Passagierung von Endothelzellen aus dem Nabelstrang festgestellt (Kalashnik et al., 2000). Endothelzellen aus der bovinen Aorta zeigen bei Langzeitkultivierung abnehmende Migration und Proliferation (Augustin et al., 1993). Ob die Alterung von Endothelzellen von der Anzahl der Passagen oder der Gesamtkultivierungsdauer abhängig ist und ob beide Aspekte zusammenwirken, könnte durch vergleichende Untersuchungen festgestellt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Endothelzellen in den niedrigeren Passagen nur wenige Wochen kultiviert und somit die höheren Passagen nach geringer Gesamt-Kultivierungsdauer erreicht. Insgesamt waren die Endothelzellen durch diese beschleunigte Passagierung nur relativ kurze Zeit den in vitro-Bedingungen ausgesetzt. Möglicherweise wurden die von Plendl (1997) untersuchten Endothelzellen in größeren Zeitabständen passagiert, so dass sie bei Erreichen der höheren Passagen 7-10 bereits länger in Kultur waren und daher Alterungserscheinungen zeigten.

### **5.1.1.2. Ultrastruktur präangiogener Endothelzellen**

Endothelzellen vor dem Beginn der Angiogenese wiesen einen relativ großen Kern mit einem deutlichen Nukleolus auf. Im Kern war wenig Heterochromatin zu sehen, was auf sehr aktive Zellen hinweist (Sinowatz, 2000). Die Zellorganellen waren oftmals am Rand der Zelle gelagert, so dass um den Kern ein organellenarmer oder sogar organellenfreier Raum entstand. Mitochondrien waren zahlreich vorhanden. Es handelte sich vor allem um Mitochondrien vom Crista-Typ, Mitochondrien vom Tubulus-Typ wurden dagegen selten gesehen. Diese treten vermehrt in Zellen auf, die Steroidhormone produzieren. Mitochondrien kommen vermehrt in jenen Zytoplasmaarealen vor, in denen der Energiebedarf besonders groß ist (Sinowatz, 2000). Dies könnte für die vorliegenden Endothelzellen so interpretiert werden, dass energieverbrauchende Vorgänge vor allem in der Peripherie der Zelle stattfinden. Raues Endoplasmatisches Retikulum war ebenfalls zu sehen. Diese Form des Endoplasmatischen Retikulums ist besonders gut in Zellen entwickelt, die auf den Export von Proteinen spezialisiert sind (Sinowatz, 2000). Weibel-Palade-Körper, die bei humanen Endothelzellen als Markerorganellen gelten und beispielsweise auch in porzinen Endothelzellen auftreten, wurden in Übereinstimmung mit vorhergehenden Untersuchungen in den Endothelzellen aus dem bovinen Ovar nicht gefunden (Folkman et al., 1979; Plendl, 1997; Fuchschönleber, 1999).

### **5.1.2. Zellkontakte**

Die ultrastrukturelle Untersuchung der interzellulären Verbindungen zeigte das Vorhandensein von „gap junctions“ und „tight junctions“. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit denen anderer Autoren (Dejana, 1996; Plendl, 1997). Im Bereich von „tight junctions“ verschmelzen die benachbarten Zellmembranen miteinander, so dass der Interzellularspalt geschlossen ist und auch kleine Moleküle nicht mehr übertreten können. „Gap junctions“ ermöglichen dagegen den Austausch kleiner Moleküle und Ionen (Sinowatz, 2000).

Vereinzelt wurden auch Desmosomen gefunden. Desmosomen dienen als Haftverbindungen und treten besonders zahlreich in stark mechanisch beanspruchten

Gewebe auf (Sinowatz, 2000). Sie sollen jedoch im Verband von Endothelzellen nicht ausgebildet werden (Dejana, 1996). Lindenbaum und Mitarbeiter (1991) zeigten jedoch das Vorkommen von Desmosomen in mikrovaskulären Endothelzellen aus der humanen Plazenta. Ricken et al. (1996) fanden Desmosomen bei der in vitro-Kultivierung von Zellen, die aus der bovinen Aorta und aus mikrovaskulären Gefäßen des Corpus luteum des Rindes isoliert worden waren. Die Zellen wiesen typische Merkmale von Endothelzellen auf, wie beispielsweise die Expression des vWF-Antigens und die Aufnahme von acetyliertem LDL. Andererseits traten auch Zytokeratin-Filamente auf, die üblicherweise in Epithelzellen mit Desmosomen assoziiert sind. In diesen Endothelzell-ähnlichen Zellen waren Desmosomen, die allerdings den im Interzellularspalt gelegenen Mittelstreifen nicht besaßen, elektronenmikroskopisch zu sehen. Mittels immunhistochemischer Methoden konnten zusätzlich die für Desmosomen typischen Proteine Desmoplakin und Desmoglein nachgewiesen werden. Solche Zytokeratin-positiven Zellen treten im bovinen Corpus luteum nur in geringer Zahl auf und bilden nach Meinung von Ricken und Mitarbeitern (1996) möglicherweise innerhalb der Endothelzellen eine spezielle Gruppe, die besondere Funktionen erfüllen könnte. Bei den in dieser Untersuchung beobachteten Endothelzellen, die Desmosomen ausbildeten, könnte es sich daher um derartige „Endothelzell-ähnliche“ Zellen handeln.

### **5.1.3. Vergleich zwischen elektronenmikroskopischem Auftreten von fibrillärem Material und immunhistochemischem Nachweis von Laminin**

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass zwischen den Zellen Spalträume entstanden, die teilweise mit einem fibrillären Material gefüllt waren. Durch Markierung mit anti-Laminin konnten außerdem im Bereich zwischen den Zellen kurze, faserartige Strukturen angefärbt werden.

Laminin ist ein wichtiger Bestandteil von Basalmembranen (Foidart et al., 1980; Grant und Kleinman, 1997). In vivo wird im Verlauf der Blutgefäßbildung eine neue Basalmembran ausgebildet (Ausprunk und Folkman, 1977), die in ihrer Zusammensetzung variieren kann und deren Komponenten von Endothelzellen und Perizyten sezerniert werden (Hirschi und D'Amore, 1996; Grant und Kleinman, 1997; Amselgruber et al., 1999). Dies stellt einen wichtigen Schritt im Verlauf der

Angiogenese dar (Folkman, 1984) und hat wahrscheinlich einen stabilisierenden und schützenden Effekt auf die neugebildeten Blutgefäße (Hirschi und D'Amore, 1996; Benjamin et al., 1998; Goede et al., 1998). Die Produktion von Laminin als Bestandteil der Basalmembran durch Endothelzellen konnte auch *in vitro* gezeigt werden (Kramer et al., 1984; Sorokin et al., 1994). Aufgrund der übereinstimmenden Lokalisation der elektronenmikroskopisch dargestellten fibrillären Struktur und des immunhistochemisch mit anti-Laminin markierten Materials kann angenommen werden, dass die hier untersuchten Endothelzellen ein basalmembranähnliches Material sezernieren.

Die Bindung der Antikörper gegen Laminin konnte bereits beobachtet werden, wenn die Zellen sich noch im präangiogenen Stadium befanden. Lichtmikroskopisch wiesen die Zellen zu dieser Zeit das sogenannte Kopfsteinpflastermuster auf, wobei die Zellen eine polygonale Form besaßen und dicht gedrängt aneinander lagen.

Da sich die Basalmembran *in vivo* auf der basalen Seite der Endothelzellen befindet (Hees, 2000), könnte die Deposition von basalmembranähnlichem Material darauf hinweisen, dass die *in vitro* kultivierten Zellen begonnen hatten, eine Polarität zu entwickeln, obwohl lichtmikroskopisch noch keine Anzeichen für Differenzierung der Zellseiten erkennbar waren.

#### **5.1.4. Untersuchungen an Endothelzellen während der *in vitro*-Angiogenese**

Wurden die Endothelzellen nur mit Nährmedium ohne entsprechende Zusätze versorgt, zeigten sie auch nach mehreren Wochen in Kultur keine angiogenetischen Aktivitäten. Die Angiogenese *in vitro* konnte in diesem Modell nur durch Verabreichung des Selektivmediums, das die bereits unter Punkt 5.1.1.1. erwähnten Zusätze ECGS und S 180-konditioniertes Medium enthält, erreicht werden. Die bereits erwähnten Inhaltsstoffe dieser Zusätze, FGF-1 und VEGF (Rosenthal et al. 1990; Papapetropoulos et al., 1999), wirken nicht nur mitogen, sondern fördern auch die Migration der Zellen und veranlassen Endothelzellen, kapillarähnliche Strukturen auszubilden (Connolly et al., 1989; Leung et al., 1989; Klagsbrun und D'Amore, 1991; Pepper et al., 1992).

Endothelzellen, die wenige Tage nach Erreichen der Konfluenz gesplittet wurden, begannen zwei Wochen später mit der Angiogenese. Eine Verzögerung des Beginns oder des Ablaufs der Angiogenese war bei regelmäßigem Splitten der Kulturen auch in den höheren Passagen und damit älteren Endothelzellen nicht zu sehen. Einige Kulturen aus dem Corpus luteum in Blüte und dem Corpus luteum in Rückbildung wurden erst nach über fünf Monaten ununterbrochener Kultivierung, in der sie deutliche Zeichen der Angiogenese gezeigt hatten, gesplittet. Teilweise war schon eine Rückbildung der angiogenetischen Strukturen zu beobachten. Nach dem Splitten bildeten diese Zellen zwar wieder ein Kopfsteinpflastermuster aus, es dauerte dann aber 7 bis 10 Wochen bis es wieder zur in vitro-Angiogenese kam. Wurden hingegen Kulturen gesplittet, die gerade erst mit der Bildung angiogenetischer Strukturen begonnen hatten, konnte nach dem Splitten ein beschleunigtes Einsetzen der in vitro-Angiogenese beobachtet werden.

Eine Möglichkeit zur Erklärung des unterschiedlichen Beginns der Angiogenese in den Kulturen ist, dass eine Abhängigkeit davon besteht, in welchem Stadium der Angiogenese sich die Zellen zum Zeitpunkt des Splittens befunden hatten. Der Ablauf der Angiogenese in vivo wie auch in vitro lässt sich in mehrere, aufeinanderfolgende Phasen aufteilen (Folkman, 1984; Pepper et al., 1996). Vielleicht bedingt dieser vorgegebene Ablauf, dass die Endothelzellen nach dem Splitten die Angiogenese in der Phase fortsetzen, in der sie sich vor der Teilung befunden hatten. Die Mehrzahl der in dieser Studie untersuchten Zellkulturen wurde bei Erreichen der Konfluenz, also präangiogen, geteilt und trat daher nach dem Splitten wieder in dieses Stadium ein, bevor eine Bildung angiogenetischer Strukturen zu beobachten war. Kulturen, die bereits mit der in vitro-Angiogenese begonnen hatten, waren möglicherweise so aktiviert, dass die präangiogene Phase abgekürzt oder eventuell sogar übersprungen wurde. Dadurch würde das beschleunigte Auftreten endothelialer Strukturen erklärt. In über 5 Monate kultivierten Endothelzellen war zum Zeitpunkt des Splittens bereits die Rückbildung der endothelialen Strukturen zu beobachten. Möglicherweise musste in solchen Kulturen, bevor die Zellen erneut mit der in vitro-Angiogenese beginnen konnten, erst diese Regressionsphase beendet werden und eventuell noch ein Ruhestadium zwischengeschaltet werden. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass bei

solchen Endothelzellen erst mehrere Wochen nach dem Splitten wieder angiogenetische Vorgänge auftraten.

Die Erklärungen der geschilderten Vorgänge implizieren, dass zumindest für die in vitro-Angiogenese ein Grundprogramm existiert, das nicht nur einen bestimmten schrittweisen, sondern auch einen zeitlichen Ablauf vorgibt. Ein zeitlich genau geregelter Auf- und Abbau von Gefäßen ist in vivo vor allem bei der physiologischen Angiogenese im Corpus luteum zu beobachten (Findlay, 1986; Redmer und Reynolds, 1996), wobei die in dieser Studie verwendeten Endothelzellen aus diesem Gewebe stammen. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zwischen der Regelung der Angiogenese in vivo und in vitro.

#### **5.1.4.1. Migration der Endothelzellen**

Initiale Veränderungen der Endothelzellen, die den Beginn der Angiogenese markierten, waren die Ausbildung von Zellfortsätzen und die Aneinanderreihung von Zellen, die damit eine längliche Form annahmen.

Die Ausbildung von Fortsätzen kann auch in vivo beobachtet werden und stellt den ersten Schritt der Migration dar. Die Fortsätze erstrecken sich dabei durch die Basalmembran hindurch in die umgebende extrazelluläre Matrix erstrecken. Im weiteren Verlauf wandert die gesamte Zelle aus der Gefäßwand aus (Ausprunk und Folkman, 1977; Paku und Paweletz, 1991; Amselgruber et al., 1999). Die Aneinanderreihung von Zellen und die Ausbildung von Zellfortsätzen in vitro könnte als Äquivalent dieser Migration betrachtet werden. In vivo erfolgt die Migration der Endothelzellen in Richtung eines angiogenen Stimulus, den beispielsweise bei der Tumor-induzierten Angiogenese in der Cornea die Tumorzellen darstellen (Ausprunk und Folkman, 1977). Bei implantierten Schwämmen oder Gelen, die proangiogene Substanzen enthalten, kann ebenfalls ein Einwachsen der Gefäße in Richtung des Stimulus beobachtet werden (Fajardo et al., 1988; Nguyen et al., 1994; Vacca et al., 1998). Dieses Prinzip wird auch bei in vitro-Versuchen mit der Boyden-Kammer angewendet, um zu zeigen, ob eine Substanz eine gerichtete Migration von Endothelzellen bewirkt (Tolsma et al., 1993; Iwahana et al., 1996). Grundsätzlich ist anzunehmen, dass die in vitro-Angiogenese durch angiogene

Faktoren, die im Selektivmedium enthalten sind, initiiert wird, da Endothelzellen, die nur das Nährmedium erhalten, keine tubulären Strukturen ausbilden. Für die beiden in Frage kommenden Substanzen, FGF-1 und VEGF werden Rezeptoren auf in vitro kultivierten Endothelzellen gefunden (Pepper et al., 1996; Plendl et al., 1999). Da diese Substanzen im Medium jedoch über die gesamte Kultur verteilt sind, kann eine auf den angiogenen Stimulus gerichtete Migration der Endothelzellen eigentlich nicht stattfinden. Es bleibt daher vorerst ungeklärt, welche Mechanismen bei den in vitro kultivierten Endothelzellen die Ausbildung und dabei vor allem die Richtung der zellulären Fortsätze bestimmen.

#### **5.1.4.2. Ringbildung und Vernetzung**

Lichtmikroskopisch war zu beobachten, dass in allen Kulturen die Endothelzellen erst ring-, dann netzartige Strukturen formten, bis schließlich ein feines, endotheliales Maschenwerk die gesamte Kultur überzog. Die Ausbildung von Zellringen wurde auch durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt. Größere Maschen dieser endothelialen Netze wurden durch die Ausbildung von Sprossen unterteilt.

Auch bei angiogenetischen Vorgängen in vivo, wie beispielsweise bei der Neovaskularisierung des Corpus luteum in Anbildung (Zheng et al., 1993) oder der tumor-induzierten Angiogenese (Ausprunk und Folkman, 1977) bilden die Kapillarsprosse durch Verzweigung und Anastomosierung ein netzartiges oder schlingenförmiges Gefäßsystem aus. Die Anordnung der Kapillaren ermöglicht eine optimale Versorgung des Gewebes, da die Diffusionsstrecken gering bleiben. Die Gefäße können damit ihre eigentliche Aufgabe, nämlich den Stoffaustausch, am besten erfüllen (Hees, 2000).

Wie zuvor erwähnt, wird die in vitro-Angiogenese wahrscheinlich durch angiogene Faktoren im Selektivmedium bewirkt. In vitro könnte daher die Ausbreitung der angiogenetischen Strukturen über die gesamte Fläche der Kulturschalen mit der gleichmäßigen Verteilung des angiogenen Stimulus im Medium zusammenhängen.

Möglicherweise wird die Anordnung der Endothelzellen zueinander wiederum durch Botenstoffe zwischen den Zellen reguliert. Dafür spricht die Beobachtung,

dass größere Maschen oftmals durch neue Sprossen in kleinere unterteilt wurden. Vielleicht kommt es in engen Maschen durch bestimmte Botenstoffe zur Hemmung der Migration der Endothelzellen. In weiten Maschen würden diese Stoffe die Zielzellen vielleicht nicht mehr erreichen, so dass die Hemmung entfällt. Es wäre auch denkbar, dass mit der Entfernung der Zellen voneinander die abnehmende Konzentration dieser Botenstoffe einen negativen Gradienten erzeugt, der damit die Richtung für chemotaktisch migrierende Endothelzellen bestimmt.

Das bereits angesprochene, basalmembranähnliche, fibrilläre Material trat in dieser Phase der Ringbildung und Vernetzung deutlich in Erscheinung und wies sowohl im elektronenmikroskopischen Bild wie auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen eine typische Anordnung auf. Es füllte Spalträume, die sich zwischen benachbarten Zellen gebildet hatten, konnte allerdings auch Zellen verbinden, zwischen denen eine größere Entfernung lag. Dabei wurde es von langen, dünnen Zellausläufern umgeben. Zwischen nah beieinander liegenden Zellen wirkte das Material ungeordnet. Wenn es sich dagegen über größere Strecken hinzog, wies es meist eine länglich und parallel verlaufende Strukturierung auf. In zunehmendem Maße wurde das Material auch auf der Außenseite der entstandenen Zellringe gefunden, so dass es diese umrandete. Auf der Innenseite der Ringstrukturen trat das basalmembranähnliche Material nicht auf.

In vivo findet die Ausbildung einer Basalmembran eher in den reifen Bereichen des neu gebildeten Gefäßes statt. Die Spitze des Kapillarsprosses ist oft noch unvollständig oder gar nicht bedeckt, während der Ursprung schon von einer vollständigen Basalmembran eingeschlossen ist (Ausprunk und Folkman 1977; Paku und Paweletz, 1991; Amselgruber et al., 1999). Die Deposition einer Basalmembran hemmt wahrscheinlich das Wachstum des Sprosses. Gleichzeitig übt sie eine Schutzwirkung auf die neugebildeten Gefäße aus und erschwert die Regression der neugebildeten Strukturen (Hirschi und D'Amore, 1996; Benjamin et al., 1998; Goede et al., 1998).

In vitro scheint das basalmembranähnliche Material ebenfalls die Anordnung und Migration der Endothelzellen und damit das Wachstum der endothelialen Strukturen zu beeinflussen. Es tritt bereits vor Beginn der in vitro-Angiogenese,

wenn die Zellen noch keine ringförmige Anordnung aufweisen, als fibrilläre, netzartig verzweigte Struktur zwischen den Zellen auf. Möglicherweise wird durch die einseitige Ablagerung des basalmembranähnlichen Materials die Umformung der Zellen in die beobachteten Ringstrukturen vorgegeben und eine weitere Migration verhindert. Die Deponierung des Materials nur auf der äußeren Seite der Zellringe zeigt, dass die Zellen in diesem Stadium der *in vitro*-Angiogenese eine eindeutige Polarität mit zwei unterschiedlichen Zellseiten aufweisen.

#### **5.1.4.3. Ausbildung von Zellsprossen**

Im Verlauf der Ausbildung des feinmaschigen endothelialen Netzwerkes konnte beobachtet werden, dass größere Zellringe durch Zellsprosse in kleinere Ringe unterteilt wurden.

Eine Teilung von Blutgefäßen durch Ausbildung von Pfeilern innerhalb von Gefäßen wird *in vivo* in Herz, Lunge und der Chorioallantoismembran beobachtet und als Intussuszeption bezeichnet (van Groningen, 1991; Burri, 1992; Patan et al., 1996; Djonov et al., 2000). Dabei werden von der Gefäßwand ausgehend Falten in das Lumen gebildet, die sich schließlich mit der gegenüberliegenden Seite vereinigen oder frei im Lumen liegende Pfeiler ausbilden können (Patan et al., 1996; Djonov et al., 2000). Im Zentrum befinden sich Endothelzell-ähnliche Zellen, Myofibroblasten und Kollagenfibrillen. Die dem Lumen zugewandte Seite der Pfeiler ist jedoch immer von Endothelzellen bedeckt (Burri et al., 1991; Patan et al., 1996; Djonov et al., 2000).

Die in dieser Studie beschriebenen Zellsprosse wiesen in ihrem Aufbau große Ähnlichkeit mit den bei der Intussuszeption *in vivo* auftretenden Pfeilern auf. Die elektronenmikroskopische Darstellung und die Markierung mit anti-Laminin zeigten, dass sich auch bei den Zellsprossen die Endothelzellen der Außenseite anlagerten, während sich zentral basalmembranähnliches Material befand. *In vivo* wie *in vitro* gewährleistet diese Anordnung der Strukturen in den Pfeilern oder Zellsprossen, dass das Lumen des Gefäßes beziehungsweise die Innenseite der Zellringe auch nach der Teilung vollständig von Endothelzellen ausgekleidet bleibt und die Zellen auf der basalen Seite von einer basalmembranähnlichen Struktur unterlagert sind. Gleichzeitig bleibt damit die Polarität der Endothelzellen erhalten.

Beide Vorgänge dienen der Teilung eines Innenraumes, den in vivo das Gefäßlumen und in vitro das Innere des Zellringes darstellt. Diese Ähnlichkeiten weisen darauf hin, dass es sich bei der in vitro beobachteten Teilung größerer Zellringe in kleinere um einen Vorgang handeln könnte, der der Intussuszeption entspricht.

#### **5.1.4.4. Ausbildung solider Stränge**

In Kulturen, die sich länger als sechs Wochen im Stadium der Angiogenese befunden hatten, kam es zur Bildung längerer, solider Zellstränge, die in ihrem Durchmesser aus mehreren Zellen zu bestehen schienen. Lichtmikroskopisch war in einigen dieser Stränge eine schienenartige Struktur zu erkennen. Zellstränge konnten auch bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet werden. Die Stränge bestanden zumeist aus einer zentralen, länglichen Struktur aus fibrillärem Material, an der entlang sich flache Endothelzellen aufreihen. Ein ähnliches Bild ergab die immunhistochemische Markierung mit dem Antikörper gegen Laminin. Im Zentrum der Zellstränge färbte sich eine faserartige Struktur stark an, während die umgebenden Endothelzellen nur schwach markiert wurden. Auf der Außenseite solcher Stränge wurde das fibrilläre Material nicht gefunden. Mit Auftreten dieser soliden Stränge konnte eine teilweise Abnahme des zuvor gebildeten, feinmaschigen, endothelialen Netzwerkes beobachtet werden, allerdings waren zu keinem Zeitpunkt abgelöste Endothelzellen zu sehen.

Bei Vergleich der Lokalisation der lichtmikroskopisch sichtbaren, schienenartigen Struktur, des elektronenmikroskopisch festgestellten fibrillären Materials und der mit anti-Laminin markierten Substanz ist wiederum eine deutliche Übereinstimmung festzustellen. Die soliden Zellstränge scheinen daher aus einer zentralen basalmembranähnlichen Struktur zu bestehen, der außen flache, langgestreckte Endothelzellen aufsitzen.

Die Entstehung dieser größeren Strukturen und die gleichzeitige Rückbildung der feineren, ringartigen Gebilde könnten einen Umgestaltungsprozess darstellen, wie er auch bei der Angiogenese in vivo beobachtet werden kann. Mit Beginn der Durchblutung kommt es zur Remodellierung des primären Kapillarsystems in ein

reifes Blutgefäßnetz, wobei größere Gefäße wie Arteriolen und Venulen entstehen und nicht mehr benötigte Kapillaren zurückgebildet werden (Augustin et al., 1995; Goede et al., 1998). Bei derartigen Umbauvorgängen kommt es anscheinend nur in geringem Maße zu Apoptose von Endothelzellen. Bei der Rückbildung der Gefäße im bovinen Corpus luteum stellten Modlich et al. (1996) und Fuchs-Schönleber (1999) fest, dass Luteinzellen den größten Teil der apoptotischen Zellen ausmachten, aber relativ wenig apoptotische Endothelzellen auftraten. Auch bei der physiologischen Rückbildung von Gefäßen in der Retina von Ratten sind kaum apoptotische Endothelzellen zu sehen (Hughes und Chang-Ling, 2000). Möglicherweise wird ein Großteil der Endothelzellen, die durch Auflösung der primären angiogenetischen Strukturen freigesetzt werden, für den Aufbau größerer Gefäße verwendet (Goede et al., 1998; Hughes und Chang-Ling, 2000). Abschwimmende Endothelzellen konnten auch in dieser Studie zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Vielleicht werden in vitro ebenfalls Endothelzellen aus dem primären, feinmaschigen Netz abgezogen, um bei der Ummodellierung in größere Zellstränge verwendet zu werden.

#### **5.1.4.5. Differenzierung der Endothelzellen**

##### **5.1.4.5.1. Ausbildung basalmembranähnlicher Strukturen und Polarisierung der Zellseiten**

In der vorliegenden Untersuchung waren zwei unterschiedliche und typische Anordnungsmuster von Endothelzellen und basalmembranähnlichem Material zu beobachten.

Bei den ringartig angeordneten Zellen trat das basalmembranähnliche Material nicht nur in den Spalträumen, die sich zwischen Zellen bildeten auf, sondern lagerte sich vor allem außen an die Zellen an. Auf der Seite der Zellringe, die sich nach innen wandte, wurde das Material grundsätzlich nicht gefunden.

Auch die soliden Zellstränge wiesen eine typische Grundstruktur auf. Das basalmembranähnliche Material bildete im Inneren der Stränge eine längsgerichtete Struktur, an der sich außen die Endothelzellen entlang streckten.

In vivo befindet sich die Basalmembran des Blutgefäßes auf der basalen Seite der Endothelzellen (Hees, 2000). Das in vitro produzierte basalmembranähnliche Material wurde ebenfalls nur auf einer Seite der Endothelzellen deponiert, die damit der basalen Seite entsprechen würde. Dies war bei den Zellringen die nach außen gewandte Seite der Zellen und bei den soliden Strängen die nach innen gerichtete Seite. Die vom fibrillären Material abgewandte Seite der Endothelzellen, das heißt die Innenseite in den Zellringen und die Außenseite in den Strängen, entspräche damit der luminalen Seite.

Die basale und die luminale Seite wiesen sowohl in den ringartigen Strukturen, wie auch bei den soliden Strängen typische Strukturen im Bereich der Zellmembran auf.

Auf der vom fibrillären Material abgewandten luminalen Seite konnte das Auftreten von kurzen, fingerartigen Ausstülpungen oder Fortsätzen beobachtet werden.

Solche Ausstülpungen könnten temporären Mikrovilli entsprechen, die in vivo ebenfalls auf der luminalen Seite des Gefäßes gebildet werden (Fawcett, 1977). Ein Teil der Fortsätze wandte sich zur Zelle zurück und verschmolz derart mit der Zellmembran, dass dabei ein kleines Lumen entstand. Solche Einschlüsse werden als Pinozytosevorgänge gedeutet und sind in dieser Form nur in vitro zu beobachten. Die Zellen sollen dadurch kleine Flüssigkeitströpfchen aus dem Medium aufnehmen (Fawcett, 1977). Die an der Ausbildung solider Stränge beteiligten Endothelzellen lagen dicht auf der basalmembranähnlichen Struktur. Ihre Zellkerne wölbten sich von der Struktur weg in das umgebende Medium. Auch in vivo, besonders gut bei kleinen Kapillaren zu sehen, wird ein Hervorwölben der Zellen in das Lumen der Gefäße beobachtet.

Auf der basalen, dem fibrillären Material zugewandten Seite der Endothelzellen traten in der Zellmembran vermehrt kleine Einschnürungen und Vesikel im angrenzenden Zytoplasma auf. An manchen Stellen, an denen sich das fibrilläre Material tief in die Zelle hineinzuziehen schien, waren besonders viele dieser Invaginationen und Bläschen zu finden, so dass die Zellmembran nicht mehr zu erkennen war.

Solche, oft als mikropinozytotisch bezeichneten Vesikel, kommen in vivo regelmäßig in Endothelzellen von Kapillaren vor. Es wird angenommen, dass dadurch Flüssigkeit und gelöste Stoffe aktiv durch die Kapillarwand transportiert werden (Fawcett, 1977; Folkman und Haudenschild, 1980). Andere Studien an Kapillaren der Retina von Ratten zeigten, dass bei Verabreichung speziell markierter Substanzen diese sowohl in den basalen Invaginationen wie auch in den Vesikeln im Zytoplasma gefunden wurden. Ein Übertritt der Substanzen in das Lumen der Kapillaren wurde jedoch nicht beobachtet. Daraus folgerten die Autoren, dass ein transzellulärer Transport von der basalen zur luminalen Seite nicht stattfindet. (Gordon und Essner, 1985). Da in der vorliegenden Studie die Invaginationen und Vesikel vor allem auf der Seite der Zelle auftraten, an die das fibrilläre Material angelagert war, wäre es möglich, dass diese Strukturen dazu dienen, die innerhalb der Zelle synthetisierten Komponenten der basalmembranähnlichen Struktur auszuschleusen.

Die einseitige Ablagerung von basalmembranähnlichem Material sowie die beschriebenen Differenzierungen der luminalen und basalen Zellseite zeigen, dass die Endothelzellen im Verlauf der in vitro-Angiogenese eine eindeutige Polarität entwickeln.

#### **5.1.4.5.2. Lumenbildung**

Lichtmikroskopisch stellten sich die durch die in vitro-Angiogenese gebildeten endothelialen Strukturen als blutgefäßähnliche, tubulär wirkende Strukturen dar. Allerdings konnte die Ausbildung eines echten Lumens im Inneren dieser soliden endothelialen Stränge nicht beobachtet werden. Zieht man die zuvor beschriebene, eindeutige Polarität der Zellen in diesen Strängen mit nach außen gerichteter luminaler und nach innen gewandter basaler Seite in die Überlegungen mit ein, dann erscheint die Möglichkeit einer Lumenbildung im Inneren der Stränge als unwahrscheinlich. Die Ausbildung angiogenetischer Strukturen mit einer solchen „umgekehrten Polarität“ wurde auch bei anderen in vitro-Modellen mit nur zweidimensional wachsenden Endothelzellen beschrieben (Montesano et al., 1992).

Ein eindeutig als solches zu bezeichnendes Lumen wurde weder licht- noch elektronenmikroskopisch gefunden. Im Zytoplasma einer Zelle (siehe Abb. 69, S. 145) trat allerdings ein Hohlraum auf, der, da die Zelle nur in einer Ebene geschnitten ist, mehrere Deutungsmöglichkeiten zulässt:

a) Grundsätzlich könnte hier ein Teil des Zytoplasmas bei der Präparation verloren gegangen sein und es sich bei dem Hohlraum um ein Artefakt handeln. Die kleinen Strukturen im Hohlraum könnten Reste des Zytoplasmas darstellen. Diese Möglichkeit kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da der Zellkern in dem Bereich, in dem er dem Hohlraum seitlich anliegt, eine leichte Einziehung aufweist und sich die Zellorganellen radiär um den Hohlraum anordnen.

b) Der Hohlraum könnte eine Einbuchtung der Zelle darstellen. Eine solche Zelle würde somit eine Bohnen- oder Napfform aufweisen. Derart geformte Zellen wurden jedoch in keinem der in dieser Studie untersuchten Schnitte gesehen. Die Endothelzellen wiesen eine runde, ovale oder langgestreckte Form auf.

c) Ein Lumen in einer Zelle kann gebildet werden, indem die Zelle flacher wird, ihre beiden Seiten sich umbiegen und sich so vereinigen, dass sie einen Hohlraum einschließen (Folkman, 1984; Paku, 1998). Bei einer solchen Lumenbildung würde ein Hohlraum entstehen, der die gesamte Zelle kanalisiert. Würde es sich bei dem beschriebenen Hohlraum um ein in dieser Weise gebildetes Lumen handeln, sollte im Bereich der Kontaktstelle eine Überlappung des Zytoplasmas zu sehen sein, wie sie beispielsweise bei kleinsten, nur aus einer Endothelzelle bestehenden Kapillaren im Gewebeschnitt auftritt. Eine solche Kontaktstelle zwischen den beiden Seiten der Endothelzelle wurde nicht gefunden.

d) Der Hohlraum könnte als intrazelluläre Vakuole angesehen werden. Folkman und Haudenschild (1980) beobachteten, dass sich in Endothelzellen Vakuolen ausbilden. Die Vakuolen mehrerer Zellen flossen zusammen und bildeten so ein primäres Lumen. Innerhalb der Vakuolen trat eine teils fibrilläre, membranöse oder amorphe Substanz auf, die nicht weiter bestimmt werden konnte. Folkman und Haudenschild (1980) kamen zu dem Schluss, dass dieses Material wie eine Art Mandrin den Raum ausfüllt und später entfernt wird, so dass das Lumen entsteht. Für eine intrazelluläre Vakuole spricht in dieser Untersuchung, dass das Zytoplasma den Hohlraum ohne Unterbrechungen umgibt. Im Inneren des Hohlraums waren kleine, längliche Strukturen zu sehen. Diese könnten als Rest des von

Folkman und Haudenschild (1980) beschrieben „Mandrins“, der erst die Vakuolen ausfüllt und bei Bildung des Lumens entfernt wird, betrachtet werden.

#### **5.1.4.6. Endothelzellen ohne in vitro-Angiogenese**

Bei der Ausbildung der endothelialen Strukturen waren niemals alle Endothelzellen einer Kultur beteiligt. Ein Teil der Endothelzellen blieb zwischen bzw. unter dem endothelialen Netzwerk in Form des Kopfsteinpflastermusters bestehen. In den Untersuchungen von Fuchs-Schönleber (1999) werden Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung aufgeführt, die auch nach einem Monat keine Angiogenese zeigten. Da Endothelzellen eine sehr heterogene Gruppe darstellen (Auerbach et al., 1992; Plendl et al., 1992), wäre es möglich, dass in den in dieser Studie untersuchten Kulturen zwei Arten von Zellen, angiogenetische und nicht angiogenetische, existieren oder dass die Zellen sich im Verlauf der Angiogenese in diese beiden Gruppen differenzieren.

#### **5.1.5. Regression der endothelialen Strukturen**

##### **5.1.5.1. Regression endothelialer Strukturen in Langzeitkulturen**

Ein besonderer Befund dieser Studie war die fast vollständige Rückbildung der tubulären Strukturen in einer Langzeitkultur, die aufgrund ihrer ausgeprägten in vitro-Angiogenese über mehrere Monate beobachtet wurde. Die Regression der Strukturen trat spontan nach 6 Monaten auf, obwohl keine Veränderungen an den Kulturbedingungen (Selektivmedium, Temperatur, CO<sub>2</sub>-Begasung) vorgenommen worden waren.

Regressionsvorgänge von zuvor gebildeten Blutgefäßen werden im Rahmen pathologischer wie auch physiologischer Vorgänge gefunden. Wird bei der tumor-induzierten Angiogenese der Stimulus, in diesem Fall der Tumor, entfernt, kann eine Rückbildung der Gefäße beobachtet werden (Folkman, 1984). Im Corpus luteum kommt es unter hormonellem Einfluss in zyklischen Abständen zur Neo-vaskularisierung und anschließend zur Rückbildung der Gefäße (Augustin et al., 1995; Redmer und Reynolds, 1996). Diese vaskuläre Regression scheint nach

Meinung einiger Autoren nur solange stattfinden zu können, wie periendotheliale Komponenten wie eine reife Basalmembran und Perizyten fehlen. In dieser Phase soll die Remodellierung der neugebildeten Gefäße möglich sein, so dass das primär entstandene System nachfolgend den tatsächlichen Bedürfnissen angepasst werden kann (Benjamin et al., 1998; Goede et al., 1998).

Eine basalmembranähnliche Struktur wurde *in vitro* zwar ausgebildet, allerdings ist ihre genaue Zusammensetzung nicht bekannt. Außerdem werden im Verlauf der Angiogenese und der Reifung der Blutgefäße unterschiedliche Komponenten der Basalmembran von Endothelzellen sezerniert (Grant und Kleinman, 1997; Amselgruber et al., 1999). An der Bildung der Basalmembran sind *in vivo* zusätzlich die Perizyten beteiligt (Hirschi und D'Amore, 1996; Grant und Kleinman, 1997), die in diesem *in vitro*-Modell nicht vorhanden sind und daher nicht zur Bildung von Basalmembranmaterial beitragen können. Es ist daher wahrscheinlich, dass die *in vitro* gebildete basalmembranähnliche Struktur in ihrer Zusammensetzung nicht einer reifen Basalmembran, wie sie *in vivo* auftritt, entspricht. Die zweite Komponente die gebildeten kapillarähnlichen Strukturen dauerhaft schützen könnte, sind Perizyten, die, wie bereits erwähnt, fehlen. Möglicherweise bedingt daher auch *in vitro* der mangelhafte Schutz durch periendotheliale Strukturen die Regression der angiogenetischen Strukturen.

#### **5.1.5.2. Regression endothelialer Strukturen durch Entzug des Selektivmediums**

Eine Rückbildung der bereits gebildeten, endothelialen Strukturen konnte ebenfalls bei Endothelzellen nach Entzug des Selektivmediums beobachtet werden. Allerdings waren noch nach Wochen die Bereiche der ehemaligen Angiogenese an einer längs gerichteten Anordnung der Zellen zu erkennen. Wie bereits beschrieben, wird schon von den präangiogenen Zellen basalmembranähnliches Material sezerniert, das eine bestimmte Anordnung der Zellen vorzugeben scheint. Es wäre möglich, dass diese Grundstruktur die Zellen dadurch auch nach Entzug des Selektivmediums in ihrer Lage fixiert.

## 5.2. PCR

In dieser Studie sollte die Expression des VEGF, der beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 sowie des Wachstumshormon-Rezeptors untersucht werden. Dafür wurde mRNA aus Endothelzellen in verschiedenen Stadien der Angiogenese aus dem Corpus luteum in Blüte und dem Corpus luteum in Rückbildung isoliert.

### 5.2.1. Zellzählung und RNA-Isolierung

Vor der Verwendung in der PCR wurden die Zellen gezählt. Die aus den Kulturen insgesamt isolierte Gesamt-RNA wurde photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die pro cm<sup>2</sup> Kulturfläche und pro 1 Million Zellen extrahierte Gesamt-RNA ermittelt.

Bei Vergleich der präangiogenen Endothelzellen mit den angiogenen Kulturen war eine deutliche Zunahme der Zellzahlen festzustellen. In den über 5,5 Monate lang kultivierten Endothelzellen wurden mehr als doppelt so viele Zellen gezählt, wie in den 1 Monat alten Kulturen.

Die Proliferation der Endothelzellen im Verlauf der Angiogenese stellt einen der Hauptschritte der Angiogenese (Folkman, 1984; Pepper et al., 1996) dar, wobei die Vermehrung der Zellen im vorliegenden Fall eindeutig auf die Inhaltsstoffe des Selektivmediums zurückzuführen ist, wie dies im vorhergehenden Abschnitt zur in vitro-Angiogenese ausgeführt wurde.

Die Auswertung der isolierten Gesamt-RNA-Menge zeigte bei zwei Kulturen stark abweichende Werte. Dies betraf die Endothelzellen des Corpus luteum in Blüte und in Rückbildung, die zwei Monate in Kultur waren und auch bereits angiogenetische Strukturen entwickelt hatten. Aus diesen Kulturen wurde so wenig RNA gewonnen, dass Fehlreaktionen bei der RNA-Extraktion nicht auszuschließen waren. Die Werte der restlichen Kulturen wiesen, wenn die Gesamt-RNA auf die Kulturfläche bezogen wurde, große Schwankungen auf. Vergleich man die einen Monat kultivierten, präangiogenetischen Endothelzellen mit den stark angiogenetischen Endothelzellen, die 5,5 Monate in Kultur waren, konnte neben der

deutlichen Zunahme der Zellzahl auch eine Erhöhung der isolierten Gesamt-RNA pro  $\text{cm}^2$  Kulturfäche beobachtet werden. Dagegen nahm die Menge der extrahierten Gesamt-RNA bezogen auf die Zellzahl im Vergleich etwas ab. Betrachtet man die verschiedenen Kulturen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, zeigen sich bei der Gesamt-RNA, wenn die Werte auf die Zellzahl bezogen werden, geringere Schwankungen, als wenn die Menge pro  $\text{cm}^2$  Kulturfäche berechnet bestimmt wird.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Zunahme der aus den Kulturen gewonnenen Gesamt-RNA wahrscheinlich hauptsächlich auf die Vermehrung der Zellen zurückzuführen ist und weniger auf eine Erhöhung der RNA-Produktion durch die einzelnen Endothelzellen.

In den folgenden Versuchsabläufen (Reverse Transkription, PCR, Gelelektrophorese) wurde mit gleichbleibenden Mengen an RNA und cDNA gearbeitet. Außerdem wird der Anteil der mRNA an der gesamten RNA mit 2-4 % als relativ konstant beschrieben (Schröder, 1999). Allerdings schränken die Schwankungen bei den Werten der RNA-Isolierung und die dadurch entstehenden Fehler mögliche quantifizierende Aussagen ein.

### **5.2.2. Expression des VEGF**

VEGF-mRNA wurde in dieser Studie in allen untersuchten Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte und in Rückbildung nachgewiesen. Dies traf auch für Endothelzellen zu, die initial das Selektivmedium erhalten hatten, dann jedoch über mehrere Monate nur mit dem Nährmedium versorgt wurden.

VEGF bewirkt in den meisten in vivo- und in vitro-Modellen der Angiogenese die Migration und Proliferation der Endothelzellen und die Ausbildung neuer Blutgefäße oder blutgefäßähnlicher, endothelialer Strukturen (Leung et al., 1989; Connolly et al., 1989; Pepper et al., 1992; Nicosia et al., 1994). Dieser Wachstumsfaktor wird vor allem von Zellen des Parenchyms solcher Gewebe produziert, in denen neue Blutgefäße benötigt werden. VEGFR-mRNA findet sich beispielsweise bei der Angiogenese im Corpus luteum in Ausbildung in den

Luteinzellen (Phillips et al., 1990; Shweiki et al., 1993) oder auch in den Perizyten, die den Endothelzellen nachfolgen (Reynolds und Redmer, 1998).

Eine Expression dieses Faktors durch die Endothelzellen selbst, wie sie in der vorliegenden Untersuchung beobachtet wurde, konnten Ladoux und Frelin (1993) bei mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Gehirn von Ratten und Rindern zeigen, bei Endothelzellen aus der Aorta wurde das Transkript jedoch nicht gefunden. Plendl et al. (1999) wies die VEGF-mRNA in angiogenetischen, mikrovaskulären Zellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung nach. Obwohl die Zellen dieser Studie deutlich VEGF-mRNA aufwiesen, schien die Expression kein solches Ausmaß zu erreichen, als dass die Zellen ohne Zugabe proangiogener Substanzen selbstständig angiogenetische Strukturen ausgebildet hätten. Endothelzellen, die nach Entzug des Selektivmediums nur das Nährmedium DMEM<sup>+</sup> erhielten, zeigten auch nach Wochen keine in vitro-Angiogenese, im Gegensatz zu Zellen, die mit den Zusätzen des Selektivmediums versorgt worden waren.

Bei der Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den präangiogenen und den angiogenen Kulturen. Vergleichbare Banden wiesen auch die Kulturen auf, die durch Entzug des Mediums oder nach Langzeitkultivierung die endothelialen Strukturen zurückgebildet hatten.

Werden die im Gel abgebildeten Banden unter den eingangs gemachten Vorbehalten, die RNA-Isolierung betreffend, verglichen, scheinen im Verlauf der Angiogenese keine ausgeprägte Veränderung der VEGF-Expression aufzutreten. Möglicherweise exprimieren die in dieser Studie in vitro kultivierten Endothelzellen grundsätzlich in geringem Maße VEGF, dessen mRNA auch nach Entzug des Selektivmediums in den nur mit dem Nährmedium DMEM<sup>+</sup> versorgten Zellen nachgewiesen werden konnte. Weitere Untersuchungen an der von Fuchs-Schönleber (1999) beschriebenen Endothelzellkultur, die trotz Anregung durch das Selektivmedium auch nach mehreren Wochen keine Angiogenese zeigte, könnten in diesem Zusammenhang zur Aufklärung beitragen.

Eine mögliche Ursache für die gleichbleibende Expression des VEGF, auch im Verlauf der Angiogenese, könnte auch eine Anpassung der Endothelzellen an die in vitro-Kultivierung darstellen, die in vivo so nicht zu sehen wäre. Veränderungen

von kultivierten Endothelzellen sind von anderen Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise dem FGF-2 bekannt. In vivo wurde der Rezeptor dieses Faktors bisher nur in seltenen Fällen auf Endothelzellen gefunden. In vitro wird er dagegen regelmäßig exprimiert (Pepper et al., 1996).

Eine Erhöhung der Expression von VEGF kann in reinen Endothelzellkulturen durch Hypoxie (Namiki et al., 1995; Nomura et al., 1995) oder durch Zugabe pro-angiogener Substanzen wie Interleukin-1 $\alpha$  (Imaizumi et al., 2000) erreicht werden. Auch die Verabreichung von VEGF soll beispielsweise in Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen aus der menschlichen Haut zur Erhöhung der VEGF-mRNA führen (Vega-Diaz et al., 2001). Eine Veränderung der Expression des VEGF durch den im Selektivmedium enthaltenen VEGF könnte mittels einer quantitativen PCR nachgewiesen werden.

### **5.2.3. Expression der VEGF-Rezeptoren**

Alle untersuchten Endothelzellen exprimierten die VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2. Die im Gel abgebildeten Banden zeigen in den verschiedenen Stadien der Angiogenese kaum Unterschiede.

Beide Rezeptoren treten beim Adulten mit wenigen Ausnahmen nur auf Endothelzellen auf (Jakeman et al., 1992; Peters et al., 1993), wobei die Bindung von VEGF sowohl bei proliferierenden wie auch bei ruhenden Endothelzellen beobachtet wurde (Jakeman et al., 1992). Dementsprechend konnten die Expression der beiden Rezeptoren nicht nur in angiogenetischen Kulturen sondern auch in solchen gezeigt werden, die noch nicht mit der in vitro-Angiogenese begonnen oder diese bereits wieder zurückgebildet hatten. Welche Rolle VEGF im ruhenden Endothel spielt, ist noch weitgehend ungeklärt. In vivo wie in vitro scheint dieser Wachstumsfaktor an der Bildung und Erhaltung von fenestriertem Endothel beteiligt zu sein und damit die Durchlässigkeit von Gefäßen zu erhöhen (Breier et al., 1992; Roberts und Palade, 1995; Dovrak et al., 1995; Esser et al., 1998).

Bisher konnte nur bei Bindung von VEGF an VEGFR-2 eine Signalübertragung und mitogene Wirkung beobachtet werden, obwohl VEGFR-1 eine höhere Affinität für VEGF aufweist als VEGFR-2, (Waltenberger et al., 1994; Keyt et al., 1996). In der

vorliegenden Untersuchung wiesen die Endothelzellen jedoch nicht nur VEGFR-2- sondern auch VEGFR-1-mRNA auf. VEGFR-1 wird während der embryonalen Entwicklung exprimiert, die Expression sinkt dann nach Vollendung der endothelialen Differenzierung ab, wird beim Adulten jedoch wieder deutlich hochreguliert (Peters et al., 1993). Für VEGFR-1 oder auch den durch alternatives Spleißen entstehenden, löslichen sVEGFR-1 werden unterschiedliche Aufgaben diskutiert. Diese Rezeptoren könnten zum einen als Reservoir für überschüssigen VEGF dienen oder auch eine regulierende Funktion im Ablauf der Angiogenese haben (Kendall und Thomas, 1993). Möglicherweise wird auch bei den in dieser Studie untersuchten Endothelzellen der vorhandener VEGF durch die Bindung an beide Rezeptoren im Gleichgewicht gehalten und somit eine überschießende Angiogenese verhindert.

In vivo wird eine Hochregulierung der VEGFR-mRNA durch Hypoxie und durch VEGF bewirkt (Tuder et al., 1995; Barleon et al., 1997). Da die VEGF-Expression der Endothelzellen selbst in dieser Versuchsanordnung relativ gering zu sein scheint, ist anzunehmen, dass dieser Faktor kaum Einfluss auf die Expression der beiden Rezeptoren nimmt. Ob der im S 180-konditionierten Medium enthaltene VEGF (Rosenthal et al., 1990) die Expression der Rezeptoren verändert, müsste durch quantifizierende Untersuchungen festgestellt werden.

#### **5.2.4. Expression des Wachstumshormon-Rezeptors**

In allen untersuchten Kulturen konnte die Expression von GHR-mRNA nachgewiesen werden. Wurde in der PCR für den Nachweis des GHR die gleiche Menge cDNA eingesetzt wie für VEGF, entstanden bei der Auswertung im Agarosegel extrem breite Banden, die für die Bestimmung der Produktlänge anhand des mitgeführten Markers nicht mehr geeignet waren. Um schmalere, aber exaktere Banden zu erhalten, wurde die cDNA auf circa ein Drittel der zuvor verwendeten Menge verringert.

Die GHR-Expression war in allen untersuchten Kulturen sehr deutlich. Im Vergleich erschienen die Banden der Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Blüte etwas schwächer als die Banden der Zellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung.

Innerhalb der beiden Gruppen waren keine Unterschiede festzustellen. Der Rezeptor wurde auch von präangiogenen Endothelzellen und Endothelzellen, die seit Wochen wegen Entzug des Selektivmediums ihre endothelialen Strukturen zurückgebildet hatten, stark exprimiert.

In vorhergehenden immunhistochemischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei Markierung mit anti-GHR vor allem in angiogenetischen Endothelzellpopulationen eine deutliche Immunfluoreszenz zu beobachten war, während in nicht-angiogenetischen Kulturen nur eine schwache Antikörperbindung festgestellt werden konnte (Budde, 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Expression des Rezeptors nicht vom Stadium der *in vitro*-Angiogenese abhängig ist, denn auch Endothelzellen, die gerade keine endothelialen Strukturen zeigten, exprimierten GHR-mRNA. Möglicherweise steht die Expression des GHR jedoch im Zusammenhang mit der grundsätzlichen Fähigkeit der Zellen zur Angiogenese, da die von Budde (1999) beschriebene schwache Markierung mit dem Antikörper nur bei solchen Endothelzellen zu beobachten war, die auch nach Wochen in Kultur keine *in vitro*-Angiogenese zeigten.

Eventuell bestimmt auch die Herkunft der Endothelzellen die GHR-mRNA-Expression. In der Studie von Budde (1999) wurde ebenfalls gezeigt, dass GHR im Gewebeschnitt selten im Endothel des Corpus luteum gefunden und dort nur Endothelzellen kleiner Arterien und Arteriolen markiert wurden. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei den *in vitro* kultivierten Endothelzellen, die mit anti-GHR markiert waren und die in der vorliegenden Untersuchung die GHR-mRNA exprimierten, nur um solche aus den aufgeführten Gefäßen handelte.

Hinsichtlich der Funktion des GHR vermutete Budde (1999), dass GH einen Einfluss auf die Zunahme des Gefäßwanddurchmessers der Arteriolen und kleinen Arterien im bovinen Ovar nehmen könnte. Eine stimulierende Wirkung von GH auf die Angiogenese wird auch in verschiedenen *in vivo*-Modellen beschrieben (Gould et al., 1995; Struman et al., 1999). Bei GH-Defizienz wurde eine geringere Verzweigung von Gefäßen beobachtet (Smith et al., 1997; Hellström et al., 1999). Möglicherweise fördert GH das Wachstum der Gefäße über eine Stimulierung der Proliferation der Endothelzellen. Eine mitogene Wirkung von GH auf *in vitro* kulti-

vierte, mikrovaskuläre Endothelzellen wurde in einigen Studien gezeigt (Rymaszewski et al., 1991; Struman et al., 1999).

In Untersuchungen, in denen makrovaskuläre Endothelzellen aus dem Nabelstrang verwendet wurden, war keine Wirkung von GH auf die in vitro-Angiogenese festzustellen (Rymaszewski et al., 1991; Ikeo et al., 2001). Es ist unklar ob diese Zellen den Rezeptor für GH aufweisen, da in der bekannten Literatur keine Studien gefunden, die sich mit der Expression von GHR auf makrovaskulären Endothelzellen befassen. Möglicherweise wirkt GH nicht auf solche Zellen, weil der Rezeptor nicht exprimiert wird. Zudem zeigten Ikeo et al. (2001) in ihrer Studie nur, dass GH keinen Einfluss auf die Migration von Endothelzellen hat; die Wirkung auf die Proliferation der Zellen wurde nicht untersucht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass GH über den GHR proangiogen auf mikrovaskuläre Endothelzellen wirkt, wobei seine Wirkung vor allem die Proliferation der Zellen betreffen könnte.

### **5.3. Beurteilung von Angiogenese-Modellen**

Die Auswahl eines Angiogenese-Modells hängt primär davon ab, welche Aspekte der Angiogenese untersucht werden sollen. Wenn beispielsweise nachgewiesen werden soll, ob eine Substanz grundsätzlich angiogen wirkt, ist dafür eine ununterbrochene Beobachtung des Versuchsansatzes nicht unbedingt Voraussetzung. Sollen dagegen, wie in dieser Studie, die verschiedenen Stadien der Gefäßbildung beobachtet werden, dann sollten die Veränderungen kontinuierlich dokumentiert werden können.

#### **5.3.1. In vivo-Modelle**

Ein Vorteil der in vivo-Modelle der Angiogenese ist, dass alle beteiligten Zellen, Strukturen und Mechanismen, wie sie im Organismus auftreten, vorhanden sind. Die Versuchskonditionen weisen daher große Ähnlichkeit mit den tatsächlichen Gegebenheiten auf. Von diesen Modellen sind vor allem die Chorioallantois-membran, die Cornea und implantierte, durchsichtige Beobachtungskammern für eine kontinuierliche Beobachtung der Angiogenese geeignet. Gewebeproben und

Implantate können ebenfalls in verschiedenen Stadien der Angiogenese den Versuchstieren entnommen werden.

In der Chorioallantoismembran kann die Blutgefäßentwicklung zwar ununterbrochen beobachtet werden, trotzdem weist dieses Modell einige Nachteile auf: Zum einen handelt es sich um ein aviäres Gewebe, so dass Erkenntnisse nicht unbedenklich auf Säugetiere übertragen werden können (Fajardo et al., 1988; Auerbach et al., 2000). Zum anderen findet in der Chorioallantoismembran physiologischerweise eine Neubildung von Blutgefäßen statt. Daher muss das Ausmaß der Vaskularisierung in der unveränderten Chorioallantoismembran in den verschiedenen Entwicklungsphasen bekannt sein, bevor beurteilt werden kann, welche Wirkung angiogene oder antiangiogene Substanzen haben. Das Gewebe der Chorioallantoismembran kann mit entzündlichen Reaktionen auf Kontaminationen reagieren, wie sie beispielsweise schon durch das Fenstern der Kalkschale verursacht werden können. Beim Eröffnen des Eies beeinflussen mögliche Änderungen der Umgebungstemperatur, der Luftfeuchtigkeit und der Sauerstoffspannung die Entwicklung der Chorioallantoismembran (Auerbach et al., 2000). Im gefensternten Ei ist der einsehbare Bereich relativ klein. Dieser Mangel kann behoben werden, indem die Chorioallantoismembran aus der Schale entnommen und *in vitro* kultiviert wird (Auerbach et al., 1974).

Die avaskuläre Cornea bietet gute Möglichkeiten, die Stadien der Angiogenese zu beobachten, da sie physiologischerweise gefäßlos ist (Gimbrone et al., 1974). Allerdings kann es zu entzündlichen und angiogenetischen Reaktionen auf die eingebrachten Trägermaterialien kommen. Dies hat möglicherweise eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge (Gaudric et al., 1992; Auerbach et al., 2000). Einen großen Nachteil stellt die sensible Innervierung der Cornea dar. Daher sind solche Versuche für die Tiere teilweise mit starken Schmerzen verbunden und unter Tierschutzaspekten sehr umstritten.

Durchsichtige Beobachtungskammern, die in den Körper eingebracht werden, gestatten ebenfalls die kontinuierliche Beobachtung der Angiogenese. Allerdings führen entzündliche Reaktionen, die bei der Implantation der Kammern auftreten können, allein schon zur Neubildung von Blutgefäßen, welche die Ergebnisse

beeinflussen können (Auerbach et al., 2000). Auch die unter dem Fenster verringerte Körpertemperatur hat eventuell Auswirkungen auf die Angiogenese. In einigen dieser Modelle, z.B. dem kranialen Fenster, müssen die Gefäße für die Beobachtung mit speziellen Methoden, beispielsweise fluoreszierenden Kontrastmitteln oder Transillumination, sichtbar gemacht werden (Dellian et al., 1996; Jain et al., 1997).

Gewebeproben oder schwamm- bzw. gelartige Implantate, die proangiogene oder auch antiangiogene Substanzen bzw. Tumorzellen enthalten, können entnommen und mit unterschiedlichsten Methoden untersucht werden (Norrby et al., 1986; Andrade et al., 1987; Fajardo et al., 1988; Nguyen et al., 1994). Eine genaue Unterscheidung der neugebildeten von bereits vorhandenen Gefäßen ist vor allem beim Einwachsen der Gefäße in die Implantate möglich (Fajardo et al., 1988; Nguyen et al., 1994; Vacca et al., 1998). Eine fortgesetzte Beobachtung der Angiogenese ist hierbei nicht möglich. Die Stadien müssen in Proben untersucht werden, die verschiedenen Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden.

Ein deutlicher Nachteil aller vivo-Modelle ist der Verbrauch einer großen Anzahl von Versuchstieren und die Tatsache, dass die Versuche teilweise mit nicht vermeidbaren, starken Schmerzen einhergehen.

### **5.3.2. in vitro-Modelle**

Bei den in vitro-Modellen können Explantat-Kulturen und Zellkulturen unterschieden werden.

Explantatkulturen aus der Aorta oder anderen Gefäßen ähneln noch stark den in vivo-Modellen, da noch alle am Aufbau des Gefäßes beteiligten Zellen vorhanden sind. Allerdings werden in diesen Versuchen hämodynamische Effekte nicht mehr berücksichtigt. Die Quantifizierung der Angiogenese kann problematisch werden, da teilweise Strukturen, die Gefäßsprossen ähneln, auch von Perizyten oder glatten Muskelzellen gebildet werden können (Brown et al., 1996). Daher muss eine genaue Identifizierung der Endothelzellen erfolgen. Teilweise ist die Sprossung neuer Gefäße aus den Explantaten so stark, dass durch Überwucherung der

Kulturen nach einigen Tagen keine Quantifizierung mehr möglich ist (Nicosia und Ottinetti, 1990). Ein weiterer Nachteil ist, dass die Lebensdauer von Explantaten auf wenige Wochen beschränkt ist (Nicosia et al., 1982; Nicosia und Ottinetti, 1990; Brown et al., 1996).

In *in vitro*-Kulturen von Endothelzellen können, wie beschrieben, alle wichtigen Schritte der Angiogenese beobachtet werden (Folkman und Haudenschild, 1980). Die Versuchsbedingungen sind gut zu kontrollieren und leicht zu verändern. Die Gabe angiogener oder antiangiogener Substanzen ist einfach und kann in Konzentration und Dauer problemlos variiert werden. Die kontinuierliche Beobachtung erfolgt mikroskopisch, wobei auch der Einsatz von Bildverarbeitungssystemen oder Video-Aufzeichnungen möglich sind. Einmal isolierte Endothelzellen können passagiert und vermehrt werden. Sie überleben in Kultur monatelang oder tiefgefroren auch mehrere Jahre (Folkman et al., 1979; Plendl, 1997; Fuchs-Schönleber, 1999).

Häufig werden Endothelzellen aus der Aorta oder dem Nabelstrang verwendet. Diese Endothelzellen sind relativ einfach zu isolieren. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass *in vivo* eine Sprossung neuer Kapillaren aus makrovaskulären Gefäßen nicht zu beobachten ist (Folkman et al., 1979). Solche Endothelzellen eignen sich daher weniger als *in vitro*-Angiogenese-Modell, wie beispielsweise mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Corpus luteum, in dem physiologischerweise angiogenetische Prozesse auftreten (Plendl, 1997).

Als Nachteil aller Endothelzellkulturen ist zu sehen, dass keine Interaktionen mit anderen Zellen oder Strukturen stattfinden und so die Erkenntnisse nur beschränkt auf *in vivo*-Situationen übertragen werden können. Durch Kokulturen, beispielsweise von Endothelzellen und Granulosazellen aus dem Corpus luteum (Fuchs-Schönleber, 1999), können wechselseitige Wirkungen dennoch dargestellt werden.

Außerdem ist zu berücksichtigen, dass Endothelzellen eine heterogene Gruppe von Zellen bilden (Auerbach et al., 1992; Plendl et al., 1992) und daher Versuche mit Endothelzellen aus unterschiedlichen Isolierungen schwierig zu beurteilen und zu vergleichen sind. Beispielsweise wirkt humanes GH proliferationsfördernd auf

mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Retina, hat aber keine derartigen Wirkungen auf Endothelzellen aus dem Nabelstrang (Rymaszewski et al., 1991).

Schließlich sollte auch in Betracht gezogen werden, dass im Verlauf der Kultivierung Veränderungen an den Zellen auftreten können, die so in vivo nicht zu beobachten sind. Beispielsweise ermöglicht es die starke Proliferation der Endothelzellen in vitro, aus wenigen, isolierten Zellen Kulturen mit Millionen von Endothelzellen zu züchten. Allerdings ist gerade diese in vitro beobachtete, starke Teilung der Zellen untypisch für die meisten Endothelzellen in vivo (Denekamp, 1984).

Unter Berücksichtigung der angesprochenen Besonderheiten stellen Endothelzell-Kulturen ein attraktives Angiogenese-Modell dar, das in vielen Bereichen Tiermodelle ergänzen oder ersetzen kann.