

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Einflussfaktoren auf die angiogene Potenz
humaner mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro***

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

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Henrike Sievers

Tierärztin

aus Celle

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3972

Gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Hiebl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): man, microvessels (MeSH), endothelium, myocardium, lungs, foreskin (MeSH), angiogenesis, culture media, cell culture, atherosclerosis

Tag der Promotion: 07.08.2017

In Gedenken an meine Mutter

Christine-Marlene Sievers

Spiele, lächle, denke an mich...

(Henry Scott Holland, 1910)

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis.....	1
2.	Abkürzungsverzeichnis von Einleitung, unveröffentlichter Studie und Diskussion	3
3.	Abbildungsverzeichnis von Einleitung, unveröffentlichter Studie und Diskussion	3
4.	Einleitung.....	4
4.1.	Angiogenese	4
4.2.	Angiogeneseforschung.....	6
5.	Ziel dieser Arbeit	10
6.	Verwendete Zellen und Methoden	11
7.	Publikationen	13
7.1.	<i>In vitro</i> angiogenic potency in human microvascular endothelial cells derived from myocardium, lung and skin	14
	Abstract	15
1.	Introduction.....	15
2.	Materials and methods	16
3.	Results	19
4.	Discussion.....	21
	References.....	28
7.2.	Human microvascular endothelial cells displaying reduced angiogenesis and increased uptake of lipids during <i>in vitro</i> culture	32
	Abstract	33
1.	Introduction.....	33
2.	Materials and methods	34
3.	Results	38
4.	Discussion.....	45
	References.....	50
8.	Unveröffentlichte Studie	55
8.1.	Analyse des nach Bahrami et al. [13] definierten 6. Stadiums der angiogenen Kaskade humaner mikrovaskulärer Endothelzellen <i>in vitro</i>	55
9.	Diskussion.....	58

Verzeichnisse

9.1.	Erkenntnisse dieser Arbeit	58
9.2.	Schlussfolgerungen	62
10.	Zusammenfassung.....	63
11.	Summary	64
12.	Literaturverzeichnis von Einleitung, unveröffentlichter Studie und Diskussion	66
13.	Publikationsliste	74
13.1.	Originalartikel.....	74
13.2.	Beteiligung der Autoren an den Originalartikeln	74
13.3.	Kongressbeiträge.....	75
14.	Danksagung	76
15.	Selbstständigkeitserklärung	77

2. Abkürzungsverzeichnis von Einleitung, unveröffentlichter Studie und Diskussion

acLDL	acetyliertes Low Density Lipoprotein
Ang-1/-2	Angiopoietin-1/-2
CD	Cluster of Differentiation
CDC42	Cell Division Control Protein 42
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EGF	Epidermal Growth Factor
FBS	Fetales Bovines Serum
FGF-1/-2	Fibroblast Growth Factor-1/-2
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCMEC	Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells
HDMEC-1/-2	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells-1/-2
HPMEC	Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells
Ras	Rat sarcoma
Rho	Ras homologue
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor-A
vWF	von-Willebrand-Faktor

3. Abbildungsverzeichnis von Einleitung, unveröffentlichter Studie und Diskussion

Abb. 1: Schematische Darstellung der sprossenden Angiogenese.....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung der intussuszeptiven Angiogenese kleiner Kapillaren.....	6
Abb. 3: Digitale Aufnahmen humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Herz im 6. Stadium der angiogenen Kaskade.....	56

4. Einleitung

4.1. Angiogenese

Angiogenese bezeichnet das Entstehen neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Blutkapillaren [10, 117]. Blutkapillaren sind kleinste Blutgefäßverzweigungen in Organen und Geweben, die einen Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem Gewebe gewährleisten [31, 81]. Ihre Gefäßwand besteht aus Endothelzellen und Perizyten, deren Basallaminae miteinander verschmolzen sind [81, 99]. Die Kapillare wird von einer Basalmembran umhüllt, die sie vom umliegenden Bindegewebe abgrenzt [51, 81]. Basallamina und -membran gehören zur extrazellulären Matrix und bestehen im Wesentlichen aus Kollagen Typ IV, Laminin, Entactin/Nidogen und Proteoglykanen [83, 107]. Die Synthese und Sekretion dieser Bestandteile erfolgt vor allem durch Endothelzellen, aber auch durch Perizyten [18, 81]. Die Regulation des Blutflusses durch die Kapillaren übernehmen präkapilläre (Met-)Arteriolen, deren Gefäßwand einen dreischichtigen Aufbau aus Endothelzellen („Intima“), glatten Muskelzellen („Media“) sowie einer dünnen Schicht aus Bindegewebe mit elastischen Fasern („Adventitia“) aufweist [31, 81]. Den Kapillaren nachgeschaltet sind Venulen, die ebenfalls dem Stoffaustausch dienen. Ihr Wandaufbau entspricht anfangs dem der Kapillaren und wird im weiteren Gefäßverlauf wieder dreischichtig [31, 81].

Ein Sauerstoffmangel (Hypoxie) im umliegenden Gewebe eines Kapillarnetzes kann dazu führen, dass die kapillären bzw. mikrovaskulären Endothelzellen, die sich normalerweise im Ruhezustand befinden, über eine vermehrte Produktion des proangiogenen Wachstumsfaktors VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) aktiviert und zur Angiogenese stimuliert werden [25]. Diese kann durch Sprossung oder Intussuszeption der Kapillaren erfolgen [40, 117].

Bei der sprossenden Angiogenese entstehen neue Blutgefäße durch Wachstum tubulärer Strukturen aus bereits existierenden Kapillaren. Aktiviert durch den angiogenen Stimulus durchlaufen Endothelzellen innerhalb eines Gefäßwandabschnitts der Kapillare eine charakteristische angiogene Kaskade [10, 116, 117]: Zunächst setzen sie den Abbau der Basalmembran in Gang. Durch die Ausbildung von Filopodien spezifiziert sich eine aktivierte Endothelzelle zur „Tip-Zelle“ (englisch: tip „Spitze“). Diese wandert in Richtung des angiogenen Stimulus in das umliegende Gewebe und bildet so die Spitze des Sprosses. Das weitere Wachstum des Sprosses erfolgt durch die Proliferation sogenannter „Stalk-Zellen“ (englisch: to stalk „jemanden verfolgen“), die der „Tip-Zelle“ in Richtung des angiogenen Stimulus folgen [10, 25, 61, 116, 117]. Der Mechanismus der anschließenden Ausbildung eines Gefäßlumens ist noch nicht ausreichend geklärt. Sigurbjörnsdóttir et al. [121] führen in einer aktuellen Übersicht vier mögliche Mechanismen zur Lumenbildung *de novo* auf: die intrazelluläre oder interzelluläre Vakuolisierung der Endothelzellen [54, 68], die Apoptose der Endothelzellen nach Kontaktverlust zur extrazellulären Matrix [108] sowie die Invagination der endothelialen Plasmamembran [62, 68]. Anschließend wird das neu entstandene Blutgefäß durch die Ausbildung einer Basalmembran stabilisiert

[10]. Während dieses Reifungsprozesses wandeln sich die „Stalk-Zellen“ in sogenannte „Phalanx-Zellen“ (griechisch: phálanx „die Schlachtreihe“) um, deren Proliferationsrate um ein Vielfaches geringer ist als die der „Stalk-Zellen“ [40, 116]. Diese angiogene Kaskade aus Migration, Proliferation und der Ausbildung tubulärer Strukturen ist in Abbildung 1 dargestellt.

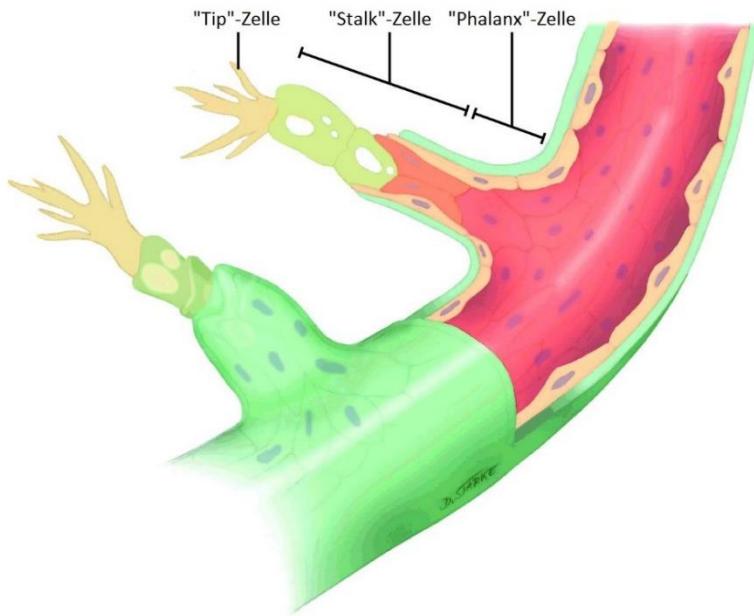


Abb. 1: Schematische Darstellung der sprossenden Angiogenese. (Mit Genehmigung kopiert aus *Intussusceptive angiogenesis: A biologically relevant form of angiogenesis*; De Spieghelaere et al., 2012 und in die deutsche Sprache übersetzt.)

Deutlich schneller verläuft die intussuszeptive Angiogenese. Hierbei entstehen neue Blutgefäße aufgrund der Teilung bereits existierender Kapillaren: Durch die Einstülpung gegenüberliegender Gefäßwandabschnitte in das Gefäßlumen und ihre anschließende Verbindung kommt es zur Ausbildung eines intraluminalen Pfeilers, der das Gefäßlumen zunächst teilt und im weiteren Verlauf zur Spaltung des Ausgangsgefäßes in zwei neue Blutgefäße führt (Abb. 2). Der Regulationsmechanismus dieser Form der Angiogenese ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Neben Wachstumsfaktoren scheinen auch hämodynamische Kräfte eine wichtige Rolle im Prozess der intussuszeptiven Angiogenese zu spielen [28, 29, 40, 117].

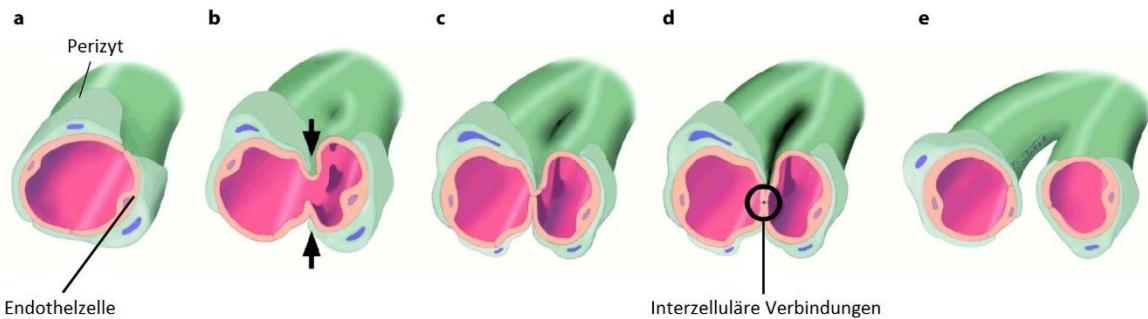


Abb. 2: Schematische Darstellung der intussuszeptiven Angiogenese kleiner Kapillaren, die von Perizyten umgeben sind (a). Die gegenüberliegenden Gefäßwände bewegen sich aufeinander zu (b), so dass ein intraluminaler Pfeiler entsteht (c), indem sich die gegenüberliegenden Endothelzellen miteinander verbinden (d). Durch das weitere Wachstum des Pfeilers wird die Kapillare in zwei neue Kapillaren gespalten (e). (Mit Genehmigung kopiert aus *Intussusceptive angiogenesis: A biologically relevant form of angiogenesis; De Spieghelaere et al., 2012* und in die deutsche Sprache übersetzt.)

Physiologisch spielt Angiogenese im adulten Organismus vor allem eine Rolle bei Gewebeauf- und -abbauprozessen in der Milchdrüse sowie im weiblichen Geschlechtsapparat im Verlauf des Geschlechtszyklus und der Gravidität [52, 82, 109]. Ebenso ist sie an Prozessen der Regeneration und Wundheilung beteiligt [112]. Angiogenese ist jedoch auch von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie zum Beispiel hyperproliferativer Gelenks- und Hauterkrankungen (Arthritiden, Psoriasis) [67, 94], retinaler Störungen (z.B. altersabhängige Makuladegeneration, diabetische Retinopathie) [132] sowie Tumorwachstum [56, 57].

4.2. Angiogeneseforschung

Das Forschungsgebiet der Angiogenese befasst sich unter anderem mit der Entwicklung angiomanipulatorischer Therapien [66, 138]. So unterdrücken antiangiogene Wirkstoffe die Angiogenese und könnten somit pathologische Prozesse, wie zum Beispiel Tumorwachstum, hemmen [45, 55, 64, 84]. Proangiogene Wirkstoffe hingegen fördern die Angiogenese und könnten die Durchblutung ischämischen Gewebes verbessern [34, 60, 64, 123].

Zur Überprüfung anti-/angiogener Wirkstoffe in präklinischen Studien können *in vitro*-, *ex vivo*- sowie *in vivo*-Modelle verwendet werden [8, 32, 64, 127, 130, 131]. Mit dem Ziel, Tierversuche im Sinne des 3R-Konzepts (3R = Replace, Reduce, Refine) nach Russell und Burch [118] zu ersetzen, zu reduzieren oder zu verfeinern, werden viele Substanzen zunächst in *in vitro*- oder *ex vivo*-Modellen getestet [42, 110, 128].

In *in vitro*-Modellen werden isolierte Endothelzellen einer Spezies zusammen mit einem Kultivierungsmedium außerhalb des Organismus in einem Kultivierungsgefäß kultiviert [53, 93]. Sie haben den Vorteil, dass isolierte Prozesse analysiert und somit direkte Effekte auf die Endothelzellen identifiziert werden können. Zudem sind sie schnell durchführbar und leicht zu kontrollieren. Jedoch können die komplexen Regelmechanismen der

tatsächlichen Situation *in vivo* nicht ausreichend berücksichtigt werden, so dass gewonnene Ergebnisse in anschließenden *in vivo*-Modellen überprüft werden müssen [8, 43, 64, 127].

Bei den *ex vivo*-Modellen wird die Injektion einer Substanz in den Tierkörper dadurch umgangen, dass das zur Überprüfung dienende Gewebe/Organ explantiert und zum Beispiel auf Kollagen Typ IV, Fibrin oder Matrigel, einer Mischung aus Proteinen, die von Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkomzellen der Maus sezerniert werden, kultiviert wird [65, 74, 87]. Bekannte *ex-vivo*-Modelle sind zum Beispiel das Ratten- und das Maus-Aorta-Modell [17, 24, 100].

Als *in vivo*-Modelle werden zum Beispiel das Cornea-Modell [23, 63], das Modell der transparenten Rückenhautkammer [6, 22, 47, 91, 106] sowie das Chorioallantoismembran-Modell [9, 102, 103] eingesetzt. Hierbei wird eine zu prüfende Substanz direkt in das Tier beziehungsweise Ei implantiert.

4.2.1. Angiogenese *in vitro*

4.2.1.1. *In vitro*-Modelle

Zur *in vitro*-Kultivierung von Endothelzellen steht dem Wissenschaftler eine große Anzahl unterschiedlicher zwei- und dreidimensionaler Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsmodelle [8, 32, 64, 127, 130, 131, 133] sowie ein all-in-one-Modell [11] zur Auswahl, in denen Endothelzellen in Mono- oder Kokultur kultiviert werden können. Je nach Aufbau existieren mittlerweile unterschiedliche Ausführungen der einzelnen Modelle [8, 32, 64, 127, 130, 131, 133]. Allein im Bereich der Migrationsmodelle haben Kramer et al. [89] zahlreiche unterschiedliche Varianten aufgeführt. Je nach Bedarf werden die Modelle sowohl durch die Firmen, die sie vertreiben, als auch durch den Wissenschaftler, der sie einsetzt, zusätzlich modifiziert [69]. Dieses mannigfaltige Angebot an unterschiedlichen *in vitro*-Modellen erschwert nicht nur die Auswahl eines geeigneten Modells, sondern zum Teil auch die Interpretation dieser Ergebnisse im Kontext mit Ergebnissen anderer Modelle [13, 127].

4.2.1.2. Endothelzellen für *in vitro*-Modelle

Endothelzellen stellen in Bezug auf ihre Morphologie, Funktion sowie Genexpression eine äußerst heterogene Zellgruppe dar [1-4]. Unterschiede existieren zum einen zwischen Endothelzellen unterschiedlicher Organe und Blutgefäßabschnitte, zum anderen aber auch zwischen Endothelzellen unterschiedlicher Zellspender [1, 79, 139]. Invernici et al. [79] konnten nachweisen, dass humane mikrovaskuläre Endothelzellen unterschiedlicher Organe eines Organspenders Unterschiede hinsichtlich der Expression von

Adhäsionsmolekülen aufweisen. Yan et al. [139] hingegen untersuchten das Expressionsprofil von Adhäsionsmolekülen humaner mikrovaskulärer Endothelzellen eines Organs unterschiedlicher Zellspender und konnten ebenfalls Unterschiede feststellen. Dies zeigt, dass der Phänotyp von Endothelzellen sowohl durch den Zellspender als auch das Gewebe, aus dem die Endothelzellen isoliert wurden, geprägt wird [1, 3, 70]. Hinzu kommt, dass Endothelzellen eine gewisse Plastizität besitzen, die es ihnen trotz Differenzierung ermöglicht, sich veränderten Umgebungsbedingungen anpassen zu können [90, 115]. Durch die Isolierung, Kryokonservierung sowie Kultivierung von Endothelzellen kann es daher zu Veränderungen ihres spezifischen Phänotyps kommen [26, 59, 90, 93, 111, 115].

Zur Durchführung von *in vitro*-Studien zur Angiogenese können primäre humane Endothelzellen unterschiedlicher Organe und Zellspender von zahlreichen Firmen in vitaler oder kryokonservierter Form käuflich erworben werden. Laut Angaben dieser kommerziellen Firmen werden die Endothelzellen im Rahmen der Qualitätskontrolle vor dem Verkauf für einen gewissen Zeitraum kultiviert. Dies dient der Bestimmung der Populationsverdopplung, der Effizienz beim Anwachsen und einiger weiterer Zellkulturparameter. Die Ergebnisse können dem dazugehörigen Analysezertifikat entnommen werden. Es gibt weiterhin Auskunft über Alter, Geschlecht und Abstammung des Zellspenders sowie den negativen Nachweis bezüglich bestimmter Viren und Bakterien. Durch den Nachweis, dass über 90% der isolierten und kultivierten Endothelzellen CD 31 exprimieren, acLDL (acetyliertes Low Density Lipoprotein) aufnehmen sowie vWF (von-Willebrand-Faktor)-positiv und alpha-smooth-muscle-Aktin-negativ sind, versuchen die kommerziellen Firmen zu garantieren, dass es sich bei den in der jeweiligen Charge enthaltenen Zellen - unter Verwendung der firmeneigenen Kultivierungsmedien, Reagenzien und Protokolle - um Endothelzellen handelt. Angaben über ihre angiogene Potenz bzw. ihre Fähigkeit, kapillarähnliche Strukturen ausbilden zu können, werden jedoch nicht gemacht. Manche Firmen bieten Endothelzellchargen an, deren Responsivität gegenüber VEGF-A in einem einfachen Proliferationstest signifikant positiv ist. Jedoch wird dieser Test nicht bei allen Endothelzellchargen routinemäßig durchgeführt.

4.2.1.3. Beschichtung des Kultivierungsgefäßes

Endothelzellen sind adhärente Zellen, die sich an die Oberfläche des Kultivierungsgefäßes anheften [59]. Die Aussaat der Endothelzellen erfolgt zumeist in unbeschichteten oder beschichteten Kultivierungsgefäßen [53, 93]. Zum Teil werden die Zellen auch auf einem Zwischenmedium, wie zum Beispiel einem Membranfilter, Glas- oder Thermax®-Plättchen, ausgesät, um für weitere Untersuchungen den geschlossenen Zellrasen oder kapillarähnliche Strukturen unversehrt dem Kultivierungsgefäß entnehmen zu können [71, 101]. Eine Beschichtung mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix und Adhäs-

sionsfaktoren, wie zum Beispiel Laminin, Fibronektin, Kollagen oder Gelatine, kann die Zellen in ihrem Wachstum unterstützen [44, 85, 93, 133]. Bei der Wahl der Beschichtung ist jedoch zu beachten, dass manche Substanzen durchaus Einfluss auf die angiogene Potenz von Endothelzellen haben können [30, 44, 93, 127, 130]. Jegliche Veränderung in der Zusammensetzung oder molekularen Beschaffenheit der Beschichtung kann daher die angiogene Potenz kultivierter Endothelzellen beeinflussen [37, 38, 44, 73, 88, 92, 127, 137]. Den größten aktivierenden Einfluss auf die Ausbildung kapillärähnlicher Strukturen scheint Matrigel zu besitzen [8, 35, 127]. Auerbach et al. [8] und Donovan et al. [43] beobachteten, dass Matrigel selbst nicht-endotheliale Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten, zur Ausbildung kapillärähnlicher Strukturen stimulieren kann. Jedoch ist bei der Verwendung von Matrigel auch zu berücksichtigen, dass seine Zusammensetzung Chargebedingten Schwankungen unterliegen kann [8].

4.2.1.4. Kultivierungsmedium

Hinsichtlich eines geeigneten proangiogenen Kultivierungsmediums empfehlen die Firmen, die Endothelzellkulturen kommerziell anbieten, ein firmeneigenes, speziell auf diese Zellen abgestimmtes Medium. Meist handelt es sich hierbei um ein Basalmedium, dem unterschiedliche proangiogene Wachstumsfaktoren sowie fetales Kälberserum (FBS) in definierten Konzentrationen zugeführt werden können. Manche Firmen verwenden anstelle der einzeln zuzugebenden Wachstumsfaktoren das „Endothelial Cell Growth Supplement“ (ECGS), ein kaum definierter Extrakt aus dem Rinderhirn, der unter anderem unterschiedliche Konzentrationen der proangiogenen Wachstumsfaktoren FGF-1 und -2 (Fibroblast Growth Factor-1 und -2) enthält [105]. Die Zusammensetzung von ECGS und FBS kann jedoch von Charge zu Charge sehr variabel sein [27, 120]. Bryan et al. [27] konnten belegen, dass die Verwendung unterschiedlicher FBS-Chargen bereits dazu führen kann, dass kultivierte Endothelzellen Unterschiede hinsichtlich ihrer Antigen-Expression aufweisen. Die Morphologie und Funktion kultivierter Endothelzellen kann daher entscheidend von der Zusammensetzung des Kultivierungsmediums abhängen [13, 19, 39, 85, 93]. Bei der Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Herz und der neonatalen Haut mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A, FGF-2 sowie deren Kombination beobachteten Bahrami et al. [13] bei beiden Endothelzellkulturen morphologische Unterschiede in der Ausbildung angiogener Strukturen: Während die Kultivierung mit FGF-2 sowie der Kombination aus beiden Wachstumsfaktoren zur Ausbildung regulärer kapillärähnlicher Strukturen führte, bildeten die Endothelzellkulturen bei der Kultivierung mit VEGF-A eher irreguläre endotheliale Strukturen aus. De Spieghelaere et al. [39] kultivierten diese Endothelzellen mit den Wachstumsfaktoren Angiopoietin 1- und -2 (Ang-1 und Ang-2) und stellten dabei fest, dass die Angiopoietine eine unterschiedliche angiogene Wirkung in Abhängigkeit von der Anwesenheit weiterer Wachstumsfaktoren, aber auch in Bezug auf die Kultivierung unterschiedlicher Endothelzellkul-

turen aufweisen können. Während sie humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der neonatalen Haut zur moderaten Angiogenese stimulieren konnten, zeigten sie bei der Kultivierung mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Herz keinerlei angiogene Wirkung. Benest et al. [19] konnten bei der Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Haut und humaner makrovaskulärer Endothelzellen aus der Nasalvene mit den Wachstumsfaktoren VEGF-A und Ang-1 ebenfalls beobachten, dass die Wirkung dieser Wachstumsfaktoren unter anderem davon abhängen kann, an welchen Endothelzellen sie eingesetzt werden.

5. Ziel dieser Arbeit

Zur Quantifizierung der Angiogenese *in vitro* haben Bahramioltani und Plendl [11] ein all-in-one-Modell etabliert, das darauf basiert, die morphologischen Veränderungen der kultivierten Endothelzellen im Verlauf der angiogenen Kaskade definierten Stadien zuzuordnen. Für die Kultivierung humaner Endothelzellen wurden folgende Stadien definiert: Stadium 1 - konfluenter Monolayer, Stadium 2 - Sprossen der Endothelzellen, Stadium 3 - lineare Aneinanderlagerung der Endothelzellen, Stadium 4 - Ausbildung eines Netzwerks, Stadium 5 - frühe Phase der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen zu kapillarähnlichen Strukturen, Stadium 6 - späte Phase der dreidimensionalen Organisation [13, 16]. Bei der Kultivierung primärer humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Herz (HCMEC; HMVEC-C Cardiac MV Endo Cells, Lonza, Verviers, Belgien), der neonatalen Haut (HDMEC-1; HMVEC-dBI Neo, Lonza, Verviers, Belgien), der adulten Haut (HDMEC-2; HMVEC-F, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland) und der Lunge (HPMEC; HPMEC, Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) in diesem all-in-one-Modell konnten Bahramioltani und Plendl [12] beobachten, dass trotz des Einsatzes der von den jeweiligen Firmen empfohlenen proangiogenen Kultivierungsmedien (EGM[®]-2MV Bulletkit, Lonza, Verviers, Belgien; Microvascular endothelial cell growth medium, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland; Endothelial Cell Growth Medium MV, Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) nicht alle Endothelzellen zur Angiogenese stimuliert werden konnten: Während die Endothelzellen aus dem Herz und der neonatalen Haut innerhalb von 60 Kultivierungstagen alle Stadien der angiogenen Kaskade bis hin zu Bildung kapillarähnlicher Strukturen durchliefen, zeigten die Endothelzellen aus der adulten Haut eine sehr geringe angiogene Potenz, indem sie lediglich einen Monolayer (Stadium 1) ausbildeten [12, 16]. Die Endothelzellen aus der Lunge konnten bis zum 28. Kultivierungstag zur linearen Aneinanderreihung (Stadium 3) stimuliert werden, welche jedoch ab dem 30. Kultivierungstag zurückgebildet wurde (Stadium 2 bzw. 1). Ihre angiogene Potenz schien ebenfalls sehr gering zu sein [12, 16].

Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass Endothelzellen, die in einem Angiogenese-Modell mit proangiogenem Kultivierungsmedium kultiviert werden, deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer angiogenen Potenz aufweisen können.

Veröffentlichungen, die nicht-angiogene Endothelzellen *in vitro* thematisieren, sind rar. Die Literaturdatenbank PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) liefert zum Suchfeld „non-angiogenic endothelial cells in vitro“ lediglich 12 Treffer. Die Hintergründe für das Auftreten nicht-angiogener Endothelzellen *in vitro* sind weitestgehend unbekannt. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, mögliche Ursachen für eine unterschiedliche angiogene Potenz kultivierter humaner mikrovaskulärer Endothelzellen systematisch zu untersuchen.

6. Verwendete Zellen und Methoden

Die in den Studien dieser Arbeit verwendeten Endothelzellen wurden von drei verschiedenen Firmen käuflich erworben. Sie unterschieden sich zum einen hinsichtlich der Organe, aus denen sie isoliert wurden, zum anderen hinsichtlich ihrer Zellspender. Sie wurden in dem all-in-one-Modell nach Bahrami und Plendl [11] auf gelatinisierten 24-Well-Platten in Monokultur mit den von den Firmen empfohlenen proangiogenen Kultivierungsmedien kultiviert (EGM®-2MV Bulletkit, Lonza, Verviers, Belgien; Microvascular endothelial cell growth medium, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland; Endothelial Cell Growth Medium MV, Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die verwendeten Kultivierungsmedien wiesen Unterschiede hinsichtlich ihrer Zusammensetzung auf.

In der ersten Studie dieser Arbeit wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Herz (HCMEC; HMVEC-C Cardiac MV Endo Cells, Lonza, Verviers, Belgien), der adulten Haut (HDMEC-2; HMVEC-F, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland) sowie der Lunge (HPMEC; HPMEC, Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) sowohl in ihrem firmeneigenen Kultivierungsmedium als auch in den Kultivierungsmedien der anderen beiden Firmen sowie in Kombinationen aus den genannten Medien über einen Zeitraum von 60 Tagen kultiviert. So konnte zum einen die Auswirkung unterschiedlicher Kultivierungsmedien auf die angiogene Potenz der jeweiligen Endothelzellen beurteilt werden, zum anderen war es möglich, unterschiedliche Endothelzellen in identischen Medien gegenüberzustellen, um die angiogene Potenz in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Endothelzellen bewerten zu können.

In der zweiten Studie dieser Arbeit wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der neonatalen Haut (HDMEC-1; HMVEC-dBI Neo, Lonza, Verviers, Belgien) zweier unterschiedlicher Zellspender unter identischen Kultivierungsbedingungen kultiviert und

somit der Einfluss des Zellspenders auf die angiogene Potenz der Endothelzellen untersucht.

In der dritten, unveröffentlichten Studie dieser Arbeit wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Herz (HCMEC; HMVEC-C Cardiac MV Endo Cells, Lonza, Verviers, Belgien) langzeitkultiviert und die angiogene Potenz der Endothelzellen innerhalb einer Kultur untersucht.

7. Publikationen

Die Forschungsergebnisse der vorliegenden Qualifikationsarbeit wurden als Originalartikel in einer internationalen Fachzeitschrift mit Gutachtersystem publiziert.

In vitro angiogenic potency in human microvascular endothelial cells derived from myocardium, lung and skin

Henrieke Sievers, Mahtab Bahrami, Sabine Käßmeyer and Johanna Plendl

Clinical Hemorheology and Microcirculation **49** (2011), S. 473-486

DOI 10.3233/CH-2011-1497

Human microvascular endothelial cells displaying reduced angiogenesis and increased uptake of lipids during *in vitro* culture

Henrieke Sievers, Ruth M. Hirschberg, Bernhard Hiebl, Hana Hünigen and Johanna Plendl

Clinical Hemorheology and Microcirculation **61** (2015), S. 367-383

DOI 10.3233/CH-152002

Beide Publikationen sind entsprechend den Vorgaben der Fachzeitschrift aufgebaut.

7.1. *In vitro* angiogenic potency in human microvascular endothelial cells derived from myocardium, lung and skin

Henrieke Sievers^{a,*}, Mahtab Bahrami Soltani^b, Sabine Käßmeyer^a and Johanna Plendl^a

^a*Institute of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany*

^b*Institute of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany*

*Corresponding author: Henrieke Sievers, Institute of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Kossestraße 20, 14195 Berlin, Germany
Tel.: +49 30 83853560; Fax: +49 30 83853480; E-Mail: sievers.henrieke@vetmed.fu-berlin.de

Clinical Hemorheology and Microcirculation **49** (2011), S. 473-486

DOI 10.3233/CH-2011-1497

IOS Press

With 6 figures and 3 tables

Reprinted from Clinical Hemorheology and Microcirculation, Volume 49, Henrieke Sievers, Mahtab Bahrami Soltani, Sabine Käßmeyer and Johanna Plendl, *In vitro* angiogenic potency in human microvascular endothelial cells derived from myocardium, lung and skin, pages 473-486, Copyright (2011), with permission from IOS Press.

Abstract

Human microvascular endothelial cells derived from myocardium (HCMEC), lung (HPMEC) and foreskin (HDMEC) showed different angiogenic potency when cultivated in their original growth media provided by the distributors. In order to standardize microenvironmental conditions in an all-in-one assay of angiogenesis the aim of this study was to find one optimal growth medium for the endothelial cells derived from the different organs. Therefore each endothelial cell type was cultivated under identical conditions in the different original growth media as well as in several media formulations of the original growth media.

Results reveal that even if cultivated in the same growth medium under exactly the same cultivation conditions – over a prolonged time period of 60 days – the endothelial cells still showed different angiogenic potency. This is due to a combination of extrinsic factors, i.e., the isolation procedure and in particular the growth medium, as well as to intrinsic differences between cells of diverse origin.

Keywords: Human microvascular endothelial cells, myocardium, lung, foreskin, angiogenic potency, growth medium

1. Introduction

Angiogenesis includes the sprouting of new vessels from pre-existing ones as well as their remodelling and regression [38].

In vitro the angiogenic cascade starts with endothelial activation resulting in the degradation of the basal membrane, followed by migration, proliferation and three-dimensional organization of endothelial cells as well as lumenization of new sprouts. Finally endothelial secretion of basal membrane components stabilizes the newly formed vessels [6, 14].

Many *in vitro* angiogenesis assays have been developed to test potential pro- and anti-angiogenic drugs and to investigate their mode of action. In order to create a validated system that allows quantitation of angiogenesis *in vitro*, an all-in-one assay was established in our laboratory [7-9, 17]. This assay is based on staging of the angiogenic cascade. Briefly, endothelial cells proliferated upon seeding onto culture dishes and formed a confluent monolayer (stage 1), from which *in vitro* angiogenesis commenced. The angiogenic cascade of human microvascular endothelial cells was classified into the following stages on the basis of phase-contrast microscopic examination: Stage 1, confluent monolayer of polygonal shaped endothelial cells; stage 2, endothelial cell sprouting (>50% elongated shaped endothelial cells); stage 3, linear side-by-side arrangement of endothelial cells (>50% linearly arranged cells); stage 4, networking of linearly arranged endothelial cells.

lial cells; stage 5, formation of a three-dimensional network of capillary-like structures (early phase: Formation of capillary-like structures of endothelial cells with an internal lumen and a diameter of more than 28 µm); stage 6, formation of a three-dimensional network of capillary-like structures (late phase: All endothelial cells are included in the capillary-like structures; dissolution of the cell layer on the bottom) (Table 3).

Examining human endothelial cells derived from myocardium, lung and foreskin in this all-in-one assay, marked differences were detected in the angiogenic potency of the cells. Human microvascular endothelial cells derived from myocardium (HCMEC) ran through all defined stages of angiogenesis within 60 days (stage 1- 6). Endothelial cells derived from lung (HPMEC) aligned linearly (stage 3) until day 28 and regressed to former stages from day 30 onward. Endothelial cells derived from foreskin (HDMEC) developed into a confluent monolayer (stage 1) and remained in this stage during the whole cultivation period.

The endothelial cells used in this all-in-one assay were purchased from different distributors, who delivered a specific original growth medium for their endothelial cells. In order to standardize microenvironmental conditions for this all-in-one assay the aim of this study was to find one optimal growth medium for these endothelial cells derived from different organs. Therefore each endothelial cell type was cultivated under identical conditions in the different original growth media as well as in several media formulations of the original growth media for up to 60 days (Table 2).

2. Materials and methods

2.1 Human endothelial cells and growth media

The study was performed in accordance to the ethical guidelines of this journal [4].

Human microvascular endothelial cells derived from adult myocardium (HCMEC) and their original growth medium (medium A) provided by the distributor were purchased from Lonza (Verviers, Belgium; original catalogue cell culture name: HMVEC-C Cardiac MV Endo Cells; original catalogue medium name: EGM®-2MV Bulletkit®).

Human microvascular endothelial cells derived from adult lung (HPMEC) and their original growth medium (medium B) provided by the distributor were purchased from Promocell GmbH (Heidelberg, Germany; original catalogue cell culture name: HPMEC; original catalogue medium name: Endothelial Cell Growth Medium MV).

Human microvascular endothelial cells derived from adult foreskin (HDMEC) and their original growth medium (medium C) provided by the distributor were purchased from Provitro GmbH (Berlin, Germany; original catalogue cell culture name: HMVEC-F; original catalogue medium name: Microvascular endothelial cell growth medium).

The particulars of growth media composition disclosed by the distributors are given in Table 1.

Table 1

Original media for the different endothelial cell types provided by the distributors. Concentration of the growth supplements in 500ml medium

Supplements	Medium A	Medium B	Medium C
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	-	4µl/ml ECGS	4µl/ml ECGS/ Heparin (3mg/ml)
VEGF	1µl/ml	-	-
hFGF-B	4µl/ml	-	-
R ³ -IGF-1	1µl/ml	-	-
hEGF	1µl/ml	10ng/ml	10ng/ml
FBS	50µl/ml	50µl/ml	50µl/ml
Hydrocortisone	0,4µl/ml	1µg/ml	1µg/ml
Heparin	-	90µg/ml	see ECGS
Gentamicin/ Amphotericin B	1µl/ml GA-1000	10µl/ml 0,2µg/ml	50µg/ml 50ng/ml

Table 2

Different media formulations in which each endothelial cell type was incubated

Media formulations	Human microvascular endothelial cells		
	Myocardial (HCMEC)	Lung (HPMEC)	Foreskin (HDMEC)
Media formulation 1	100% medium A (control)	100% medium B (control)	100% medium C (control)
Media formulation 2	50% medium A + 50% medium B	50% medium B + 50% medium A	50% medium C + 50% medium A
Media formulation 3	100% medium B	100% medium A	100% medium A
Media formulation 4	50% medium A + 50% medium C	50% medium B + 50% medium C	50% medium C + 50% medium B
Media formulation 5	100% medium C	100% medium C	100% medium B

2.2 Cell culture

The endothelial cells derived from different organs were cultivated over a period of 60 days on gelatin-coated 24-well-plates (Iwaki; Tokyo, Japan). Cells were used in the sixth passage in a concentration of 4.5×10^4 cells per well. Each endothelial cell culture was

grown in five different growth media formulations. These included the three different original growth media as well as a mixture of 50% original growth medium plus 50% non-original growth medium (Table 2). The endothelial cells were incubated for up to 60 days at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere (INCO2/1, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany). The medium was refreshed every 3-4 days.

Table 3

Definition of stages of angiogenesis *in vitro* and description of cell morphology within the different stages [7]

Stage no.	Morphology of endothelial cells
Stage 1	Confluent monolayer Polygonal shaped cells
Stage 2	Endothelial sprouting > 50% elongated shaped cells
Stage 3	Linear side by side arrangement > 50% linearly arranged cells
Stage 4	Networking Network of linearly arranged cells
Stage 5	Three-dimensional organisation, early phase Appearance of capillary-like structures (linear structures of endothelial cells with a diameter of more than 28 µm; for these structures an internal lumen was shown by electron microscopy)
Stage 6	Three-dimensional organisation, late phase All linearly arranged cells form capillary-like structures; dissolution of the cell layer on the bottom

2.3 Phase-contrast microscopy of the cultures

Phase-contrast microscopy was carried out every 3-4 days applying an inverted microscope (Axiovert 25; Zeiss, Jena, Germany). Digital pictures were taken on the 13th, 36th and 60th day of cultivation with a video camera (colorView II; Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster, Germany) and the image editing system analysis docu (Version 5.0; Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster, Germany).

3. Results

The changes of endothelial cell morphology observed in the course of the angiogenic cascade *in vitro* were associated with the previously classified six defined stages (Table 3).

3.1 Human microvascular endothelial cells derived from myocardium (HCMEC)

Incubated in their original growth medium (medium A) HCMEC ran through all stages of the angiogenic cascade within 60 days. Endothelial cells proliferated strongly, formed a monolayer (stage 1) and already after 28 days, they built a cellular network on top of this monolayer (stage 4). The first capillary-like structures were observable on day 42 (stage 5), of which the number increased up to day 56, while the underlying monolayer dissolved (stage 6) (Figure 1a₁ and 1a₂).

In comparison to HCMEC cultivated in their original growth medium (medium A), HCMEC supplied with 50% medium A and 50% medium B (Figure 1b₁ and 1b₂) or with 100% medium B respectively (Figure 1c₁ and 1c₂) started a slower run through the stages of the angiogenic cascade, as they reached stage 3 on day 28. Furthermore these cells remained in stage 3 until day 60.

HCMEC incubated in 50% medium A and 50% medium C reached stage 3 of the angiogenic cascade after 18 days. However, angiogenesis did not proceed to a further stage but declined to stage 2 at day 32. Until day 42 of cultivation most of the cells were found detached from the bottom of the culture plate (Figure 1d₁ and 1d₂).

HCMEC incubated in 100% medium C grew in a confluent monolayer on day 11 (stage 1). No angiogenic activity was seen in the culture dish. Until the 42nd day of cultivation most of the cells were found detached from the bottom of the culture plate (Figure 1e₁ and 1e₂).

The time-dependent course of the angiogenic cascade of these endothelial cells cultivated in the different media formulations is shown in Figure 4.

3.2 Human microvascular endothelial cells derived from lung (HPMEC)

Incubated in their original growth medium (medium B) HPMEC built up a monolayer and began to form an angiogenic cellular network on top of this monolayer (stage 4) on day 13. After that period, the endothelial cells did not progress to further stages of the angiogenic cascade but regressed to stage 3 and remained in this stage until day 60 (Figure 2a₁ and 2a₂).

HPMEC incubated in 50% medium B and 50% medium A grew in a confluent monolayer (stage 1) at day 8. From day 36 until day 60 the angiogenic stage of cells switched between stage 3 and 4 (Figure 2b₁ and 2b₂) but did not proceed to stage 5 or 6 of the angiogenic cascade.

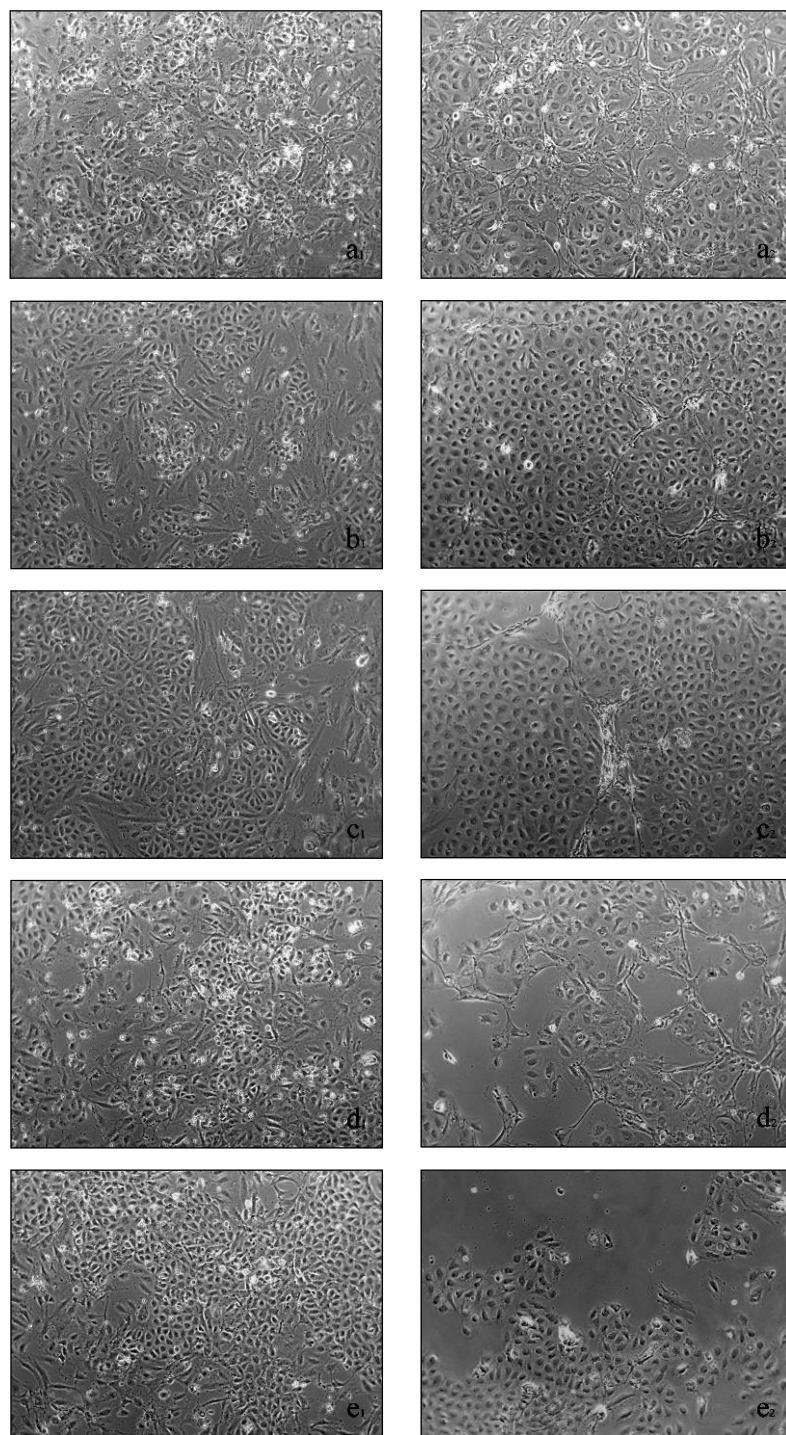


Fig. 1. Digital pictures of HCMEC on the 13th and 36th cultivation day in the five different media formulations. a₁) HCMEC in original medium (medium A) after 13 cultivation days, 100x, a₂) HCMEC in original medium (medium A) after 36 cultivation days, 100x, b₁) HCMEC in 50% medium A + 50% medium B after 13 cultivation days, 100x, b₂) HCMEC in 50% medium A + 50% medium B after 36 cultivation days, 100x, c₁) HCMEC in 100% medium B after 13 cultivation days, 100x, c₂) HCMEC in 100% medium B after 36 cultivation days, 100x, d₁) HCMEC in 50% medium A + 50% medium C after 13 cultivation days, 100x, d₂) HCMEC in 50% medium A + 50% medium C after 36 cultivation days, 100x, e₁) HCMEC in 100% medium C after 13 cultivation days, 100x, e₂) HCMEC in 100% medium C after 36 cultivation days, 100x.

HPMEC incubated in 100% medium A already aligned linearly (stage 3) at day 13 and began forming a network on top of the cellular monolayer (stage 4) from day 60 (Figure 2c₁ and 2c₂).

HPMEC supplied with 50% medium B and 50 % medium C started to align linearly at day 28 (stage 3) and remained in this stage until day 60 (Figure 2d₁ and 2d₂).

HPMEC supplied with 100 % medium C started to align linearly at day 13 (stage 3) and remained in this stage until day 60 (Figure 2e₁ and 2e₂).

The time-dependent course of the angiogenic cascade of these endothelial cells cultivated in the different media formulations is shown in Figure 5.

3.3 Human microvascular endothelial cells derived from foreskin (HDMEC)

Incubated in their original medium (medium C) the endothelial cells started sprouting (stage 2) at day 18 and remained in this stage until day 60 (Figure 3a₁ and 3a₂).

HDMEC incubated in 50% medium C and 50% medium A (Figure 3b₁ and 3b₂) or 100% medium A respectively (Figure 3c₁ and 3c₂) developed into a confluent monolayer (stage 1) from day 8 on and remained in this stage during the whole cultivation period, i.e. until day 60.

Incubated in 50% medium C and 50% medium B cellular sprouting of HDMEC was recognizable from day 18 on (stage 2), however until day 60 this sprouting regressed and endothelial cells finally formed the confluent monolayer of stage 1 again (Figure 3d₁ and 3d₂).

Cultivation in 100% medium B a sprouting of HDMEC was recognizable from day 21 on (stage 2). From day 36 on, they aligned linearly (stage 3) and remained in this stage until day 60 (Figure 3e₁ and 3e₂).

The time-dependent course of the angiogenic cascade of these endothelial cells cultivated in the different media formulations is shown in Figure 6.

4. Discussion

Human microvascular endothelial cells derived from myocardium (HCMEC), lung (HPMEC) and foreskin (HDMEC) showed different angiogenic potency when cultivated in their original growth media provided by the distributors. In order to standardize microenvironmental conditions in an all-in-one assay of angiogenesis the aim of this study was to find one optimal growth medium for the endothelial cells derived from the different organs.

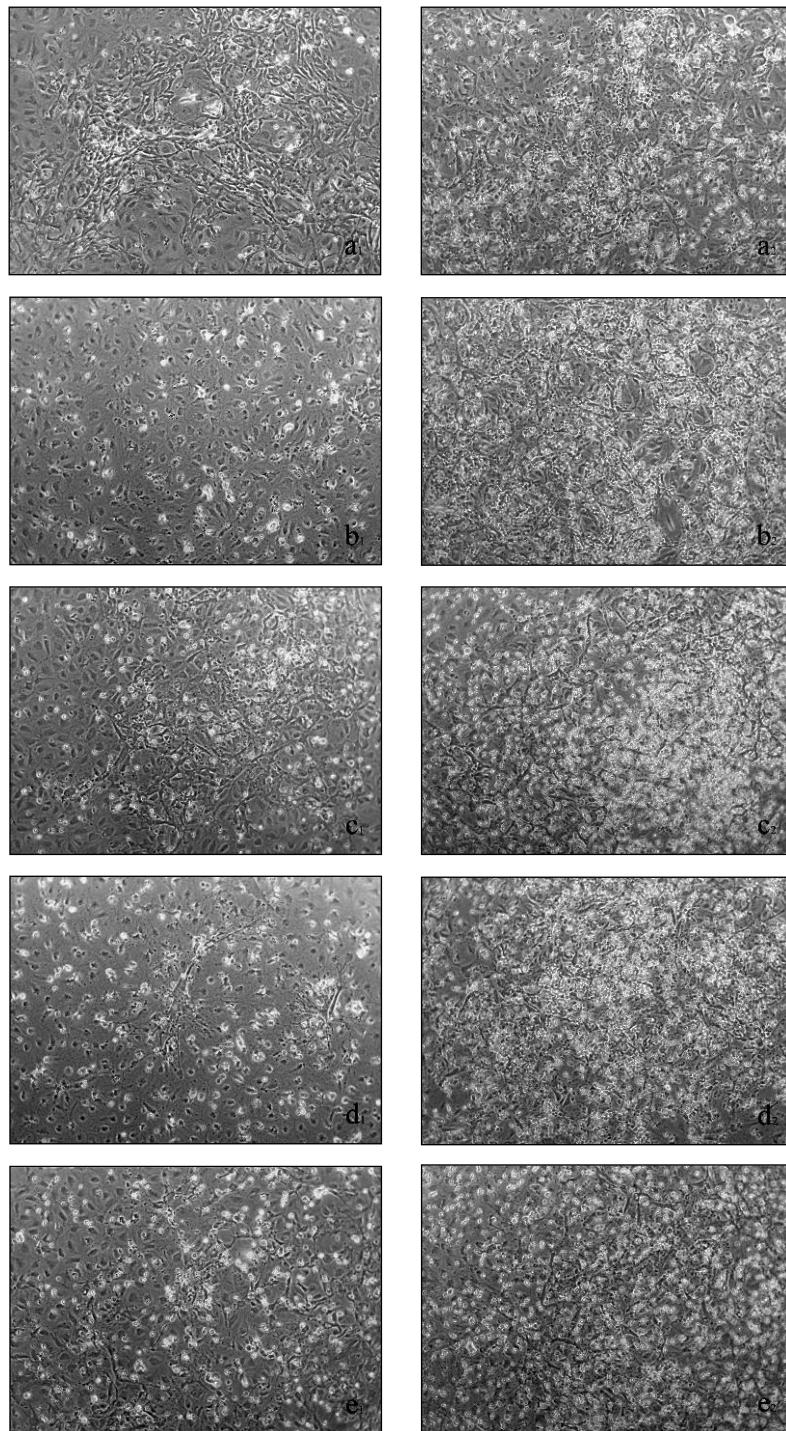


Fig. 2. Digital pictures of HPMEC on the 13th and 36th cultivation day in the five different media formulations. a₁) HPMEC in original medium (medium B) after 13 cultivation days, 100x, a₂) HPMEC in original medium (medium B) after 36 cultivation days, 100x, b₁) HPMEC in 50% medium B + 50% medium A after 13 cultivation days, 100x, b₂) HPMEC in 50% medium B + 50% medium A after 36 cultivation days, 100x, c₁) HPMEC in 100% medium A after 13 cultivation days, 100x, c₂) HPMEC in 100% medium A after 36 cultivation days, 100x, d₁) HPMEC in 50% medium B + 50% medium C after 13 cultivation days, 100x, d₂) HPMEC in 50% medium B + 50% medium C after 36 cultivation days, 100x, e₁) HPMEC in 100% medium C after 13 cultivation days, 100x, e₂) HPMEC in 100% medium C after 36 cultivation days, 100x.

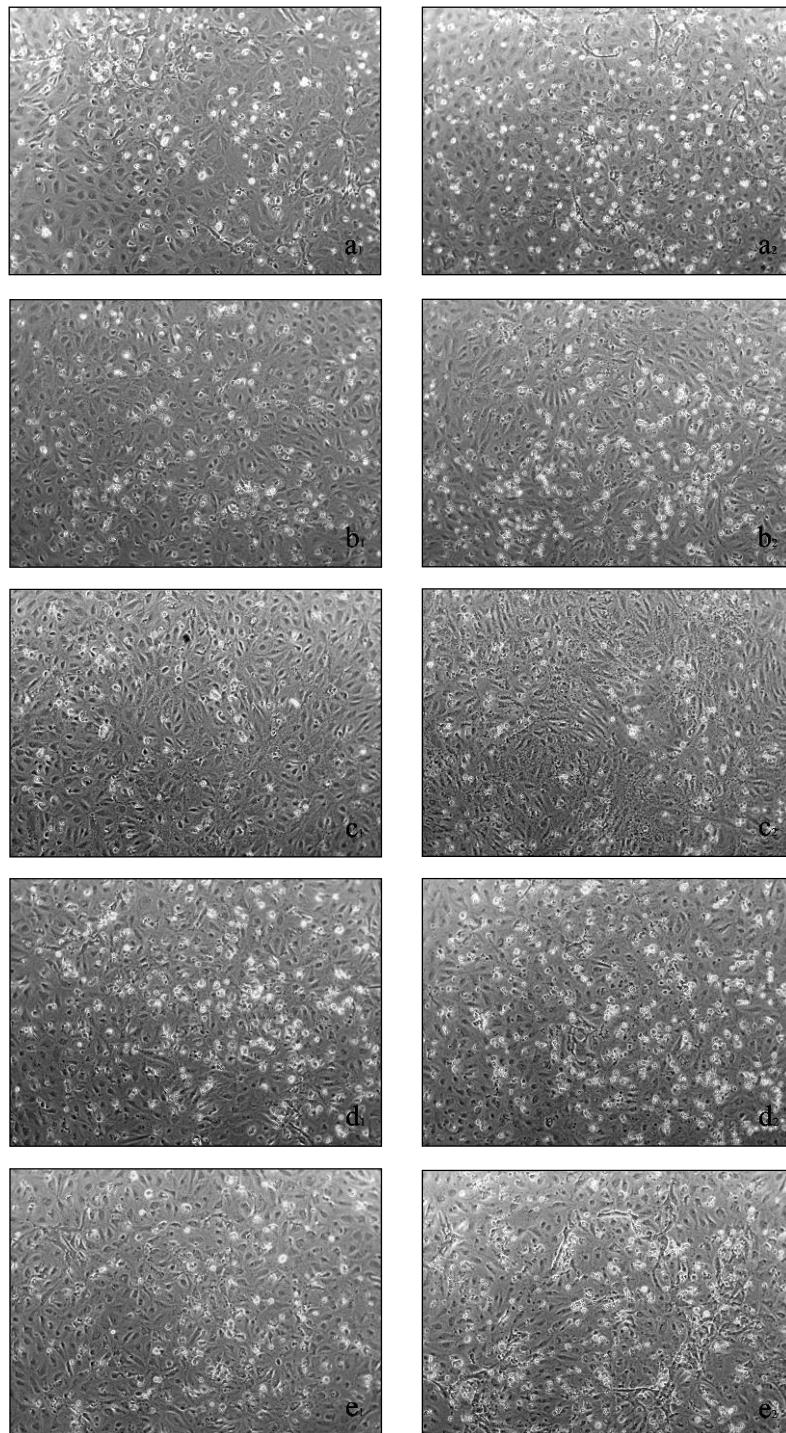


Fig. 3. Digital pictures of HDMEC on the 13th and 36th cultivation day in the five different media formulations. a₁) HDMEC in original medium (medium C) after 13 cultivation days, 100x, a₂) HDMEC in original medium (medium C) after 36 cultivation days, 100x, b₁) HDMEC in 50% medium C + 50% medium A after 13 cultivation days, 100x, b₂) HDMEC in 50% medium C + 50% medium A after 36 cultivation days, 100x, c₁) HDMEC in 100% medium A after 13 cultivation days, 100x, c₂) HDMEC in 100% medium A after 36 cultivation days, 100x, d₁) HDMEC in 50% medium C + 50% medium B after 13 cultivation days, 100x, d₂) HDMEC in 50% medium C + 50% medium B after 36 cultivation days, 100x, e₁) HDMEC in 100% medium B after 13 cultivation days, 100x, e₂) HDMEC in 100% medium B after 36 cultivation days, 100x.

Therefore each endothelial cell type was cultivated under identical conditions in the different original growth media as well as in several media formulations of the original

growth media for up to 60 days. It is known that the growth medium influences cell type, morphology and proliferation of primary cultures and cell lines not only of endothelial but also of other cells [5, 18, 22, 28, 29, 33, 34, 37, 45]. Cells take up microenvironmental signals at the cell surface and process it inside [1, 2]. The most important information of the culture microenvironment *in vitro* includes components of the growth medium [5, 18, 22, 28, 29, 33, 34, 37, 45].

Comparison of the three different growth media in this study revealed that all contained fetal bovine serum (FBS), human Endothelial Growth Factor (hEGF) and hydrocortisone, components frequently used in endothelial growth media.

Medium B and C additionally contained Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) and heparin. ECGS is a poorly defined extract of bovine neural tissue containing acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF), varying concentrations of basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), and various attachment factors that work as signalling molecules. bFGF is the active component in ECGS that signals endothelial cell growth [25].

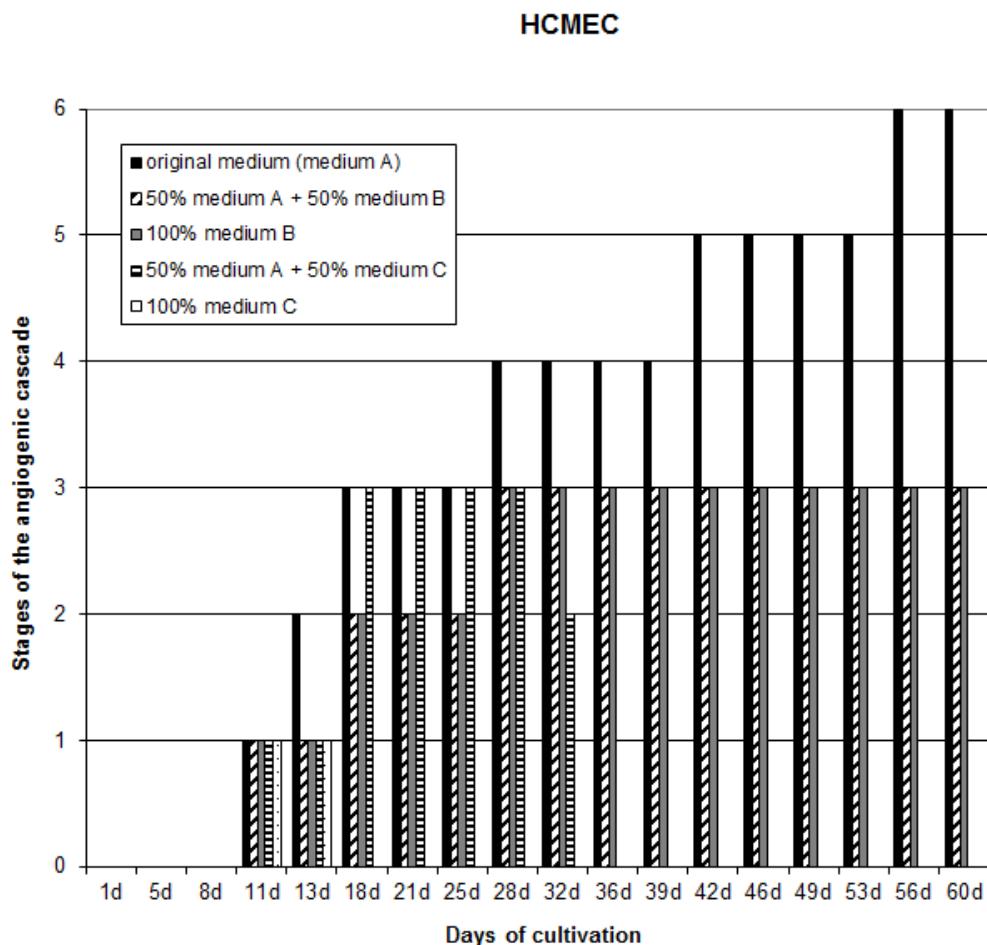


Fig. 4. Time-dependent course of the angiogenic cascade of HCMEC cultivated in original growth medium (medium A), medium B and C.

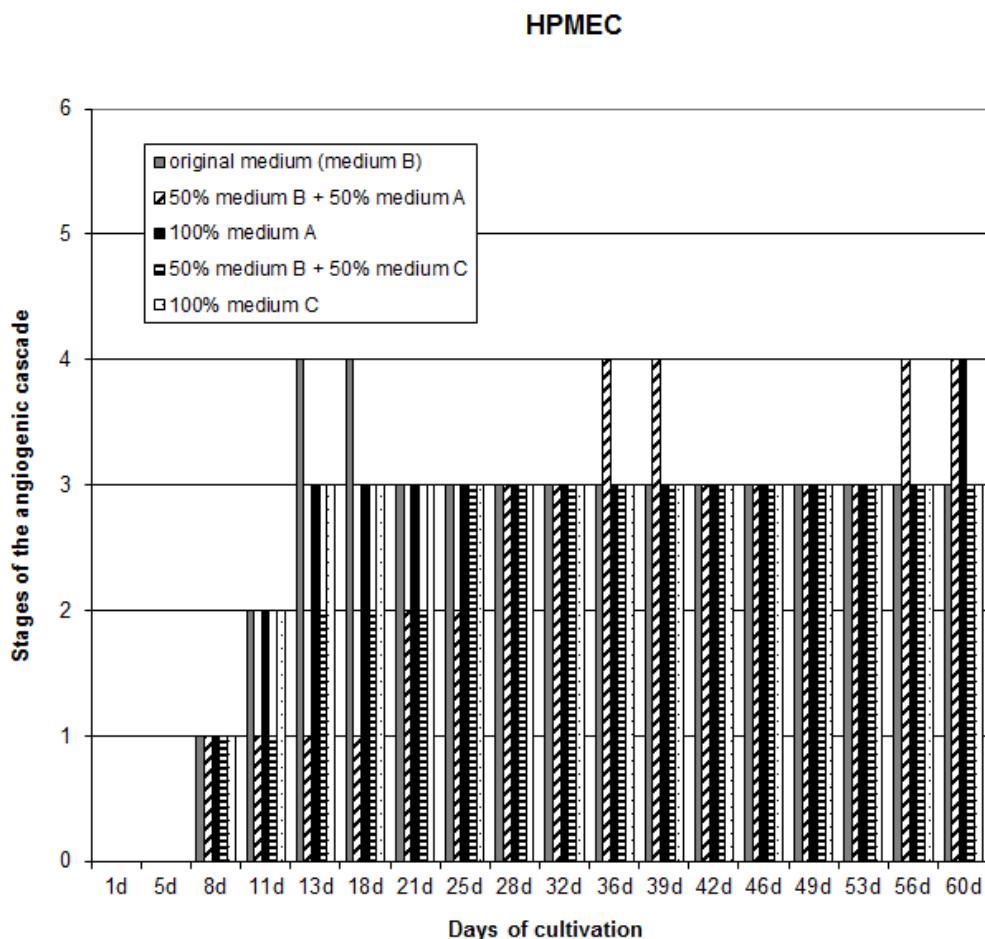


Fig. 5. Time-dependent course of the angiogenic cascade of HPMEC cultivated in original growth medium (medium B), medium A and C.

It induces endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis *in vitro* and regulates the expression of several molecules that are reckoned to mediate critical steps during angiogenesis [10, 13].

Heparin binds to FGF and promotes ligand formation with the receptor of Fibroblast Growth Factor (FGFR) [25].

Medium A did not contain ECGS and heparin but recombinant Insulin-like Growth Factor 1 ($R^3\text{-IGF-1}$), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and bFGF (Table 1). $R^3\text{-IGF-1}$ modulates angiogenesis by up-regulating the expression of VEGF, the major regulator of blood vessel formation and function [43]. Certain endothelial cells like HUVECs grown in a 3D fibrin gel respond stronger to bFGF stimulation than to VEGF. Conversely, VEGF stimulates HUVEC growth in monolayer cultures, and more specifically in the absence of ECGS (i.e., aFGF, bFGF and other growth factors) [22].

Results of this study reveal that even if cultivated in the same growth medium under exactly the same cultivation conditions – over a prolonged time period of 60 days – the endothelial cells still showed different angiogenic potency.

The endothelial cells used in the present study were isolated from myocardium, lung and foreskin. Angiogenic potency *in vivo* and *in vitro* explicitly has been described to be dependent on the organ of origin and even the localisation within one organ bed [3,12,36,40]. For example, Hiebl et al. [24] observed a different sensitivity of microvascular endothelial cells to angiogenic stimuli depending on the tissue from which they were isolated. Moreover, different endothelial proliferation in dorsal versus tail skin was found to be due to genetic heterogeneity of skin microvasculature in mouse models [31].

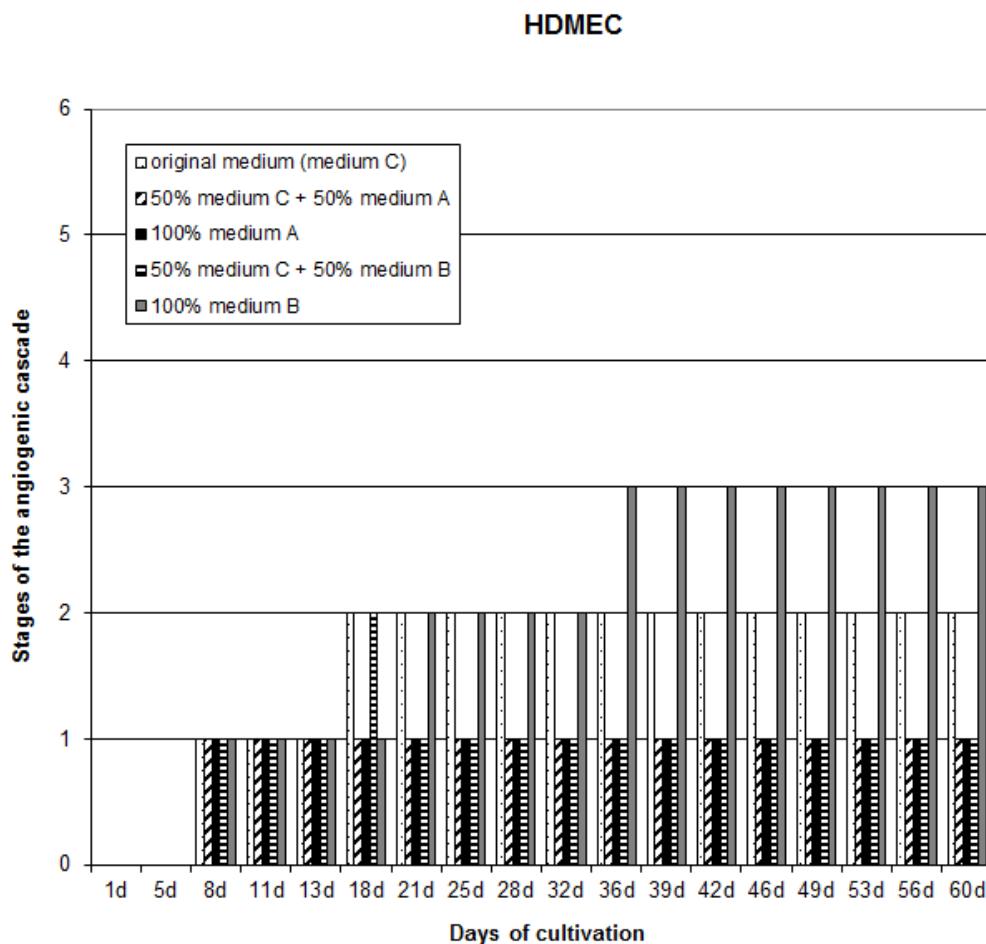


Fig. 6. Time-dependent course of the angiogenic cascade of HDMEC cultivated in original growth medium (medium C), medium A and B.

Another reason for different angiogenic potency may be the blood vessel type from which the endothelial cells have been isolated [40]. Differences between micro- and macrovascular endothelial cells exist because of distinct gene expression profiles that play a role in interaction with extracellular matrix, migration and angiogenesis. The differences in gene expression strongly suggest that endothelial cells from different sites will have corresponding differences in their developmental potential, their response to experimental ma-

nipulation, and their interactions with other cells [11, 16]. King et al. [29] emphasized that rat lung microvascular endothelial cells possess a unique pro-proliferative phenotype that is not present in rat lung macrovascular endothelial cells.

According to the distributors, endothelial cells of our study originate from microvascular blood vessels of adult donors. Therefore differences in angiogenic potency due to different developmental stage as described for juvenile and aged microvascular cells are not likely to play a role [5, 46]. However, no information is available whether the cells have been isolated from venules, arterioles or capillaries. It is known that all segments of the macro- and microvascular system comprise specific populations of endothelial cells, as described for arteries versus veins and pre- or postcapillary versus capillary endothelium [2, 21, 32, 35, 44]. Jung and Franke [26] even demonstrated differences between microvascular endothelial cells in reaction to stress.

The question arises whether the different angiogenic potency observed in the cell cultures examined in the present study is due to *in vitro* cultivation of cells or whether it is also present *in vivo*. When studying the proangiogenic activity of Urotensin-II on different human endothelial cell populations, Albertin et al. [3] found a discrepancy between *in vitro* and *in vivo* results suggesting that the cells need an intact tissue environment for angiogenesis.

An important determinator of angiogenic potency of endothelial cells *in vitro* may be the isolation and harvesting procedure which is stressed by Marin et al. [33]. The distributors of the different endothelial cultures in our study do not reveal their method of isolation. In a critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays, Staton et al. [42] emphasized that cultivation and repeated passaging of original cells changes gene expression and angiogenic potency. Cultivation, harvesting and passaging procedures have been the same throughout our study. Cells were treated with substances of the same batch (for example trypsin) at the same time by the same person in our lab. In all experiments cells of the same passage were used.

Angiogenic potency of endothelial cells *in vitro* and *in vivo* can also be related to the presence of endothelial progenitor cells, i.e., cells with a high proliferative potential [15, 23, 30]. Endothelial progenitors are located in the vascular wall, also in adult organs [20]. Due to enzymatic treatment during the isolation procedure they become part of endothelial cultures. As they share markers with adult endothelial cells they can not readily be identified as progenitors [39]. It has been demonstrated that highly proliferative microvascular cultures from the adult bovine corpus luteum contain endothelial progenitors [27]. Further studies should clarify whether different angiogenic potency of endothelial cells is a consequence of the presence of endothelial progenitors.

In conclusion, the present study underlines that standardization of microenvironmental conditions for different endothelial cells can not be achieved by incubating the cells in the same growth medium - even over a prolonged time period - because different angiogenic potency of endothelial cells *in vitro* result from a combination of intrinsic differences be-

tween cells of diverse origin as well as extrinsic factors, i.e., the isolation procedure and the growth medium. The individual phenotypic response of each cell to the microenvironment is reflected in gene and/or protein expression that are determining for angiogenic potency [1, 2, 19, 41]. This has to be taken into consideration when *in vitro* angiogenesis is assessed.

Acknowledgements:

The authors wish to acknowledge Mrs. Ilka Slosarek for excellent technical assistance and Mr. Olof Krueger for language revision.

References

- [1] W.C. Aird, Endothelial cell heterogeneity, *Crit Care Med* **31** (2003), 221-230.
- [2] W.C. Aird, Mechanisms of endothelial heterogeneity in health and disease, *Circ Res* **98** (2006), 159-162.
- [3] G. Albertin, D. Guidolin, E. Sorato, R. Spinazzi, A. Mascalini, B. Oselladore, M. Montopoli, M. Antonello and D. Ribatti, Pro-angiogenic activity of urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations, *Regulatory Peptides* **157** (2009), 64-71.
- [4] Anonymous, Ethical guidelines for publication in Clinical Hemorheology and Microcirculation, *Clin Hemorheol Microcirc* **44** (2010), 1-2.
- [5] W.T. Arthur, R.B. Vernon, E.H. Sage and M.J. Reed, Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice, *Microvasc Res* **55** (1998), 260-270.
- [6] R. Auerbach, R. Lewis, B. Shinnars, L. Kubai and N. Akhtar, Angiogenesis assays: A critical overview, *Clin Chem* **49** (2003), 32-40.
- [7] M. Bahrami-Soltani, W. De Spieghelaere, P. Janczyk, B. Hiebl, P. Cornillie and J. Plendl, Quantitation of angiogenesis *in vitro* induced by VEGF-A and FGF-2 in two different human endothelial cultures – an all-in-one assay, *Clin Hemorheol and Microcirc* **45** (2010), 1-14.
- [8] M. Bahrami-Soltani and J. Plendl, Different antiangiogenic effects of angiostatin and suramin – a quantitative *in vitro* study, *APMIS* **115** (2007), 30-46.
- [9] M. Bahrami-Soltani and J. Plendl, Ein neues *in vitro*-Modell zur Quantifizierung der Angiogenese, *ALTEX* **21** (2004), 227-244.
- [10] C. Basilico and D. Moscatelli, The FGF family of growth factors and oncogenes, *Adv Cancer Res* **59** (1992), 115-165.
- [11] M. Bastaki, E.E. Nelli, P. Dell'Era, M. Rusnati, M.P. Molinari-Tosatti, S. Parolini, R. Auerbach, L. Ruco, L. Possati and M. Presta, Basic fibroblast growth factor-induced an-

- giogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17** (1997), 454-464.
- [12] Y. Baumer, S. Burger, F.E. Curry, N. Golenhofen, D. Drenckhahn, J. Waschke, Differential role of Rho GTPases in endothelial barrier regulation dependent on endothelial cell origin, *Histochem Cell Biol* **129** (2008), 179-191.
- [13] A. Bikfalvi, S. Klein, G. Pintucci and D.B. Rifkin, Biological roles of fibroblast growth factor-2, *Endocrine Reviews* **18** (1997), 26-45.
- [14] C. Borselli, O. Oliviero, S. Battista, L. Ambrosio and P.A. Netti, Induction of directional sprouting angiogenesis by matrix gradients, *J Biomed Mater Res A* **80** (2007), 297-305.
- [15] P. Carmeliet and A. Luttun, The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis, *J Thromb Haemost* **86** (2001), 289-297.
- [16] J.T. Chi, H.Y. Chang, G. Haraldsen, F.L. Jahnson, O.G. Troyanskaya, D.S. Chang, Z. Wang, S.G. Rockson, M. van de Rijn, D. Botstein and P.O. Brown, Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling, *PNAS* **100** (2003), 10623-10628.
- [17] W. De Spieghelaere, P. Cornillie, W. Van den Broeck, J. Plendl and M. Bahrami-Soltani, Angiopoietins differentially influence in vitro angiogenesis by endothelial cells of different origin, *Clin Hemorheol Microcirc* **47** (2011), 1-13.
- [18] T. Drewa, R. Joachimiak, A. Kaznica, V. Sarafian and J. Sir, Primary cultures from rat vibrissae as a potential cell source for in vitro construction of urinary bladder wall grafts, *Transplantation Proceedings* **41** (2009), 1932-1935.
- [19] M.A. Engelse, N. Laurens, R.E. Verloop, P. Koolwijk and V.W.M. van Hinsbergh, Differential gene expression analysis of tubule forming and non-tubule forming endothelial cells: CDC42GAP as a counter-regulator in tubule formation, *Angiogenesis* **11** (2008), 153-167.
- [20] S. Ergün, D. Tilki, H.P. Hohn, U. Gehling and N. Kilic, Potential implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells, *J Thromb Haemost* **98** (2007), 930-939.
- [21] R.P. Franke, R. Fuhrmann, B. Hiebl, F. Jung, Influence of radiographic contrast media (Iodixanol und Iomeprol) on the morphology of human arterial and venous endothelial cells on extracellular matrix in vitro, *Clin Hemorheol Microcirc* (2010), in press.
- [22] E. Gagnon, P. Cattaruzzi, M. Griffith, L. Muzakare, K. LeFlao, R. Faure, R. Bélineau, S.N. Hussain, M. Koutsilieris and C.J. Doillon, Human vascular endothelial cells with extended life spans: in vitro cell response, protein expression, and angiogenesis, *Angiogenesis* **5** (2002), 21-33.
- [23] K. Hemmen, T. Reinl, K. Buttler, F. Behler, H. Dieken, L. Jänsch, J. Wilting and H.A. Weich, High-resolution mass spectrometric analysis of the secretome from mouse lung endothelial progenitor cells, *Angiogenesis* **14** (2011), 163-172.
- [24] B. Hiebl, S. Bog, C. Mrowietz, M. Jünger, F. Jung, A. Lendlein, R.P. Franke, Influence of VEGF stimulated human macrophages on the proliferation of dermal microvascular endothelial cells: coculture experiments, *Clin Hemorheol Microcirc* **46** (2010), 211-216.

- [25] http://atcc.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/82/~/endothelial-cell-growth-supplement-%28ecgs%29, 18.07.11, 16:00h
- [26] F. Jung, R.P. Franke, Extreme reduction of the capillary lumen in segments of the venular legs of human cutaneous capillaries, *Microvasc Res* **78** (2009), 241-245.
- [27] S. Kaessmeyer and J. Plendl, Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro, *Clin Hemorheol and Microcirc* **41** (2009), 83-101.
- [28] N.S. Kim and S.J. Kim, Isolation and cultivation of microvascular endothelial cells from rat lungs: effect of gelatine substratum and serum, *Yonsei Medical Journal* **32** (1991), 303-314.
- [29] J. King, T. Hamil, J. Creighton, S. Wu, P. Bhat, F. McDonald and T. Stevens, Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes, *Microvasc Res* **67** (2004), 139-151.
- [30] S.X. Liang, L.M. Khachigian, Z. Ahmadi, M. Yang, S. Liu and B.H. Chong, In vitro and in vivo proliferation, differentiation and migration of cardiac endothelial progenitor cells (SCA1(+)/CD31(+) side population cells), *J Thromb Haemost* (2011), [Epub ahead of print]
- [31] F. Liu, J. Smith, Z. Zhang, R. Cole and B.J. Herron, Genetic heterogeneity of skin microvasculature, *Developmental Biology* **340** (2010), 480-489.
- [32] J.A. Macdonald, N. Murugesan and J.S. Pachter, Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature, *Journal of Neuroscience Research* **88** (2010), 1457-1474.
- [33] V. Marin, G. Kaplanski, S. Grès, C. Farnarier and P. Bongrand, Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells, *Journal of Immunological Methods* **254** (2001), 183-190.
- [34] A. Mayer, S. Lee, F. Jung, G. Grütz, A. Lendlein, B. Hiebl, CD14+ CD163+ IL-10+ monocytes/macrophages: Pro-angiogenic and non pro-inflammatory isolation, enrichment and long-term secretion profile, *Clin Hemorheol Microcirc* **46** (2010), 217-223.
- [35] N. Mecha Disassa, B. Styp-Rekowska, B. Hinz, L. Da Silva-Azevedo, A.R. Pries, A. Zakrzewicz, Differential expression of VEGFA, TIE2, and ANG2 but not ADAMTS1 in rat mesenteric microvascular arteries and veins, *Physiol Res* **58** (2009), 193-202.
- [36] A.D. Muir, P.P. McKeown, U. Bayraktutan, Role of gender, smoking profile, hypertension, and diabetes on saphenous vein and internal mammary artery endothelial relaxation in patients with coronary artery bypass grafting, *Oxid Med Cell Longev* **3** (2010), 199-205.
- [37] S. Ozturk, G. Kaseko, T. Mahaworasilpa and H.G.L. Coster, Adaption of cell lines to serum-free culture medium, *Hybridoma and Hybridomics* **22** (2003), 267-272.
- [38] S. Patan, Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodelling, *J Neurooncol* **50** (2000), 1-15.

- [39] T.J. Povsic and P.J. Goldschmidt-Clermont, Endothelial progenitor cells: markers of vascular reparative capacity, *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* **2** (2008), 199-213.
- [40] D. Ribatti, B. Nico, A. Vacca, L. Roncali and F. Dammacco, Endothelial cell heterogeneity and organ specificity, *Journal of hematotherapy & stem cell research* **11** (2002), 81-90.
- [41] R.M. Rohan, A. Fernandez, T. Udagawa, J. Yuan and R.J. D'Amato, Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice, *FASEB J* **14** (2000), 871–876.
- [42] C.A. Staton, M.W.R. Reed and N.J. Brown, A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays, *Int J Exp Path* **90** (2009), 195-221.
- [43] O. Stoeltzing, W. Liu, N. Reinmuth, F. Fan, A.A. Parikh, C.D. Bucana, D.B. Evans, G.L. Semenza and L.M. Ellis, Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer, *American Journal of Pathology* **163** (2003), 1001-1011.
- [44] L. Wagner, J.G. Hoey, A. Erdely, M.A. Boegehold and C. Baylis, The nitric oxide pathway is amplified in venular vs arteriolar cultured rat mesenteric endothelial cells, *Microvasc Res* **62** (2001), 401-409.
- [45] H. Zhu, N. Miosge, J. Schulz and H. Schliephake, Regulation of multilineage gene expression and apoptosis during in vitro expansion of human bone marrow stromal cells with different cell culture media, *Cells tissues organs* **192** (2010), 211-220.
- [46] W.H. Zhu, M. Iurlaro, A. MacIntyre, E. Fogel and R.F. Nicosia, The mouse aorta model: influence of genetic background and aging on bFGF- and VEGF-induced angiogenic sprouting, *Angiogenesis* **6** (2003), 193-199.

7.2. Human microvascular endothelial cells displaying reduced angiogenesis and increased uptake of lipids during *in vitro* culture

Henrieke Sievers^{a,*}, Ruth M. Hirschberg^b, Bernhard Hiebl^c, Hana Hünigen^a and Johanna Plendl^a

^a*Institute of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Germany*

^b*SFB 1112, Institute of Chemistry and Biochemistry - Physical and Theoretical Chemistry, Department of Biology, Chemistry and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Germany*

^c*Center for Medical Basic Research, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany*

*Corresponding author: Henrieke Sievers, Institute of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Koserstraße 20, 14195 Berlin, Germany
Tel.: +49 30 83853560; Fax: +49 30 83853480; E-Mail: sievers.henrieke@vetmed.fu-berlin.de

Clinical Hemorheology and Microcirculation **61** (2015), S. 367-383

DOI 10.3233/CH-152002

IOS Press

With 10 figures

Reprinted from Clinical Hemorheology and Microcirculation, Volume 61, Henrieke Sievers, Ruth M. Hirschberg, Bernhard Hiebl, Hana Hünigen and Johanna Plendl, Human microvascular endothelial cells displaying reduced angiogenesis and increased uptake of lipids during *in vitro* culture, pages 367-383, Copyright (2015), with permission from IOS Press.

Abstract

Human microvascular ECs from the neonatal foreskin of two donors purchased from one distributor were used in an angiogenesis assay under the same culture conditions. Different angiogenic potency was apparent in these two batches (EC*ang* and EC*non-ang*). During the cultivation period of three weeks, EC*ang* ran through all stages of angiogenesis starting from proliferation to migration up to the formation of three-dimensional capillary-like structures. Despite expression of endothelial markers, EC*non-ang* showed excessive intracellular storage of lipids in form of multilamellar bodies and decreased angiogenic potency in contrast to its counterpart, EC*ang*. Results indicate that lipid metabolism differs in EC*ang* versus EC*non-ang*. This study points up that these differences are based on the different donors and presents a novel and valuable model for the study of mechanisms of atherosclerosis in endothelial cells *in vitro*.

Keywords: Foreskin, fetal bovine serum, multilamellar bodies, atherosclerosis

1. Introduction

In vitro angiogenesis assays constitute a widely applied approach for studying the mechanisms of angiogenesis, and they also provide useful models for preclinical studies of cardiovascular disease [43, 56]. Angiogenesis assays are performed with endothelial cells (ECs), which are defined as cells that line all blood vessels [22]. The expression of CD 34, CD 31 and von Willebrand factor (vWF) are typical immunocytochemical markers, and Weibel Palade bodies (WPB) are marker organelles of ECs [30, 37]. Despite these common characteristics, it is known that ECs are heterogenous and display different phenotypes, varying in localisation, function as well as in health and disease [1-3]. Apart from macro- and microvascular EC many differences are known between ECs of different species, sex, age, organs, between different vascular beds even within the same organ, and between neighboring ECs of the same organ and blood vessel type [1-3, 18, 19, 27, 50]. Manifestations of this EC heterogeneity are detectable at different levels, i.e. regarding EC morphology, gene expression, antigen composition, and functions [1-3, 18, 19, 27, 50]. Amongst the many EC functions like the establishment of a selective barrier, regulation of hemostasis, blood fluidity and coagulation cascade, leukocyte trafficking, regulation of vascular tone and endocytosis, the most striking is their angiogenic potency [15, 31, 38, 50]. In the light of interpretation of *in vitro* angiogenesis assays, the assumption that all ECs are equally angiogenic is critical. Over the last years, it has been found that in addition to the now well-known structural EC heterogeneity, individual ECs may also adopt specialized functional phenotypes, particularly during angiogenesis [3, 8, 41]. Be-

sides ECs guiding the vascular sprouts known as the endothelial tip cells [20], another highly proliferative EC phenotype that establishes the stability of the new sprout and forms the vascular lumen has been described, known as the endothelial stalk cell [16, 20, 24, 41]. So far there are only few reports on impaired angiogenic potency of ECs or its progenitor cells derived from the same organ but different donors [32].

In our laboratory, ECs from micro- and macrovascular vessels of different species, age, organs and tissues were examined in long-term cultivation [17]. Different angiogenic potency was apparent in two batches of human microvascular ECs derived from the neonatal foreskin of two donors. During the cultivation period of three weeks, the ECs of the one batch ran through all stages of angiogenesis starting from proliferation to migration up to the formation of three-dimensional capillary-like structures. The ECs of the other batch developed distinct morphological changes, showed excess intracellular storage of lipids, and decreased angiogenic potency. All the same, all endothelial markers were still expressed.

We hypothesize that negative results of angiogenesis assays may not only be the consequence of inadequate angiogenic stimuli via proangiogenic factors but may also occur due to an impaired angiogenic potency or an inherent loss of the angiogenic potency of ECs dependent on the donor. This important aspect of endothelial heterogeneity, which is often not considered when the cells are selected for *in vitro* assays, is the focus of the present study.

2. Materials and methods

2.1 Human endothelial cells and growth media

The study was performed in accordance to the ethical guidelines of this journal (*Clinical Hemorheology and Microcirculation* **44** (2010), 1-2).

Two different batches of human microvascular endothelial cells derived from the foreskin of two newborn Caucasian (HDMEC-1) and their original growth medium, provided by the distributor, were purchased from Lonza (Verviers, Belgium; original catalogue cell culture name: HMVEC-dBI Neo; original catalogue medium name: EGM[®]-2MV Bulletkit[®]). Due to their very different angiogenic behavior during cultivation (for details see results section), batch No. 1 was subsequently termed EC^{ang}, and batch No. 2 EC^{non-ang}.

2.2 General cell culture

The two different batches of endothelial cells (EC^{ang}, EC^{non-ang}) were cultivated over a period of three weeks each on 8 wells of 24-well-plates (Iwaki; Tokyo, Japan). Cells were

used in the fifth passage in a concentration of 4.5×10^4 cells per well. They were grown in their original growth medium provided by the distributor (EGM®-2MV Bulletkit®, Lonza) containing 5 % fetal bovine serum (FBS). They were incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere (INCO2/1, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany). The growth medium was refreshed every three to four days.

2.3 Phase-contrast microscopy of the cultures

Phase-contrast microscopy was carried out every three to four days applying the inverted microscope IX81 (Olympus GmbH, Hamburg, Germany). Digital pictures were taken on days 3, 10, 16, and 21 of cultivation with a video camera XM10 (Olympus GmbH, Hamburg, Germany) and the image editing system cell® version 3.1 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany): Two image sections (magnification: x 200) from the 8 wells of each plate were randomly chosen and digitally recorded on day 3 for image analysis allowing cell count, and assessment of cell morphology and angiogenesis. The same image sections of each well were recorded on culture days 10, 16, and 21. Using the software AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss GmbH, Jena, Germany), the number of cells was analyzed per picture section.

2.4 Additional cultivation in medium with altered FBS-concentrations

2.4.1 FBS-reduced cultivation

After the preliminary cultivation in original growth medium (as described in 2.2), both batches (ECang, ECnon-ang) were also grown in their growth medium containing 1.25%, or 0% FBS, respectively.

2.4.2 FBS-extended cultivation

Batch 1 (ECang) was additionally grown in its growth medium containing 10%, 15%, 20%, or 30% FBS, respectively.

2.5 Cytological staining

2.5.1 Trypan blue exclusion test of cell viability

This test is used to determine viable cells present in a cell culture. It is based on the principle that live cells possess intact cell membranes that exclude trypan blue [55]. After cultivation over 21 days in original growth medium containing 5% FBS, cells of the sec-

ond batch (EC_{non-ang}) were washed with PBS and stained with trypan blue (1:9 solution). They were evaluated under the inverted microscope Axiovert 25 (Zeiss GmbH, Jena, Germany).

2.5.2 Neutral red uptake test

Neutral red is a cationic dye that readily diffuses through cell membranes and accumulates in cellular lysosomes of live cells [44].

After cultivation over 21 days in original growth medium containing 5% FBS, cells of the batch 2 (EC_{non-ang}) were washed with PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany) and stained with neutral red (5 mg/100 ml PBS, Biochrom AG, Berlin, Germany), incubated for 2 hours and evaluated under the inverted microscope Axiovert 25 (Zeiss GmbH, Jena, Germany).

2.5.3 Nile blue

Nile blue is used to quantify lipid levels in cells. It distinguishes between neutral non-acidic lipids like triglycerides which are stained pink, and acidic lipids like fatty acids which are stained blue [6]. Nile blue sulfate was applied to cells as follows: After cultivation over 21 days in original growth medium containing 5% FBS, the growth medium of both cell batches (EC_{ang}, EC_{non-ang}) was aspirated from each well, and cells were rinsed twice with PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany). Subsequently, cells were fixed with methanol-acetone (1:1) at -20 °C for 10 min, blow-dried, and after submission to a descending ethanol series stained with Nile blue (6 g/100 ml aq. dest.). The cells were evaluated under the inverted microscope Axiovert 25 (Zeiss GmbH, Jena, Germany).

2.5.4 Verification of acid phosphatase according to Barka [7]

A marker enzyme of lysosomes is acid phosphatase which can be stained according to Barka [7]. After cultivation over 21 days in original growth medium containing 5% FBS, the growth medium of both cell batches (EC_{ang}, EC_{non-ang}) was aspirated from each well, and cells were rinsed twice with PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany). Subsequently, cells were fixed in the first step with methanol-acetone (1:1) at -20 °C for 10 min, blow-dried and fixed in the second step with 1.25% glutaraldehyde in 0.05M PIPES (pH 7.25) for 10 min on ice. After rinsing with aqua dest., cells were incubated for 45 min at 37 °C in a medium of 9 mg Naphthol-AS-MX-phosphate in 1 ml dimethylformamide, 5 ml veronal-acetat-buffer, 12 ml aqua bidest. and 1.6 ml pararosanilin which was converted into the

diazocompound (pH 5). The cells were evaluated under the inverted microscope Axiovert 25 (Zeiss GmbH, Jena, Germany).

2.6 Immunocytochemistry

Cultured ECs that are competent of *in vitro* angiogenesis express EC markers like CD 31 and von Willebrand factor (vWF) [17, 37], and are required to mimic the angiogenic process *in vivo* including endothelial capability to express collagen type IV and laminin as a component of the basement membrane [5, 9, 29].

The immunocytochemical investigations of these antigens were carried out as follows: After cultivation over 21 days in original growth medium containing 5% FBS, the growth medium of both cell batches (ECang, ECnon-ang) was aspirated from each well and cells were rinsed twice with PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany). Subsequently, cells were fixed in the first step with methanol-acetone (1:1) (Roth, Karlsruhe, Germany) at -20 °C for 10 min, blow-dried and fixed in the second step with 10% formalin in PBS (Roth, Karlsruhe, Germany) overnight. After rinsing twice with PBS, and unmasking in retrieval solution high pH (DakoCytomation, Hamburg, Germany), at 30 min, 86°C, cells were incubated with an endogenous peroxidase block using 3% hydrogen peroxide in PBS (Roth, Karlsruhe, Germany) for 20 min at room temperature and non-specific blocking in buffer containing 3% BSA and w/o 1% milk (Roth, Karlsruhe, Germany) for 30 min was performed. The protein block reagent was removed and cells were incubated with the primary antibody to CD 31 (monoclonal mouse anti-CD 31 endothelial cell clone JC70A, diluted 1:50 in PBS; DakoCytomation, Hamburg, Germany), collagen type IV (monoclonal mouse anti-human collagen IV clone CIV22, diluted 1:50 in PBS; DakoCytomation, Hamburg, Germany), laminin (polyclonal rabbit anti-laminin, diluted 1:50 in PBS; DakoCytomation, Hamburg, Germany) or von Willebrand factor (polyclonal rabbit anti-human vWF, diluted 1:50 in PBS; DakoCytomation, Hamburg, Germany) overnight at 4 °C in a moist chamber.

After 12 hours, primary antibody was aspirated. The cells were rinsed twice with PBS and subsequently incubated with the relevant secondary antibody (EnVision + System-HRP anti-mouse (labelled polymer); DakoCytomation, Hamburg, Germany) for 45 min at room temperature, followed by rinsing twice with PBS. Visualization was performed using DAB solution (DakoCytomation, Hamburg, Germany) for 20 min at room temperature.

For negative controls, the primary antibody was replaced by rabbit immunoglobulin (Ig) fraction normal (DakoCytomation, Hamburg, Germany) or mouse IgG1 (DakoCytomation, Hamburg, Germany). For positive controls, the primary antibodies were tested on human abdominal skin. The cells were evaluated under the inverted microscope Axiovert 25 (Zeiss GmbH, Jena, Germany).

2.7 Transmission electron microscopy

The ultrastructural investigations were carried out as follows:

After cultivation over 21 days in original growth medium containing 5% FBS, the growth medium of both cell batches (ECang, ECnon-ang) was removed from each well and substituted by PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany), followed by cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2) (Roth, Karlsruhe, Germany) and Karnovsky's fixative (Merck Eurolab, Darmstadt, Germany). After 4 hours of refrigeration at 4 °C, the cells were rinsed with cacodylate buffer and contrasted with cacodylate-buffered osmium tetroxide (1 %) (Chempur, Karlsruhe, Germany) for 2 hours at 4 °C. The cells were rinsed with cacodylate buffer again and scraped out of the well carefully. After centrifugation the cells were overlayed with 1.5% Agar-Agar (Fluka, Buchs, Switzerland) [23]. Subsequently, the cells were dehydrated and embedded in glycidether 100 (Roth, Karlsruhe, Germany) via propylene oxide (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). After polymerization for 48 hours at 60 °C semi-thin sections (0.8 µm) were evaluated to establish the appropriate specimen for ultra-thin sectioning (Leica Ultracut UCT, Reichert-Jung, Vienna, Austria). Slides of 70 nm were cut and absorbed to nickel grids, contrasted with lead citrate and uranyl acetate, and examined using an EM109T electron microscope (Zeiss GmbH, Jena, Germany).

3. Results

3.1 Phase-contrast microscopy of the cultures

3.1.1. Cultivation with 5% FBS (Fig. 1)

Batch 1 (ECang):

At day 3 there was no confluent monolayer. The number of cells per image section was few (Fig. 2) but the cells were relatively large (diameter: 60 - 100 µm), even after confluence (diameter: 40 - 60 µm). They displayed a fine granulated cytoplasm, typical for cultured ECs. Network formation was beginning from day 10 onwards.

Batch 2 (ECnon-ang):

At day 3 there was a confluent monolayer of many small cells (Fig. 2) (diameter: 20 - 40 µm) which developed large numbers of phase-dense debris-like granules that appeared to be distributed all over and in-between the cells. In the course of cultivation the granules increased in size until the entire monolayer was covered. At day 21 the cells still formed a monolayer. There was no evidence of angiogenesis.

3.1.2 FBS-reduced cultivation (1.25% FBS; 0% FBS) (Fig. 3)

Batch 1 (ECang):

The cultivation of the cells was not possible in neither of the FBS-reduced media (1.25% FBS; 0% FBS). Even after 3 days they did not attach to the culture dish.

Batch 2 (EC_{non-ang}):

In growth medium with 1.25% FBS no phase-dense granules could be observed. The cells formed a confluent monolayer with linearly arranged cells from day 1 onwards, but even after 41 days of cultivation there was no sign of angiogenesis.

In medium with 0% FBS phase-dense granules were also not observed. Cells formed a network from day 1 onwards. However, cellular debris and lucent blebs (diameter: up to 4 µm) were detected in the cytoplasm. From day 15 onwards cells shrank, lost contact with neighboring cells, and cellular lysis started.

3.1.3 FBS-increased cultivation (10, 15, 20, 25, 30% FBS) (data not shown)

Batch 1 (EC_{ang}):

The increase of FBS in the growth medium did not result in any visible changes in the cells compared to cultivation in 5 % FBS. Formation of cytoplasmic granules could not be provoked by high levels of FBS.

3.2 Cytological staining

3.2.1 Trypan blue exclusion test of cell viability (data not shown)

Batch 2 (EC_{non-ang}):

Cells did not take up the dye, thus showing that they were intact and alive.

3.2.2 Neutral red uptake test (data not shown)

Batch 2 (EC_{non-ang}):

Cells readily took up the dye, proving that they were intact and alive.

3.2.3 Nile blue (Fig. 4)

Batch 1 (EC_{ang}):

The cytoplasm of the cells was weakly stained with blue hue, indicating the presence of low levels of acidic lipids.

Batch 2 (EC_{non-ang}):

The cytoplasm of the cells was intensively stained in blue, indicating acidic lipids in high concentrations.

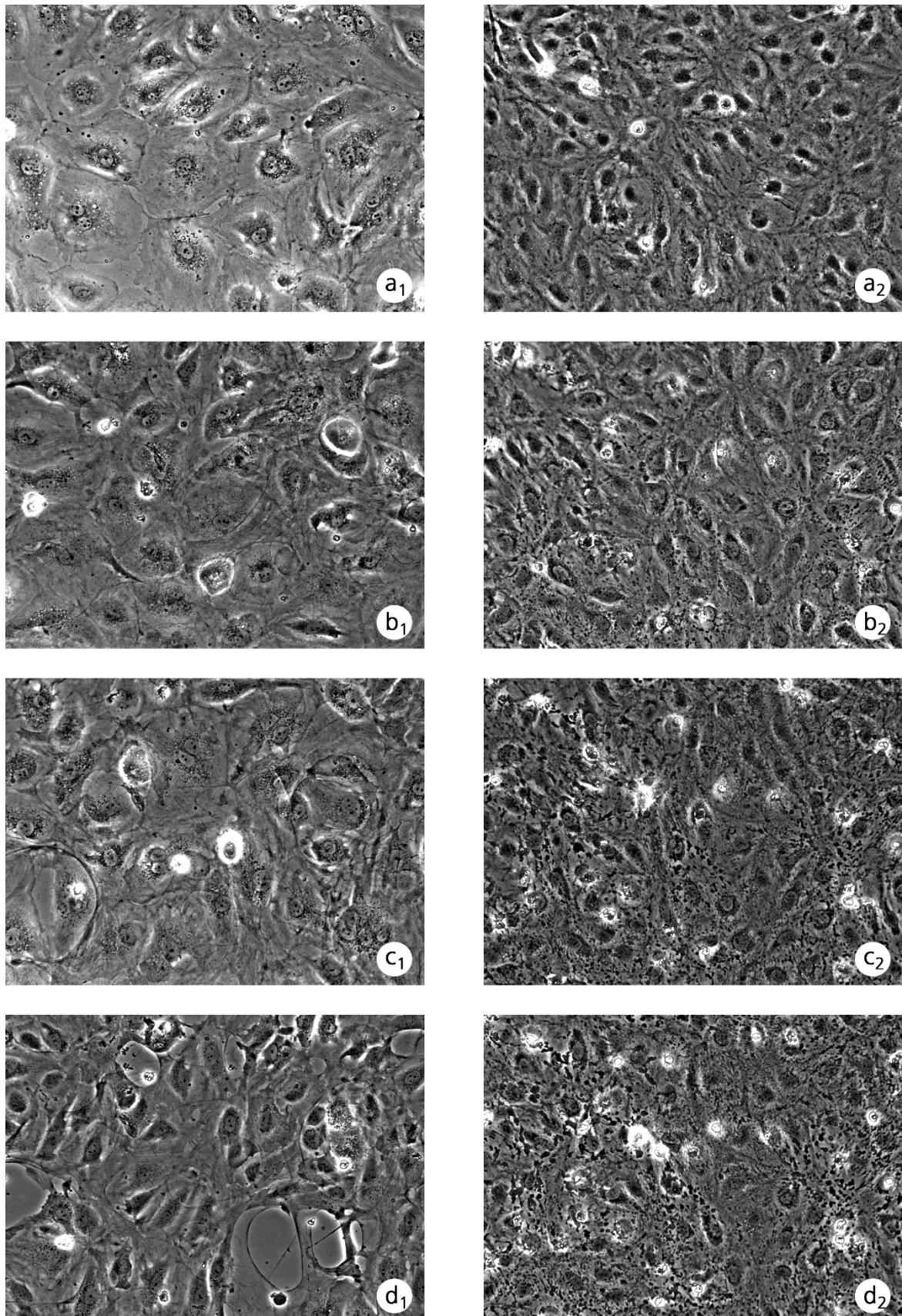


Fig. 1. Digital pictures of ECang (1) and ECnon-ang (2) at day 3 (a), 10 (b), 16 (c), and 21 (d) of cultivation in growth medium containing 5 % FBS, phase-contrast microscopy, 200x.

3.2.4 Verification of acid phosphatase according to Barka (Fig. 4, insertion)

Batch 1 (ECang):

Few intracellular small granules were identified as lysosomes by positive reaction for the lysosomal marker enzyme acid phosphatase.

Batch 2 (ECnon-ang):

Intense acid phosphatase activity distributed in intracellular as well as extracellular granules was observed indicating lysosomes within still intact cells as well as within lysosomal debris.

3.3 Immuncytochemistry

3.3.1 CD 31 (Fig. 5)

Batch 1 (ECang):

All cells displayed a clearly visible, homogenous positive reaction. Cells featured a diffuse immunolocalisation of the antigen of the entire cytoplasmic membrane. Cellular projections of intercellular contacts were also distinctly reactive.

Batch 2 (ECnon-ang):

All cells stained positive for anti-CD 31, but clearly weaker than batch 1.

3.3.2 Collagen IV (Fig 6.)

Batch 1 (ECang):

A sheet-like network of strongly collagen type IV-immunopositive extracellular matrix was found surrounding the cells. Weak granular cytoplasmic immunostaining was seen in many cells, particularly in the cell periphery.

Batch 2 (ECnon-ang):

Few extracellular immunopositive fibres of collagen IV were observed.

3.3.3 Laminin (Fig. 7)

Batch 1 (ECang):

Similar to the described collagen staining, an extensive network of strongly laminin- immunopositive extracellular matrix was found surrounding the cells. Weak granular cytoplasmic immunostaining was seen in many cells.

Batch 2 (ECnon-ang):

Strong intracellular granular staining for laminin, but no extracellular immunopositive material was observed.

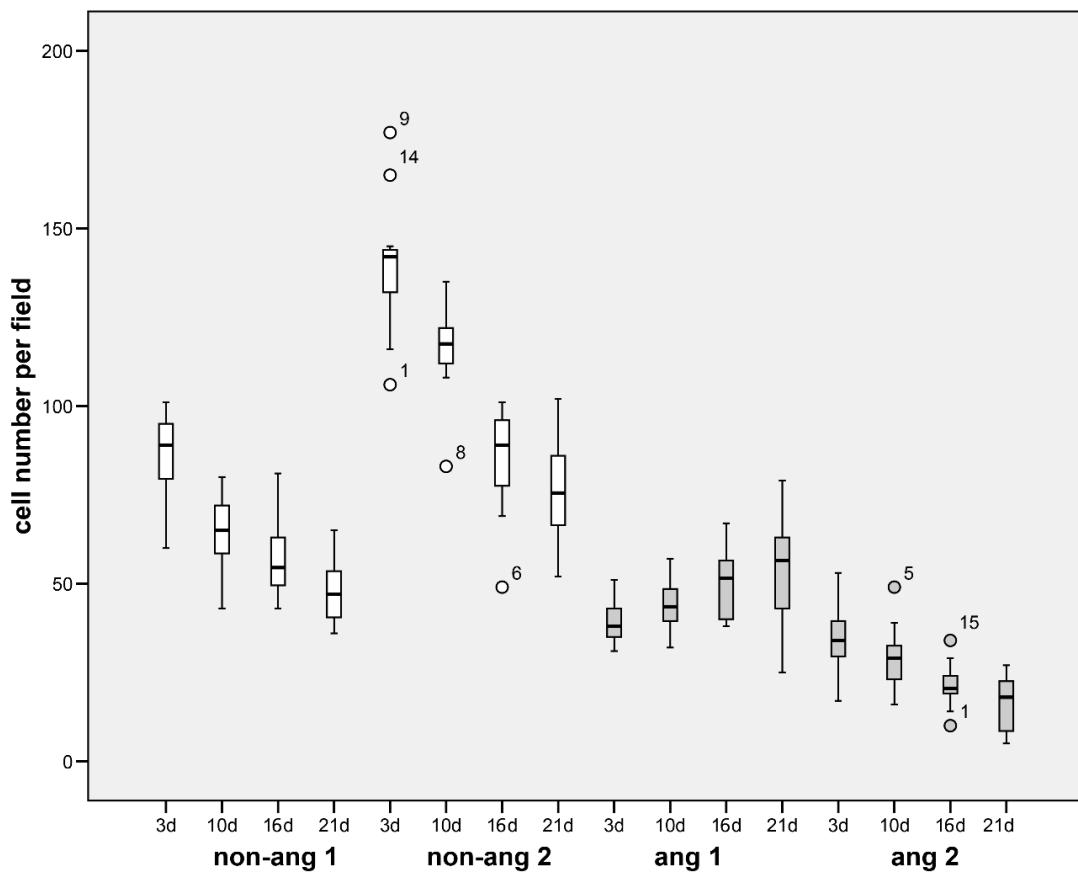


Fig. 2. One box shows the cell number measurements of the same two image sections taken from eight wells on four different days during cultivation, respectively. The image sections were initially randomly selected on day 3, and quantification of cells/cell counting was performed on day 3, and consecutively at the same image section on days 10, 16, and 21 over the (entire) duration of cultivation.

3.3.4 vWF (data not shown)

Batch 1 (ECang):

All cells stained strongly positive for the endothelial marker anti-vWF with the typical punctate staining pattern.

Batch 2 (ECnon-ang):

Similar to ECang, all cells stained strongly positive for anti-vWF.

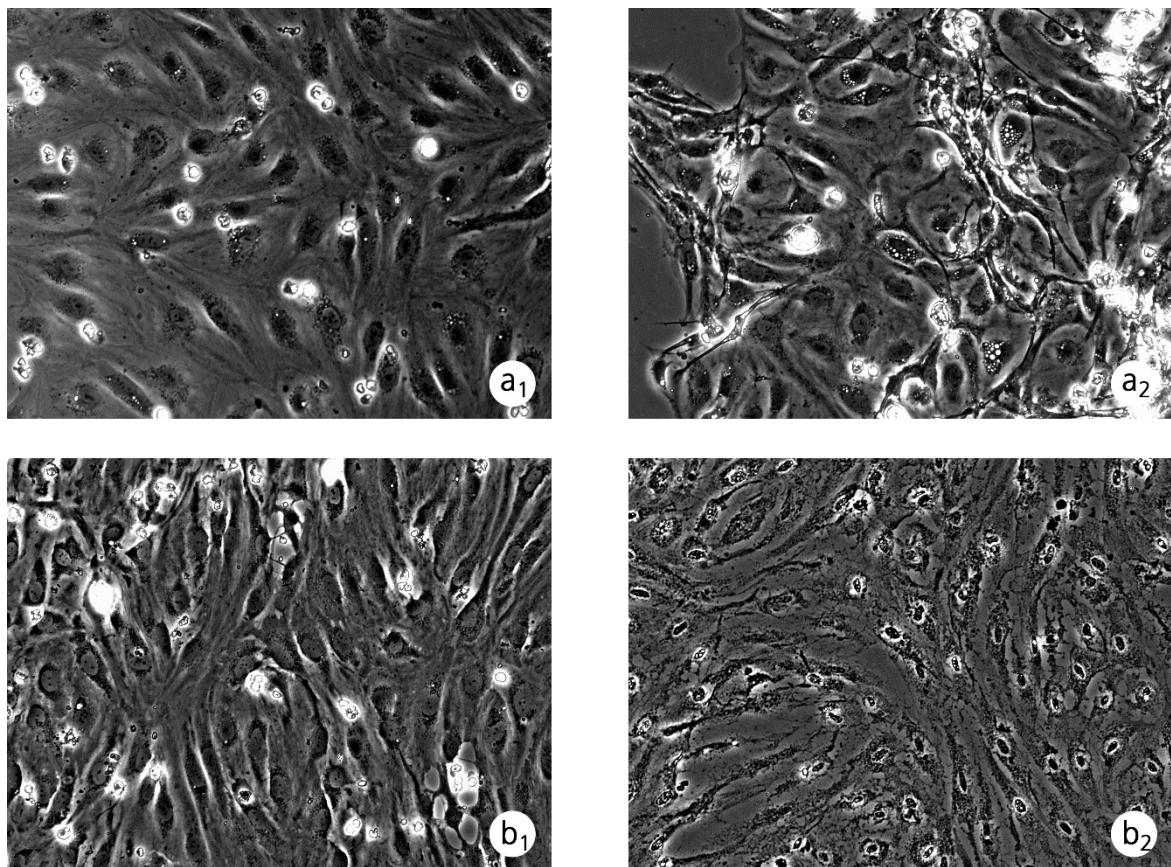


Fig. 3. Digital pictures of ECnon-ang at day 1 (a), and 15 (b) of cultivation in growth medium containing 1.25 % (1) or 0% (2) FBS, phase-contrast microscopy, 200x.

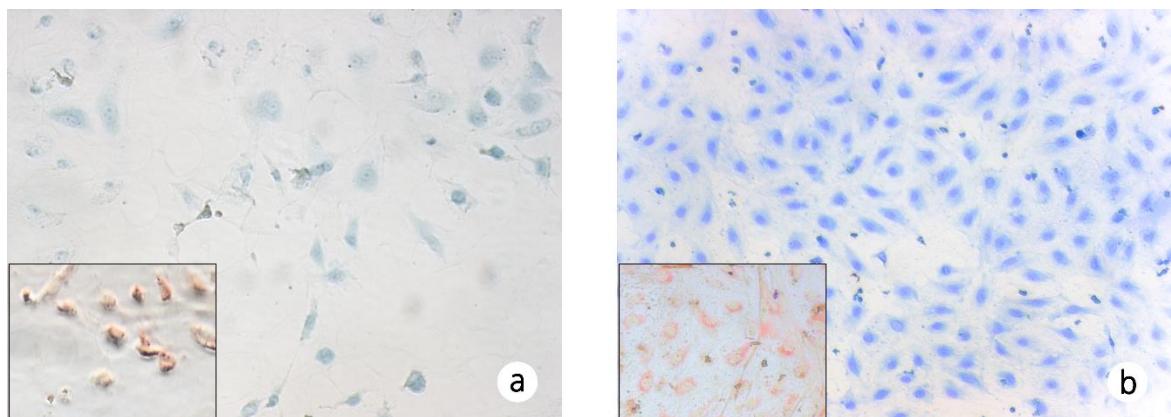


Fig. 4. Digital pictures of ECang (a) and ECnon-ang (b) at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, Nile blue staining, 200x.

Insertion: Digital pictures of ECang (a) and ECnon-ang (b) at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, verification of acid phosphatase, 200x.

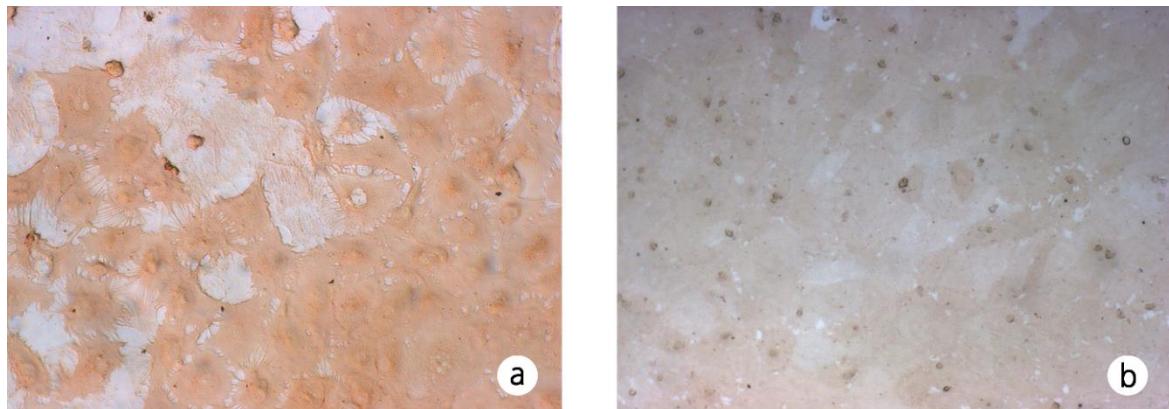


Fig. 5. Digital pictures of ECang (a) and ECnon-ang (b) at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, immunocytochemical detection of CD 31, 200x.

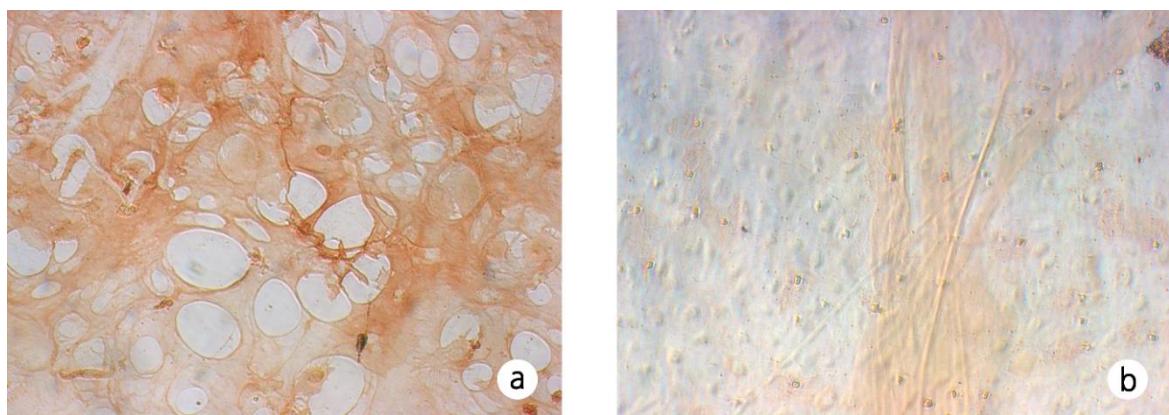


Fig. 6. Digital pictures of ECang (a) and ECnon-ang (b) at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, immunocytochemical detection of collagen type IV, 200x.

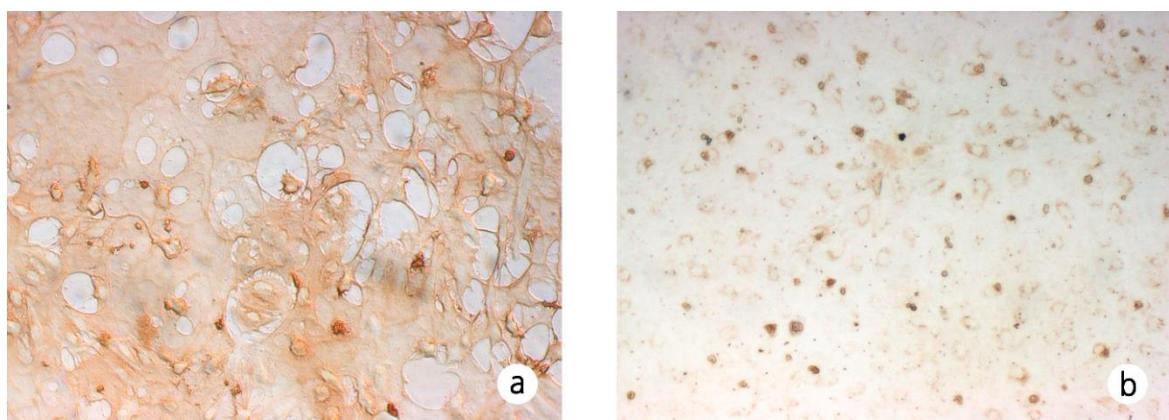


Fig. 7. Digital pictures of ECang (a) and ECnon-ang (b) at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, immunocytochemical detection of laminin, 200x.

3.4. Transmission electron microscopy

Batch 1 (ECang) (Fig. 8):

Endothelial marker organelles Weibel-Palade bodies were localized in the cytoplasm of the cells. Shape of nuclei was elongated and regular with heterochromatin at the edges. Mitochondria of the crista type, rough endoplasmatic reticulum, Golgi fields, few lysosomes, and occasional concentric membranous bodies, consisting of staples of thin electron dense lamellar membranes bodies, were detected in the cytoplasm. Cells displayed cellular extensions contacting other cells: In some cases these extensions had the form of a calyx whereas the membrane of the contacted counterpart cell bulged into this calyx. No microvilli were present on the cellular surfaces.

Batch 2 (ECnon-ang) (Figs. 9 and 10):

Weibel-Palade bodies were localized in the cytoplasm of the cells. Elongated and regular nuclei, rough endoplasmatic reticulum, mitochondria of the crista type, and Golgi fields were detected, similar to the cells of ECang. More lysosomes than in ECang were present. The most striking ultrastructural result was an abundance of concentric membranous bodies, consisting of staples of thin electron dense lamellar membranes, distributed all over the cytoplasm. These organelles were segregated into groups, consisting of up to more than 10 single lamellar structures, and each group was surrounded by a porous membrane.

An abundance of cellular debris was seen in the extracellular space. Frequently this debris was in close vicinity to cells, being surrounded by intact cells. The contacting cell membrane areas showed small vesicular invaginations.

4. Discussion

Human microvascular ECs from the neonatal foreskin of two donors purchased from one distributor were used in an angiogenesis assay. Different angiogenic potency was apparent in these two batches (ECang and ECnon-ang). During the cultivation period of three weeks, ECang ran through all stages of angiogenesis starting from proliferation to migration up to the formation of three-dimensional capillary-like structures. ECnon-ang developed distinct morphological changes, showed excessive intracellular storage of lipids and decreased angiogenic potency.

As it is known that ECs undergo a phenotypic drift when they are removed from their native tissue and grown in cell culture [1] efforts were undertaken to verify and confirm the endothelial identity of the non-angiogenic cells, using similar markers like the distributor. Also in our hands, endothelial markers were found to be expressed in ECnon-ang. In addition to the endothelial marker organelles Weibel-Palade-bodies [30] detected on an ul-

trastructural level, the cells expressed vWF as well as CD 31, both known to be reliable immunocytochemical endothelial markers [37].

Although the endothelial identity of the cells was confirmed, EC*non-ang* were not able to elongate or arrange linearly, important steps in the angiogenic cascade, nor were the cells able to form three-dimensional capillary-like structures like their angiogenic counterparts, EC*ang*. Both batches were cultivated over a period of 21 days and it is necessary to stress that both batches were incubated in the same growth medium under the same culture conditions.

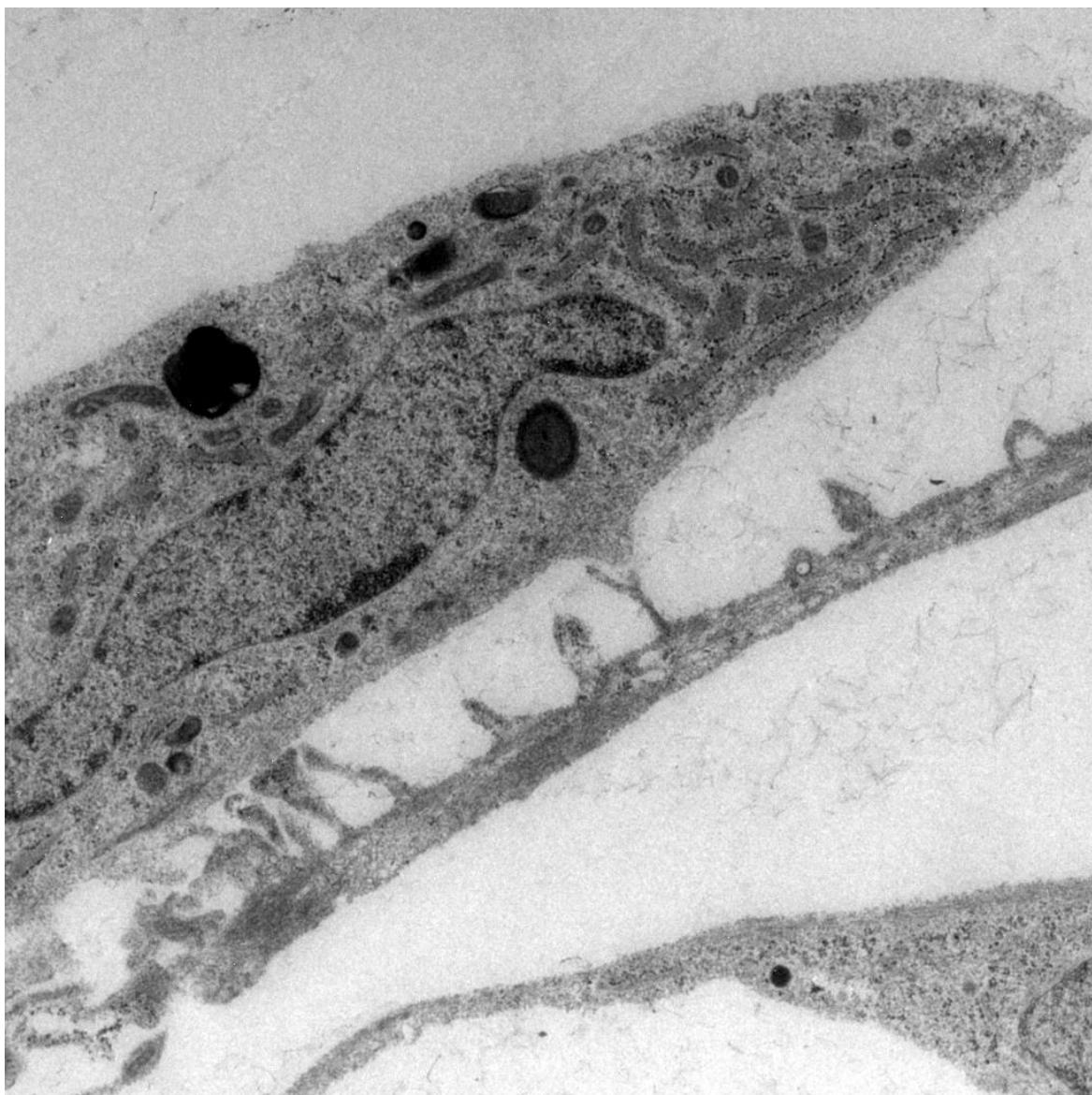


Fig. 8. Digital picture of EC*ang* at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, transmission electron microscopy, 7000x.

A potential reason for reduced angiogenesis is the impaired production of extracellular matrix molecules. EC*non-ang* described in the present study did not form a network of collagen type IV-immunopositive extracellular matrix compared to EC*ang*. ECs are reported to produce molecules of the extracellular matrix and basement membrane, particularly collagen type IV and laminin, which modulate the migratory and proliferative behavior to growth factors and play an important role in capillary tube morphogenesis [5, 9, 29]. Recently it was found that the production of collagen type IV is proportional to the angiogenic capacity of cells [5]. Applied to an all-in-one assay, ECs derived from the human heart and neonatal foreskin showed angiogenic potency and development of three-dimensional vascular structures and expressed the endothelial extracellular matrix protein collagen type IV.

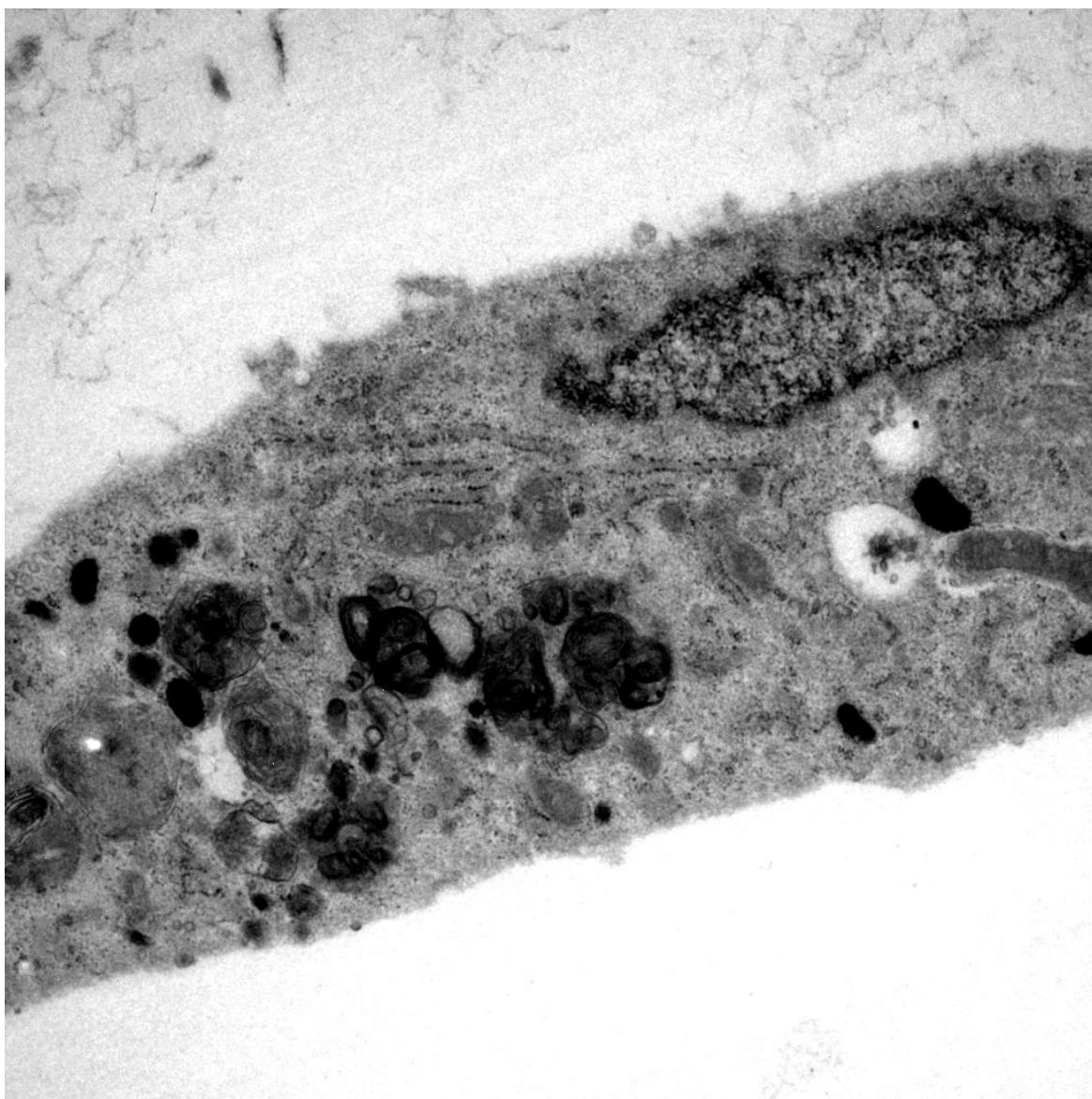


Fig. 9. Digital picture of EC*non-ang* at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, transmission electron microscopy, 7000x.

In contrast, human microvascular ECs derived from the lung and adult foreskin could not be stimulated to perform angiogenesis. Concomitantly, the collagen type IV expression of these non-angiogenic EC was very low [5].

Another striking finding in cultures of *ECnon-ang* was the appearance of debris-like phase-dense granular material that appeared to be distributed all over and in-between the cells. Cellular debris may be a sign of cell damage, or cell death [58]. In order to exclude this, cells were stained with neutral red or trypan blue [44, 55]. Results clearly confirmed that *ECnon-ang* were intact and alive.

In a further attempt to track down the identity of the phase-dense granular material, ultra-structural studies using a transmission electron microscopy were undertaken and many concentric membranous bodies, consisting of staples of thin electron dense lamellar membranes, either single or arranged in groups, were found in the cytoplasm.

These structures are identified as multilamellar bodies, i.e. in normal physiologic conditions rare EC organelles with a roundish to oval form. Depending on the study, their diameter is indicated to vary between 0.1 to 2.5 µm [21, 46]. Different types of multilamellar bodies are described: type I multilamellar bodies develop lipid membranes as a result of impaired lipid degradation in autophagolysosomes; type II lamellae are piles of rough endoplasmic reticulum [52].

Multilamellar bodies detected in our study have been diagnosed as type I both by verification of lysosomal activity and lipids. The presence of acid phosphatase determines the lysosomal activity of multilamellar bodies [33, 49]. Acid phosphatase activity was found to be very high in *ECnon-ang* distributed in intracellular as well as extracellular granules indicating lysosomes.

The lipid level of the contents of the multilamellar bodies in *ECnon-ang* was determined by Nile blue staining. It distinguishes between neutral non-acidic lipids like triglycerides, and acidic lipids like fatty acids [6]. The cytoplasm of *ECang* was weakly stained in a bluish hue, whereas the cytoplasm of *ECnon-ang* was stained intensively in distinct blue, indicating intracellular acidic lipids in high concentrations in *ECnon-ang*.

The only source of lipids for cells used in our study was FBS supplemented to the growth medium in a relatively low concentration of 5%. FBS is frequently used as a supplement to cell culture medium. FBS contains lipids and individual compositions of fatty acids [10, 47, 54]. It is well known that lipids can influence the results cellular experiments [10, 47, 54]; therefore we ensured that the FBS used in our study was from the same lot.

Serum lipids are needed for the adhesion and proliferation of cells in culture [10, 47] which was also shown in the present study: *ECang* were not able to survive in FBS reduced growth media (1.25%, or 0% FBS); they did not attach to the culture dish and died. In contrast to *ECang*, 1.25% FBS supplemented growth medium resulted in growth of *ECnon-ang*, but notably without formation of phase-dense granules, i.e. multilamellar bodies.



Fig. 10. Digital picture of ECnon-ang at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, transmission electron microscopy, 12000x.

Insertion: Digital picture of ECnon-ang at day 21 of cultivation in growth medium containing 5% FBS, Weibel-Palade-bodies, transmission electron microscopy, 20000x.

Like ECang, ECnon-ang did not survive in growth medium completely without FBS (0%). An increase of FBS in the growth medium of ECang (10% up to 30%), on the other hand, did not result in the generation of multilamellar bodies in this EC batch.

Results indicate that lipid metabolism differs in ECang versus ECnon-ang. Cellular uptake of lipids occurs either through receptor-mediated or receptor-independent endocytosis [28, 57]. Signs of endo- or exocytotic activity potentially indicating uptake of lipids have been found ultrastructurally in ECnon-ang in the form of multiple small vesicular invaginations at the cellular membrane. The incoming material is enclosed by the membrane into the cell interior and transported into the cytoplasm where it fuses with lysosomes for sup-

plying lipids to the cell [57]. In lysosomes, the non-degraded lipid material is organized in the concentrically packed lamellar structures of the multilamellar bodies [33, 48].

Reports on multilamellar bodies in healthy cells including endothelial cells are rare. For example Schmitz et al. reported multilamellar bodies under normal physiologic conditions in healthy pneumocytes II [39, 46]. Multilamellar bodies have also been examined in cultured luteal endothelium of pregnant versus non-pregnant cows, and have been found in the endothelium of pregnant cows exclusively [42].

In contrast to the healthy organism the presence of multilamellar bodies has been described frequently in cells of the diseased organism, particularly in atherosclerosis [4, 11, 25, 33, 45, 53]. In macrophages, for example, multilamellar bodies are formed in consequence of an overwhelming lipid invasion changing them into foam cells being known in atherosclerotic lesions [34]. *In vivo* ECs form multilamellar bodies only in late stages of atherosclerosis, or in the absence of phagocytic cells, thus displaying macrophage-like properties *in vitro* [4, 11, 25, 33, 45, 51, 53]. Interestingly, atherosclerosis, a disease dependent on different factors including genetic make-up, sex and hypercholesterolemia, is also associated with a decrease in angiogenesis [12-14, 26, 35, 59].

The EC batch EC_{non-ang} is a cell type isolated from a newborn donor displaying endothelial marker molecules, an abundance of multilamellar bodies storing lipids but without angiogenic potency. It cannot be ruled out that the high storage of lipids is only an *in vitro* effect. However, the characteristics of its angiogenic counterpart EC batch, EC_{ang}, suggests that the lipid metabolism of the donor is responsible for the enormous lipid storage of EC_{non-ang}. At this stage it is unknown whether this donor suffered from neonatal atherosclerosis or whether he will develop this disease in later stages of his life because cell donation was anonymous [36, 40]. All the same, the cells are a novel and valuable model for the study of mechanisms of atherosclerosis in ECs *in vitro*.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge Ilka Slosarek, Tania Fuhrmann-Selter, Verena Holle, Franziska Ermisch and Martin Werner for excellent technical assistance.

References

- [1] W.C. Aird, Endothelial cell heterogeneity, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2** (2012), 1-13.
- [2] W.C. Aird, Mechanisms of endothelial heterogeneity in health and disease, *Circulation Research* **98** (2006), 159-162.
- [3] W.C. Aird, Phenotypic heterogeneity of the endothelium, I. structure, function, and

- mechanisms, *Circulation Research* **100** (2007), 158-173.
- [4] F. Antohe, Endothelial cells and macrophages, partners in atherosclerotic plaque progression, *Archives of Physiology and Biochemistry* **112(4/5)** (2006), 245-253.
- [5] M. Bahrami-Soltani, I. Slosarek, W. De Spiegelaere and J. Plendl, Angiogenesis and collagen type IV expression in different endothelial cell culture systems, *Anatomia Histologia Embryologia* **43** (2014), 103-115.
- [6] J.D. Bancroft and M. Gamble, *Theory and practice of histological techniques*, Churchill Livingstone Elsevier, 2008.
- [7] T. Barka and P.J. Anderson, Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanalin as coupler, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **10** (1962), 741-753.
- [8] R. Blanco and H. Gerhardt, VEGF and notch in tip and stalk cell selection, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3** (2013), 1-19.
- [9] E. Bonanno, M. Iurlaro, J.A. Madri and R.F. Nicosia, Type IV collagen modulates angiogenesis and neovessel survival in the rat aorta model, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* **36** (2000), 336-340.
- [10] D.A. Brindley, N.L. Davie, E.J. Culme-Seymour, C. Mason, D.W. Smith and J.A. Rowley, Peak serum: implications of serum supply for cell therapy manufacturing, *Regenerative Medicine* **7(1)** (2012), 7-13.
- [11] M.C. Carou, P.R. Cruzans, A. Maruri, J.C. Stockert and D.M. Lombardo, Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: morphological features and clearance by homologous phagocytosis, *Acta Histochemica* **117** (2015), 92-103.
- [12] P.Y. Chang, S. Luo, T. Jiang, Y.T. Lee, S.C. Lu, P.D. Henry, C.H. Chen, Oxidized low-density lipoprotein downregulates endothelial basic fibroblast growth factor through a pertussis toxin-sensitive G-protein pathway, *Circulation* **104** (2001), 588-593.
- [13] E. Chavakis, E. Dernbach, C. Hermann, U.F. Mondorf, A.M. Zeiher and S. Dimmeler, Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway, *Circulation* **103** (2001), 2102-2107.
- [14] C.H. Chen, T. Jiang, J.H. Yang, W. Jiang, J. Lu, G.K. Marathe, H.J. Pownall, C.M. Ballantyne, T.M. McIntyre, P.D. Henry and C.Y. Yang, Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription, *Circulation* **107** (2003), 2102-2108.
- [15] A.M. Dart and J.P.F. Chin-Dusting, Lipids and the endothelium, *Cardiovascular Research* **43** (1999), 308-322.
- [16] E. Dejana, E. Tournier-Lasserre and B.M. Weinstein, The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications, *Developmental Cell* **16** (2009), 209-221.
- [17] K. Dietze, I. Slosarek, T. Fuhrmann-Selter, C. Hopperdietzel, J. Plendl and S. Käßmeyer, Isolation of equine endothelial cells and life cell angiogenesis assay, *Clinical*

- Hemorheology and Microcirculation* **58** (2014), 127-146.
- [18] M.A. Engelse, N. Laurens, R.E. Verloop, P. Koolwijk and V.W.M. van Hinsbergh, Differential gene expression analysis of tubule forming and non-tubule forming endothelial cells: CDC42GAP as a counter-regulator in tubule formation, *Angiogenesis* **11** (2008), 153-167.
- [19] R.P. Franke, R. Fuhrmann and F. Jung, Influence of radiographic contrast media on the nitric oxide release from human arterial and venous endothelial cells on extracellular matrix, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **55(1)** (2013), 95-100.
- [20] H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima and C. Betsholtz, VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia, *The Journal of Cell Biology* **161(6)** (2003), 1163-1177.
- [21] M. Hariri, G. Millane, M.P. Guimond, G. Guay, J.W. Dennis and I.R. Nabi, Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy, *Molecular Biology of the Cell* **11** (2000), 255-268.
- [22] S.P. Herbert and D.Y.R. Stainier, Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12** (2011), 551-564.
- [23] R.M. Hirschberg and J. Plendl, Pododermal angiogenesis and angioadaptation in the bovine claw, *Microscopy Research and Technique* **66** (2005), 145-155.
- [24] M.L. Iruela-Arispe and G.E. Davis, Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation, *Developmental Cell* **16** (2009), 222-231.
- [25] L. Ivan and F. Antohe, Hyperlipidemia induces endothelial-derived foam cells in culture, *Journal of Receptors and Signal Transduction* **30(2)**, 106-114.
- [26] J.J. Jang, H.K.V. Ho, H.H. Kwan, L.F. Fajardo and J.P. Cooke, Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia, *Circulation* **102** (2000), 1414-1419.
- [27] F. Jung and R.P. Franke, Extreme reduction of the capillary lumen in segments of the venular legs of human cutaneous capillaries, *Microvascular Research* **78** (2009), 241-245.
- [28] M.J. Kim, J. Dawes and W. Jessup, Transendothelial transport of modified low-density lipoproteins, *Atherosclerosis* **108** (1994), 5-17.
- [29] Y. Kubota, H.K. Kleinman, G.R. Martin and T.J. Lawley, Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures, *The Journal of Cell Biology* **107** (1988), 1589-1598.
- [30] P. Kumar, S. Kumar, H.B. Marsden, P.G. Lynch and E. Earnshaw, Weibel-Palade bodies in endothelial cells as a marker for angiogenesis in brain tumors, *Cancer Research* **40(6)** (1980), 2010-2019.
- [31] B. Li and R. Xiu, Angiogenesis: from molecular mechanisms to translational implications, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **54(4)** (2013), 345-355.
- [32] T.S. Li, M. Kubo, K. Ueda, M. Murakami, A. Mikamo and K. Hamano, Impaired angiogenic potency of bone marrow cells from patients with advanced age, anemia, and renal

- failure, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **139**(2) (2010), 459-465.
- [33] F. Lupu, I. Danaricu and N. Simionescu, Development of intracellular lipid deposits in the lipid-laden cells of atherosclerotic lesions, a cytochemical and ultrastructural study, *Atherosclerosis* **67** (1987), 127-142.
- [34] E.L. Mander, R.T. Dean, K.K. Stanley and W. Jessup, Apolipoprotein B of oxidized LDL accumulates in the lysosomes of macrophages, *Biochimica et Biophysica Acta* **1212** (1994), 80-92.
- [35] W. Martinet and G.R.Y. De Meyer, Autophagy in atherosclerosis, a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential, *Circulation Research* **104** (2009), 304-317.
- [36] J. Milei, G. Ottaviani, A.M. Lavezzi, D.R. Grana, I. Stella and L. Matturri, Perinatal and infant early atherosclerotic coronary lesions, *Canadian Journal of Cardiology* **24**(2) (2008), 137-141.
- [37] A.M. Müller, M.I. Hermanns, C. Skrzynski, M. Nesslinger, K.M. Müller and C.J. Kirkpatrick, Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWF, and CD34 *in vivo* and *in vitro*, *Experimental and Molecular Pathology* **72**(3) (2002), 221-229.
- [38] J. Neumüller and A. Ellinger, Secretion and endocytosis in endothelial cells, in: *The Golgi Apparatus*, A.A. Mironov, M. Pavelka, Springer Vienna, 2008, pp. 520-534.
- [39] M. Ochs, H. Fehrenbach and J. Richter, Electron spectroscopic imaging (ESI) and electron energy loss spectroscopy (EELS) of multilamellar bodies and multilamellar body-like structures in tannic acid-treated alveolar septal cells, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **42**(6) (1994), 805-809.
- [40] E. Pesonen, Preliminary and early stages of atherosclerosis in childhood, *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie* **135**(6) (1989), 545-548.
- [41] L.K. Phng and H. Gerhardt, Angiogenesis: a team effort coordinated by notch, *Developmental Cell* **16** (2009), 196-208.
- [42] J. Plendl, C. Neumüller and Fred Sinowitz, Differences of microvascular endothelium in the bovine corpus luteum of pregnancy and the corpus luteum of the estrous cycle, *Biology of the Cell* **87** (1996), 179-188.
- [43] K. Rahman and G.M. Lowe, Garlic and cardiovascular disease: a critical review, *Journal of nutrition* **136** (2006), 736-740.
- [44] G. Repetto, A. del Peso and J. L Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature Protocols* **3** (2008), 1125-1131.
- [45] R. Ross, T.N. Wight, E. Strandness and B. Thiele, Human atherosclerosis, I. cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery, *American Journal of Pathology* **114**(1) (1984), 79-93.
- [46] G. Schmitz and G. Müller, Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids, *Journal of Lipid Research* **32** (1991), 1539-1570.
- [47] P. Scholz, *Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit und ohne Supplementierung eines Serumersatzes*, Dissertation,

- Freie Universität Berlin, 2009.
- [48] C. Settembre and A. Ballabio, Lysosome: regulator of lipid degradation pathways, *Trends in Cell Biology* **24(12)** (2014), 743-750.
- [49] M.M. Sholley, S.A. Gudas, C.C. Schwartz and M.Y. Kalimi, Dehydroepiandrosterone and related steroids induce multilamellar lipid structures in cultured human endothelial cells, *American Journal of Pathology* **136(5)** (1990), 1187-1199.
- [50] H. Sievers, M. Bahrami-Soltani, S. Käßmeyer and J. Plendl, In vitro angiogenic potency in human microvascular endothelial cells derived from myocardium, lung and skin, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **48** (2011), 1-15.
- [51] M. Simionescu, Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27** (2007), 266-274.
- [52] K. Spanel-Borowski, M. Nowicki, J. Borlak, T. Trapphoff and U. Eichenlaub-Ritter, Endoplasmic reticulum-derived multilamellar bodies in oocytes of mouse follicle cultures under oxidized low-density lipoprotein treatment, *Cells Tissues Organs* **197** (2013), 77-88.
- [53] O. Stein and Y. Stein, Bovine aortic endothelial cells display macrophage-like properties towards acetylated I-labelled low density lipoprotein, *Biochimica et Biophysica Acta* **620** (1980), 631-635.
- [54] L.L. Stoll and A.A. Spector, Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines, *In Vitro* **20(9)** (1984), 732-738.
- [55] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Current Protocols in Immunology* (2001), Appendix 3B, doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- [56] Z. Tahergorabi and M. Khazaei, A review on angiogenesis and its assays, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **15(6)** (2012), 1110–1126.
- [57] E. Vasile, M. Simionescu and N. Simionescu, Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ, *The Journal of Cell Biology* **96** (1983), 1677-1689.
- [58] J. Yuan and G. Kroemer, Alternative cell death mechanisms in development and beyond, *Genes & Development* **24** (2010), 2592-2602.
- [59] M.E. Zettler, M.A. Prociuk, J.A. Austria, G. Zhong and G.N. Pierce, Oxidized low-density lipoprotein retards the growth of proliferating cells by inhibiting nuclear translocation of cell cycle proteins, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24** (2004), 727-732.

8. Unveröffentlichte Studie

8.1. Analyse des nach Bahramoltani et al. [13] definierten 6. Stadiums der angiogenen Kaskade humaner mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro*

8.1.1. Einleitung

Bahramoltani et al. [13] beschreiben das sechste Stadium der angiogenen Kaskade als Weiterentwicklung der kapillarähnlichen Strukturen unter gleichzeitiger Auflösung des Monolayers. Da an der Ausbildung der kapillarähnlichen Strukturen letztendlich nur ein Bruchteil der kultivierten Endothelzellen teilnimmt [48, 122], war von besonderem Interesse, welche Funktionen die Endothelzellen im Monolayer im Laufe der angiogenen Kaskade erfüllen. Dieser Fragestellung wurde mithilfe eines Life-Science-Mikroskops nachgegangen. Durch eine zusätzlich am Mikroskop angebrachte Heiz- und Begasungskammer konnten die Bedingungen im Brutschrank imitiert werden, so dass Langzeitaufnahmen kultivierter Endothelzellen während dieser finalen Phase der *in vitro*-Angiogenese möglich waren.

8.1.2. Material und Methoden

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Herz (HCMEC; HMVEC-C Cardiac MV Endo Cells, Lonza, Verviers, Belgien) wurden über mehrere Wochen auf gelatinisierten 24-Well-Platten (Iwaki; Tokio, Japan) in ihrem firmeneigenen Kultivierungsmedium (EGM[®]-2MV Bulletkit, Lonza, Verviers, Belgien) kultiviert. Die Endothelzellen wurden in der sechsten Passage in einer Konzentration von $4,5 \times 10^4$ Zellen pro Well ausgesät. Die Kultivierung erfolgte unter dem Life-Science-Mikroskop IX81 (Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt (okolab; Pozzuoli, Italien). Das Kultivierungsmedium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Mithilfe eines automatisierten Objektivtisches und der Software cell^R (Olympus, Hamburg, Deutschland) wurden am Übergang vom 5. zum 6. Stadium der angiogenen Kaskade in drei Wells je elf bis sechzehn Regionen besonderen Interesses ausgewählt und täglich aufgesucht. Digitale Aufnahmen wurden mithilfe der Videokamera XM10 (Olympus, Hamburg, Deutschland) in zum Teil halbstündlichen Abständen gemacht.

8.1.3. Ergebnisse

Abbildung 3 zeigt, dass die im Monolayer befindlichen Endothelzellen keinerlei angiogenes Verhalten zeigen und an der Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen zunächst nicht direkt beteiligt sind. Im weiteren Verlauf der Kultivierung lagern sich diese Endothelzellen jedoch an die bereits ausgebildeten kapillarähnlichen Stränge an. Dieser Prozess findet

unter gleichzeitiger Abschnürung von Zellmaterial in Form von Vesikeln statt (Abb. 3 d - h).

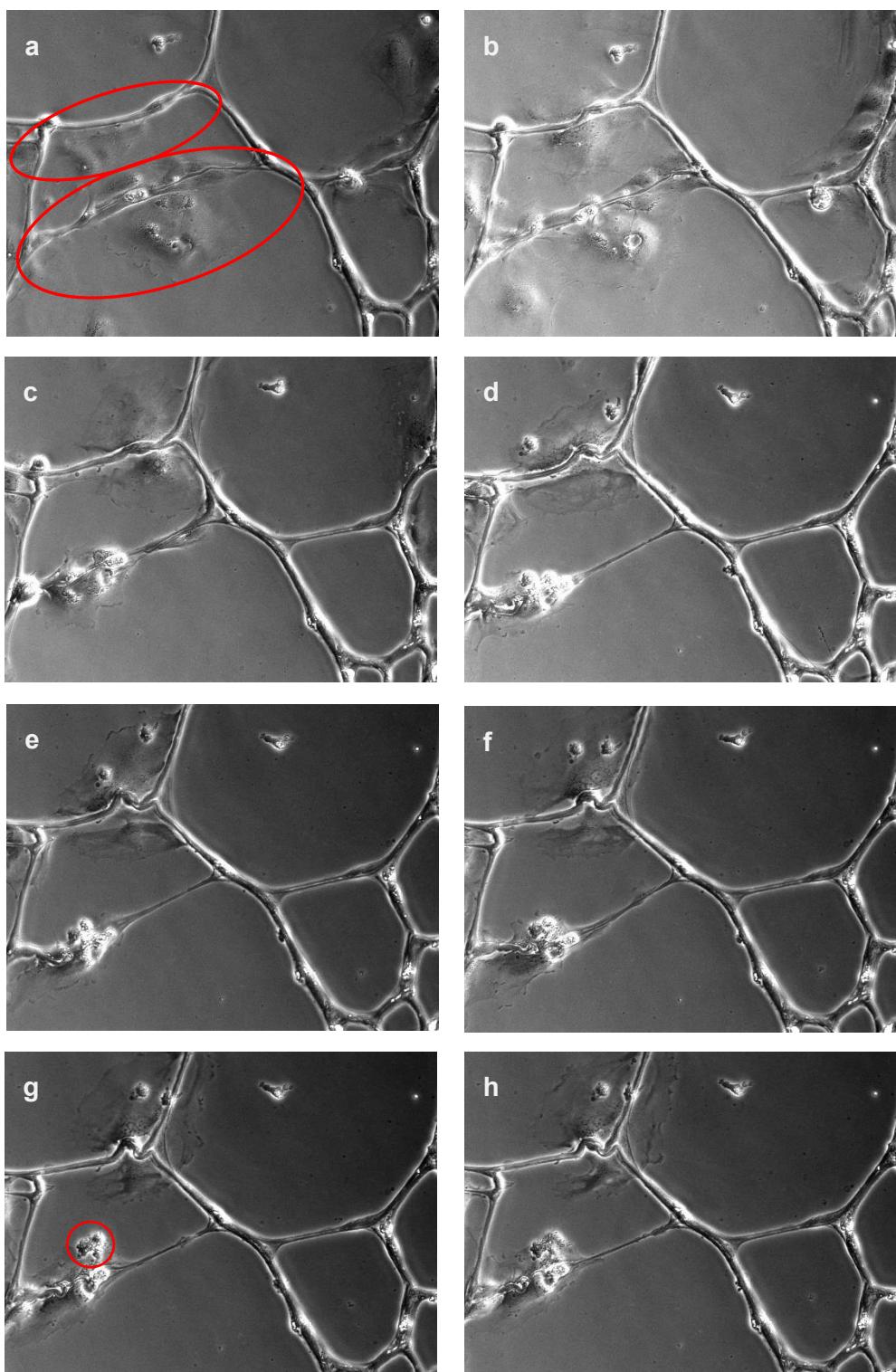


Abb. 3: Digitale Aufnahmen humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Herz im 6. Stadium der angiogenen Kaskade; a) ausgewählte Position, b) nach 5h, c) nach 26h, d) nach 48h, e) nach 49h, f) nach 50h, g) nach 51h, h) nach 51,5h (100x, Life-Science-Mikroskop). Die roten Markierungen in Abbildung 3 a) heben die ausgewählten Regionen besonderen Interesses hervor. In Abbildung 3 g) ist die Abschnürung kleiner Vesikel markiert.

8.1.4. Diskussion

Die Funktion der im Monolayer befindlichen Endothelzellen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Anlagerung der Endothelzellen an die kapillarähnlichen Stränge könnte einerseits dem Wachstum der Stränge dienen, andererseits könnten die angelagerten Endothelzellen auch die Funktion der in dieser Monokultur fehlenden Perizyten und vaskulären Myozyten übernommen haben, indem sie am Ende der angiogenen Kaskade die kapillarähnlichen Strukturen durch die Anlagerung an diese stabilisieren. Die Fähigkeit von Endothelzellen, die Aufgaben perivaskulärer Zellen zu übernehmen, wurde bereits durch mehrere Wissenschaftler beschrieben [33, 58, 125, 141] und könnte eine mögliche Ursache für die fehlende angiogene Potenz dieser Endothelzellen sein.

9. Diskussion

9.1. Erkenntnisse dieser Arbeit

Bei der *in vitro*-Kultivierung aktiverter Endothelzellen mit einem proangiogenen Kultivierungsmedium wird davon ausgegangen, dass alle Endothelzellen prinzipiell angiogen sind und die angiogene Kaskade bis hin zur Ausbildung kapillärähnlicher Strukturen durchlaufen. Bei der Kultivierung kommerziell erworber humaner mikrovaskulärer Endothelzellen in einem all-in-one-Modell [11] konnten Bahrami und Plendl [12] jedoch beobachten, dass die angiogene Potenz bestimmter Endothelzellkulturen trotz Kultivierung mit proangiogenen Kultivierungsmedien *in vitro* sehr gering ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Ursachen einer unterschiedlichen angiogenen Potenz humaner mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro* zugrunde liegen könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte das durch Bahrami und Plendl [12] beobachtete heterogene Verhalten kultivierter Endothelzellen hinsichtlich ihrer angiogenen Potenz bestätigt werden. Unterschiede in Bezug auf die angiogene Potenz humaner mikrovaskulärer Endothelzellen konnten zum einen zwischen Endothelzellen unterschiedlicher Organe, aber auch zwischen Endothelzellen unterschiedlicher Zellspender beobachtet werden. Selbst innerhalb einer Kultur verhielten sich Endothelzellen unterschiedlich angiogen. Dies deutet darauf hin, dass das angiogene Verhalten einer Endothelzelle primär von der Zelle an sich bestimmt wird und somit zwischen angiogenen und nicht-angiogenen Endothelzellen unterschieden werden kann. Jedoch konnte gezeigt werden, dass kultivierte Endothelzellen in der Ausprägung ihrer angiogenen Potenz nicht nur durch die Beschichtung des Kultivierungsgefäßes [8, 30, 44, 93], sondern auch durch die Zusammensetzung kommerziell erhältlicher proangiogener Kultivierungsmedien maßgeblich beeinflusst werden können. Demnach kann angenommen werden, dass die angiogene Potenz kultivierter Endothelzellen vornehmlich auf einer Interaktion dieser Zellen mit ihrer Umwelt beruht. Die Beobachtungen aus den letzten beiden Studien der vorliegenden Arbeit deuten zudem darauf hin, dass bestimmte Endothelzellen sogar dazu in der Lage sind, möglicherweise als Reaktion auf die Kultivierungsbedingungen, ihren Phänotyp zu ändern und die Funktion nicht vorhandener Zellen, wie zum Beispiel Perizyten, vaskulärer Myozyten oder Makrophagen zu übernehmen [7, 80, 125, 141]. Diese Endothelzellen exprimierten weiterhin endothiale Marker, zeigten jedoch keinerlei angiogene Potenz. Derartige Veränderungen des Phänotyps werden von einigen Wissenschaftlern mit vaskulären Erkrankungen, wie zum Beispiel Atherosklerose, in Zusammenhang gebracht [7, 80, 141]. Andere Wissenschaftler schreiben die Fähigkeit, sich in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen in eine bestimmte Zellart zu entwickeln, vornehmlich vaskulären Progenitorzellen zu. Diese wurden mittlerweile in der Wand selbst kleiner Blutgefäße nachgewiesen und könnten somit durchaus in isolierten Zellchargen enthalten sein [72, 78, 114, 119, 140].

Aufgrund der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass die angiogene Potenz kultivierter Endothelzellen und somit der Verlauf von *in vitro*-Studien zur Angiogenese in erster Linie davon abhängen kann, welche Endothelzellen isoliert und unter welchen Bedingungen sie kultiviert werden.

9.1.1. Konsequenzen für die Interpretation und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen aus *in vitro*-Studien

Basierend auf diesen Erkenntnissen und unter Berücksichtigung des mannigfaltigen Angebots an erhältlichen Chargen humaner mikrovaskulärer Endothelzellen sowie unterschiedlichen Möglichkeiten der Kultivierung stellt sich die Frage, inwiefern die Ergebnisse aus *in vitro*-Studien zur Angiogenese sicher reproduziert werden können. Zahlreiche Wissenschaftler bemängeln die Tatsache, dass viele präklinische Studien nicht reproduzierbar sind [20, 46, 98, 113]. Das Forschungsgebiet der Angiogenese ist hiervon ebenfalls betroffen [45, 126, 133]. Prinz et al. [113] führen die fehlende Reproduzierbarkeit von Ergebnissen präklinischer Studien nicht auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurück. Andere Wissenschaftler [20, 46] hingegen betrachten die Verwendung unterschiedlicher Zell- und Reagenzchargen durchaus als einen potentiellen Auslöser für die fehlende Reproduzierbarkeit präklinischer Studien. Die Ergebnisse der Studien der vorliegenden Arbeit weisen ebenfalls darauf hin. Durch den Einsatz unterschiedlicher Modelle in der Angiogenese-Forschung kann die Interpretation unterschiedlicher Ergebnisse außerdem erschwert werden [13, 127]. Einen weiteren Grund für die fehlende Reproduzierbarkeit von Ergebnissen aus präklinischen Studien sieht Elliott [46] darin, dass gewonnene Ergebnisse nicht ausreichend genug kontrolliert wurden, so dass es häufig zu falsch-positiven/-negativen Ergebnissen gekommen sein könnte. Die Tatsache, dass es kaum Veröffentlichungen gibt, die nicht-angiogenes Verhalten von Endothelzellen trotz proangiogener Kultivierungsbedingungen thematisieren, könnte darauf zurückzuführen sein, dass unzureichende Kontrollen dazu geführt haben, dass die fehlende Ausprägung der angiogenen Potenz kultivierter Endothelzellen unbemerkt blieb und somit eine Kultivierung mit anti-angiogenen Substanzen unter Umständen zu falsch-positiven Ergebnissen geführt hat. Da negative Ergebnisse bei den meisten Journals eine geringe Akzeptanz haben [41, 46, 97, 113], könnte eine gewisse Voreingenommenheit von Wissenschaftlern gegenüber der Veröffentlichung positiver Ergebnissen ebenfalls dazu geführt haben, dass *in vitro*-Studien zur Angiogenese womöglich falsch interpretiert wurden [46, 50, 113]. Anhand der Studien der vorliegenden Arbeit ist jedoch deutlich zu erkennen, wie wichtig es ist, negative Ergebnisse zu veröffentlichen, um auf derartige Beobachtungen in *in vitro*-Studien zur Angiogenese aufmerksam machen zu können.

9.1.2. Mögliche Lösungsansätze

Einige Verlage haben ihre Einstellung gegenüber negativen Ergebnissen bereits geändert und zum Teil sogar Journale herausgebracht, die ausschließlich der Publikation negativer Ergebnisse dienen. Den Wissenschaftlern kann dadurch der Druck genommen werden, positive Ergebnisse veröffentlichen zu müssen, so dass Ergebnisse in der Konsequenz eher hinterfragt, intensiver kontrolliert und wiederholt werden können [97].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass vor allem im Bereich der Angiogenese Kontrollen von *in vitro*-Studien unumgänglich sind. Vor dem Einsatz einer Endothelzellcharge empfiehlt es sich, diese vorab über mindestens 30 bis 40 Tage in dem gewählten *in vitro*-Modell zu kultivieren, um sicherstellen zu können, dass sie alle Stadien der angiogenen Kaskade durchläuft und demnach unter den gegebenen Voraussetzungen angiogen ist. Während der Versuchsdurchführung sind validierte Positiv- und Negativkontrollen erforderlich [8, 127]. Die Interpretation der Ergebnisse muss stets unter Berücksichtigung der verwendeten Zellcharge sowie der Kultivierungsbedingungen erfolgen [20, 39]. Daher sollten die Ergebnisse anhand weiterer Angiogenese-Modelle und unter Verwendung anderer Zellchargen und Kultivierungsmedien systematisch abgesichert werden [127]. Bei der Untersuchung der angiogenen Potenz multipotenter mesenchymaler Stromazellen des Menschen unter Entzug von Kälberserum verwendeten Oskowitz et al. [104] zur Absicherung ihrer Ergebnisse nicht nur unterschiedliche Angiogenese-Modelle, sondern auch mesenchymale Stromazellen unterschiedlicher Zellspender.

Aufgrund der Tatsache, dass *in vitro*-Modelle *in vivo*-Bedingungen nicht ausreichend genug wiedergeben können, müssen die Ergebnisse aus *in vitro*-Studien zudem in *in vivo*-Studien überprüft werden [8, 43, 64, 127]. Derzeit befassen sich zahlreiche Wissenschaftler mit der Entwicklung eines *in vitro*-Modells, das *in vivo*-Bedingungen weitestgehend nachempfinden kann. Bei dem sogenannten „Multiorgan-Chip“ handelt es sich um ein dreidimensionales *in vitro*-Modell zur Kultivierung lebender Zellen in kontinuierlich perfundierten, mikrometer-kleinen Kammern, wobei jede Kammer für sich ein eigenes Organmodell darstellen soll. Über einen künstlichen Kreislauf, der über eine Mikropumpe angetrieben wird, können die einzelnen Organmodelle miteinander verbunden werden. Somit können die physiologischen Abläufe im menschlichen Organismus *in vitro* weitestgehend nachempfunden werden [21, 49, 75-77, 96, 135]. Das Forschungsziel besteht darin, einen „Human-on-a-chip“ mit mehr als 10 Organmodellen auf einem Chip zu entwickeln. Durch die Entwicklung dieser Chips erhoffen sich die Wissenschaftler, einen Großteil der Tierversuche ersetzen und somit eine sicherere Entwicklung von Medikamenten gewährleisten zu können [95]. Im Bereich der Angiogenese-Forschung werden in diesem Modell jedoch weiterhin unterschiedliche Zellchargen eingesetzt, die auf Bestandteile der extrazellulären Matrix ausgesät und mit kommerziell erhältlichen Kultivierungsmedien kultiviert werden [86, 136]. Bezug nehmend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

wäre daher zu überprüfen, ob die ermittelte angiogene Potenz auch in diesem Modell durch die verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

Die Absicherung der angiogenen Potenz humaner mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro* könnte vereinfacht werden, wenn es dafür spezifische Marker gäbe. Bisher befassen sich nur wenige Wissenschaftler mit dem Ziel, Marker für angiogene Endothelzellen zu etablieren, um diese vorab schneller identifizieren zu können.

Bei der Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Herz, der Lunge sowie der neonatalen und adulten Haut in dem all-in-one-Modell nach Bahrami-Soltani und Plendl [11] konnten Bahrami-Soltani et al. [15] eine Korrelation zwischen der angiogenen Potenz dieser Zellen und deren Fähigkeit zur Synthese und Sekretion von Kollagen Typ IV nachweisen. Diese Korrelation konnte auch in der zweiten Studie der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, in der ebenfalls humane mikrovaskuläre Endothelzellen der neonatalen Haut in diesem all-in-one-Modell kultiviert wurden: Die nicht-angiogene Endothelzellkultur zeigte eine deutlich geringere Sekretion von Kollagen Typ IV und Laminin als die angiogene Endothelzellkultur.

In einer weiteren Studie untersuchten Bahrami-Soltani et al. [14] das Proteinexpressionsprofil humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Herz, der Lunge sowie der neonatalen und adulten Haut, die zuvor eine Woche lang in dem all-in-one-Modell [11] kultiviert wurden. Dabei konnten sieben Proteine, unter anderem Vimentin, ermittelt werden, die ausschließlich von den angiogenen Endothelzellkulturen exprimiert wurden. Aufgrund der Tatsache, dass Vimentin von angiogenen Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* exprimiert wird, könnte es als positiver Marker für angiogene Endothelzellen dienen [14, 36, 103, 134].

Engelse et al. [48] und Silva et al. [122] untersuchten das Genexpressionsprofil unterschiedlich angiogener Endothelzellen innerhalb einer Kultur. In beiden Studien wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Haut durch proangiogene Wachstumsfaktoren dazu stimuliert, kapillarähnliche Strukturen in eine dreidimensionale Fibrinmatrix auszubilden, um auf diese Weise eine Isolierung der angiogenen Endothelzellen in den kapillarähnlichen Strukturen getrennt von den nicht-angiogenen Endothelzellen im Monolayer zu ermöglichen. Engelse et al. [48] konnten nachweisen, dass in den angiogenen Endothelzellen die Expression von CDC42GAP reduziert war. CDC42GAP (p50RhoGAP) ist ein GTPase-aktivierendes Protein, das CDC42 (Cell Division Control Protein 42) inaktiviert [124]. CDC42 reguliert die Ausbildung von Filopodien und ist an der Lumenausbildung beteiligt. Eine Überexpression von CDC42GAP in den kultivierten Endothelzellen führte zu einer verminderten Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen, während die unterdrückte Expression von CDC42GAP die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen verstärkte. Das Expressionsprofil von CDC42GAP sowie vermutlich weiterer RhoGTPase-Regulatoren, wie p73RhoGAP und p68RhoGAP, könnte dazu genutzt werden, angiogene von nicht-angiogenen Endothelzellen innerhalb einer Kultur zu unterscheiden [5, 129].

Silva et al. [122] konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die angiogenen Endothelzellen im Vergleich zu den nicht-angiogenen Endothelzellen eine deutlich geringere CD 143-Expression aufwiesen. Nach einer Transplantation von Endothelzellen mit geringerer CD 143-Expression in ein ischämisches Gewebe bildeten diese deutlich mehr Blutgefäße aus als unsortierte Endothelzellen. Somit könnte eine geringe CD 143-Expression ebenfalls als Marker für angiogene Endothelzellen innerhalb einer Zellkultur eingesetzt werden. In Kombination mit Endothelzellmarkern könnten die Ergebnisse dieser Studien der Identifikation angiogener Endothelzellen dienen [14]. Jedoch ist auch hierbei wieder zu berücksichtigen, dass diese Ergebnisse bisher lediglich auf die in den jeweiligen Studien verwendeten Zellen und Kultivierungsbedingungen zurückgeführt werden können. Für einen erfolgreichen Einsatz als universelle Marker für angiogene Endothelzellen muss daher sichergestellt werden, dass diese Ergebnisse unter Verwendung anderer Zellchargen sowie Kultivierungsbedingungen reproduzierbar sind.

9.2. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung der Einflussfaktoren auf die angiogene Potenz kultivierter Endothelzellen lediglich in einem Angiogenese-Modell durchgeführt, dennoch konnte deutlich gezeigt werden, dass die angiogene Potenz kultivierter Endothelzellen und somit das Ergebnis von *in vitro*-Studien zur Angiogenese entscheidend davon abhängen kann, welche Endothelzellen verwendet und unter welchen Bedingungen sie kultiviert werden.

Demnach darf nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass jede Endothelzelle, die endotheliale Marker exprimiert und mit proangiogenen Kultivierungsmedien in einem beliebigen Angiogenese-Modell kultiviert wird, zur Angiogenese stimuliert werden kann und somit angiogen ist.

Es sind weitere Untersuchungen, auch unter Verwendung anderer Angiogenese-Modelle und Zellchargen, notwendig, um ein besseres Verständnis für die Zusammenhänge, vor allem in Bezug auf die phänotypischen Veränderungen der Endothelzellen sowie eine mögliche Beteiligung vaskulärer Progenitorzellen, entwickeln zu können. Die Etablierung universeller Marker stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, angiogene von nicht-angiogenen Endothelzellen unterscheiden zu können.

10. Zusammenfassung

Einflussfaktoren auf die angiogene Potenz humaner mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro*

Bei der Entwicklung anti-/angiogener Therapien werden erste Versuche hinsichtlich der Wirksamkeit einer Substanz in *in vitro*-Modellen durchgeführt. Dafür ist es erforderlich, dass isolierte Endothelzellen bei der Kultivierung in einem Angiogenese-Modell durch den Einsatz eines proangiogenen Kultivierungsmediums aktiviert und zur Angiogenese stimuliert werden können.

Bei der Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen unterschiedlicher Organe und Firmen in einem all-in-one-Modell [11] beobachteten Bahrami und Plendl [12], dass diese Zellen trotz Kultivierung in proangiogenen Kultivierungsmedien deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer angiogenen Potenz aufweisen können. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, potentielle Einflussfaktoren auf die angiogene Potenz humaner mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro* systematisch zu untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass kultivierte Endothelzellen prägnante Unterschiede hinsichtlich ihrer angiogenen Potenz aufweisen können. Diese wurden sowohl zwischen Endothelzellen unterschiedlicher Organe als auch unterschiedlicher Zellspender sowie zwischen Endothelzellen innerhalb derselben Kultur beobachtet. In der Ausprägung ihrer angiogenen Potenz können sie dabei maßgeblich durch die Kultivierungsbedingungen beeinflusst werden. Die Beobachtungen aus den letzten beiden Studien der vorliegenden Arbeit deuten zudem darauf hin, dass bestimmte Endothelzellen sogar dazu in der Lage sind, vermutlich als Reaktion auf die Kultivierungsbedingungen, ihren Phänotyp zu ändern und die Funktion nicht vorhandener Zellen, wie zum Beispiel Perizyten, vaskulären Myozyten oder Makrophagen zu übernehmen. Demnach kann angenommen werden, dass die angiogene Potenz einer Endothelzelle das Resultat einer Interaktion dieser Zelle mit ihrer Umwelt ist, so dass die Ergebnisse von *in vitro*-Studien zur Angiogenese in erster Linie von der verwendeten Endothelzellcharge sowie den Kultivierungsbedingungen abhängen. In Anbetracht des mannigfaltigen Angebots an unterschiedlichen Zellchargen sowie Kultivierungsbedingungen stellt sich daher die Frage, inwiefern *in vitro*-Studien zur Angiogenese sicher reproduzierbar sind. Wissenschaftliche Veröffentlichungen über nicht-angiogene Endothelzellen gibt es kaum. Dies gibt Grund zur Annahme, dass bei der Durchführung von *in vitro*-Studien zur Angiogenese der Einsatz unterschiedlicher Endothelzellchargen sowie Kultivierungsbedingungen als Einflussfaktoren auf die angiogene Potenz kultivierter Endothelzellen nicht ausreichend berücksichtigt und Studien zur Reproduzierbarkeit nicht durchgeführt wurden, infolgedessen es womöglich zu falsch-positiven/-negativen Ergebnissen gekommen sein könnte.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass Ergebnisse aus *in vitro*-Studien zur Angiogenese ausschließlich auf die in der jeweiligen Studie verwendeten Zellen und Kultivierungs-

bedingungen bezogen werden dürfen. Es ist dringend erforderlich, die gewonnenen Ergebnisse validierten Kontrollen zu unterziehen und in weiteren Modellen, auch unter Verwendung anderer Zellchargen, zu bestätigen.

Die vorliegende Arbeit hebt ebenfalls deutlich die Relevanz der Veröffentlichung negativer Ergebnisse hervor, um auf derartige Beobachtungen in *in vitro*-Studien zur Angiogenese aufmerksam machen zu können.

Die Tatsache, dass sich kultivierte Endothelzellen trotz Einsatz eines proangiogenen Kultivierungsmediums als nicht-angiogen erweisen können, muss bei der Durchführung von *in vitro*-Studien zur Angiogenese unbedingt berücksichtigt werden.

Die Etablierung universeller Marker könnte eine Unterscheidung angiogener von nicht-angiogenen Endothelzellen ermöglichen.

11. Summary

Influences on the angiogenic potency of human microvascular endothelial cells *in vitro*

In the development of anti-/angiogenic therapies, initial tests concerning the effectiveness of a substance are performed in *in vitro* assays. For this purpose, it is necessary to activate and stimulate isolated endothelial cells to angiogenesis by using a proangiogenic growth medium in an angiogenesis-assay for their cultivation.

Bahrami and Plendl [12], however, illustrated in an all-in-one-assay [11] that cultivated human microvascular endothelial cells of different organs and distributors can show noticeable differences concerning their angiogenic potency, despite cultivation in proangiogenic growth media.

Therefore, the aim of the present thesis was the systematic investigation of potential influences on the angiogenic potency of human microvascular endothelial cells *in vitro*.

The results of the present thesis confirm that cultivated endothelial cells display distinct differences in regard to their angiogenic potency. Differences were observed between endothelial cells of different organs as well as different cell donors, and between endothelial cells within the same cell culture. In manifestation of their angiogenic potency, endothelial cells are decisively influenced by the cultivation conditions. Observations from the two last studies of this thesis indicate that certain endothelial cells are able to alter their phenotype and to take on the role of cells which are not present, like pericytes, vascular myocytes or macrophages, presumably in answer to the cultivation conditions. Thus, it can be assumed that the angiogenic potency of cultivated endothelial cells is the result of the interaction of these cells with their environment, so that findings of *in vitro*-studies of angiogenesis can primarily depend on the used cell batch as well as the cultivation conditions. Considering the various range of different cell batches as well as the different culti-

vation conditions available, the question arises whether *in vitro*-studies in angiogenesis research are reproducible in a reliable manner. There are hardly any scientific publications concerning non-angiogenic endothelial cells. This gives reason to believe that in previous studies, the influence on the angiogenic potency of cultivated endothelial cells by using different endothelial cell batches as well as cultivation conditions were not taken adequately into account, and that reproducibility studies were not performed. Consequently, the results of *in vitro*-studies could be misinterpreted.

The present thesis shows that the results of *in vitro*-studies concerning angiogenesis may only be interpreted within the scope of the cell batches and cultivation conditions used. It is necessary to further validate the results using different assays, such as validated control assays, and cell batches.

Furthermore, the present thesis clearly indicates the relevance of the publication of negative results in order to illustrate such observations in *in vitro* angiogenesis studies.

The fact that cultivated endothelial cells may turn out to be non-angiogenic despite application of a proangiogenic growth medium must be taken into account when performing angiogenesis *in vitro*-studies. The establishment of universal markers could enable a differentiation between angiogenic and anti-angiogenic endothelial cells.

12. Literaturverzeichnis von Einleitung, unveröffentlichter Studie und Diskussion

- [1] Aird, W.C., Endothelial cell heterogeneity, *Critical Care Medicine* **31** (2003), S. 221-230.
- [2] Aird, W.C., Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease, *Circulation Research* **98** (2006), S. 159-162.
- [3] Aird, W.C., Phenotypic heterogeneity of the endothelium, *Circulation Research* **100** (2007), S. 174-190.
- [4] Aird, W.C., Endothelial cell heterogeneity, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2** (2012), S. 1-13.
- [5] Aitsebaomo, J., Wennerberg, K., Der, C.J., Zhang, C., Kedar, V., Moser, M., Kingsley-Kallesen, M.L., Zeng, G.Q. and Patterson, C., p68RacGAP is a novel GTPase-activating protein that interacts with vascular endothelial zinc finger-1 and modulates endothelial cell capillary formation, *The Journal of Biological Chemistry* **279** (2004), S. 17963-17972.
- [6] Algire, G.H., An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse, *Journal of the National Cancer Institute* **4** (1943), S. 1-11.
- [7] Antohe, F., Endothelial cells and macrophages, partners in atherosclerotic plaque progression, *Archives of Physiology and Biochemistry* **112** (2006), S. 245-53.
- [8] Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L. and Akhtar, N., Angiogenesis assays: a critical overview, *Clinical Chemistry* **49** (2003), S. 32-40.
- [9] Ausprung, D.H., Knighton, D.R. and Folkman, J., Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels, *The American Journal of Pathology* **79** (1975), S. 597-682.
- [10] Ausprung, D.H. and Folkman, J., Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis, *Microvascular Research* **14** (1977), S. 53-65.
- [11] Bahrami, M. and Plendl, J., A new in vitro model to quantify angiogenesis, *Alternatives to Animal Experimentation* **21** (2004), S. 227-244.
- [12] Bahrami, M. and Plendl, J., Establishment of realistic in vitro models of angiogenesis: How to make the right choice, *Alternatives to Animal Experimentation* **24** (2007), S. 185-186.
- [13] Bahrami, M., De Spiegelaere, W., Janczyk, P., Hiebl, B., Cornillie, P. and Plendl, J., Quantitation of angiogenesis in vitro induced by VEGF-A and FGF-2 in two different human endothelial cultures – an all-in-one assay, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **46** (2010), S. 189-202.
- [14] Bahrami, M., Harms, T., Drewes, B. and Plendl, J., Searching for markers to identify angiogenic endothelial cells: a proteomic approach, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **55** (2013), S. 255-269.
- [15] Bahrami, M., Slosarek, I., De Spiegelaere, W. and Plendl, J., Angiogenesis and collagen type IV expression in different endothelial cell culture systems, *Anatomia, Histologia, Embryologia* **43** (2014), S. 103-115.
- [16] Bahrami, M. and De Spiegelaere, W., Tumor Angiogenesis Assays: Methods and Protocols, *Tumor Angiogenesis Assays: Methods and Protocols* (2016), Springer New York.
- [17] Baker, M., Robinson, S.D., Lechertier, T., Barber, P.R., Tavora, B., D'amico, G., Jones, D.T., Vojnovic, B. and Hodivala-Dilke, K., Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis, *Nature Protocols* **7** (2012), S. 89-104.
- [18] Bär, T. and Wolff, J.R., The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex, *Cell and Tissue Research* **133** (1972), S. 231-248.
- [19] Benest, A.V., Salmon, A.H., Wang, W., Glover, C.P., Uney, J., Harper, S.J. and Bates, D.O., VEGF and angiopoietin-1 stimulate different angiogenic phenotypes

- that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue, *Microcirculation* **13** (2006), S. 423-437.
- [20] Berg, E.L., Hsu, Y.C. and Lee, J.A., Consideration of the cellular microenvironment: physiologically relevant co-culture systems in drug discovery, *Advanced Drug Delivery Reviews* **69** (2014), S. 190-204.
- [21] Bhatia, S.N. and Ingber, D.E., Microfluidic organs-on-chips, *Nature Biotechnology* **32** (2014), S. 760-772.
- [22] Biel, N.M., Lee, J.A., Sorg, B.S. and Siemann, D.W., Limitations of the dorsal skinfold window chamber model in evaluating anti-angiogenic therapy during early phase of angiogenesis, *Vascular Cell* **6** (2014), S. 1-11.
- [23] Birsner, A.E., Benny, O. and D'Amato, R.J. The corneal micropocket assay: A model of angiogenesis in the mouse eye, *Journal of Visualized Experiments* (2014), last update 16.08.2014; available from: <http://www.jove.com/video/51375>.
- [24] Blacher, S., Devy, L., Burbridge, M.F., Roland, G., Tucker, G., Noël, A. and Foidart, J.M., Improved quantification of angiogenesis in the rat aortic ring assay, *Angiogenesis* **4** (2001), S. 133-142.
- [25] Blanco, R. and Gerhardt, H., VEGF and Notch in tip and stalk cell selection, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3** (2013), S. 1-19.
- [26] Børsum, T., Hagen, I., Henriksen, T. and Carlander, B., Alterations in the protein composition and surface structure of human endothelial cells during growth in primary culture, *Atherosclerosis* **44** (1982), S. 367-378.
- [27] Bryan, N., Andrews, K.D., Loughran, M.J., Rhodes, N.P. and Hunt, J.A., Elucidating the contribution of the elemental composition of fetal calf serum to antigenic expression of primary human umbilical-vein endothelial cells in vitro, *Bioscience Reports* **31** (2011), S. 199-210.
- [28] Burri, P.H. and Djonov, V., Intussusceptive angiogenesis - the alternative to capillary sprouting, *Molecular Aspects of Medicine* **23** (2002), S. 1-27.
- [29] Burri, P.H., Hlushchuk, R. and Djonov, V., Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance, *Developmental Dynamics* **231** (2004), S. 474-488.
- [30] Campbell, N.E., Kellenberger, L., Greenaway, J., Moorehead, R.A., Linnerth-Petrik, N.M. and Petrik, J., Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis, *Journal of Oncology* **2010** (2010), S. 1-13.
- [31] Chambers, R. and Zweifach, B.W., Topography and function of the mesenteric capillary circulation, *Developmental Dynamics* **75** (1944), S. 173-205.
- [32] Cole, R.W., Liu, F., Herron, B.J., Méndez-Vilaz, A. and Diaz, J., Imaging of angiogenesis: past, present and future, *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* **3** (2010), S. 885-896.
- [33] Coll-Bonfill, N., Musri, M.M., Ivo, V., Barberà, J.A. and Tura-Ceide, O., Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling, *American Journal of Stem Cells* **4** (2015), S. 13-21.
- [34] Cooke, J.P. and Losordo, D.W., Modulating the Vascular Response to Limb Ischemia, *Circulation Research* **116** (2015), S. 1561-1578.
- [35] Crabtree, B. and Subramanian, V., Behavior of endothelial cells on Matrigel and development of a method for a rapid and reproducible in vitro angiogenesis assay, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **43** (2007), S. 87-94.
- [36] Dave, J.M. and Bayless, K.J., Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting, *Microcirculation* **21** (2014), S. 333-344.
- [37] Davis, G.E. and Senger, D.R., Endothelial Extracellular Matrix, Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization *Circulation Research* **97** (2005), S. 1093-1107.
- [38] Davis, G.E. and Senger, D.R., Extracellular matrix mediates a molecular balance between vascular morphogenesis and regression, *Current Opinion in Hematology* **15** (2008), S. 197-203.

- [39] De Spiegelaere, W., Cornillie, P., Van den Broeck, W., Plendl, J. and Bahramoltani, M., Angiopoietins differentially influence in vitro angiogenesis by endothelial cells of different origin, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **48** (2011), S. 15-27.
- [40] De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van den Broeck, W., Plendl, J., Bahramoltani, M., Simoens, P., Djonov, V. and Cornillie, P., Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis, *Journal of Vascular Research* **49** (2012), S. 390-404.
- [41] Dirnagl, U. and Lauritzen, M., Fighting publication bias: introducing the Negative Results section, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **30** (2010), S. 1263-1264.
- [42] Doke, S.K. and Dhawale, S.C., Alternatives to animal testing: A review, *Saudi Pharmaceutical Journal* **23** (2015), S. 223-229.
- [43] Donovan, D., Brown, N.J., Bishop, E.T. and Lewis, C.E., Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo, *Angiogenesis* **4** (2001), S. 113-121.
- [44] Dye, J.F., Lawrence, L., Linge, C., Leach, L., Firth, J.A. and Clark, P., Distinct patterns of microvascular endothelial cell morphology are determined by extracellular matrix composition, *Journal of Endothelial Cell Research* **11** (2004), S. 151-167.
- [45] Ebos, J.M.L. and Kerbel, R.S., Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis, *Nature Reviews Clinical Oncology* **8** (2011), S. 210-221.
- [46] Elliott, S., Bad Science: Cause and Consequence, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **105** (2016), S. 1358-1361.
- [47] Endrich, B., Asaishi, K., Götz, A. and Meßmer, K., Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters, *Research in Experimental Medicine* **177** (1980), S. 125-134.
- [48] Engelse, M.A., Laurens, N., Verloop, R.E., Koolwijk, P. and van Hinsbergh, V.W.M., Differential gene expression analysis of tubule forming and non-tubule forming endothelial cells: CDC42GAP as a counter-regulator in tubule formation, *Angiogenesis* **11** (2008), S. 153-167.
- [49] Esch, E.W., Bahinski, A. and Huh, D., Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery, *Nature Reviews Drug Discovery* **14** (2015), S. 248-260.
- [50] Fanelli, D., Negative results are disappearing from most disciplines and countries, *Scientometrics* **90** (2011), S. 891-904.
- [51] Fernando, N.V.P. and Movat, H.Z., The fine structure of the terminal vascular bed: III. The capillaries, *Experimental and Molecular Pathology* **3** (1964), S. 87-97.
- [52] Findlay, J.K., Angiogenesis in reproductive tissues, *Journal of Endocrinology* **111** (1986), S. 357-366.
- [53] Folkman, J., Haudenschild, C. and Zetter, B.R., Long-term culture of capillary endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76** (1979), S. 5217-5221.
- [54] Folkman, J. and Haudenschild, C., Angiogenesis in vitro, *Nature* **288** (1980), S. 551-556.
- [55] Folkman, J. and Ingber, D., Inhibition of angiogenesis, *Seminars in Cancer Biology* **3** (1992), S. 89-96.
- [56] Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nature Medicine* **1** (1995), S. 27-30.
- [57] Folkman, J., Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Seminars in Oncology* **29** (2002), S. 15-18.
- [58] Frid, M.G., Kale, V.A. and Stenmark, K.R., Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation, *Circulation Research* **90** (2002), S. 1189-1196.

- [59] Fry, A.K. and Higgins, A.Z., Measurement of cryoprotectant permeability in adherent endothelial cells and applications to cryopreservation, *Cellular and Molecular Bioengineering* **5** (2012), S. 287-298.
- [60] Fukuda, S., Yoshii, S., Kaga, S., Matsumoto, M., Kugiyama, K. and Maulik, N., Angiogenic strategy for human ischemic heart disease: brief overview, *Molecular and Cellular Biochemistry* **264** (2005), S. 143-149.
- [61] Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K. and Shima, D., VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia, *The Journal of Cell Biology* **161** (2003), S. 1163-1177.
- [62] Gervais, L. and Casanova, J., In vivo coupling of cell elongation and lumen formation in a single cell, *Current Biology* **20** (2010), S. 359-366.
- [63] Gimbrone, M.A., Cotran, R.S., Leapman, S.B. and Folkman, J., Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea, *Journal of the National Cancer Institute* **52** (1974), S. 413-427.
- [64] Goodwin, A.M., In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents, *Microvascular Research* **74** (2007), S. 172-183.
- [65] Grant, D.S. and Kleinman, H.K., Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix, *Regulation of Angiogenesis* (1997), Springer.
- [66] Hagedorn, M. and Bikfalvi, A., Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **34** (2000), S. 89-110.
- [67] Heidenreich, R., Röcken, M. and Ghoreschi, K., Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis, *International Journal of Experimental Pathology* **90** (2009), S. 232-248.
- [68] Herwig, L., Blum, Y., Krudewig, A., Ellerstsdottir, E., Lenard, A., Belting, H.G. and Affolter, M., Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo, *Current Biology* **21** (2011), S. 1942-1948.
- [69] Hetheridge, C., Mavria, G. and Mellor, H., Uses of the in vitro endothelial–fibroblast organotypic co-culture assay in angiogenesis research, *Biochemical Society Transactions* **39** (2011), S. 1597-1600.
- [70] Hiebl, B., Bog, S., Mrowietz, C., Juenger, M., Jung, F., Lendlein, A. and Franke, R.P., Influence of VEGF stimulated human macrophages on the proliferation of dermal microvascular endothelial cells: coculture experiments, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **46** (2010), S. 211-216.
- [71] Hirschberg, R.M., Sachtleben, M. and Plendl, J., Electron microscopy of cultured angiogenic endothelial cells, *Microscopy Research and Technique* **67** (2005), S. 248-259.
- [72] Hirschberg, R.M., Plendl, J. and Kaessmeyer, S., Alpha smooth muscle actin in the cycling ovary - an immunohistochemical study, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **50** (2012), S. 113-129.
- [73] Hughes, C.C.W., Endothelial–stromal interactions in angiogenesis, *Current Opinion in Hematology* **15** (2008), S. 204-209.
- [74] Hughes, C.S., Postovit, L.M. and Lajoie, G.A., Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture, *Proteomics* **10** (2010), S. 1886-1890.
- [75] Huh, D., Hamilton, G.A. and Ingber, D.E., From 3D cell culture to organs-on-chips, *Trends in Cell Biology* **21** (2011), S. 745-754.
- [76] Huh, D., Torisawa, Y.S., Hamilton, G.A., Kim, H.J. and Ingber, D.E., Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips, *Lab on a Chip* **12** (2012), S. 2156-2164.
- [77] Huh, D., Kim, H.J., Fraser, J.P., Shea, D.E., Khan, M., Bahinski, A., Hamilton, G.A. and Ingber, D.E., Microfabrication of human organs-on-chips, *Nature Protocols* **8** (2013), S. 2135-2157.

- [78] Ingram, D.A., Mead, L.E., Moore, D.B., Woodard, W., Fenoglio, A. and Yoder, M.C., Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells, *Blood* **105** (2005), S. 2783-2786.
- [79] Invernici, G., Ponti, D., Corsini, E., Cristini, S., Frigerio, S., Colombo, A., Parati, E. and Alessandri, G., Human microvascular endothelial cells from different fetal organs demonstrate organ-specific CAM expression, *Experimental Cell Research* **308** (2005), S. 273-282.
- [80] Ivan, L. and Antohe, F., Hyperlipidemia induces endothelial-derived foam cells in culture, *Journal of Receptors and Signal Transduction* **30** (2010), S. 106-114.
- [81] Junqueira, L.C. and Carneiro, J., *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histopathologie* (1996), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [82] Kaessmeyer, S. and Plendl, J., Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **41** (2009), S. 83-101.
- [83] Kalluri, R., Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis, *Nature Reviews Cancer* **3** (2003), S. 422-433.
- [84] Kerbel, R. and Folkman, J., Clinical translation of angiogenesis inhibitors, *Nature Reviews Cancer* **2** (2002), S. 727-739.
- [85] Kim, N.S. and Kim, S.J., Isolation and cultivation of microvascular endothelial cells from rat lungs: effects of gelatin substratum and serum, *Yonsei Medical Journal* **32** (1991), S. 303-314.
- [86] Kim, S., Lee, H., Chung, M. and Jeon, N.L., Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip, *Lab on a Chip* **13** (2013), S. 1489-1500.
- [87] Kleinman, H.K. and Martin, G.R., Matrigel: basement membrane matrix with biological activity, *Seminars in Cancer Biology* **15** (2005), S. 378-386.
- [88] Kniazeva, E. and Putnam, A.J., Endothelial cell traction and ECM density influence both capillary morphogenesis and maintenance in 3-D, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **297** (2009), S. C179-C187.
- [89] Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M. and Dolznig, H., In vitro cell migration and invasion assays, *Mutation Research* **752** (2013), S. 10-24.
- [90] Lacorre, D.A., Baekkevold, E.S., Garrido, I., Brandtzaeg, P., Haraldsen, G., Amalric, F. and Girard, J.P., Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment, *Blood* **103** (2004), S. 4164-4172.
- [91] Lehr, H.A., Leunig, M., Menger, M.D., Nolte, D. and Messmer, K., Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice, *The American Journal of Pathology* **143** (1993), S. 1055-1062.
- [92] Madri, J.A. and Williams, S.K., Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components, *The Journal of Cell Biology* **97** (1983), S. 153-165.
- [93] Marin, V., Kaplanski, G., Gres, S., Farnarier, C. and Bongrand, P., Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells, *Journal of Immunological Methods* **254** (2001), S. 183-190.
- [94] Marrelli, A., Cipriani, P., Liakouli, V., Carubbi, F., Perricone, C., Perricone, R. and Giacomelli, R., Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation?, *Autoimmunity Reviews* **10** (2011), S. 595-598.
- [95] Marx, U., Walles, H., Hoffmann, S., Lindner, G., Horland, R., Sonntag, F., Klotzbach, U., Sakharov, D., Tonevitsky, A. and Lauster, R., 'Human-on-a-chip' developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man?, *Alternatives to Laboratory Animals* **40** (2012), S. 235-257.

- [96] Maschmeyer, I., Lorenz, A.K., Schimek, K., Hasenberg, T., Ramme, A.P., Hübner, J., Lindner, M., DREWELL, C., Bauer, S. and Thomas, A., A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents, *Lab on a Chip* **15** (2015), S. 2688-2699.
- [97] Matosin, N., Frank, E., Engel, M., Lum, J.S. and Newell, K.A., Negativity towards negative results: a discussion of the disconnect between scientific worth and scientific culture, *Disease Models & Mechanisms* **7** (2014), S. 171-173.
- [98] Mobley, A., Linder, S.K., Braeuer, R., Ellis, L.M. and L., Z., A survey on data reproducibility in cancer research provides insights into our limited ability to translate findings from the laboratory to the clinic, *PLOS ONE* **8** (2013), S. 1-4.
- [99] Nehls, V. and Drenckhahn, D., The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle?, *Histochemistry* **99** (1993), S. 1-12.
- [100] Nicosia, R.F. and Ottinetti, A., Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro, *Laboratory investigation* **63** (1990), S. 115-122.
- [101] Nooteboom, A., Hendriks, T., Ottehöller, I. and Van Der Linden, C.J., Permeability characteristics of human endothelial monolayers seeded on different extracellular matrix proteins, *Mediators of Inflammation* **9** (2000), S. 235-241.
- [102] Nowak-Sliwinska, P., Ballini, J.P., Wagnières, G. and Van Den Bergh, H., Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model, *Microvascular Research* **79** (2010), S. 21-28.
- [103] Nowak-Sliwinska, P., van Beijnum, J.R., van Berkel, M., van den Bergh, H. and Griffioen, A.W., Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane, *Angiogenesis* **13** (2010), S. 281-292.
- [104] Oskowitz, A., McFerrin, H., Gutschow, M., Carter, M.L. and Pochampally, R., Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic, *Stem Cell Research* **6** (2011), S. 215-225.
- [105] Papapetropoulos, A., Garcia-Cadena, G., Dengler, T.J., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D. and Sessa, W.C., Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors, *Laboratory investigation* **79** (1999), S. 213-223.
- [106] Papenfuss, H.D., Gross, J.F., Intaglietta, M. and Treese, F.A., A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold, *Microvascular Research* **18** (1979), S. 311-318.
- [107] Paulsson, M., Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **27** (1991), S. 93-127.
- [108] Peters, K., Troyer, D., Kummer, S., Kirkpatrick, C.J. and Rauterberg, J., Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro, *Microvascular Research* **64** (2002), S. 334-338.
- [109] Plendl, J., Angiogenesis and vascular regression in the ovary, *Anatomia, Histologia, Embryologia* **29** (2000), S. 257-266.
- [110] Plendl, J., Kässmeyer, S., Stark, R. and Bahramsooltani, M., Alternativen zu Tierversuchen, *Nova Acta Leopoldina* **95** (2006), S. 71-80.
- [111] Polchow, B., Kebbel, K., Schmiedeknecht, G., Reichardt, A., Henrich, W., Hetzer, R. and Lueders, C., Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks, *Journal of Translational Medicine* **10** (2012), S. 1-17.
- [112] Polverini, P.J., Angiogenesis and wound healing: basic discoveries, clinical implications, and therapeutic opportunities, *Endodontic Topics* **24** (2011), S. 130-145.

- [113] Prinz, F., Schlange, T. and Asadullah, K., Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets?, *Nature Reviews Drug Discovery* **10** (2011), S. 712-712.
- [114] Psaltis, P.J. and Simari, R.D., Vascular wall progenitor cells in health and disease, *Circulation Research* **116** (2015), S. 1392-1412.
- [115] Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L. and ammacco, F., Endothelial cell heterogeneity and organ specificity, *Journal of Hematology & Stem Cell Research* **11** (2002), S. 81-90.
- [116] Ribatti, D. and Crivellato, E., "Sprouting angiogenesis", a reappraisal, *Developmental Biology* **372** (2012), S. 157-165.
- [117] Risau, W., Mechanisms of angiogenesis, *Nature* **386** (1997), S. 671-674.
- [118] Russell, W.M.S. and Burch, R.L., *The principles of humane experimental technique* (1959), Methuen, London.
- [119] Schoen, K., Hirschberg, R.M., Plendl, J. and Kaessmeyer, S., Identification of CD133-, CD34-and KDR-positive cells in the bovine ovary: A new site of vascular wall resident endothelial progenitor cells, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **52** (2012), S. 67-84.
- [120] Schrödel, A., Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien, *Biologie in unserer Zeit* **37** (2007), S. 289-289.
- [121] Sigurbjörnsdóttir, S., Mathew, R. and Leptin, M., Molecular mechanisms of de novo lumen formation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15** (2014), S. 665-676.
- [122] Silva, E.A., Eseonu, C. and Mooney, D.J., Endothelial cells expressing low levels of CD143 (ACE) exhibit enhanced sprouting and potency in relieving tissue ischemia, *Angiogenesis* **17** (2014), S. 617-630.
- [123] Silvestre, J.S. and Levy, B.I., Angiogenesis therapy in ischemic disease, *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux* **95** (2002), S. 189-196.
- [124] Smith, G.R., Givan, S.A., Cullen, P. and Sprague Jr, G.F., GTPase-activating proteins for Cdc42, *Eukaryotic Cell* **1** (2002), S. 469-480.
- [125] Sommer, M., Gerth, J., Stein, G. and Wolf, G., Transdifferentiation of endothelial and renal tubular epithelial cells into myofibroblast-like cells under in vitro conditions: a morphological analysis, *Cells Tissues Organs* **180** (2005), S. 204-214.
- [126] Staton, C.A., Stribbling, S.M., Tazzymann, S., Hughes, R., Brown, N.J. and Lewis, C.E., Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo, *International Journal of Experimental Pathology* **85** (2004), S. 233-248.
- [127] Staton, C.A., Reed, M.W.R. and Brown, N.J., A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays, *International Journal of Experimental Pathology* **90** (2009), S. 195-221.
- [128] Stephens, M.L., Fowle, J., Boverhof, D., Richmond, J., Recio, L., Zhu, H., Alepee, N., Curren, R., Baskettter, D. and Natsch, A., *Reducing, Refining and Replacing the Use of Animals in Toxicity Testing* (2013), RSC Publishing.
- [129] Su, Z.J., Hahn, C.N., Goodall, G.J., Reck, N.M., Leske, A.F., Davy, A., Kremmidiotis, G., Vadas, M.A. and Gamble, J.R., A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (2004), S. 12212-12217.
- [130] Tahergorabi, Z. and Khazaei, M., A review on angiogenesis and its assays, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **15** (2012), S. 1110-1126.
- [131] Ucuzian, A.A. and Greisler, H.P., In vitro models of angiogenesis, *World Journal of Surgery* **31** (2007), S. 654-663.
- [132] Usui, Y., Westenskow, P.D., Murinello, S., Dorrell, M.I., Scheppke, L., Bucher, F., Sakimoto, S., Paris, L.P., Aguilar, E. and Friedlander, M., Angiogenesis and Eye Disease, *Annual Review of Vision Science* **1** (2015), S. 155-184.

- [133] Vailhé, B., Vittet, D. and Feige, J.J., In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis, *Laboratory Investigation* **81** (2001), S. 439-452.
- [134] van Beijnum, J.R., Dings, R.P., van der Linden, E., Zwaans, B.M.M., Ramaekers, F.C.S., Mayo, K.H. and Griffioen, A.W., Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature, *Blood* **108** (2006), S. 2339-2348.
- [135] van der Meer, A.D. and van den Berg, A., Organs-on-chips: breaking the in vitro impasse, *Integrative Biology* **4** (2012), S. 461-470.
- [136] van der Meer, A.D., Orlova, V.V., ten Dijke, P., van den Berg, A. and Mummery, C.L., Three-dimensional co-cultures of human endothelial cells and embryonic stem cell-derived pericytes inside a microfluidic device, *Lab on a Chip* **13** (2013), S. 3562-3568.
- [137] Weijers, E.M., Van Wijhe, M.H., Joosten, L., Horrevoets, A.J.G., De Maat, M.P.M., Van Hinsbergh, V.W.M. and Koolwijk, P., Molecular weight fibrinogen variants alter gene expression and functional characteristics of human endothelial cells, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **8** (2010), S. 2800-2809.
- [138] Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S. and Carmeliet, P., Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer, *The Journal of Clinical Investigation* **123** (2013), S. 3190-3200.
- [139] Yan, J., Nunn, A.D. and Thomas, R., Selective induction of cell adhesion molecules by proinflammatory mediators in human cardiac microvascular endothelial cells in culture, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* **3** (2010), S. 315-331.
- [140] Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U.M., Ito, W.D., Treede, H., Lauke, H., Weil, J., Reichenspurner, H., Kilic, N. and Ergün, S., Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis, *Development* **133** (2006), S. 1543-1551.
- [141] Zhu, P., Huang, L., Ge, X., Yan, F., Wu, R. and Ao, Q., Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling, *International Journal of Experimental Pathology* **87** (2006), S. 463-474.

13. Publikationsliste

13.1. Originalartikel

Sievers, H., Bahrami, M., Käßmeyer, S., Plendl, J., *In vitro angiogenic potency in human microvascular endothelial cells derived from myocardium, lung and skin*, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **49** (2011), S. 473-486, DOI 10.3233/CH-2011-1497

Sievers, H., Hirschberg, R.M., Hiebl, B., Hünigen, H., Plendl, J., Human microvascular endothelial cells displaying reduced angiogenesis and increased uptake of lipids during *in vitro* culture, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **61** (2015), S. 367-383, DOI 10.3233/CH-152002

13.2. Beteiligung der Autoren an den Originalartikeln

13.2.1. *In vitro* angiogenic potency in human microvascular endothelial cells derived from myocardium, lung and skin

H.S. konzipierte den Versuch und entwickelte das Versuchsdesign. Der Versuch wurde vollständig von H.S. durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde überwiegend durch H.S. durchgeführt. H.S. war an der Ergebnisdiskussion sowie der Erstellung des Manuskripts überwiegend beteiligt. **M.B.** war an der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes beteiligt. **S.K.** war an der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes beteiligt. **J.P.** war an der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes beteiligt. **Alle Autoren** waren an der kritischen Durchsicht und der Überarbeitung des Manuskripts beteiligt.

13.2.2. Human microvascular endothelial cells displaying reduced angiogenesis and increased uptake of lipids during *in vitro* culture

H.S. war an der Konzeption des Versuchs und der Entwicklung des Versuchsdesigns beteiligt. Der Versuch wurde überwiegend von H.S. durchgeführt. An der Erhebung der zytologischen, immunzytochemischen und transmissionselektronischen Daten war H.S. beteiligt. An der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes war H.S. überwiegend beteiligt. **R.H.** hat den Versuch überwiegend konzipiert und das Versuchsdesign entwickelt. An der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes war R.H. beteiligt. **B.H.** war an der Erstellung des Manuskripts beteiligt. **H.H.** war an der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes beteiligt. **J.P.** war an der Auswertung

und Diskussion der Ergebnisse sowie der Erstellung des Manuskriptes war beteiligt. **Alle Autoren** waren an der kritischen Durchsicht und der Überarbeitung des Manuskripts beteiligt.

13.3. Kongressbeiträge

Sievers, H., Ultrastrukturelle Untersuchungen an Endothelzellen mit unterschiedlicher angiogener Potenz, 5. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin, 02.07.2010

Sievers, H., Bahrami, M., Käßmeyer, S., Plendl, J., Heterogenität von angiogenen Prozessen *in vitro*, 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie e.V., Berlin, 17.09.-18.09.2010

Sievers, H., Bahrami, M., Kaessmeyer, S., Plendl, J., Intrinsic and extrinsic factors cause angiogenic heterogeneity of endothelial cells *in vitro*, 16. Conference of the European Society of Hemorheology and Microcirculation and 30. Annual Conference of the German Society of Hemorheology and Microcirculation, Munich/Germany, 18.06.-21.06.2011

Sievers, H., Morphologische Beurteilungen der Angiogenese *in vitro* mittels moderner Live-Imaging-Technologie, 6. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar Biomedical Sciences, Berlin, 01.07.2011

Sievers, H., Plendl, J., Vom Monolayer zum kapillärähnlichen Netzwerk: angiogene Endothelzellen Life-Cell-Imaging-Mikroskop, 31. Annual Conference of the German Society of Hemorheology and Microcirculation, Halle, 15.06.-16.06.2012

Sievers, H., Plendl, J., Tubuläre Strukturen angiogener Endothelzellen im Life-Cell-Imaging-Mikroskop, 7. Doktorandensymposium u. DRS Präsentationsseminar, Berlin, 13.07.2012

Sievers, H., Plendl, J., Tubule forming in angiogenesis *in vitro*, XXIXth EAVA Congress, Stara Zagora (Bulgaria), 25.07.-28.07.2012

Sievers, H., Hünigen H., Hirschberg R.M., Cell specific effects of FBS on apoptosis, necrosis and autophagy of two batches of human microvascular endothelial cells *in vitro*, 8th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists, Poznan (Poland), 15.07.-17.07.2015

Sievers, H., Hirschberg, R.M., Hiebl, B., Hünigen, H., Plendl, J., Mikrovaskuläre Endothelzellen mit erhöhter Lipidaufnahme und verminderter Angiogenese *in vitro*, 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie e.V., Regensburg, 27.11.-28.11.2015

Sievers, H., Hirschberg, R.M., Hiebl, B., Hünigen, H., Plendl, J., Different lipid metabolism and angiogenic potency between two batches of endothelial cells *in vitro*, Doktoranden-symposium 2016, Berlin, 16.09.2016

14. Danksagung

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Frau Prof. Dr. Plendl richten. Sie hat mich sehr in meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und mir dadurch die Möglichkeit gegeben, diese Dissertation zu verfassen. Zudem danke ich ihr sehr für das entgegengebrachte Vertrauen.

Weiterhin möchte ich meinen Koautoren dafür danken, dass sie mich durch ihre Ideen und die konstruktive Diskussion der Ergebnisse in meiner Arbeit sehr voran gebracht haben, ganz besonders Frau Dr. Hünigen und Frau Dr. Hirschberg.

Allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden vom Institut für Veterinär-Anatomie möchte ich für jegliche Unterstützung herzlich danken. Frau Slosarek, Frau Fuhrmann-Selter, Frau Dre wes, Frau Briest-Forch, Frau Holle und Frau Ermisch waren mir bei allen labortechnischen Arbeiten stets eine unschätzbare Hilfe. Herrn Krüger und Frau Gentner möchte ich für die exzellenten Englischkorrekturen danken. Herrn Werner danke ich sehr für die Unterstützung bei der Bearbeitung sämtlicher Abbildungen.

Meiner Familie danke ich für den steten Rückhalt in den letzten Jahren. Ganz besonders danke ich meiner Mutter, Christine-Marlene Sievers, die bis zum Schluss an mich geglaubt hat und in allen Lebenslagen für mich da war. Meinem Bruder, Eike-Willem Sievers, danke ich dafür, dass wir die Vergangenheit so super gemeinsam gemeistert haben. Mein größter Dank gilt meiner Tochter, Johanna Sievers, die mich jeden Tag aufs Neue durch ihre bezaubernde und immer liebende Art begeistert. Meinem Vater, Cord Sievers, danke ich dafür, dass er mir Johanna vor allem in der letzten Zeit so oft abgenommen hat, so dass ich mich in Ruhe auf diese Arbeit konzentrieren konnte.

All meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, ihr stets offenes Ohr sowie ihre andauernde und nicht nachlassende Motivation.

Zu guter Letzt möchte ich dem Verlag IOS Press für die Genehmigung danken, meine beiden Publikationen für diese Arbeit verwenden zu dürfen.

15. Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 07. August 2017

Henrieke Sievers