

## 6 Diskussion

### 6.1 *In vitro*-Angiogenese mikrovaskulärer Endothelzellen

Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, basierend auf dem intensiven Zusammenspiel von Zellen, löslichen Faktoren und extrazellulären Matrixkomponenten. Angiogenese *in vivo* beinhaltet Wachstum und Stabilisierung des neuen Gefäßes (Vailhé et al., 2001). Analog zur *in vivo*-Angiogenese durchliefen die eingesetzten mikrovaskulären Endothelzellen auch *in vitro* nach Stimulation mit pro-angiogenen Faktoren die verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade wie Migration, Proliferation und Differenzierung in kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen, welche eindeutig dem Wachstum von Gefäßen *in vivo* zugeordnet werden können. Eine Stabilisierung *in vitro* gebildeter kapillarähnlicher Strukturen, wie sie *in vivo* durch Rekonstruktion der Basalmembran und der interstitiellen Matrix (Ausprunk und Folkman, 1977) erfolgt, konnte in den etablierten Zellkulturmodellen partiell durch Sekretion von basalmembranähnlichem Material durch die Endothelzellen beobachtet werden.

Anhand der durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen muriner und humaner Endothelzellen wurde die angiogene Kaskade *in vitro* in 5 Stadien eingeteilt (*Stadium 0-4*). Das *Stadium 0*, die Proliferation der Endothelzellen, gehört im engeren Sinne nicht zur *in vitro*-Angiogenese, da die Endothelzellen nach Aussaat unabhängig von einem angiogenen Stimulus proliferieren. Die Proliferation von Endothelzellen ist aber ein wichtiger Schritt zu Beginn der *in vivo*-Angiogenese, so dass dieses Stadium aufgrund der *in vitro* und *in vivo* vergleichbaren proliferativen endothelialen Aktivität, welche für die Transfektionsexperimente von Bedeutung war, als *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* definiert wurde. Unbekannt ist, ob die eingesetzten Endothelzellen in diesem Stadium im Vergleich zu späteren Stadien der angiogenen Kaskade ein übereinstimmendes Genexpressionsmuster aufweisen. Das *Stadium 1*, der subkonfluente bis konfluente Monolayer, ist das Stadium, von dem aus die *in vitro*-Angiogenese startete. Dieses Stadium war hinsichtlich der endothelialen Aktivität vergleichbar mit ruhenden Endothelzellen *in vivo* aufgrund des Proliferationsarrestes der Zellen durch Kontaktinhibition. Durch Stimulierung der Endothelzellen mit pro-angiogenen Faktoren erfolgte eine Umstrukturierung des Monolayers mit linearer und zirkulärer Aneinander-

reihung von Endothelzellen (*Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro*) und der Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen (*Stadium 3 und 4 der angiogenen Kaskade in vitro*).

Bei den in dieser Arbeit etablierten Modellen der *in vitro*-Angiogenese handelt es sich um Langzeitmodelle, in denen sich kapillarähnliche Strukturen auf der Oberfläche eines Zellschicht bilden (Vernon et al., 1995) und somit nicht alle Endothelzellen an der Bildung kapillarähnlicher Strukturen beteiligt sind. Davis und Mitarbeiter (2002) postulierten das Phänomen der lateralen Inhibierung, bekannt beispielsweise bei der Entwicklung der Sinneshaare der Cochlea (Lanford et al., 1999), als Ursache dafür, dass sich nur einige Endothelzellen an der Bildung kapillarähnlicher Strukturen ausgehend von einem konfluenten Monolayer beteiligen. Laterale Inhibierung bedeutet dabei, dass einige Zellen Faktoren bilden, die ihre Nachbarzellen in der „Entwicklung“ hemmen, was zu einer selektiven Differenzierung der Zellen führt (Davis et al., 2002). In Kurzzeitmodellen kann die Bildung kapillarähnlicher Strukturen innerhalb von 1-3 Tagen beobachtet werden, wobei die Endothelzellen im subkonfluenten Zustand vorliegen müssen, da eine vollständige Konfluenz der Zellen die schnelle Bildung kapillarähnlicher Strukturen verhindert (Vailhé et al., 1997).

Die Endothelzellen wurden in Kulturschalen (versuchsweise mit Gelatine beschichtet) ausgesät. Es handelt sich also um Langzeit-Modelle von endothelialen Reinkulturen ohne Einsatz dreidimensionaler extrazellulärer Matrices. Während das Modell der *in vitro*-Angiogenese muriner Endothelzellen den zweidimensionalen Modellen zuzuordnen ist, in welchen es zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen planar zur Kulturschalenoberfläche kommt, konnte mit der Kultur humaner Endothelzellen erstmals ein dreidimensionales Modell der *in vitro*-Angiogenese trotz fehlenden Zusatzes eines dreidimensionalen extrazellulären Substrates etabliert werden.

### **6.1.1 Zweidimensionales *in vitro*-Modell der Angiogenese muriner mikrovaskulärer Endothelzellen**

Die angiogene Kaskade muriner Endothelzellen, isoliert aus dem Herzmuskel zwei Wochen alter Mäuse, identifiziert und etabliert von Plendl und Mitarbeitern (1993), wurde durch Kultivierung im Selektivmedium P0 induziert, welches als pro-angiogene Zusätze Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) und S180-konditioniertes Medium sowie als Kofaktor Heparin enthielt. ECGS ist ein kommerziell erhältliches Extrakt aus bovinem Nervengewebe und enthält laut Hersteller den Endothelial Cell Growth Factor (ECGF)- $\alpha$  und - $\beta$  sowie den Fibroblast Growth Factor (FGF), der ebenfalls von Maciag et al. (1979) charakterisiert wurde. Bei dem

Fibroblast Growth Factor scheint es sich in der Hauptsache um FGF-1 zu handeln (Gambirini und Armelin, 1982; Papapetropoulos et al., 1999; Plendl, 1997), welcher mitogen auf mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen wirkt (Klagsbrun und D'Amore, 1991). Auch ECGF- $\alpha$  und - $\beta$  wirken mitogen auf Endothelzellen (Burgess et al., 1985). ECGF besitzt sowohl in struktureller als auch in funktioneller Hinsicht eine sehr große Ähnlichkeit zu FGF-1, was zur Vermutung führte, dass entweder diese beiden Faktoren identisch sind oder aber zur gleichen Familie von Polypeptid Wachstumsfaktoren gehören (Schreiber et al., 1985).

S180-konditioniertes Medium wurde von Zellen eines murinen Fibrosarkoms gewonnen und enthält nachweislich VEGF (Rosenthal et al., 1990), den wichtigsten pro-angiogenen Faktor. VEGF stimuliert *in vitro* die Degradation der extrazellulären Matrix, die Proliferation und Migration der Endothelzellen sowie die Bildung kapillarähnlicher Strukturen und führt zu einer Expression von beispielsweise proteolytischen Enzymen wie Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren (Pepper et al., 1991).

Ein wichtiger pro-angiogener Kofaktor im Selektivmedium war das Heparin. Heparin kann z.B. einige Isoformen des VEGF aus ihrer Bindung an Heparansulfat-Proteoglykanen der Zelloberfläche oder extrazellulären Matrix freisetzen (Houck et al., 1992). Auch FGF-2 kann durch Heparin-ähnliche Moleküle aus seiner Bindung an die extrazelluläre Matrix gelöst werden (Basilico und Moscatelli, 1992; Nicosia und Villaschi, 1999). Darüber hinaus kann Heparin bei der Bindung von VEGF und FGF an ihre Rezeptoren eine modulierende pro-angiogene Wirkung ausüben (Basilico und Moscatelli, 1992; Gitay-Goren et al., 1992).

Es ist davon auszugehen, dass die angiogene Kaskade muriner Endothelzellen unter Beteiligung dieser genannten Faktoren parakrin induziert wurde, da die Kultivierung der Zellen im Erhaltungsmedium DMEM<sup>+</sup>, welchem diese Faktoren fehlten, nicht zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen führte. Darüber hinaus besteht noch die Möglichkeit einer autokrinen Wirkung löslicher pro-angiogener Faktoren, welche die Endothelzellen selbst produzieren und sezernieren. Untersuchungen zeigen, dass mikrovaskuläre Endothelzellen *in vitro* beispielsweise VEGF exprimieren (Ladoux und Frelin, 1993; Plendl et al., 1999; Schuster, 2002).

Die murinen Endothelzellen bildeten innerhalb von zwei Tagen nach Einsaat einen subkonfluenten bis konfluenten Monolayer aus überwiegend länglichen Zellen (**Stadium 1 der angiogenen Kaskade *in vitro***). Das für Endothelzellen häufig beschriebene, „als typisch geltende“ Kopfsteinpflastermuster aus polygonalen Zellen konnte nur stellenweise beobachtet werden. Da das vaskuläre Endothel eine sehr heterogene Zellpopulation darstellt, insbesondere hinsichtlich der Organspezifität, gilt die Morphologie des Kopfsteinpflastermusters nicht mehr, wie lange Zeit vermutet, als Kennzeichen endothelialer Zellkulturen (Plendl, 1997).

Die ersten morphologischen Veränderungen, die den Beginn der angiogenen Kaskade markierten und innerhalb von zwei Tagen nach Ausbildung des Monolayers zu beobachten waren, bestanden in einer linearen Aneinanderreihung länglicher Endothelzellen, wobei sich im weiteren Verlauf unterschiedlich große Ringe aus zirkulär aneinander gereihten Endothelzellen darstellten (**Stadium 2 der angiogenen Kaskade in vitro**). Die linear aneinander gereihten Endothelzellen sind vergleichbar mit den während der *in vivo*-Angiogenese durch Migration und Proliferation entstehenden endothelialen Zellsprossen. Eine zielgerichtete Migration von Endothelzellen, analog zur *in vivo*-Angiogenese, konnte aufgrund der Kulturbedingungen nicht erfasst werden. Aufgrund des fehlenden Gradienten an pro-angiogenen Faktoren, welche gleichmäßig im Kulturmedium verteilt vorlagen, konnte die lineare Aneinanderreihung der Endothelzellen durch Migration und Proliferation nicht zielgerichtet, sondern verteilt über die Kulturschale an verschiedenen Stellen beobachtet werden. Die endotheliale zielgerichtete Migration kann *in vitro* mittels spezieller Methoden studiert werden, beispielsweise in der Boyden-Kammer, wobei die Endothelzellen in Richtung einer chemotaktischen Lösung wandern (Goligorsky et al., 1999; Malinda et al., 1999; Sala et al., 2002) oder einfach durch „Scratching“ (Verletzen, Ankratzen) eines konfluenten Zelllayers (Bussolino et al., 1992; Imaizumi et al., 2000b). Analog zum „Scratching“ wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Migration der murinen Endothelzellen zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich nach dem Ablösen der kapillarähnlichen Strukturen, beobachtet.

Endothelzellen, die 2-3 Wochen in Kultur gehalten wurden, bildeten planare, miteinander verbundene Zellstränge (**Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro**), die straßenartig die Kulturschalen durchzogen. In der Breite bestanden diese Stränge aus mehreren (ca. 3-8) parallel orientierten Zellreihen. Zwischen den endothelialen Strängen waren längliche Zellen im subkonfluenten Zustand zu erkennen, die untereinander durch ihre Fortsätze in Verbindung standen und ein Maschenwerk zwischen den Strängen bildeten. Eine mikroskopisch erfassbare Veränderung bzw. Umgestaltung dieser kapillarähnlichen Strukturen im Sinne eines vaskulären Remodeling konnte nicht dokumentiert werden. Die kapillarähnlichen Strukturen schienen lediglich an Umfang durch Anlagerung weiterer Endothelzellen zuzunehmen, was letztlich zur Ablösung dieser Strukturen führte. Analog zum *Stadium 2* konnte auch die Ausbildung der kapillarähnlichen Strukturen aufgrund des fehlenden Gradienten an pro-angiogenen Faktoren über die gesamte Kulturschale verteilt beobachtet werden. Erstaunlicherweise war kein allmählicher Aufbau der kapillarähnlichen Strukturen zu erkennen, diese zeigten sich fast zeitgleich in allen Kulturschalen in ihrer gesamten Ausdehnung. Der morphologisch sichtbare Übergang von linear und zirkulär aneinander gereihten Endothelzellen zu den planaren kapillarähnlichen Strukturen scheint sich also relativ schnell zu vollziehen.

Die **transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung** zeigte analog zur phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung längliche Endothelzellen (*Stadium 2 und 3 der angiogenen Kaskade in vitro*), die longitudinal angeordnet waren. Die Zellkerne waren häufig gelappt und das Chromatin war hauptsächlich als Euchromatin organisiert, was auf sehr aktive Zellen hinweist (Sinowatz, 2000). Auch das vermehrte Vorkommen von Mitochondrien sowie gut ausgebildetem rauem Endoplasmatischem Retikulum (rER) spiegelte eine hohe Aktivität der Zellen wider (Spaniel-Borowski und Mayerhofer, 1987). Raues Endoplasmatisches Retikulum ist besonders gut in Zellen entwickelt, die auf den Export von Proteinen spezialisiert sind (Sinowatz, 2000). Es könnte hier auf die Synthese und Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix hindeuten. Weibel-Palade-Körperchen, die als spezifische endotheliale Zellorganellen angesehen werden und beispielsweise in humanen (Folkman et al., 1979; Huber et al., 2002) und porcinen Endothelzellen (Plendl et al., 2002) *in vitro* nachgewiesen werden konnten, wurden nicht gefunden. In bovinen Endothelzellen konnten diese Organellen ebenfalls nicht bzw. nur in einer atypischen Form nachgewiesen werden (Folkman et al., 1979; Fuchs-Schoenleber, 1999; Plendl, 1997).

Zwischen den Endothelzellen, insbesondere in den entstandenen interzellulären Spalträumen, zeigte sich fibrilläres Material. Dieses war auch in intrazellulären großen Vakuolen sowie im Lumen kapillarähnlicher Strukturen zu finden. Es hat sich gezeigt, dass die Endothelzellen *in vitro* entsprechend den *in vivo*-Verhältnissen verschiedene Komponenten der Basalmembran bilden und sezernieren. So konnten beispielsweise Laminin (Kramer et al., 1984; Schuster, 2002; Tilling et al., 2002), Fibronectin (Feder et al., 1983; Tilling et al., 2002), Kollagen I und III (Sage et al., 1981) sowie Kollagen IV (Kramer et al., 1984; Tilling et al., 2002) in endothelialen Reinkulturen nachgewiesen werden. Die extrazelluläre Matrix ist neben ihrer strukturellen Funktion auch in die Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen involviert (Deckwer et al., 1999; Ekblom et al., 1986; Sternlicht und Werb, 2001). Dabei interagiert die Matrix direkt mit Oberflächenrezeptoren der Zellen und initiiert so Signalkaskaden, die deren Differenzierung beeinflussen. Integrine, die als transmembranes Element der Basalmembran das intrazelluläre Zytoskelett mit extrazellulären Matrixkomponenten verbinden, spielen dabei eine wichtige Rolle. Die Differenzierung von Endothelzellen in Langzeitmodellen scheint sogar abhängig zu sein von der zellulären Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile (Sage und Vernon, 1994). Dies erklärt die verhältnismäßig lange Dauer des *Stadiums 2 der angiogenen Kaskade*, in welchem eine intensive Synthese und Sekretion von fibrillärem Material erfolgte, welches dann zur Differenzierung der Endothelzellen mit Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen führte.

Die **Stabilisierung** des neu gebildeten Gefäßes durch Einstellung von Migration, Proliferation und extrazellulärer Proteolyse, durch Rekonstruktion der Basalmembran und interstitiel-

len Matrix (Ausprunk und Folkman, 1977) sowie bei den meisten Gefäßen zusätzlich durch Anlagerung von Perizyten (Hirschi und D'Amore, 1996; Hirschi und D'Amore, 1997) ist entscheidend für das Fortbestehen dieser *in vivo*, da unreife Gefäße bei Wegfall des angiogenen Stimulus schnell der Apoptose und Regression unterliegen können (Benjamin et al., 1998).

Aufgrund der nur unzureichenden Stabilisierung der von den murinen Endothelzellen *in vitro* gebildeten kapillarähnlichen Strukturen kam es nach ca. 10 Tagen zur Ablösung dieser durch Verlust der Adhärenz an der Kulturschale. Dieser Stabilitätsmangel ist offensichtlich Resultat der nur unvollständig ausgebildeten basalmembranähnlichen Struktur, an welcher *in vivo* auch Perizyten beteiligt sind, sowie möglicherweise auch der fehlenden Anlagerung von Perizyten. Darüber hinaus erfolgte in diesem Modell eine kontinuierliche Stimulation der Zellen mit im Kulturmedium enthaltenden pro-angiogenen Faktoren, so dass davon auszugehen ist, dass weder Migration und Proliferation der Endothelzellen noch die extrazelluläre Proteolyse eingestellt wurden.

Von einer Regression der kapillarähnlichen Strukturen im engeren Sinne kann in der vorliegenden Arbeit nicht gesprochen werden, da es sich um ein mechanisches Ablösen handelte und sich die kapillarähnlichen Strukturen nicht zurückbildeten. Schuster (2002) dagegen beobachtete im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit eine fast vollständige Rückbildung der kapillarähnlichen Strukturen in einem Langzeitmodell boviner Endothelzellen aus dem Corpus luteum. Trotz unveränderter Kulturbedingungen (Selektivmedium, Temperatur, CO<sub>2</sub>-Begasung) trat spontan nach 6 Monaten eine Regression der tubulären Strukturen auf.

Nach dem Ablösen der kapillarähnlichen Strukturen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Migration und Proliferation von Endothelzellen in die zellfreien Areale der Kulturschale beobachtet, wobei ein vollständig konfluenten Monolayer nicht ausgebildet wurde. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Umgestaltungsprozess des Endothelzelllayers und es zeigten sich netzartige Formationen, die das mikroskopische Bild über 6-8 Wochen dominierten. Ein besonderer Befund dieser Studie war das anschließend erneute Auftreten kapillarähnlicher Strukturen nach ca. 2 Monaten Kultivierung. Dieses erinnert an eine „Latenz“- oder „Ruhezeit“, in welcher die Endothelzellen zumindest morphologisch nicht auf pro-angiogene Faktoren ansprechen und anscheinend die Fähigkeit zur *in vitro*-Angiogenese erlangen. Interessant ist, dass im zweiten Zyklus gerade die Zellen kapillarähnliche Strukturen ausbildeten, die zuvor unbeteiligt an der Ausbildung dieser Strukturen waren, nämlich zwischen den kapillarähnlichen Strukturen netzartig durch ihre Fortsätze verbunden vorlagen. Da Endothelzellen eine sehr heterogene Zellpopulation darstellen (Plendl et al., 1992), wäre es denkbar, dass es zwei Arten von Zellen gibt, nämlich angiogene und nicht angiogene. Möglich wäre auch, dass sich die Endothelzellen im Verlauf der Angiogenese in diese beiden Gruppen differenzieren (Schuster, 2002). Dass im zweiten Zyklus dieses Angiogenese-Modells

zuvor scheinbar nicht-angiogene, evtl. „lateral inhibierte“ (Davis et al., 2002) Endothelzellen an der Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen beteiligt waren, spricht dafür, dass in der langen „Latenzzeit“ die Differenzierung dieser Zellen in angiogene erfolgte.

Die murinen Endothelzellen wurden in den Passagen 37 bis 42 untersucht, wobei die Zellen in großen Zeitabständen (bis zu 2-3 Monaten) passagiert bzw. kryokonserviert wurden. Die Zellen waren also relativ lange den *in vitro*-Bedingungen ausgesetzt. Der typische, sich wiederholende Ablauf der angiogenen Kaskade konnte nur in den Passagen 37 bis 40 beobachtet werden. Bei höheren Passagen muriner Endothelzellen wurden keine kapillarähnlichen Strukturen ausgebildet, sondern lediglich netzartige endotheliale Formationen, die ohne wesentliche Umbauvorgänge über mehrere Wochen beobachtet werden konnten. Plendl et al. (1995) beschrieben ab Passage 42 ein verändertes Wachstumsverhalten dieser Zellen *in vitro*, eine spontane Transformation mit Übergang von endothelialer zu epitheloider Morphologie und Induktion von malignen Hämangioendotheliomen nach Implantation der Zellen in geeignete Empfängertiere. Die Zellen in dieser Arbeit zeigten auch *in vitro* ein verändertes Wachstumsverhalten, welches sich jedoch nicht in einer erhöhten angiogenen Potenz im Vergleich zu den zuvor beschriebenen transformierten Endothelzellen äußerte, sondern in einer fehlenden Induktion der angiogenen Kaskade durch pro-angiogene Faktoren, bedingt durch die lange Kultivierungsdauer.

In dem hier beschriebenen Langzeitmodell der *in vitro*-Angiogenese muriner mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Myokard konnten nicht alle in dieser Arbeit definierten Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* beobachtet werden. *Stadium 4*, Kennzeichen eines dreidimensionalen *in vitro*-Modells, mit der Organisation eines dreidimensionalen Netzwerkes kapillarähnlicher Strukturen, konnte nicht erfasst werden, da zur Kultivierung der murinen Endothelzellen kein dreidimensionales extrazelluläres Substrat verwendet wurde. Darüber hinaus reichte die zelluläre Eigensynthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix nicht aus zur Bildung einer eigenen dreidimensionalen Matrix. Nachteilig an diesem Modell war, dass kapillarähnliche Strukturen nicht über einen längeren Zeitraum untersucht werden konnten, da diese innerhalb von 10 Tagen ihre Adhärenz verloren.

### **6.1.2 Dreidimensionales *in vitro*-Modell der Angiogenese humaner mikrovaskulärer Endothelzellen**

Für die Untersuchungen der *in vitro*-Angiogenese wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Vorhaut von Neugeborenen eingesetzt. Es wurden Endothelzellen untersucht, die aus einem Pool von Spendern bestanden. Die angiogene Kaskade der humanen Endo-

thelzellen wurde durch Kultivierung im Wachstumsmedium EGM-2 MV induziert, welches als pro-angiogene Faktoren VEGF, EGF (Epidermal Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), FGF-2 (mit Heparin) und als weiteren Zusatz Hydrocortison enthält. FGF-2, eines der ersten charakterisierten angiogenen Peptide, sowie EGF führen *in vitro*, ähnlich wie VEGF, zu einer Induktion der endothelialen Proliferation, Migration, Protease-Bildung und Differenzierung in kapillarähnliche Strukturen (Basilico und Moscatelli, 1992; Bastaki et al., 1997; Bussolino et al., 1996; Klagsbrun und D'Amore, 1991; Mignatti et al., 1989; Presta et al., 1986; Sato et al., 1993). Auch IGF-1 stimuliert die Proliferation und Migration *in vitro* kultivierter Endothelzellen (Grant et al., 1993) und in hohen, pathophysiologischen Konzentrationen (100-200 ng/ml) auch die Bildung kapillarähnlicher Strukturen (Nakao-Hayashi et al., 1992). In welcher Konzentration dieser pro-angiogene Faktor im Kulturmedium vorlag, wurde jedoch vom Hersteller auch auf Anfrage nicht preisgegeben. Hydrocortison ist ein Glukokortikoid und besitzt einen suppressiven Effekt auf Matrix-Metalloproteinasen (Nagase, 1998), welche beispielsweise von humanen Endothelzellen *in vitro* exprimiert werden (Chan et al., 1998; Cornelius et al., 1995; Hanemaaijer et al., 1993). Darüber hinaus gehört Hydrocortison aber auch aufgrund anti-angiogener Wirkung zu den angiostatischen Steroiden (Crum et al., 1985; Folkman und Ingber, 1987). Kräling und Mitarbeiter (1999) beschrieben eine Induktion der Matrixdeposition in Kultur von humanen dermalen Endothelzellen durch Hydrocortison, welche zu einer gesteigerten Adhäsion der Zellen an diese Matrix und einer reduzierten proliferativen Aktivität führte, resultierend in Gefäßreifung und Differenzierung. Im Gegensatz dazu beschrieben mehrere Autoren eine Glukokortikoid-unabhängige Inhibierung der Angiogenese durch angiostatische Steroide in der Anwesenheit von Heparin oder einem Heparin-Fragment (Crum et al., 1985; Folkman und Ingber, 1987; Folkman et al., 1983; Ingber et al., 1986). Ingber et al. (1986) beobachteten eine Auflösung der Basalmembran von Kapillaren mit anschließender Regression nach Koapplikation von Corticosteroid und Heparin. Es scheint paradox, dass die Auflösung der Basalmembran eher zur Inhibierung als zur Induktion der Angiogenese führt. Es wurde aber gezeigt, dass eine generalisierte Degradation der Basalmembran und interstitiellen Matrix, welche zur Folge hat, dass den Endothelzellen das Substrat zur Migration und Proliferation fehlt, zur Inhibierung der Angiogenese führt (Goldenberg, 1995). Es ist davon auszugehen, dass die selektive Induktion der Matrixdeposition Resultat der Glukokortikoidaktivität von Hydrocortison und folglich unabhängig von einem angiostatischen Effekt ist (Kräling et al., 1999).

Neben der parakrinen Wirkung pro-angiogener Faktoren des Kulturmediums besteht auch in diesem Modell noch die Möglichkeit einer autokrinen Induktion der Angiogenese durch pro-angiogene Faktoren, die die Endothelzellen selbst produzieren und sezernieren.

### 6.1.2.1 Morphologie humaner mikrovaskulärer Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro*

Die humanen Endothelzellen bildeten innerhalb von zwei Tagen nach Einsaat einen subkonfluenten bis konfluenten Monolayer aus spindelförmigen bis länglichen Zellen (**Stadium 1 der angiogenen Kaskade *in vitro***). Das „als typisch geltende“ Kopfsteinpflastermuster konnte auch in der humanen Zellkultur nur stellenweise beobachtet werden, was wiederum auf die Heterogenität von Endothelzellen hindeutet (Plendl, 1997). In Kulturen mit sehr geringer Zelldichte hatten sich nach einigen Tagen kleinere Inseln von spindelförmigen bis länglichen Endothelzellen gebildet, deren Ränder scharf abgegrenzt waren. Diese Inseln vergrößerten sich und konfluieren teilweise. Die Entstehung der Inseln erfolgte sowohl durch Zusammenlagerung von Einzelzellen in Folge einer Migration sowie durch Proliferation. Auch in Kokultursystemen wird eine Bildung von Kolonien aus Endothelzellen durch Migration beschrieben (Fuchs-Schoenleber, 1999). Eine vollständige Konfluenz konnte in dieser Arbeit auch nach mehreren Wochen der Kultivierung nicht beobachtet werden, wahrscheinlich bedingt durch den fehlenden Kontakt der Endothelzellen untereinander (Schuster, 2002).

Die immunhistochemische Markierung der Endothelzellen mit anti-Kollagen IV erbrachte bereits in diesem Stadium den besonderen Befund, dass die humanen Endothelzellen *in vitro* Kollagen IV synthetisieren und sezernieren. Kollagen IV gehört zu den Hauptbestandteilen von Basalmembranen, die *in vivo* fast alle Kapillaren umgeben. Im Verlaufe der Stabilisierungsphase erfolgt *in vivo* eine Rekonstruktion der Basalmembran und interstitiellen Matrix (Ausprunk und Folkman, 1977), wobei sowohl Endothelzellen als auch Perizyten an der Bildung beteiligt sind (Amselgruber et al., 1999; Hirschi und D'Amore, 1996). Die Bildung und Sekretion von Kollagen IV mit ähnlicher morphologischer Ausprägung in konfluenten Monolayern zeigten auch Tilling und Mitarbeiter (2002) in einer Kultur von porzinen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Gehirn. Dagegen wurden in Kultur boviner mikrovaskulärer Endothelzellen nur Kollagene vom Typ I und III nachgewiesen (Sage et al., 1981), also Hauptbestandteile der interstitiellen Matrix *in vivo*. Die extrazelluläre Matrix besitzt vielfältige Aufgaben. Neben einer mechanischen Funktion zur Unterstützung und Aufrechterhaltung der Gewebestrukturen ist sie auch in wichtige zelluläre Funktionen wie Migration, Proliferation und Differenzierung involviert (Ekblom et al., 1986; Sternlicht und Werb, 2001). Haralabopoulos et al. (1994) zeigten *in vitro* und *in vivo*, dass die endotheliale Synthese von Kollagen Voraussetzung für die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen ist, da eine Hemmung der Kollagensynthese zur Inhibierung der Bildung kapillarähnlicher Strukturen sowie der *in vivo*-Angiogenese führte.

Dass die Endothelzellen zu diesem frühen Zeitpunkt bereits fibrilläres Material produzieren, zeigte auch das mikroskopische Bild nach enzymatischem Ablösen der Endothelzellen von

der Kulturschale. Es konnten auf der Kulturschale zurückbleibende dünne, faserartige, netzartig angeordnete Strukturen beobachtet werden, wobei es sich offensichtlich um von den Zellen sezerniertes fibrilläres Material handelte.

Initiale morphologische Veränderungen des Monolayers, die innerhalb von einem Tag nach Erreichen der Konfluenz zu erkennen waren, bestanden in einer linearen Aneinanderreihung länglicher Endothelzellen, wobei sich im weiteren Verlauf ringförmige Zellstrukturen ausbildeten (**Stadium 2 der angiogenen Kaskade *in vitro***). Eine zielgerichtete Migration von Endothelzellen konnte aufgrund des fehlenden Gradienten an pro-angiogenen Faktoren nicht beobachtet werden. Die Bildung der Zellreihen *in vitro*, vergleichbar mit den während der *in vivo*-Angiogenese durch Migration und Proliferation entstehenden endothelialen Zellsprossen, wurde möglicherweise geleitet durch fibrilläres Material. Eine lineare und zirkuläre Aneinanderreihung konnte auch in durch geringere Aussaatdichte bedingten nicht vollständig konfluenten Zellkulturen beobachtet werden und zwar genau in solchen Bereichen der Kulturschale, in denen die Zellen bereits in größeren Inseln formiert vorlagen. Die Zusammenlagerung von dicht gepackten Zellen, hier als abgeschlossene Einheit in Inselformation, scheint also für die Einleitung der angiogenen Kaskade initiierend zu wirken. Es ist möglich, dass die Zellen bei hoher Dichte genügend fibrilläres Material synthetisieren und sezernieren, welches eine Veränderung in der Zelladhäsion bewirkt (Madri und Williams, 1983) und so zu Umstrukturierungen des Zelllayers führt. Möglicherweise induzieren auch die interzellulären Kontakte zwischen den Endothelzellen eine gesteigerte Synthese von pro-angiogenen Faktoren (Fuchs-Schoenleber, 1999).

Diese Fakten sprechen dafür, dass auch *in vitro* ein genau geregelter Ablauf der angiogenen Kaskade besteht, welcher morphologisch mit der vollständigen bzw. partiellen Konfluenz der Zellen und vermutlich auf Genebene mit der Ansprechbarkeit der Zellen auf pro-angiogene Faktoren, z.B. durch Expression bestimmter Rezeptoren, beginnt.

Die immunhistochemische Markierung der Endothelzellen im *Stadium 2* mit anti-Kollagen IV belegte eine Zunahme an sezerniertem Protein, wobei sich Zentrum und Randbereich der Kulturschale in der Ausprägung deutlich unterschieden. Während sich im Zentrum eine dreidimensionale, schwammartige, immunopositive Struktur zeigte, dominierte im Randbereich noch der faserartige Charakter aufgrund der geringeren Dichte des Materials.

Im *Stadium 2* der angiogenen Kaskade war ein Abrunden einzelner Zellen zu beobachten, welches verschiedene Ursachen haben kann. Es wird beispielsweise bei Stresseinwirkung beobachtet, im Rahmen des Zelltodes, kann aber auch auf eine Alterung der Zellen hinweisen (Plendl, 1997) oder mit einem Verlust der Kontaktinhibition, z.B. bei transformierten Zellen (Plendl et al., 1995) zusammenhängen. Da die Zellen keine sonstigen Charakteristika ei-

ner Transformation aufwiesen und auch sonstige Alterungserscheinungen wie Vergrößerung der Zellen, Ausbildung von Stressfasern oder verstärkte Granulierung (Plendl, 1997) nicht zu beobachten waren, erscheint eine Reaktion auf Stress am wahrscheinlichsten für das Abrunden einzelner Zellen in diesem Stadium.

Die phasenkontrastmikroskopisch erfassbaren, morphologischen Veränderungen, die schließlich zum definierten *Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro* führten, bestanden im Auftreten von planaren, zum Teil ringförmigen Zellstrukturen mit Vakuolen auf der unteren konfluenten Zellschicht im Zentrum der Kulturschale. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um linear und zirkulär aneinander gereihte Endothelzellen handelt, die einen zentralen Bereich umschlossen, wie es die histologische Untersuchung (May-Grünwald-Giemsafärbung) der Zellen zu diesem Zeitpunkt im Zentrum der Kulturschale demonstrierte. Möglicherweise handelt es sich hierbei bereits um erste planare kapillarähnliche Strukturen. Im Zentrum dieser Strukturen zeigten sich fibrilläres Material sowie auch gehäuft morphologisch auffällige Zellen, welche im übrigen Zelllayer lediglich vereinzelt vorzufinden waren. Charakteristika dieser Zellen waren Zellschrumpfung, Kernpyknose sowie zum Teil Kernfragmentierung. Diese morphologischen Kennzeichen sowie die vornehmliche Lokalisation im Zentrum der planaren Strukturen sprechen für apoptotische Zellen. Apoptose scheint im Rahmen der Lumenbildung eine große Rolle zu spielen (Meyer et al., 1997; Peters et al., 2002). Dies bestärkt die Vermutung, dass es sich hierbei um kapillarähnliche Strukturen handelt, deren zentraler Bereich zum Lumen wird.

Der sekretorische Phänotyp der Endothelzellen zeigte sich bereits lichtmikroskopisch in Form einer Sekretion von fibrillärem Material, welches extrazellulär sowohl in faserartiger als auch in globulärer Form vorzufinden war (siehe Abb. 42 und 44). Möglicherweise handelt es sich hierbei um unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix.

In Kulturen, die 10-15 Tage in Kultur gehalten wurden, zeigten sich in den Randbereichen der Kulturschale deutlich längliche kapillarähnliche Strukturen (***Stadium 3 der angiogenen Kaskade in vitro***). Initiiert wurden diese offensichtlich durch ein stellenweises Ablösen des Zellteppichs vom Rand der Kulturschale. Die Zellen im Zentrum der Kulturschale waren zu diesem Zeitpunkt phasenkontrastmikroskopisch nicht mehr zu beurteilen. Das mikroskopische Bild zeigte konfluente Zellen mit undeutlichen Zellgrenzen, überlagert von zahlreichen rundlichen, adhärennten Strukturen (s. Abb. 36). Die Identität dieser Strukturen bleibt unklar. Morphologisch ähnelten diese Strukturen fibrillärem Material in globulärer Form verglichen mit der histologischen und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung. Die Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Kollagen IV zeigte auch eine Markierung der globulären

Strukturen, diese war jedoch in schwächerer Form auch nach Inkubation mit dem PBS-Puffer (Kontrolle) zu beobachten, wodurch eine Unterscheidung nicht möglich war. Auf der anderen Seite könnte es sich aber ebenfalls um abgerundete Zellen, möglicherweise absterbende (apoptotische, nekrotische) Endothelzellen handeln. Diese Hypothese kann eindeutig durch die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung widerlegt werden, da Endothelzellen mit morphologischen Apoptose- bzw. Nekrose-Charakteristika in dieser Lokalisation nicht in solch großer Anzahl gefunden wurden.

Die anschließende dreidimensionale Organisation kapillarähnlicher Strukturen auf der unteren Zellschicht (**Stadium 4 der angiogenen Kaskade *in vitro***) repräsentierte, analog zur *in vivo*-Angiogenese, die Bildung kapillarähnlicher Strukturen durch lokale Auflösung des extrazellulären Substrates sowie Migration, Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen. Es zeigten sich unterschiedlich breite, lange und verzweigte Zellstränge, was als wertvolles Kriterium für ein realitätsnahes *in vitro*-Modell gewertet werden kann (Donovan et al., 2001). Ein dreidimensionales Wachstum der Zellen war zu diesem Zeitpunkt möglich, da sich die Endothelzellen durch Sekretion von großen Mengen an fibrillärem Material eine dreidimensionale extrazelluläre Matrix geschaffen hatten, welche eine Invasion der Endothelzellen durch Degradation des Substrates erlaubte. Werden Endothelzellen auf einem Gel (Montesano und Orci, 1985; Montesano et al., 1986), unter einem Gel (Peters et al., 2002; Schor et al., 1983) oder zwischen zwei Gelschichten (Chalupowicz et al., 1995; Montesano et al., 1983) kultiviert, so beginnen sie direkt nach Stimulation mit pro-angiogenen Faktoren in das dreidimensionale Substrat zu invadieren und die Ausbildung planarer kapillarähnlicher Strukturen bleibt aus. Da im hier vorgestellten Modell kein exogenes dreidimensionales Substrat den Endothelzellen zur Verfügung gestellt wurde, musste erst die Synthese von Komponenten und anschließende Ausbildung dieser Matrix erfolgen, so dass ein dreidimensionales Wachstum zu einem früheren Zeitpunkt nicht beobachtet werden konnte.

Die immunhistochemische Markierung von Kollagen IV zeigte im Zentrum der Kulturschale eine unverändert dichte, flächenhafte, immunopositive Struktur, während die kapillarähnlichen Strukturen in den Randbereichen intensiv außen angefärbt wurden. Dies zeigt eindeutig, dass sich außen, also auf der vom Lumen abgewandten Seite der Zellen, fibrilläres Material, hier als Kollagen IV identifiziert, befindet.

Auffällig war, dass mikroskopisch erfassbare kapillarähnliche bzw. dreidimensionale Netzwerke nur in den Randbereichen der Kulturschale festzustellen waren. Auch andere Studien berichten von bestimmten Arealen der Kulturschale, in denen die Bildung kapillarähnlicher Strukturen zu beobachten war bzw. initiiert wurde, beispielsweise in den Randbereichen der Kulturschale mit Ausbreitung ins Zentrum (Feder et al., 1983) oder in der mittleren Zone der

Kulturschale zwischen dem konfluenten Zentrum und der subkonfluenten Peripherie (Folkman und Haudenschild, 1980b). In dem hier beschriebenen Modell erfolgte eine Adhäsion der kapillarähnlichen Strukturen bzw. einzelner Äste von Netzwerken an der Kulturschalenwand. Auch vertikale Zelllayer als Resultat eines Wachstums der Endothelzellen entlang der Kulturschalenwand wurden beobachtet. Dies impliziert, dass die Kulturschalenwand diese Formationen durch zusätzliche Stabilisierung unterstützte. Darüber hinaus könnte auch die geringere Zelldichte in diesem Bereich einen Einfluss auf die Bildung kapillarähnlicher Strukturen haben. Aufgrund der Ergebnisse der histologischen Untersuchung und immunhistochemischen Markierung ist jedoch davon auszugehen, dass auch im Zentrum der Kulturschale planare kapillarähnliche Strukturen ausgebildet wurden, eine Beurteilung war allerdings aufgrund des überlagernden, dreidimensionalen Substrates nicht möglich. Eine potentielle Ursache für das Fehlen dreidimensional organisierter Netzwerke im Zentrum der Kulturschale könnte die höhere Dichte des extrazellulären Substrates in diesem Areal sein. Womöglich reichte die Bildung von Proteasen der Endothelzellen nicht aus, um diese dichte Schicht zu durchdringen.

Eine vollständige Regression der kapillarähnlichen Strukturen bis zur Ausbildung eines Monolayers konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr konnte mikroskopisch ein intensives Remodeling mit Regression und Bildung neuer kapillarähnlicher Strukturen verfolgt werden, bedingt durch die kontinuierliche Stimulation der Endothelzellen mit im Kulturmedium enthaltenen pro-angiogenen Faktoren. Nach ca. 3-4 Monaten Kultivierung der Endothelzellen kam es stets zu einem Verlust der Adhärenz des Zellteppichs auf einer Seite der Kulturschale mit anschließendem Umschlagen zur anderen Seite und späterer vollständiger Ablösung. Im Anschluss konnten analog zum „Scratching“ (Bussolino et al., 1992; Imaizumi et al., 2000b) eine Migration und Proliferation der Endothelzellen aus dem ursprünglichen Layer beobachtet werden, wodurch die zellfrei gewordenen Areale erneut mit Zellen besiedelt wurden. Eine vollständige Konfluenz wurde, wie im murinen Zellkulturmodell beschrieben, nicht erreicht. Innerhalb der nächsten zwei Wochen kam es erneut zur linearen Aneinanderreihung länglicher Zellen mit Ausbildung von Netzwerken aus dünnen Zellsträngen auf einem subkonfluenten Zelllayer. Das Auftreten planarer bzw. dreidimensional organisierter kapillarähnlicher Strukturen konnte im weiteren Untersuchungszeitraum von zwei bis drei Wochen nicht mehr beobachtet werden. Nicht auszuschließen ist eine wie bei den murinen Endothelzellen vermutete „Latenz-“, oder „Ruhezeit“, woran sich wieder ein neuer Zyklus der angiogenen Kaskade, nach Differenzierung der Endothelzellen in einen angiogenen Phänotyp, anschließt. Da die Endothelzellen versuchsbedingt nicht länger als 5 Monate in Kultur gehalten wurden, können hierzu keine weiteren Aussagen getroffen werden.

Die lichtmikroskopische Untersuchung von nach Richardson gefärbten Semidünnschnitten längs durch kapillarähnliche Strukturen erbrachte den Nachweis eines zentralen Lumens innerhalb dieser Strukturen. Zum Teil konnten Lumina angefüllt mit großen Mengen an fibrillärem Material sowie Zelldetritus beobachtet werden, zum Teil befand sich lediglich wenig fibrilläres Material im Lumen. Folkman und Haudenschild (1980a) beschrieben bereits 1980 ein teilweise fibrilläres, membranöses und amorphes Material im Lumen kapillarähnlicher Strukturen, welches nach Abschluss der Lumenbildung durch einen nicht näher charakterisierten Mechanismus entfernt wird. Die in diesem Modell nachgewiesenen, unterschiedlichen Mengen an fibrillärem Material im Lumen kapillarähnlicher Strukturen indizieren bei Annahme einer Leit- und Stützfunktion des Materials („Mandrin“) im Rahmen der Lumenbildung (Folkman und Haudenschild, 1980a), dass dieses aus dem Lumen entfernt wird, wobei Lumina ohne Inhalt, wie sie nach Abschluss der Lumenbildung zu erwarten wären (Folkman und Haudenschild, 1980a), nicht nachgewiesen werden konnten. Erschwerend bei der Untersuchung zeigte sich das in Kultur erfolgte Remodeling, so dass eine zeitliche Aussage bzw. ein zeitlicher Vergleich der unterschiedlichen Mengen an fibrillärem Material in den Lumina nicht möglich war.

Die humanen Endothelzellen wurden in den Passagen 4 bis 10 untersucht, wobei die Zellen relativ lange (bis zu 5 Monate) ohne Passagierung den *in vitro*-Bedingungen ausgesetzt waren, so dass höhere Passagen nach einer relativ langen Kultivierungsdauer erreicht wurden. Der zuvor beschriebene charakteristische Ablauf der angiogenen Kaskade konnte nur in den Passagen 4 bis 9 beobachtet werden. Humane Endothelzellen in der Passage 10 zeigten keine einheitliche Morphologie mehr und die typischen morphologischen Veränderungen während der angiogenen Kaskade konnten nicht beobachtet werden. Das mikroskopische Bild glich dem zuvor beschriebenen nach dem Ablösen der kapillarähnlichen Strukturen mit der Ausbildung von dünnen endothelialen Zellsträngen. Auch Endothelzellen, die im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro* gesplittet wurden, zeigten anschließend lediglich die Ausbildung eines Netzwerkes aus dünnen endothelialen Zellsträngen. Ähnliche Beobachtungen stellte Schuster (2002) in einem *in vitro*-Modell der Angiogenese boviner Endothelzellen an. Nach dem Splitten bildeten die Endothelzellen ein Kopfsteinpflastermuster und es dauerte 7 bis 10 Wochen bis zur erneuten *in vitro*-Angiogenese der Zellen. Schuster vermutete, dass der vorgegebene Ablauf der angiogenen Kaskade bedingt, dass die Endothelzellen nach dem Splitten die Angiogenese in dem Stadium fortsetzen, in welchem sie sich vor der Subkultivierung befunden hatten. Demnach müssten die humanen Endothelzellen, die im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade* gesplittet wurden, erst einmal die bei den murinen Endothelzellen postulierte „Latenzzeit“ durchlaufen, um ihren angiogenen Phänotyp wiederzuerlangen. Da die humanen Endothelzellen versuchsbedingt nicht länger als 5 Monate in Kultur

gehalten wurden, kann hierzu an dieser Stelle keine Aussage gemacht werden. Weitere Versuche mit expandierter Kultivierungszeit nach dem Ablösen der kapillarähnlichen Strukturen könnten klären, ob auch in diesem Modell ein zweiter Zyklus der Angiogenese nach durchlaufender „Latenzzeit“ mit möglicher Differenzierung der Endothelzellen in einen angiogenen Phänotyp initiiert wird.

In dem dreidimensionalen Langzeitmodell der *in vitro*-Angiogenese humaner mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Vorhaut konnten alle in dieser Arbeit definierten Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* (*Stadium 0-4*) beobachtet werden. Trotz fehlender Bereitstellung eines dreidimensionalen Substrates erfolgte ein dreidimensionales Wachstum als Resultat der hohen Synthese und Sekretion von basalmembranähnlichem Material durch die Endothelzellen. Die Verwendung exogener Polymere in dreidimensionalen *in vitro*-Modellen hat den Nachteil, dass die Konzentration und biochemischen Parameter der Matrix, welche Einfluss auf die Dichte und mechanischen Eigenschaften des Substrates haben (Ferrenq et al., 1997) und zu unterschiedlichen endothelialen Phänotypen führen können (Nehls und Herrmann, 1996) exakt bestimmt werden müssen. Darüber hinaus müssen unter Umständen exogene Antiproteasen zur Limitierung der Geldegradation durch die Endothelzellen eingesetzt werden (Zhu et al., 2000). All diese Nachteile entfallen, da für dieses *in vitro*-Modell der Angiogenese lediglich die Endothelzellen sowie pro-angiogene Faktoren zu deren Aktivierung benötigt werden. Für das Wachstum und die *in vitro*-Angiogenese der humanen Endothelzellen war nicht einmal ein Gelatinesubstrat notwendig, wie es in einigen Studien für das Überleben mikrovaskulärer Endothelzellen in Langzeitkulturen postuliert wurde (Folkman et al., 1979; Folkman und Haudenschild, 1980a). Die extrazelluläre Matrix war in unterschiedlicher Weise in die *in vitro*-Angiogenese involviert. Zu Beginn der angiogenen Kaskade fand eine intensive Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix statt, die Endothelzellen bildeten ihr eigenes dreidimensionales Substrat. Während der anschließenden endothelialen Zellmigration und Differenzierung erfolgte ein Remodeling und Abbau der extrazellulären Matrix sowie eine Synthese und Sekretion im Rahmen der Lumenbildung. Mit Abschluss der Lumenbildung erfolgte wahrscheinlich eine partielle Resorption des Materials aus dem Lumen.

Dieses realitätsnahe *in vitro*-Modell der Angiogenese humaner mikrovaskulärer Endothelzellen berücksichtigt im Gegensatz zum murinen zweidimensionalen *in vitro*-Modell alle Wachstumsschritte der angiogenen Kaskade *in vivo*. Die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen erfolgte im *Stadium 4* analog zur *in vivo*-Situation durch folgende Schritte: Lokale Auflösung des basalmembranähnlichen Materials, Migration bzw. Invasion, Proliferation und dreidimensionale Organisation eines Netzwerkes aus kapillarähnlichen Strukturen unterschiedlicher Längen, Durchmesser und Verzweigungen. Im Gegensatz zum murinen Modell konnten die

kapillarähnlichen Strukturen auch über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, was offensichtlich Resultat der Stabilisierung durch Sekretion großer Mengen an fibrillärem Material war.

### **6.1.2.2 Ultrastruktur humaner mikrovaskulärer Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro***

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro* (*Stadium 2-4*) zeigte ovale bis lang gestreckte Endothelzellen, die überwiegend in Reihen linear angeordnet waren. Die länglichen Zellen wiesen in der Regel an mindestens einem Zellpol einen sehr langen, dünnen Zellausläufer auf, durch den eine Kontaktaufnahme zu anderen Zellen erfolgte. Auf eine hohe Aktivität der Zellen deuteten euchromatische Kerne, zahlreiche Mitochondrien, gut ausgebildetes rER und zahlreiche Golgi-Felder hin (Sinowatz, 2000). In der Nähe der Golgi-Felder konnten zahlreiche rundliche, membranbegrenzte Vesikel beobachtet werden. An der Zellmembran waren vermehrt kleine, bläschenförmige Invaginationen zu erkennen und zwar auf der dem zentralen Lumen zugewandten Seite, was auf Endo- bzw. Exozytosevorgänge hindeutet. Möglicherweise handelt es sich hierbei um die Exozytose von synthetisierten Bestandteilen der extrazellulären Matrix oder um die Resorption des nun nicht mehr benötigten fibrillären Materials im Lumen. Zahlreiche Mikrovesikel wurden auch in bovinen (Feder et al., 1983; Schuster, 2002) und humanen Endothelzellen (Folkman und Haudenschild, 1980a) in der Nähe des fibrillären Materials im Lumen beobachtet.

Auffällig in einzelnen Zellen waren membranbegrenzte, rundliche Strukturen, die unterschiedlich große, membranbegrenzte Einschlüsse beherbergten. Meyer und Mitarbeiter (1997) beschrieben eine phagozytotische Population von Endothelzellen, die als Charakteristikum Anhäufungen von Lipofuszin in sekundären Lysosomen als Reste nicht verdauter Substanzen enthielten. Diese Population von Endothelzellen bildete durch Degradation der Kollagenmatrix Kanäle in dieser für die Differenzierung von kapillarähnlichen Strukturen (Meyer et al., 1997). Es wäre möglich, dass es sich bei den hier beobachteten Strukturen ebenfalls um sekundäre Lysosomen (Heterolysosomen) mit enthaltendem Lipofuszin handelt. In einigen Zellarten (z.B. Herzmuskelzellen, Hepatozyten) werden diese Produkte als Restkörper aufbewahrt, aber in den meisten Zellen fusionieren die Lipofuszingranula mit der Plasmamembran und entlassen ihren Inhalt in den extrazellulären Raum (Junqueira et al., 1992).

Als Endothelzell-spezifische Organellen konnten Weibel-Palade-Körperchen entsprechend anderer Studien (Folkman et al., 1979; Huber et al., 2002) in den humanen Endothelzellen nachgewiesen werden.

Zwischen den Zellen befand sich in großen Mengen fibrilläres Material, immer auf mindestens einer Seite von einer länglichen Zelle bzw. einem langen, dünnen Zellausläufer begrenzt. Dieses wies, wie bereits lichtmikroskopisch zu erkennen war, eine unterschiedliche Strukturierung (faserartig bzw. globulär) auf. In Übereinstimmung zu anderen Studien (Feder et al., 1983; Folkman und Haudenschild, 1980a; Meyer et al., 1997; Schuster, 2002) wurde das fibrilläre Material ebenfalls im Lumen kapillarähnlicher Strukturen nachgewiesen, welches dessen Funktion als „Mandrin“ (Folkman und Haudenschild, 1980a) im Rahmen der Lumenbildung verdeutlicht.

### **6.1.3 Lumenbildung während der Angiogenese *in vitro***

Licht- und transmissionselektronenmikroskopisch konnte ein zentrales Lumen im Inneren der kapillarähnlichen Strukturen muriner und humaner Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Entstehung von Vakuolen im Zuge der Lumenbildung, wie sie 1980 von Folkman und Haudenschild (1980a) und später von anderen Autoren (Bayless et al., 2000; Bayless und Davis, 2002; Davis und Camarillo, 1996; Iruela-Arispe et al., 1991; Kubota et al., 1988; Meyer et al., 1997; Montesano et al., 1983) beschrieben wurde, konnte sowohl bei den murinen als auch bei den humanen Endothelzellen beobachtet werden. Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der murinen Endothelzellen zeigte zunächst viele kleine Vakuolen, die leer erschienen und zum Teil konfluieren. Zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchung wiesen einzelne murine Endothelzellen dann eine große Vakuole auf, innerhalb derer fibrilläres Material sowie Zelldetritus zu erkennen waren. Dies spricht dafür, dass kleine Vakuolen zu größeren konfluieren (Meyer et al., 1997). Auch die lichtmikroskopische Untersuchung von nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten humanen Endothelzellen zeigte große intrazelluläre Vakuolen. Meyer et al. (1997) beschrieben das Auftreten von zwei Typen von Vakuolen mit unterschiedlichen Einschlüssen im Zuge der Lumenbildung. Die Vakuolen enthielten entweder fibrilläres Material oder Membrantrümmer. Diese exakte Differenzierung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht getroffen werden. Während die größeren Vakuolen in den murinen Endothelzellen fibrilläres Material oder Zelldetritus oder auch beides enthielten, konnte über das Material der Vakuolen in der humanen Zellkultur keine Aussage gemacht werden, da diese lediglich im Lichtmikroskop detektiert werden konnten. Das fibrilläre Material scheint im Rahmen der Lumenbildung eine Leit- und Stütz-

funktion zu erfüllen. Es wird in die Vakuolen sezerniert und nach Abschluss der Lumenbildung resorbiert (Folkman und Haudenschild, 1980a).

Meyer et al. (1997) beschrieben die Vakuolen als autophagisches Resultat einer lysosomalen Degradation der im Rahmen der Migration erfolgten Extension der Plasmamembran. Folglich müssten die Vakuolen Reste von unterschiedlichen Organellen sowie Membranresten enthalten, wobei von der Arbeitsgruppe um Meyer häufiger Membranreste beobachtet wurden, wahrscheinlich aufgrund der längeren Persistenz dieser Komponenten (Meyer et al., 1997). Die ultrastrukturelle Darstellung muriner Endothelzellen mit großen intrazellulären Vakuolen (s. Abb. 12) weist auf eine apoptotische Zelle in der Vakuole hin.

Zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung konnten Lumina ohne fibrilläres Material gefunden werden, wie es verschiedene Autoren nach Abschluss der Lumenbildung beobachteten (Folkman und Haudenschild, 1980a; Ingber und Folkman, 1989a). Es ist wahrscheinlich, dass von den humanen Endothelzellen das fibrilläre Material nach Abschluss der Lumenbildung ebenfalls resorbiert wird. Aufgrund des intensiven Remodelings kapillarähnlicher Strukturen im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade* wäre es möglich, dass im Rahmen der licht- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung nur Anschnitte von noch nicht vollständig lumenisierten kapillarähnlichen Strukturen erfolgten. Die Untersuchungen muriner und humaner Endothelzellen deuten auf diesen Vorgang hin, da Lumina mit unterschiedlichen Mengen an fibrillärem Material beobachtet werden konnten.

Über die Beteiligung von intrazellulären Vakuolen bei der Lumenbildung existieren unterschiedliche Theorien. Folkman und Haudenschild (1980a) postulierten die Entstehung eines kontinuierlichen Lumens durch Vereinigung der Vakuolen benachbarter Endothelzellen, wobei das Lumen im Durchmesser nur von einer Endothelzelle begrenzt sein kann. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung eines Lumens ist die Fusion der intrazellulären Vakuolen mit interzellulären Spalträumen (Meyer et al., 1997). Beide Theorien konnten durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden.

Die Untersuchung kapillarähnlicher Strukturen muriner Endothelzellen zeigte Lumina, welche in der Regel im Durchmesser nur von einer Zelle begrenzt waren, welches für den ersten Mechanismus spricht. Das Auftreten von großen Vakuolen in den murinen Endothelzellen mit deutlich benachbarter Lokalisation zu interzellulären Spalträumen dagegen verdeutlicht eine möglicherweise bevorstehende Fusion der Vakuolen mit interzellulären Spalträumen, wie Meyer und Mitarbeiter (1997) es postulierten. Die Beobachtungen im murinen Zellkulturmodell sprechen dafür, dass beide Mechanismen der Lumenbildung nebeneinander bestehen.

Lumina, die nur von einer Zelle begrenzt waren, sowie interzelluläre Spalträume wurden bei den humanen Endothelzellen transmissionselektronenmikroskopisch nicht beobachtet. Lichtmikroskopisch gibt es Anzeichen für die Lumenbildung durch Fusion von intrazellulären Vakuolen mit interzellulären Spalträumen (s. Abb. 44).

Von Paku (1988) wurde ein weiterer Mechanismus der Lumenbildung beschrieben. Hierbei entsteht durch kreisförmige Umbiegung der Zellkörper von Endothelzellen und anschließende Vereinigung der Zellenden zentral ein Lumen, welches im Durchmesser ebenfalls nur von einer Zelle begrenzt sein kann. Anzeichen für diesen Mechanismus konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden.

Das Auftreten von Apoptosen, wie es von Meyer und Mitarbeitern (1997) sowie von Peters und Mitarbeitern (2002) im Zuge der Lumenbildung beschrieben wurde, konnte im humanen Modell bestätigt werden. Die Untersuchungen humaner Endothelzellen zeigten eindeutig, dass Apoptose eine vorherrschende Rolle im Rahmen der Lumenbildung spielt. Die lichtmikroskopische Untersuchung von nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Endothelzellen zeigte linear und zirkulär aneinander gereihete Endothelzellen (möglicherweise erste planare kapillarähnliche Strukturen), die im Zentrum fibrilläres Material sowie Zellen mit morphologischen Apoptose-Charakteristika wie Zellschrumpfung, Kernpyknose sowie Kernfragmentierung enthielten. Auch bei der Untersuchung von Semidünnschnitten, gefärbt nach Richardson, wurden im Lumen kapillarähnlicher Strukturen Zellen mit morphologischen Apoptose-Charakteristika gefunden. Lumina, die fast vollständig mit fibrillärem Material angefüllt waren, zeigten dabei ebenfalls eine große Anzahl apoptotischer Endothelzellen, während „reifere“ Lumina, gekennzeichnet durch geringe Mengen an fibrillärem Material, ebenfalls nur vereinzelt apoptotische Zellen aufwiesen.

#### **6.1.4 Polarität der Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro***

Vaskuläre Endothelzellen *in vivo* zeichnen sich durch eine Polarität aus, gekennzeichnet durch einen nach außen gerichteten basalen (abluminalen) und einen nach innen gerichteten luminalen Membranbereich. Die Deposition von Komponenten der Basalmembran *in vitro* setzt eine Polarität voraus, also eine eindeutige Bestimmung von basaler und luminaler Seite der Zellen (Paku, 1998).

Im Gegensatz zur eindeutig definierten Polarität von Endothelzellen *in vivo*, ist die Bestimmung der Polarität *in vitro* kultivierter Endothelzellen schwierig und verschiedene Studien zeigen aufgrund unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen divergierende Ergebnisse. Im Rahmen der *in vivo*-Angiogenese entstehen Gefäße, ausgekleidet von ruhenden Endothel-

zellen, welche einer Basalmembran aufsitzen und in den meisten Fällen von Perizyten umgeben werden. In den in dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Modellen der Angiogenese konnten dagegen keine ruhenden kapillarähnlichen Strukturen beobachtet werden, da erstens die Endothelzellen kontinuierlich mit pro-angiogenen Faktoren stimuliert wurden und zweitens eine Basalmembran nur unvollständig ausgebildet wurde bzw. Perizyten fehlten. Betrachtet man diese *in vitro*-Voraussetzungen, so wird deutlich, dass die Bestimmung einer eindeutigen Polarität der Endothelzellen in diesen Modellen sehr schwierig ist und vielmehr nur Anzeichen für Polaritäten während der angiogenen Kaskade diskutiert werden können.

In beiden in dieser Arbeit charakterisierten Zellkulturmodellen wurde von den Endothelzellen ein basalmembranähnliches Material sezerniert, im humanen Modell als Kollagen IV identifiziert. Kollagen IV konnte in der humanen Zellkultur über dem Zelllayer nachgewiesen werden. Tilling et al. (2002) führten eine immunhistochemische Markierung von Kollagen IV nach Entfernen der Zellen von der Kulturschale durch und beobachteten eine Immunfärbung unter dem Zelllayer, welches eine polarisierte Sekretion zur basalen Seite der Zellen indiziert. Im humanen Zellkulturmodell gibt es ebenfalls Anzeichen für eine polarisierte Sekretion von fibrillärem Material zur basalen Seite der Zellen, da das mikroskopische Bild nach dem Ablösen der Zellen fibrilläres Material auf der Kulturschale zeigte. Wie Tilling und Mitarbeiter (2002) bereits vermuteten, ist jedoch nicht auszuschließen, dass das basalmembranähnliche Material von den Zellen ins Kulturmedium sezerniert wird und sich anschließend unter dem Zelllayer zusammenlagert.

Die Anwesenheit von fibrillärem Material im Lumen kapillarähnlicher Strukturen und das Fehlen dieses Materials an der Außenseite der Strukturen im Licht- und Transmissionselektronenmikroskop spiegeln eine umgekehrte Polarität der Endothelzellen mit nach innen gewandter basaler und nach außen gerichteter luminaler Seite wider. Hierfür spricht auch, dass sowohl die murinen als auch die humanen Endothelzellen, welche die Lumina auskleideten, sich in der Mehrzahl nach außen, also zur abluminalen Seite wölbten, während *in vivo*, insbesondere in kleinen Kapillaren, ein Hineinwölben der Endothelzellen ins Lumen zu beobachten ist. Die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen mit einer umgekehrten Polarität wurde in verschiedenen *in vitro*-Modellen beschrieben (Feder et al., 1983; Fuchs-Schoenleber, 1999; Montesano et al, 1992; Schuster, 2002). Feder und Mitarbeiter (1983) führten zur Unterstützung dieser Vermutung eine Färbung mit Ruthenium-Rot durch, welches typischerweise an Elastin und Proteoglykane bindet. Retrograd zur *in vivo*-Färbung der luminalen Plasmamembran (Glykokalix) und extrazellulären Matrix (Ausprunk et al., 1981), beobachteten Feder et al. (1983) eine Färbung der abluminalen Plasmamembran sowie des intraluminalen fibrillären Materials. Die in dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenzfär-

bung von Kollagen IV im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade in vitro* zeigte jedoch auch eine abluminale Markierung kapillarähnlicher Strukturen. Es ist also nicht auszuschließen, dass es bei der Aufbereitung der Zellproben für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung zu einer Ablösung des nicht luminalen Materials gekommen ist. Unter diesem Aspekt ist eine Aussage über die Polarität der Endothelzellen schwierig.

Unter der Annahme, dass das fibrilläre Material, welches in intrazellulären Vakuolen, interzellulären Spalträumen sowie in zentralen Lumina detektiert werden konnte, Leit- und Stützfunktion für die Bildung kapillarähnlicher Strukturen mit einem Lumen erfüllt und nach Abschluss der Lumenbildung vollständig aus dem Lumen resorbiert wird, ist nicht auszuschließen, dass im Anschluss eine Deposition des basalmembranähnlichen Materials auf der basalen Seite der Endothelzellen, sofern noch nicht stattgefunden, erfolgt und die Endothelzellen folglich die gleiche Polarität wie *in vivo* aufweisen würden. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass sich einige Endothelzellen bereits ins Lumen hineinwölbten. Da jedoch die Endothelzellen in Reinkultur vorlagen, eine Basalmembran nur unvollständig ausgebildet wurde und darüber hinaus die Zellen kontinuierlich mit pro-angiogenen Faktoren stimuliert wurden, konnten keine ruhenden kapillarähnlichen Strukturen beobachtet werden. Stattdessen erfolgte ein intensives Remodeling mit Regression und anschließender Neubildung von kapillarähnlichen Strukturen. Diese Beobachtungen indizieren, dass die Endothelzellen *in vitro* im Verlaufe der angiogenen Kaskade unterschiedliche Polaritäten aufweisen, entsprechend der unterschiedlichen Funktionen des sezernierten extrazellulären Materials.

Dass Endothelzellen *in vitro* aber auch analog zur *in vivo*-Situation eine Polarität mit nach innen gewandter luminaler und nach außen gerichteter abluminaler Seite aufweisen können, zeigten beispielsweise Pelletier und Mitarbeiter (2000), welche Endothelzellen mit Perizyten kultivierten. Sie beobachteten die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen mit einer basalmembranähnlichen Struktur auf der abluminalen Seite, während die Lumina entweder leer waren oder nur Zelldetritus enthielten. Umgeben waren die kapillarähnlichen Strukturen von Perizyten. Diese *in vitro* gebildeten kapillarähnlichen Strukturen weisen also eine große Ähnlichkeit zu Kapillaren *in vivo* auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Endothelzellen aufgrund unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen *in vitro* unterschiedliche Polaritäten entwickeln.

## 6.2 Transfektion mikrovaskulärer Endothelzellen

### 6.2.1 Mikroskopische Untersuchung transfizierter Endothelzellen

#### 6.2.1.1 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung transfizierter Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden am Ende der Inkubation mit dem Transfektionsmix sowie direkt vor der Zellyse mikroskopisch beurteilt. Endothelzellen, die im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* transfiziert wurden, zeigten zu beiden Untersuchungszeitpunkten morphologische Veränderungen. Am Ende der Inkubation mit dem Transfektionsmix waren in großer Anzahl dunkle, rundliche Vesikel zwischen den Zellen sowie diffus verteilt im Zytoplasma der Zellen sichtbar. Das mikroskopische Bild der Zellen vor Zugabe des Transfektionsmixes sowie das der Kontrollen am Ende der Scheininkubation wiesen diese Vesikel nicht auf. Es ist also anzunehmen, dass es sich bei den beschriebenen Vesikeln um die Plasmid-DNA-Komplexe handelte. Hierfür spricht auch die direkte Korrelation der Anzahl der Vesikel mit der eingesetzten Plasmid-DNA-Konzentration. Auch Meng (2002) beschrieb nach liposomaler Transfektion boviner Endothel- und Granulosazellen lichtmikroskopisch sichtbare Vesikel zwischen den Zellen.

Nach dem durchgeführten Mediumwechsel und weiterer 24- bzw. 30-stündiger Inkubation der Endothelzellen bis zur Zellernte waren die Vesikel nicht mehr bzw. in deutlich geringerer Anzahl zwischen den Zellen zu sehen. Beim Mediumwechsel wurden alle nicht internalisierten bzw. nicht an Zellmembranen adhärennten Komplexe entfernt. Die intrazellulären Vesikel waren zu diesem Zeitpunkt unverändert sichtbar, wobei das mikroskopische Bild der transfizierten humanen Endothelzellen sogar eine deutlich perinukleäre Lage der Vesikel anzeigte. Dies spricht für ein erfolgreiches Kern-Targeting, welches auch durch die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung transfizierter Endothelzellen (s. Kap. 6.2.1.2) bestätigt wurde.

Zytotoxische Auswirkungen in Form eines Ablösens der Endothelzellen von der Kulturschale wurden sowohl beim Einsatz einer zu hohen Plasmid-DNA- bzw. *SuperFect*-Konzentration (4 µg bzw. 4 µl pro Kulturschale) sowie auch als Resultat einer zu langen Inkubation mit dem Transfektionsmix (3-4 Stunden) beobachtet. Da die meisten Transfektionsreagenzien für die Zellen toxisch sind, muss die Inkubationszeit limitiert werden (Luo und Saltzman, 2000a). Eine Steigerung der Transfektionseffizienz kann nur durch Erhöhung der Anzahl an für die Zellen verfügbaren DNA-Molekülen erzielt werden. Diese ist jedoch durch Erhöhung der DNA-

Konzentration, welche immer auch mit einer Erhöhung der Konzentration des Transfektionsreagenzes verbunden ist, nicht zu erreichen. Luo und Saltzman (2000a) beobachteten eine Steigerung der Reporterexpression um bis zu 750% durch Erhöhung der „physikalischen DNA-Konzentration“ an der Zelloberfläche. Sie verwendeten Siliziumdioxid-Nanopartikel, welche an die DNA-Dendrimer-Komplexe assoziierten und durch Sedimentation in Lösung die Konzentration der Komplexe auf der Zelloberfläche erhöhten. Entscheidende Parameter waren dabei Größe sowie Anzahl der Partikel (Luo und Saltzman, 2000a). Weitere Versuche durch Einsatz von Nanopartikeln könnten zeigen, ob die Konzentration der DNA-Dendrimer-Komplexe an der Zelloberfläche und damit die Effizienz des Gentransfers in diesen Modellen noch gesteigert werden kann.

Das mikroskopische Bild transfizierter muriner Endothelzellen im *Stadium 3* bzw. transfizierter humaner Endothelzellen im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade* zeigte vereinzelt extrazellulär Vesikel in Arealen geringerer Zelldichte. Intrazellulär konnten Vesikel nur in einzelnen murinen Endothelzellen, die sich zwischen den kapillarähnlichen Strukturen befanden, beobachtet werden, während das Zellbild humaner Endothelzellen in diesem Stadium der *in vitro*-Angiogenese die Beurteilung einer intrazellulären Lokalisation von Vesikeln nicht ermöglichte. Das mikroskopische Bild zeigte lediglich einen verschwommenen, konfluenten Layer von Endothelzellen, überlagert von zahlreichen rundlichen, adhärennten Strukturen. Da in beiden Zellkulturmodellen auch unmittelbar vor der Zellernte, also nach einem Mediumwechsel, noch Vesikel extrazellulär zu beobachten waren, ist von einer Adhärenz dieser an der Kulturschale auszugehen, hier insbesondere offensichtlich aufgrund der versuchsweisen Beschichtung der Kulturschalen mit Gelatine.

### **6.2.1.2 Ultrastruktur transfizierter Endothelzellen**

Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Endothelzellen am Ende der Inkubation mit dem Transfektionsmix sowie direkt vor der Zellyse fixiert. Während die murinen Endothelzellen am Ende der Inkubation mit dem Transfektionsmix keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zu den als Kontrollen eingesetzten Zellen aufwiesen, zeigten die humanen Endothelzellen zahlreiche Vesikel (Durchmesser 50-80 nm) an der Zellmembran, im Zytoplasma sowie an der Kernmembran. Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um die DNA-Dendrimer-Komplexe handelt, da erstens die als Kontrollen eingesetzten humanen Endothelzellen diese Vesikel in so großer Anzahl ohne Assoziation zu Golgi-Feldern nicht aufwiesen, zweitens sich die Größe mit Angaben von Tang und Szoka (1997), welche DNA-Dendrimer-Komplexe elektronenmikroskopisch untersuchten (Durchmesser 40-60 nm), deckt und drittens insbesondere die Vesikel an der Kernmembran die von Tang und Szoka (1997)

beschriebene „Donut“-ähnliche Morphologie aufwiesen. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit darf angenommen werden, dass es sich hierbei um bereits freie, nicht in Endo- bzw. Lysosomen eingeschlossene Komplexe handelt.

Kukowska-Latallo et al. (1996) postulierten eine Aufnahme von Plasmid-DNA-Dendrimer-Komplexen durch Endozytose, da eine Vorinkubation der Zellen mit einem speziellen Inhibitor der Endozytose eine Aufnahme der Komplexe verhinderte. Bei der Endozytose stülpen sich lokalisierte Abschnitte der Zellmembran nach innen ein, schnüren sich ab und bilden endozytotische Vesikel (Sinowatz, 2000). Die Ergebnisse der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung bestätigen eine Aufnahme der Komplexe durch Endozytose, da an der Zellmembran der transfizierten humanen Endothelzellen zahlreiche Vesikel zu erkennen waren.

Die endozytotischen Vesikel verschmelzen mit dicht unter der Plasmamembran lokalisierten frühen Endosomen, welche ihre Inhaltsstoffe dann zu den späten Endosomen ins Zellzentrum transportieren (Luzio et al., 2001). Durch Fusion der späten Endosomen mit primären Lysosomen entstehen dann sekundäre Lysosomen (Futter et al., 1996; Piper und Luzio, 2001), die eigentlichen Verdauungskompartimente der Zelle.

Aufgrund des Durchmessers der zytoplasmatischen Vesikel (50-80 nm) sowie ihrer homogenen Erscheinung liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den hier beobachteten zahlreichen Vesikeln im Zytoplasma um Endosomen oder primäre Lysosomen handelt, welche einen Durchmesser von ca. 50 nm aufweisen (Junqueira et al., 1992). Sekundäre Lysosomen dagegen besitzen eine eher heterogene Morphologie sowie Durchmesser von 200-2000 nm (Junqueira et al., 1992). Für eine gesicherte Identifizierung sekundärer Lysosomen ist jedoch der histochemische Nachweis ihrer enthaltenden hydrolytischen Enzyme notwendig (Junqueira et al., 1992).

Für den Transport der DNA-Dendrimer-Komplexe zum Kern (Kern-Targeting) kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Die die Komplexe enthaltenden Endosomen könnten mit primären Lysosomen zu sekundären Lysosomen verschmelzen, wobei sicherlich ein großer Teil der Komplexe durch lysosomale Nukleasen abgebaut wird. Dendrimeren und insbesondere aktivierten Dendrimeren wie *SuperFect* wird eine funktionelle Rolle beim Entkommen der Komplexe aus den Lysosomen zugeschrieben (Tang et al., 1996), die dazu führt, dass einem Teil der Komplexe die Freisetzung ins Zytoplasma gelingt. Nicht auszuschließen ist auch, dass die Komplexe vor Fusion zu sekundären Lysosomen aus den Endosomen entkommen bzw. die Fusion unterbleibt. Hierfür spricht, dass bereits nach 2-stündiger Inkubation der humanen Endothelzellen mit dem Transfektionsmix Vesikel an der Kernmembran

nachgewiesen werden konnten, während sekundäre Lysosomen in den Zellen offensichtlich nicht zu erkennen waren. Erst nach weiterer 24-stündiger Inkubation der humanen Endothelzellen waren spezifische Organellen, so genannte multivesikuläre Körper in den Zellen sichtbar, welche zu den späten Endosomen gezählt werden (Luzio et al., 2001; Piper und Luzio, 2001). Zabner und Mitarbeiter (1995) wiesen DNA-Lipid-Komplexe in Endosomen nach, die offensichtlich nicht mit Lysosomen fusionierten. Sie beobachteten nach endozytotischer Aufnahme von DNA-Lipid-Komplexen einen Transport der in Endosomen eingeschlossenen Komplexe zu einem perinukleären Kompartiment, wo durch Fusion der Endosomen größere membranumhüllte Aggregate entstanden, die Vesikel im Inneren beherbergten. Auch Thurston et al. (1998) beobachteten *in vivo* nach intravenöser Injektion von markierten kationischen Lipiden deren Lokalisation in intrazellulären multivesikulären Körpern.

Aufgrund der Lokalisation der Komplexe an der Kernmembran sowie aufgrund des Nachweises einer transgenen Expression ist gesichert, dass zumindest ein Teil der DNA-Dendrimer-Komplexe aus den Endosomen bzw. Lysosomen entkommt und den Kern erreicht.

Insgesamt stellen das Kern-Targeting und der anschließende Eintritt der DNA bzw. DNA-Dendrimer-Komplexe in den Zellkern für viele nicht-virale Methoden des Gentransfers wie beispielsweise den liposomalen Gentransfer einen ineffizienten Prozess dar (Brisson und Huang, 1999). Capecchi (1980) zeigte, dass die Injektion von nackter Plasmid-DNA in den Zellkern zu einer Transgenexpression in über 50% der Zellen führte, während nach Injektion ins Zytoplasma nur in weniger als 0,01% der Zellen eine Expression nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung wurde von Zabner und Mitarbeitern (1995) sowie von Pollard et al. (1998) bestätigt. Während die Injektion von DNA-Lipid-Komplexen ins Zytoplasma zu keiner Steigerung der Effizienz des Transfers der DNA zum Kern führte (Pollard et al., 1998; Zabner et al., 1995), konnten Pollard et al. (1998) einen gesteigerten Transfer der DNA, komplexiert mit polykationischen Polymeren (Polyethylenimin, Polylysin) zum Kern beobachten als mögliches Resultat einer durch das polykationische Polymer vermittelten verbesserten intrazytoplasmatischen Mobilität oder bedingt durch einen effektiveren Schutz der DNA vor dem Abbau durch endogene Nukleasen. Ob Dendrimere ebenfalls eine funktionelle Rolle beim Kern-Targeting spielen, bleibt unklar. Für *SuperFect* wäre dies zu evaluieren durch Vergleich der Effizienz nach Injektion von nackter Plasmid-DNA sowie mit dem Transfektionsreagenz komplexierter DNA ins Zytoplasma.

Zur Überwindung der Kernmembran gibt es verschiedene Möglichkeiten. Der einfachste Weg ist sicherlich über die Kernporen, wobei dies nur für kleinere Moleküle (z.B. Oligonukleotide) möglich ist. Plasmide sind aufgrund ihrer Größe in der Regel nicht in der Lage, die Kernporen zu passieren (Zabner et al., 1995). Ein zellzyklusabhängiger Eintritt der DNA in den Kern

wird von mehreren Autoren postuliert (Brunner et al., 2000; Fasbender et al., 1997; Tseng et al., 1999). Der Zellzyklus proliferierender Zellen gliedert sich in die folgenden vier Phasen (Sinowatz, 2000): Eine Wachstumsphase vor der DNA-Verdopplung (Gap-1, kurz G<sub>1</sub>), eine DNA-Synthesephase (S), eine Wachstumsphase nach der DNA-Verdopplung (Gap-2, kurz G<sub>2</sub>) und die Mitose (M). Brunner und Mitarbeiter (2000) zeigten, dass die Transfektionseffizienz stark abhängig ist vom Zellzyklusstadium der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion. Die Transfektion mit Lipo- oder Polyplexen während der S- oder G<sub>2</sub>-Phase führte zu einer Steigerung der Gentransfereffizienz verglichen mit der Transfektion in der G<sub>1</sub>-Phase. Während die gesteigerte Effizienz der Transfektion während der S- oder G<sub>2</sub>-Phase wahrscheinlich Resultat eines effizienten Eintritts der DNA in den Kern aufgrund der aufgelösten Kernmembran während der Mitose war, basierte die geringe Effizienz während der G<sub>1</sub>-Phase offensichtlich auf einer zu frühen Einschleusung der Komplexe in die Zelle mit der Folge, dass die Komplexe vor möglichem Eintritt in den Kern während der Mitose bereits abgebaut waren (Brunner et al., 2000). Tseng und Mitarbeiter (1999) beobachteten eine Steigerung der Gentransfereffizienz von Plasmid-DNA-Liposomen-Komplexen durch Transfektion während der späten G<sub>1</sub>-Phase im Vergleich zur G<sub>2</sub>/M-Phase. Auch sie postulierten die Steigerung der Effizienz als Resultat einer aufgelösten Kernmembran in der M-Phase, welche den Übertritt der Plasmid-DNA in den Kern ermöglicht. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien von Brunner et al. (2000) und Tseng et al. (1999) bezüglich des für einen effizienten Gentransfer geeigneten Zellzyklusstadiums sind offensichtlich Resultat verschiedener Zellkulturen sowie verschiedener Komplexbildner mit der Plasmid-DNA.

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung zeigte DNA-Dendrimer-Komplexe an der Kernmembran, wobei sich die Kernmembran in diesem Bereich nicht klar abzeichnete. Während die Kernmembran sonst bis auf in unregelmäßigen Abschnitten ausgebildete Kernporen kontinuierlich deutlich ausgebildet war, schien sie in dem Bereich der adhären den Komplexe offensichtlich in Auflösung begriffen. Ob diese Desintegration nun im Zusammenhang mit einer Mitose steht oder ob das Transfektionsreagenz *SuperFect* möglicherweise einen Mechanismus zur lokalen Auflösung der Kernmembran besitzt, kann mit letzter Sicherheit nicht geklärt werden. Die Wahrscheinlichkeit, eine mitosebedingte Desintegration der Kernmembran nur im Bereich der Vesikel zu finden bei sonst regelrecht ausgebildeter Kernmembran, ist relativ gering. Der fehlende Nachweis einer Transgenexpression in murinen Endothelzellen im *Stadium 3 der angiogenen Kaskade* deutet jedoch auf einen zellzyklusabhängigen Eintritt der Komplexe in den Kern hin. Während beispielsweise der liposomale Gentransfer von der Proliferationsrate der zu transfizierenden Zellen abhängig ist (Brisson und Huang, 1999; Zabner et al., 1995), scheint die Auflösung der Kernmembran für den Polyethylenimin-vermittelten Gentransfer keine Voraussetzung zu sein (Pollard et al., 1998).

Über die Mechanismen des Eintritts der DNA in den Kern bei der Polyfektion mittels Dendrimern liegen keine Studien vor.

Die in dieser Studie beobachtete Lokalisation von zytoplasmatischen DNA-Dendrimer-Komplexen an der Kernmembran spricht dafür, dass die Dissoziation der DNA aus dem Komplex entweder direkt vor Eintritt in den Kern oder erst im Kern erfolgt. Während beispielsweise die direkte Injektion von DNA-Lipid-Komplexen in den Zellkern zu keiner Expression des Transgens führte (Pollard et al., 1998; Zabner et al., 1995), konnte nach Injektion von DNA-Polymer-Komplexen (Polyethylenimin, Polylysin) eine Expression des Transgens nachgewiesen werden (Pollard et al., 1998). Dies spricht dafür, dass im Gegensatz zu DNA-Lipid-Komplexen eine Dissoziation der DNA aus Komplexen mit Polymeren im Kern stattfinden kann. Denkbar wäre auch eine Freisetzung der DNA aus dem Komplex unmittelbar beim Eintritt in den Kern infolge einer Konkurrenz der sich auflösenden anionischen Kernmembran mit der DNA um die Dendrimer-Bindung.<sup>4</sup>

Die murinen Endothelzellen zeigten nach der Transfektion ähnliche morphologische Veränderungen wie die humanen Endothelzellen während der Transfektion. Es konnten zahlreiche Vesikel im Zytoplasma ohne Assoziation zu Golgi-Feldern beobachtet werden. Auch an der Kernmembran zeigten sich Vesikel, wobei die Kernmembran analog zu transfizierten humanen Endothelzellen eine Desintegration zeigte. Multivesikuläre Körper oder sekundäre Lysosomen konnten auch nach der Transfektion nicht nachgewiesen werden. Dies indiziert, dass der Abbau der aufgenommenen DNA-Dendrimer-Komplexe in den murinen Endothelzellen langsamer als in den humanen Endothelzellen erfolgt. Hierfür spricht auch die höhere Expression der Luciferase bei vergleichbaren Transfektionsparametern im Vergleich zum humanen Zellkulturmodell. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass auch in den murinen Endothelzellen Abbauvorgänge der transfizierten DNA-Dendrimer-Komplexe zu einem früheren Zeitpunkt erfolgten, welche transmissionselektronenmikroskopisch nicht erfasst wurden.

Es ist bekannt, dass abhängig vom eingesetzten Transfektionsreagenz bzw. Zelltyp unterschiedliche Barrieren den Gentransfer des jeweiligen Systems limitieren. Für die in dieser Arbeit durchgeführte Dendrimer-vermittelte Polyfektion sind Aufnahme der Komplexe in die Endothelzellen sowie Eintritt der Komplexe bzw. Plasmid-DNA in den Kern wichtige limitierende Schritte, da diese Prozesse offensichtlich zellzyklusabhängig erfolgten.

---

<sup>4</sup> <http://www.columbia.edu/~jlt32/Dendrimer.pdf>

## 6.2.2 Optimierung der Transfektion muriner und humaner Endothelzellen

Mikrovaskuläre Endothelzellen und insbesondere humane reagieren sehr empfindlich auf eine Veränderung ihrer Umgebung und lassen sich deshalb beispielsweise mit klassischen Methoden wie der Diethylaminoether (DEAE)-Dextran- oder Calciumphosphatmethode nur ineffizient transfizieren (Schwachtgen et al., 1994; Teifel et al., 1997). Aufgrund einer bestehenden großen Variabilität zwischen verschiedenen Zelltypen muss ein Transfektionsprotokoll für jeden Zelltyp optimiert werden (Kotnis et al., 1995; Teifel et al., 1997). Aus diesem Grund erfolgte in Vorversuchen eine Optimierung der Plasmid-DNA-Konzentration pro Kulturschale, der Inkubationszeit der Endothelzellen mit dem Transfektionskomplex sowie der Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte. Als Transfektionsmethode wurde die Polyfektion mittels Dendrimeren gewählt und das kommerziell erhältliche, auf aktivierten Dendrimer-Molekülen basierende Reagenz *SuperFect* eingesetzt. Da Dendrimere eine nahezu exakt definierte Struktur besitzen (Bosman et al., 1999), verspricht ihr Einsatz eine stabile Komplexbildung mit der DNA sowie reproduzierbare Transfektionsergebnisse. Dendrimere, insbesondere aktivierte Dendrimere, sollen das Entkommen der Komplexe aus den Endosomen begünstigen (Haensler und Szoka, 1993; Tang et al., 1996) sowie möglicherweise eine funktionelle Rolle bei der Dissoziation der DNA aus dem Komplex spielen.<sup>5</sup> Darüber hinaus zeichnen sie sich im Vergleich zu effektiven lipid-basierten Systemen durch eine deutlich geringere Toxizität aus (Tang et al., 1996). Aufgrund dieser Tatsache schien die Polyfektion mittels *SuperFect* zur Transfektion der Endothelzellen *in vitro* geeignet.

Ein besonders wichtiger Aspekt, der bei der Optimierung einer Transfektionsmethode an einer Zelllinie Berücksichtigung finden muss, ist der Status der Proliferation der Zielzellen. Die meisten Gentransfersysteme sind trotz hoher Effizienzen *in vitro* relativ ineffizient bei der Applikation *in vivo*. Ein wichtiger Grund ist, dass in einem intakten Gewebe die meisten Zellen nicht proliferieren, sondern sich in einem ruhenden Zustand befinden (Pelisek et al., 2002). Um vergleichbare Gentransfereffizienzen *in vivo* zu erzielen, sollte die Optimierung also *in vitro* an ruhenden Zellen durchgeführt werden, wenn diese Zellen *in vivo* ebenfalls in diesem Zustand vorliegen. Pelisek und Mitarbeiter (2002) konnten mittels kationischer Lipid-vermittelter Transfektion auf diese Weise 2- bis 5-fach höhere Transfektionseffizienzen *in vivo* erzielen durch Optimierung der entscheidenden Parameter an ruhenden Zellen *in vitro*.

Im adulten Organismus ist die Teilungsrate von Endothelzellen äußerst niedrig. Für Endothelzellen aus verschiedenen Geweben werden Turnover-Raten von  $1 \times 10^2$  bis  $1 \times 10^4$  Tagen angegeben (Denekamp, 1984). Unter bestimmten physiologischen (z.B. während zyklischer Prozesse im weiblichen Reproduktionstrakt) oder pathologischen (z.B. beim Tumorwachs-

---

<sup>5</sup> <http://www.columbia.edu/~jlt32/Dendrimer.pdf>

tum) Bedingungen kann das Endothel jedoch wieder aktiviert werden und es kommt zur Angiogenese. Im Rahmen der Behandlung verschiedener Erkrankungen, z.B. Tumorerkrankungen, repräsentiert das aktivierte Endothel ein attraktives Ziel für gentherapeutische Strategien. In Übereinstimmung erfolgten die Optimierungsversuche in dieser Arbeit an proliferierenden Endothelzellen (*Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro*).

Die Ergebnisse der Optimierungsversuche an murinen und humanen Endothelzellen zeigten Unterschiede in einzelnen Parametern, was die Notwendigkeit einer Spezies-spezifischen Optimierung der Versuchsbedingungen sowie die höhere Sensibilität humaner Endothelzellen widerspiegelt (s. Tab. 19). So konnte zur Transfektion muriner Endothelzellen die doppelte Plasmid-DNA- bzw. *SuperFect*-Konzentration eingesetzt werden ohne mikroskopisch sichtbare Zellschäden zu verursachen.

Einen Unterschied zeigten auch die Ergebnisse der Optimierung der Inkubationszeit der Endothelzellen nach der Transfektion bis zur Zellernte. Während im humanen Zellkulturmodell alle untersuchten Vektoren (pJWM115, pCK5, pPS12, pPS6) eine Abnahme in ihrer Aktivität bei Erhöhung der Inkubationszeit um 6 Stunden zeigten, waren im murinen Zellkulturmodell Unterschiede zwischen den Vektoren zu verzeichnen. Beispielsweise zeigten die Plasmide pCK5 (Ets-1l-luc) und pPS12 (Ets-1k-luc) Unterschiede bei der Wahl des optimalen Zeitpunktes zur Auswertung des Luciferase-Assays (s. Tab. 19).

Transfektionsparameter	MHEC5	HDMEC
Plasmid-DNA-Konzentration pro Kulturschale	2 µg	1 µg
<i>SuperFect</i> -Konzentration pro Kulturschale	2 µl	1 µl
Inkubationszeit mit dem Transfektionskomplex	2 h	2 h
Inkubationszeit nach der Transfektion bis zur Zellernte	pJWM115 (CMV-luc): 24 h pCK5 (Ets-1l-luc): 24 h pPS12 (Ets-1k-luc): 30 h pPS6 (E-sel-luc): 30 h	pJWM115 (CMV-luc): 24 h pCK5 (Ets-1l-luc): 24 h pPS12 (Ets-1k-luc): 24 h pPS6 (E-sel-luc): 24 h

**Tab. 19: Vergleich der ermittelten Transfektionsparameter im Rahmen der Optimierungsversuche im murinen (MHEC5) und humanen (HDMEC) Zellkulturmodell**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die ermittelten Transfektionsparameter bei Einsatz des gleichen Transfektionsreagenzes (*SuperFect*) eine Orientierung bieten können, aber nur bedingt auf andere endotheliale Zelllinien übertragbar sind.

### 6.2.3 Schwankungen der Transfektionseffizienz und mögliche Ursachen

Die Ergebnisse der Transfektionen, insbesondere die der durchgeführten Pilotstudie im murinen Zellkulturmodell, zeigten Schwankungen der Luciferase-Aktivität und verdeutlichten, dass auch kultivierungsbedingte Parameter die Transfektionseffizienz erheblich beeinflussen können. Insgesamt zeigte die Pilotstudie niedrigere RLU-Messwerte im Vergleich zu den Optimierungsversuchen im murinen Zellkulturmodell. Eine mögliche Erklärung für Schwankungen der RLU-Messwerte sind Differenzen in der Anzahl der Zellen, die für den Luciferase-Assay eingesetzt wurden. Um die Relevanz dieser möglichen Fehlerquelle abschätzen zu können, wurde die Proteinkonzentration in den Zelllysaten mit der Methode nach Pierce als Maßstab für die Zellzahl bestimmt. Es ergaben sich deutlich Differenzen der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten eines Versuchs. Eine eindeutige Korrelation hoher Luciferase-Werte mit hohen Proteinkonzentrationen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die ermittelten Unterschiede der Proteinkonzentration in den Zelllysaten trotz Einsatzes konstanter Zellzahlen zur Transfektion verdeutlichten die Notwendigkeit einer Standardisierung der RLU-Messwerte, welche in den nachfolgenden Versuchen mittels der Proteinbestimmung der Zellysate durchgeführt wurde. Nur so konnten die Ergebnisse innerhalb eines Versuches miteinander verglichen und beurteilt werden. Eine versuchsübergreifende Beurteilung ist allgemein schwierig, da die Reporterexpression zwischen Transfektionsexperimenten, durchgeführt an verschiedenen Tagen, um den Faktor 10 variieren kann (Hollon und Yoshimura, 1989).

Durch Prüfung von kultivierungsbedingten Unterschieden zwischen den durchgeführten Versuchen wurden die Schwankungen zwischen den Messungen analysiert. Die nachfolgend aufgeführten Parameter haben Einfluss auf das Kulturverhalten der Zellen.

➤ Kultivierungszeiten der Endothelzellen vor der Subkultivierung für die Transfektion:

Die für die Transfektion eingesetzten Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* befanden sich vor der Subkultivierung für die Transfektion unterschiedlich lange Zeit in vollständiger Konfluenz in Kultur. Bei zu hoher Dichte der Zellkultur sinkt die Proliferationsrate stark ab (Lindl, 2002). Im Hinblick auf einen Gentransfer kann eine Proliferation der Zellen je nach verwendetem Gentransfersystem die Aufnahme der Komplexe in die Zellen (Fasbender et al., 1997; Thurston et al., 1998) sowie den Eintritt der Komplexe bzw. DNA in den Kern (Brunner et al., 2000; Fasbender et al., 1997; Tseng et al., 1999) begünstigen. Mit regelmäßiger Passagierung der Zellen können also höhere Effizienzen erzielt werden, sofern eine Zellzyklusabhängigkeit des verwendeten Gentransfersystems besteht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, dass die Transfektionseffizienz durch Reduktion der Kultivierungsdauer der Zellen vor der Subkultivierung für die Trans-

fektion gesteigert werden konnte. Dies zeigt deutlich, dass die Proliferationsrate der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion eine entscheidende Voraussetzung für einen effizienten Gentransfer in diesem System war.

➤ Zellpassage und Kultivierungszeiten der Endothelzellen:

Endothelzellen können nicht unbegrenzte Zeit kultiviert und passagiert werden, ihre Verwendbarkeit für Versuche wird durch die Alterung der Zellen *in vitro* bestimmt (Plendl, 1997). Es gibt jedoch auch Zellen, die durch eine spontane Veränderung des Genoms unbegrenztes Wachstum *in vitro* zeigen. Verbunden mit einer Alterung der Endothelzellen in Kultur ist eine verminderte Proliferation der Zellen (Del Vecchio und Smith, 1982; Plendl, 1997). Es liegt also nahe, möglichst Endothelzellen früher Passagen zu transfizieren. Ein direkter Vergleich der Zellpassage ist dennoch schwierig, da oftmals nicht zu ermitteln ist, wie lange die Zellen in vorherigen Passagen in Kultur gehalten wurden. Insbesondere in Endothelzellkulturen ist dies schwierig, da die Zellen lange Zeit im konfluenten Zustand *in vitro* ohne Absterben verbleiben können und die in dieser Arbeit eingesetzten Endothelzellen zum Zwecke der *in vitro*-Angiogenese sogar mehrere Monate in Kultur gehalten wurden. Zellen einer späteren Passage, die durch regelmäßiges Ausdünnen innerhalb kurzer Zeit zu dieser Passage gelangt sind, könnten also möglicherweise ein höheres Proliferationspotential aufweisen als Zellen einer früheren Passage, die lange Zeit ohne Passagierung in Kultur gehalten wurden. Die Optimierungsversuche im murinen Zellkulturmodell zeigten beispielsweise trotz höherer Passage der transfizierten Endothelzellen höhere Luciferaseaktivitäten als die Versuche der Pilotstudie. Doch selbst wenn die Zellen zuvor aufgetaut werden und bei gleicher Aussaatdichte eine identische Kultivierungszeit vor der Subkultivierung für die Transfektion eingehalten wird, sind frühere Kultivierungszeiten sowie Auftau- und Einfriervorgänge zu berücksichtigen. Praktisch ist es also nur möglich, die zu transfizierenden Zellen unter standardisierten Bedingungen zu kultivieren, wenn diese unmittelbar zuvor isoliert werden. Ansonsten können immer kultivierungsbedingt Schwankungen in der Effizienz des Gentransfers auftreten.

➤ Aussaat der Endothelzellen für die Transfektion:

Aussaatdichte und Zeitpunkt der Aussaat der Endothelzellen für die Transfektion waren weitere wichtige Parameter, die berücksichtigt werden mussten. Es zeigten sich sowohl geringere Effizienzen des Gentransfers bei zu hoher bzw. zu geringer Aussaatdichte der Endothelzellen sowie bei zu früher bzw. zu später Aussaat vor der Transfektion, basierend auf einer resultierenden zu geringen Proliferation der Endothelzellen zum Zeitpunkt der Transfektion. Trotz Standardisierung dieser Parameter stellte sich heraus, dass die Endothelzellen dennoch zum Zeitpunkt der Transfektion bzw. Zellernte in morphologisch erkennbaren unterschiedlichen Dichten in Kultur vorlagen. Mögliche Differenzen in der Anzahl an Zellen wur-

den durch die durchgeführte Normierung der RLU-Werte auf den Proteingehalt der Zellysate standardisiert.

#### **6.2.4 Transfektion muriner und humaner Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro***

Durch den Einsatz von Endothelzell-spezifischen bzw. Angiogenese-spezifischen genregulatorischen Elementen kann eine Zelltyp-spezifische Expression des Transgens erzielt werden. Diese ist beispielsweise im Rahmen der gentherapeutischen Anti-Angiogenese zur Behandlung von Tumorerkrankungen sinnvoll, um sicherzustellen, dass das eingeschleuste Transgen, welches beispielsweise für ein stark toxisches Protein kodiert, nur von angiogenen Endothelzellen des Tumors exprimiert wird.

In dieser Arbeit wurden Vektoren mit verschiedenen Endothelzell-spezifischen Promotoren (Ets-1l, Ets-1k, E-sel) *in vitro* auf ihre Effizienz im murinen und humanen Zellkulturmodell untersucht. Es sollte eine Aussage darüber gemacht werden, mit welchem Promotor das Transgen, in diesem Fall das Reporter-gen Luciferase, dessen Aktivität in Zellextrakten mittels einer Biolumineszenzreaktion nachweisbar war, in den etablierten Zellkulturmodellen am effizientesten exprimiert werden kann.

Die Transfektion muriner und humaner Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* führte mit allen eingesetzten Vektoren zur Expression der Luciferase. Hieraus ist zu schließen, dass sowohl das Adhäsionsmolekül E-Selektin als auch der Transkriptionsfaktor Ets-1 in den hier eingesetzten proliferierenden murinen und humanen Endothelzellen exprimiert werden. Dieses Ergebnis korreliert mit dem anderer *in vitro*- und *in vivo*-Studien. Kräling und Mitarbeiter (1996) konnten *in vivo* einen Zusammenhang zwischen der E-Selektin-Expression und der endothelialen Zellproliferation in humanen Hämangiomen feststellen. Diese Aussage wurde von Bischoff und Mitarbeitern (1997) für *in vitro* kultivierte bovine mikrovaskuläre Endothelzellen bestätigt. Die Expression von Ets-1 ist während der Angiogenese *in vivo* im Rahmen physiologischer und pathologischer Vorgänge deutlich erhöht (Wernert et al., 1992) und wird nach Abschluss der Angiogenese herunterreguliert (Bolton et al., 1995; Kola et al., 1993; Maroulakou et al., 1994). In Übereinstimmung wurde eine hohe Ets-1 mRNA-Expression in proliferierenden (Wernert et al., 1992) und migrierenden (Tanaka et al., 1998) Endothelzellen *in vitro* nachgewiesen, jedoch nicht in ruhenden Endothelzellen (Wernert et al., 1992).

Für die Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Modelle bedeutet dies, dass das *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* das Äquivalent zum Stadium der Proliferation zu Beginn der Wachstumsphase der *in vivo*-Angiogenese darstellt.

Der Vergleich der Reporterogenaktivität nach Transfektion muriner und humaner Endothelzellen, unabhängig vom eingesetzten Vektor, verdeutlicht, dass sich murine Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro* effizienter transfizieren lassen. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und könnten sowohl auf Ebene des Transfers der DNA in den Zellkern als auch auf Transkriptionsebene liegen. Aufgrund der morphologisch erkennbaren höheren Dichte muriner Endothelzellen zum Zeitpunkt der Zellernte bei geringerer Aussaatdichte im Vergleich zu humanen Endothelzellen in Verbindung mit dem indizierten langsameren intrazellulären Abbau der Komplexe (s. Kap. 6.2.1.2) ist zu vermuten, dass ein höherer Anteil der transfizierten Plasmid-DNA den Kern erreicht.

Insgesamt wurden in allen Transfektionsversuchen erwartungsgemäß mit dem pJWM115-Vektor (CMV-luc) die höchsten Effizienzen erzielt. Dabei waren die Differenzen zwischen den Aktivitäten der Endothelzell-spezifischen und dem konstitutiven CMV-Promotor im humanen Zellkulturmodell im Vergleich zum murinen deutlich größer trotz Transfektion proliferierender und zusätzlich zytokin-aktiverter Endothelzellen. Verschiedene Studien zeigten, dass eine Stimulierung von Endothelzellen mit pro-angiogenen Faktoren (z.B. VEGF, FGF-2, TNF- $\alpha$ ) zu einer Expression von Ets-1 (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996; Sato et al., 2000; Wernert et al., 1992) und E-Selektin (Aoki et al., 2001; Bevilacqua et al., 1989; Bischoff et al., 1997) führt. Bischoff und Mitarbeiter beispielsweise konnten die E-Selektin-Expression in proliferierenden Endothelzellen *in vitro* durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  steigern, während auch in konfluenten HUVEC-Kulturen eine VEGF- bzw. TNF- $\alpha$ -induzierte Expression von Ets-1 nachgewiesen werden konnte (Sato et al., 2000; Wernert et al., 1992). Boyle und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass die E-Selektin-Expression auf Ebene der Transkription reguliert wird. Durch Verlust einer Protein-DNA-Interaktion an nur einer von drei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im E-sel-Promotor wird die zytokin-induzierte Hochregulation der Expression beendet (Boyle et al., 1999). Becker-André et al. (1992) konnten in Reporterstudien auch eine zytokin-induzierte Aktivierung des murinen E-sel-Promotors trotz fehlender Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im Promotor beobachten, wenn auch in schwächerer Form verglichen mit dem humanen E-sel-Promotor. Walton und Mitarbeiter (1998) transfizierten humane Endothelzellen mit einem adenoviralen Luciferasekonstrukt unter der Kontrolle des E-sel-Promotors und beobachteten eine 30-fache Steigerung der Luciferase-Expression nach Inkubation transfizierter Zellen in TNF- $\alpha$  im Vergleich zu unbehandelten transfizierten Zellen. Auch die Kultivierung der Endothelzellen in tumorkonditioniertem Medium resultierte in einer ähnlich hohen Induktion der Luciferaseexpression (Walton et al., 1998). Da über die Konzentrationen der pro-angiogenen Faktoren im Wachstumsmedium EGM-2 MV keine Angaben vorliegen, müssten weitere Versuche

durch Inkubation der transfizierten humanen Endothelzellen in beispielsweise TNF- $\alpha$  zeigen, ob die beobachtete Aktivität des E-sel- bzw. Ets-1-Promotors noch zu steigern ist bzw. bereits in gesteigerter Form vorlag. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, die Zellen an ein Erhaltungsmedium ohne pro-angiogene Faktoren in Kultur zu adaptieren und die Transfektionen in diesem Medium durchzuführen.

Insgesamt indizieren die Ergebnisse, dass die murinen Endothelzellen *in vitro* eine höhere Expression von Ets-1 und E-Selektin als die humanen Endothelzellen zeigen.

In dieser Studie wurden in beiden Zellkulturmodellen mit den Vektoren pCK5 (Ets-1l-luc) und pPS12 (Ets-1k-luc) höhere Expressionsraten der Luciferase erzielt als mit dem pPS6-Vektor (E-sel-luc), wobei eine genaue Differenzierung zwischen den Vektoren pCK5 und pPS12 nur im humanen Modell möglich war aufgrund von Schwankungen nach Transfektionen muriner Endothelzellen mit dem pCK5-Vektor. Im humanen Zellkulturmodell war das Plasmid pCK5 deutlich effizienter als der pPS12-Vektor. Des Weiteren waren die Differenzen zwischen den Transfektionseffizienzen im Vergleich von pCK5 und pPS12 zum pPS6-Vektor im humanen Modell größer (s. Tab. 20).

Vektor	MHEC5 Median [RLU/mg Protein]	HDMEC Median [RLU/mg Protein]
pJWM115 (CMV-luc)	15,38x10 <sup>8</sup>	4,17x10 <sup>8</sup>
pCK5 (Ets-1l-luc)	4,41x10 <sup>8</sup>	12,11x10 <sup>6</sup>
pPS12 (Ets-1k-luc)	3,47x10 <sup>8</sup>	2,35x10 <sup>6</sup>
pPS6 (E-sel-luc)	1,84x10 <sup>8</sup>	1,17x10 <sup>6</sup>

**Tab. 20: Vergleich der Aktivitäten der untersuchten Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren nach Transfektion muriner (MHEC5) und humaner (HDMEC) Endothelzellen im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro***

Angegeben ist jeweils der Median der Mediane der 3 unabhängigen Experimente.

### 6.2.5 Transfektion muriner und humaner Endothelzellen im *Stadium 3* bzw. *4* der angiogenen Kaskade *in vitro*

In dieser Studie wurden murine und humane Endothelzellen im Stadium der Bildung kapillarähnlicher Strukturen mit den verschiedenen Vektoren (pJWM115, pCK5, pPS12, pPS6) transfiziert. Während murine Endothelzellen für die Versuche bis zum *Stadium 3* der angiogenen Kaskade *in vitro* kultiviert wurden, erfolgten die Versuche in der humanen Zellkultur aufgrund des etablierten dreidimensionalen Modells der Angiogenese im *Stadium 4*.

Die Ergebnisse spiegeln die angiogene Potenz beider Angiogenese-Modelle wider. Die Transfektion muriner Endothelzellen führte entsprechend dem offensichtlich fehlenden Remodeling bestehender kapillarähnlicher Strukturen, welche sich mikroskopisch als „ruhend“ darstellten, zu keiner Expression der Luciferase, unabhängig vom eingesetzten Vektor (s. Tab. 21). Es liegt nahe, dass dies Resultat der fehlenden bzw. zu geringen Proliferation der Endothelzellen war, welche eine zu geringe Aufnahme der Komplexe in die Zellen sowie einen intrazellulären Abbau dieser durch Nukleasen aufgrund fehlender Permeabilität der Kernmembran zur Folge hat. Diese Annahme wurde durch ein eindeutig positives Ergebnis nach Transfektion mit dem pJWM115-Vektor (Messung 2) nach Ablösen einiger Zellen bzw. kapillarähnlicher Strukturen durch äußere Manipulation (Waschprozess mit PBS-Puffer) von der Kulturschale bestärkt.

Im Gegensatz zum murinen Modell erfolgte die Transfektion humaner Endothelzellen im *Stadium 4* der angiogenen Kaskade. Es wurde eine geringe Expression der Luciferase im Vergleich zu den als Kontrollen mitgeführten Endothelzellen detektiert (s. Tab. 21). Dies war offensichtlich Resultat des dynamischen, dreidimensionalen Wachstums der humanen Endothelzellen bzw. des Remodelings bestehender dreidimensionaler Netzwerke aus kapillarähnlichen Strukturen. Dabei konnte ein wichtiger Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen festgestellt werden. Humane Endothelzellen, die zu Beginn des *Stadiums 4* in die Transfektionsexperimente einbezogen wurden, zeigten eine höhere Expression der Luciferase als Endothelzellen, die zu späteren Zeitpunkten des *Stadiums 4* transfiziert wurden. Auch dieses ist durch eine unterschiedliche Proliferationsrate der Endothelzellen zu verstehen. Zu Beginn des *Stadiums 4* befinden sich die kapillarähnlichen Strukturen in mehreren Ebenen noch im Aufbau. Verbunden hiermit ist eine relativ starke Proliferation der Endothelzellen durch das Wachstum in mehreren Ebenen. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer, also bereits bestehenden kapillarähnlichen Netzwerkformationen in mehreren Ebenen, findet ein Umbau (Remodeling) dieser Strukturen statt. Dieses Remodeling ist ebenfalls mit einer Proliferation der Endothelzellen verbunden, aber bezogen auf die Gesamtheit der Zellen in einem geringeren Ausmaß als beim Aufbau der Strukturen.

Auch Meng (2002) konnte in ihrer Dissertationsarbeit in Abhängigkeit von der angiogenen Potenz der Endothelzellen *in vitro* eine unterschiedliche Transgenexpression beobachten. Sie transfizierte bovine Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Anbildung und Rückbildung im Stadium der kapillarähnlichen Strangbildung. Die Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Rückbildung, welche eine höhere angiogene Aktivität in Kultur aufwiesen, zeigten eine höhere Transgenexpression als die Endothelzellen aus dem Corpus luteum in Anbildung. Thurston und Mitarbeiter (1998) konnten *in vivo* eine gesteigerte Aufnahme von kationischen Liposomen-DNA-Komplexen von angiogenen Endothelzellen in Tumoren sowie chronisch entzündetem Gewebe im Vergleich zu Gefäßen im gesunden Gewebe beobachten (Thurston et al., 1998).

Vektor	MHEC5		HDMEC	
	Maximum [RLU]	Minimum [RLU]	Maximum [RLU]	Minimum [RLU]
pJWM115 (CMV-luc)	42.507	52	534.679	40.002
pCK5 (Ets-1l-luc)	238	53	7.532	218
pPS12 (Ets-1k-luc)	447	62	5.783	79
pPS6 (E-sel-luc)	123	53	1.904	100
Kontrollen	595	5	134	53

**Tab. 21: Vergleich der Aktivitäten der untersuchten Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren nach Transfektion muriner Endothelzellen (MHEC5) im Stadium 3 und humaner Endothelzellen (HDMEC) im Stadium 4 der angiogenen Kaskade *in vitro***

Angegeben ist jeweils der Maximal- bzw. Minimalwert der 3 unabhängigen Experimente (n = 12 bzw. Kontrollen: n = 6).

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen eindrücklich, dass der Erfolg bzw. die Effizienz dieses Gentransfersystem von der Proliferation der Endothelzellen abhängig ist. Übertragen auf einen *in vivo*-Gentransfer, in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der *in vivo*-Studie von Thurston und Mitarbeitern (1998), bedeutet dies, dass nur aktivierte Endothelzellen, also beispielsweise Tumorendothelien, erfolgreich zu transfizieren wären, während Nebenwirkungen auf das ruhende Endothel unwahrscheinlich sind. Mögliche Auswirkungen des Gentransfers auf das ruhende Endothel könnten zudem minimiert werden durch Einsatz von regulatorischen Elementen solcher Gene, die ausschließlich während der Angiogenese, also nur von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden (z.B. Ets-1).

Die Analyse der Aktivitäten der untersuchten Vektoren im humanen Zellkulturmodell im *Stadium 4 der angiogenen Kaskade* ergab ein ähnliches Ergebnis wie nach Transfektion humaner Endothelzellen im *Stadium 0*. Mit den Plasmiden pCK5 (Ets-1luc) und pPS12 (Ets-1k-luc) wurden höhere Expressionsraten der Luciferase erzielt als mit dem pPS6-Vektor (E-sel-luc), wobei eine genaue Differenzierung zwischen den Vektoren pCK5 und pPS12 aufgrund großer Schwankungen der Ergebnisse nicht möglich war. Insgesamt waren die Unterschiede der Transfektionseffizienzen der Vektoren mit Endothelzell-spezifischen Promotoren (pCK5, pPS12, pPS6) zum pJWM115-Vektor (CMV-luc) noch größer als im *Stadium 0*, während nur geringe Unterschiede zwischen den Vektoren mit Endothelzell-spezifischen Promotoren zu verzeichnen waren. Ob dies nun Resultat einer möglicherweise geringeren Expression von E-Selektin und Ets-1 in diesem Stadium im Vergleich zum *Stadium 0* ist, kann nur durch Genexpressionsanalysen oder mittels Immunhistochemie geklärt werden.

Meng (2002) erzielte bei gleicher Plasmid-DNA-Konzentration pro Kulturschale höhere Luciferase-Expressionsraten mit allen Promotoren (CMV, Ets-1, E-sel) nach Transfektion angiogener boviner Endothelzellen sowohl aus dem Corpus luteum in Rückbildung als auch aus dem Corpus luteum in Anbildung. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist jedoch insofern schwierig, da es sich in der Studie von Meng (2002) um bovine Endothelzellen sowie insbesondere um eine andere Transfektionsmethode (kationische Liposomen) handelte, mit welcher beispielsweise eine längere Inkubation der Endothelzellen in dem Transfektionsmix ohne mikroskopisch sichtbare Anzeichen einer Zellschädigung möglich war.

### **6.2.6 Steigerung bzw. Reduktion der Aktivität des E-Selektin-Promotors durch zusätzliche Enhancer-/Intron-Sequenzen**

In dieser Studie wurde die Steigerung der murinen E-sel-Promotoraktivität durch zwei murine Endothelzell-spezifische Enhancer sowie durch das humane HLA-Intron untersucht. Die Versuche erfolgten an proliferierenden Endothelzellen im *Stadium 0 der angiogenen Kaskade in vitro*.

Die Aktivität des E-sel-Promotors ließ sich durch das HLA-Intron steigern, wobei eine höhere Steigerung im humanen Zellkulturmodell zu verzeichnen war (s. Tab. 22). Dies ist möglicherweise Resultat der Spezies-Spezifität des Genelements. Introns sind für die Funktionalität bestimmter Gene essentiell und können zur Regulation der Genexpression sowie zur Stabilisierung der RNA beitragen. Auf Introns können sich beispielsweise Enhancer-Sequenzen befinden wie beim Flk-1-Gen (Kappel et al., 1999), die die Transkription positiv beeinflussen.

<b>Vektor</b>	<b>MHEC5</b> Median [RLU/mg Protein]	<b>HDMEC</b> Median [RLU/mg Protein]
pPS6 (E-sel-luc)	1,74x10 <sup>8</sup>	4,44x10 <sup>6</sup>
pPO18 (5xebs-E-sel-luc)	0,19x10 <sup>8</sup>	0,30x10 <sup>6</sup>
pPO14 (E-sel-luc-flk-1)	0,23x10 <sup>8</sup>	1,35x10 <sup>6</sup>
pPO12 (E-sel-HLA-luc)	6,84x10 <sup>8</sup>	18,80x10 <sup>6</sup>

**Tab. 22: Vergleich der Aktivitäten der untersuchten Vektoren mit zusätzlichen Enhancer-/Intron-Sequenzen nach Transfektion muriner (MHEC5) und humaner (HDMEC) Endothelzellen im Stadium 0 der angiogenen Kaskade *in vitro***

Angegeben ist jeweils der Median der Mediane der 4 (MHEC5) bzw. 3 (HDMEC) unabhängigen Experimente.

Im Gegensatz zum HLA-Intron konnte die E-sel-Promotoraktivität durch die Endothelzell-spezifischen Enhancer nicht gesteigert werden. In beiden untersuchten Zellkulturmodellen wurde eine stärkere Reduktion der Promotoraktivität durch den 5xebs-Enhancer beobachtet. Während ebs eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie darstellt, können an den Flk-1-Enhancer Transkriptionsfaktoren der Ets-, GATA- und SCL/Tal-1-Familien binden (Kappel et al., 2000). Dies könnte die stärkere Reduktion der E-sel-Promotoraktivität durch den 5xebs-Enhancer erklären.

Da die Funktionsfähigkeit beider Enhancer durch Kotransfektion mit Plasmiden, die für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren kodieren, bestätigt wurde (Angaben der Bezugsfirma der Plasmide, Munich Biotech AG), deutet die Reduktion der E-sel-Promotoraktivität durch die beiden Enhancer darauf hin, dass die entsprechenden Transkriptionsfaktoren (z.B. Ets-1) in den untersuchten Zellkulturmodellen nicht in ausreichender Menge exprimiert werden. Möglicherweise fehlen auch andere mitspielende Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls für die Transkriptionsinitiation des Reportergens erforderlich sind. Eine höhere Expression der entscheidenden Transkriptionsfaktoren in späteren Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* ist nicht auszuschließen. Glienke und Mitarbeiter (2000) beispielsweise konnten unterschiedliche Genexpressionsmuster in proliferierenden und in kapillarähnliche Strukturen differenzierten mikrovaskulären humanen Endothelzellen feststellen. Da die Endothelzellen im Stadium der Bildung kapillarähnlicher Strukturen aber praktisch nicht transfizierbar sind, lässt sich hierüber keine Aussage treffen. Nur durch Expressionsanalysen der Faktoren oder mittels Immunhistochemie könnten eindeutige Aussagen über das Expressionsmuster der *in vitro* kultivierten murinen und humanen mikrovaskulären Endothelzellen gemacht werden.

### 6.3 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurden *in vitro*-Modelle der Angiogenese muriner und humaner mikrovaskulärer Endothelzellen für Transfektionsexperimente etabliert. In dem Bemühen, Tierversuche auf das unerlässliche Maß zu reduzieren, kommt den in der vorliegenden Arbeit etablierten Zellkulturmodellen als Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch eine besondere Bedeutung zu. Über den Tierschutzaspekt hinaus stellen die Modelle kostengünstige, sensitive, einfache experimentelle Systeme dar, die eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten. Das murine Zellkulturmodell bietet sich für Gentransferstudien an, da sich diese Endothelzellen effizient transfizieren lassen und darüber hinaus den Vorteil einer guten Vergleichbarkeit mit *in vivo*-Daten der Maus bieten. Mit dem in dieser Arbeit etablierten realitätsnahen, dreidimensionalen *in vitro*-Modell der Angiogenese humaner Endothelzellen steht erstmals ein experimentelles System zur Verfügung, welches auf die Verwendung dreidimensionaler Polymere verzichten kann. Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Endothelzellkulturen werden derzeit bereits in anderen Laboratorien zu ähnlichen Experimenten verwendet. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit sind eine Reihe weiterer Untersuchungen interessant und geplant.

Zur weiteren Charakterisierung des dreidimensionalen *in vitro*-Modells der Angiogenese humaner Endothelzellen könnte die Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum (über 5 Monate) klären, ob auch in diesem Modell analog zur murinen Kultur ein zweiter Zyklus der Angiogenese nach postulierter „Latenzzeit“ mit Differenzierung der Endothelzellen in einen angiogenen Phänotyp initiiert wird. Zur Identifizierung der in dieser Arbeit beobachteten aufgelagerten, rundlichen Strukturen über dem Zelllayer wäre die Charakterisierung weiterer Komponenten der Basalmembran ein Ansatzpunkt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Transfektion mikrovaskulärer Endothelzellen implizieren ein von der *in vivo*-Situation abweichendes Genexpressionsmuster, beispielsweise für den Transkriptionsfaktor Ets-1. Genexpressionsanalysen oder immunhistochemische Untersuchungen der Endothelzellen in unterschiedlichen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* könnten hierüber Aufschluss geben. Im Hinblick auf eine Steigerung der Gentransfereffizienz wäre die von Luo und Saltzman (2000a) beschriebene Erhöhung der „physikalischen Konzentration“ der DNA an der Zelloberfläche durch Einsatz von Nanopartikeln in den hier etablierten Modellen zu evaluieren. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, die humanen Endothelzellen an ein Erhaltungsmedium ohne pro-angiogene Faktoren in Kultur zu adaptieren und die Transfektionen in diesem Medium durchzuführen. Hierbei könnten Infor-

mationen über eine mögliche Steigerung der Expression der Ets-1- und E-Selektin-Gene durch pro-angiogene Faktoren gewonnen werden.

Noch immer gibt es nur ungenügende Erkenntnisse über den Transfer der DNA in den Zellkern der Zielzelle bei den verschiedenen Transfektionsmethoden. Während beispielsweise umfangreichere Studien über DNA-Lipid-Komplexe veröffentlicht wurden (Friend et al., 1996; Zabner et al., 1995), existieren kaum Informationen über einen Dendrimer-vermittelten Gentransfer. Es wäre von Bedeutung zu untersuchen, ob Dendrimere (*SuperFect*) eine funktionelle Rolle beim Kern-Targeting spielen. Durch Vergleich der Gentransfereffizienz nach Injektion von nackter Plasmid-DNA sowie mit dem Transfektionsreagenz komplexierter DNA ins Zytoplasma der Zellen könnte dies evaluiert werden. Nachdem in dieser Arbeit freie DNA-Dendrimer-Komplexe an der in Auflösung begriffenen Kernmembran demonstriert werden konnten, wäre nun näher zu untersuchen, ob *SuperFect* einen Mechanismus zur lokalen Auflösung der Kernmembran besitzt. Dies könnte durch Injektion der Komplexe ins Zytoplasma nicht proliferierender Zellen und Bestimmung der Transgenexpression erfolgen. Darüber hinaus könnte durch Injektion von nackter bzw. komplexierter DNA in den Zellkern gezeigt werden, ob eine Dissoziation der DNA aus dem Komplex mit den Dendrimeren im Kern überhaupt möglich ist, wie es für andere Polymere gezeigt wurde (Pollard et al., 1998).

Die Markierung der DNA mit Gold oder anderen Markern und anschließende transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung transfizierter Endothelzellen könnten gesicherte Informationen über den Transfer der DNA in den Zellkern liefern. In diesem Zusammenhang wäre es auch sinnvoll, Organellen wie beispielsweise Lysosomen durch Nachweis ihrer enthaltenden Enzyme darzustellen, wie es von Zabner und Mitarbeitern (1995) publiziert wurde.