

7 Zusammenfassung

Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, kommt physiologischerweise nur im Embryo und Fetus sowie beim Adulten im Rahmen zyklischer Prozesse im Ovar, in der Plazenta und bei der Entwicklung der Milchdrüse vor (Risau, 1997). Alle anderen Formen der Angiogenese sind mit pathologischen Prozessen, insbesondere dem Tumorwachstum, verbunden. Eine hoffnungsvolle und Erfolg versprechende Alternative zu bisherigen Strategien der Tumortherapie ist die gentherapeutische Anti-Angiogenese. Eine selektive Expression des Transgens von Endothelzellen kann dabei durch Einsatz von Endothelzell-spezifischen genregulatorischen Elementen erzielt werden. Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Hauptziele, nämlich die Etablierung und Charakterisierung von *in vitro*-Modellen der Angiogenese muriner und humaner mikrovaskulärer Endothelzellen sowie die Charakterisierung verschiedener Plasmidkonstrukte auf Effizienz in diesen Modellen. Im Rahmen der Transfektionsversuche sollten zusätzlich morphologische Veränderungen transfizierter Endothelzellen auf licht- und elektronenmikroskopischer Basis untersucht werden, um einerseits Aussagen über die Aufnahme der Transfektionskomplexe in die Zellen sowie deren Weg in den Zellkern zu machen und andererseits mögliche morphologische Schädigungen der Zellen infolge der Transfektion zu beurteilen und abzuschätzen.

Analog zur *in vivo*-Angiogenese durchliefen die eingesetzten mikrovaskulären Endothelzellen, isoliert aus der Vorhaut von Neugeborenen sowie aus dem Myokard zwei Wochen alter Mäuse, durch Stimulation mit pro-angiogenen Faktoren verschiedene Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro*. Initiiert wurde die angiogene Kaskade morphologisch durch eine vollständige bzw. partielle Konfluenz der Endothelzellen (*Stadium 1*). Es kam zur linearen und zirkulären Aneinanderreihung von Endothelzellen (*Stadium 2*) und schließlich zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen (*Stadium 3* und *4*). Die Endothelzellen bildeten ein basalmembranähnliches Material, welches interzellulär sowie in intrazellulären Vakuolen und im Lumen kapillarähnlicher Strukturen detektiert werden konnte. Die Lumenbildung erfolgte durch Ausbildung intrazellulärer Vakuolen sowie durch Apoptose. Während die eingesetzten murinen Endothelzellen planar zur Kulturschalenoberfläche kapillarähnliche Strukturen ausbildeten (zweidimensionales *in vitro*-Modell der Angiogenese), konnte mit den humanen Endothelzellen erstmals ein realitätsnahes, dreidimensionales *in*

in vitro-Modell der Angiogenese etabliert werden, in dem analog zur *in vivo*-Angiogenese die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen durch Degradation eines von den Zellen selbst sezernierten basalmembranähnlichen Substrates sowie Migration bzw. Invasion, Proliferation und Differenzierung erfolgte. Im basalmembranähnlichen Material wurde immunhistochemisch Kollagen IV identifiziert. Ein besonderer Befund dieser Arbeit, beobachtet im murinen Zellkulturmodell, war der zyklische Verlauf der *in vitro*-Angiogenese mit dazwischen liegender „Latenzzeit“. Nach dem Ablösen der kapillarähnlichen Strukturen von der Kulturschale konnte nach ca. 2 Monaten Kultivierung der auf der Kulturschale verbliebenen Endothelzellen ein erneutes Auftreten dieser Strukturen beobachtet werden. Interessant war, dass im zweiten Zyklus gerade die Zellen kapillarähnliche Strukturen ausbildeten, welche zuvor unbeteiligt an der Ausbildung dieser Strukturen waren. Die Ergebnisse indizieren, dass während der „Latenzzeit“ eine Differenzierung der Endothelzellen in einen angiogenen Phänotyp erfolgte.

Die Polyfektion mittels aktivierten Dendrimeren erfolgte vergleichend im Stadium der endothelialen Proliferation (*Stadium 0*) sowie der Bildung kapillarähnlicher Strukturen (*Stadium 3* bzw. *4*). Die Transfektion proliferierender Endothelzellen führte mit allen untersuchten Vektoren pJWM115 (CMV-luc), pCK5 (Ets-1l-luc), pPS12 (Ets-1k-luc) und pPS6 (E-sel-luc) zur Expression des Reportergens Luciferase, woraus zu schließen ist, dass sowohl das Adhäsionsmolekül E-Selektin als auch der Transkriptionsfaktor Ets-1 in proliferierenden murinen und humanen Endothelzellen exprimiert werden. Insgesamt wurden mit den Vektoren pCK5 und pPS12 höhere Expressionsraten der Luciferase erzielt als mit dem pPS6-Vektor. Die Ergebnisse der Transfektion muriner und humaner Endothelzellen im Stadium der Bildung kapillarähnlicher Strukturen spiegelten die angiogenetische Situation beider *in vitro*-Modelle wider. Während die Transfektion muriner Endothelzellen im *Stadium 3*, unabhängig vom eingesetzten Vektor, zu keiner Expression der Luciferase führte, wurde nach Transfektion humaner Endothelzellen im Stadium der dreidimensionalen Organisation kapillarähnlicher Strukturen (*Stadium 4*) eine geringe Expression detektiert. Dabei konnte ein wichtiger Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen im humanen Zellkulturmodell 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. Dies ist durch die unterschiedliche Proliferationsrate der Endothelzellen in diesem Stadium zu erklären. Diese Ergebnisse indizieren eine Zellzyklusabhängigkeit des verwendeten Gentransfersystems. Ein effizienter Gentransfer konnte nur in proliferierenden Endothelzellen beobachtet werden, als Resultat einer gesteigerten Aufnahme der Komplexe sowie eines effizienteren Eintritts der Komplexe bzw. Plasmid-DNA in den Kern. Die ultrastrukturelle Untersuchung ließ vermuten, dass die

durch Endozytose aufgenommenen Komplexe vor der Fusion mit primären Lysosomen aus den Endosomen entkommen, da freie DNA-Dendrimer-Komplexe an der Kernmembran vor dem Erscheinen multivesikulärer Körper (späte Endosomen) in humanen Endothelzellen detektiert werden konnten. In den murinen Endothelzellen schien sich der intrazelluläre Abbau der Komplexe im Vergleich zu den humanen Endothelzellen langsamer zu vollziehen, welches die allgemein höhere Effizienz des Gentransfers in diesen Zellen zumindest partiell erklären könnte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Steigerung der E-sel-Promotoraktivität (pPS6) durch die Endothelzell-spezifischen Enhancer 5xpbs (pPO18) und Flk-1 (pPO14) sowie durch das HLA-Intron (pPO12) untersucht. Im Gegensatz zum HLA-Intron, welches zu einer Erhöhung der Aktivität des E-sel-Promotors um ein Vielfaches führte, konnte die Promotoraktivität durch die Endothelzell-spezifischen Enhancer nicht gesteigert werden. Dies deutet darauf hin, dass die entsprechenden Transkriptionsfaktoren wie z.B. Ets-1 in den untersuchten Zellkulturmodellen nicht in ausreichender Menge exprimiert werden. Genexpressionsanalysen oder immunhistochemische Untersuchungen der Endothelzellen in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* könnten hierüber Aufschluss geben.

Im Hinblick auf eine Reduktion von Tierversuchen durch Ersatz- und Ergänzungsmethoden kommt den in der vorliegenden Arbeit etablierten *in vitro*-Modellen der Angiogenese eine besondere Bedeutung zu. Über den Tierschutzaspekt hinaus stellen sie kostengünstige, sensitive, einfache experimentelle Systeme für weiterführende Untersuchungen dar. Während das murine Zellkulturmodell insbesondere für Gentransferstudien geeignet ist, da sich die murinen Endothelzellen effizient transfizieren lassen, steht mit dem realitätsnahen, dreidimensionalen *in vitro*-Modell der Angiogenese humaner Endothelzellen ein experimentelles System zur Verfügung, welches sich in der Hauptsache für Untersuchungen der *in vitro*-Angiogenese eignet. Aufgrund des fehlenden Einsatzes einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix und der damit verbundenen Reduktion nicht bzw. schwierig standardisierbarer Faktoren ist dieses Modell geeignet für Untersuchungen von beispielsweise Zelladhäsionsmolekülen, Zell-Matrix-Interaktionen oder auch zur Identifizierung spezifischer Inhibitoren der Lumenbildung. Die etablierten Endothelzellkulturen werden derzeit bereits in anderen Laboratorien für ähnliche Experimente eingesetzt.