

Aus der Arbeitsgruppe  
„Arteriogenesis and Collateral Targeting“  
Leiter: Priv. Doz. Dr. Wulf Ito  
Medizinische Klinik III, Angiologie und Kardiologie  
Des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. Thomas Meinertz

# **Entwicklung eines in vitro Modells zur Evaluation der Funktion eines in Kollateralarterien regulierten Antigens**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Nina Janson  
Aus Bonn

Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
Der Universität Hamburg am 02.10.2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. W. D. Ito

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. M. Merten

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. W.-H. Zimmermann

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Herz-/Kreislaufkrankungen .....	3
1.2 Formen des Gefäßwachstums .....	5
1.2.1 Die Vaskulogenese .....	5
1.2.2 Die Angiogenese .....	6
1.2.3 Die Arteriogenese.....	8
1.2.4 Unterschiede zwischen Arterio- und Angiogenese .....	9
1.3 Rolle von Monozyten/Makrophagen bei der Neubildung von Gefäßen ...	10
1.4 Ziel der Arbeit .....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Material .....	13
2.1.1 Zelllinien .....	13
2.1.2 Reagenzien .....	13
2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	16
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Endothelzellkultur .....	18
2.2.1.1 Anzucht der Endothelzellen .....	18
2.2.1.2 Passage der Zellen.....	19
2.2.1.3 Zellzählung .....	19
2.2.2 Bestätigung des endothelialen Charakters der RHE A Zellen durch Markierung der Zellen und Auswertung im FACS-Gerät .....	20
2.2.3 Herstellung des kollateralspezifischen Antikörpers .....	21
2.2.3.1 Immunisierung und Generierung eines monoklonalen Antikörpers (in Vorarbeiten erfolgt) .....	21
2.2.3.2 Aufzucht der Hybridomazellen .....	22
2.2.3.3 Isolierung des kollateralspezifischen Antikörpers aus Hybridomazellüberstand .....	23
2.2.4 Migrationsassay .....	24
2.2.4.1 Kultur der Endothelzellen auf Thermanox-Plättchen.....	24
2.2.4.2 Beobachtung der Zellmigration .....	25
2.2.4.3 Fixierung der Zellen .....	25
2.2.5 Proliferation der Endothelzellen .....	26
2.2.5.1 Ausplattierung der Zellen .....	26
2.2.5.2 Markierung der Zellen mit BrdU .....	27
2.2.5.3 Enzymatische Behandlung der Zellen .....	28
2.2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung .....	29
2.2.6 Kultur der Alveolarmakrophagen einer adulten Ratte.....	29
2.2.7 Antikörpervermittelte Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen .....	30
2.2.7.1 Ausplattieren der Rattenherzendothelzellen auf Objektträgern .	30
2.2.7.2 Zugabe von Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) .....	30
2.2.7.3 Bindung der Makrophagen an die Endothelzellen .....	31
2.2.7.4 Enzymatische Färbung der Makrophagen .....	31
2.2.7.5 Dokumentation der Makrophagenadhäsion .....	32
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1 Charakterisierung der Rattenherzendothelzelllinien .....	33

3.1.1 Phänotypische Unterschiede der RHE A und RHE neg. Zellen .....	33
3.1.2 Bestätigung des endothelialen Charakters von RHE A und RHE neg. Zellen .....	34
3.1.3 Migrationsvermögen der RHE Zellen .....	35
3.1.4 Proliferationsverhalten.....	36
3.2 In vitro Auswirkungen der Aktivierung des transmembranösen Proteins auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen sowie die Adhärenz von Makrophagen .....	37
3.2.1 Migrationsverhalten der Endothelzellen unter Einfluss von CTA 157-2 .....	37
3.2.2 Proliferationsvermögen unter Einfluss von CTA 157-2.....	39
3.2.3 Proliferation der RHE A Zellen in verschiedenen Medien.....	39
3.2.4 Proliferationsrate der RHE A Zellen nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an CTA 157-2.....	40
3.2.5 Auswirkungen von CTA 157-2 auf die Adhäsion von Makrophagen	43
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1 Charakterisierung der Zellen.....	45
4.1.1 Angiogenese und Arteriogenese .....	45
4.1.2 Zelllinien versus Primärzellen.....	46
4.1.3 Endothelzellen vom Rattenherz .....	47
4.2 Modelle zur in vitro Untersuchung der Angiogenese .....	49
4.2.1 Entwicklung eines Modells zur Untersuchung der Migration und Proliferation von Endothelzellen .....	51
4.2.2 Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen .....	53
4.3 Identifikation eines in Kollateralarterien regulierten Proteasoms und Fokal-Adhäsion assoziierten Antigens .....	55
4.4 Auswirkungen des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 in vitro und in vivo.....	57
4.4.1 Einfluss des Proteasom aktivierenden Antikörpers CTA 157-2 auf die Endothelzellmigration in vitro .....	57
4.4.2 Einfluss des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 auf die Zellproliferation in vitro .....	58
4.4.3 Beobachtungen zu Auswirkungen des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 auf das Kollateralwachstum in vivo .....	59
4.4.4 Einfluss des Antikörpers CTA 157-2 bei der Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen.....	61
4.5 Ausblick .....	64
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>76</b>
<b>9 Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>77</b>
<b>10 Lebenslauf .....</b>	<b>78</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Herz-/Kreislaufkrankungen

Laut World Health Organisation (WHO) sterben jedes Jahr geschätzte 17 Millionen Menschen weltweit an kardiovaskulären Erkrankungen. In den USA entspricht das einem Anteil von 40% aller Todesfälle. Dabei ist die Koronare Herzerkrankung (KHK) die häufigste Todesursache mit einer Prävalenz bis zu 20% der Männer im mittleren Lebensalter und eine der häufigsten Erkrankungsursachen (WHO: cardiovascular diseases 2001/2002).

Außer der KHK gehören zum Formenkreis der kardiovaskulären Erkrankungen der arterielle Hypertonus, der Schlaganfall, periphere Gefäßerkrankungen, die Kardiomyopathie sowie angeborene und erworbene Herzfehler.

Im Jahr 2001 gab es weltweit alle vier Sekunden einen Herzinfarkt, der durch eine mangelnde Perfusion der Herzkranzgefäße ausgelöst wird. Häufigste Ursache hierfür ist die Arteriosklerose, ein Prozess, der zu einem langsamen Verschluss des Gefäßlumens führt, und vor allem die großen Überleitungsgefäße wie die epikardialen Koronararterien, ferner aber auch die Karotiden, die Nierenarterien und die Femoralarterien betreffen kann (Ross 1993). Als Risikofaktoren der Arteriogenese gelten der Nikotinabusus sowie Adipositas, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und der arterielle Hypertonus. Als Folge eines Gefäßverschlusses kommt es im umliegenden Gewebe zu einem Missverhältnis zwischen dem Sauerstoffangebot und dem Sauerstoffbedarf, welches zu Zelluntergang und Nekrosen führt und einen irreversiblen Funktionsverlust des Organs bedingen kann. Klinisch kommt es zur Angina pectoris, zum Myokardinfarkt, zum Apoplex, zur Niereninsuffizienz oder zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.

Einzige Möglichkeit, den entstehenden Schaden zu begrenzen, sind invasive Therapien wie die Ballondilatation, Implantationen von Stents und Bypass-Operationen. Ihr Einsatz ist jedoch auf Gefäße mit größeren Lumina begrenzt bzw. geht oft mit Komplikationen wie Verletzung der Gefäßwand mit Gefahr der Restenose (Rate: 40%) einher.

Interessant ist jedoch, dass nicht bei allen Patienten mit Stenosen oder kompletten Verschlüssen der Herzkranzgefäße ein Infarkt auftreten muss. Die Myokarddurchblutung kann durch vorhandene Umgehungskreisläufe aufrechterhalten werden, die die verschlossenen mit den intakten Gefäßen verbinden. Solche existierenden Verbindungen zwischen gleich versorgenden Arterien werden Kollateralgefäße genannt (Spalteholz 1907).

Schon im Jahr 1757 fand Albrecht von Haller am menschlichen Herz ein Gefäßsystem aus funktionellen Arterien, welches die Koronararterien untereinander verbindet. Letztlich brachten jedoch Longland und Fulton den Beweis, dass Koronararterien keine anatomischen Endarterien sind, sondern durch Anastomosen verbunden sind, die in jedem menschlichen Herzen existieren (Fulton 1965).

Die klinische Bedeutung dieser Kollateralarterien liegt in ihrer Fähigkeit zu wachsen, und damit größere Mengen Blut zu transportieren, womit sie zwar keinen Infarkt verhindern, jedoch den entstehenden Schaden durch Kompensation der eingeschränkten Perfusion begrenzen können.

Man unterscheidet zwei Formen von Kollateralgefäßen:

- 1) große epikardiale Gefäße, die durch schnelles Wachstum aus präexistierenden interarteriellen Verbindungen in muskuläre Arterien entstehen und deren Entstehungsprozess als adaptive Arteriogenese bezeichnet wird (Schaper und Ito 1996), sowie
- 2) kleine endokardial gelegene Gefäße, die durch das Aussprossen von Kapillaren im ischämischen Gebiet entstehen, aber nicht über eine glatte Muskelschicht verfügen und unter den Prozess der Angiogenese fallen (Risau 1993).

Angiogenese und Arteriogenese sind beides Prozesse der Gefäßneubildung, die nach der Geburt auftreten, und somit abzugrenzen sind von der Vaskulogenese, die ausschließlich die Entwicklung des Gefäßsystems im Embryo bezeichnet (Risau 1997).

## 1.2 Formen des Gefäßwachstums

### 1.2.1 Die Vaskulogenese

Das Blutgefäßsystem ist das erste Organ, das während der embryonalen Entwicklung entsteht und bereits vor Einsetzen der Blutzirkulation angelegt ist. Die Vaskulogenese beginnt im Dottersack mit der Differenzierung von Hämangioblasten aus dem Mesoderm, genauer aus mesenchymalen Zellen. Die Hämangioblasten formen Blutinseln, so genannte Cluster, die die ersten erkennbaren Gefäßstrukturen darstellen (Gonzalez-Crussi 1971). Deren innere Schicht differenziert sich in hämatopoetische Vorläuferzellen, während sich aus dem äußeren Teil, den Angioblasten, die primitiven Endothelzellen entwickeln (His 1900; Flamme 1997). Diese bilden durch Zusammenwachsen die ersten einfachen Gefäße. Aus dem einfachen Gefäßplexus entsteht durch Teilung von Gefäßen und Ummantelung mit glatten Muskelzellen oder Perizyten ein komplexes Netzwerk.

Nach Einsetzen des Herzschlags differenzieren sich einige Gefäße in Arterien und Venen, während andere als Kapillaren bestehen bleiben (Risau 1997). Induziert werden diese Veränderungen durch erhöhte Drücke und Scherkräfte innerhalb der Gefäße, wie sie durch die veränderte Hämodynamik nach Einsetzen der Blutzirkulation zustande kommen. In der Folge kommt es zur Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen, die die entstandenen Arterien ummanteln.

Angioblasten sind sehr mobile Zellen, da sie allein oder in Zellverbänden migrieren können. So besitzen sie die Möglichkeit, weit entfernt von ihrem Ursprungsort neue Gefäße zu bilden (Sabin 1920). Zuerst glaubte man, dass Angioblasten nur im Embryo vorkommen, aber sie lassen sich auch im Knochenmark und Blut nachweisen und rekapitulieren die Vaskulogenese, indem sie in die ischämischen Gebiete wandern und zu reifen Endothelzellen differenzieren (Asahara et al. 1997). Ihre Mobilität und Differenzierung werden von Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular endothelial growth factor), bFGF (Basic fibroblast growth factor) und IGF-1 (Insulin like growth factor) gesteuert (Takahashi et al. 1999; Peichev et al. 2000).

Die Endothelzellen bilden die innere Zellschicht der Gefäße und erfüllen eine Reihe von Aufgaben wie Permeabilität, Thrombogenität und Wiederherstellung eines Gefäßes nach Verletzung. Allerdings sind sie auch für den Beginn und den Fortschritt einer Arteriosklerose verantwortlich. Heute sind diverse Faktoren bekannt, die in die Funktion des Endothels eingreifen und teilweise selbst davon gebildet werden.

Die Bildung von neuen Blutgefäßen im adulten Organismus findet physiologisch in Zyklen während der Reproduktionsphase (Schwangerschaft) und bei regenerativen Vorgängen wie der Wundheilung statt. Bei diesen Prozessen ist die Gefäßbildung streng reguliert. Unkontrolliertes Wachstum findet man dagegen bei verschiedenen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie oder rheumatoiden Arthritis sowie auch beim Tumorwachstum und seiner Metastasierung (Folkman 1971).

### **1.2.2 Die Angiogenese**

Der Begriff Angiogenese wurde 1935 erstmals von Arthur Hertig eingeführt und bezeichnet einen Prozess, bei dem bereits angelegte Blutgefäße proliferieren und ein neues kapillarartiges Netzwerk bilden (Risau 1997).

Man unterscheidet zwei Formen der Angiogenese. Erste beschreibt das Sprossen von Kapillaren aus bereits vorhandenen Gefäßen („sprouting angiogenesis“). Dabei wird extrazelluläre Matrix abgebaut und der vorhandene Platz durch einwandernde Endothelzellen gefüllt, die neue Lumina formen. Die zweite Möglichkeit der Angiogenese ist die Vergrößerung des kapillären Netzwerks durch Einwachsen von transendothelialen Brücken oder glatten Muskelzügen („Intussuseption“) (Risau 1997; Carmeliet 2000).

Im Mittelpunkt der Angiogenese stehen die Endothelzellen, die die innerste Schicht der Gefäße bilden und während der Angiogenese kaskadenartig die Phasen der Migration, Proliferation und Differenzierung durchlaufen (Folkman 1984). Hauptstimulus ist die Hypoxie, ein Sauerstoffmangel, der z.B. nach Gefäßverschlüssen auftreten kann. Ist die Diffusion von Sauerstoff aus dem Blut in die Zelle nicht möglich, werden durch den intrazellulären



Sauerstoffmangel Proteine wie HIF-1 (Hypoxia inducible factor 1) und VEGF verstärkt exprimiert und es kommt im folgenden zur Aktivierung der Angiogenese. Zu Beginn reagieren die Endothelzellen mit Vermehrung ihrer Zellorganellen (Ausprunk und Folkman 1977). Um eine Migration der Zellen zu ermöglichen, kommt es zur Fragmentierung der Basalmembran. Daran beteiligt sind diverse proteolytische Enzyme wie Proteinasen, plasminogen aktivierte Proteasen und Heparansen, die von Endothelzellen und Perizyten synthetisiert werden (Folkman 1984). U.a. führt Angiopoetin 2 zum Abbau der Muskelschicht. Diese Destabilisierung der Gefäße erleichtert das Herauslösen von Zellen aus ihrem Verband und bildet eine Basis für die Migration (Carmeliet 2000).

Die migrierenden Zellen bilden durch Aneinanderreihen einen Kapillarspross, der durch vermehrte Zellteilungen proliferiert (Folkman 1984). Letztlich kommt es zur Lumenbildung innerhalb der neu gebildeten Kapillare durch Vereinigung der Vakuolen benachbarter Endothelzellen (Folkman und Haudenschild 1980) und zum Wiederaufbau der Basalmembran.

Man muss jedoch bedenken, dass durch die Angiogenese allenfalls eine geringe Verbesserung der Perfusion zu erwarten ist, da Kapillaren nicht in der Lage sind, ausreichende Mengen Blut zu transportieren und sich den physiologischen Bedürfnissen anzupassen. Auch fehlt den neu gebildeten Kapillaren die Schicht glatter Muskelzellen, somit sind sie instabil und rupturgefährdet.

Die effizienteste Möglichkeit, die Perfusion in einem ischämischen Gebiet zu sichern, besteht in der Bildung von Kollateralen, also größeren Gefäßen wie Arteriolen und Arterien, da nur sie ausreichende Mengen Blut transportieren können (Kroll, Waltenberger 2000).

Sie besitzen die Fähigkeit, ihr Lumen bei Verschluss einer Hauptarterie dramatisch zu vergrößern, um so die Blutversorgung des angrenzenden Gebietes zu sichern.

Die Bildung von Kollateralen entsteht durch den Prozess der Arteriogenese, der im nachfolgenden näher beschrieben wird, und sich wesentlich von dem Prozess der Angiogenese unterscheidet.

### **1.2.3 Die Arteriogenese**

Kollateralarterien entstehen durch schnelles Wachstum aus bereits angelegten Gefäßen, die unter normalen Bedingungen nicht gebraucht werden. Dieser Vorgang wird als Arteriogenese bezeichnet (Buschmann, Schaper 2000). Resultat dieses aktiven Prozesses, der in zwei Phasen abläuft, sind neue Gefäße, die aus einer Schicht Endothelzellen und einer Lamina elastica interna bestehen und, im Gegensatz zum kapillären Netzwerk, von glatten Muskelzellen umgeben sind, die wesentlich für die Stabilität der Gefäßwand sorgen (Longland 1953). Nach einer schnellen Proliferation von bereits angelegten Gefäßverbindungen, folgt eine Phase der Umwandlung, in der es zu einer Zunahme der Länge der Kollateralarterien kommt, für die eine Migration von Gefäß- und Muskelzellen erforderlich ist (Herzog et al. 2002).

Die Arteriogenese lässt sich in die vier Phasen der Initiation, Proliferation, Migration und Reifung unterteilen (Scholz et al. 2000):

Erhöhte Scherkräfte in den angelegten Kollateralgefäßen nach einem hämodynamisch relevanten Gefäßverschluss führen initial zu einer Aktivierung der Endothelzellen mit folgender Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie z. B. ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) oder VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) und Akkumulation von Makrophagen. Die entstandene lokale Entzündungsreaktion lockt weitere Makrophagen an. Diese bilden Wachstumsfaktoren wie bFGF (Basic fibroblast growth factor) und TNF- $\alpha$  (Tumornekrose-Faktor alpha), die die mitotische Aktivität und Proliferation am ersten bis zum dritten Tag post okklusionem von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten stimulieren. Muskelzellen wandeln sich vom kontraktilen in den synthetischen Phänotyp um. Nach drei bis vierzehn Tagen kommt es zu einem ultrastrukturellen Umbau des Gefäßes mit Fragmentierung der Lamina elastica interna, einer Bindegewebsschicht, zur Migration glatter

Muskelzellen sowie zu einer Vergrößerung des Lumens und Verdickung der Wand. Letztlich kommt es zur Reifung des neu gebildeten Gefäßes. Proliferation und Migration nehmen ab (Scholz, Ito 2000).

#### **1.2.4 Unterschiede zwischen Arterio- und Angiogenese**

Die Arterio- und die Angiogenese differieren in mehreren Aspekten:

Kapillaren entstehen durch Sprossung oder Intussuseption, während Kollateralarterien durch Proliferation von bereits angelegten Anastomosen entstehen (Schaper et Ito 1996).

Beobachtungen konnten zeigen, dass die Arteriogenese im Gegensatz zur Angiogenese im nicht ischämischen Gebiet abläuft, und nicht durch Hypoxie, sondern wahrscheinlich durch eine verstärkte Schubspannung nach einem Gefäßverschluss induziert wird (Ito et al. 1997). Folglich führen die erhöhten Scherkräfte wahrscheinlich zur Eröffnung von präexistierenden Anastomosen, die die veränderte hämodynamische Situation schnell ausgleichen können.

Das Kollateralwachstum benötigt zudem wesentlich weniger Zeit. Tierexperimente konnten eine maximale Proliferation drei Tage nach Gefäßverschluss zeigen, während das Kapillarwachstum im Schnitt sieben Tage bis zum Erreichen des Proliferationsmaximums benötigte (Ito et al. 1997). Bei Betrachten des histologischen Aufbaus fällt ein weiterer, bereits oben genannter Unterschied auf: Kollateralarterien bestehen aus mehreren Schichten: Die innerste Schicht bilden die 50-150 µm langen Endothelzellen, die in einer einfachen Lage zum Gefäßlumen hin angeordnet sind. Angrenzend findet sich bei Arterien die Lamina elastica interna. Zusammen bilden sie die so genannte Tunica intima. Diese wird umgeben von einer Schicht glatter Muskelzellen, elastischer Fasernetze, Kollagenfasern (Typ I und III) und Grundsubstanz (Proteoglykane). Bei Arterien findet man nach außen hin des Weiteren eine Lamina elastica externa. Beide Schichten werden zusammen als Tunica media bezeichnet. Als letztes folgt die Tunica externa (Adventitia), eine kollagenreiche (Typ I) Bindegewebsschicht.

Dagegen sind aus der Angiogenese hervorgehende Kapillaren im Durchmesser nur 4-15 µm groß. Sie besitzen eine Tunica intima und Adventitia, jedoch keine

Tunica media. Aufgrund der fehlenden Muskelschicht sind sie instabiler und rupturieren eher. Sie dienen im Wesentlichen dem Stoff- und Gasaustausch, der durch einen verlangsamten Blutstrom erleichtert wird. Kollateralarterien dagegen sind geeignet, einem hohen intravasalen Druck durch gesteigerten Blutfluss standzuhalten, und sorgen wie die Arterien und Venen im Allgemeinen für die Blutversorgung.

Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass die Proliferation und die Migration von Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen wesentliche gemeinsame Prozesse der Angio- und Arteriogenese darstellen.

### **1.3 Rolle von Monozyten/Makrophagen bei der Neubildung von Gefäßen**

Monozyten bzw. Makrophagen formen keine homogene Population, sondern bestehen aus einer Vielzahl von Zellen, die unter bestimmten Bedingungen in Organen akkumulieren (Butcher 1991). Sie gehören zu dem Mononukleären Phagozytose System und entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit den Granulozyten (Sunderkötter 1994). Die ersten phagozytierenden Zellen sind die Monoblasten, sie differenzieren sich weiter in Promonozyten und Knochenmarksmonozyten (Furth 1992). Monozyten gehen dann in den Blutkreislauf über, wandern in verschiedene Organe und differenzieren sich dort in Gewebemakrophagen mit spezifischen Eigenschaften.

Die Akkumulation und Aktivierung von Monozyten spielt eine wichtige Rolle bei der Angio- und Arteriogenese (Arras et al. 1998). Schaper et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Adhäsion von Monozyten an die Intima von Kollateralgefäßen der Koronararterien und deren schnellem Wachstum darstellen (Schaper et al. 1976). Durch die lokal entstehende Entzündungsreaktion wird die umgebende Matrix aufgelöst und eine Ausdehnung der neuen Gefäße erleichtert (Arras, Ito 1999). Während der Zeit der größten Proliferation von Gefäßzellen, etwa am dritten Tag nach einem Gefäßverschluss der Femoralarterie, wurde eine maximale Akkumulation von

Monozyten beobachtet (Arras et al. 1998). Bekannt ist des Weiteren, dass Makrophagen durch Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF) chemotaktisch aktiviert werden (Clauss et al. 1996) sowie wiederum selbst in der Lage sind, Substanzen zur Stimulation des Gefäßwachstums zu sezernieren (Weihrauch et al. 1994). Die Makrophagen sind die Hauptlieferanten von TNF- $\alpha$  (Tumornekrose-Faktor alpha) und bFGF (Basic fibroblast growth factor), einem bekannten Wachstumsfaktor für Endothel- als auch für glatte Muskelzellen (Arras et al. 1998).

Ito et al. konnten nach Infusion von MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) die Akkumulation von Makrophagen stimulieren. Gleichzeitig fanden sie eine erhöhte Anzahl von Kollateralarterien und Kapillaren (Ito et al. 1997).

Letztlich muss festgehalten werden, dass Monozyten bei der Arteriogenese eine wichtige Rolle spielen (Arras et al. 1998). Sie sind Träger großer Mengen an Wachstumsfaktoren, die die Umbauprozesse von Gefäßen modulieren können. Nach einer erhöhten Schubspannung infolge eines hämodynamisch relevanten Gefäßverschlusses werden Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren hochreguliert, und es folgt eine Invasion von Monozyten und deren Reifung zu Makrophagen. Diese setzen wiederum weitere Wachstumsfaktoren frei und induzieren damit die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Clauss 1996). Diese Vorgänge sind entscheidend bei der Arteriogenese, da nur so aus einer präformierten Kollateralarterie nach Gefäßverschluss eine funktionell relevante Kollaterale entsteht (Schaper, Buschmann 1999).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Modell, auf dessen Grundlage die Proliferation und die Migration von Rattenherzendothelzellen getrennt untersucht werden können. Zu diesem Zweck wurde eine Rattenherzendothelzelllinie verwendet, die ursprünglich von Derhaag et al. (1996) als eine spontan immortalisierte Zelllinie isoliert und anhand endothelialer Oberflächenmarker charakterisiert wurde. Aufgrund der spontanen Immortalisierung mussten die Zellen nicht mit einem viralen Onkogen infiziert werden und waren deshalb geeignet, eine in vivo Situation zu repräsentieren. Es zeigte sich, dass die Zelllinie in der Kultur sehr heterogen erschien. Einige Zellen wuchsen weniger dicht und zeigten eine Tendenz zur Migration, während andere dichte Zellverbände mit hoher Proliferationsrate bildeten. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Zellen getrennt und aus einzelnen Zellen ein Klon jeder Zelllinie separat angezchtet. Die daraus entstandene primär migrierende Zelllinie nannte man RHE A, die primär proliferierende Zelllinie RHE neg..

Im Anschluss wurden beide Zelllinien mittels Antikörper gegen verschiedene Antigene und Oberflächenmarker bezüglich des endothelialen Phänotyps charakterisiert. In der FACS (Fluorescence activated cell sorter) Analyse zeigte sich eine signifikante Expression von CD 54, FLK-1, FLT-1 sowie VE-Cadherin von beiden Zelllinien.

Um weitere transmembranöse Moleküle zu finden, wurden die von Hybridomazellen produzierten Antikörper auf histologischen Schnitten im Hinblick auf ihre Kollateralselektivität durchgemustert und selektioniert. Auf diese Weise wurde ein kollateralspezifischer monoklonaler Antikörper mit Namen CTA 157-2 (Collateral targeting antibody) generiert.

Ziel war es nun, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, den Einfluss des von dem Antikörper CTA 157-2 gebundenen Antigens auf die Migration und Proliferation von Rattenherzendothelzellen sowie ferner auch auf die Adhäsion von Makrophagen in vitro zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

Rattenherzendothelzellen: Die heterogene Ausgangszelllinie wurde von Derhaag et al. (1996) isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach Markierung mit einem primären Antikörper gegen das kollateralspezifische Antigen (CSA) wurden die Zellen im FACS-Gerät sortiert und die positiven und negativen Zellen getrennt aufgezogen. Nach einer zweiten Sortierung wurde aus den positiven, also CSA exprimierenden Zellen, eine migrierende Zelle (Klon A) kultiviert, die entstehende, stark migrierende Zelllinie deshalb RHE A genannt. Der zweite Klon bildete die nicht migrierende Zelllinie, im Folgenden RHE neg. genannt.

Hybridzellen: Fusionierte Lymphozyten mit SP2/O Myelomzellen von Mäusen (C.J. Dean 1998).

CRL-2192: Nr. 8383 ist eine Alveolar-Makrophagen-Zelllinie, die durch eine Lungenlavage einer männlichen adulten Sprague/Dawley Ratte gewonnen wurde (erhalten vom University of Texas Health Science Center).

#### 2.1.2 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien werden im Folgenden tabellarisch aufgelistet:

Akkutase	Cat. No: L-11-007, 100 ml, steril
Aqua dest.	Fa. PAA Laboratories GmbH
BrdU-Antikörper	Aqua ad iniectabilia, Baxter GmbH, Deutschland
	BDPharMingen, USA

BrdU Flow Kit	BD PharMingen, USA
Cy <sup>TM</sup> 2-conjugated	Jackson ImmunoResearch, USA
AffiniPure Goat Anti-Mouse / Goat Anti Rabbit IgG	
Cytofix/Cytoperm Puffer	BDPharMingen, USA
Cytoperm Plus Puffer	BDPharMingen, USA
DMSO	Dimethylsulfoxid, Merck KgaA, Deutschland
Dulbecco's MEM	With Glutamax – L (=L-Alanyl-Glutamine) with sodium pyruvate + pyridoxine with 4500 MG/l Glucose Fa. Gibco BRL
EDTA	= Ethylenediamine-tetraacetic acid FW 372.2 Disodium salt: Dihydrate C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, Fa. Sigma ED2SS
Einbettungsmedium	DAKO Corporation, USA
Einfriermedium	Gibco BRL, Deutschland
Eluationspuffer	ImmunoPure L Elution Buffer, Pierce, USA
F12K-Medium	Kaighn's modification Cat. No.: 21127-022, Fa. Gibco BRL
FCS	1). Fa. SIGMA, F-4135, 500 ml Heat inactivated, sterile filtered 2). Fa. Gibco BRL, 500 ml, origin: South American, Mycoplasma + virus screened
FLK-1 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, USA
FLT-1 (H-225)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Giemsa	Giemsas Lösung: Azur-Eosin-Methylen- blaulösung für die Mikroskopie (enthält Methanol) Fa. Merck 1.09204.0500 500 ml
Glutamin	Gibco BRL, Deutschland
Hämalaun	Merck, Deutschland
Hepes Buffer	Cat. No.: 15630-049, 20 ml Solution 1M, Fa. Gibco BRL



Hyflo Super Gel	Fluka Chemie GmbH, Schweiz
May-Grünwald	MAY-GRÜNVALDS Eosine-methylene blue Solution modified for microscopy (contains methanol), Fa. Merck 1.01424.0500 500 ml
Mouse anti rat CD54	Serotec, USA
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Deutschland
Natriumbarbiturat	Merck, Deutschland
PBS Dulbecco's	W/o Ca + Mg, w/o sodium bicarbonate 500 ml Cat. No.: 14190-169, Fa. Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin	Cat. No.: 1074440, Fa. Boehringer
PFA	= Paraformaldehyd (Formaldehyd 37%) Cat. No.: 4002, Fa. Merck
Puffer pH 7,2	BupH Phosphate Saline Packs, Pierce, USA
Salzsäure	HCl, Merck, Deutschland
Sodiumbicarbonat	= NaHCO <sub>3</sub> , Cat. No.: 25080-052, Unit 20ml Fa. Gibco BRL 7.5%
TNF- $\alpha$	= Tumornekrose-Faktor alpha, Recombinant rat (E.coli derived) Cat. No.: 510-RT, 10.0 $\mu$ g, >97% Purity Fa. R&D Systems, Minneapolis MN 55413
Tris Puffer	Gibco BRL, USA
Trypsin	Trypsin-EDTA (1x) IN HBSS w/o Ca + Mg, w/ EDTA 4 NA Cat. No.: 25300-054, Fa. Gibco BRL
Tryptan-Blau	1:10
Waschpuffer	Perm/Wash <sup>TM</sup> Buffer, BDPharMingen, USA
Weisesche Pufferlösung	1000g enthalten: Kaliumdihydrogenphosphat 0.49g di-Natr.hydr.phosphat x 2H <sub>2</sub> O 1.14 g gereinigtes Wasser ad 1000g, Apotheke UKE

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Es wurden folgende Materialien und Geräte benutzt:

Affinity Pak Immobilized Protein-L Säulen	Pierce, Rockford, IL, USA
Bac-Platten	Petrischalen für Mikrobiologie, Ø10 cm Cat. No.: 997491
Brutschrank	Heraeus Instruments, Deutschland
Chamber slides	Lab Tek chamber slide w/o cover Permanox slide sterile 8 well (PK 16) Fa. Nalge Nunc International
Deckgläser	24 x 60 mm, Marienfeld, Deutschland
Dreibodenflasche	Nunclon Triple Flask, Nunc GmbH & CoKG, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS-Calibur, Becton Dickinson, Deutschland
Einfriercontainer	Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container, USA
Entsalzende Säulen	Desalting Column PD-10 Sephadex G-25M, Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden
FACS-Röhrchen	Falcon 2054, Becton Dickinson, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Blue Max™ Jr. 15ml Propylene Conical tube 17 x 120 mm style, 352069 15 ml 352070 50 ml, Fa. Becton Dickinson
Falcon-Zellkulturflasche	0,2µm vented Blue Plug Seal Cap 250 ml Cat. No.: 353111, Fa. Becton Dickinson
Faltenfilter	Ø185 mm, Schleicher & Schuell, Deutschland
Filter	Millex-HV 0,45 µm FilterUnit, Millipore, Frankreich
Kameramikroskop	Zeiss, Deutschland
Konzentrator	Miniplus Concentrator, Amicon Bioseparations, Millipore Corporation, USA
Kryoröhrchen	Nunc Cryo Tube™ Vials, Nalge Nunc Int.,

Kühlschrank	Dänemark Liebherr, Deutschland
Küvette	Assistent, Deutschland
Membranfilter 0,2 µm	Stericap 500 ml, Millipore Corporation, USA
Mikroskop	Olympus M021, Japan
N <sub>2</sub> -Behälter	Air Liquid GT 40, Frankreich
Nunclon™	Surface für Zell-, Gewebekultur Fa. Nunc International
Objektträger mit Deckglas	Lab-Tek® Chamber Slide™ System and Lab-Tek® Chambered Coverglass, Nalge Nunc Int., USA
pH-Meter	pH537, Wilke & Witzel Medizintechnik, Deutschland
Photometer	Spectrophotometer DU 640, Beckman, USA
Pinzette	Medicon, Deutschland
Pipetten	Serologische Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Polystyrene/non pyrogenic Fa. Becton Dickinson, Deutschland
Plättchen	Thermanox Coverslips CS 500 Size 13 mm diameter Cat. No.: 174950, Fa. Nalge Nunc Int.
Platten mit 6 wells	Nunc™ Surface, Nunc GmbH, Deutschland
Quarzglasküvette	Suprasil, Hellma, Deutschland
Waage	Sartorius Analytic
Wasserbad	GFL-Schüttelwasserbad 1083, Rudolf Franke Labortechnik, Deutschland
Wasserstrahlpumpe	Biochem Vaccu Center, Merck, Deutschland
Werkbank	Lamin Air HVR 2448, HERAEUS Instruments GmbH, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup>
Zellkulturschale	Nunclon™ Surface Platten, Nunc GmbH, Deutschland

Zellschaber	1,8 cm blade, Costar, USA
Zentrifuge	Labofuge 400R, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Endothelzellkultur

#### 2.2.1.1 Anzucht der Endothelzellen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank mit vertikalem Luftstrom. Die Arbeiten wurden mithilfe von serologischen Pipetten durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurde eine 500 ml Flasche Dulbecco's MEM Medium mit 10% Hitze inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) und 1 ml Penicillin/Streptomycin versetzt und im 37°C warmen Wasserbad angewärmt. Davon wurden 10 ml in ein 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt.

Schockgefrorene Rattenherzendothelzellen, im Folgenden als RHE Zellen bezeichnet, wurden aus dem mit flüssigem Stickstoff gefüllten N<sub>2</sub>-Behälter geholt und schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Sobald die größte Menge der Suspension aufgetaut war, wurden die Zellen zügig im vorbereiteten Falcon-Röhrchen aufgenommen, um eine Schädigung durch das im flüssigen Zustand toxische DMSO aus dem Einfriermedium zu vermeiden.

Um die RHE Zellen vom Einfriermedium zu trennen, wurden sie drei bis vier Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend saugte man den Überstand unter der Werkbank mit einer Wasserstrahlpumpe ab und lockerte die RHE Zellen durch Schütteln und Beklopfen des Falcon-Röhrchens auf. Sie wurden dann in 10 ml frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 auf mittlere Zellkulturflaschen verteilt, in die bereits je 5 ml frisches Medium vorgelegt wurde.

Zur Aufzucht der RHE Zellen wurden die Flaschen für zwei bis drei Tage im 37°C warmen Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen lagen dann als

adhärente Monolayerkulturen vor. Im subkonfluenten bis konfluenten Zustand konnten die Zellen dann weiterverarbeitet werden.

### **2.2.1.2 Passage der Zellen**

Konfluent gewachsene RHE Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, d.h. eine Zellkulturflasche wurde im Verhältnis 1:3 (RHE A) bzw. 1:5 (RHE neg.) aufgeteilt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Zum Ablösen des adhären Zellrasens wurde jede Flasche trypsiniert: Sie wurde mit 4 ml Trypsin EDTA (0,5% Lösung 1:10 verdünnt, mit PBS versetzt) und für zwei Minuten in den Brutschrank gelegt. Nach optischer Kontrolle, ob alle Zellen gut abgelöst waren, wurde die Flasche geschüttelt, 11 ml frisches Medium zur Inaktivierung des Trypsins und Bindung des zytotoxisch wirkenden EDTA dazu pipettiert und der Inhalt in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und das Zellpellet nach Aufschütteln in 12 ml frischem Medium resuspendiert.

In neue Zellkulturflaschen wurden je 6 ml frisches Medium vorgelegt, und 4 ml der Zellsuspension zugefügt.

Wenn die Zellen nicht benötigt wurden, wurden sie eingefroren. Die Zellen einer mittleren Zellkulturflasche wurden gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde jedoch nicht mit Medium, sondern in 2 ml Einfriermedium mit DMSO aufgenommen, und die Suspension auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden dann zügig im Einfriercontainer im -80°C - Schrank schockgefroren. Mit dem im Container enthaltenen Isopropanol gelang ein schonenderes Einfrieren, da die Temperatur in den Röhrchen um 1°C pro Minute abnahm. 24 Stunden später wurden sie in den mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter umgelagert.

### **2.2.1.3 Zellzählung**

Um die genaue Anzahl der Zellen zu bestimmen, wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation in einer bestimmten Menge an frischem Medium aufgenommen, und gleichmäßig im Falcon-Röhrchen verteilt.

Ein Aliquot von 50 µl wurde in einem well einer 96-well-Platte 1:2 mit 50 µl Trypanblau vermischt. ein bis zwei Tropfen wurden auf die obere Kante einer Zählkammer gegeben. Lebende Zellen färbten sich im Gegensatz zu apoptotischen Zellen, die blau erschienen, nicht an.

Unter dem Mikroskop wurden die Zellen gezählt, die in den vier Eck-Quadraten lagen. Diese wurden durch die Anzahl der Felder geteilt und mit der Verdünnung multipliziert. Anschließend wurde die Zellzahl mit  $10^4$  multipliziert, um die Menge in 1 ml zu bestimmen.

### **2.2.2 Bestätigung des endothelialen Charakters der RHE A Zellen durch Markierung der Zellen und Auswertung im FACS-Gerät**

Um typische Oberflächenantigene der kultivierten Endothelzellen zu überprüfen, wurden diese mit speziellen Antikörpern markiert und gefärbt und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FACS-Gerät) gemessen.

Zur Markierung der Antigene wurden folgende Primär – Antikörper benutzt:

Mouse anti rat CD54, FLT-1 (H-225) und FLK-1 (C-20).

Die ersten Antikörper wurden mit zweiten Antikörpern gegen gefärbt:

CD54 mit dem Cy<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG

FLT-1 und FLK-1 mit dem CY<sup>TM</sup>2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit

Alle Antikörper wurden vor Beginn des Versuchs im Verhältnis 1:100 mit PBS/3%FCS verdünnt.

Je eine Flasche Rattenherzendothelzellen der Klonreihe RHE A und RHE neg. wurden wie oben beschrieben trypsinisiert. Im Anschluss erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation und nach dem Absaugen des Überstandes die Aufnahme des Zellpellets in 20 ml PBS/3%FCS. Die Zellsuspension wurde mit 2 ml auf zehn FACS-Röhrchen verteilt und ein zweites Mal zentrifugiert. Nachdem auch der Überstand wieder abgesaugt worden war, fand die erste Markierung der Zellen durch Zugabe von je 50 µl des ersten Antikörpers statt.

Die Röhrchen für die Negativkontrollen wurden mit 50 µl PBS/3%FCS versehen. Alle Zellen wurden kurz aufgewirbelt und für eine Stunde im Kühlschrank inkubiert.

Durch dreimalige Zugabe von je 2 ml PBS/3%FCS und anschließender Zentrifugation der FACS-Röhrchen wurden dann die Zellen gewaschen, d.h. nicht gebundene Antikörper wurden so entfernt. Nach der dritten Zentrifugation wurden die markierten Zellen gegen gefärbt. Dazu nahm man die Zellen in 50 µl einer Fluoreszenz-markierten zweiten Antikörperlösung auf. Auch die Zellen, die als Negativkontrolle fungierten, wurden mit je einem der Zweitantikörper versehen. Es erfolgte eine zweite Inkubation für 30 Minuten im Kühlschrank, und im Anschluss wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen, um nicht gebundene Antikörpermoleküle zu entfernen.

Zuletzt wurde das Zellpellet in 500 µl PBS/PFA aufgenommen und die Markierung der Zellen im FACS-Gerät sichtbar gemacht.

### **2.2.3 Herstellung des kollateralspezifischen Antikörpers**

#### **2.2.3.1 Immunisierung und Generierung eines monoklonalen Antikörpers (in Vorarbeiten erfolgt)**

C57/B16 Mäuse wurden mit Membranpräparationen aus Kollateralarterien durch drei intraperitoneale Injektionen im Abstand von zwei Wochen immunisiert (Sigma; St. Louis, USA). Zwei Tage nach einer vierten Stoßinjektion wurde die Milz der Mäuse entnommen. In weiteren Arbeitsschritten wurden die daraus gewonnenen Lymphozyten mit SP2/O Myelomzellen von Mäusen fusioniert (C.J. Dean, 1998).

Unter Verwendung von Kryoschnitten aktivierter Kollateralarterien sowie entsprechender Kontrollgefäße wurden die Klone detektiert und selektiert.

Für in vivo und in vitro Untersuchungen musste der Antikörper mittels der Affinity Pak Immobilized Protein-L Säulen isoliert werden.

### 2.2.3.2 Aufzucht der Hybridomazellen

Als Zellkulturmedium wurde, wie oben bei den Endothelzellen bereits beschrieben, eine Flasche Dulbecco's MEM mit 10 – 15% fetalem Kälberserum und einer Ampulle Penicillin/Streptomycin angesetzt. Davon wurden 10 ml entnommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert.

Die in einem Kryotube schock gefrorenen Hybridomazellen wurden aus dem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter entnommen und im 37°C warmen Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Nach Überführung der Zellsuspension in das Falcon-Röhrchen erfolgten eine dreiminütige Zentrifugation bei 1000 rpm und das anschließende Absaugen des Überstandes. Durch mehrmaliges Klopfen des Röhrchens wurden die Zellen vom Boden gelöst und in 10 ml frisches Zellkulturmedium suspendiert. In einer 250 ml Zellkulturflasche wurden die Hybridomazellen unter den gleichen Bedingungen wie die Endothelzellen für zwei bis vier Tage inkubiert. Sobald sie subkonfluent gewachsen waren, wurden sie durch starkes Klopfen an die Flasche wieder vom Boden gelöst, und die Suspension im Verhältnis 1:2 auf größere Zellkulturflaschen (750 ml) verteilt. Dabei wurde die doppelte Menge an Zellkulturmedium hinzu gegeben. Unter täglicher mikroskopischer Kontrolle der Zellmorphologie erfolgte, falls nötig, die erneute Zugabe von 10 ml frischem Medium, bis die erwünschte Wachstumsdichte erreicht war. Im Anschluss wurde die gesamte Suspension einer Flasche auf eine Dreibodenflasche zuzüglich der doppelten Menge an frischem Medium überführt. Alle zwei bis drei Tage wurde ein neues Medium bis zu einem maximalen Flaschenvolumen von 200 ml hinzu gegeben.

Vor Erreichen der maximalen Zelldichte wurden die Hybridomazellen mitsamt ihrem Überstand zur weiteren Verarbeitung in ein steriles Becherglas gegeben. Zuvor hatten die Zellen, um eine maximale Antikörperausschüttung zu erreichen, einen Tag lang kein frisches Medium erhalten.

Die Suspension wurde mit einem Esslöffel Hyflo Super Gel gemischt, um die Zellen, Zelltrümmer und eventuell vorhandene Präzipitate zu binden und sie somit vom Überstand zu trennen. Das eingesetzte Gel diente dabei als Vorfilter, der es ermöglichte, die gesamte Suspension im Anschluss mit einem 0,2 µm



Membranfilter unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe zu filtrieren, ohne dass dieser verstopft.

### **2.2.3.3 Isolierung des kollateralspezifischen Antikörpers aus Hybridomazellüberstand**

Zu Beginn wurden die für die Isolation verwendeten Proteinsäulen (AffinityPak Immobilized Protein L) auf Raumtemperatur gebracht. Die Säulen waren an mit Protein L gekoppelter Sepharose gefüllt. Der Antikörper enthaltende Hybridomazellüberstand wurde 1:2 mit einem bindenden Puffer pH 7,2 verdünnt.

Um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden, erfolgte zuerst die Öffnung des oberen Deckels und erst im Anschluss daran die Öffnung des unteren Verschlusses der Säule. Vor Verwendung der Säulen wurden diese mit 10 ml des zuvor hergestellten Puffers gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte Schritt für Schritt die Zugabe von 50 ml des verdünnten Hybridomazellüberstandes auf jede einzelne Säule. An die vollständige Bestückung der Säulen wurde ein erneuter Waschvorgang mit 25 ml des Bindungspuffers angeschlossen.

Unter Verwendung eines Elutionspuffers, der Glycin enthielt und dadurch einen pH-Wert von 4,0 besaß, wurden die zuvor gebundenen Antikörper wieder von der Säule gelöst. Hierfür wurden pro Säule je sieben Reagenzröhrchen mit 100 µl 1M Tris Puffer (pH 7,5) bestückt, um wieder eine Neutralisierung herbeizuführen. Der Durchlauf von 1 ml Elutionspuffer wurde unter gleichzeitigem Auffangen des Eluats im Reagenzröhrchen abgewartet, um anschließend die Säulen vor erneuter Bestückung auf das nächste Röhrchen umzusetzen.

Für die spätere Extinktionsmessung mittels Photometer wurden die Proben zur Vermischung kurz gevortext. Die Extinktionsmessung erfolgte unter Verwendung einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von  $L=280$  nm. Die Proben wurden hierfür in eine Quarzglasküvette überführt.

Die Fraktionen mit Absorptionswerten größer 0,1 wurden gepoolt und zur Volumeneinengung in einen Konzentrator pipettiert. Nach der Einengung auf

das gewünschte Volumen erfolgte das Entsalzen des Konzentrats. Die dafür verwendeten Säulen wurden nach Erreichen der Raumtemperatur geöffnet und ebenfalls mit 25 ml des Bindungspuffers gewaschen, bevor das Konzentrat darauf pipettiert wurde. Pro Säule wurden erneut sieben Reagenzröhrchen vorbereitet und das Konzentrat auf die Säulen gegeben. Danach wurde jede Säule mit je 1 ml Eluationspuffer bestückt, die Fraktion gesammelt und die Säule auf das nächste Röhrchen umgesetzt.

Im Anschluss daran erfolgte die Extinktionsbestimmung der erhaltenen Fraktionen im Photometer. Die Fraktionen mit Absorptionswerten größer 0,1 wurden in ein gemeinsames Reagenzröhrchen gegeben, aus dem nach erfolgtem Schwenken nochmals 1 ml zur wiederholten Messung der Extinktion abgenommen wurde.

Die so erhaltene Endextinktion wurde durch den Faktor 1,18 dividiert, um die Konzentration der Probe in mg/ml zu bestimmen.

Vor dem Einfrieren erfolgten die sterile Filtration und das Versetzen des gereinigten Antikörpers mit 1% FCS, um einer Aggregation und einem Verlust durch Anhaften an Plastikoberflächen entgegenzuwirken.

## **2.2.4 Migrationsassay**

### **2.2.4.1 Kultur der Endothelzellen auf Thermanox-Plättchen**

Zum Versuchsaufbau wurden mit einer sterilen Pinzette je sieben Thermanox Plättchen in einer Petrischale für Mikrobiologie ausgelegt. Durch die Verwendung der Petrischalen hafteten sich die Zellen nicht auf deren Oberfläche, sondern überwiegend auf den Plättchen an. Diese sollten gleichmäßig in der Schale verteilt sein und nicht übereinander liegen. Die subkonfluent gewachsenen RHE A Zellen wurden aus dem Brutschrank genommen und das Medium aus den Zellkulturflaschen unter der Werkbank abgesaugt. Durch Zugabe von 10 ml PBS und anschließendem Absaugen wurden die RHE A Zellen gewaschen. Man löste die adhärent gewachsenen Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA und beschleunigte den Vorgang durch Inkubation der Flaschen für zwei Minuten im Brutschrank. Danach wurde mit der Hand ein

paar Mal kräftig gegen die Flaschen geschlagen, um die Zellen in Suspension zu bringen. Die Reaktion musste dann schnell durch Zugabe von 11 ml Medium abgestoppt werden, da das Trypsin die Zellen angreift. In fünf 15 ml Falcon-Röhrchen wurden je 5 ml frisches Medium vorgelegt und im Folgenden je 3 ml der Zellsuspension darin aufgenommen. Nach Verteilung der Zellen im Medium überführte man den Inhalt eines Falcon-Röhrchens auf eine vorbereitete Petrischale. Dabei war zu beachten, dass zuerst die Thermanox Plättchen mit der Flüssigkeit bedeckt wurden, denn sie sollten fest am Boden der Petrischale bleiben und nicht an der Oberfläche schwimmen. Durch leichtes Schwenken der Schalen erreichte man zuletzt eine gleichmäßige Verteilung der Suspension und der Plättchen. Sobald alle Plättchen nebeneinander lagen, ließ man auf ihnen die RHE A Zellen für zwei bis drei Tage im Brutschrank wachsen.

#### **2.2.4.2 Beobachtung der Zellmigration**

Zwei bis drei Tage später wurde der aus dem Überstand von Hybridomazellen gewonnene und isolierte Antikörper CTA 157-2 aus dem Gefrierschrank geholt. In 15 ml Falcon-Röhrchen wurden die benötigten Mengen an frischem Medium vorgelegt und definierte Volumina des Antikörpers CTA 157-2 dazugegeben. 6-well-Platten wurden beschriftet und in jedes well je 2 ml der vorbereiteten Medien pipettiert.

Die Petrischalen wurden vorsichtig dem Brutschrank entnommen. Unter der Werkbank wurden die bewachsenen Thermanox-Plättchen nacheinander mit einer sterilen Pinzette aus den Schalen genommen. In waagerechter Position überführte man daraufhin je ein Plättchen in ein well der 6-well-Platte und ließ es darin vorsichtig am Rand zu Boden gleiten. Die Platten verblieben zur weiteren Inkubation für zwei bis drei Tage im Brutschrank. In der Zeit konnten die RHE A Zellen von den Plättchen auf den Boden der wells migrieren.

#### **2.2.4.3 Fixierung der Zellen**

Zur Vorbereitung wurde ein Gemisch aus PBS, FCS und EDTA angesetzt:

Die 6-well-Platten wurden zwei bis drei Tage später aus dem Brutschrank genommen und das alte Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Durch Zugabe von 2 ml PBS und anschließendem Absaugen wurden die wells gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Plättchen aus den wells entfernt und verworfen.

Zum Ablösen der migrierten RHE A Zellen vom Boden der einzelnen wells pipettierte man in jedes well 1 ml Trypsin-EDTA und inkubierte die Platten im Brutschrank. Nach einer Minute nahm man die Platten, klopfte leicht mit der Hand von außen dagegen und überführte die Zellsuspension aus je drei wells in ein 15 ml Falcon-Röhrchen. Im Anschluss wurden die wells mit je 2 ml PBS/2%FCS/EDTA gewaschen, um eventuell noch im well verbliebene Zellen zu entfernen. Der Inhalt der drei wells wurde der Zellsuspension im 15 ml Falcon hinzugefügt. In der Zentrifuge wurden die RHE A Zellen für drei Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen aufgeschüttelt, in 1 ml PBS/2%FCS/EDTA aufgenommen und aus den Falcon-Röhrchen in vorher beschriftete FACS-Röhrchen umgekippt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt.

Im FACS-Röhrchen erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 1000 rpm. Den Überstand entfernte man durch langsames Umkippen der FACS-Röhrchen. Das Zellpellet am Boden der Röhrchen sollte dabei durch so wenig Bewegung wie möglich beeinflusst werden. Die RHE A Zellen wurden zur Fixierung in 0,5 ml PBS/1% Formaldehyd resuspendiert.

Zur Auswertung wurden die Zellen am gleichen oder spätestens am nächsten Tag im Durchflusszytometer gezählt.

## **2.2.5 Proliferation der Endothelzellen**

### **2.2.5.1 Ausplattierung der Zellen**

20 ml frisches Medium wurden unter einer sterilen Werkbank in ein 45 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. Isolierter und tiefgefrorener Antikörper CTA 157-2 wurde auf Raumtemperatur gebracht und, ausgehend von der Ausgangskonzentration, in verschiedener Menge den Falcon-Röhrchen zugesetzt. Das Ziel war es, verschiedene Konzentrationen des Antikörpers zu erreichen.

RHE A Zellen wurden in einer mittleren Zellkulturflasche wie oben beschrieben hochgezogen, bis sie subkonfluent gewachsen waren. Dann wurden sie trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach dem Aufschütteln in 5 ml frischem Medium aufgenommen und gezählt. Die Zellzahl sollte  $80 \times 10^4$  Zellen in 20 ml Medium betragen. Dazu dividierte man die unter dem Mikroskop gezählte durch die vorgegebene Zellzahl. Die so ermittelte Anzahl der Zellen in Milliliter wurde in die Falcon Spitzröhrchen mit einfachem Medium oder Medium mit darin gelöstem Antikörper überführt.

Nachdem die Zellen in den Falcon-Röhrchen gleichmäßig verteilt waren, wurden je 3 ml der Zellsuspension in ein well der vorher beschrifteten 6-well-Platten pipettiert. Während der folgenden 24 Stunden konnten die RHE A Zellen im Brutschrank in Abhängigkeit von der Konzentration des Antikörpers proliferieren.

#### **2.2.5.2 Markierung der Zellen mit BrdU**

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Analogon von Thymidin, das die Zellen während ihres Regenerationszyklus in ihre DNS einbauen. Durch Markierung mit einem Fluoreszenz gekoppelten Antikörper lässt sich damit die Proliferationsrate von Zellen bestimmen. Aus einem BrdU Flow Kit wurden Kryoröhrchen mit BrdU dem  $-80^\circ\text{C}$  Schrank entnommen und auf Raumtemperatur gebracht. In einem 45 ml Falcon-Röhrchen wurden dann pro 1 ml frischem Medium 10  $\mu\text{l}$  BrdU zugefügt.

24 Stunden nach Inkubation der RHE A Zellen mit bzw. ohne CTA 157-2 wurde das alte Medium mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Man pipettierte in jedes well 1,5 ml des Gemischs Medium-BrdU und inkubierte die Platten für weitere zwei Stunden im Brutschrank. Im Anschluss wusch man die Zellen zwei Mal mit je 2 ml PBS/3% FCS und ein Mal mit 2 ml PBS pro well. Zum Ablösen der Zellen wurden sie für eine Minute trypsinisiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 ml PBS/3%FCS gestoppt. Der Inhalt eines wells wurde in ein FACS-Röhrchen überführt. Die RHE A Zellen wurden in der Zentrifuge vom Medium getrennt und der Überstand vorsichtig abgekippt. 100  $\mu\text{l}$  Cytifix/Cytoperm Puffer wurden in jedes FACS-Röhrchen pipettiert, um die Zellen durch das darin

enthaltene Formaldehyd zu fixieren. Die Röhrchen wurden gevortext und für 30 Minuten auf Eis gestellt.

Am nächsten Tag wurde jedem FACS-Röhrchen 1 ml Waschpuffer zugefügt, der vorher im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt wurde. Die Röhrchen wurden kurz gevortext und zum Entfernen des Fixierungsmediums wie gewohnt zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt worden war, nahm man die Zellen in je 0,5 ml PBS/3%FCS auf und bewahrte sie über Nacht bei 4°C im Kühlschrank auf.

Konnte jedoch nicht direkt weitergearbeitet werden, mussten die Zellen kryokonserviert werden. Dazu gab man in jedes FACS-Röhrchen anstelle des Waschpuffers 1 ml PBS/3%FCS, zentrifugierte die Endothelzellen ab und nahm das Pellet nach Entfernen des Überstandes in je 1 ml Einfriermedium auf. Dieses bestand aus 10% DMSO und 90% FCS. Sofort im Anschluss wurden die FACS-Röhrchen verschlossen und konnten im -80°C - Schrank auf unbegrenzte Zeit gelagert werden.

### **2.2.5.3 Enzymatische Behandlung der Zellen**

Die RHE A Zellen wurden aus dem Kühlschrank genommen und abzentrifugiert. Zur Permeabilisierung der Zellwände wurden jedem FACS-Röhrchen 100 µl Cytoperm Plus Puffer hinzugefügt, die Zellen kurz aufgewirbelt, und auf Eis gestellt. Nach zehn Minuten wurde in jedes Röhrchen 1 ml Waschpuffer pipettiert, die Zellsuspension erneut zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Mussten die Zellen von -80°C erst langsam auf Raumtemperatur gebracht werden, entfiel die Zugabe des CytopermPlus Puffers. Frisch aufgetaut wurden sie in 1 ml PBS/3%FCS aufgenommen, ebenfalls zentrifugiert und vom Überstand befreit.

Zur Refixierung der Endothelzellen wurden sie ein zweites Mal mit 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer für fünf Minuten inkubiert. Darauf wurden dann je 1 ml Waschpuffer gegeben. Nach erneuter Zentrifugation und Abkippen des Überstandes sollten im nächsten Schritt die BrdU-Epitope, die Bindungsstellen für den fluoreszierenden Antikörper, aufgedeckt werden. Dies geschah mit Hilfe der Desoxyribonuklease (DNase) - Lösung. Von der Stocklösung wurden 300 µl

auf 1000µl PBS gegeben. In jedes FACS-Röhrchen wurden dann 100 µl verdünnte DNase pipettiert und mit den Zellen vermischt. Die Reaktion fand dann bei 37°C im Wasserbad während 60 Minuten statt.

Im Anschluss wurden die Endothelzellen durch erneute Zugabe von 1 ml Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig ausgekippt.

#### **2.2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung**

Ein Fluoreszenz – gekoppelter BrdU-Antikörper wurde im Verhältnis 1:50 mit Waschpuffer verdünnt. Zur Färbung wurden je 50 µl auf die Zellen gegeben. Die Zellen der Negativkontrollen wurden nicht mit fluoreszierendem BrdU-Antikörper markiert, sondern bekamen stattdessen 50 µl Waschpuffer zugefügt. Die FACS-Röhrchen wurden daraufhin für 20 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden wieder 1 ml Waschpuffer hinzugefügt, die Röhrchen zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS/3%FCS resuspendiert und die Zellzahl im Durchflusszytometer gemessen.

#### **2.2.6 Kultur der Alveolarmakrophagen einer adulten Ratte**

Als Kulturmedium zur Aufzucht der Makrophagen wurde F-12K Medium genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Zur 500 ml Flasche wurden noch 75 ml FCS, 5 ml Glutamin, 5 ml 7,5% Sodumbicarbonat sowie 1 ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

Die eingefrorenen Makrophagen wurden analog den Endothelzellen aufgetaut. Nach der dreiminütigen Zentrifugation wurde das Zellpellet eines Falcon-Röhrchens unter Zugabe von je 5 ml frischen Mediums auf zwei Zellkulturschalen verteilt. Diese wurden zur Aufzucht der Makrophagen im Brutschrank inkubiert.

Alle drei bis vier Tage wurde unter der sterilen Werkbank frisches F-12K Medium auf die Schalen pipettiert und unter leichtem Schwenken der Platten untergemischt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Dichte der Schalen kontrolliert, wobei man sowohl adhärente als auch in Suspension wachsende Zellen beobachten konnte. Nach ungefähr einer Woche hatte sich die Zellzahl

vergrößert, so dass die Makrophagen zur weiteren Aufzucht umgesetzt werden konnten. Mit einem Zellschaber wurden die adhärennten Zellen vom Boden der Platten gelöst. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit in einer Pipette aufgezogen und im Verhältnis 1:3 auf neue Schalen verteilt. Zur besseren Nährstoffversorgung wurde noch soviel neues Medium hinzugefügt, dass der Boden der Schalen gut bedeckt war.

Konnten die Makrophagen nicht sofort weiterverarbeitet werden, mussten sie wie die Endothelzellen eingefroren werden.

## **2.2.7 Antikörpervermittelte Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen**

### **2.2.7.1 Ausplattieren der Rattenherzendothelzellen auf Objektträgern**

Subkonfluent gewachsene Endothelzellen einer Zellkulturflasche mussten zur Vorbereitung trypsinisiert und gezählt werden: Die Soll-Zellzahl für diesen Versuch betrug  $45 \times 10^4$  Zellen in 12 ml Medium. Nach der Ermittlung der benötigten Milliliter-Menge wurden 12 ml Medium in 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und die errechnete Menge an Zellen hinzu gegeben. Durch kurzes Schwenken wurden die Endothelzellen gleichmäßig verteilt. Je 400  $\mu$ l wurden dann in jede der acht Kammern der Objektträger pipettiert. Die Objektträger wurden im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.7.2 Zugabe von Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ )**

Die Objektträger wurden 24 Stunden später aus dem Brutschrank genommen und das alte Medium durch vorsichtiges Absaugen aus den Kammern entfernt. Im Anschluss wurde jede zweite Kammer mit 400  $\mu$ l Medium und TNF- $\alpha$  versehen, das vorher in einer Konzentration von 5 mM angesetzt wurde, während die anderen Kammern nur 400  $\mu$ l Medium allein bekamen. Die Zellen wurden dann im Brutschrank weitere 18 Stunden inkubiert.

Für den nächsten Tag wurde ein so genanntes Bindungsmedium angesetzt: Dazu wurden 100 ml Dulbecco's Medium mit 5 ml FCS und 25 mM HEPES Puffer versehen und die Mischung im Kühlschrank aufbewahrt.



### **2.2.7.3 Bindung der Makrophagen an die Endothelzellen**

Mehrere Platten mit Makrophagen wurden dem Brutschrank entnommen, diese mit einem Zellschaber in Suspension gebracht und in ein 45 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation wurden sie nach Zugabe einer definierten Menge Bindungsmediums gepoolt, und es erfolgte eine zweite Zentrifugation. Im Anschluss wurden die Makrophagen gezählt. Die Zellzahl sollte  $5 \times 10^6$  Zellen/ml betragen. Die Objektträger wurden aus dem Brutschrank genommen und das alte Medium mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Der Endothelzellrasen wurde im Anschluss zweimal mit 200  $\mu$ l Bindungsmedium gewaschen, um eventuell noch verbliebene Medium- und TNF- $\alpha$  - Reste zu entfernen.

Dann wurde der Antikörper CTA 157-2 entweder als Hybridomaüberstand aufgetaut und 1:3 mit Bindungsmedium verdünnt oder bereits isoliert in bestimmter Konzentration im Bindungsmedium gelöst. 400  $\mu$ l wurden in jede Kammer pipettiert und für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dabei wurden zwei bis vier Kammern als spätere Kontrollwerte nur mit der gleichen Menge an Bindungsmedium gefüllt.

Zuletzt wurden die Objektträger erneut zweimal mit 200  $\mu$ l Bindungsmedium pro Kammer gewaschen und 150  $\mu$ l der Makrophagen nach kurzem Auflockern auf die Endothelzellen gegeben. Bei 4°C wurden die Objektträger auf einem Wipptisch für 30 Minuten inkubiert.

### **2.2.7.4 Enzymatische Färbung der Makrophagen**

Makrophagen enthalten als histiozytäre Zellen, im Gegensatz zu den Endothelzellen, das Enzym Saure Phosphatase, das im Folgenden zur Erkennung der adhärennten Zellen angefärbt werden sollte.

Zunächst wurden folgende Lösungen vorbereitet:

Lösung A: 10 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat wurde in 2 ml DMSO auf dem Magnetrührer gelöst.

Lösung B: 18 ml Aqua dest. wurden mit 6 ml Veronalpuffer, der aus 1,94 g Natriumacetat und 2,94 g Natriumbarbiturat ad 100 ml Aqua dest. bestand, und

6 ml 0,1 mol/l Salzsäure (HCl) vermischt. Der pH-Wert musste auf 7,62 fein eingestellt werden.

400 mg Natrium-Nitrit wurden abgewogen und in einem Falcon-Röhrchen mit 7 ml Aqua dest. aufgefüllt. Unter kräftigem Schütteln entstand eine homogene Lösung. Sechs Tropfen Natrium-Nitrit ließ man mit sechs Tropfen Neufuchsin (5 g Neufuchsin in 100 ml 2N HCl) reagieren und stoppte die Reaktion nach einer Minute durch Zukippen der Lösung B. Auch hier musste der pH-Wert auf 5 mit verdünnter HCl fein eingestellt werden.

Lösung A und B wurden zusammengekippt und durch einen Faltenfilter (Ø185 mm) in eine Küvette gegeben.

Die Objektträger wurden vom Wipptisch genommen und die Coverglass Aufsätze durch vorsichtiges Abziehen des Gummis verworfen. Dann wurde die restliche Flüssigkeit mit den nicht anhaftenden Makrophagen durch einmaliges kräftiges Schütteln entfernt und die Objektträger senkrecht in die Färbeküvette gestellt. Dort färbte man sie für 90 Minuten im Dunklen auf einem Schüttler.

Nach der Inkubation erfolgte das Abkippen der Färbelösung, und man spülte die Objektträger zweimal mit Leitungswasser. In 10% Formalin wurden die Zellen fixiert.

Danach wurden sie in Leitungswasser fünf Minuten gebläut. Zur Gegenfärbung der Endothelzellen tauchte man die Objektträger kurz in Hämalaun und spülte sie mit Aqua dest. nach. Abschließend wurden die gefärbten Felder mit Deckgläsern und Einbettungsmedium eingedeckelt.

#### **2.2.7.5 Dokumentation der Makrophagenadhäsion**

Die fertigen Objektträger wurden nach Einbettung und Fixierung auf ein Kameramikroskop gelegt und mit dem 40er Objektiv scharf eingestellt. Von jedem der acht Felder des Objektträgers wurden stichprobenartig drei Fotos gemacht. Wichtig war, dass ein Bereich auf dem Objektträger gewählt wurde, auf dem die Zellen nicht zu dicht oder sogar übereinander lagen. Die Filme wurden dann in das Fotolabor zur Entwicklung gegeben.

Nach Erhalt der Fotos wurden die adhärennten Makrophagen manuell gezählt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Rattenherzendothelzelllinien

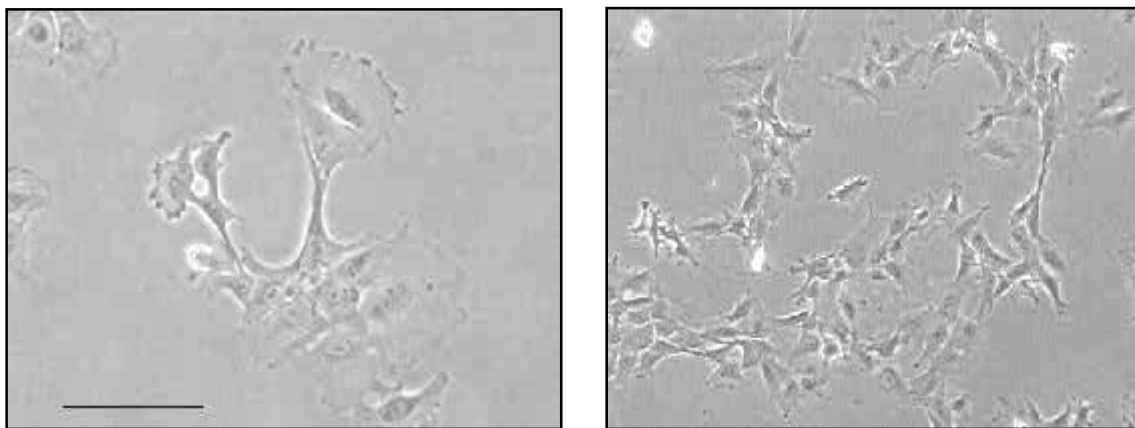
#### 3.1.1 Phänotypische Unterschiede der RHE A und RHE neg. Zellen

Die ursprüngliche Zelllinie von Endothelzellen wurde freundlicherweise von D.J. Derhaag zur Verfügung gestellt. Sie wurde durch Isolation aus Rattenherzen gewonnen. Mikroskopisch konnte festgestellt werden, dass sich diese Kultur aus zwei phänotypisch unterschiedlichen Zellarten zusammensetzte:

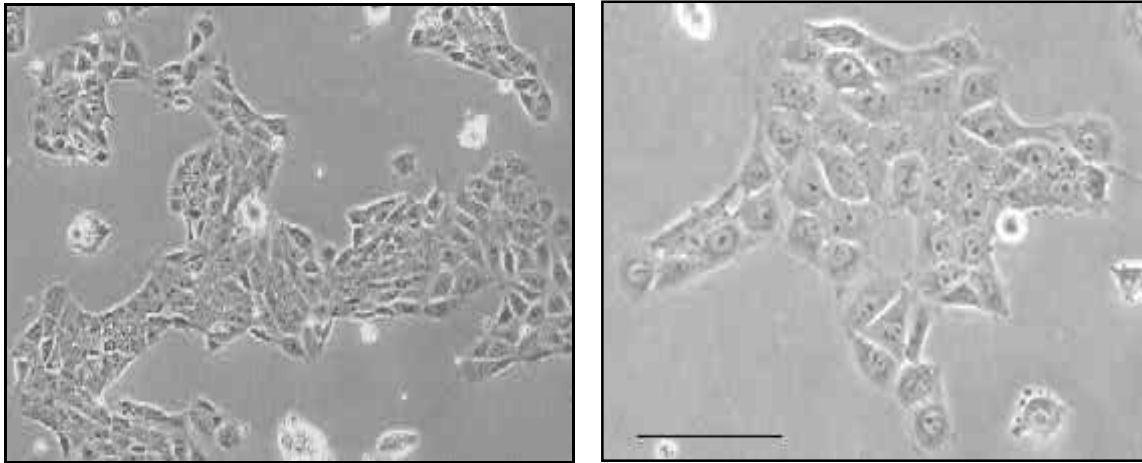
Eine Zellart wuchs in der Kultur eher vereinzelt, die Kontakte zwischen den Zellen entstanden durch lange Ausläufer, sog. Lamellipodien. Das Zytoplasma dieser Zellen war sehr dominant und sie waren um die 30  $\mu\text{m}$  groß.

Die zweite Zellart wuchs in kleinen, dichteren Strukturen. Die Zellen lagen in einem engen Kontakt zueinander und bildeten eine Art Kopfsteinpflaster. Wir konnten eine maximale Größe von 15  $\mu\text{m}$  feststellen. Des Weiteren fehlten auch die oben beschriebenen Ausläufer.

Durch kontinuierliche Verdünnung wurde die heterogene Zellkultur vereinzelt, und eine Zelle jeder Zellart subkloniert. Die neu entstandenen Zelllinien hießen RHE A bzw. RHE neg..



**Abb. 1:** Phasenkontrastbilder von RHE A Zellen:  
links: 10x vergrößert, Balken = 40  $\mu\text{m}$ , rechts: 20x vergrößert



**Abb. 2:** Phasenkontrastbilder von RHE neg. Zellen:  
links: 10x vergrößert, Balken = 40  $\mu$ m, rechts: 20x vergrößert

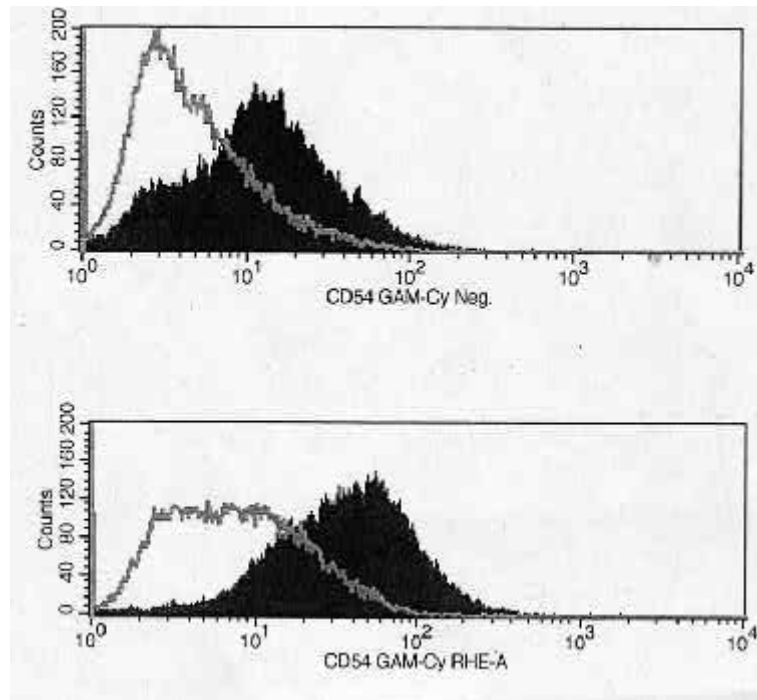
### 3.1.2 Bestätigung des endothelialen Charakters von RHE A und RHE neg. Zellen

Es ist bekannt, dass Zellen sich in Zellkultur verändern können. Um den endothelialen Charakter der subklonierten Zelllinien RHE A und RHE neg. zu bestätigen, färbten wir diese mit verschiedenen Antikörpern gegen endothelspezifische Proteine und untersuchten diese in der Durchflusszytometrie. Dazu gehörten u.a. CD 54, Flk-1, Flt-1 etc.

Den unten stehenden Abbildungen ist zu entnehmen, dass das endotheliale Markerprotein CD 54 signifikant exprimiert wird.

In der Durchflusszytometrie ist deutlich eine Verschiebung der gefärbten Zellen in den intensiveren Fluoreszenzbereich erkennbar. Ähnliche Kurven erhielten wir nach Färbung der Zellen mit anderen, oben genannten Markern. Somit konnten der endotheliale Charakter der neuen Zelllinien RHE A und RHE neg. bestätigt werden.

Die nicht ausgefüllten Kurven stellen die mit einer Isotypkontrolle gefärbten Zellen dar, die ausgefüllten Kurven repräsentieren die Signale der spezifisch gefärbten Zellen.



**Abb. 3:** Durchflusszytometrische Analyse von RHE A und RHE neg. Zellen gegen das endothelspezifische Markerprotein CD 54.

### 3.1.3 Migrationsvermögen der RHE Zellen

Da die Zelllinien RHE A und RHE neg. sich in ihrem Phänotyp stark unterschieden, vermutete man eine unterschiedliche Fähigkeit, sich auf dem Boden anhand der Lamellipodien fortzubewegen. Um diesen dynamischen Vorgang sichtbar zu machen, wurden in der Arbeitsgruppe Versuche mit der TimeLapse Videomikroskopie durchgeführt: In 50 ml Kulturflaschen wurden die Zelllinien bis zu einer 70%igen Konfluenz herangezogen, im Brutschrank mit Kulturmedium inkubiert und auf einem vorgewärmten Mikroskopiertisch gelegt. Mit einer CCD-Kamera erfolgten Aufnahmen über sieben Stunden in einminütigen Abständen. Mithilfe der Imagoquant Multi-Track Software Version 2.01 wurde die Migrationsgeschwindigkeit und der Migrationsweg ermittelt.

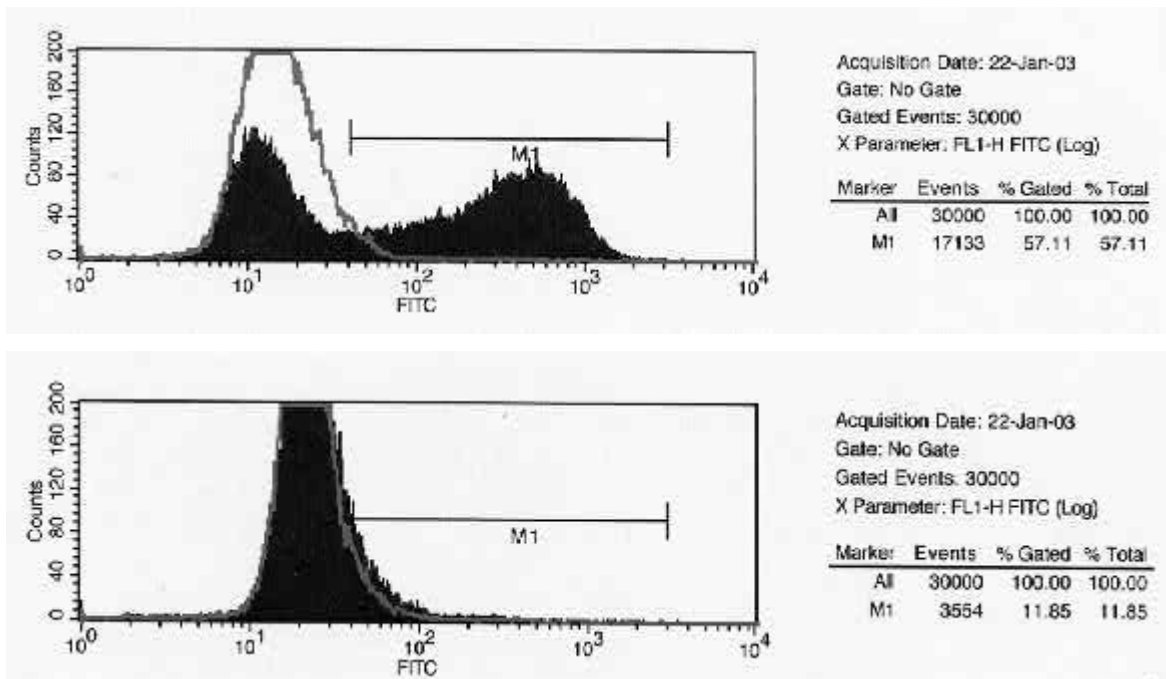
Resultat dieser Untersuchung war eine individuelle Migration der RHE A Zellen. Die Zellen zeigten zunehmende Entfernung vom ursprünglichen Zellverband mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $0,1 \mu\text{m}/\text{min}$ . Bei den RHE neg. Zellen wurde dieses Phänomen nicht beobachtet. Sie bewegten sich mit  $0,04 \mu\text{m}/\text{min}$  nicht halb so schnell fort.

### 3.1.4 Proliferationsverhalten

Während der Zellkultivierung zeigte sich ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der Zellen. Die RHE neg. Zellen schienen wesentlich teilungsaktiver zu sein.

Sie wuchsen in dichten Zellpaketen unter Ausbildung des typischen „Kopfsteinpflasters“. Bei der Passage mussten die RHE A Zellen im Verhältnis 1:3, die RHE neg. Zellen dagegen im Verhältnis 1:5 getrennt werden. Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurden Experimente mit dem Thymidin-Analogon Bromodesoxyuridin (BrdU) durchgeführt, das bei der Teilung der Zellen in ihre DNS eingebaut wird. Durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen das BrdU wurden die proliferierten Zellen markiert und durch FACS-Messung gezählt.

Die unten angeführte Abbildung stellt das unterschiedliche Wachstumsverhalten der RHE A und der RHE neg. Zellen im Vergleich dar.



**Abb. 4:** FACS-Analysen nach Färbung des BrdU durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens. 12% der RHE A Zellen und 57% der RHE neg. Zellen haben das BrdU eingebaut. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N. Obermeyer 2004)

Nach einer zweistündigen Inkubationszeit haben ungefähr 12% der RHE A Zellen (Abb. 4 unten) und etwa 57% der RHE neg. Zellen (Abb. 4 obere Kurven) das BrdU in ihre DNS eingebaut.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen in der Zellkultur. RHE neg. Zellen bilden eine stark proliferierende Zelllinie, während die RHE A Zellen eher die Tendenz zur Migration zeigen.

Beide Zelllinien eignen sich somit zu in vitro Untersuchungen über Proliferation und Migration von Zellen.

## **3.2 In vitro Auswirkungen der Aktivierung des transmembranösen Proteins auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen sowie die Adhärenz von Makrophagen**

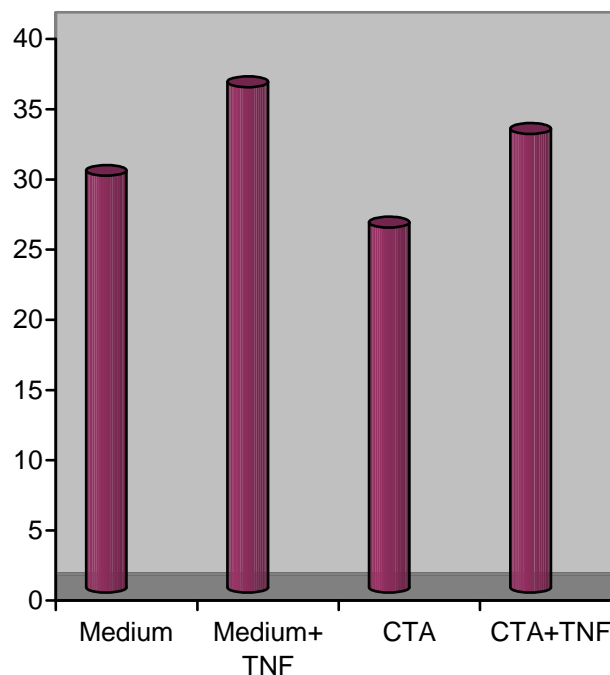
### **3.2.1 Migrationsverhalten der Endothelzellen unter Einfluss von CTA 157-2**

Wie oben bereits erwähnt, konnte gezeigt werden, dass beide Zelllinien in unterschiedlicher Schnelligkeit migrieren. Von Interesse war es nun, zu testen, inwieweit der isolierte Antikörper Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Endothelzellen hat. Man verwendete für diese Versuchsreihe nur RHE A Zellen, da sich diese durch ihre schnellere Migrationsgeschwindigkeit besser eignen. Nach Inkubation der Zellen in Petrischalen auf Thermanox-Plättchen wurden diese in 6-well-Platten ausgelegt und weitere zwei bis drei Tage inkubiert. Das Zytokin TNF- $\alpha$  alleine und in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper CTA 157-2 wurde verwendet, um die Auswirkung auf das Migrationsverhalten der Zellen zu testen. Nach Entfernen der Plättchen wurden die Zellen aus drei wells des gleichen Mediums zusammengefasst und in Formaldehyd für die Zählung im FACS-Gerät suspendiert.

Probe	Medium	TNF- $\alpha$	CTA 1:100	CTA+TNF- $\alpha$
1	41,28	39,46	34,73	26,61
2	26,7	39,84	18,23	28,35
3	26,27	26,73	20,76	34,32
4	25,24	49,46	20,12	47,17
5	28,84	27,24	34,61	16,62
6	29,81	33,77	0	42,96
<b>Mittelwert</b>	29,69	36,08333333	25,69	32,6716667
<b>Standardabw.</b>	5,92459281	8,66591638	8,25029393	11,2413975

**Tab. 1:** Anzahl der migrierten Zellen in den verschiedenen Medien mit bzw. ohne Zusatz von CTA und TNF- $\alpha$  (gezählte Zellen in Prozent)

Wie in der oben angeführten Tabelle und anschließenden Graphik erkennbar ist, scheint der kollateralspezifische Antikörper CTA 157-2 keinen Einfluss auf die Migration der Endothelzellen zu haben. Man sieht, dass im Medium ohne Zusatz im Mittel etwa 30% der Zellen migrierten, während es nach Blockade von CTA 157-2 durchschnittlich nur 26% waren. Nicht weiter überraschend ist, dass TNF- $\alpha$  zu einer verstärkten Migration der Endothelzellen geführt hat, hier waren es rund 36% der Zellen. Eine statistische Signifikanz zeigte sich nicht.



**Abb. 5:** Migrationsverhalten von RHE A Zellen in verschiedenen Medien (in Prozent)



### 3.2.2 Proliferationsvermögen unter Einfluss von CTA 157-2

In den vorangegangenen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass der Antikörper gegen das kollateralspezifische Antigen keinen Einfluss auf die Migration der Zellen hat. Von näherem Interesse war es nun herauszufinden, ob das Antigen eine Rolle bei der Proliferation der Zellen spielt. Es galt zu prüfen, welchen Einfluss der Antikörper spielt, und ob diese Antigen-Antikörper-Reaktion von der Konzentration des Antikörpers abhängt. Die Zellen wurden dafür in einem Medium mit Antikörper CTA 157-2 inkubiert. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen dann mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers inkubiert.

### 3.2.3 Proliferation der RHE A Zellen in verschiedenen Medien

Wie in der nachfolgenden Tabelle gezeigt, führte die Behandlung der Zellen mit dem Antikörper CTA 157-2 zu einer Abnahme der Proliferationsrate.

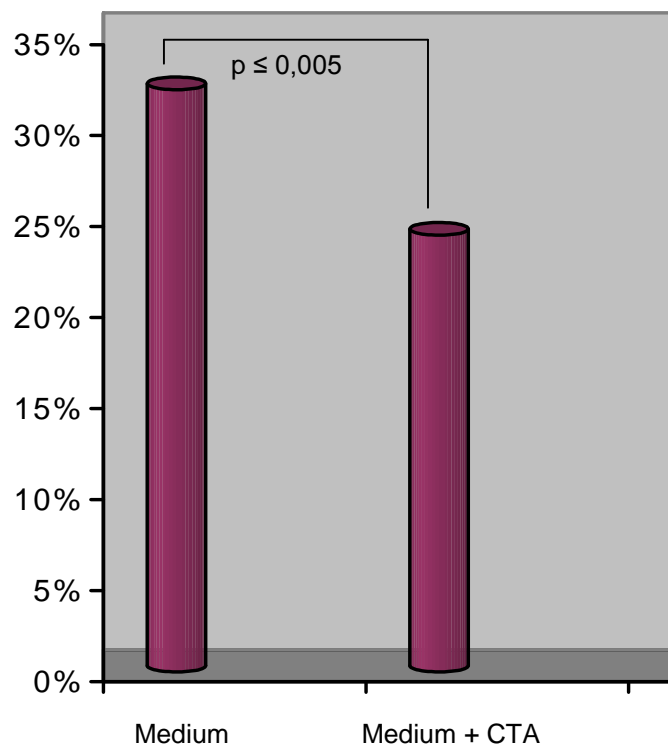
Probe	Medium	CTA
1	28,09	22,96
2	24,96	30,36
3	28,38	24,18
4	46,91	21,08
5	31,07	27,12
6	42,57	26,17
7	28,7	17,75
8	35,8	24,79
9	28,32	22,77
10	34,84	26,05
11	26,13	17,27
12	29,13	27,47
<b>Mittelwert</b>	32,075	23,9975
<b>Standardabweichung</b>	6,75826968	3,89952241

**Tab. 2:** Proliferation der RHE A Zellen im Medium im Vergleich zu einer Zugabe von CTA 157-2. Von jeder Probe wurden in der FACS Messung 20.000 Zellen als maximale Zellzahl analysiert (Angaben in Prozent)

Es wurde eine gleich große Anzahl von Zellen im Medium allein und mit Zusatz von CTA 157-2 in einer Konzentration von 15 µg/ml inkubiert. Durchschnittlich

proliferierten im Medium 32% der Endothelzellen, während es durch Zugabe des Antikörpers zu einer Abnahme der proliferierten Zellen kam. Die Zellzahl lag hier im Mittel bei 24%.

Die unten stehende Graphik verdeutlicht den statistisch signifikanten Unterschied.



**Abb. 6:** Proliferation von RHE A Zellen in Medium mit und ohne Zusatz von CTA 157-2. Nach Zugabe des CTA-Antikörpers 157-2 proliferieren statistisch signifikant weniger Zellen ( $p < 0,005$ ). Der Antikörper liegt hier in einer Konzentration von 15  $\mu\text{g/ml}$  vor.

### 3.2.4 Proliferationsrate der RHE A Zellen nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an CTA 157-2

Da sich eine Auswirkung des Antikörpers auf die Proliferationsrate der Endothelzellen zeigte, wurde im Folgenden geprüft, ob man einen bestimmten Konzentrationsbereich definieren kann, in dem die Proliferationsrate am stärksten abnimmt. Die RHE A Zellen wurden deshalb mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers CTA 157-2 versetzt.

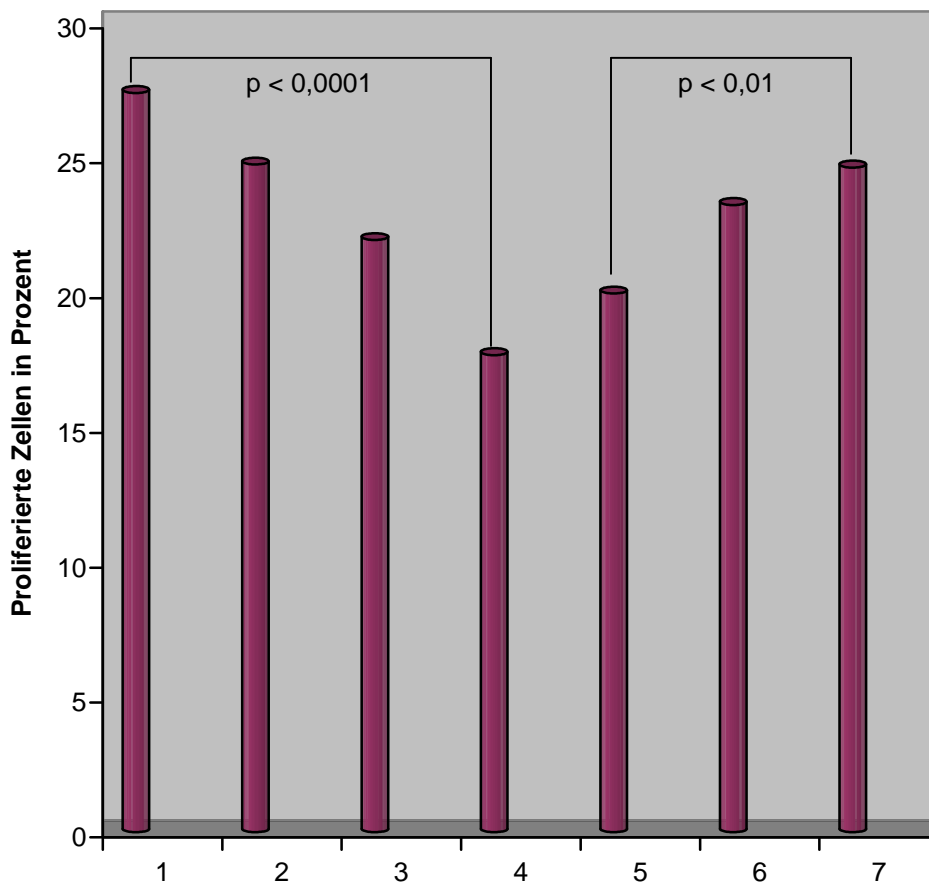
Probe	Medium	CTA 5µg/ml	CTA 10µg/ml	CTA 14µg/ml	CTA 17µg/ml	CTA 20µg/ml	CTA 25µg/ml
1	24,37	22,59	23,32	18,7	19,63	24,05	24,8
2	28,44	33,53	16,21	21	22,02	19,46	24,64
3	31,91	27,86	26,5	0	19,25	23,52	22,16
4	20,6	19,14	25,69	19,19	21,77	23,88	28,93
5	27,13	21,91	25	12,46	20,91	23,56	24,07
6	29,99	24,3	24,39	28,68	19,29	21,08	25,15
7	25,44	26,57	14,13	18,15	21,53	25,15	22,02
8	31,45	28,3	22,23	21,14	17,98	23,61	24,58
9	0	18,66	20,2	19,94	17,41	25,05	25,5
<b>Mittelwert</b>	27,41625	24,7622222	21,9633333	17,6955556	19,9766667	23,2622222	24,65
<b>Standardabw.</b>	9,26162693	4,52361649	4,06970378	7,39723388	1,576543336	1,74027953	1,90822198

**Tab .3:** Prolifizierte Zellen in Prozent nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers CTA 157-2

Die auf der vorangehenden Seite dargestellte Tabelle zeigt die gemessenen Zellzahlen im Verhältnis zu einer vorher festgelegten Zellzahl in Prozent.

Auffallend ist, dass mit zunehmender Konzentration des CTA-Antikörpers die proliferierten Zellen zunächst abnehmen. Im Medium ohne Antikörperzusatz vermehrten sich 27% der Zellen, bei einer CTA Konzentration von 15 µg/ml waren es nur noch 18%. Bei höherer Konzentration des Antikörpers stieg die Rate an Zellteilungen wieder bis auf 25%.

Interessanterweise zeigte sich die stärkste Hemmung der Proliferation in einem engen Konzentrationsbereich um 15 µg/ml von CTA 157-2.



**Abb. 7:** Proliferationsrate in Prozent nach Inkubation der Zellen im Medium allein und mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers CTA 157-2 (1 = Medium; 2 = CTA 5 µg/ml, 3 = CTA 10 µg/ml, 4 = CTA 14 µg/ml, 5 = CTA 17 µg/ml, 6 = CTA 20 µg/ml, 7 = CTA 25 µg/ml)  
Der kollateralspezifische Antikörper CTA 157-2 führt konzentrationsabhängig bei einer Konzentration von 15 µg/ml zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation von Endothelzellen *in vitro* ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.0001$ ).

### 3.2.5 Auswirkungen von CTA 157-2 auf die Adhäsion von Makrophagen

Studien konnten zeigen, dass Makrophagen u.a. durch Produktion von angiogenen Faktoren (bFGF, TNF- $\alpha$ ) eine wichtige Rolle bei der Arteriogenese spielen. Ihre Akkumulation wird durch eine Reihe von so genannten Selektinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen, die auf Endothelzellen in bestimmten Situationen hochreguliert werden, gebahnt. Es ist bisher jedoch wenig über die Regulation von Zelladhäsionsmolekülen bzw. Chemokinen in Kollateralarterien bekannt.

In dieser Versuchsreihe sollte herausgefunden werden, ob das Antigen bzw. seine Bindung durch den Antikörper eine Rolle bei der Adhäsion von Makrophagen an die Endothelzellen spielt.

Alveolarmakrophagen der Ratte wurden auf Objektträger gegeben, auf denen bereits durch mehrere Arbeitsschritte Endothelzellen, die in unterschiedlichen Medien inkubiert wurden, ausplattiert waren. Nach mehreren Waschvorgängen und spezifischer Färbung der Makrophagen wurden Fotos von den Objektträgern gemacht.

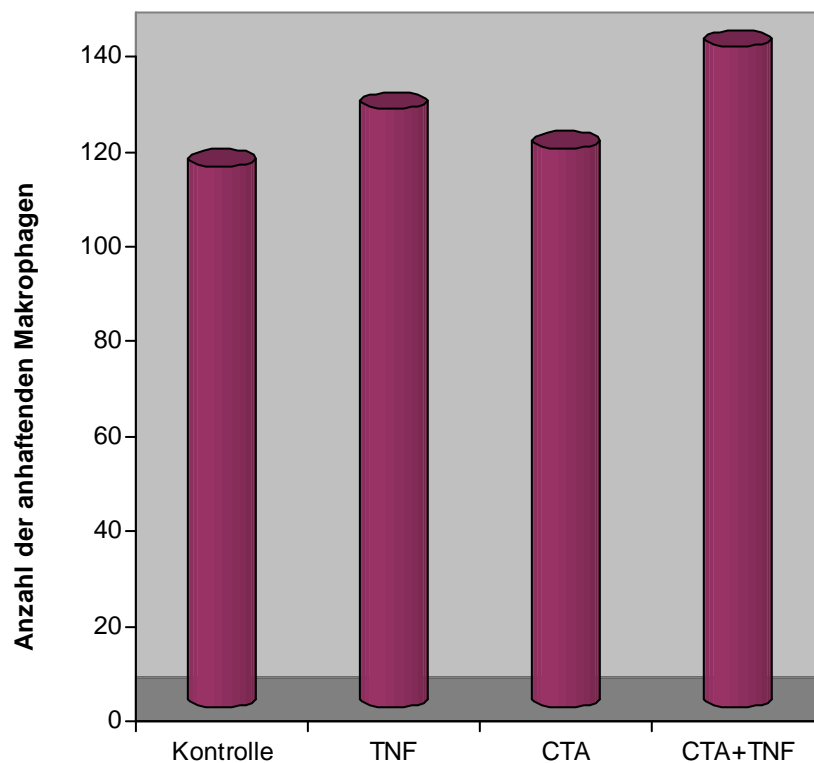
Die Mittelwerte von jeweils vier ausgezählten Objektträgern sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Medium	TNF- $\alpha$	Medium	CTA	TNF- $\alpha$ +CTA
OT 1	143,5	126,33	119	146,66
OT 2	142,83	151,66	113,6	113,5
OT 3	110,5	98	112,6	144,6
OT 4	107,66	80,16	125,6	152
<b>Mittelwert</b>	126,08	114,02	117,82	139,20
<b>Standardabw.</b>	19,76	31,44	5,96	17,48

**Tab. 4:** Mittelwerte der gezählten Makrophagen auf den einzelnen Objektträgern (OT). Die Werte entstanden durch Auszählung von jeweils drei Fotos eines Feldes auf dem Objektträger.

Bei Betrachtung der Daten fällt auf, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Adhärenz der Makrophagen gibt. Nach Zugabe von Hybridomazellüberstand mit produziertem CTA-Antikörper akkumulierten

annähernd gleiche viele Makrophagen wie im Medium allein. Die vermehrte Akkumulation durch TNF- $\alpha$  wird bekanntermaßen unter anderem durch eine Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen bewirkt. Aufgrund der starken Streuung der Werte kam es in diesen Versuchen zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden.



**Abb. 8:** Unterschiedliche Adhäsionen von Makrophagen an Endothelzellen im Medium allein (Kontrolle), im Medium mit TNF- $\alpha$ , im Medium mit CTA und im Medium mit TNF- $\alpha$  und verdünntem Hybridomazellüberstand

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der Zellen

#### 4.1.1 Angiogenese und Arteriogenese

Angiogenese und Arteriogenese sind komplexe Vorgänge, basierend auf dem intensiven Zusammenspiel von Zellen, löslichen Faktoren und Matrix. Analog zur in vivo Angiogenese durchlaufen die eingesetzten Endothelzellen auch in vitro die verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade, nämlich Migration, Proliferation und Differenzierung in kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen. Die Bildung eines neuen Gefäßes in vivo ist ein zweiphasiger Prozess: nach einer Phase der Zellproliferation folgt die Phase der Reifung, für die eine Migration von Endothel- und Muskelzellen nötig ist (Herzog et al. 2002). Doch nicht nur bei der Gefäßneubildung, sondern auch bei der Reparatur eines verletzten Gefäßes erfolgt die Wiederherstellung eines intakten Endothels durch die Migration von benachbarten Endothelzellen (Sprague et al. 2000). Andererseits ist die Migration auch bei der Arteriosklerose ein wichtiger Prozess, der in der Bildung eines arteriosklerotischen Plaques resultiert. Der Vorgang der Zellmigration wird von diversen Proteinen wie VEGF, Metalloproteinase 1 und fibroblast growth factor (FGF) sowie im Zusammenspiel mit Integrinen und dem Zytoskelett gesteuert (Nishizaka et al. 2000; Wang et al. 2001).

Um diese komplexen Vorgänge näher betrachten zu können, versuchte man, ein reproduzierbares Modell zu entwickeln, welches erlaubt, die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie die Adhärenz von Makrophagen in vitro genau zu untersuchen. Dabei war natürlich wichtig, so genau wie möglich eine in vivo Situation zu reflektieren.

#### **4.1.2 Zelllinien versus Primärzellen**

An Zellkulturen lassen sich grundlegende physiologische Studien betreiben, ferner sind sie gut geeignet, um Auswirkungen von Substanzen und Substanzgemischen zu erfassen.

Ein ganzes Arsenal von Zellkultursystemen steht derzeit für Ersatzmethoden zum Tierversuch zur Verfügung. Generell lassen sich zwei Ansätze unterscheiden:

Aus dem Gewebe eines Tieres können Primärzellen direkt entnommen und nach mechanischer oder enzymatischer Vereinzelung kultiviert werden. Oder man verwendet permanente Zelllinien, die im Labor vermehrt werden können.

Vorteil der Primärzellen ist, dass sie zumindest zu Beginn der Kultur meist noch den entsprechenden Zellen in vivo ähneln und die physiologischen Fähigkeiten des Organs in vitro nachahmen können. Allerdings besteht die Gefahr der Dedifferenzierung während der Kultur; zudem muss bei ihrer Verwendung mit erheblichen interindividuellen Unterschieden gerechnet werden. Außerdem besitzen Primärzellen nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit und können oft nur über Tage bis Wochen am Leben erhalten werden.

Eine viel verwendete Alternative stellen Zelllinien dar, die durch eine genetische Veränderung unbegrenzte Teilungsfähigkeit erlangt haben. Häufig gehen diese Zelllinien auf entartete Stammzellen, meist Krebszellen, zurück oder sind vermehrungsfähige ursprüngliche Primärzellen mit beschränkter physiologischer Fähigkeit. Oft sind sie mit einem Krebs erzeugenden Agens behandelt worden, mit der Folge einer malignen Transformation. Neben der Immortalität weisen Zelllinien gegenüber Primärzellen den Vorteil der Homogenität auf, d.h. sie besitzen einheitliche physiologische Grundmerkmale. Des Weiteren sind sie robuster. Sie sind weniger anfällig für spontane Mutationen oder veränderte Genexpressionen.

Allerdings können auch Zelllinien im Verlauf der Passagen ihre Eigenschaften ändern. Man muss sich zudem immer vor Augen halten, dass sie gegenüber den nicht transformierten Zellen in vivo bedeutende Unterschiede aufweisen können. Ein weiterer Nachteil, der allerdings sowohl Primärzellen als auch



Zelllinien betrifft, ist die letztlich doch limitierte Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf das Tier bzw. den Menschen.

Während eine Substanz in vitro direkt am Ziel agiert, sprich an der Zelle selbst, durchläuft die Substanz im Tier extrem unterschiedliche Strukturen.

In dieser Arbeit wurde für die Studien eine Zelllinie mit Endothelzellen aus dem Rattenherzen verwendet. Endothelzellen dienen als erste Sensoren für Veränderungen der Gefäßdynamik wie z.B. eine erhöhte Schubspannung (Resnick et al. 2003). Sie übersetzen einen mechanischen Stimulus direkt in biochemische Reaktionswege, die dann weitere Signalkaskaden auslösen.

#### **4.1.3 Endothelzellen vom Rattenherz**

Die ursprünglich von Derhaag et al. isolierten und beschriebenen Zellen mussten nicht mit einem Onkogen transfiziert werden, da sie spontan immortalisiert waren. Sie eigneten sich daher gut, um eine in vivo Situation zu imitieren. Die Zellen wurden auf sämtliche endotheliale Marker positiv getestet, um ihren endothelialen Charakter zu bestätigen und nach in vivo Injektion entwickelten sich daraus Hämangiome.

Es zeigte sich während der Kultur, dass diese Zelllinie aus einer heterogenen Population bestand. Man beobachtete zwei phänotypisch verschiedene Zellen, differenzierend in Größe, Wachstums- sowie Fortbewegungsverhalten. Durch Verdünnung der Kultur wurden sie vereinzelt und eine Zelle eines jeden Typs geklont. Aus der anfänglich verwendeten Zellkultur konnten so zwei neue Zelllinien von Endothelzellen gewonnen werden, die als RHE A bzw. RHE neg. bezeichnet wurden (Obermeyer et al. 2003). Um ihren endothelialen Charakter zu bestätigen, wurden diese Zellen erneut mit verschiedenen Antikörpern gegen endotheliale Antigene behandelt. Beide Zelllinien exprimierten CD54, Flk-1, Flt-1 und VE-Cadherin, alles endotheliale Marker. Des Weiteren konnte kein Unterschied in der Stärke der Expression der Markerproteine zwischen den RHE A Zellen und den RHE neg. Zellen festgestellt werden. Dies bedeutet, dass während der Klonierung keine Veränderung des endothelialen Phänotyps der Zellen stattfand. Ein epithelialer Charakter wurde durch Färbung mit zwei Zytokeratin-Antikörpern ausgeschlossen. Die Zelllinie exprimierte kein

Zytokeratin, wohingegen sich mit diesen Antikörpern das Zytokeratin anderer Zellen von Haut und Darm der Ratte darstellen ließ (Obermeyer et al. 2003).

Obwohl beide Zelllinien aus einem Elternklon stammten, konnten bei ihnen klare Unterschiede im Migrationsverhalten und in der Proliferationsgeschwindigkeit festgestellt werden, wobei der größte Unterschied der zwei Zelllinien in ihrem Aussehen lag:

Die RHE A Zellen waren wesentlich größer und erreichten durchschnittlich eine Größe von etwa 30  $\mu\text{m}$ . Sie wuchsen vereinzelt in Form einer Monolayer. Zusätzlich besaßen sie zahlreiche Lamellipodien, Filopodien und Pseudopodien und zeigten eine spontane amöbenartige Bewegung auch ohne einen chemotaktischen Reiz. Die Arbeitsgruppe konnte anhand videomikroskopischer Aufnahmen eine Migrationsgeschwindigkeit von 1  $\mu\text{m}/\text{min}$  zeigen.

Die RHE neg. Zellen dagegen waren wesentlich kleiner bei einer Größe um 15  $\mu\text{m}$  und wuchsen im Gegensatz zu den RHE A Zellen viel dichter und in mehreren Schichten. Sie bildeten dadurch ein typisches, kopfsteinartiges Pflaster. Lamellipodien und Filopodien fanden sich nicht. Dies spiegelte sich auch in ihrer Fortbewegung wieder. Diese erfolgte nur im Verband mit anderen Zellen, niemals vereinzelt wie bei den RHE A Zellen, und dabei wesentlich langsamer. Die durchschnittliche Geschwindigkeit lag bei den RHE neg. Zellen bei nur 0,04  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Somit migrierten die RHE A Zellen mehr als doppelt so schnell wie die RHE neg. Zellen.

Durch das unterschiedliche Migrationsverhalten waren diese Zellen also bestens geeignet für Studien über Bewegungsabläufe.

Als man sich das Proliferationsverhalten ansah, fiel auf, dass RHE A Zellen mehr als zweimal so viel Zeit zur Teilung benötigten wie die RHE neg. Zellen. Letztere benötigten ungefähr fünf Stunden, um sich zu verdoppeln. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden die Zellen mit dem Thymidin-Analogen Bromodesoxyuridin (BrdU) inkubiert. Nach Behandlung mit einem fluoreszierenden Antikörper wurde die Analyse mittels der Durchflusszytometrie durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach zwei Stunden rund 50% der RHE neg. Zellen das BrdU inkorporiert hatten, während es bei den RHE A Zellen lediglich 15% waren. Das bedeutet, dass sich ungefähr 25% der RHE neg. Zellen nach

zwei Stunden geteilt hatten. Das entspricht einer Proliferationsrate von 33%. Um herauszufinden, ob die geringere Proliferationsrate der RHE A Zellen in einem zu geringen Zellkontakt begründet liegt, wurde der Versuch mit einer Zellkultur wiederholt, in der die Zellen in doppelter Dichte vorlagen, und somit dichter als die RHE neg. Zellen wuchsen. Es konnte damit keine höhere Zellproliferationsrate erreicht werden, sie blieb gleich bei ungefähr 11% in zwei Stunden. Somit war eine Inhibition der Wachstumsrate durch einen zu geringen Zellkontakt ausgeschlossen. Zusammenfassend zeigen die RHE neg. Zellen also ein schnelleres Wachstum als die RHE A Zellen, und unterscheiden sich auch in der Mobilität. Es lassen sich also mit der Zelllinie nicht nur Studien über die Migration, sondern auch über die Proliferation durchführen. Beide Vorgänge bestimmen wesentlich den Vorgang des Kollateralwachstums.

#### **4.2 Modelle zur in vitro Untersuchung der Angiogenese**

In dem Bemühen, Tierversuche auf ein minimales Maß zu reduzieren, muss die Methode und Effizienz endothelzellspezifischer genregulatorischer Elemente in vitro getestet werden. Hierfür ist es notwendig, realitätsnahe in vitro Modelle der Angiogenese mikrovaskulärer Endothelzellen zu etablieren, also solche, in denen die Endothelzellen alle Schritte der Angiogenese durchlaufen und dreidimensionale kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen bilden können. Von der physiologischen Seite betrachtet, muss ein in vitro Modell alle Schritte der Angiogenese berücksichtigen: Lösung der Endothelzellen aus ihrem Verband, Reifung und Zusammenschluss zu einem funktionierenden Netzwerk (Vailhé et al. 2001). Weiterhin muss es schnell und einfach durchführbar sein, reproduzierbare Ergebnisse schaffen und leicht quantifizierbar sein.

Die ersten in vitro Beobachtungen über die Angiogenese wurden bereits vor über zwanzig Jahren durch Folkman und Haudenschild gemacht. Sie beobachteten die spontane Bildung von kapillarähnlichen Strukturen nach einer längeren Kultivierung von Endothelzellen (Folkman 1980). Inzwischen wurden viele in vitro Modelle mit Endothelzellen aus unterschiedlichen Geweben und

Organen entwickelt, welche zum genauen Verständnis der Angiogenese beigetragen haben (Vailhé et al. 2001). In diesen in vitro Assays kann eine Analyse über die meisten Stadien der angiogenen Kaskade einschließlich Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen erfolgen (Montesano et al. 1992).

Die Migration von Endothelzellen kann beispielsweise anhand der Boyden-Kammer beobachtet werden, in der eine Bewegung der Zellen in Richtung eines chemotaktischen Reizes durch eine Membran erfolgt (Malinda et al. 1999). Eine andere Methode ist das Scratching (Verletzen, Ankratzen) eines konfluenten Monolayers von Zellen, woraus im Folgenden die Migration von Zellen in den freien Bereich beobachtet werden kann (Bussolino et al. 1992).

Modelle zur Untersuchung der Proliferationsrate basieren auf Zellzählungen (Trochon et al. 1998; Rymaszewski et al. 1991), Thymidin-Inkorporation (Rymaszewski et al. 1991) oder immunhistochemischer Färbung proliferierender Zellen mit Antikörpern gegen PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und anschließender Zählung immunpositiver Zellen (Ahmad et al. 2001).

Des Weiteren unterscheidet man in der Literatur grundsätzlich zwischen zwei- und dreidimensionalen Modellen:

Bei den beschriebenen Zellkulturmodellen humaner Endothelzellen handelt es sich zum größten Teil um zweidimensionale Modelle (Vailhé et al. 2001), in denen sich kapillarähnliche Strukturen planar zur Oberfläche der Kulturschalen bilden. Als Beschichtungen der Schalen dienen adhäsive Proteine oder Gele aus Kollagen, Fibrin oder Matrigel® (Vernon et al. 1995).

Eine dreidimensionale Organisation kapillarähnlicher Strukturen mit einem zentralen Lumen wird nur nach Kultivierung von Endothelzellen unter Einsatz dreidimensionaler Polymere beschrieben (Kollagengele, gereinigtes Fibrin) (Auerbach et al. 2000; Vailhé et al. 2001).

Letztere sollen eher eine in vivo Situation reflektieren, da sie die Formation eines Gefäßes im dreidimensionalen Raum während des Versuchsablaufs erlauben. Nach Kultivierung und Stimulation konfluenter Zellen können sie sich im Gel ausbreiten und kapillarähnliche Strukturen im Raum ausbilden

(Montesano and Orci 1985). Stadien der Angiogenese können hier eher nachvollzogen werden.

#### **4.2.1 Entwicklung eines Modells zur Untersuchung der Migration und Proliferation von Endothelzellen**

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Prozess der Migration und Proliferation von Zellen *in vitro* näher zu beschreiben. Dazu wurde ein zweidimensionales Modell erstellt, um reproduzierbare Versuche durchzuführen.

Nachteil dieser Methode ist, dass nicht alle Aspekte der Angiogenese reflektiert werden. Bei den zweidimensionalen Versuchen fehlt die dritte Dimension, deshalb sind sie eher geeignet, die Intussuseption als die Sprossung von Kapillaren zu repräsentieren (Vernon and Sage 1995). Auch beeinflussen die Zellzahl, die Zellproliferationsrate und die Konzentration sowie die biochemische Zusammensetzung der Medien wesentlich den Erfolg dieser Versuche (Vailhé et al. 2001). Nichts desto trotz sind zweidimensionale Methoden einfach in der Handhabung und besonders zuverlässig zum Screening der *in vitro* Aktivität Angiogenese hemmender Moleküle. Weiterhin kann mit ihrer Hilfe die Rolle von Zelladhäsionsmolekülen bei der Bildung von Gefäßen und die endotheliale Matrixsynthese untersucht werden (Gamble et al. 1993).

Die Versuchsreihe zur Untersuchung der Migration begann mit einer Ausplattierung der Zellen auf Thermanox-Plättchen in Petrischalen. Der Boden der Schalen war so beschichtet, dass sich die Zellen eher auf den Plättchen ansiedelten als auf dem Boden der Schalen. Die Plättchen wurden unter der Vorstellung in Multiplatten umgesetzt, dass auf diese Weise eine Migration von den Plättchen in den verschiedenen Medien auf den Boden der Multiplatte möglich war. Tatsächlich konnte man nach der Inkubation unter dem Mikroskop Zellen entfernt vom Rand der Plättchen sehen. Natürlich muss diskutiert werden, ob bei dem Wechsel der Plättchen aus den Zellkulturschalen in die Multiplatte eine hohe Zahl Zellen abgeschwemmt wurde. Genauso bestand die Möglichkeit, dass beim Hineingleiten der Plättchen in die neue Platte Zellen

direkt auf den Boden fielen und somit das Ergebnis verfälschten. Diese Fehler ließen sich jedoch durch langsame Handhabung und unmittelbare Kontrolle der neuen Platten unter dem Mikroskop weitgehend minimieren. Ein weiteres Problem bestand in der Dichte der Besiedlung der Plättchen. Man benötigte eine gleichmäßige Dichte, da die Zelldichte eine wichtige Voraussetzung für die Migration der Zellen bildet. Außer der gleichmäßigen Besiedlung durften die Zellen nur im subkonfluenten Zustand vorliegen, da eine vollständige Konfluenz der Zellen die schnelle Bildung kapillarähnlicher Strukturen verhindert (Vailhé et al. 1997).

Vorteil der entwickelten Methode im Gegensatz zu dem weit verbreiteten „Scratching assay“ war eine bessere Standardisierung der Migrationsfront vor Beginn des Versuchs. Beim „scratching assay“, bei dem durch einen Schaber eine Straße in eine konfluente oder subkonfluente Endothelzellschicht gekratzt wird, kommt es oft zu einer sehr unregelmäßigen „Kante“, wobei einige Zellen auch im abgekratzten Bereich liegen bleiben.

Für diese Arbeit wurde für die Versuche zur Proliferation der Rattenherzendothelzellen das Thymidin-Analogon Bromodesoxyuridin (BrdU) verwendet. Anhand des Einbaus von BrdU in die DNS der Zellen sollte die Proliferationsrate bestimmt werden.

Nachteil des BrdU ist, dass es nicht nur bei der Zellteilung, sondern auch bei Reparaturprozessen in die DNS eingebaut wird und die Ergebnisse somit positiv verfälschen kann. Anhand von in vivo Experimenten zur Proliferation von Kollateralgefäßen, bei denen in den Kontrollgefäßen keine BrdU positiven Zellen zu finden waren, wird die Spezifität dieser Methode deutlich (Herzog et al. 2002).

Ein Vorteil ist, dass das BrdU nur von lebenden Zellen inkorporiert wird. Eine falsch hohe Zellzahl durch tote, nicht mehr teilungsfähige Zellen konnte somit ausgeschlossen werden.

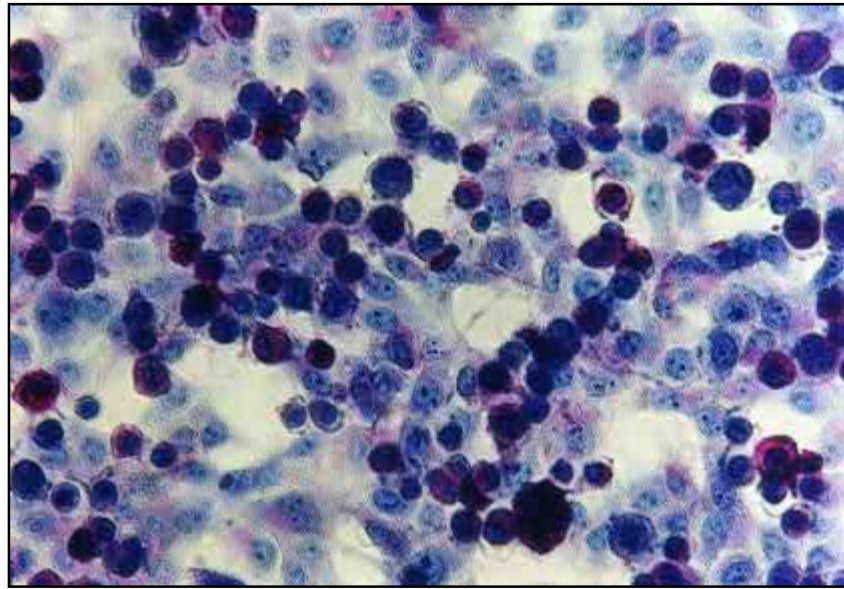
#### 4.2.2 Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen

Wenn Monozyten aus dem Blutkreislauf in ein Gewebe wandern, werden sie als Makrophagen bezeichnet. Dabei bestehen sie nicht aus einer homogenen Population, sondern aus einer Vielzahl spezialisierter Zellen. Sie heften sich während des Kollateralwachstums und der Sprossung von Kapillaren an der Wand der wachsenden Gefäße an und versammeln sich während der Zeit der maximalen Proliferation um die Gefäße (Arras et al. 1998).

Es sollte deshalb ein Modell entwickelt werden, was es erlaubt, die Adhäsion von Makrophagen an das Endothel zu untersuchen.

Die Versuchsdurchführung, die sich an gängige Methoden zur Bestimmung der Makrophagenadhäsion in vitro anlehnte, brachte jedoch einige Schwierigkeiten mit sich. Man verwendete zunächst eine Färbung nach Pappenheim. Doch die Zellzählung gestaltete sich auch nach Verdünnung äußerst schwierig, da adhärenente Makrophagen nicht von apoptotischen Endothelzellen zu unterscheiden waren. Es folgte ein Wechsel zur Färbung eines Enzyms der Makrophagen, der Sauren Phosphatase. Vorteil der neuen Färbemethode war, dass sich nur die histiozytären Zellen anfärbten, während Endothelzellen ungefärbt blieben. Man konnte jedoch nicht erkennen, ob die Makrophagen auf den Endothelzellen saßen, oder direkt auf der Oberfläche des Objektträgers hafteten. Die Gegenfärbung erfolgte dann mit verdünntem Hämalaun. Auch hier war es nicht einfach, die richtige Konzentration zu finden, da sich die gefärbten Makrophagen leicht überfärbten und nicht zu identifizieren waren. Nach erfolgreicher Färbung wurden die Ergebnisse fotografisch dokumentiert, d.h. von jedem Feld auf dem Objektträger wurden drei Fotos gemacht, und die Zellen per Hand ausgezählt. Diese Methode kann möglicherweise als zu ungenau betrachtet werden, da man sich Bereiche auf dem Objektträger suchen musste, auf denen die Zelldichte nicht zu hoch war. Nach Zählung wurden die einzelnen Makrophagen auf dem Foto farbig markiert, um eine doppelte Zählung zu vermeiden. Die Identifikation der Makrophagen gestaltete sich jedoch nach wie vor schwierig, da abgestorbene Endothelzellen ihre typische Form verlieren und sich abrunden. Sie können somit leicht mit Makrophagen verwechselt werden.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass die Methode zur Überprüfung der Makrophagenadhäsion nicht ideal erscheint, da sie eine niedrige Sensitivität und Spezifität besitzt.



**Abb. 9:** *Fotografie eines Objektträgers mit Endothelzellen und Makrophagen*

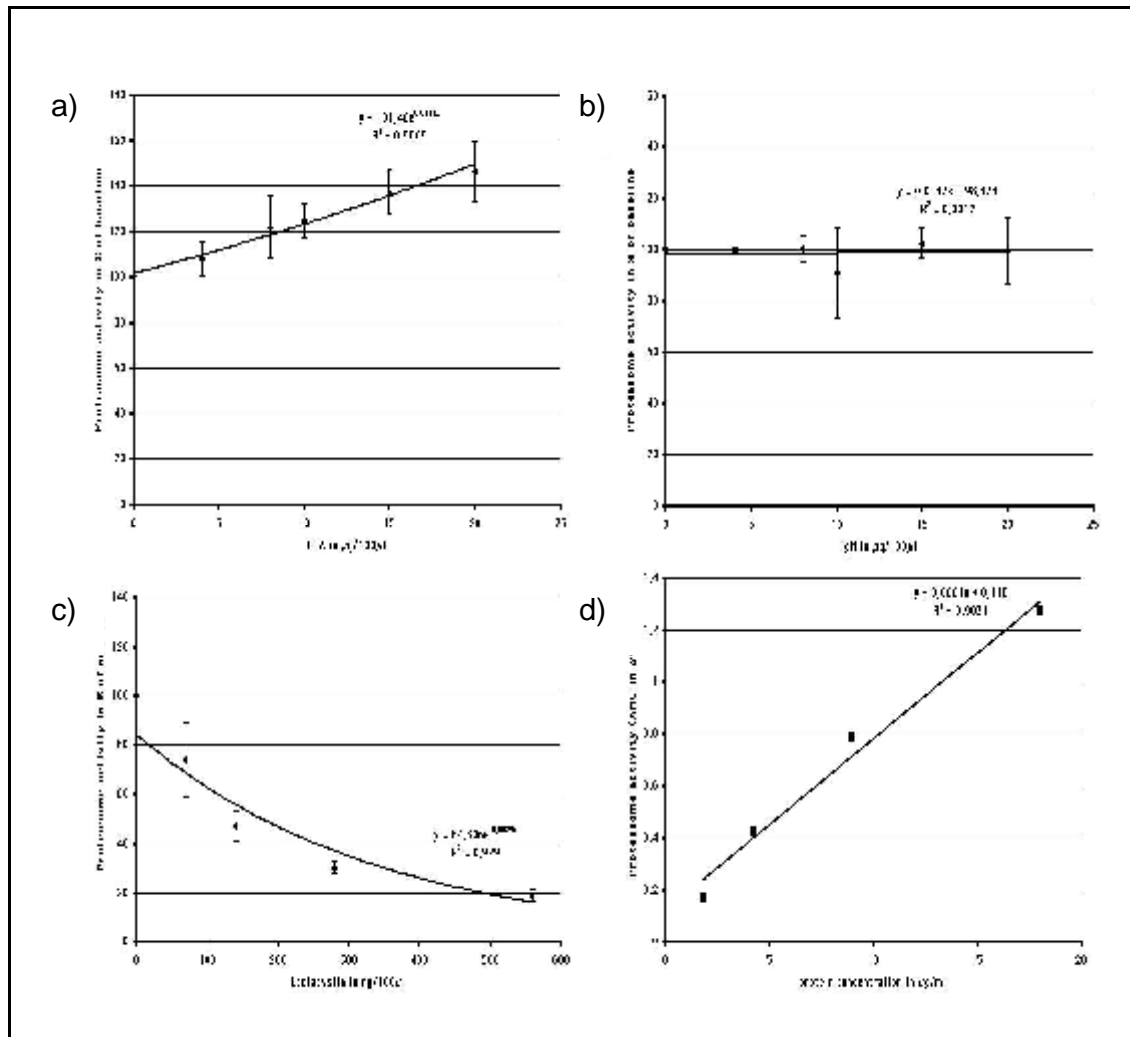
Die hellen Zellen sind Endothelzellen, die auf dem Objektträger ausplattiert wurden. Man kann gut ihre Ausläufer sowie den Zellkern erkennen. Bei den dunklen, abgerundeten Zellen ist eine Differenzierung zwischen adhärennten Makrophagen und apoptotischen Endothelzellen nicht sicher möglich.



### **4.3 Identifikation eines in Kollateralarterien regulierten Proteasoms und Fokal-Adhäsion assoziierten Antigens**

Das im ersten Teil der Arbeit entwickelte Zellkulturmodell wurde anschließend genutzt, um die Funktionalität des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 zu überprüfen. Parallel zu den oben geschilderten Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe Versuche durchgeführt, um die molekulare Identität des von CTA 157-2 gebundenen kollateralspezifischen Antigens weiter zu ergründen. Hierfür wurden Membranpräparationen der Endothelzellen vom Rattenherz durchgeführt und mittels Gel- und Ionenaustauschchromatographie näher aufgeschlüsselt.

Anhand der Untersuchungen wurde der Beweis erbracht, dass es sich um ein Antigen handelt, welches eine Größe von ca. 700 kDa besitzt und aus mehreren Untereinheiten besteht. Nach chromatographischer Reinigung konnte eine 26 kDa  $\alpha$ 7- und eine 21 kDa  $\beta$ 3-Untereinheit des 20S-Proteasoms als Teil des von CTA 157-2 gebundenen Proteinkomplexes mit Hilfe der Elektrospray Technik identifiziert werden. Die Annahme, dass es sich bei dem von CTA 157-2 gebundenen Anteil um ein Proteasom, also um einen Proteinkomplex, handelt, konnte weiter untermauert werden. Nach Hinzufügen des kollateralspezifischen Antikörpers kam es zu einer Steigerung der Aktivität eines rekombinant hergestellten 20S-Proteasoms, im Gegensatz zur Kontrolle, bei der ein unspezifischer IgM-Antikörper eingesetzt wurde. Hier fehlte eine Aktivitätssteigerung. Des Weiteren hemmte Laktazystin erwartungsgemäß konzentrationsabhängig die Aktivität. In weiteren Versuchen stimulierte CTA 157-2 konzentrationsabhängig die AMC (7-amino-4-methylcoumarin) Abspaltung von LLVY (Leucin-Leucin-Valin-Tyronin Peptid) durch gereinigtes Proteasom. Somit konnte nicht nur die Bindung, sondern die direkte Stimulation des Proteasoms durch den kollateralspezifischen Antikörper gezeigt werden.



**Abb. 10:** a) Der kollateralspezifische Antikörper CTA 157-2 führt zu einer Aktivierung des 20s Proteasoms, dagegen konnte b) bei einem Kontroll-IgM-Antikörper kein Effekt dargestellt werden. c) Laktazystin reduziert konzentrationsabhängig die Proteasomaktivität. d) Aktivierung des Proteasoms in gereinigten Membranpräparationen nach Zugabe des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2. (entnommen von Ito et al., 2004)

Die Stimulation der gereinigten Membranfraktionen mit CTA 157-2 führte ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung des Proteasoms und somit zur Inhibition der Proliferation.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei dem von CTA 157-2 gebundenen Antigen um ein membranständiges Molekül handelt. Dies wurde durch Fluoreszenzdoppelfärbungen und konfokale Analysen bestätigt. In diesen konnte gezeigt werden, dass das von CTA 157-2 gebundene Antigen und

Proteine der fokalen Adhäsionspunkte wie Paxillin, Plectin, Vinculin und  $\beta$ 3-Integrin koexprimiert waren. Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus zwei  $7\alpha$ - und zwei  $7\beta$ -Untereinheiten, wobei die sieben Proteine jeweils einen Ring bilden. Die beiden katalytischen, für die Proteindegradation zuständigen  $7\beta$ -Ringe liegen innen und werden durch die beiden  $7\alpha$ -Ringe umgeben. Erst durch Öffnen der  $\alpha$ -Ringe, was spezifisch durch einen weiteren Proteinkomplex bewerkstelligt wird, gelangt das zu degradierende Protein zu den  $\beta$ -Untereinheiten. In der Regel ist die vorherige Verbindung des zu degradierenden Proteins mit Ubiquitin notwendig (Hershko 1998; Hochstrasser 1996). Durch diesen Mechanismus des gesteuerten und spezifischen Abbaus von Proteinen ist es der Zelle möglich, sehr schnell auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Wichtige Proteine werden ständig synthetisiert und wieder proteosomal abgebaut. Durch Steuerung des proteosomalen Abbaus kann die Zelle die Expression dieser Proteine sehr schnell und sehr fein regulieren. Dementsprechend könnte die Bindung des Antikörpers CTA 157-2 an das Proteasom eine Degradation von Proteinen in der Zelle hervorrufen, die für die Feinregulierung des Kollateralwachstums notwendig sind. Daraus ergibt sich u.a. die Möglichkeit, über einen extrazellulären Liganden die proteosomale Aktivität zu steuern.

#### **4.4 Auswirkungen des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 in vitro und in vivo**

##### **4.4.1 Einfluss des Proteasom aktivierenden Antikörpers CTA 157-2 auf die Endothelzellmigration in vitro**

Es konnte gezeigt werden, dass das von diesem Antikörper gebundene Antigen keine Rolle bei der Migration von Endothelzellen zu spielen scheint. In nahezu allen Versuchsreihen war der mittlere prozentuale Anteil an migrierten Zellen im Verhältnis zu einer definierten Zellzahl ohne statistische Signifikanz. Im Medium ohne Zusatz migrierten ungefähr 30% der Zellen. Nach Zugabe von CTA 157-2 waren es 26%, man kann hier also nicht von einer Beeinflussung der Zellen

durch Bindung des Antikörpers ausgehen. Weiterhin war die Standardabweichung innerhalb einer Sorte an Medium recht hoch. Letztlich muss deshalb hier festgelegt werden, dass der kollateralspezifische Antikörper nach Stimulation des Proteasoms keinen Einfluss auf die Migration von Endothelzellen auszuüben scheint. Zusätzlich muss allerdings bedacht werden, dass die Ursache der negativen Ergebnisse vielleicht nicht nur in der fehlenden Wirkung des Antikörpers liegt, sondern ebenfalls in der Methode begründet sein kann.

#### **4.4.2 Einfluss des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 auf die Zellproliferation in vitro**

Anders verhält es sich bei der Proliferation von Endothelzellen. Wir verwendeten für diese Versuchsreihe RHE A Zellen, da nur sie das Proteasom- und Fokal Adhäsion assoziierte Antigen, wie in durchflusszytometrischen Analysen nach Färbung mit CTA 157-2 nachgewiesen wurde, an der Oberfläche exprimieren. Sie gehören zwar primär dem migrierenden Zelltyp an, jedoch befindet sich das Antigen bei der stark proliferativen Zellreihe, den RHE neg. Zellen, nur perinukleär und kann somit nicht ohne Permeabilisierung der Zellen vom Antikörper gebunden werden (Ito et al. 2004).

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass nach Zugabe des Antikörpers CTA 157-2 statistisch signifikant weniger Zellen (24%) proliferierten ( $P < 0,005$ ). In der Versuchsreihe mit Inkubation im Medium ohne Zusätze waren es 32% der Zellen im Verhältnis zu einer vorher festgelegten Gesamtzahl. D.h. bei gleicher Ausgangszellzahl sind durch Blockade des Antikörpers CTA 157-2 etwa 8% weniger Zellen proliferiert.

Von weiterem Interesse war es dann herauszufinden, ob die Abnahme der Proliferation proportional zur steigenden Antikörperkonzentration erfolgt. In einer zweiten Versuchsreihe konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Antikörper CTA 157-2 nur in einem engen Konzentrationsbereich die oben beschriebene Wirkung zeigte. Im Vergleich zu der Rate an proliferierten Zellen im Medium (Mittelwert 27%) zeigten die Zellen nach Zugabe des Antikörpers eine statistisch signifikante Reduktion ihrer Proliferationsrate (Mittelwert 17%).

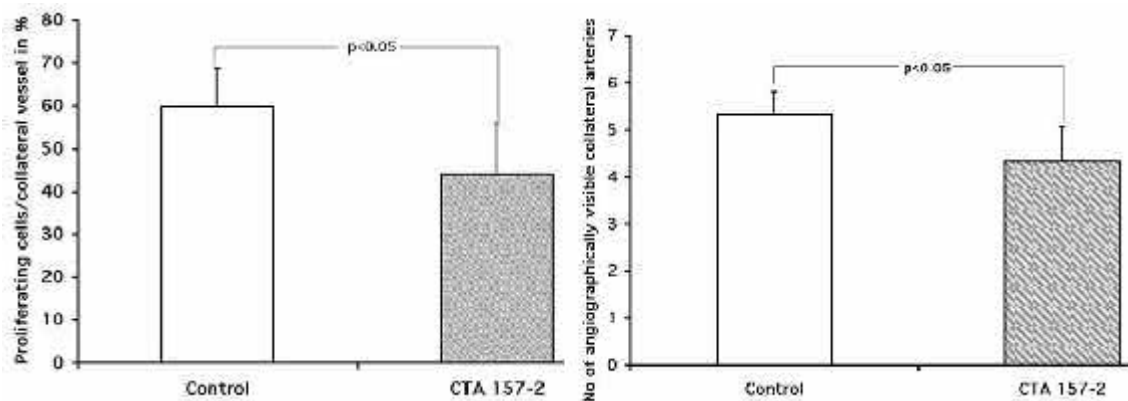
Mit zunehmender Konzentration des Antikörpers wird das Proteasom stärker aktiviert und hemmt im Folgenden die Proliferation der Zellen. Begründet wird dies in einem vermehrten Bedarf an Adhäsionsproteinen bis hin zu einem unkontrollierten Abbau. Das entstehende Ungleichgewicht führt zu einer Reduktion der Zellproliferation. Nimmt dagegen die Menge der vorhandenen Antikörper zu, steigt auch die Rate der proliferierenden Zellen wieder. Wir erklären uns diesen Befund dadurch, dass bei einem Überschuss von Antikörpern wahrscheinlich lösliche Immunkomplexe gebildet werden, die nicht mehr in der Lage sind, sich an Antigene zu binden.

#### **4.4.3 Beobachtungen zu Auswirkungen des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 auf das Kollateralwachstum in vivo**

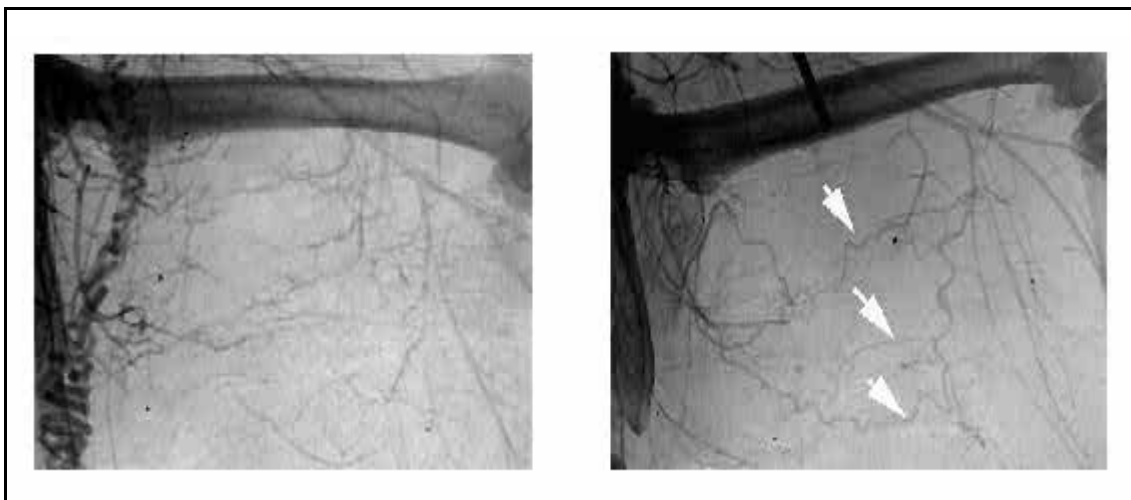
Während das Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkungen des Antikörpers CTA 157-2 auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen in Versuchen in vitro zu testen, wurde parallel dazu ein in vivo Modell an der Ratte entwickelt (in der Arbeitsgruppe durchgeführt von S. Traub). Mithilfe dieses Modells konnte erstmals eine präexistierende Kollaterale identifiziert werden, die es erlaubt, die Wirkung einer Substanz auf das Kollateralwachstum zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde eine Ligatur mit gleichzeitiger Katheterisierung der Femoralarterie vorgenommen, die es ermöglichte, den kollateralspezifischen Antikörper direkt in die Blutzirkulation zu injizieren. Zur Quantifizierung wurde die Kollateraldichte mittels stereoskopischer Auswertung der Angiographien sowie durch Färbung histologischen Materials ermittelt. Vergleicht man die Gesamtzahl der angiographisch dargestellten Gefäße nach Femoralarterienligatur und gleichzeitiger kontinuierlicher Infusion von CTA mit der der Kontrollgruppe, bei der lediglich PBS injiziert wurde, so ließ sich eine signifikant geringere Anzahl an ausgebildeten Kollateralgefäßen in der CTA-Gruppe beobachten. Hieraus ergab sich, dass die kontinuierliche Gabe des Antikörpers in die Kollateralzirkulation in vivo zu einer Hemmung des Kollateralwachstums führte. Identisches ergab sich durch Ermittlung des Proliferationsindex. Dazu wurden der Ratte BrdU-Pumpen zusätzlich zur oben beschriebenen Katheterisierung

implantiert. Die Ergebnisse zeigten auch hier eine signifikante Reduktion der proliferierten Zellen.

Zusammenfassend scheint der kollateralspezifische Antikörper CTA 157-2 sowohl *in vitro* als auch im Vergleich zu den *in vivo* Versuchen zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation beim Kollateralwachstum zu führen.



**Abb. 11:** CTA 157-2 reduziert signifikant die Proliferation von Kollateralgefäßen und die Anzahl von sichtbaren Kollateralgefäßen *in vivo* ( $p < 0.05$  in beiden Fällen).



**Abb. 12:** Angiographisch sichtbare Kollateralarterien im Rattenhinterbein von Kontrolltieren 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie (weiße Pfeile in der rechten Abbildung). Bei Tieren, denen der Antikörper CTA 157-2 kontinuierlich injiziert wurde, sind sie nicht sichtbar (linke Abbildung).

#### **4.4.4 Einfluss des Antikörpers CTA 157-2 bei der Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen**

Tatsache ist, dass die Akkumulation von Monozyten bzw. Makrophagen mit dem Gefäßwachstum in bestimmten Regionen assoziiert ist. Bisher war jedoch unklar, woher diese Makrophagen rekrutiert wurden. Man nahm an, dass sie sich aus zirkulierenden Monozyten entwickelten. Mithilfe von Antikörpern, die eine Differenzierung zwischen einwandernden und residenten Makrophagen erlaubten, gelang es der Arbeitsgruppe zu zeigen, dass es sich bei den um Kollateralarterien akkumulierenden Zellen sowohl um Gewebsmakrophagen als auch um weniger reife Makrophagen handelte (Khmelewski 2004). Es wurden keine Zellen im Bereich des Kollateralwachstums entdeckt, die Oberflächenmarker von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark trugen. Durch Sekretion von Substanzen wie Metalloproteinasen stimulieren Makrophagen wesentlich das Gefäßwachstum (Berse 1992).

Es wurde untersucht, ob der Antikörper durch Bindung an das Proteasom- und Fokal Adhäsion assoziierte Antigen und seine nachfolgende Aktivierung die Akkumulation von Makrophagen beeinflusst.

Endothelzellen wurden dafür auf einem Objektträger mit acht Kammern ausplattiert und mit verschiedenen Medien inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Makrophagen auf die Endothelzellen gegeben. Es folgten verschiedene Färbungen sowie die Auszählung der adhärennten Makrophagen. Vergleicht man die Mittelwerte der Versuchsreihe, die nur Medium erhielt, mit denen, die Medium und Hybridomazellüberstand mit enthaltenem CTA 157-2 Antikörper erhielt, so fällt auf, dass beide Werte nahezu identisch sind. Es konnte die Anhaftung von 114 versus 117 Zellen nachgewiesen werden.

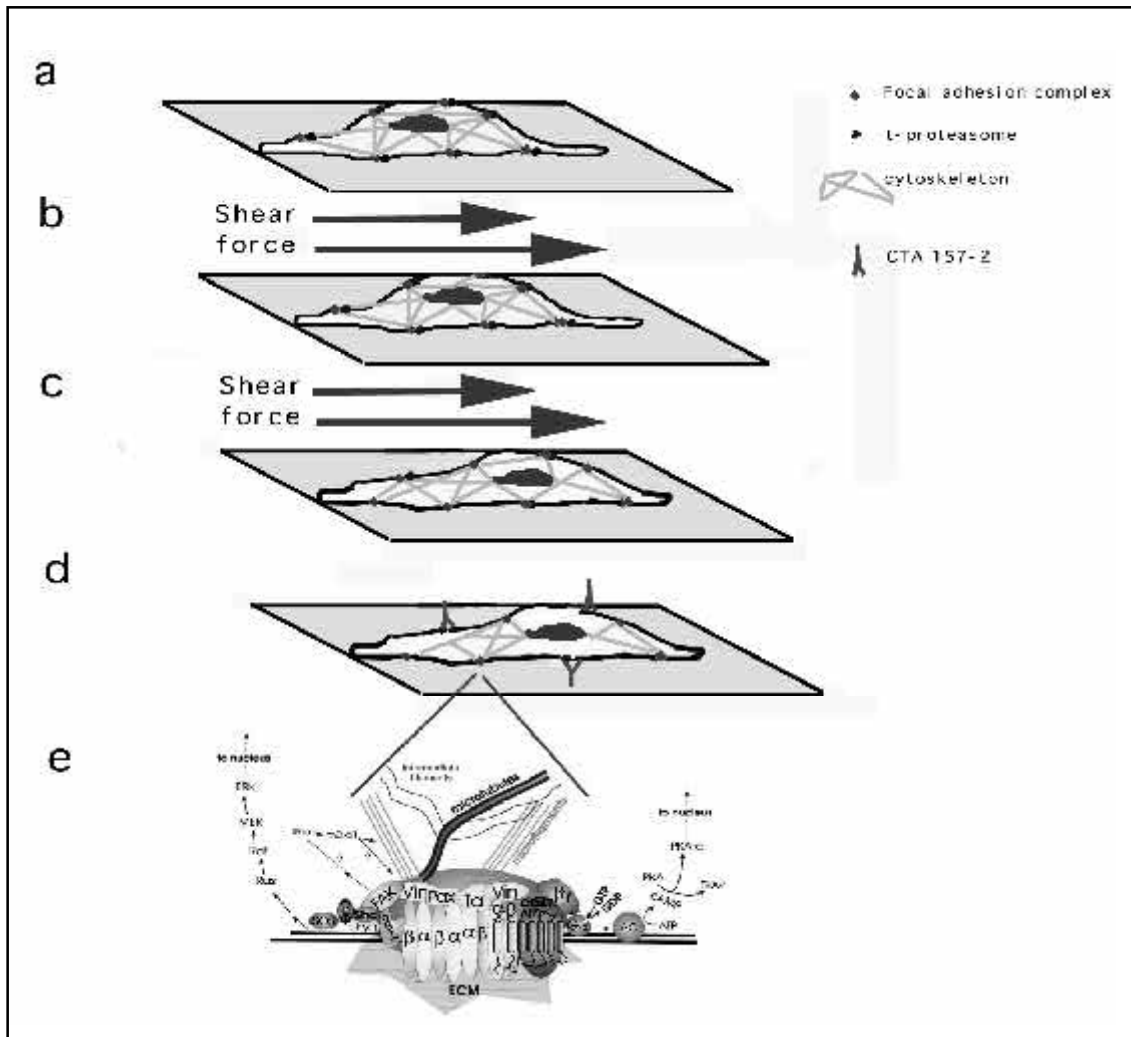
Wie zu erwarten zeigte sich, dass nach Stimulation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  wesentlich mehr Makrophagen adhärirten, im Durchschnitt etwa 126 Zellen. Somit bestätigte sich die Vermutung, dass der Tumornekrose-Faktor alpha bei seinen vielfältigen biologischen Funktionen u. a. als Zellstimulans fungiert. Limitierend bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings die hohe Standardabweichung. Dadurch erreichten auch die Ergebnisse der TNF- $\alpha$  positiven Kontrolle keine statistische Signifikanz.

Zusammenfassend scheint der Antikörper CTA 157-2 keinen direkten Effekt auf die Akkumulation von Makrophagen zu haben.

Anhand der geschilderten Befunde stellte man abschließend folgende Hypothese zur Wirkung des kollateralspezifischen Antikörpers 157-2 auf:

Zu Beginn des Kollateralwachstums kommt es zu einem Anstieg der Expression des von CTA 157-2 erkannten Proteasom assoziierten Antigens. Dadurch werden ein schneller und gesteuerter posttranskriptioneller Umbau der fokalen Adhäsionsproteine und damit eine rasche Adaptation an die sich drastisch verändernden Schubspannungen gewährleistet. Dies hat einen wichtigen Einfluss auf komplexe intrazelluläre Vorgänge, die es der Zelle erst ermöglichen, zu proliferieren und zu migrieren. Die Steigerung der Proteasomaktivität durch CTA 157-2 führt jedoch zu einem Ungleichgewicht im notwendigen vermehrten Umsatz der fokalen Adhäsionsproteine hin zu einem nicht mehr balancierten Abbau, was die beobachtete Reduktion der Proliferation von Kollateralarterien und RHE A Zellen bedingt.





**Abb. 13:** Schematische Darstellung der Hypothese über die Funktion des Proteasoms beim Kollateralwachstum

a) Nach Verschluss eines Hauptversorgungsgefäßes werden die Endothelzellen der präexistierenden arteriellen Anastomosen einem dramatischen Anstieg der Schubspannung ausgesetzt.

b) Aktivierung des Proteasoms in der Zellwand der Endothelzellen führt zu:  
c) Degradation und Neubildung der fokalen Adhäsionsproteine und die daraus resultierende Anpassung des Zytoskeletts an die veränderte Schubspannung.

d) Mit zunehmender Aktivierung des Proteasoms verändern sich das Zytoskelett und die Kräfteverteilung zur Anpassung an die Schubspannung.

e) Die zelluläre Kräfteverteilung konzentriert sich u.a. auf die Seite der fokalen Adhäsionsmoleküle und ist für die Integration zahlreicher Zellvorgänge, wie z.B. Migration und Proliferation, verantwortlich. Veränderungen der Schubspannung führen im Folgenden zu Veränderungen der Proliferationsrate.

(Übernommen und ergänzt von D. Ingber 2003)

## 4.5 Ausblick

In den letzten Jahren wurden viele tierexperimentelle und klinische Studien initiiert und durchgeführt, um die Möglichkeit zu überprüfen, durch ein gesteigertes Kollateralwachstum eine Verbesserung der Perfusion vieler Organe zu erreichen. In Tiermodellen am ischämischen Herz und Bein wurde der Beweis erbracht, dass die Peptide VEGF-A und b-FGF zur Induktion der Bildung von neuen Blutgefäßen in der Lage sind (Harada et al. 1994/1996; Unger et al. 1994). Damit könnte ein verbesserter kollateraler Blutfluss und eine erhöhte Kapillardichte erreicht werden. Es liegt also der Gedanke nahe, in Zukunft Wachstumsfaktoren in der Behandlung der Koronaren Herzkrankheit und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit klinisch einzusetzen.

Anhand des in Vorarbeiten generierten kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, über die Beeinflussung des Ubiquitin-Proteasom-Systems das Kollateralwachstum und die Endothelzellproliferation zu beeinflussen. Denkbar ist somit, über eine Entwicklung und den gezielten Einsatz von spezifischen Proteasominhibitoren bzw. -aktivatoren in den Vorgang des Kollateralgefäßwachstums einzugreifen.

Der therapeutische Nutzen der Kontrolle des Gefäßwachstums muss jedoch stets von zwei Seiten her betrachtet werden:

Einerseits kann die Therapie in einer Hemmung der Neubildung von Gefäßen liegen. Klinische Einsatzgebiete wären die Inhibition des Tumorwachstums oder die Unterdrückung der proliferativen diabetischen Retinopathie. In diesem Bereich werden bereits erfolgreich Proteasominhibitoren klinisch eingesetzt. Auf der anderen Seite würden Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder der koronaren Herzkrankheit von einer Stimulation der Gefäßneubildung profitieren (Ng et al. 2001). Im Gegensatz zum Proteasom im Allgemeinen ist die Regulation des von CTA 157-2 gebundenen Proteasom assoziierten Antigens jedoch auf das Kollateralwachstum primär beschränkt und nicht in Tumorgefäßen zu finden. Hier scheint eine spezifische Steuerung des Kollateralwachstums möglich (Mazur et al. 2003).

Dazu ist jedoch noch die weitere molekulare Identifikation des von CTA 157-2 gebundenen Antigens notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Durch zahlreiche Studien konnte in der letzten Zeit gezeigt werden, dass es sich bei der Bildung von Kollateralgefäßen und der Angiogenese um zwei verschiedene Formen des Gefäßwachstums handelt. Es wurde der Begriff „Neo-Arteriogenese“ geprägt, der das Wachstum von Kollateralarterien aus präexistierenden arteriolen Anastomosen durch eine frühe Phase der Zellproliferation und einer folgenden Phase, in der Umbauprozesse zur Stabilisierung des Gefäßes stattfinden, beschreibt. Dieser schnelle, adaptive Vorgang wird durch veränderte hämodynamische Kräfte nach einem Gefäßverschluss ausgelöst. Durch die veränderte Hämodynamik werden zelluläre Signale in Gang gesetzt, die zu einer Proliferation und Migration führen. Angiogenese dagegen beschreibt die Bildung von neuen Kapillaren in einem Ischämiegebiet, die jedoch eine ausreichende Blutzufuhr nach Verschluss eines Gefäßes meist nicht kompensieren können. Die maximale Proliferation des Kollateralgefäßes ist mit einer massiven Akkumulation von Makrophagen assoziiert, die durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen den Gefäßumbau unterstützen. Endotheliale Proliferation, Migration und Monozyten/Makrophagenadhäsion spielen daher beim Kollateralwachstum eine zentrale Bedeutung und lenken zudem den Fokus auf Zelloberflächenmoleküle, die während des Kollateralwachstums hochreguliert sind. Zur Identifikation kollateralspezifischer Oberflächenmoleküle, die das Wachstum von Kollateralarterien erklären können, wurden in Vorarbeiten monoklonale Antikörper gegen Membranpräparationen von Kollateralarterien hergestellt. Nach Selektionierung anhand der Kollateralspezifität wurde ein Antikörper CTA 157-2 hergestellt, der insbesondere auf dem Endothel proliferierender Kollateralarterien exprimiert war. In dieser Arbeit wurde zunächst ein in vitro Modell anhand einer Endothelzellkultur der Ratte entwickelt, dass es erlauben sollte, Migration, Proliferation und Makrophagenadhäsion zu untersuchen. Dieses Modell wurde anschließend zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass dieser kollateralspezifische Antikörper konzentrationsabhängig zu einer signifikanten

Reduktion der Zellproliferation führt. Er scheint jedoch dabei weder einen Einfluss auf die Migration von Endothelzellen noch auf die Akkumulation von Makrophagen zu haben, bzw. wird hier eine Verbesserung des Modells nötig sein, um diese Auswirkungen näher untersuchen zu können.

Weitere Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe ergaben den Hinweis, dass es sich bei dem von dem Antikörper CTA 157-2 gebundenen Antigen um eine Fokal Adhäsion und Proteasom assoziierte Struktur handelt. Der Antikörper selbst ist in der Lage, das Proteasom zu aktivieren. Weiterhin wurde ebenfalls gezeigt, dass CTA 157-2 zu einer signifikanten Reduktion des Kollateralwachstums in vivo führt, so dass man davon ausgeht, dass eine Aktivierung des Proteasoms in seiner Netto-Wirkung zu einer Hemmung der Endothelzellproliferation und des Kollateralwachstums führt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
BFGF	Basic fibroblast growth factor
BrdU	Bromodesoxyuridin
CSA	Kollateralspezifisches Antigen
CTA 157-2	Kollateralspezifischer Antikörper CTA 157-2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamine-tetraacetic acid
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLK-1	Fetal liver kinase 1
FLT-1	Fms-like Tyrosine kinase 1
HCl	Salzsäure
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IGF-1	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor 1
IgM	Immunglobulin M
KHK	Koronare Herzkrankheit
LLVY	Leucin-Leucin-Valin-Tyronin Peptid
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd (Formaldehyd 37%)
RHE	Rattenherzendothel
TNF- $\alpha$	Tumornekrose-Faktor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmad S.A., Liu W., Jung Y.D., Fan F., Wilson M., Reinmuth N., Shaheen R.M., Bucana C.D., Ellis L.M. (2001) The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res.* 61: 1255-1259
- Arras M., Ito W.D., Scholz D., Winkler B., Schaper J., Schaper W. (1999) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101: 40-50
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967
- Ausprunk D.H., Folkman J. (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14: 53-65
- Berse B., Brown L.F., Water L.V.D., Dvorak H.F., Dvorak F., Senger D.R. (1992) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. *Mol Biol Cell* 3: 211-220
- Buschmann I., Schaper W. (2000) The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis) *J Pathol* 190: 338-342
- Bussolino F., Di Renzo M.F., Ziche M., Bocchietto E., Olivero M., Naldini L., Gaudino G., Tamagnone L., Coffey A., Comoglio P.M. (1992) Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119: 629-641

- Butcher E.C. (1991) Leukocyte - endothelial cell recognition – 3 (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036
- Carmeliet P., Collen D. (1997) Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Amer J Physiol* 42: H2091-H 2104
- Carmeliet P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395
- Clauss M., Weich H., Breier G., Knies U., Röckl W., Waltenberger J., Risau W. (1996) The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities – Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 271: 17629-17634
- Derhaag J.G., Duijvestijn A.M., Emeis J.J., Engels W., van Breda Vriesman P. J. (1996) Production and characterization of spontaneous rat heart endothelial cell lines. *Lab Invest* 74: 437-451
- Flamme I., Frolich T., Risau W. (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173: 206-210
- Folkman J., Haudenschild C. (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551-556
- Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J. Med.* 285: 1182-1186
- Folkman J. (1984) What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51: 601-604
- Folkman, J. (1998) Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circ* 97: 1108-1110)

- Fulton W.F.M. (1965) The coronary arteries. *Charles C Thomas: Springfield, IL*
- Furth van R. (1992) Phagocytic cells: Development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. *Inflamm: Basic principles and clinical correlates*. Raven press, N. Y., 325-340
- Gamble J.R., Matthias L.J., Meyer G., Kaur P., Russ G., Faul L., Berndt M.C., Vadas M.A. (1993) Regulation of in vitro capillary tube formation by anti-integrin antibodies. *J Cell Biol* 121: 931-943
- Gonzalez-Crussi F. (1971) Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. *Am J Anat*. 130: 441-460
- Harada K., Grossman W., Friedman M., Edelman E.R., Prasad P.V., Keighley C.S., Manning W.J., Sellke F.W., Simons M (1994) Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 94: 623-630
- Harada K., Friedman M., Lopez J.J., Wang S.Y., Li J., Prasad P.V., Pearlman J.D., Edelman E.R., Sellke F.W., Simons M. (1996) Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Amer J Physiol* 39: H1791-H1802
- Hershko A., Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Ann Rev Biochem* 67: 425-479
- Herzog S., Sager H., Khmelevski E., Deylig A., Ito W.D. (2002) Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology* 283: H2012-H2020
- His W. (1900) Leiothoblast und Angioblast der Wirbelthiere. *Abhandl K S Ges Wiss Math Phys* 22: 171-238



- Hochstrasser M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Ann Rev Genet* 30: 405-439
- Ingber D. (2003) Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Science* 116: 1397-1408.
- Ito W.D., Arras M., Winkler B., Scholz D., Schaper J., Schaper W. (1997) Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 80: 829-837
- Ito W.D., Arras M., Winkler B., Htun P., Schaper W. (1997) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* 273: H1255 - 1265
- Ito W.D., (2003) Why we need arteriogenesis research. *Endothelium* 10: 193-195
- Ito W.D., Lellek H., Bergmann J., Herzog S., Janson N., Obermeyer N., Tiede P., Deylig A., Buck F., Schaper W., Meinertz T. (2004) Identification of transmembraneous proteasome as novel regulator of collateral growth. *submitted for publication*
- Khmelewski E., Becker A., Meinertz T., Ito W.D. (2004) Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation. *Circ Res* in press
- Kroll J., Waltenberger J. (2000) Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A), *Z Kardiol* 89: 206-218
- Kraemer R. (2000) Regulation of cell migration in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis report* 2: 445 - 452

- Longland C.J. (1953) The collateral circulation of the limb. *New Ann R Coll Sur Engl* 13: 161-164
- Malinda K.M., Ponce L., Kleinman H.K., Shackelton L.M., Millis A.J. (1999) Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp. Cell Res* 250: 168-173
- Mazur A., Deylig A., Liebau M., Schaper W., Meinertz T., Ito W.D. (2003) Collateral targeting with single chain antibodies. *Endothelium* 10(4-5): 277-284
- Montesano R., Pepper M.S., Vassalli J.D., Orci L. (1992) Modulation of angiogenesis in vitro. *EXS* 61: 129-136
- Ng Yin-Shan, D'Amore P. (2001) Review: Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2: 278-285
- Nishizaka T., Shi Q., Sheetz M.P. (2000) Position-dependant linkages of fibronectin-integrin-cytoskeleton. *Proc Natl Acad. USA* 97: 692-697
- Obermeyer N., Janson N., Bergmann J., Buck F., Ito W.D. (2003) Proteome Analysis of migrating versus nonmigrating rat heart endothelial cells reveals distinct expression patterns. *Endothelium* 10: 167-178
- Resnick N., Yahav H., Shay-Salit A., Shusy M., Schubert S., Zilberman L.C. Wofovitz E. (2003) Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 81: 167-177
- Risau W. (1993) Development of the vascular system of organs and tissues. In Schaper W, Schaper J. eds: *Collateral circulation: Heart, brain, kidney, limbs*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 17-28

- Risau W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674
- Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 362; 801-809
- Rymaszewski Z., Cohen R.M., Chomczynski P. (1991) Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 617-621
- Sabin F.R (1920) Studies on the origin of blood vessels and of red blood-corporcules as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib Embryol* 36: 213-259
- Schaper J., Koenig R., Franz D., Schaper W. (1976) The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch, A Pathol. Anat. Histopathol.* 370: 193-205
- Schaper W., Ito W.D. (1996) Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 79: 911-919
- Schaper W., Buschmann I. (1999) Collateral circulation and diabetes. *Circ* 99: 2224-2226
- Scholz D., Ito W.D., Fleming I., Deindl E., Sauer A., Wiesnet M., Busse R., Schaper W., Schaper J. (2000) Ultrastructure and molecular histology of rabbit hindlimb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* 436: 257-270
- Spalteholz W. (1907) Die Koronararterien des Herzens. *Verhandl Anat Ges* 21: 141; in *Anat Anz* 30

- Sprague E.A., Luo J., Palmaz J.C. (2000) Endothelial cell migration onto metal stent surfaces under static and flow conditions. *J of long term effects of medical implants* 10: 97-110
- Sunderkötter C., Steinbrink K., Goebeler M., Bhardwaj R., Sorg C. (1994) Macrophages and arteriogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410- 422
- Takahashi T. (1999) Ischemia – and cytokine induced mobilization of bone-marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5: 434-438
- Trochon V., Li H., Vasse M., Franken F., Thomaidis A., Soria J., Lu H., Gardner C., Soria C. (1998) Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 2: 277-285
- Unger E.F., Banai S., Shou M., Lazarous D.F., Jaklitsch M.T., Sheinowitz M., Correa R., Klingbeil C., Epstein S.E. (1994) Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol.* 266: H1588-1595
- Vailhé B., Vittet D., Feige J.-J. (2001) Mini Review: in vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 81: 439-452
- Vernon R.B., Sage E.H. (1995) Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of a vascular form. *Am J Pathol* 147: 873-883
- Wang N., Naruse K., Stamenovic D., Fredberg J.J., Mijailovich S.M., Tolic-Norrelykke I.M., Polte T., Mannix R., Ingber D.E. (2001) Mechanical behaviour in living cells consistent with the tensegrity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7765-7770

Weihrauch B., Zimmermann R., Arras M., Schaper J. (1994) Expression of extracellular matrix proteins and the role of fibroblasts and macrophages in repair processes in ischemic porcine myocardium. *Cell Mol Biol Res* 40: 105-116

WHO (world health organization), cardiovascular diseases: prevention and control 2001/2002

## 8 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. Thomas Meinertz als Leiter des Instituts für Kardiologie der Universität Hamburg für die Promotionsmöglichkeit. Herrn PD Dr. W. Ito möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die trotz häufigen Zeitmangels gute Betreuung danken. Nicht zuletzt dafür, dass er auch nach Wechsel des Wohnorts immer bereit war, mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit zu unterstützen.

Ein weiterer Dank gilt den technischen Assistentinnen Juliane Bergmann und v. a. Andrea Deylig, ohne deren Anleitung und Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Auch danke ich Natalie Obermeyer, einer ehemaligen Kollegin und guten Freundin, für die nette und hilfreiche Zusammenarbeit.

Bei meiner Freundin Sandra Traub möchte ich mich für die harten, aber oft auch recht lustigen Stunden während des Studiums bedanken. Wir haben uns gemeinsam durch Prüfungen gekämpft und die schwere Zeit während der Examina gemeinsam mit endlosen Telefonaten überbrückt. Ihre Tatkraft hat mich oftmals angespornt.

Ein großer Dank gilt Britt Hellenbrand, die mich mit ständigen Nachfragen daran erinnerte, dass die Arbeit zu Ende geschrieben werden musste. Ganz besonders danke ich ihr für die ausdauernde Hilfe bei Vollendung dieser Arbeit und für ihre Freundschaft.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und die immer vorhandene liebevolle Unterstützung bedanken.

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens) Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung gegeben oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Nina Janson

## 10 Lebenslauf

### ***Persönliche Daten***

Name	Janson
Vorname	Nina
Geburtsdatum	10.12.1976
Geburtsort	Bonn
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Eltern	Prof. Dr. med. Rainer Janson, Radiologe Ursula Janson, geb. Pletziger, gelernte MTRA
Familienstand	ledig

### ***Schulbildung***

1983 – 1987	Katholische Grundschule Am Dhünnberg, Leverkusen
1987 – 1996	Freiherr-vom-Stein Gymnasium, Leverkusen

### ***Studium***

04/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
04/1999	Physikum
08/1999	4-wöchige Famulatur in der Abteilung für Allgemeinmedizin, Klinikum Leverkusen
04/2000	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07/2000	Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Leverkusen



---

03/2001	Famulatur in der kardiologischen Ambulanz, Universitätskrankenhaus Eppendorf
08/2001	Famulatur in einer gynäkologischen Praxis in Thousand Oaks, Kalifornien
08/2002	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2002 – 10/2003	Praktisches Jahr in der Chirurgie (1. Tertial) und Medizinischen Klinik II (3. Tertial) im Krankenhaus Köln-Merheim, davon 2 Wochen Plastische Chirurgie, 2. Tertial in der Gynäkologie der Universitätsklinik Köln
11/2003	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit 02/2004	Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität zu Köln

***Nebentätigkeiten***

1996-2001	Pharma Packungstechnologie bei der Bayer AG, Leverkusen Pflanzenschutzzentrum Monheim der Bayer AG, Leverkusen Radiologie, Klinikum Leverkusen Gaudi Musical, Köln Schlaflabor der HNO-Klinik, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
-----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Köln, März 2006