

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Schrader

**Isolierung, Charakterisierung und Kultivierung von
Endothelzellen aus der Mauseaorta**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Meral Saraldi

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers

Für meine Mutter

ZUSAMMENFASSUNG

Isolierung, Charakterisierung und Kultivierung von Endothelzellen aus der Mauseaorta

Meral Saraldi

Makrovaskuläre arterielle Endothelzellen spielen bei der Entstehung einer Arteriosklerose eine zentrale Rolle. Für detaillierte Studien der zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge sind daher *in-vitro-Modelle* aus gut definierten makrovaskulären arteriellen Endothelzellen erforderlich. Es wurden bereits diverse Methoden zur Isolierung dieser Endothelzellen aus verschiedenen Spezies beschrieben. In Hinblick auf Effizienz und Reproduzierbarkeit waren diese jedoch unzureichend.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung einer einfachen und reproduzierbaren Methode zur Gewinnung und Kultivierung arterieller makrovaskulärer Endothelzellen aus der Aorta der Maus für *in-vitro*-Studien. Die Maus wurde als Quelle für makrovaskuläre arterielle Endothelzellen wegen der Verfügbarkeit von transgenen Tiermodellen gewählt.

Zu diesem Zweck wurden Aorten 28-35 Tage alter Mäuse, die vom Aortenbogen bis zur Iliakalbifurkation in voller Länge entnommenen wurden, längs aufgetrennt und in einem Enzymgemisch inkubiert. Die sich demarkierende Endothelschicht wurde mit dem Ziel einer hohen Endothelzellausbeute sowie minimaler Kontamination durch nicht-endotheliale Zellen vorsichtig mit einem Plastikschaber abgetragen. Nach kurzzeitiger Kultivierung wurde die Zellausbeute aus ca. 16 Aorten *gepoolt*. Aus dieser primären Mischkultur wurden die Endothelzellen durch magnetische Zellseparation mit von Invitrogen speziell für diese Arbeit zur Verfügung gestellten, CD31-gekoppelten *Dynabeads* isoliert und erneut in Kultur genommen.

Die Reinheit der Endothelzellkulturen wurde zu verschiedenen Kulturzeitpunkten durch den Nachweis der Endothelzellmarker PECAM-1/CD31, ICAM-2/CD102, CD73, ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, Endoglin/CD105 sowie des von-Willebrand-Faktors (vWF) und der Dil-Ac-LDL-Aufnahme mittels FACS-Analysen und Immunzytochemie bestimmt. Nach diesem Vorgehen wurden insgesamt 6 breit angelegte Experimente durchgeführt. Im Laufe der Experimente wurden entsprechend der bereits gewonnenen Erkenntnisse und der Anforderungen an die Methode optimierende Modifikationen am Protokoll vorgenommen.

Die Auswertung aller Experimente ergab, dass mit der von uns gewählten Methode Endothelzellen erfolgreich aus der Mauseaorta isoliert werden können. Nach der magnetischen Zellseparation hatten die Kulturen einen sehr hohen Endothelzellanteil. Allerdings wurden auch wesentliche Nachteile der Methode deutlich: die Ausbeute an Endothelzellen aus den Mauseorten war generell gering. Zudem gab es Hinweise auf eine Dedifferenzierung der Endothelzellen mit Verlust des endothelialen Phänotyps. Bei reinen Endothelzellkulturen mit erhaltenem endothelialen Phänotyp wurde ein sehr langsames Proliferationsverhalten beobachtet, wohingegen dedifferenzierende Endothelzellen deutlich schneller proliferierten. Als mögliche Störfaktoren müssen angesehen werden: die mechanische Behandlung der Aorten, Trypsin als Serinprotease könnte die Aussagekraft von CD31 eingeschränkt haben und *Dynabeads* könnten einen toxischen Effekt ausgeübt haben. Es wird diskutiert, dass eine weitere Verbesserung des Protokolls in der Verwendung von neonatalen Mäusen, der Zellaufreinigung mit der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung oder der Immortalisierung muriner Aortenendothelzellen bestehen könnte.

Abkürzungsverzeichnis

A	
ACE	<i>Angiotensin-converting-enzyme</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
B	
b.End	<i>brain endothelial cells</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO ₂	Kohlendioxid
D	
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dil-Ac-LDL	<i>1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorat-acetylates-low density lipoprotein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	
EDHF	<i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Exp.	Experiment
F	
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FCS	<i>Forward scatter</i>
Fe ₂ O ₃	Eisen(III)-oxid
Fe ₃ O ₄	Eisen(II,III)-oxid
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FL	Fluoreszenzkanal
G	
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GP	Glykoprotein
H	
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HUAEC	<i>Human umbilical artery endothelial cell</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
I	
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
ICAM-2	<i>Intercellular adhesion molecule-2</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
J	
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>

K	
KG	Körpergewicht
L	
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAEC	<i>Murine aortic endothelial cell</i>
MVECGM	<i>Microvascular endothelial cell growth medium</i>
Mio.	Millionen
N	
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NO	Stickstoffmonoxid
O	
O ₂	Sauerstoff
P	
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PerCP	Peridin Chlorophyll
R	
Rh	Rhodamin
R-PE	R-Phycoerythrin
RPM	<i>Rounds per minute</i>
S	
s.	siehe
s.c.	subcutan
α-SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
T	
TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
t-PA	<i>Tissue type plasminogen activator</i>
U	
u-PA	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
V	
VAP-2	<i>Vascular apoptosis-inducing protein 2</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE-Cadherin	<i>Vascular endothelial-cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
VVO	<i>Vesiculo-vacuolare organelle</i>
vWF	von Willebrand Faktor
W	
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Endothel – Bedeutung für die kardiovaskuläre Forschung am Beispiel der endothelialen Dysfunktion	1
1.2	Das Endothel	3
1.2.1	Aufbau des Endothels	3
1.2.2	Endothelzellfunktionen	4
1.2.3	Funktionelle und morphologische Heterogenität des Endothels	9
1.2.4	Endotheliale Heterogenität - genetische und extrinsische Hypothese	11
1.2.5	Endotheliale Marker	11
1.3	Methoden zur Isolierung muriner Endothelzellen	16
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Enzyme	19
2.1.3	Medien	19
2.1.4	Puffer	20
2.1.5	Antikörper	20
2.1.6	Geräte	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Isolierung muriner Endothelzellen (MAEC) aus der Mauseorta	22
2.2.2	Aufreinigung der Primärkultur mit <i>cleavable Dynabeads NSA</i>	24
2.2.3	Charakterisierung der murinen Endothelzellen mittels Immunzytochemie	30
2.2.4	Charakterisierung der murinen Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie	33
2.2.5	Dil-Ac-LDL Färbung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Experiment I	39
3.2	Experiment II	44
3.3	Experiment III	48
3.4	Experiment IV	51
3.5	Experiment V	59
3.6	Experiment VI	68
3.7	Übersicht und Zusammenfassung der Ergebnisse	73
4	Diskussion	77
4.1	Wesentliche Ergebnisse	78
4.2	Evaluierung potentieller Störfaktoren der Endothelzellisolationmethode	79
4.2.1.	Alter der Versuchstiere	79
4.2.2	Mechanische Ablösung der Endothelzellen aus der Intima	79
4.2.3	Anwendung von Trypsin	81
4.2.4	Magnetische Zellseparation / <i>Dynabeads</i>	83
4.3	Evaluierung der verwendeten Charakterisierungsmerkmale für MAEC	86
4.4	Zelluläre Dedifferenzierung / zelluläre Seneszenz	89
4.5	Neue Methoden zur Isolierung muriner Endothelzellen	90
5	Schlussfolgerung	100
6	Literaturverzeichnis	102
	Danksagung	
	Eidesstattliche Versicherung	

1 Einleitung

1.1 Das Endothel – Bedeutung für die kardiovaskuläre Forschung am Beispiel der endothelialen Dysfunktion

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stellen sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Todesursache dar. 2008 starben weltweit geschätzt 17,3 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Ereignisse, was einem Anteil von 30% an allen Todesfällen entspricht (WHO, September 2012). Daher hat die Forschung auf diesem Gebiet sowohl in medizinischer als auch in volkswirtschaftlicher Hinsicht eine große Bedeutung. Die koronare Herzerkrankung, der ischämische Hirninfarkt und die periphere arterielle Verschlusskrankheit sind die drei wichtigsten und häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen. Die Arteriosklerose ist die pathophysiologische Grundlage für die genannten Krankheiten. Die WHO definiert die Arteriosklerose als eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima. Sie kann mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, ferner mit der Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergehen und mit Veränderungen der Arterienmedia verbunden sein (WHO, 2003).

Bei der Entstehung der Arteriosklerose spielt das Endothel eine sehr wichtige Rolle, die endotheliale Dysfunktion wird als Initialphase der Arteriosklerose betrachtet. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Dyslipidämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus begünstigen die Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Der Begriff der endothelialen Dysfunktion entspricht einer gestörten vaskulären Homöostase, bei der diverse Funktionen des Endothels beeinträchtigt sind. Zu diesen Funktionen gehören die Regulierung des Gefäßtonus, die Steuerung bidirektionaler Austauschvorgänge von Substraten zwischen Blut und Gewebe, die Blutstillung und –gerinnung sowie Fibrinolyse, inflammatorische und immunologische Prozesse und die Angio- und Vaskulogenese (1).

Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion sind o.g. Funktionen derart gestört, dass das Endothel u.a. einen prothrombotischen und proinflammatorischen Zustand annimmt sowie eine erhöhte Permeabilität aufweist. Zudem wird durch Proliferation von glatten Muskelzellen die Ausbildung arteriosklerotischer Gefäßplaques begünstigt.

Zur weiteren Aufklärung der pathophysiologischen Vorgänge, die Störungen wie der endothelialen Dysfunktion zugrunde liegen, und zur Optimierung der therapeutischen und

präventiven Möglichkeiten sind *in vitro* Zellmodelle notwendig. Da sich die endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose vorrangig auf makrovaskulärer Ebene im arteriellen Stromgebiet manifestieren, besteht großes Interesse an Zellmodellen aus diesem Abschnitt des Gefäßsystems. Häufig werden aufgrund der einfachen Verfügbarkeit und leichten und effektiven Zellisolierung HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) eingesetzt. Die Übertragbarkeit der an HUVECs gewonnenen Ergebnisse auf das arterielle Gefäßsystem ist jedoch kritisch zu sehen, da arterielle und venöse Endothelzellen strukturell und funktionell unterschiedlich sind.

Die Verfügbarkeit primärer humaner makrovaskulärer arterieller Endothelzellen ist stark limitiert, so dass diese Zellen für *in vitro* Untersuchungen bisher nicht in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung stehen. Vor dem Hintergrund der guten Verfügbarkeit von Aorten aus Mäusen sowie des Vorhandenseins diverser transgener Mauslinien ist die Etablierung muriner *in vitro* Zellmodelle mit Endothelzellen aus dem makrovaskulären arteriellen Stromgebiet interessant und erstrebenswert.

1.2 Das Endothel

1.2.1 Aufbau des Endothels

Endothelzellen kleiden als einschichtiger Zellrasen sämtliche Blut- und Lymphgefäße von innen aus und sitzen dabei einer 80 nm dicken Basalmembran auf. Die Einheit aus Endothelzellen und Basalmembran wird als *Tunica intima* bezeichnet. Daran schließt sich, getrennt von einer *Membrana elastica interna*, die *Tunica media* an, die aus glatten Muskelzellen und elastischen und kollagenen Fasern besteht. Nach der *Membrana elastica externa* folgt die *Tunica adventitia*. Sie bildet die äußerste Schicht der Blutgefäße, die der Integration der Gefäße in das umgebende Gewebe dient. In der *Tunica adventitia* verlaufen die vegetativen Nervenfasern (Innervation der Gefäßwandmuskulatur) und die *Vasa vasorum* (Blutversorgung der äußeren Gefäßwand).

Endothelzellen sind dünne und längliche Zellen, die ca. 50-70 μm lang, 10-30 μm breit und 0,1-10 μm dick sind. Die Anzahl an gefäßauskleidenden Endothelzellen im menschlichen Organismus kann auf 10 bis 60×10^{12} Zellen geschätzt werden, was einer Oberfläche von ca. 300 bis 1000 m^2 entspricht (2-4). Die gesamte Endothelzellschicht eines Organismus ist als ein diffus verteiltes, dennoch eigenständiges und zusammengehörendes Stoffwechselorgan zu betrachten (5).

Strukturell unterscheidet man 3 Endothelarten: kontinuierliches, fenestriertes und diskontinuierliches Endothel. Arterien und Venen werden von kontinuierlichem Endothel ausgekleidet. In Kapillaren können, je nach Organ und Anforderungen, alle drei Endothelarten nachgewiesen werden.

1. Kontinuierliches Endothel:

Das kontinuierliche Endothel bildet eine durchgehende Zellschicht ohne Lücken zwischen den Zellen. Die Basalmembran ist ebenfalls nicht unterbrochen. Der Interzellularraum wird durch *tight junctions* verschlossen, die eine Diffusionsbarriere zwischen dem Intra- und Extravasalraum darstellen. Über die *tight junctions* erfolgt die Diffusion von Wasser, Glukose, Harnstoff und weiteren hydrophilen Substanzen (1, 6). Diese Endothelart findet sich in Organen, in denen die strikte Trennung zwischen Intra- und Extravasalraum von Bedeutung ist. Es kommt u.a. im zentralen Nervensystem vor, wo das kontinuierliche Endothel den wesentlichen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke

darstellt.

2. Fenestriertes Endothel:

Diese Endothelart zeichnet sich durch ca. 50-60 nm weite Poren zwischen den Endothelzellen aus. Die Poren sind durch ein ca. 4 nm dickes Diaphragma verschlossen, das lediglich für Wasser und niedermolekulare, hydrophile Stoffe permeabel ist. Mit diesen Eigenschaften findet sich das Endothel dort, wo Filtration, Sekretion und Absorption erfolgen, z.B. in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes, endokrinen Drüsen und in der Niere (1).

3. Diskontinuierliches Endothel:

Diskontinuierliches Endothel weist offene Poren von 0,1 – 1 μm auf. Im Bereich der Poren ist auch die Basalmembran unterbrochen. Diese Eigenschaft ermöglicht im Vergleich zum kontinuierlichem Endothel einen ca. 100mal schnelleren Durchtritt von Flüssigkeit. Organe wie die Leber und das Knochenmark, in denen ein zügiger Flüssigkeits- bzw. Blutaustausch notwendig sind, weisen dieses Endothel auf (1, 6).

1.2.2 Endothelzellfunktionen

Das Endothel ist, entgegen der ursprünglichen Annahmen, keine einfache, passive und semipermeable Barriere zwischen Blut und Interstitium. Es ist vielmehr ein komplexes Stoffwechselorgan, das bei diversen physiologischen sowie pathophysiologischen Vorgängen im vaskulären System eine wichtige Rolle spielt. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Zusammenstellung der wichtigsten Endothelzellfunktionen, die im Folgenden kurz besprochen werden sollen.

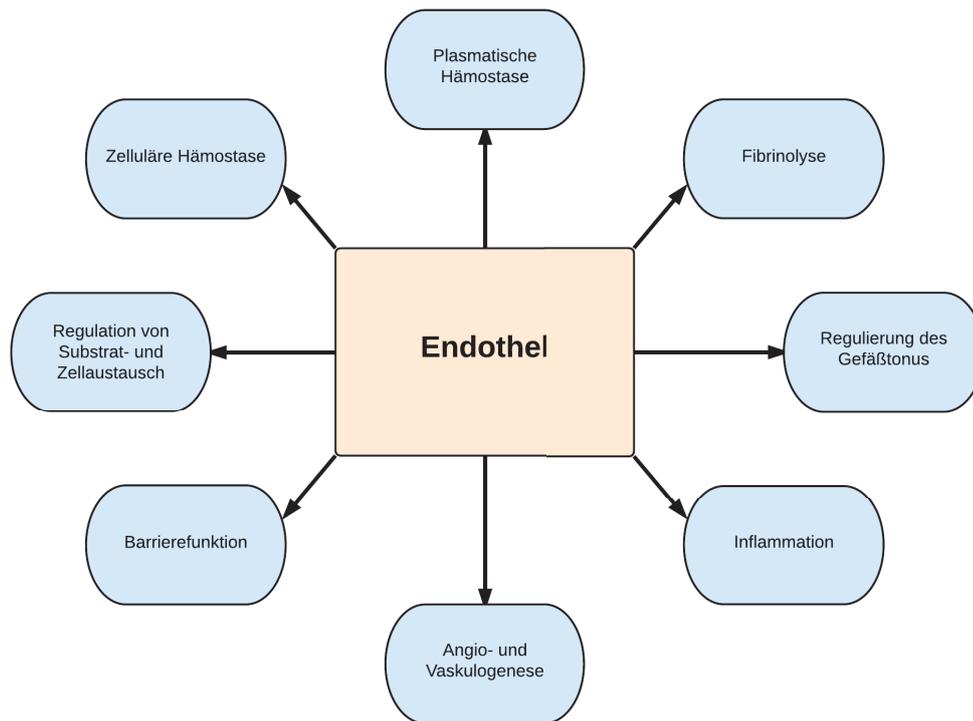


Abb. 1.1: Endothelzellfunktionen

Erläuterungen siehe Text.

Barrierefunktion – Substrataustausch

Das Endothel ist eine multifunktionelle Grenzschicht zwischen dem Intra- und Extravasalraum. Es stellt eine semipermeable physikalische Barriere zwischen beiden Kompartimenten dar und reguliert unter physiologischen Bedingungen die Passage von gelösten Substanzen, Flüssigkeiten, Ionen, Makromolekülen, Hormonen und Zellen (7). Dieser Transport kann über einen parazellulären oder transzellulären Weg erfolgen. Diverse Umstände wie z.B. inflammatorische Prozesse, Ischämie- und Reperfusionzustände, Sepsis und Verbrennungen führen zu einer gestörten Barrierefunktion mit erhöhter Permeabilität für Makromoleküle wie z.B. Albumin und Flüssigkeiten. Daraus resultieren u.a. die Extravasation von Plasma und ein interstitielles Ödem. Auch im Rahmen der Arteriosklerose kommt es zu einer Störung der endothelialen Permeabilität mit dadurch vermehrtem Transport von Lipoproteinen in den Extravasalraum.

Hämostase – Thrombose - Fibrinolyse

Die Regulation von Hämostase, Thrombose und Fibrinolyse gehört ebenfalls zu den Hauptfunktionen des Endothels. Im nicht-aktivierten Normalzustand ist die

Endotheloberfläche nicht-thrombogen, Thrombozyten und Leukozyten adhären nicht am Endothel, der Blutfluss bleibt ungestört. Diese physiologische antiadhäsive und antiaggregatorische Eigenschaft beruht in erster Linie auf Stickstoffmonoxid (NO) (8, 9) und Prostazyklin. Im Falle einer Verletzung des Endothels wird die stark thrombogene subendotheliale Matrix mit u.a. Kollagenfasern freigelegt und die primäre zelluläre Hämostase wird aktiviert. Im ersten Schritt kommt es über die Bindung von subendotheliale Kollagen-gebundenem von-Willebrand-Faktor an den thrombozytären GPIb/IX/V Glykoprotein-Rezeptor zur Wandadhäsion von Thrombozyten. Durch zusätzliche Bindung an endotheliale Integrine wird die Thrombozytenadhäsion verstärkt. Die nachfolgende direkte Bindung an das subendotheliale Kollagen über den Kollagenrezeptor GPVI führt schließlich zur Formveränderung und Aktivierung der Thrombozyten. Die Thrombozyten-Aktivierung hat die Ausschüttung verschiedener Mediatoren wie Fibrinogen, ADP, ATP, Arachidonsäure bzw. Thromboxan A₂, Serotonin sowie vWF zur Folge. Dadurch kommt es zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten, zur Thrombozytenaggregation sowie Vasokonstriktion mit dem Ziel der Stabilisierung des initialen weißen Thrombus.

Parallel zur zellulären Blutstillung beginnt die sekundäre Hämostase, die plasmatische Gerinnungskaskade wird aktiviert. Daran wesentlich beteiligt sind plasmatische Gerinnungsfaktoren, größtenteils Serinproteasen, die kaskadenartig aktiviert werden. Die Endstrecke dieser Kaskade ist die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, das den initial gebildeten thrombozytenreichen Thrombus durch Vernetzung weiter stabilisiert. Die plasmatische Gerinnung kann extrinsisch oder intrinsisch aktiviert werden. Die extrinsische Gerinnungsaktivierung erfolgt bei einer Gefäßverletzung durch Freisetzung von subendothelial gelegenen Gewebethromboplastin / *tissue factor* (TF), ein membrangebundenes Glykoprotein, das im Komplex mit dem Faktor VIIa die Gerinnungsfaktoren Faktor IX und Faktor X aktiviert. Der aktivierte Faktor Xa katalysiert zusammen mit dem Kofaktor Va die Umwandlung von Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa), das wiederum Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Die intrinsische Gerinnung wird aktiviert, wenn Blut mit Fremdoberflächen in Kontakt gerät. Dabei kommt es nacheinander zur Aktivierung von Faktor XII, Faktor XI, Faktor IX und schließlich Faktor X. Nach Aktivierung des Faktor X läuft die Kaskade genauso wie bei extrinsischer Aktivierung ab, Endprodukt ist das Fibrin.

Nach erfolgreicher Hämostase und Abschluss der Reparaturmechanismen wird die Fibrinolyse aktiviert, wodurch der gebildete Thrombus aufgelöst und der normale Blutfluss wieder hergestellt wird. Der in Endothelzellen gebildete *tissue type plasminogen activator* (t-PA) und die hauptsächlich aus dem Urogenitaltrakt stammende Urokinase (u-PA) aktivieren Plasminogen zu Plasmin. Die Endopeptidase Plasmin löst Fibrin durch hydrolytische

Spaltung auf. Abbildung 1.2 zeigt eine vereinfachte schematische Übersicht von primärer und sekundärer Hämostase sowie der Fibrinolyse.

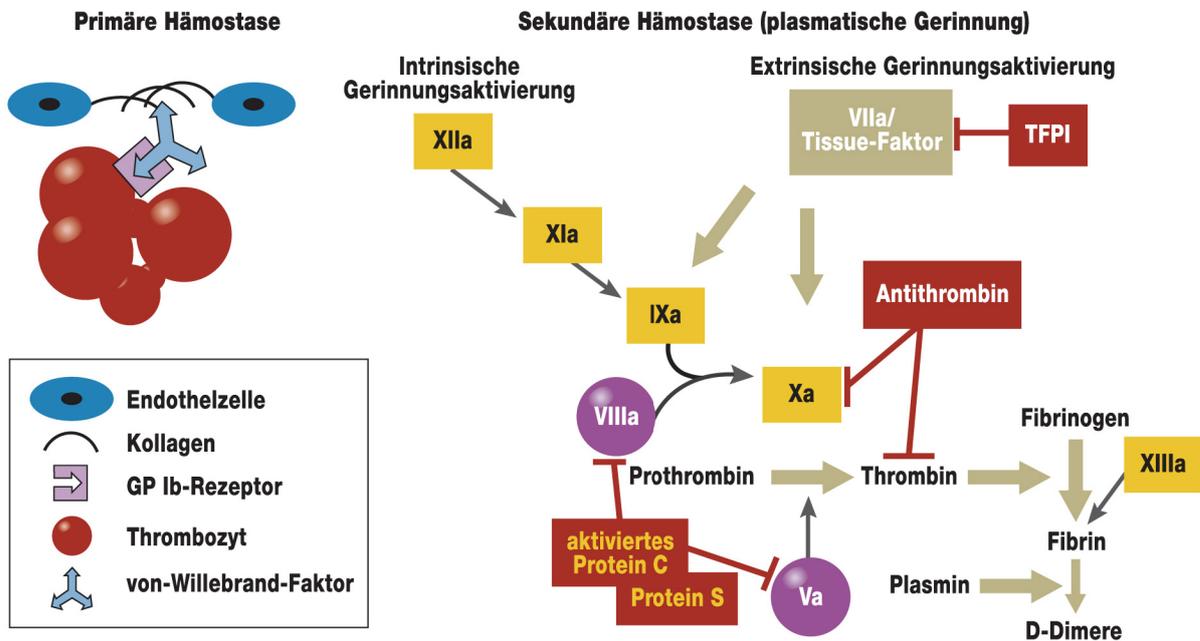


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der primären und sekundären Hämostase (10)

Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Ärzte-Verlags GmbH veröffentlicht.

a: aktiviert, TFPI: *tissue factor pathway inhibitor*, GP: Glykoprotein

Inflammation - Transendotheliale Leukozytentransmigration

Eine weitere wichtige Rolle spielt das Endothel im Rahmen immunologischer und inflammatorischer Prozesse. Bei lokalen und systemischen Entzündungen sowie bei der Wundheilung werden inflammatorische Zellen vom Endothel zum Ort der Entzündung rekrutiert. Die Auswanderung von Leukozyten aus dem Intravasalraum in das umgebende entzündete Gewebe erfolgt in mehreren Schritten und findet größtenteils im Bereich postkapillärer Venolen statt (11). Den ersten Schritt der Leukozyten-Adhäsionskaskade stellt die Anhaftung (*capturing*) der rekrutierten Leukozyten an das Endothel dar. Durch wiederholtes Lösen und erneutes Zustandekommen der Bindung zwischen Endothel und Leukozyt rollen die abgebremsten Leukozyten entlang des Endothels (12). Dieser erste Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel erfolgt über Selektine (E-Selektin, P-Selektin, L-Selektin), Adhäsionsmoleküle, die induziert durch *TNF-α* und IL-1 sowohl auf Leukozyten (L-Selektin) als auch endothelial (E- und P-Selektin) exprimiert werden (13). Nachfolgend kommt es zu einer festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Über aktivierte leukozytäre $\beta 2$ -Integrine (LFA-1, Mac-1, VLA-4) binden die Leukozyten an endotheliale

Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie wie z.B. PECAM-1, ICAM-1 und VCAM-1. Im letzten Schritt kommt es zur transendothelialen Migration der Leukozyten. Diese erfolgt überwiegend parazellulär. Nach Änderungen der Zellmorphologie mit Abflachung der Zelle und Ausbildung von Zellausläufern, löst der Leukozyt interendotheliale Adhäsionsmoleküle wie PECAM-1, CD99 und JAM (2) auf und gelangt durch die entstandene Lücke im Endothel in das subendotheliale Gewebe.

Vaskulogenese – Angiogenese

Auch an der Vaskulogenese und Angiogenese ist das Endothel maßgeblich beteiligt.

Als Vaskulogenese wird die *de novo* Bildung von Gefäßen bezeichnet. Während der Embryonalentwicklung findet die embryonale Vaskulogenese statt. Dabei wandern Angioblasten, endotheliale Vorläuferzellen aus dem Mesoderm, in den Embryo ein und differenzieren sich zu Endothelzellen und formieren so einen primitiven Gefäßplexus (14). Unter bestimmten Umständen wie bei Ischämie, Inflammation und Malignomen kann auch eine postnatale Vaskulogenese beobachtet werden. Unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumshormonen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen wandern endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark aus und bilden neue Gefäße.

Bei der Angiogenese sprossen neue Blutgefäße aus präexistenten Gefäßen aus. Beobachtet wird dieser Prozess z.B. bei der Ausreifung des primitiven embryonalen Gefäßplexus zum organisierten Gefäßsystem und beim neonatalen Organwachstum (15). Angiogenese im adulten Organismus findet u.a. beim zyklusabhängigen Aufbau des Endometriums, beim Aufbau der Plazenta während der Gravidität, bei Wundheilung und Entzündung sowie Hypoxie statt. Weitere pathologische Zustände, die mit einer abnormalen Angiogenese assoziiert sind, sind Neoplasien, die diabetische Retinopathie sowie die rheumatoide Arthritis.

Ruhende Endothelzellen werden durch angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und Angiopoietin-1, ausgeschüttet aus z.B. hypoxischem oder entzündetem Gewebe, aktiviert. Aktivierte Endothelzellen lösen sich aus den Zellkontakten und durchwandern die Basalmembran. Nach Degradierung der extrazellulären Matrix migrieren die Endothelzellen entlang des Gradienten der Wachstumsfaktoren und Chemokine an den Ort der neu zu entstehenden Gefäße. Dort proliferieren sie und formieren sich zu tubulären, gefäßartigen Strukturen. Daran schließt sich die Reifungs- und Differenzierungsphase an mit u.a. Rekrutierung von glatten Muskelzellen oder Perizyten und Ausbildung einer extrazellulären Matrix.

Regulierung des Vasotonus

Eine entscheidende Rolle spielt das Endothel auch bei der Regulierung des Vasotonus. Durch Vasokonstriktion und -dilatation und entsprechende Veränderung des Gefäßdurchmessers werden Blutfluss und die damit verbundene Perfusion von Organen und Gewebe durch das Endothel reguliert. Vermittelt werden die Änderungen des Gefäßtonus über die Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen durch das Endothel mit konsekutiver Modulation des Kontraktionszustands der glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Zu den Vasodilatoren gehören u.a. Stickstoffmonoxid (NO) (16, 17), Prostazyklin, Bradykinin und EDHF (*endothel derived hyperpolarisation factor*). NO spielt bei der Endothel-vermittelten Vasodilatation die wichtigste Rolle. Es wird von der konstitutiven, membrangebundenen endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) gebildet, indem eine Nitrogruppe von L-Arginin abgespalten wird (18, 19). An den glatten Muskelzellen der Gefäßwand führt NO durch eine Erniedrigung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Relaxation und somit zur Vasodilatation. Die Aktivität der eNOS und die Synthese von NO werden gesteigert durch erhöhte Schubspannung sowie durch humorale Faktoren wie Acetylcholin, Bradykinin und Serotonin.

Die Vasokonstriktion wird vermittelt durch u.a. Endothelin-1, Thromboxan A2 und Prostaglandin H2. Darunter ist das Endothelin-1 als hochpotenter Vasokonstriktor besonders hervorzuheben. Endothelin-1 wird von Endothelzellen u.a. bei erhöhter Schubspannung (20) und Hypoxie ausgeschüttet. Auch humorale Mediatoren wie Angiotensin II, Thrombin, Vasopressin und Noradrenalin führen zu einer vermehrten Freisetzung von Endothelin-1 (21). Endothelin-1 bindet an Endothelin-Rezeptoren der glatten Muskelzellen der Gefäßwand mit nachfolgender Kontraktion der Zellen und konsekutiver Vasokonstriktion.

1.2.3 Funktionelle und morphologische Heterogenität des Endothels

Eingangs wurde erwähnt, dass venöse Endothelzellen wie z.B. HUVECs weniger für *in vitro* Analysen zur endothelialen Dysfunktion und Arteriosklerose geeignet sind. Gründe dafür sind bedeutende funktionelle und morphologische Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen.

Funktionell unterscheiden sich Endothelzellen aus Arterien und Venen u.a. in Hinblick auf den Stickstoffmonoxid(NO)-stoffwechsel, dessen Störung eine wichtige Rolle bei der endothelialen Dysfunktion spielt. NO wirkt vasodilatierend, hemmt die Thrombozytenadhäsion und – aggregation und die Proliferation von glatten Muskelzellen. Die reduzierte arterielle NO-Verfügbarkeit ist die führende Ursache der endothelialen

Dysfunktion (22). Die bisherige Forschung zum endothelialen NO-Stoffwechsel erfolgte häufig an venösen Endothelzellen, in vielen Fällen an HUVECs. In verschiedenen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die NO-vermittelte Gefäßdilatation sowohl auf makro- als auch auf mikrovaskulärer Ebene in Arterien ausgeprägter ist als in Venen (23-27). Eine Erklärung dafür ist u.a. die höhere basale eNOS-Expression in arteriellen Endothelzellen (28). Dieser Unterschied verdeutlicht, dass an venösen Endothelzellen gewonnene Erkenntnisse nur bedingt auf das arterielle System übertragen werden können. Daher sind *in vitro* Modelle mit arteriellen Endothelzellen von großer Bedeutung.

Wagner et al. verglichen arterielle und venöse Endothelzellen und wiesen weitere Unterschiede in Hinblick auf Zellmorphologie, Proteinsyntheseverhalten und Zellproliferationsrate nach (29). Sie zeigten, dass venöse Endothelzellen länger, dünner und polymorpher sind und zudem Zellfortsätze ausbilden. Endothelzellen aus dem arteriellen Stromgebiet haben hingegen eine deutlich höhere Expressionsrate für ca. ¼ der untersuchten Proteine. Nach Verletzung der Integrität der kohärenten Endothelzellschichten wurde beobachtet, dass arterielle Endothelzellen eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen, während venöse Zellen den Schaden vielmehr über die Zunahme der Zellgröße kompensieren und die Proliferationsrate nur gering ansteigt.

Auch Liu et al. analysierten die Unterschiede im Expressionsverhalten der Endothelzellen (30). Sie zeigten, dass im Organkulturmodell (Kultivierung von ganzen Nabelschnüren und anschließende Zellisolierung) die TNF- α induzierte Expression inflammatorischer endothelialer Oberflächenmoleküle auf venösen Endothelzellen ausgeprägter ist als auf arteriellen Zellen. Gleichzeitig demonstrierten sie, dass diese Unterschiede im Zellkulturmodell (direkte Isolierung der Zellen aus der Nabelschnur) zum einen nicht mehr nachweisbar sind und zum anderen die Expression der genannten Proteine nur noch minimal ist. Daraus folgerten sie, dass die Expression von Adhäsionsmolekülen stark von den hämodynamischen und metabolischen Umgebungsfaktoren und der lokalen Anatomie abhängig ist. Bei Fehlen dieser Einflussfaktoren, wie es in Zellkultur der Fall ist, kommt es zu einem stark veränderten Expressionsverhalten, bzw. zu einem Verlust phänotypischer Eigenschaften.

Die vermehrte Expression von E-Selectin und VCAM-1 auf venösen Endothelzellen im Organkulturmodell wurde durch die höhere Leukozytenaffinität venöser Zellen begründet. Die Leukozytenadhäsion und -migration im Rahmen einer Inflammation findet hauptsächlich in den postkapillären Venolen und Venen statt.

Bereits zuvor hatten mehrere Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass die meisten induzierbaren Adhäsionsmoleküle (u.a. P-Selectin/CD62P, E-Selectin/CD62E, ICAM-1/CD54)

hauptsächlich von venösen Endothelzellen exprimiert werden (1, 31, 32), vor allem auf mikrovaskulärer Ebene (33).

Ursächlich für die exemplarisch beschriebene Heterogenität der Endothelzellen werden zwei verschiedene Hypothesen diskutiert: die genetische und die extrinsische Hypothese.

1.2.4 Endotheliale Heterogenität - genetische und extrinsische Hypothese

Die genetische Hypothese postuliert, dass die funktionellen und phänotypischen Eigenschaften und der Bestimmungsort von Endothelzellen epigenetisch vorbestimmt sind. Noch vor Emigration aus dem Mesoderm und Einsatz des Blutflusses ist der Werdegang der endothelialen Progenitorzellen genetisch festgelegt (34, 35). Diese Informationen sind jedoch nicht in der DNA-Sequenz festgelegt, sondern werden durch DNA-Methylierungen codiert, die erworben werden.

Die extrinsische Hypothese geht hingegen davon aus, dass lokale Faktoren, wie Hämodynamik (u.a. Blutdruck und Flussrichtung), O₂- und CO₂-Partialdrücke und metabolische Faktoren die Differenzierung der Endothelzellen beeinflussen (36). Die extrinsische Hypothese wird gestützt durch Arbeiten, die nachweisen, dass sich der Phänotyp von Endothelzellen unter veränderten Umgebungsbedingungen ändern kann. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass venöse Endothelzellen, die arteriellen Flusseigenschaften wie hohem pulsatilem Druck und Schubspannung ausgesetzt werden, einen arteriellen Phänotyp annehmen (37, 38). Dies ist beispielsweise bei venösen Koronarbypässen der Fall. Dabei kommt es u.a. zu einer gesteigerten eNOS- (39) und verminderten Thrombomodulin-Expression (40) in den arterialisierten venösen Endothelzellen.

Es ist jedoch davon auszugehen, dass sowohl genetische Faktoren als auch lokale, umgebungsabhängige Faktoren die phänotypische Heterogenität der Endothelzellen bedingen (41).

1.2.5 Endotheliale Marker

Der Endothelzellnachweis kann *in vivo* und *in vitro* durch den Nachweis von spezifischen, von Endothelzellen exprimierten Markern erbracht werden. Garlanda und Dejana beschrieben mehrere konstitutive sowie durch inflammatorische Zytokine und Wachstumshormone induzierbare endotheliale Marker (42). Darunter sind die wichtigsten konstitutiv exprimierten Endothelzellmarker der von-Willebrand-Faktor (vWF) (43), CD31/PECAM-1 (44, 45), *Angiotensin-converting enzyme* (ACE), der Typ I *Scavenger*

Rezeptor (Aufnahme von acetyliertem LDL) (46), *Ulex europaeus* I agglutinin binding / O(H) blood-type antigen (47), VE-Cadherin (48), CD102/ICAM-2 (49), CD105/Endoglin (50), CD36 (51) und CD73/VAP-2 (52). Die wichtigsten induzierbaren Marker sind CD54/ICAM-1 (49), CD106/VCAM-1, CD62E/E-Selektin (53) und CD62P/P-Selektin.

Die meisten der genannten Marker sind endotheliale Zelladhäsionsmoleküle (CD31, VE-Cadherin, CD102, CD105, CD36, CD73, CD54, CD106, CD62E). Dies sind Moleküle auf der Oberfläche von Endothelzellen, die u.a. der Kommunikation und Interaktion mit benachbarten Endothelzellen oder anderen Zellen wie z.B. Leukozyten und Thrombozyten dienen.

Die in unseren Analysen eingesetzten Endothelzellmarker werden im Folgenden näher erläutert.

PECAM-1 / CD31:

PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*) ist ein auf Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen wie Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten exprimierter Rezeptor für Zelladhäsion und Signaltransduktion. Zudem stellt es die wesentliche Komponente der interzellulären Bindungsstellen in konfluenten Endothelzellen dar (54-57).

Auf Endothelzellen, insbesondere interzellulär, liegt PECAM-1 mit einer Anzahl von 10^6 /Zelle in sehr hoher Dichte vor (im Vergleich: ca. 5000 Moleküle pro Thrombozyt) (58).

PECAM-1 wurde anfangs eine ausschließlich proinflammatorische Funktion zugesprochen. DeLisser et al. zeigten, dass im Rahmen inflammatorischer Prozesse die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und die nachfolgende Transmigration über PECAM-1 erfolgt (59). In den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend evident, dass PECAM-1 sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Funktionen besitzt. Das antiinflammatorische Potential wirkt sich über die Abschwächung der Leukozytenaktivierung, die Hemmung der Zytokinproduktion und die Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion aus (60). Auf welche Art die gegensätzlichen Funktionen gesteuert werden ist nicht geklärt.

Aufgrund der hohen Dichte auf Endothelzellen und fehlender Expression auf nicht-endothelialen Zellen wie Fibroblasten oder Muskelzellen (61) wird PECAM-1 häufig zur Charakterisierung von Endothelzellen eingesetzt. Obwohl es zu den konstitutiven endothelialen Markern gehört, gibt es in der Literatur Hinweise für eine Herabregulierung unter Einfluss von Chemokinen (62).

ICAM-2 / CD102:

Beim Menschen wird ICAM-2 auf Endothelzellen und Leukozyten-Subpopulationen (u.a. Lymphozyten und Monozyten) exprimiert (63-66). In Mäusen konnte eine starke Expression auf Endothelzellen und lymphatischen Zellen nachgewiesen werden. Auf Zellen der myeloiden Linie, wie z.B. Granulozyten, Makrophagen und Thrombozyten zeigt sich eine nur schwache Expression, während sie auf Fibroblasten gänzlich fehlt. ICAM-2 ist ein konstitutives Adhäsionsmolekül, dessen Expressionsrate durch Zytokin-Stimulation nicht erhöht wird (66). Allerdings gibt es auch hier Hinweise für eine Zytokin/TNF- α /IL-1 vermittelte Reduktion der ICAM-2-Expression (67).

Zu den wesentlichen Funktionen von ICAM-2 gehört die Beteiligung an der Lymphozytenrezirkulation, bei der Lymphozyten transendothelial ins Gewebe emigrieren und anschließend über die Lymphe wieder ins Blut gelangen (68). ICAM-2 scheint eher nicht an entzündlichen Vorgängen teilzunehmen.

Endoglin / CD105:

Endoglin ist ein Integrin und ein Co-Rezeptor des TGF- β Rezeptorkomplexes. Endoglin wird bevorzugt und stark auf Endothelzellen exprimiert, vor allem auf mikrovaskulärer Ebene (69). Allerdings kommt es in Situationen gesteigerter Zellproliferation und Angiogenese, wie z.B. bei Entzündungen, Geweberegenerationen und tumorösen Prozessen, zu einer Steigerung der Expressionsrate (70-73). Daher eignet sich Endoglin sehr gut als Proliferationsmarker für Endothelzellen. Es wird jedoch auch eine schwache Endoglin-Expression auf nicht-endothelialen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und kardialen Mesenchymzellen beschrieben (73).

Als Co-Rezeptor des TGF- β Rezeptorkomplexes moduliert Endoglin die Rezeptorantwort auf TGF- β . TGF- β (Isoformen TGF- β 1, - β 2, - β 3) ist ein pleiotropes Zytokin, das Einfluss hat auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Angiogenese, vor allem im Rahmen der Tumorentstehung (74).

ICAM-1 / CD54:

ICAM-1 ist neben Endothelzellen auch auf Lymphozyten und Monozyten sowie auf Fibroblasten, dendritischen Zellen und Thymusepithelien zu finden(75).

In Endothelzellen gehört es im Gegensatz zu den bisher aufgezählten Adhäsionsmolekülen zu den induzierbaren Integrinen. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , LPS oder IL-1 verursachen eine deutliche Steigerung der Expressionsrate (um das 2- bis 40-fache),

während ruhende, nicht stimulierte Endothelzellen nur eine niedrige basale Expressionsrate aufweisen (76). An HUVECs wurde ein rascher Anstieg der ICAM-1 Expression unter IL-1 und TNF- α Einfluss nachgewiesen. Bei anhaltender Zytokin-Stimulation zeigte sich eine 24-72 Stunden anhaltende Persistenz von ICAM-1. Die Expressionsrate fiel nach Entzug des Zytokin-Stimulus auf den Basalwert nicht-stimulierter Zellen zurück (77).

Über ICAM-1 erfolgt im Rahmen inflammatorischer Prozesse die feste Adhäsion und Transmigration von Leukozyten. Dies geschieht hauptsächlich über die leukozytären Liganden Mac-1 und LFA-1 (78, 79).

Eine erhöhte ICAM-1 Expression findet sich in arteriosklerotischen Gefäßarealen, sowie bei aktiven und fortschreitenden Autoimmunprozessen (80).

VCAM-1 / CD106:

VCAM-1 kommt auf Endothelzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, der Synovia und auf dem Mesothel vor. Auf nicht aktivierten Endothelzellen findet sich eine niedrige basale Expressionsrate, die nach Zytokinstimulation (TNF- α , IL-1, IL-4, IFN- γ) hochreguliert wird. Dabei kann ca. 2 h nach Zytokinstimulus ein Anstieg der Expression verzeichnet werden, die nach 4-6 h ihr Maximum erreicht und für ca. 48-72 h anhält (81). Ebenso wie ICAM-1 ist VCAM-1 wesentlich an der Leukozytenadhäsion und Diapedese im Rahmen von entzündlichen Vorgängen beteiligt. Über VCAM-1 erfolgt dabei hauptsächlich die Rekrutierung und Transmigration von Lymphozyten und möglicherweise auch Monozyten, nicht jedoch von Granulozyten(81).

Klinische Bedeutung hat VCAM-1 in der Pathogenese der Arteriosklerose und rheumatoiden Arthritis. Bei beiden Erkrankungen finden sich erhöhte VCAM-1-Expressionen (82, 83).

Von-Willebrand-Faktor (vWF)

Der vWF ist ein multimeres Glykoprotein, das aus 50-100 Monomeren besteht und dadurch multiple Bindungsstellen für seine Bindungspartner Faktor VIII, Glykoprotein Ib, Glykoprotein IIb/IIIa, Kollagen und Heparin besitzt.

vWF wird nur von Endothelzellen und Megakaryozyten/Thrombozyten (84) exprimiert und findet sich in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen, in den α -Granula der Thrombozyten (85), in der Basalmembran / extrazellulären Matrix und in gelöster Form im Plasma. Die Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und die α -Granula der Thrombozyten stellen die vWF-Speicher dar.

Die im Plasma gelöste vWF-Fraktion liegt als vWF/Faktor VIII-Komplex vor und dient als Träger für Faktor VIII hauptsächlich dessen Stabilisierung und Schutz vor Proteolyse (86).

Eine wichtige Rolle spielt der vWF bei der primären Blutstillung bzw. der zellulären Gerinnung. Über den vWF erfolgt die Thrombozytenadhäsion an die verletzte Gefäßregion und die nachfolgende Thrombozytenaktivierung und –aggregation (87, 88).

Hohe Schubspannung verursacht eine Veränderung der vWF-Form, so dass es an extrazelluläre Matrixproteine bindet und ebenfalls die Thrombozytenadhäsion und –aggregation nach sich zieht (89).

Da der vWF nur von Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert wird, ist anzunehmen, dass es als endothelspezifischer Marker zur Charakterisierung von Endothelzellen gut geeignet ist. Yamamoto et al. haben 1998 die Endothelspezifität des vWF evaluiert (90). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass es auf Gefäßebene Unterschiede in der Expression des endothelialen vWFs gibt. In murinem Gewebe ist der vWF im Endothel weniger gut durchbluteter Organe 5 bis 50-fach höher exprimiert, als in gut perfundierten Organen wie z.B. in der Leber oder Niere. Außerdem ist die Expressionsrate des vWFs auf makrovaskulärer Ebene und in venösen Endothelzellen höher, als auf mikrovaskulärer Ebene und in Arterien. Senis et al. zeigten zudem, dass in der Rattenaorta die vWF-Expression sogar von Zelle zu Zelle variierte (91). Die Variation der vWF-Expression muss beim Einsatz des vWF zum Nachweis von Endothelzellen berücksichtigt werden. Die Eignung des vWF als genereller Endothelzellmarker ist daher fraglich.

Dil-Ac-LDL-Inkorporation

Zum Nachweis von Endothelzellen wird sehr häufig die Dil-Ac-LDL-Färbung eingesetzt. Endothelzellen und Makrophagen nehmen im Rahmen des Cholesterinmetabolismus über den „*scavenger cell pathway*“ acetyliertes LDL auf. Das Dil-Ac-LDL ist acetyliertes LDL, das an Fluoreszein 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine Perchlorat gekoppelt ist. Nach Aufnahme des Dil-Ac-LDL in die Endothelzelle kann die Fluoreszenz sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch mittels FACS-Analyse detektiert werden. Bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml hat Dil-Ac-LDL keinen Einfluss auf das Zellwachstum (46).

1.3 Methoden zur Isolierung muriner Endothelzellen

Insbesondere auf dem Gebiet der kardiovaskulären Forschung werden Zellmodelle benötigt, die geeignet sind für Untersuchungen am Endothel. Da in vielen Fällen Fragen zu pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen der Arteriosklerose bzw. der endothelialen Dysfunktion Ausgangspunkt für weitere Analysen sind, besteht großes Interesse an Endothelzellen aus dem makrovaskulären arteriellen Gefäßsystem. Die begrenzten Ressourcen an humanen arteriellen makrovaskulären Endothelzellen führen zur Suche nach alternativen Zellmodellen. Aufgrund der einfachen Verfügbarkeit sowie diverser zur Verfügung stehender transgener Mauslinien kommt murinen Zellmodellen dabei die größte Bedeutung zu. Es wurden verschiedene Methoden beschrieben, mit denen Endothelzellen aus unterschiedlichen Gefäßabschnitten der Maus isoliert werden können. Die in der Literatur vorhandenen Protokolle zur Isolierung muriner Endothelzellen können in zwei Grundmethoden eingeteilt werden, die entweder mikrovaskuläre oder makrovaskuläre Endothelzellen zum Ziel haben.

Bei der „*Explant*“-Technik werden Gefäßstücke, meist Aortenstücke, auf Matrigel-beschichteten Platten ausgefaltet. Matrigel ist eine gelöste Basalmembranvorbereitung und dient der Anhaftung und Differenzierung der Endothelzellen. Nach Ausbreitung der Gefäßsegmente wandern Endothelzellen, früher als Myozyten und Fibroblasten, aus der Gefäßwand auf die beschichteten Kulturplatten aus (92). Nach 4 bis 6 Tagen werden die Gefäßstücke entfernt, bevor die nicht-endothelialen Zellen in die Kultur übergehen. Es gibt diverse Modifikationen dieser Technik. Die Aorten werden in Streifen, Ringe oder kleine Stücke geschnitten. Zudem wird in einigen Protokollen das periaortale Binde- und Fettgewebe entfernt.

In weiterentwickelten Protokollen wird die „*Explant*“-Technik durch eine anschließende fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*) ergänzt. Dabei werden die mit Fluorochromen markierten Endothelzellen im FACS-Gerät aus dem Zellgemisch isoliert. Magid et al. haben dafür beispielsweise die Fluoreszenz des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) der transgenen, GFP-exprimierenden Maus genutzt (92). Huang et al. haben die Primärkultur mit Dil-Ac-LDL gefärbt, und die Zellsortierung anhand des darin enthaltenen Fluoreszeins 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine Perchlorat durchgeführt (93). Die „*Explant*“-Methoden dienen der Isolierung aortaler, makrovaskulärer Endothelzellen.

Die alternative Grundmethode zur Gewinnung muriner Endothelzellen basiert auf enzymatischer Dissoziation der Gefäße. Dabei werden die Gefäße meist mit Kollagenase

und/oder Trypsin behandelt, um das Endothel von der subendothelialen Matrix abzulösen und eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Diese Methode erfordert in den meisten Fällen eine anschließende Zellseparation, mit der Endothelzellen von nicht-endothelialen Zellen wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen getrennt werden. Dazu gibt es die Möglichkeit der seriellen Zelltrennung mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS)(94) und der parallelen Zelltrennung mittels magnetischer Zellseparation mit *Microbeads* (MACS) (95) oder *Dynalbeads* (96). Bei der magnetischen Zellseparation werden die Zielzellen mit spezifischen Antikörpern markiert, die entweder direkt an superparamagnetische Partikel gebunden sind, oder erst in einem zweiten Schritt an diese gekoppelt werden. Letztlich werden die Zielzellen, die mit den magnetischen *Beads* beladen sind, im Magnetfeld von den restlichen Zellen der Primärkultur separiert.

Die enzymatischen Methoden sind zu unterteilen in Methoden zur Isolierung makrovaskulärer oder mikrovaskulärer Endothelzellen. Zur Gewinnung makrovaskulärer Endothelzellen wird die Mausaorta kanüliert und mit Kollagenaselösung befüllt. Nach der Kollagenaseinkubation werden die Endothelzellen aus der Aorta herausgespült, aufgefangen und in Kultur genommen (97, 98). Diese Methode, für die mehrere Protokolle mit verschiedenen Modifikationen beschrieben sind, ist vergleichbar mit der Isolationsmethode für HUVECs (99) und bedarf keiner weiteren Zellseparationsmaßnahme.

Der von intraluminal erfolgenden Enzymbehandlung steht die mechanische Gewebezerkleinerung mit anschließendem Enzymverdau gegenüber. Diese Protokolle dienen in erster Linie der Gewinnung mikrovaskulärer Endothelzellen. Daher werden meist Lunge und Herz entnommen und in kleinste Gewebestücke geschnitten (95, 96). Die Gewebestücke werden anschließend mit Enzymen (Kollagenase, Trypsin, Dispase) verdaut, um die Endothelzellen von der Basalmembran ab- und aus dem Zellverband herauszulösen. In einigen Protokollen wird das Zell-/Gewebe gemischt nach der Enzymbehandlung noch gesiebt (94). Diese Art von Isolationsmethoden erfordern jedoch stets im Anschluss eine Zellseparation wie oben beschrieben (100).

Trotz der vielen verschiedenen Isolationsprotokolle hat sich bis heute kein Standardprotokoll zur Gewinnung muriner arterieller Endothelzellen, wie es bei der Isolierung von HUVECs bereits seit 1973 der Fall ist (99), etablieren lassen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer reproduzierbaren Methode zur Isolierung muriner aortaler Endothelzellen durch die Weiterentwicklung bereits bestehender Protokolle. Die Besonderheit unseres Ansatzes besteht darin, dass die Mausaorta im Ganzen einem Enzymverdau unterzogen wird und anschließend die sich demarkierende Intima gezielt mit einem Plastikschaaber abgetrennt wird. Das primäre Ziel dieses Vorgehens

ist die Erzielung einer hohen Endothelzellausbeute mit gleichzeitig geringer Kontamination durch nicht-endotheliale Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich
Dil-Ac-LDL	Biomedical Technologies Inc.
Ethanol	Merck
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Biochrom
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG
NGS (<i>normal goat serum</i>)	VectorLabs
Penicillin / Streptomycin	Gibco / Invitrogen,
Saponin	Roth
<i>SlowFade</i> Gold (Eindeckmittel)	Invitrogen
<i>Tumor necrosis factor-α</i>	Sigma

2.1.2 Enzyme

<i>Collagenase Typ I</i>	Biochrom
<i>Collagenase Typ II</i>	Biochrom
<i>Collagenase Typ XI</i>	Sigma-Aldrich
DNase I	Roche
Hyaluronidase Typ I-S	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich

2.1.3 Medien

<i>Dulbecco's MEM Eagle</i>	Gibco / Invitrogen
<i>MVECG-Medium</i>	Provitro

2.1.4 Puffer

<i>HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)</i>	0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,44 mM H ₂ PO ₄ , 1,3 mM CaCl ₂ , 1,0 mM MgSO ₄ , 4,2 mM NaHCO ₃
<i>PBS (phosphate buffered saline)</i>	2,7 mM KCl, 2 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
<i>s-EDTA (s- ethylene diamine tetraacetic acid)</i>	0,7 mM EDTA, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,2)

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper

<i>Rat Anti-mouse CD31, monoklonal</i>	BD Pharmingen, 553370
<i>Rat Anti-mouse CD62e, monoklonal</i>	R&D Systems, MAB575
<i>Rat Anti-mouse CD73, monoklonal</i>	BD Pharmingen, 550738
<i>Rat Anti-mouse CD 102, monoklonal</i>	BD Pharmingen, 550544
<i>Rat Anti-mouse CD 105, monoklonal</i>	BD Pharmingen, 550546
<i>Rat Anti-Mouse CD 106, monoklonal</i>	BD Pharmingen, 550547
<i>Polyklonal Rabbit Anti-Human vWF</i>	DakoCytomation, A 0082

Sekundärantikörper

<i>Rh-Goat-Anti-Rat</i>	Jackson ImmunoResearch
<i>FITC-Goat-Anti-Rat</i>	Jackson ImmunoResearch
<i>FITC-Goat-Anti-Rabbit</i>	Jackson ImmunoResearch

Fluorochrom-gekoppelte Primärantikörper

<i>R-PE Rat Anti-Mouse CD31, monoklonal</i>	BD Pharmingen 553373
<i>FITC Hamster Anti-Mouse CD54, monoklonal</i>	BD Pharmingen 553252
<i>PE Rat Anti-Mouse CD73, monoklonal</i>	BD Pharmingen 550741

<i>FITC Rat Anti-Mouse CD102, monoklonal</i>	BD Pharmingen 557444
--	----------------------

2.1.6 Geräte

Autoklav	Webeco
Durchflusszytometer, FACSCalibur™	Becton Dickinson
Feinanalysenwaage BP 121 S	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert35	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop, Olympus BX50	Olympus
Hellfeldkamera	Sony
Fluoreszenzkamera	Olympus
Kaltlichtquelle, KL 1500 electronic	Schott
Magnetblock, Dynal MPC-S	Invitrogen
Neubauer Zählkammer	Hecht
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson
pH-Meter, MP 220	Mettler
Schüttler	Edmund Bühler
Schüttelwasserbank, GFL 1083	GFL
Sicherheitswerkbank, LaminAir® TL 2472	Heraeus Instruments
Stereomikroskop, Leica MZ6	Leica
Sterilwerkbank, Antair BSK	Steril S.p.A
Vortexer, Vortex-Genie®2	Scientific Industries
Zellkulturinkubator, HERAcell 240	Heraeus Instruments
Zellkultur-Petrischalen	Techno Plastic Products AG
Tischzentrifugen	Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung muriner Endothelzellen (MAEC) aus der Mauseorta

Base-Medium	DMEM mit 25 mM HEPES, 20% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (Sean P. Colgan)
Kollagenase-Lösung:	Kollagenase Typ I: 450 U/ml
	Kollagenase Typ II: 4 mg/ml
	Kollagenase Typ XI: 125 U/ml
	Hyaluronidase Typ 1-s: 60 U/ml
	DNase I: 60 U/ml

Für die Gewinnung muriner Endothelzellen aus der Mauseorta wurden Mäuse im Alter von 28-35 Tagen benutzt, wobei jeweils 4 Mäuse pro Durchgang präpariert wurden. Die Tötung der Mäuse zum Zweck der Organentnahme erfolgte mittels Genickbruch durch Kollegen aus der Arbeitsgruppe (Organisationsnummer O54/90, Tierversuchsanlage der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf).

Anschließend wurden Thorax und Abdomen großzügig mit 70 % Ethanol eingesprüht, um eine Kontamination mit Keimen aus dem Tierfell bei der anschließenden Präparation der Aorta zu reduzieren. Mit sterilisierter Pinzette und Schere wurde das Abdomen von der Mitte aus eröffnet, wobei zwei Schnitte von Abdomenmitte zu beiden Seiten in Richtung Axilla gesetzt wurden. Nach Eröffnen des Thorax wurde die ventrale Thoraxwand nach oben weggeklappt, so dass man Einsicht auf die Thoraxorgane erhielt. Die weitere Präparation erfolgte erneut mit sterilisierten Instrumenten. Als erstes wurden beidseits die Lungenflügel entfernt und der Zugang zur Aorta geschaffen. Die Aorta wurde dann im Bereich der proximalen *Aorta ascendens* abgesetzt und von der Wirbelsäule frei präpariert. Das herauspräparierte Aortenstück, von der proximalen *Aorta ascendens* bis zur distalen *Aorta abdominalis* reichend, wurde schließlich in ein 50ml-Falcongefäß mit eisgekühltem *Base-Medium* transferiert, mehrmals gespült und dann auf Eis gelagert (Abb. 2.1). In einem Durchgang wurden 4 Aorten nach beschriebener Art herauspräpariert.

Die weitere Präparation der Aorten fand unter der Sicherheitswerkbank (LaminAir® TL 2472, Heraeus) statt. In eine 60 x 16 mm Petri-Schale wurden ca. 5ml *Base-Medium* gefüllt und die Aorten auf die Schale transferiert. Unter einem Stereomikroskop (MZ6, Leica) mit einer

Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott) wurde das umgebende Fett- und Bindegewebe mit sterilen Pinzetten von den Aorten abpräpariert (Abb. 2.2). Im Anschluss wurden die Aorten in eine neue 60 x 16 mm Petri-Schale mit frischem *Base-Medium* (5 ml) überführt, wo sie mit einer sterilen Federschere unter dem Mikroskop der Länge nach aufgeschnitten wurden (Abb. 2.3).



Abb. 2.1:
Murine Aorten mit noch umgebendem Fett- und Bindegewebe

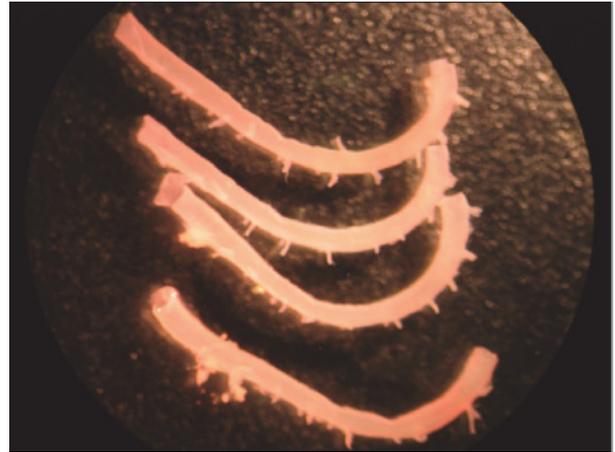


Abb. 2.2:
Murine Aorten, von Fett- und Bindegewebe freipräpariert



Abb. 2.3:
Freipräparierte, der Länge nach aufgeschnittene murine Aorten vor der enzymatischen Behandlung

Die *longitudinal* eröffneten Aorten wurden im nächsten Schritt für den Kollagenaseverdau in 2 ml einer vorgewärmten und steril filtrierten Kollagenase-Lösung gegeben. Die Inkubation in der Kollagenase-Lösung erfolgte für 45 min bei 37 °C im schüttelnden Wasserbad. Alle 5 min wurde das Falcon-Gefäß mit den Aorten auf dem Vortex-Gerät durchgemischt.

Nach dem Kollagenase-Verdau wurden 10 ml frisches, eisgekühltes *Base-Medium* hinzugefügt, um die Aktivität der Enzyme zu stoppen. Der Überstand mit bereits

herausgelösten Endothelzellen wurde dekantiert und auf Eis gelagert. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Aorten aus der Restlösung herausgeholt und auf eine frische 60 x 16 mm Petri-Schale mit ca. 1 ml *Base-Medium* überführt. Unter dem Stereomikroskop wurden die Aorten, mit der Endothelfläche nach oben zeigend, ausgebreitet. Mit einem sterilen Plastischaber wurde die *Tunica intima*, die sich sichtbar von der *Tunica media* abhob, vorsichtig, ohne die Aorta zu zerreißen, abgetrennt. Das isolierte Zellmaterial wurde abpipettiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Alle 4 Aorten wurden auf gleiche Art und Weise behandelt und die Endothelschicht aller Aorten (ohne die Aorten selbst) in einem Falcon-Gefäß gesammelt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm und 4 °C für 8 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, das *Zellpellet* in 500 µl Trypsin resuspendiert und für 5 min ins 37 °C Wasserbad gestellt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Trypsinaktivität wurde mit 15 ml *Base-Medium* gestoppt und die Zellsuspension erneut bei 1000 rpm, 4 °C für 8 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das *Pellet* in 5 ml *Base-Medium* resuspendiert und erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert, um den letzten Rest an Trypsin und Kollagenase aus der Zellsuspension herauszuwaschen. Nach dem weiteren Waschgang wurde das *Zellpellet* in 3-4 ml *MVECG-Medium* (Provitro, GmbH) resuspendiert und in einer gelatinebeschichteten Kammer (9,6cm²) einer 6-well-Platte ausgesät. Die isolierten Zellen wurden bis zum Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz (ca. 6-8 d) bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.2 Aufreinigung der Primärkultur mit *cleavable Dynabeads NSA*

Prinzip der Aufreinigung mit *cleavable Dynabeads NSA*

Um die murinen Endothelzellen aus der Primärkultur zu isolieren, erfolgte die magnetische Zellseparation mit *Dynabeads*. *Dynabeads* sind ca. 1-5 µm große, uniforme und monodisperse Kügelchen mit einem magnetischen Kern aus $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ und Fe_3O_4 und einer dünnen Polystyrolhülle, die u.a. der Isolierung des toxischen Eisenkerns dient. Aufgrund ihrer paramagnetischen Eigenschaft sind *Dynabeads* nur in einem Magnetfeld magnetisch und verlieren ihre magnetische Potenz außerhalb des Magnetfeldes (101). Bei einer Größendimension im Mikrometerbereich ist die Gefahr der Endozytose der *Dynabeads* mit daraus folgender Zelltoxizität im Vergleich zu den *MicroBeads* gering. Größenbedingt sind *Dynabeads* jedoch nicht für FACS-Experimente geeignet. Daher müssen sie nach der Zellseparation von den Zielzellen abgetrennt werden, sofern FACS-Analysen vorgesehen sind.

Bei der Anwendung von *Dynabeads* gibt es zwei Möglichkeiten der Zellseparation: die positive und negative Separationsmethode (s. Abb. 2.4).

Bei der positiven Methode werden die gewünschten Zielzellen direkt mit an Antikörper oder Liganden gekoppelten *Dynabeads* beladen und so aus dem Zellgemisch herausgefiltert. Bei der negativen Methode werden nicht die Zielzellen, sondern die restlichen, nicht erwünschten Zellen mit *Dynabeads* markiert und isoliert, so dass am Ende die Zielzellen übrig bleiben. Der Vorteil der Negativisolierung besteht darin, dass die Zielzellen unversehrt bleiben, da sie den Strapazen der *Dynabead*-Behandlung nicht ausgesetzt werden.

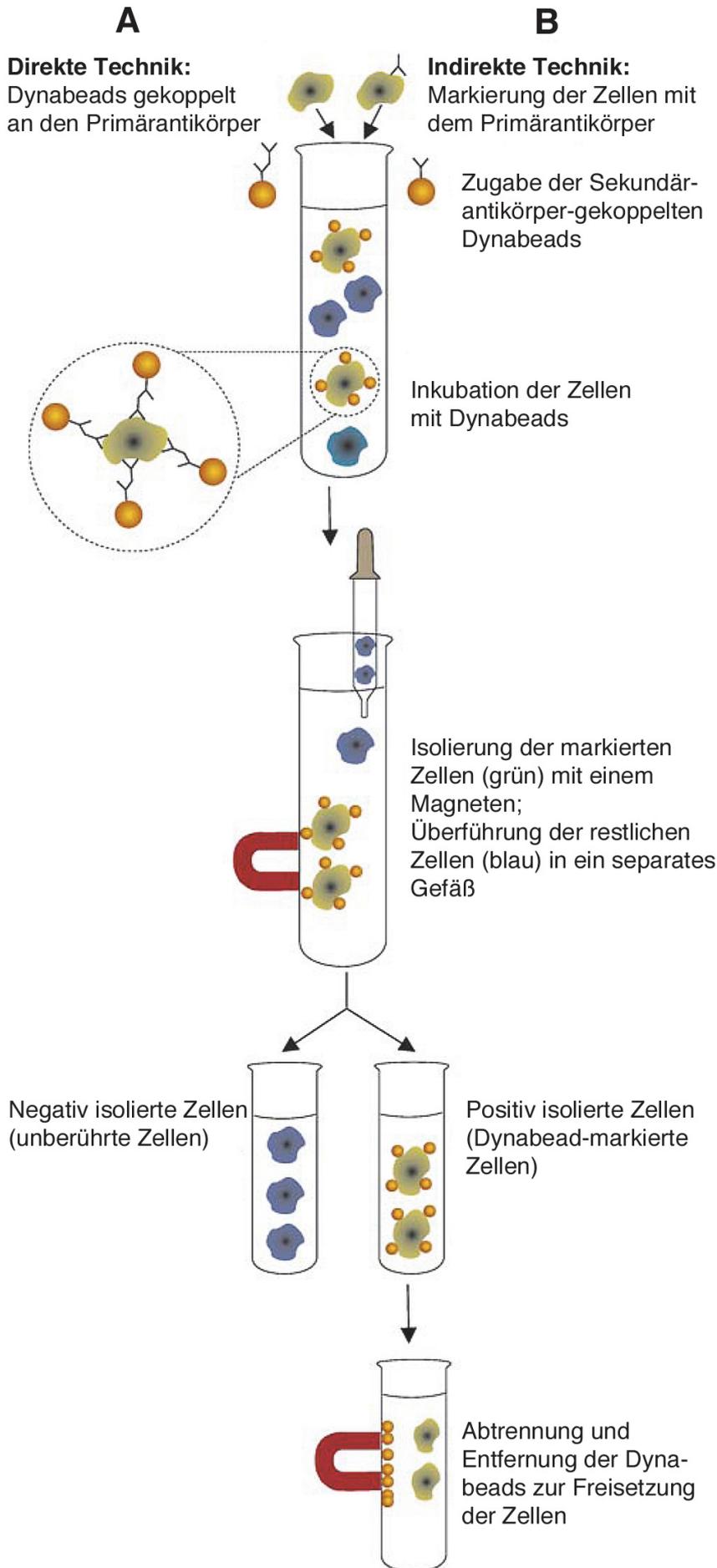


Abb. 2.4:

Direkte und indirekte Isolationstechnik mit *Dynabeads* & positive und negative Zellseparation (101); Modifiziert und veröffentlicht mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags Berlin Heidelberg und des Autors; Erläuterungen siehe Text

Weiterhin wird bei der Zellseparation mit *Dynabeads* zwischen der direkten und indirekten Technik unterschieden (s. Abb. 2.4). Bei der direkten Zellisolierung sind die *Dynabeads* von vornherein an den Primärantikörper bzw. -liganden gekoppelt und können so direkt über das spezifische Antigen an die Zielzellen binden.

Bei der indirekten Methode werden im ersten Schritt die Zielzellen mit dem Erstantikörper bzw. Erstliganden markiert. Im Anschluss werden die an den Sekundärantikörper bzw. -liganden gekoppelten *Dynabeads* hinzugefügt, die gegen den Erstantikörper bzw. Erstliganden gerichtet sind. Die Markierung der Zielzellen mit *Dynabeads* erfolgt somit in zwei Schritten.

Die in dieser Arbeit eingesetzten abtrennbaren *Dynabeads* wurden von Invitrogen speziell für unser Projekt hergestellt und waren nicht kommerziell zu erhalten. Auf deren Empfehlung erfolgte die Zellseparation in der indirekten Technik in Form einer Positivselektion. Zuerst wurde die Primärkultur mit dem CD31-Antikörper markiert. Dann wurden die *Dynabeads* hinzugefügt, die an den Primärantikörper gebunden haben und darüber an die Endothelzellen gekoppelt wurden. Nach der Markierung der Zielzellen mit *Dynabeads* wurde das Zellgemisch im Hochgradienten-Magnetfeld eines Magnetpartikelkonzentrators platziert, so dass die *Dynabeads* mit den gebundenen Endothelzellen vom Magneten angezogen wurden. Die Negativzellen bzw. Nicht-Endothelzellen, die bei fehlender CD31-Expression nicht mit *Dynabeads* markiert wurden, verblieben in Lösung und konnten separat aufgefangen werden. Nach Entnahme der Zellen aus dem Magnetfeld erhielt man die *Dynabead*-gekoppelten murinen Endothelzellen.

Da die weitere Charakterisierung der Endothelzellen u.a. mit FACS-Analysen erfolgen sollte und Proliferationsprobleme von *Dynabead*-beladenen HUVECs beschrieben waren (102), wurden von Invitrogen abtrennbare (*cleavable*) *Dynabeads* zur Verfügung gestellt. Nach der Zellseparation erfolgte die Abtrennung der *Dynabeads* mit dem im *Kit* von Invitrogen befindlichen Abtrennpuffer (*Release Buffer*).

Durchführung der Zellseparation mit *cleavable Dynabeads NSA*

Im <i>Kit</i> von Invitrogen:	<i>Release Buffer</i>
	<i>Dynabeads NSA</i> (10 mg/ml, 4 x 10 ⁸ beads/mg) Empfohlene Konzentration: 0,75 mg beads/ml
	CD31 Antikörper (0,2 mg/ml) Empfohlene Konzentration: 1 µg/1 Mio. Zellen
Weiterhin benötigt: PBS-Puffer:	PBS w/ 0,1% BSA und 2 mM EDTA (pH7,4)

Die Primärkultur wurde mit der magnetischen Zellseparation aufgereinigt, sobald die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90% erreicht hatten, was im Durchschnitt nach 6-8 Tagen gegeben war.

Aufgrund der geringen Gefäßgröße der murinen Aorta mussten die Zellen aus mehreren Aorten für die magnetische Zellseparation *gepoolt* werden. Kevil et al. beschrieben eine Isolationsmethode, bei der sie die murine Aorta ebenfalls nach Längsinzision *in toto* einer Enzymdigestion unterzogen mit nachfolgender fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (94). Dabei isolierten sie aus 12 Aorten 50000 Endothelzellen. Um eine etwas höhere Endothelzellzahl zu erzielen, *poolten* wir initial die Zellen aus 16 Aorten, die in vier Präparationsdurchgängen erhalten worden waren.

Da die Zellseparationsprozedur eine Einzelzellsuspension erfordert, wurden die konfluenten Zellschichten passagiert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit 3 ml s-EDTA gewaschen und anschließend für 10 min mit 0,5 ml s-EDTA/Trypsin (0,05% Trypsin/0,02% s-EDTA) inkubiert. Nach 10 min wurde die Trypsinaktivität mit 3 ml Medium (MVECGM) mit 20% FCS gestoppt, die Zellen aller Präparationen in einem 50 ml *Falcon-Tube* gesammelt und bei 1000 rpm und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das *Zellpellet* in 1-2 ml MVECGM resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (Neubauer-Zählkammer: Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm²) und ein weiteres Mal zentrifugiert (1000 rpm, 4 °C für 6 min).

Die Zellen wurden in 1 ml MVECGM / 25mM HEPES resuspendiert und der monoklonale *Rat Anti-Mouse CD31* Antikörper (Klon MEC 13.3) der Zellsuspension in der Konzentration 1 µg/1 Mio. Zellen hinzugefügt. Die Inkubation mit dem Antikörper fand bei 4 °C für 25 min auf einem Rotator bei sehr niedriger Geschwindigkeit statt. Während der Antikörperinkubation wurden die *Dynabeads* vorbereitet. Das gewünschte *Beadvolumen* (0,75 mg/ml Zellsuspension = 75µl) wurde in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf-

Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt, 1 ml PBS-Puffer hinzugefügt und auf dem Vortexer durchmischt. Anschließend wurde das Gefäß mit den *Beads* für 3 min in den Magnetblock (DynaL MPC-S, Invitrogen) gesetzt und der Überstand nach 3 min abpipettiert. Die auf diese Weise gewaschenen *Beads* wurden vom Magneten genommen und im selben Volumen PBS-Puffer wie das ursprüngliche Beadvolumen (75 μ l) resuspendiert. Die *Beads* wurden bis zum Einsatz bei 4 °C aufbewahrt. Nach Ablauf der Antikörperinkubation wurde die Zell-Antikörpersuspension mit 500 μ l PBS-Puffer verdünnt und bei 1000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit freien, ungebundenen Antikörpern wurde verworfen und das *Zellpellet* in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die vorbereiteten *Beads* wurden, nach erneuter Durchmischung auf dem Vortexer, den Zellen hinzugefügt. Die Inkubation der Antikörper-markierten Zellen mit den *Beads* erfolgt für 15 min bei 4 °C auf einem Rotator mit Plastikdreh Scheibe bei sehr niedriger Geschwindigkeit. Die Drehgeschwindigkeit musste so eingestellt werden, dass sich die *Beads* nicht auf dem Boden des Reaktionsgefäßes absetzen konnten. Nach der Inkubation wurden 500 μ l PBS-Puffer der Zellsuspension hinzugefügt und das Reaktionsgefäß für 3 min in den Magneten gesetzt. An Endothelzellen gebundene *Beads* und freie *Beads* wurden vom Magneten angezogen. Der Überstand mit den nicht-endothelialen Zellen wurde vorsichtig entnommen und separat aufgefangen („Durchflusszellen“).

Nach dieser primären Zellseparation erfolgten 4 Waschgänge, um möglichst alle nicht-endothelialen Zellen herauszuwaschen und eine annähernd reine Endothelzellfraktion zu erhalten. Dafür wurde das Reaktionsgefäß vom Magneten genommen, das *Zellpellet* in 800 μ l PBS-Puffer auf dem Vortexer resuspendiert und anschließend erneut für 2,5 min in den Magneten gesetzt. Die überschüssigen Nichtendothelzellen wurden jeweils zu den „Durchfluss-Zellen“ hinzugefügt. Nach dem letzten Waschgang erfolgte die Abtrennung der *Dynabeads* von den Endothelzellen. Dafür wurde das *Zellpellet* in 1 ml *Releasing Buffer* (Invitrogen) resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 8-10mal mit Druck auf- und abpipettiert und schließlich für 10 min bei 4 °C auf dem Rotator bei relativ hoher Geschwindigkeit im *Releasing Buffer* inkubiert.

Während der Inkubation im *Releasing Buffer* wurden die „Durchfluss-Zellen“ bei 1000 rpm, 4 °C für 6 min zentrifugiert. Das *Zellpellet* wurde in MVECG-Medium resuspendiert, die Zellen gezählt und schließlich auf einer gelatinebeschichteten Platte in Kultur genommen.

Nach der Trennung von *Beads* und Endothelzellen wurden die Zellen ein weiteres Mal für 3 min in den Magneten gesetzt. Während die *Beads* vom Magneten angezogen wurden verblieben die Endothelzellen in Lösung. Die Endothelzellen wurden vorsichtig abpipettiert, in einem 15 ml Falcon-Gefäß aufgefangen und bei 1000 rpm und 4 °C für 6 min zentrifugiert.

Das Endothelzell*pellet* wurde schließlich in MVECG-Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in einer gelatinebeschichteten Kammer (3,9 cm²) einer 12 *well* Platte ausgesät.

2.2.3 Charakterisierung der murinen Endothelzellen mittels Immunzytochemie

Prinzip der Immunzytochemie

Das Prinzip der Immunzytochemie beruht darauf, dass man Antigene in/auf Zellen mit spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern detektieren und visualisieren kann. Dabei wird im ersten Schritt mit einem primären Antikörper das gesuchte Antigen über eine Antigen-Antikörper-Bindung markiert. Im zweiten Schritt wird der gebundene primäre Antikörper mit einem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, sichtbar gemacht. Alternativ gibt es die Option direkt Fluorochrom-gekoppelte Primärantikörper einzusetzen. Unter einem Fluoreszenzmikroskop kann man schließlich die Fluoreszenz nachweisen und durch die Verteilung der Fluoreszenz auf die Verteilung der spezifischen Antigene schließen.

Mittels immunzytochemischem Nachweis endothelialer Antigene auf den isolierten Zellen konnte der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den isolierten Zellen um Endothelzellen aus der Mausaorta handelte.

Durchführung der Immunzytochemie

Die isolierten Endothelzellen wurden in verschiedenen Stadien der Zellkultur per Immunzytochemie analysiert. Eine bestimmte Endothelzellzahl wurde auf einem gelatinisierten Objektträger mit 8 Kammern (*Chamber Slide*) ausgesät und bis zum Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz kultiviert. Die Positivkontrolle erfolgte mit murinen, mikrovaskulären bEnd.3 Zellen und die Negativkontrolle mit jenen Zellen, die bei der Zellseparation als nicht-endotheliale Durchflusszellen aufgefangen wurden. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde für jede Zellsorte auch eine „Sekundärantikörper-Kontrolle“ durchgeführt. Dafür wurden die murinen Endothelzellen, bEnd.3 Zellen und Durchflusszellen jeweils in einer Kammer kultiviert und ausschließlich mit dem Sekundärantikörper behandelt.

Dementsprechend sah die Belegung der 8kammerigen *Chamber Slides* folgendermaßen aus:

MAEC + Primär-Ak + Sekundär-Ak	MAEC + Sekundär-Ak	bEnd.3-Zellen + Primär-Ak + Sekundär-Ak	bEnd.3-Zellen + Sekundär-Ak	
Durchfluss-Zellen + Primär-Ak + Sekundär-Ak	Durchfluss-Zellen + Sekundär-Ak			

Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Chamber Slide Belegung
Erläuterungen siehe Text

Die immunzytochemische Färbung erfolgte nachdem die Zellen auf den *Chamber Slides* eine ausreichende Konfluenz erreicht hatten.

Als erstes wurde das überschüssige Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit raumtemperiertem PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschgang wurde unverzüglich, ohne Austrocknung der Zellen, in jede Kammer 250 µl Zamboni-Fixativ (4% Paraformaldehyd, 15% Pikrinsäure, 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4) hinzugefügt. Die Fixation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach 10 min wurde das Fixativ abpipettiert und restliches Fixativ mit 500 µl PBS herausgewaschen. Die Zellen wurden zwei weitere Male für jeweils 10 min auf dem Schüttler mit je 500 µl PBS gewaschen, um verbliebenes Fixativ zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl Blockierserum (10% *normal goat serum* in PBS + 0,1% Saponin) pro Kammer für 30 min inkubiert, so dass unspezifische Bindungsstellen für das IgG blockiert wurden. Das Blockierserum musste nach Möglichkeit aus der gleichen Tierspezies stammen, in der auch der Sekundärantikörper produziert wurde.

Nach 30 min wurde das Blockierserum abgenommen und der Primärantikörper direkt hinzugefügt. In jede Kammer wurden 150 µl Antikörperlösung (Antikörper in PBS, 2% NGS, 0,1% Saponin) gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

In die Kammern der Sekundärantikörper-Kontrollen wurden, nach Entfernen des Blockierserums, je 150 µl PBS/2% NGS/0,1% Saponin gegeben. Am Folgetag wurde die Primärantikörperlösung abgenommen und die Zellen wurden einmal kurz mit 500 µl PBS/0,1% Saponin gewaschen. Im Anschluss erfolgten 3 Waschgänge für jeweils 10 min mit PBS/0,1% Saponin auf dem Schüttler. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. 150 µl Antikörperlösung wurden in jede Kammer hinzugefügt und für zwei Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Stunden wurde der Sekundärantikörper abpipettiert und die

Kammern in insgesamt 4 Waschschritten gewaschen. Die ersten beiden Male wurden die Kammern für jeweils 20 min mit PBS/0,1% Saponin gewaschen. Danach wurden die Kammern von den Objektträgern abgetrennt und die Objektträger im Ganzen zweimal 20 min nur in PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 1 Tropfen Eindeckmedium (*SlowFade* Gold, Invitrogen) auf jedes Kammerfeld gegeben und ein Deckglas vorsichtig, ohne Ausbildung von Luftblasen, über alle Kammerfelder hinweg auf den Objektträger gelegt. Mit diesem Schritt wurde die immunzytochemische Färbung beendet, so dass die Auswertung der Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen konnte.

Antikörper für die Immunzytochemie

Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<i>Rat Anti-Mouse</i> CD31 monoklonal	1:50	BD Pharmingen, 553370
<i>Rat Anti-Mouse</i> CD62e monoklonal	1:100	R&D Systems, MAB575
<i>Rat Anti-Mouse</i> CD73 monoklonal	1:100	BD Pharmingen, 550738
<i>Rat Anti-Mouse</i> CD 102 monoklonal	1:20	BD Pharmingen, 550544
<i>Rat Anti-Mouse</i> CD 105	1:20	BD Pharmingen, 550546
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Human</i> vWF	1:300	DakoCytomation, A 0082

Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<i>Rh-Goat-Anti-Rat</i>	1:400	Jackson ImmunoResearch
<i>FITC-Goat-Anti-Rat</i>	1:400	Jackson ImmunoResearch,
<i>FITC-Goat-Anti-Rabbit</i>	1:400	Jackson ImmunoResearch

2.2.4 Charakterisierung der murinen Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescent activated cell sorting*) ermöglicht als optisches Messverfahren die Beurteilung physikalischer Eigenschaften von Zellen / Teilchen anhand der Analyse von Streulicht und Fluoreszenzsignalen. Die zu untersuchenden Zellen werden als Einzelzellsuspension mittels Überdruck in eine Messkammer befördert, in der die von einem Argon- und Diodenlaser ausgehenden Laserstrahlen die passierenden Zellen als monochromatisches Licht im rechten Winkel durchstrahlen. Voraussetzung für die Messung ist das Vorliegen einer Einzelzellsuspension, die mittels hydrodynamischer Fokussierung erreicht wird. Entsprechend der physikalischen Eigenschaften (Größe und Granularität) und Fluoreszenzmarkierung der Zellen wird der Laserstrahl zum einen gestreut (Streulichtsignal) und zum anderen durch die an die Zellen gekoppelten Fluorochrome absorbiert und anschließend als Licht höherer Wellenlänge emittiert (Fluoreszenzsignal). Die so erzeugten Lichtsignale werden von Detektoren erfasst und computergestützt verarbeitet.

Streulichtsignal: Das Streulicht dient in erster Linie der Analyse von physikalischen Eigenschaften der Zellen. Dabei wird unterschieden zwischen dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Beim Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) handelt es sich um Strahlen, die durch die Zellen in einem geringen Winkel (2-20° zum einfallenden Lichtstrahl) gestreut werden und eine Aussage zur Zellgröße ermöglichen. Das zum einfallenden Licht im 90° gestreute Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) gibt Auskunft über die Granularität der Zellen.

Fluoreszenzsignal: Sind die zu analysierenden Zellen mit Fluorochromen (Tab 2.1) markiert, entstehen bei der Messung auch Fluoreszenzsignale. Die Zellen werden zum einen durch Strahlen eines Argonlasers (blaues Licht, $\lambda = 488 \text{ nm}$) und zum anderen durch Strahlen eines Diodenlasers (rotes Licht, $\lambda = 635 \text{ nm}$) angeregt. Werden Fluorochrome eingesetzt deren Absorptionsmaxima in diesem Bereich liegen (488-635 nm) emittieren sie Fluoreszenzlicht, das mittels optischer Systeme (Spiegel und Bandpassfilter) in vier unterschiedliche Spektren aufgeteilt wird und auf photosensitive Detektoren (Photomultiplier) auftrifft. Die optischen Signale werden verstärkt und in digitale Signale weiterverarbeitet. Im FACS Calibur stehen 4 Fluoreszenzkanäle (FL) zur Verfügung. Die Fluoreszenzkanäle FL 1-3 sind sensible für Licht der Fluorochrome, die sich durch den Argonlaser anregen lassen. Im

FL-1 wird 530 nm, im FL-2 585 nm und im FL-3 650 nm langes Fluoreszenzlicht detektiert. Der vierte Fluoreszenzkanal FL-4 ist Detektor für Licht der Wellenlänge 670 nm, das durch die Anregung des Diodenlasers entsteht. Die vier Fluoreszenzkanäle ermöglichen das gleichzeitige Messen von vier Fluoreszenzen bzw. die gleichzeitige Analyse von bis zu vier Zelleigenschaften.

Fluorochrome	Absorptionsmaximum in nm (Anregungslaser)	Emissionsmaximum (in nm)	Fluoreszenzkanal (FL)
FITC	495 (Argonlaser)	519	FL-1
R-PE	565 (Argonlaser)	578	FL-2
PerCP	490 (Argonlaser)	675	FL-3
APC	650 (Diodenlaser)	660	FL-4

Tab. 2.1: Absorptions- und Emissionsmaxima der gängigen Fluorochrome und korrelierende Fluoreszenzkanäle des FACS Calibur

FL: Fluoreszenzkanal, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, R-PE: R-phycoerythrin, PerCP: Peridinin Chlorophyll Protein Complex, APC: Allophycocyanin, nm: nanometer

Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen

Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um die Reinheit der Endothelzellkulturen nach der Zellseparation mit den Dynabeads zu bestimmen. Die Reinheit wurde gemessen als Anteil der Endothelzellen an der Gesamtzellzahl. Die Detektion der Endothelzellen in der Durchflusszytometrie erfolgte über die Markierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen mit Fluorochromen oder mittels Dil-Ac-LDL Färbung.

Für die Messungen wurden die auf Kulturplatten befindlichen Zellen (in einem *well* einer 6-*well* Platte) mit Trypsin und s-EDTA passagiert (0,5 ml s-EDTA und 0,5 ml Trypsin) und in PBS/FCS 20% (2 ml / *well*) aufgefangen. Nach der Zentrifugation (1000 rpm, 6 min, 4 °C) erfolgte die Resuspension des *Zellpellet* in 1 ml PBS/FCS 10%. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen (5 ml) gegeben und gewaschen. Dafür wurden die Zellen mit 2 ml PBS/FCS 10% verdünnt und anschließend zentrifugiert (1000 rpm, 6 min, 4 °C). Der Überstand wurde so dekantiert, dass das *Zellpellet* in einem Restvolumen von ca. 50 μ l verblieb. Zu diesem Restvolumen wurde der Primärantikörper in gewünschter Verdünnung hinzugefügt und es erfolgte die Inkubation für 30 min auf Eis. Nach 30 min wurden die Zellen gewaschen. Dafür wurden 3 ml PBS/FCS 10% der Zell-Antikörpersuspension hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte ein weiterer

Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 6 min, 4 °C). Nach dem Waschgang wurde der Überstand erneut dekantiert und es folgte die Sekundärantikörperinkubation, wenn nicht schon der Primärantikörper Fluorochrom-gekoppelt war. Die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (Erst- oder Zweitantikörper) erfolgte im Dunkeln. Nach einer 30-minütigen Inkubationsdauer mit dem Sekundärantikörper erfolgte ein erneuter Waschgang (s.o.), um überschüssige Antikörper herauszuwaschen. Das gewaschene *Zellpellet* wurde in 500 µl PBS/FCS 10% resuspendiert und konnte für die Messungen am FACS Calibur genutzt werden.

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Primärantikörper & Fluorochrom-gekoppelte Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung (Menge)	Hersteller
<i>R-PE-rat Anti-mouse</i> CD31 monoklonal	1:10 (= 1µg)	BD Pharmingen, 553373
<i>FITC Hamster Anti-Mouse</i> CD54, monoklonal	1:25 (= 1µg)	BD Pharmingen, 553252
<i>PE Rat Anti-Mouse</i> CD73, monoklonal	1:10 (= 1µg)	BD Pharmingen, 550741
<i>FITC Rat Anti-Mouse</i> CD102 monoklonal	1:25 (= 1µg)	BD Pharmingen, 557444
<i>Rat Anti-Mouse</i> CD105, monoklonal	1: 1,56 (= 1µg)	BD, Pharmingen
<i>Purified rat anti-mouse</i> CD106	1:1,56 (= 1µg)	BD, Pharmingen

Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung (Menge)	Hersteller
<i>FITC Goat Anti-Rat IgG</i>	1:50 (= 1,4 µg)	Jackson ImmunoResearch

Messung und Auswertung

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am FACS Calibur (BD). Die Auswertung erfolgte computergestützt mit der Cell Quest-Software.

2.2.5 Dil-Ac-LDL Färbung

Der Nachweis endothelialer Eigenschaften der isolierten murinen Endothelzellen erfolgte in erster Linie mittels Detektion von endothelialen Oberflächenmarkern. Ergänzend dazu nutzten wir die Möglichkeit, Endothelzellen durch die Dil-Ac-LDL Aufnahme nachzuweisen. Endothelzellen nehmen acetyliertes LDL (*low density lipoprotein*) über den „*scavenger cell pathway*“ des LDL-Cholesterin Metabolismus auf. Die Visualisierung des internalisierten acetylierten LDL erfolgt durch den daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Dil (*1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorat*). Nach Aufnahme des Dil-Ac-LDL erfolgt intrazellulär die lysosomale enzymatische Abspaltung des Dil mit nachfolgender Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs in den lysosomalen Membranen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Fluoreszenz der Endothelzellen, die Dil-Ac-LDL aufgenommen haben, nachgewiesen werden. Das Fluoreszenzsignal kann alternativ per Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Die Dil-Ac-LDL Färbung erfolgte durch 4-stündige Inkubation der Endothelzellen mit Dil-Ac-LDL. Dafür wurden 10 µg Dil-Ac-LDL pro ml Kulturmedium zu den Zellen hinzugefügt und für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Markierung wurde das Medium mit Dil-Ac-LDL abpipettiert, die Zellen mehrmals gewaschen, anschließend fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Präparationsmethode zur Isolierung von Endothelzellen aus der murinen Aorta. Die Anforderungen an die Methode waren in erster Linie die einfache Umsetzbarkeit, eine hohe Endothelzellausbeute und Endothelzellreinheit und die Reproduzierbarkeit. Das Hauptmerkmal der Methode ist die gezielte Isolierung der Endothelschicht, um so die Kontamination mit nicht-endothelialen Zellen aus der *Tunica media* und *adventitia* auf ein Minimum zu reduzieren. Dazu wurden die der Länge nach entnommenen und längsaufgeschnittenen Aorten im Ganzen in einem Enzymgemisch inkubiert. Die angedaute und sich dadurch demarkierende Endothelschicht wurde gezielt mit einem Plastischaber abgetragen. In einem Durchgang wurden auf diese Art vier Mausearten präpariert und die daraus isolierten Zellen in einer Kammer (9,6 cm²) einer 6-well Platte kultiviert. Die Primärkultur wurde mit von Invitrogen speziell für dieses Projekt hergestellten *cleavable Dynabeads NSA* magnetisch aufgereinigt, um Endothelzellen von Nicht-Endothelzellen zu trennen und reine Endothelzellkulturen zu erhalten. Für die magnetische Zellseparation wurden die Zellen aus mehreren Präparationen/Aorten *gepoolt*. Nach der Zellseparation und einer variablen Kulturdauer erfolgten die Reinheitsanalysen, die Bestimmung des Endothelzellanteils der Kulturen. Dafür wurden die endothelialen Zelladhäsionsmoleküle PECAM-1/CD31, ICAM-2/CD102, CD73, ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, Endoglin/CD105 und der von-Willebrand Faktor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern behandelt und eine Dil-Ac-LDL-Färbung der Zellen vorgenommen. Der quantitative Nachweis von positiv gefärbten Endothelzellen erfolgte mittels FACS-Analyse und immunzytochemischer Untersuchung.

Nach diesem Protokoll wurden zum Nachweis der Reproduzierbarkeit insgesamt sechs Experimente durchgeführt. Die Endothelzellreinheit wurde in den ersten drei Experimenten mittels FACS-Analyse bestimmt, in den anderen drei mittels Immunzytochemie. Die Isolierung der Endothelzellen aus der murinen Aorta und die magnetische Zellseparation wurden in allen sechs Experimenten standardisiert nach unserem Protokoll durchgeführt. Nur die Anzahl der für die magnetische Zellseparation *gepoolten* Aorten war bei jedem der sechs Versuche variabel. Wie der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist wurde bei dem ersten Experiment die magnetische Zellseparation mit den *gepoolten* Zellen aus insgesamt 16 murinen Aorten durchgeführt. Aufgrund der sehr geringen Ausbeute von 56000 murinen aortalen

Endothelzellen (MAEC), entsprechend einem Anteil von 4,8% an der Gesamtzellzahl vor der Zellseparation, wurden für die nachfolgenden Experimente deutlich mehr Aorten pro Experiment eingesetzt. Die Unterschiede in der Anzahl der Aorten zwischen den weiteren Experimenten (II-VI) sind durch den Verlust von Zellen bedingt durch mikrobielle Kontamination und das teilweise langsame Wachstum der Zellen mit verzögert erreichter Konfluenz und damit verzögertem Einsatz in der magnetischen Aufreinigung zu erklären.

EXPERIMENT	I	II	III	IV	V	VI
Aortenzahl	16	32	24	40	23	32
Gesamtzellzahl	$1,16 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$1,84 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$1,59 \times 10^6$
MAEC-Ausbeute	56.000 (4,8%)	120.000 (5%)	90.000 (3,3%)	60.000 (3,3%)	62.500 (1,8%)	100.000 (6,3%)

Tab. 3.1: Gesamtzellzahl und Endothelzellausbeute der sechs Experimente

Erläuterungen siehe Text

Aufgrund der geringen Endothelzellzahlen war der Einsatz der Zellen in den Reinheitsanalysen begrenzt. Mit Anfangszellzahlen wie z.B. 56000 Endothelzellen beim 1. Experiment war es nicht möglich mittels FACS-Analyse einen oder zwei Endothelzellmarker zu untersuchen. Für eine Reinheitsanalyse hätte ca. die Hälfte der Zellen unwiederbringlich in FACS-Untersuchungen eingesetzt werden müssen und die verbleibende Zellzahl wäre zu gering, um die Kultur und die Experimente fortzuführen. Daher wurden die ersten Reinheitsbestimmungen bei der 2. Passage durchgeführt, wobei nur ein Endothelmarker bestimmt werden konnte. Bei den nachfolgenden Passagen konnten mit zunehmender Zellzahl auch mehrere endotheliale Marker untersucht werden.

Bei einigen Experimenten wurden nach der magnetischen Zellaufreinigung aufgrund unerwarteter Resultate geringe Modifikationen am Versuchsablauf vorgenommen, um einerseits die Methode zu optimieren und andererseits weitere Erkenntnisse über das Verhalten und die Eigenschaften der isolierten MAEC zu gewinnen.

Die in den Einzelexperimenten gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.1 Experiment I

In dem ersten Experiment wurden insgesamt 1,16 Mio. Zellen aus 16 Aorten gewonnen. Durch die CD31-vermittelte magnetische Zellseparation konnten daraus 56.000 MAEC isoliert werden, entsprechend einem Endothelzellanteil von 4,8 %.

Die Zellen wurden nach der Aufreinigung über 36 Tage kultiviert und dabei insgesamt viermal passagiert. Der Anteil an Endothelzellen (Reinheit der Kultur) wurde durch FACS-Untersuchungen bestimmt. Die erste Reinheitsbestimmung war aufgrund der niedrigen Zellzahl erst bei der 2. Passage möglich. Eine graphische Übersicht über die Entwicklung der Gesamtzellzahl und des Anteils an Endothelzellen mit positivem Nachweis von endothelialen Markern liefert die Abbildung 3.1.

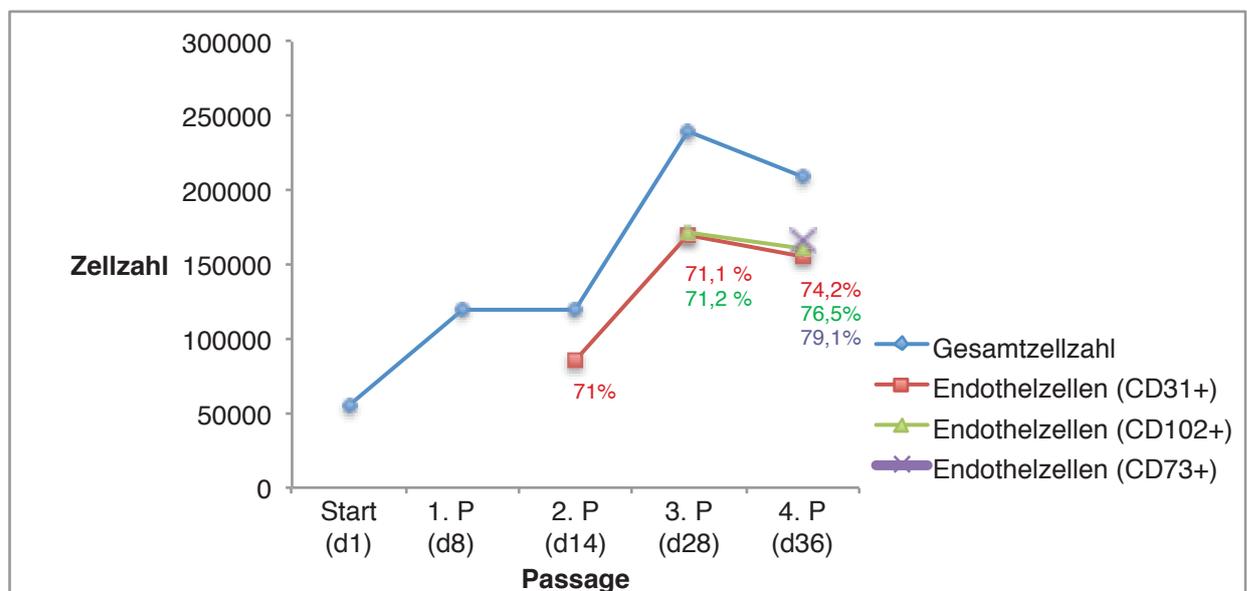


Abb. 3.1: Gesamtzellzahl und Endothelzellanteil gemessen an CD31-, CD102- und CD73-positiven Zellen, über 4 Passagen (Experiment I)

Erläuterungen siehe Text.

Blaue Kurve: Entwicklung der Gesamtzellzahl von Tag 1 bis Tag 36; rote Kurve: Anteil CD31-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl von der 2. bis zur 4. Passage; grüne Kurve: Anteil CD102-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in der 3. und 4. Passage; lila Punkt: Anteil CD73-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in der 4. Passage; P: Passage, d: Tag

Ein erstes Ergebnis bei diesem Experiment war ein sehr langsames Zellwachstum. Nach insgesamt 36-tägiger Kulturdauer war ein Anstieg der Zellzahl von anfänglichen 56.000 auf 210.000 zu verzeichnen. Dabei ist zu beachten, dass ab der 2. Passage bei jeder Passage Zellen für die FACS-Analysen entnommen wurden, die in den Gesamtzellzahlen fehlen. Das ist auch die Erklärung für den Abfall der Gesamtzellzahl von 240.000 bei der 3. Passage auf 210.000 bei der 4. Passage bzw. Endanalyse. Bei der 3. Passage wurden drei

Endothelmarker untersucht und dafür ca. 60.000 Zellen in den FACS-Analysen eingesetzt, so dass die Kultur mit 180.000 Zellen fortgeführt wurde.

Die Reinheitsanalysen zeigten bei diesem Versuch einen relativ hohen Endothelzellanteil, der zwischen **71 %** (Anteil CD31-positiver Zellen bei der 2. Passage, s. Abb. 3.2) und **79,1 %** (Anteil CD73-positiver Zellen bei der 4. Passage, s. Abb. 3.5) variierte. Ab der 2. Passage wurde bei jeder Passage der Anteil CD31-positiver Zellen bestimmt, so dass dieser Parameter als Verlaufsmarker für die Endothelzellreinheit dienen konnte. Über die Kulturdauer zeigte sich demnach ein annähernd gleichbleibender, von der 3. zur 4. Passage sogar leicht steigender Anteil CD31-positiver Zellen (s. Abb. 3.1). Nach 36-tägiger Zellkultur waren im Vergleich zu anfänglichen **71 %** bei der 2. Passage (s. Abb. 3.2) und **71,1 %** bei der 3. Passage (s. Abb. 3.3), **74,2 %** der Zellen (s. Abb. 3.4) bei der 4. Passage positiv für CD31.

Der Anteil CD102-positiver Zellen war nahezu identisch mit dem Anteil CD31-positiver Zellen und nahm ebenfalls von der 3. zur 4. Passage zu. Während bei der 3. Passage **71,2 %** (s. Abb. 3.6) der Zellen CD102-positiv waren, waren es bei der 4. Passage **76,5 %** (s. Abb. 3.7). Bei der 4. Passage wurde auch eine CD73-Markierung vorgenommen. Mit **79,1 %** (s. Abb. 3.5) zeigte sich die CD73-Positivität vergleichbar mit dem Anteil CD31- und CD102-positiver Zellen (**74,2%** und **76,5%**).

In Tabelle 3.2 sind die Gesamtzellzahlen und die Endothelzellanteile über die Kulturdauer von 36 Tagen zusammengefasst.

	Start (Tag1)	1. Passage (Tag8)	2. Passage (Tag14)	3. Passage (Tag28)	4. Passage (Tag36)
Gesamtzellzahl	56.000	120.000	120.000	240.000	210.000
CD31+ Zellen, relativ (<i>abs.</i>)	n.a.	n.a.	71% (85.200)	71,1% (170.640)	74,2% (155.820)
CD102+ Zellen, relativ (<i>abs.</i>)	n.a.	n.a.	n.a.	71,2% (170.880)	76,5% (160.650)
CD73+ Zellen, relativ (<i>abs.</i>)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	79,1% (166.110)

Tab. 3.2: Gesamtzellzahl und Endothelzellanteil, gemessen an CD31-, CD102- und CD73-positiven Zellen, über 4 Passagen (Experiment I)

n.a. = nicht analysiert

Zusammenfassend kann für dieses Experiment festgehalten werden, dass Endothelzellen erfolgreich aus der murinen Aorta isoliert und magnetisch aufgereinigt werden konnten und in relativ hoher Reinheit über vier Passagen kultiviert wurden, dabei jedoch ein langsames Wachstum aufwiesen.

Die Bestimmung der endothelialen Marker erfolgte in diesem Experiment mittels FACS-Analyse. Die entsprechenden FACS-Diagramme werden an dieser Stelle aufgeführt und am Beispiel des ersten Diagramms in Abbildung 3.3 erläutert. Für die Darstellung der Analysen wurden aufgrund der geringen Zellzahlen bei den FACS-Untersuchungen und im Sinne einer besseren Visualisierung der Zellpopulationen „Density Plot“-Diagramme (Verteilungsdichtediagramme), statt „Dot Plot“-Diagramme (Punktwolkendiagramme) benutzt. Während bei den „Dot Plot“-Diagrammen jeder Punkt eine Zelle entsprechend ihrer Messwerte darstellt, werden in „Density Plot“-Diagrammen die Häufigkeitsverteilungen der Zellen farblich kodiert. Den Diagrammachsen wurden Fluoreszenzkanäle zugewiesen. Die Fluoreszenzsignale eines Fluorochroms auf der x-Achse wurden gegen die Fluoreszenzsignale eines zweiten Fluorochroms auf der y-Achse aufgetragen. In diesem Fall wurden die vom Fluorochrom FITC emittierten und im Fluoreszenzkanal-1 gemessenen Signale auf der x-Achse gegen die vom Fluorochrom R-PE emittierten und im Fluoreszenzkanal-2 gemessenen Signale auf der y-Achse aufgetragen. Das bedeutet, dass die mit R-PE-gekoppelten, Anti-CD31-Antikörper markierten Endothelzellen im Fluoreszenzkanal-2 gemessen und auf der y-Achse dargestellt wurden. Auf diese Weise konnten R-PE-markierte Endothelzellen mit der emittierten Rotfluoreszenz, die im Fluoreszenzkanal-2 detektiert wurde, als Zellpopulation bzw. „Wolke“ auf der y-Achse abgegrenzt werden. Für eine quantitative Auswertung dieser Population wurde, wie in Abbildung 3.3 zu erkennen ist, eine polygonale Region um diese Population gelegt. Die Auswertung dieser Region erfolgte mit der CellQuest Software und ergab für die in diesem Fall definierte Region der rotfluoreszierenden CD31-positiven Endothelzellen einen Anteil von 71 % an allen untersuchten Zellen. Auf diese Weise wurden alle FACS-Analysen und Auswertungen gemacht und der Anteil an Endothelzellen bestimmt.

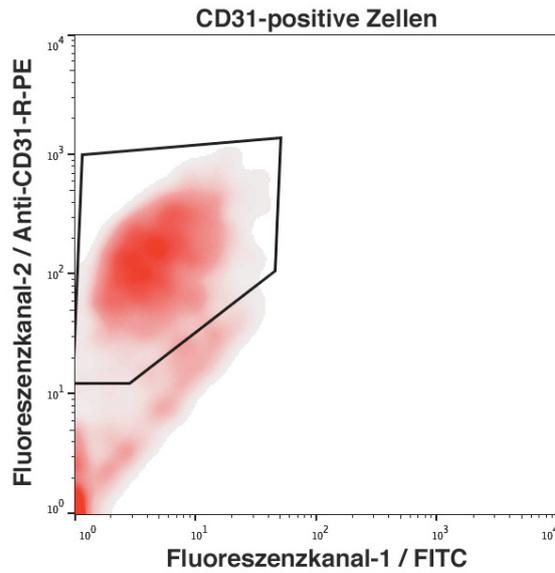


Abb. 3.2: Anteil CD31-positiver Zellen bei der 2. Passage: **71 %**

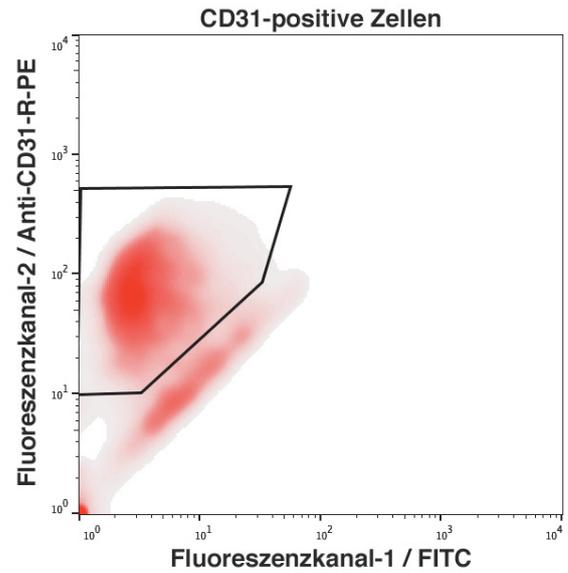


Abb. 3.3: Anteil CD31-positiver Zellen bei der 3. Passage: **71,1%**

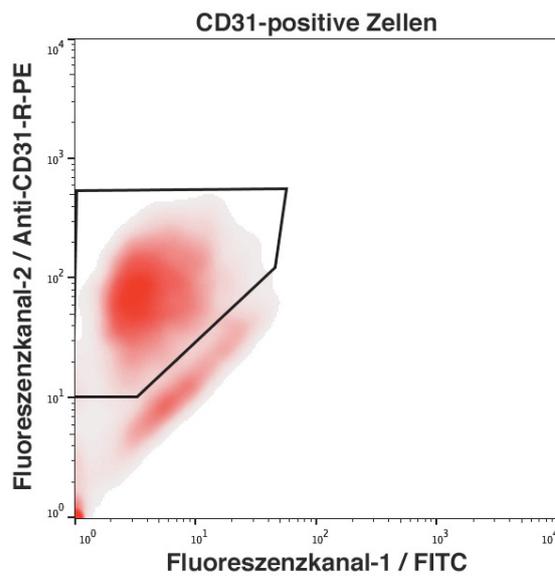


Abb. 3.4: Anteil CD31-positiver Zellen bei der 4. Passage: **74,2 %**

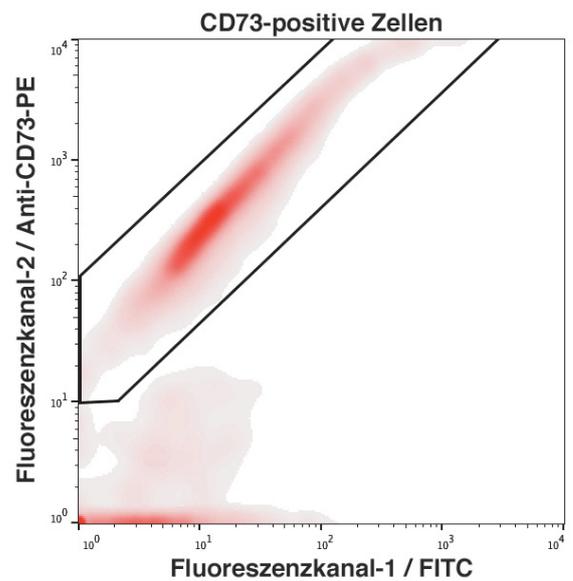


Abb. 3.5: Anteil CD73-positiver Zellen bei der 4. Passage: **79,1 %**

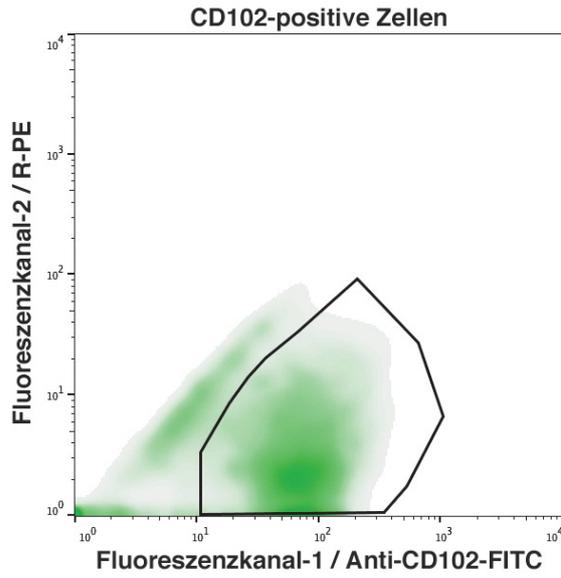


Abb. 3.6: Anteil CD102-positiver Zellen bei der 3. Passage: **71,2%**

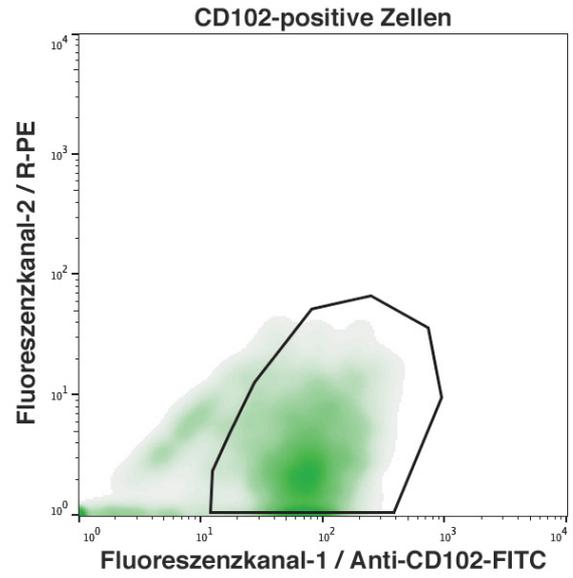


Abb. 3.7: Anteil CD102-positiver Zellen bei der 4. Passage: **76,5 %**

3.2 Experiment II

Nachdem im ersten Experiment aus 16 Aorten nur 56.000 Endothelzellen isoliert werden konnten, wurde für dieses Experiment eine Verdopplung der Aortenanzahl vorgesehen, um eine höhere Zellzahl zu erzielen. In diesem Fall wurden insgesamt 2,4 Mio. Zellen aus 32 Aorten gewonnen. Durch die magnetische Zellseparation konnten 120.000 CD31-positive MAEC isoliert werden, was einem Anteil von 5 % entsprach und somit vergleichbar war mit dem Resultat des ersten Experiments (4,8%). Auch in diesem Fall erfolgte die Reinheitsbestimmung der Kultur ab der 2. Passage durch FACS-Untersuchungen.

Im Unterschied zum ersten Experiment wurde eine rapide Zellproliferation von anfänglichen 120.000 Zellen auf 1.050.000 Zellen binnen 22 Tagen beobachtet. Der Endothelzellanteil dieser schnell proliferierenden Kultur nahm jedoch konstant ab. Anfangs, bei der zweiten Passage, betrug der Anteil CD31-positiver Endothelzellen noch **69,2 %**, fiel jedoch bei der 3. Passage auf **50,8 %** und bei der 4. Passage schließlich auf **16,9 %** ab. Nahezu identisch verhielt es sich mit dem Anteil CD102-positiver Zellen. Dieser lag bei der 3. Passage bei **43,6 %** und bei der letzten Passage nur noch bei **15,6 %**. In Abbildung 3.8 sind der Verlauf der Gesamtzellzahl und der Verlauf des Endothelzellanteils gemessen an der CD31- und CD102-Positivität graphisch dargestellt.

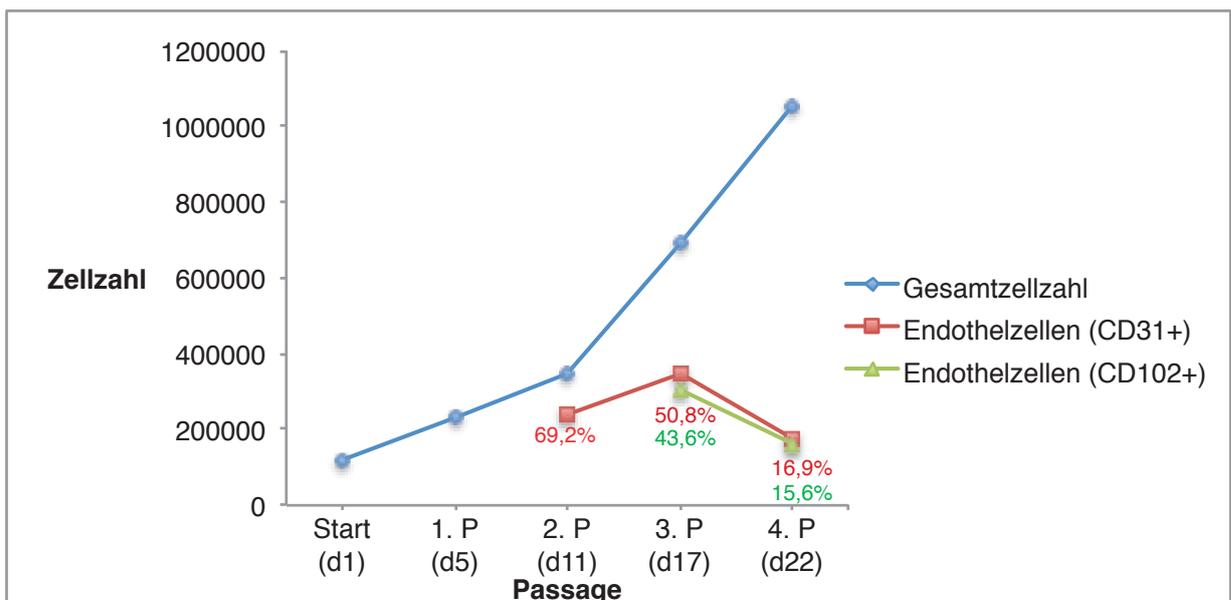


Abb. 3.8: Gesamtzellzahl und Endothelzellanteil, gemessen an CD31- und CD102-positiven Zellen, über 4 Passagen (Experiment II)

blaue Kurve: Entwicklung der Gesamtzellzahl von Tag 1 bis Tag 22; *rote Kurve:* Anteil CD31-positiver

Zellen an der Gesamtzellzahl von der 2. bis zur 4. Passage; *grüne Kurve*: Anteil CD102-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in der 3. und 4. Passage; P: Passage, d: Tag
Erläuterungen siehe Text.

Es gab zwei mögliche Erklärungen für die Abnahme des Endothelzellanteils. Es lag entweder eine zunehmende Kontamination durch nicht-endotheliale Zellen bei gleichzeitig fehlender Proliferation der Endothelzellen vor, oder aber es handelte sich um eine Dedifferenzierung der Endothelzellen mit sich veränderndem endotheliales Phänotyp und Verlust der untersuchten endothelialen Marker. Die Betrachtung der absoluten Zellzahlen deutete auf eine Dedifferenzierung. Während bei der 2. Passage absolut **242.200** CD31-positiv Endothelzellen gezählt wurden, waren es bei der 4. Passage nur noch **177.450**. Gleiches galt auch für die CD102-positiven Zellen, von der 3. zur 4. Passage nahm deren absolute Zahl von **300.840** auf **163.800** ab. Diese Beobachtung war am ehesten dadurch zu erklären, dass ein Teil der Endothelzellen, bedingt durch einen veränderten Phänotyp, die untersuchten Endothelmarker nicht mehr exprimierte. Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, wurde bei der 3. Passage eine Modifikation des Versuchsablaufs vorgenommen. Ergänzend zu der Analyse der konstitutiv exprimierten Endothelzellmarker wurde die Expression der induzierbaren endothelialen Adhäsionsmoleküle untersucht, um weitere Aussagen zum Phänotyp der kultivierten Zellen zu erhalten.

Für diese Untersuchung wurden bei der 3. Passage Zellen entnommen und mit TNF- α stimuliert. Als Entzündungsmediator induziert TNF- α auf Endothelzellen die Expression von ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) und E-Selectin (CD62e), die u.a. die Adhäsion und Migration von Leukozyten vermitteln. Es wurde eine Markierung von CD54 und CD106 vorgenommen und eine FACS-Analyse durchgeführt.

Die bei der 3. Passage entnommenen Zellen wurden nach eintägiger Kultur über 16h mit TNF- α inkubiert (103). Im Anschluss erfolgte eine erneute FACS-Analyse mit Nachweis von CD31, CD54 und CD106.

Nach der TNF- α Stimulation waren **30,1 %** der Zellen CD31-positiv, während **71,8 %** CD54- und **85,2 %** CD106-positiv waren (Abb. 3.9-3.11).

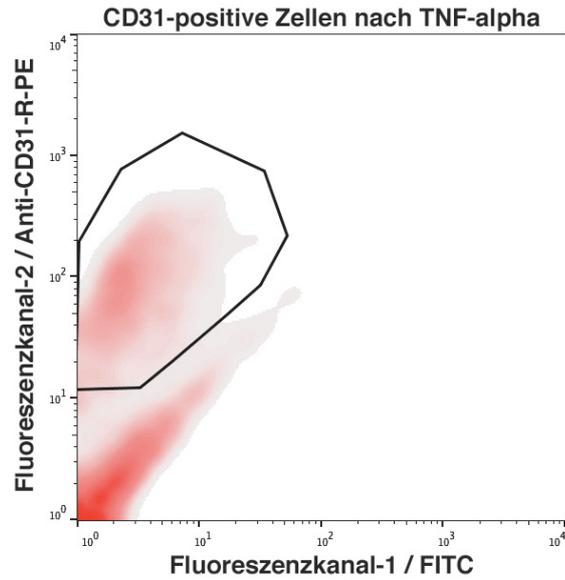


Abb. 3.9: Anteil CD31-positiver Zellen nach 16-stündiger TNF- α Inkubation, 2 Tage nach der 3. Passage: **30,1 %**

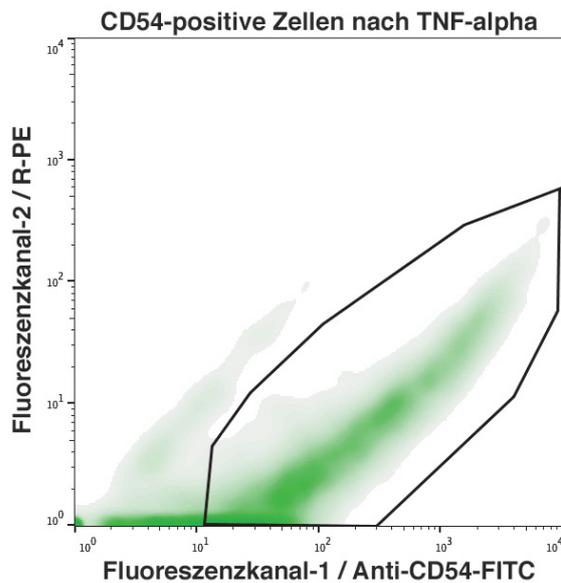


Abb. 3.10: Anteil CD54-positiver Zellen nach 16-stündiger TNF- α Inkubation: **71,8%**

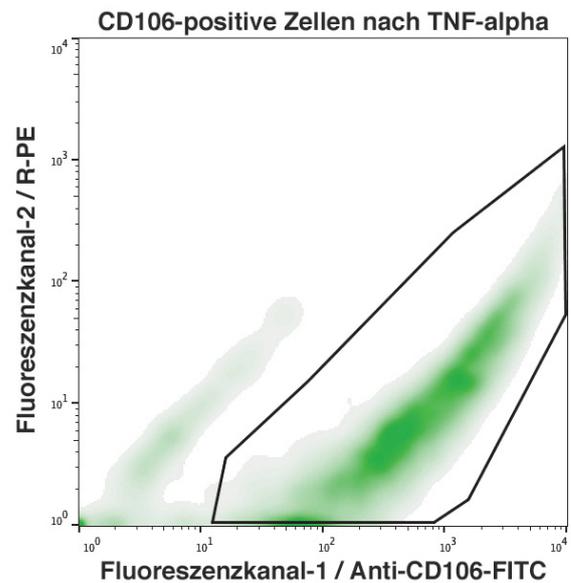


Abb. 3.11: Anteil CD106-positiver Zellen nach 16-stündiger TNF- α Inkubation: **85,2%**

Der hohe Anteil CD54 und vor allem CD106 exprimierender Zellen war beweisend für das Vorliegen von Endothelzellen. Der Anteil CD31 exprimierender Zellen war im Vergleich zur Vorbestimmung bei der 3. Passage von **50,8%** auf **30,1%** weiter abgefallen. Die nicht TNF- α stimulierten und weiter kultivierten Zellen wurden an Tag 22 ein viertes Mal passagiert mit erneuter Bestimmung der CD31- und CD102-Expression. CD31 wurde von nur noch **16,9%**

der Zellen exprimiert und CD102 von **15,6%**.

Diese Resultate stützten den Verdacht, dass der stark abnehmende Anteil CD31- und CD102-positiver Zellen bedingt war durch die Dedifferenzierung der Endothelzellen und nicht durch eine Kontamination mit nicht-endothelialen Zellen. Die Zytokin-Stimulation zeigte, dass entsprechend der CD54- und CD106-Expression ein Großteil der Zellen dieses Experiments Endothelzellen waren. Diese wiesen jedoch nicht mehr alle endothelialen Eigenschaften auf, CD31 und CD102 wurden nur noch von einem geringen Teil der Zellen exprimiert. Diese Beobachtung deutete auf einen sich *in vitro* verändernden Phänotyp der Endothelzellen mit Herabregulierung einiger konstitutiv exprimierter Endothelzellmarker.

Zusammenfassend konnte also auch bei diesem Experiment eine reine Endothelzellkultur nachgewiesen werden, die im Gegensatz zum ersten Experiment eine sehr schnelle Proliferation zeigte. In Tabelle 3.3 sind die Entwicklung der Gesamtzellzahl über die Kulturdauer von 22 Tagen und der Endothelzellanteil von der 2. bis 4. Passage zusammengefasst.

	Start (d 0)	1.Passage (d 5)	2.Passage (d 11)	3.Passage (d 17)	TNFα- Stimula- tion (d 19)	4.Passage (d 22)
Gesamtzellzahl, absolut	120.000	230.000	350.000	690.000	n.a.	1050.000
CD31+ Zellen, relativ (<i>abs.</i>)	n.a.	n.a.	69,2% (242.200)	50,8% (350.520)	30,1%	16,9% (177.450)
CD102+ Zellen, relativ (<i>abs.</i>)	n.a.	n.a.	n.a.	43,6% (300.840)	n.a.	15,6% (163.800)
CD54+ Zellen, relativ	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	71,8%	n.a.
CD106+ Zellen, relativ	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	85,2%	n.a.

Tab. 3.3: Gesamtzellzahl und Endothelzellanteil gemessen an der CD31-, CD102-, CD54 - und CD106-Expression, über 4 Passagen (Experiment II)

n.a. = nicht analysiert, abs.: absolut, d: Tag
Erläuterungen siehe Text

3.3 Experiment III

In den ersten beiden Experimenten konnte für die nach unserer Methode isolierten MAEC-Kulturen ein jeweils hoher Anteil an Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Kultur des zweiten Experiments bot jedoch Anzeichen für eine Dedifferenzierung mit zunehmender Herabregulierung der Expression von CD31 und CD102. Außerdem wurde ein divergierendes Wachstumsverhalten der Zellen beider Experimente beobachtet. Während die erste Kultur langsam proliferierte, stieg die Zellzahl der zweiten, dedifferenzierenden Kultur rapide. Daher wurde ein weiteres Experiment nach identischer Isolationsmethode durchgeführt, um zu evaluieren, welches der oben beschriebenen Verhalten zu reproduzieren war.

Aufgrund mikrobieller Kontamination und langsamen Wachstums einiger Primärkulturen erfolgte die magnetische Zellseparation mit 2,7 Mio. Zellen aus 24 Aorten und 90.000 Endothelzellen konnten isoliert und in Kultur genommen werden. Bei der 2. Passage an Tag 14 wurde eine hohe Gesamtzellzahl von 450.000 ermittelt. Die Endothelzellreinheit fiel jedoch sehr gering aus. Der Anteil CD31-positiver Zellen lag bei **18,6 %** und **17,9 %** der Zellen waren CD102-positiv (s. Abb. 3.12 und 3.13). Dies entsprach einer absoluten Zellzahl von ca. 83.700 für CD31-positive MAEC.

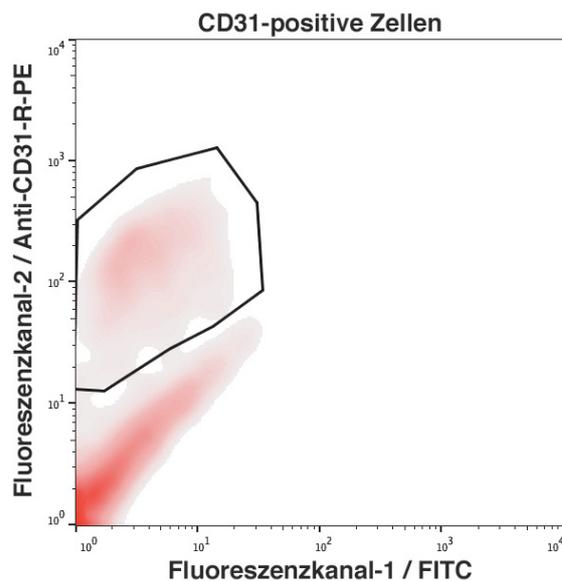


Abb. 3.12: Anteil CD31-positiver Zellen bei der 2. Passage: **18,6%**

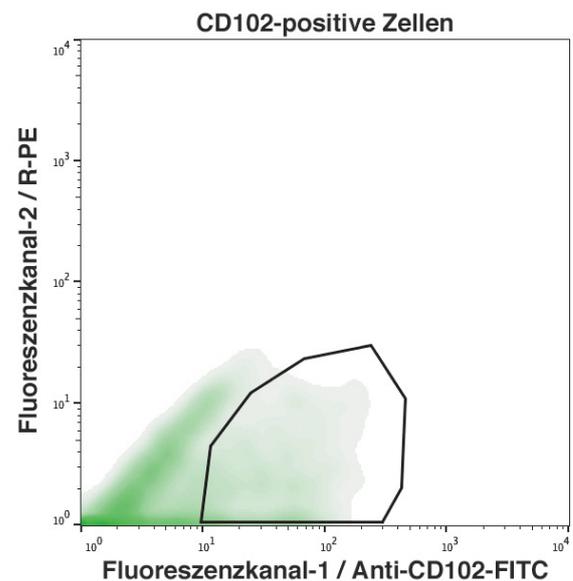


Abb. 3.13: Anteil CD102-positiv Zellen bei der 2. Passage: **17,9%**

Diese Resultate waren vergleichbar mit denen des zweiten Experiments. Auch in diesem Fall lag entsprechend der CD31- und CD102-positiven MAEC ein geringer Endothelzellanteil vor mit ebenfalls schneller Zellproliferation wie in Experiment II. Daher musste auch bei diesem Experiment ein Verlust des endothelialen Phänotyps angenommen werden, zumal auch die absolute MAEC-Zahl von 90.000 auf ca. 83.700 abfiel, während die Gesamtzellzahl auf 450.000 angestiegen war. Da dieses Phänomen sehr früh, bereits bei der 2. Passage, beobachtet wurde und der Endothelzellanteil mit **18,6 %** und **17,9 %** sehr gering ausfiel, wurde an dieser Stelle eine Modifikation des weiteren Prozederes vorgenommen.

Es erfolgte eine erneute magnetische Zellseparation mit Anti-CD31-*Dynabeads*, um den geringen Anteil an nicht dedifferenzierten Endothelzellen für weitere Analyse Zwecke zu extrahieren. Diese wurde an Tag 17 nach üblichem Protokoll durchgeführt. Aus 790.000 Zellen konnten jedoch nur 20.000 Endothelzellen isoliert werden, entsprechend einem Anteil von nur 2,5%, obwohl bei der 2. Passage drei Tage zuvor ein CD31-positiver Endothelzellanteil von 18,6% festgestellt wurde. Bei dieser Differenz war eine rasch progrediente Dedifferenzierung mit weiter abfallender CD31-Positivität anzunehmen. Es musste jedoch auch in Erwägung gezogen werden, dass ein Großteil der MAEC bei der Zellaufreinigung mit den *Dynabeads* nicht detektiert wurde oder im Rahmen der Aufreinigung abgestorben war. Diese alternative Überlegung würde die Effizienz der magnetischen Zellseparation in Frage stellen.

Die isolierten 20.000 MAEC wurden weiter kultiviert. Eine letzte Reinheitsbestimmung nach 12-tägiger Kulturdauer ergab bei 100.000 Zellen eine CD31-Positivität von **53,9 %** (abs. 53.900) und eine CD102-Positivität von **56,9 %** (abs. 56.900). Demnach proliferierten die MAEC weiter, waren jedoch z.T. auch von einer Dedifferenzierung betroffen, da ein Teil der Zellen die untersuchten Endothelzellmarker nicht mehr exprimierte. Dies zeigte, dass MAEC, die zu Beginn der Kultur ihren Phänotyp beibehielten, im weiteren Verlauf der Kultur durchaus ihr Expressionsverhalten ändern konnten.

In Abbildung 3.14 und Tabelle 3.4 wurde der Ablauf des beschriebenen Experiments graphisch und tabellarisch zusammengefasst.

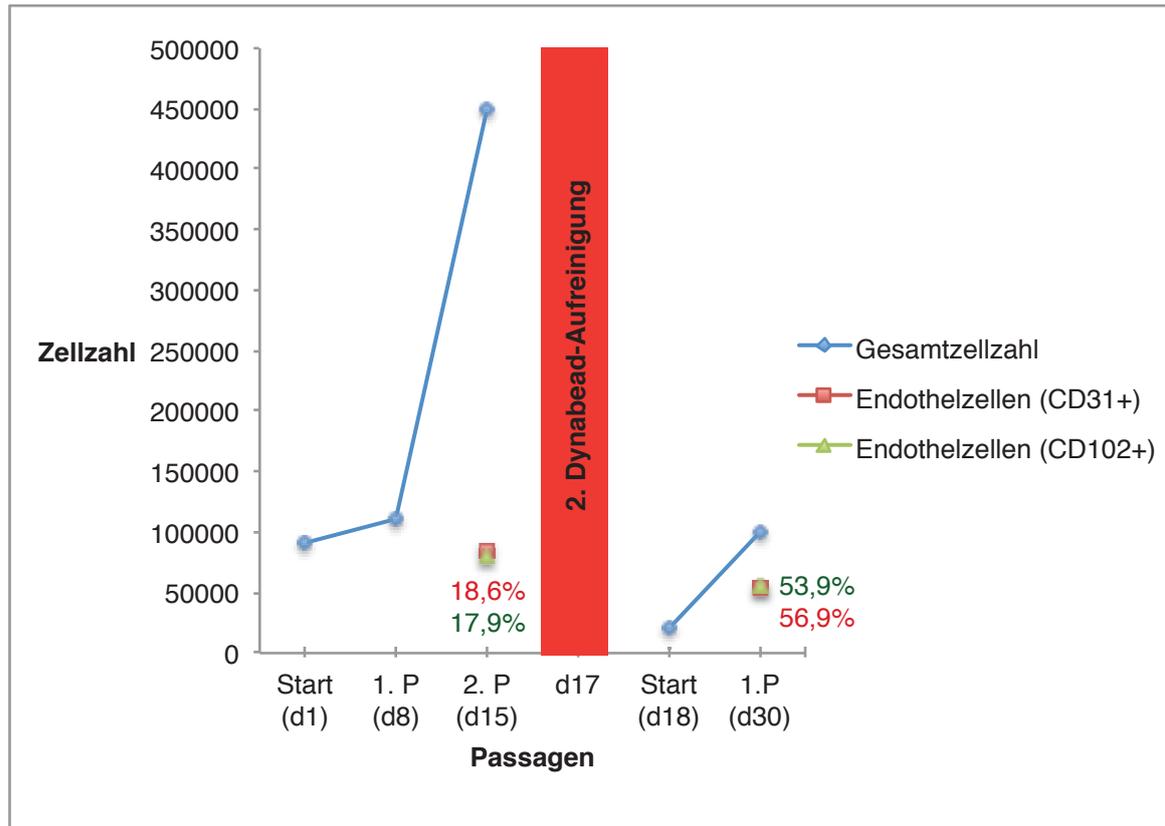


Abb. 3.14: Gesamtzellzahl und Endothelzellanteil gemessen an CD31- und CD102- positiven Zellen, nach 1. und 2. Dynabead-Aufreinigung (Experiment III)

Bei sehr niedrigem Endothelzellanteil bei der 2. Passage nach initialer Aufreinigung erfolgt eine 2. Dynabead-Aufreinigung; *blaue Kurve*: Entwicklung der Gesamtzellzahl von Tag 1 bis Tag 15 und Tag 18 bis Tag 30; *roter Punkt*: Anteil CD31-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl; *grüner Punkt*: Anteil CD102-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl; P: Passage, d: Tag
Erläuterungen siehe Text

	Start (Tag1)	1.Passage (Tag7)	2.Passage (Tag14)	2. Aufreinigung (Tag 17 / 790.000 Z.)	Start (Tag18)	1.Passage (Tag30)
Gesamtzellzahl	90.000	110.000	450.000		20.000	100.000
CD31+ Zellen, relativ (<i>abs.</i>)	n.a.	n.a.	18,6% (83.700)		n.a.	53,9% (53.900)
CD102+ Zellen, relativ (<i>abs.</i>)	n.a.	n.a.	17,9% (80.550)		n.a.	56,9% (56.900)

Tab. 3.4: Gesamtzellzahl und Endothelzellanteil relativ und absolut gemessen an CD31- und CD102- positiven Zellen, nach 1. und 2. Dynabead-Aufreinigung (Experiment III)

n.a.: nicht analysiert, Z.: Zellen, abs.: absolut
Erläuterungen siehe Text

3.4 Experiment IV

Die Auswertung der ersten drei Experimente erfolgte mit FACS-Untersuchungen. Um die Reproduzierbarkeit der bisherigen Beobachtungen mit einer alternativen analytischen Methode zu prüfen, wurden die weiteren Experimente mittels Immunzytochemie ausgewertet. Bei dieser Methode werden Endothelzellmarker mit Antikörpern markiert und über Antikörper-gekoppelte Fluorochrome visualisiert. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wird die Fluoreszenz der Zellen und somit die Expression der analysierten Marker evaluiert. Die Experimente II und III hatten Hinweise auf eine Dedifferenzierung der MAEC während der Kultur ergeben. Daher wurden bei den nachfolgenden drei Experimenten frühe Kulturstadien analysiert, um zu evaluieren, inwiefern die Dedifferenzierung Kulturdauer abhängig ist.

Die Endothelzellisolation und –aufreinigung erfolgten bei dem vierten Experiment nach bekanntem Protokoll. Aus 40 Mausarten wurden 1,84 Mio. Zellen gewonnen und daraus 60.000 Endothelzellen (Anteil: 3,3%) isoliert. Die erste Passage der Zellen erfolgte nach sechs Tagen von einer Kammer einer *12-well* Platte direkt auf einen Objektträger mit acht Kammern („*Chamber Slide*“, 0,7 cm² pro Kammer, s. Abb. 3.15). Dabei wurden insgesamt ca. 178.000 MAEC gezählt. In jeweils zwei Kammern wurden die isolierten Mausendothelzellen, bEnd.3-Zellen als Positivkontrolle und aus der *Dynabead*-Aufreinigung stammende, nicht-endotheliale „Durchflusszellen“ als Negativkontrolle ausgesät. bEnd.3-Zellen (*brain endothelial cells*) sind immortalisierte, murine Gehirnkapillar-Endothelzellen, die die untersuchten endothelialen Marker exprimieren und daher als Positivkontrolle gut geeignet sind. Jeweils eine Probe der genannten Zellentitäten wurde nur mit dem Sekundärantikörper behandelt, um eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers auszuschließen.

„Chamber Slide“

MAEC + Primär-Ak + Sekundär-Ak	MAEC + Sekundär-Ak	bEnd.3-Zellen + Primär-Ak + Sekundär-Ak	bEnd.3-Zellen + Sekundär-Ak	
Durchfluss-Zellen + Primär-Ak + Sekundär-Ak	Durchfluss-Zellen + Sekundär-Ak			

Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der „chamber slide“ Belegung
 MAEC: mouse aortic endothelial cells, bEnd.3-Zellen: brain endothelial cells, Ak: Antikörper
 Erläuterungen siehe Text

Bei diesem Experiment wurde die Expression der endothelialen Zelladhäsionsmoleküle CD31, CD102, CD105 und des vWFs untersucht, und die Dil-Ac-LDL Inkorporation analysiert. Nach 3-tägiger Kultur auf dem „Chamber Slide“ wurden die immunzytochemischen Färbungen vorgenommen und ausgewertet. Die Auswertung ergab einige Unterschiede zwischen der Expression der genannten endothelialen Oberflächenantigene.

Die Abbildung 3.17 zeigt die CD31-Färbung der MAEC. Es ist deutlich zu erkennen, dass nahezu alle Zellen CD31 exprimierten. Die Zellzählung in diesem Ausschnitt der Kultur ergab, dass von insgesamt 407 Zellen nur eine Zelle keine Rotfluoreszenz aufwies. Demnach lag mit einem Endothelzellanteil von **99,7 %** eine reine Endothelzellkultur vor.



Abb. 3.16:
 Hellfeld-Aufnahme der CD31-
 markierten MAEC,
 Vergrößerung 20-fach

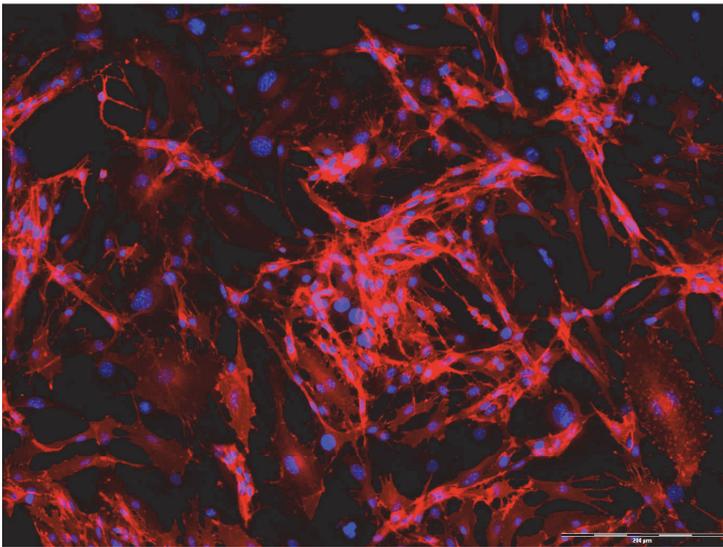


Abb. 3.17:
Fluoreszenzaufnahme der
CD31-markierten MAEC: CD31
(Rhodamin, rot), Zellkerne
(DAPI, blau),
 Vergrößerung 20-fach

406 von 407 Zellen mit CD31-
 Nachweis → 99,7%
 Endothelzellen

Bei der CD102-Markierung waren auf den ersten Blick nur wenige, deutlich rotfluoreszierende Zellen zu erkennen (Abb. 3.19). Ein Großteil der Zellen zeigte jedoch bei genauerer Betrachtung, eine nur sehr schwache Rotfluoreszenz. In Abbildung 3.19 waren von insgesamt 454 Zellen ca. 54 Zellen ohne jeglichen Nachweis einer Rotfärbung bzw. einer CD102-Expression, so dass demnach **87,5 %** der Zellen Endothelzellen waren. Als Positivkontrolle wurden bEnd.3-Zellen ebenfalls CD102-gefärbt (Abb. 3.20). Dabei kamen, vergleichbar mit den MAEC, sowohl Zellen mit sehr intensiver Rotfluoreszenz als auch Zellen mit nur schwacher Fluoreszenzintensität zur Darstellung. Quantitative Aussagen können aus Immunfluoreszenzfärbungen jedoch nicht abgeleitet werden, so dass bei den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten nicht von verschiedenen Expressionsgraden gesprochen werden kann.

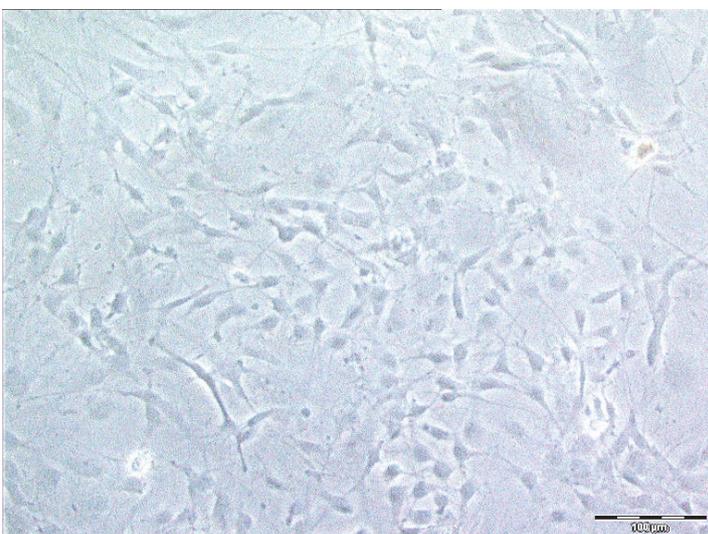


Abb. 3.18:
Hellfeld-Aufnahme der CD102-
markierten MAEC,
 Vergrößerung 20-fach

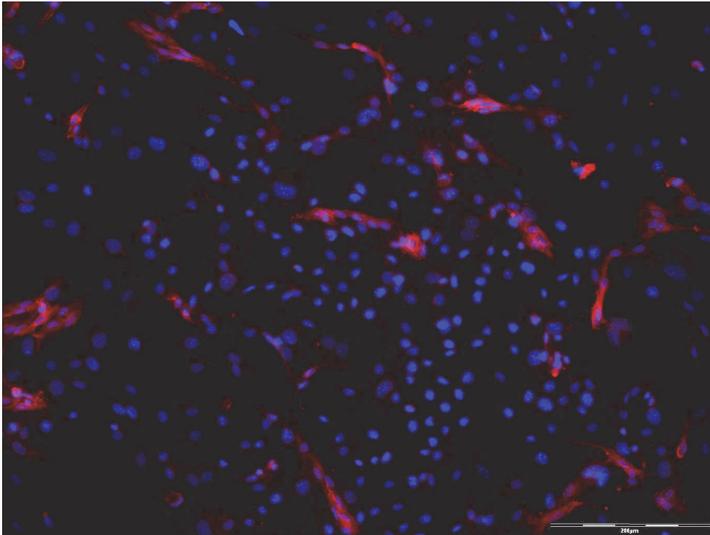


Abb. 3.19:
Fluoreszenzaufnahme der
CD102-markierten MAEC; CD102
(Rhodamin, rot), Zellkerne (DAPI,
blau),
Vergrößerung 20-fach

400 von 454 Zellen mit CD102-
Nachweis → 87,5% Endothelzellen

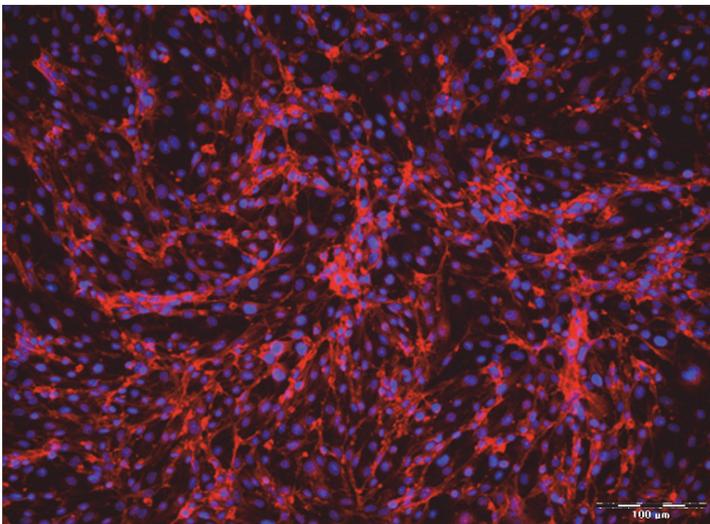


Abb. 3.20:
Fluoreszenzaufnahme der
CD102-markierten bEnd.3-Zellen
(Positivkontrolle);
CD102 (Rhodamin/rot), Zellkerne
(DAPI/blau),
Vergrößerung 20-fach

Eine weitere Analyse erfolgte mit der Doppelfärbung von CD105 und des von-Willebrand-Faktors (vWF). In Abbildung 3.22 ist die Färbung beider endothelialer Marker sowie der Zellkerne dargestellt. Die Rotfluoreszenz entspricht der CD105-Expression, während die Grünfluoreszenz der vWF-Expression zuzuordnen ist. Es zeigte sich eine deutlich erkennbare, eher schwache Rotfluoreszenz nahezu aller Zellen. In Abbildung 3.22 war auf allen 498 Zellen eine Rotfluoreszenz nachzuweisen, so dass von einer absolut reinen Endothelzellkultur auszugehen war. Die Fluoreszenz der CD105-markierten bEnd.3-Zellen (Positivkontrolle) fiel vergleichbar aus, auf allen Zellen konnte eine schwache, aber dennoch deutlich erkennbare Fluoreszenz gezeigt werden (s. Abb. 3.23).

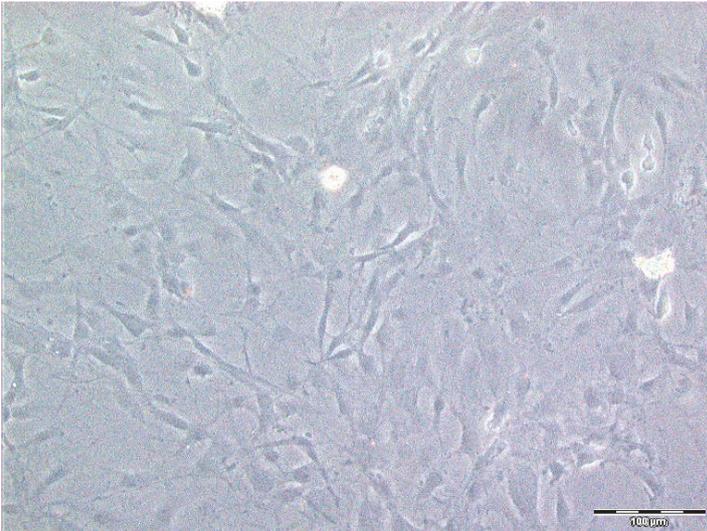


Abb. 3.21:
Hellfeld-Aufnahme der CD105-
und vWF-markierten MAEC,
Vergrößerung 20-fach

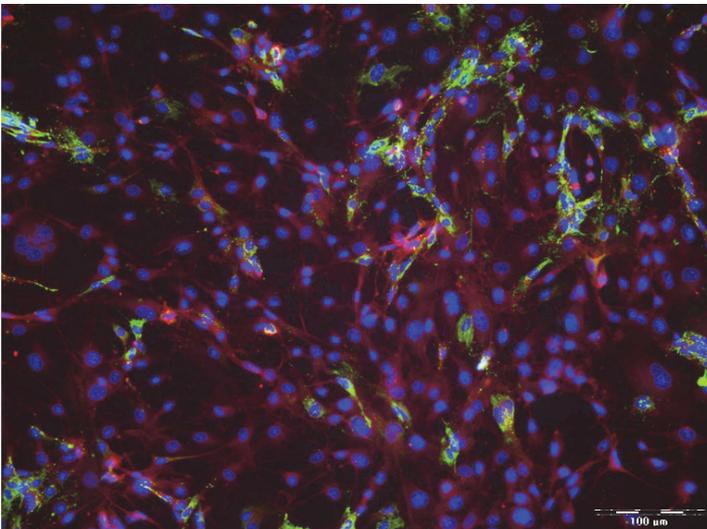


Abb. 3.22:
Fluoreszenzaufnahme der
CD105- und vWF-markierten
MAEC: CD105 (Rhodamin, rot),
vWF (FITC/grün), Zellkerne
(DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

498 von 498 Zellen mit C105-
Nachweis → 100% Endothelzellen

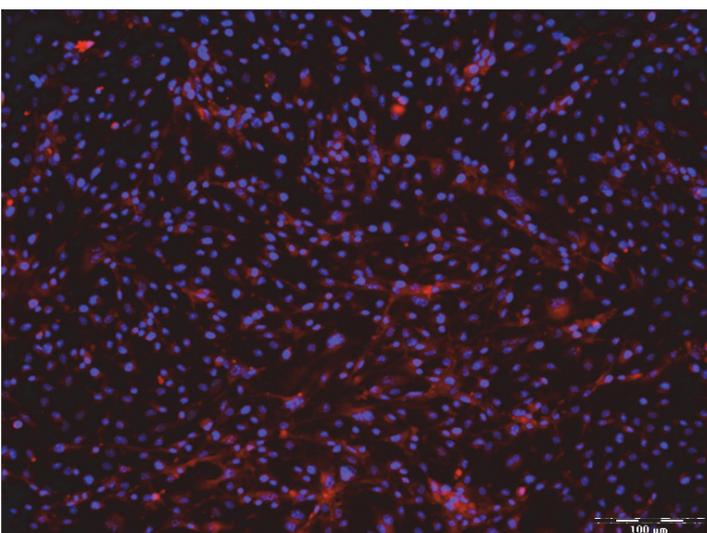


Abb. 3.23:
Fluoreszenzaufnahme der
CD105- und vWF-markierten
bEnd.3-Zellen (Positivkontrolle);
CD105 (Rhodamin/rot), Zellkerne
(DAPI/blau),
Vergrößerung 20-fach

Die Färbung des von Willebrand Faktors (vWF) zeigte Zellen mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität (s. Abb. 3.24). Während einige Zellen eine starke Fluoreszenz

aufwiesen, war bei den restlichen Zellen bei genauer Betrachtung eine nur geringe Fluoreszenz zu erkennen. In Abbildung 3.24 waren von insgesamt 498 Zellen 27 Zellen eindeutig ohne Nachweis einer Fluoreszenzaktivität, so dass demzufolge ein Endothelzellanteil von **94,6%** vorlag. Auch die vWF-markierten bEnd.3-Zellen (Positivkontrolle) zeigten deutliche Fluoreszenzunterschiede, darunter ebenfalls auch Zellen ohne jegliche Fluoreszenz (Abb. 3.25). Diese Variabilität der vWF-Expression ist bekannt und in der Literatur beschrieben (90, 91). Abhängig von Gefäßebene und -typ und sogar innerhalb eines Gefäßes können unterschiedliche Expressionsgrade für den vWF vorliegen. Dieses Expressionsmuster ist bei der Beurteilung der vWF-Färbung und beim Vergleich mit anderen Endothelzellmarkern zu berücksichtigen.

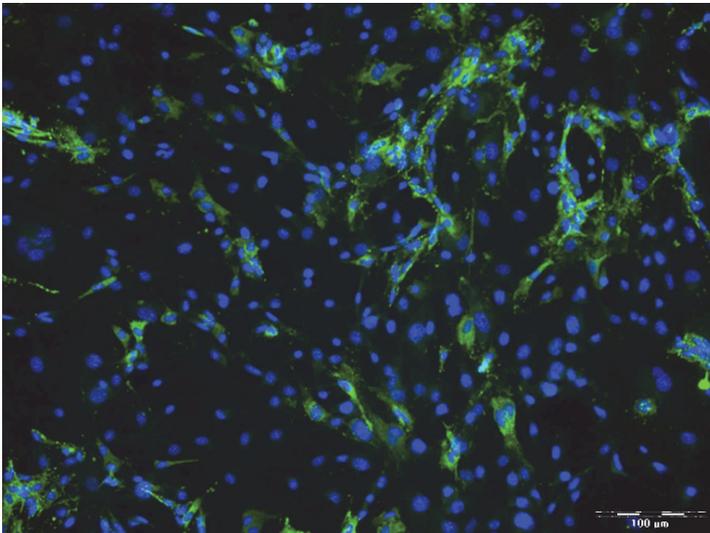


Abb. 3.24:
Fluoreszenzaufnahme der
CD105- und vWF-markierten
MAEC; vWF (FITC/grün),
Zellkerne (DAPI/blau),
Vergrößerung 20-fach

471 von 498 Zellen mit vWF-
Nachweis → 94,6% Endothelzellen

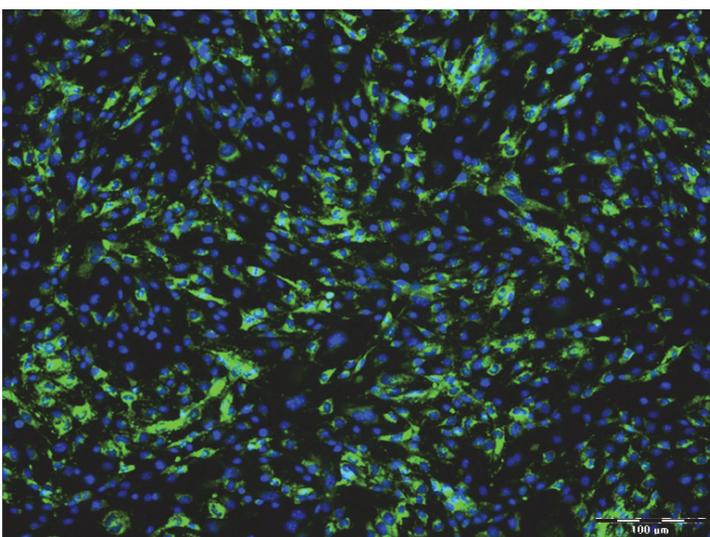


Abb. 3.25:
Fluoreszenzaufnahme der
CD105- und vWF-markierten
bEnd.3-Zellen (Positivkontrolle);
vWF (FITC/grün), Zellkerne
(DAPI/blau),
Vergrößerung 20-fach

Zuletzt wurde die Dil-Ac-LDL Inkorporation dieser Kultur untersucht. Charakteristisch für Endothelzellen ist die Aufnahme von acetyliertem LDL über den „scavenger cell pathway“.

Die Visualisierung dieses Stoffwechselprozesses gelingt durch den Fluoreszenzfarbstoff Dil (*1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorat*), der an acetyliertes LDL gekoppelt ist. Nach einer 4-stündigen Inkubation mit Dil-Ac-LDL zeigte ein Großteil der MAEC eine deutliche Rotfluoreszenz. Während bei einigen Zellen eine nur geringe Fluoreszenzintensität zu beobachten war, lag bei wenigen Zellen überhaupt keine Fluoreszenz vor. In Abbildung 3.27 hatten von 274 Zellen 26 kein Dil-Ac-LDL aufgenommen und fluoreszierten daher nicht. Somit lag in diesem Fall der Endothelzellanteil bei **90,5%**.

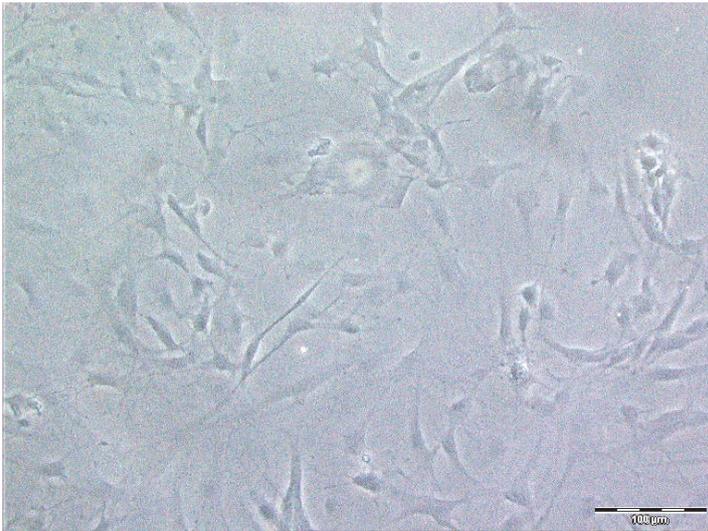


Abb. 3.26:
Hellfeld-Aufnahme der Dil-Ac-LDL-markierten MAEC,
Vergrößerung 20-fach

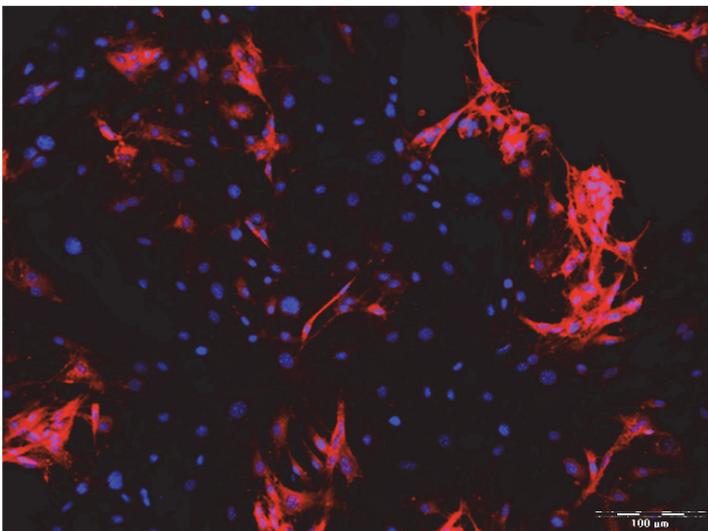


Abb. 3.27:
Fluoreszenzaufnahme der Dil-Ac-LDL-markierten MAEC:
Endothelzellen (Dil-Ac-LDL /rot),
Zellkerne (DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

248 von 274 Zellen mit Dil-Ac-LDL-Aufnahme → 90,5% Endothelzellen

Eine Übersicht über die Expression der verschiedenen Endothelzellmarker in diesem Experiment zeigt die Tabelle 3.5. Zusammenfassend ergab dieses Experiment einen sehr hohen Anteil an Endothelzellen. Bei der CD105-Markierung wurde sogar ein Endothelzellanteil von **100%** nachgewiesen, jede Zelle exprimierte CD105. Die geringste, aber dennoch sehr hohe Expression wurde für den vWF nachgewiesen, **87,5 %** der Zellen

waren vWF-positiv. Zum Proliferationsverhalten der MAEC konnte bei den immunzytochemischen Untersuchungen keine quantitative Aussage gemacht werden, so dass lediglich eine qualitative Beschreibung des Wachstums zulässig war. Entsprechend der demonstrierten Bilder lag in diesem Experiment im Vergleich zu den bEnd.3 Zellen (siehe Abb. 3.28), die in selber Anzahl ausgesät wurden, kein hoher Konfluenzgrad der MAEC vor. Die typische Morphologie makrovaskulärer Endothelzellen mit polygonaler Form und Ausbildung eines Pflastersteinreliefs, wurde aufgrund der fehlenden Konfluenz in keiner Probe beobachtet. Aufgrund dessen wurde eine geringe Proliferationsrate vermutet.

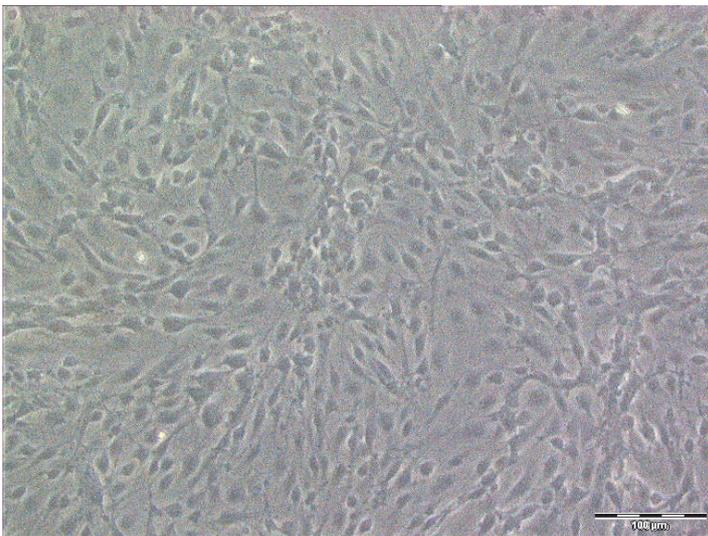


Abb. 3.28:
Konfluenzgrad von bEnd.3 Zellen (mit gleicher Ausgangszellzahl und Kulturdauer),
Vergrößerung 20-fach

Endothelzellmarker	Anteil exprimierender Zellen
CD31	99,7%
CD102	87,5%
CD105	100%
vWF	94,6%
Dil-Ac-LDL	90,5%

Tab. 3.5: Übersicht Endothelzellmarker und Anteil exprimierender MAEC in Experiment IV

3.5 Experiment V

Aufgrund der guten Ergebnisse des vierten Experiments mit hohem Endothelzellanteil in der Kultur wurde zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Methode und der Ergebnisse das fünfte Experiment nahezu identisch gestaltet. Aus 23 Aorten wurden 3,5 Mio. Zellen gewonnen und daraus 62.500 Endothelzellen isoliert (Anteil: 1,8%). Diese wurden über acht Tage, bis zum Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz, in einer Kammer einer *12-well* Platte kultiviert. Die nachfolgende 1. Passage erfolgte direkt auf einen „gekammerten Objektträger“ (*Chamber Slide*). Nach 5tägiger Kultur auf dem „*Chamber Slide*“ erfolgten die immunzytochemischen Analysen. Der Endothelzellnachweis erfolgte auch in diesem Fall über den Nachweis von CD31, CD102, CD105, von-Willebrand-Faktor (vWF) und der Dil-Ac-LDL-Inkorporation. Im vorherigen Experiment war eine variable vWF-Expression beobachtet worden, die Zellen derselben Kultur zeigten bei der Markierung des vWFs große Unterschiede in der Fluoreszenzintensität. Auf einigen Zellen war zum Teil eine nur diskrete Fluoreszenz erkennbar. Eine ähnliche Beobachtung war auch auf den bEnd.3 Zellen gemacht worden. Daher wurde in diesem Experiment jede immunzytochemische Färbung als Doppelfärbung mit dem vWF durchgeführt, um dessen Expression systematisch zu beobachten und mit den anderen Endothelmarkern zu vergleichen.

Die CD31 und vWF- Doppelmarmierung (Abb. 3.29 – 3.32) zeigte einheitlich einen sehr geringen Endothelzellanteil. Von 726 Zellen (gezählte Zellkerne) waren auf 30 Zellen CD31 und auf 18 Zellen der vWF nachzuweisen, wonach ein Endothelzellanteil von 4,1% und 2,5% vorlag.

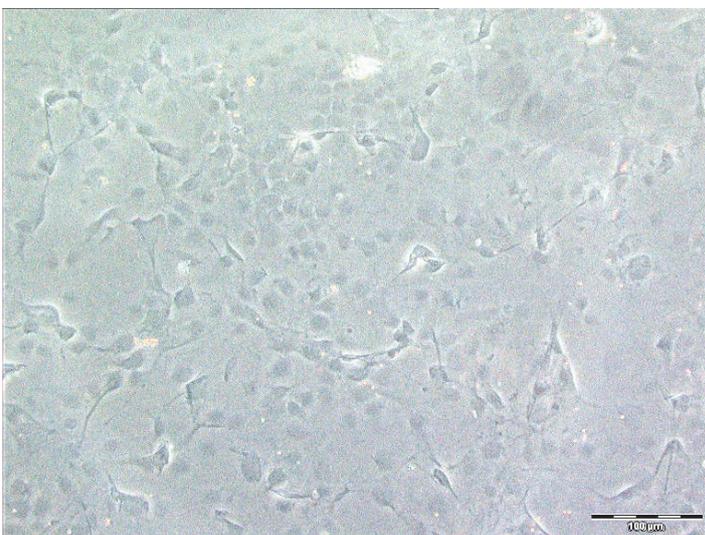


Abb. 3.29:
Hellfeld-Aufnahme der CD31- und
vWF-markierten MAEC,
Vergrößerung 20-fach

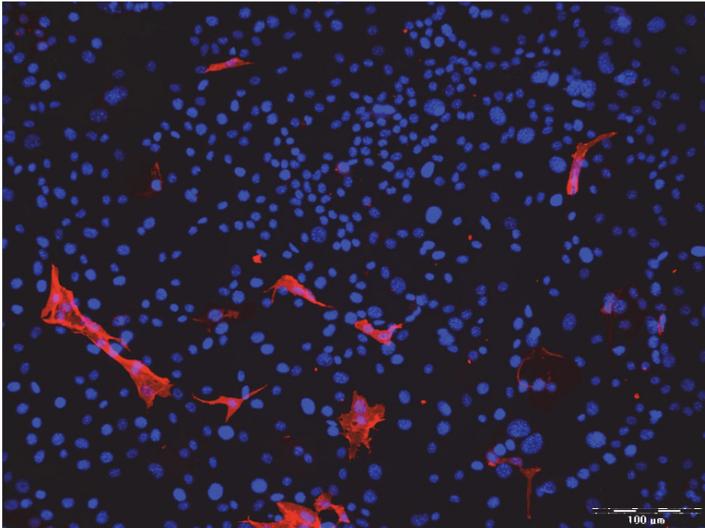


Abb. 3.30:
Fluoreszenzaufnahme der CD31-
und vWF-markierten MAEC: CD31
(Rhodamin/rot), Zellkerne (DAPI,
blau),
Vergrößerung 20-fach

30 von 726 Zellen **mit** CD31-
Nachweis → 4,1% Endothelzellen

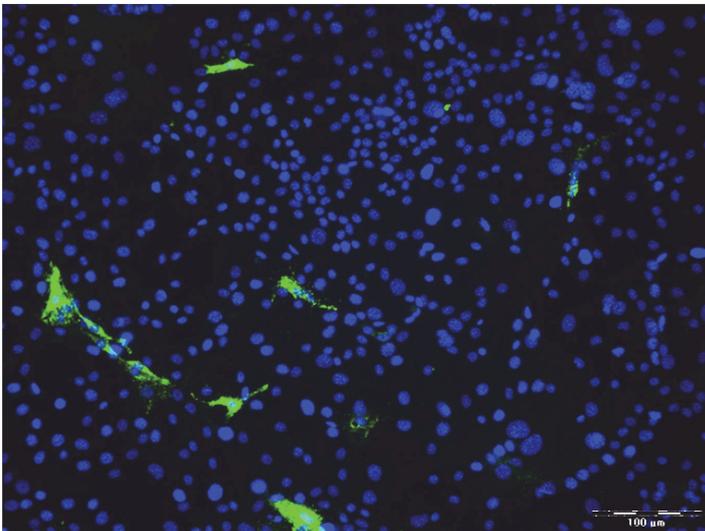


Abb. 3.31:
Fluoreszenzaufnahme der CD31-
und vWF-markierten MAEC: vWF
(FITC, grün), Zellkerne (DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

18 von 726 Zellen **mit** vWF-Nachweis
→ 2,5% Endothelzellen

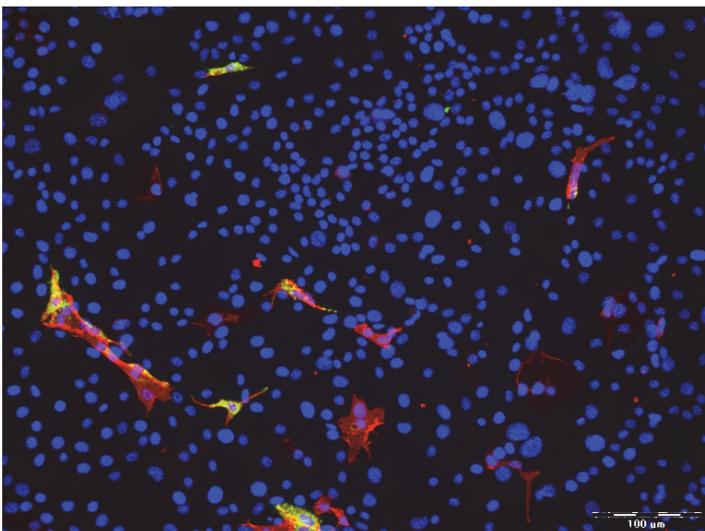


Abb. 3.32:
Fluoreszenzaufnahme der CD31-
und vWF-markierten MAEC: CD31
(Rhodamin/rot), vWF (FITC, grün),
Zellkerne (DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

Die Fluoreszenzmarkierung von CD102 und des vWFs fiel vergleichbar aus. Es waren ebenfalls nur wenige Zellen positiv für beide Marker. Die Rotfluoreszenz der CD102 exprimierenden Zellen fiel wie bereits im Vorexperiment sehr schwach aus. Von insgesamt

465 Zellen (der obere Abschnitt mit dem intensiv rot fluoreszierenden Artefakt wurde nicht berücksichtigt) exprimierten 18 Zellen CD102 (Abb. 3.34) und 30 Zellen den vWF (Abb. 3.35). Somit lag ein Endothelzellanteil von ca. **3,9%** bzw. **6,5%** vor.

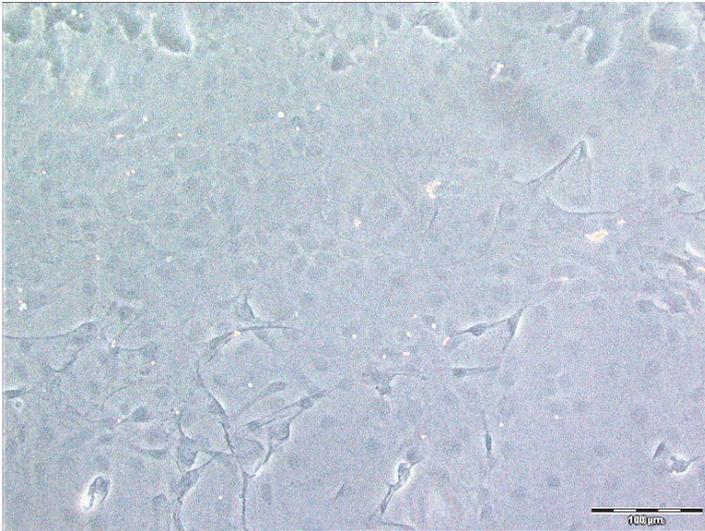


Abb. 3.33:
Hellfeld-Aufnahme der CD102 und
vWF-markierten MAEC,
Vergrößerung 20-fach

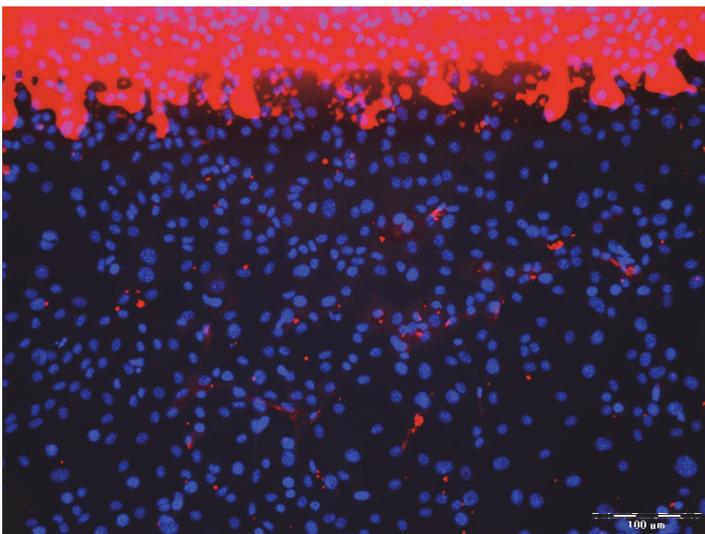


Abb. 3.34:
Fluoreszenzaufnahme der
CD102- und vWF-markierten MAEC:
CD102 (Rhodamin, rot), Zellkerne
(DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

18 von 465 Zellen mit CD102-
Nachweis
→ 3,9% Endothelzellen

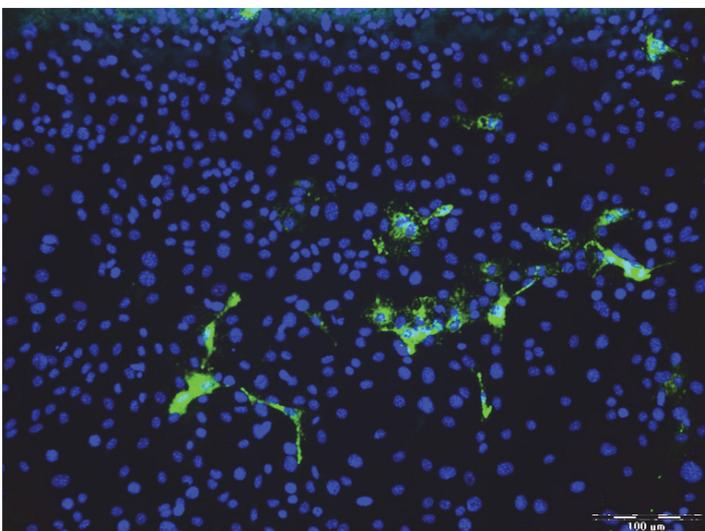


Abb. 3.35:
Fluoreszenzaufnahme der
CD102- und vWF-markierten MAEC:
vWF (FITC, grün), Zellkerne (DAPI,
blau),
Vergrößerung 20-fach

30 von 465 Zellen mit vWF-Nachweis
→ 6,5% Endothelzellen

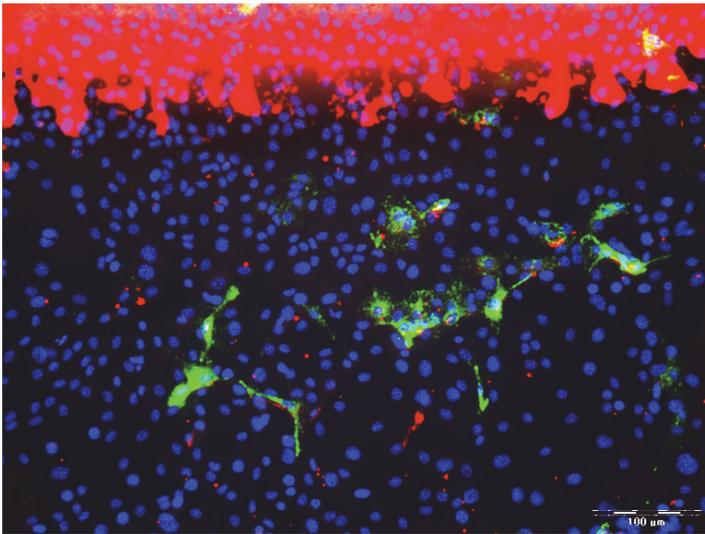


Abb. 3.36:
Fluoreszenzaufnahme der
CD102- und vWF-markierten MAEC:
CD102 (Rhodamin, rot), vWF (FITC,
grün), Zellkerne (DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

In diesem Fall war der vWF auf deutlich mehr Zellen zu detektieren als CD102. Der Anteil CD102-positiver Zellen war vergleichbar mit dem Anteil CD31-positiver Zellen, **3,9%** (CD102) und **4,1%** (CD31). Der vWF-Nachweis hingegen ergab bei der ersten Doppelfärbung mit CD31 **2,5%** vWF-positiver Zellen versus **6,5%** bei der zweiten Doppelfärbung mit CD102.

Aus der Doppelfärbung von CD105/vWF resultierte ebenfalls ein sehr geringer Endothelzellanteil. Auf vereinzelt Zellen war eine Rotfluoreszenz nachzuweisen, die jedoch so schwach war, dass Zellgrenzen kaum zu erkennen waren. Aufgrund dessen war eine verlässliche Ermittlung der Anzahl CD105-positiver Zellen nicht möglich. Auch die starke Rotfluoreszenz der in Kultur verbliebenen *Dynabeads* mit Überstrahlung der Fluoreszenz der CD105 exprimierenden Zellen stellte ein Hindernis für die Zellzählung dar. Auf dem Nativbild der CD105/vWF-markierten Zellen (Abb. 3.37) sind die persistierenden *Dynabeads* deutlich zu erkennen.

Die Grünfluoreszenz der vWF-positiven Zellen war hingegen deutlich zu erkennen. Diese konnte auf 21 von 963 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.39). Somit ergab sich ein Endothelzellanteil von **2,2%**.

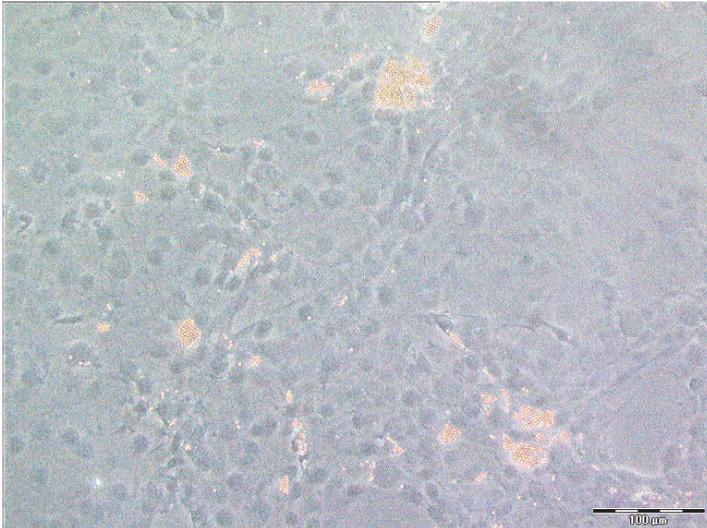


Abb. 3.37:
Helfeld-Aufnahme der CD105-
und vWF-markierten MAEC,
Vergrößerung 20-fach

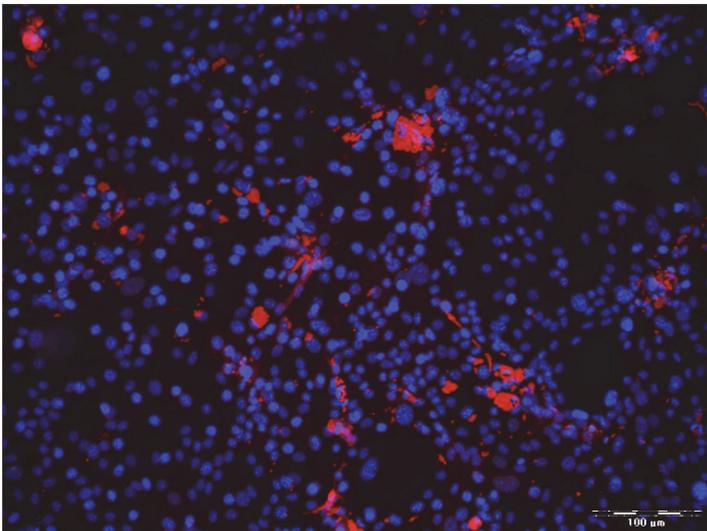


Abb. 3.38:
Fluoreszenzaufnahme der
CD105- und vWF-markierten MAEC:
CD105 (Rhodamin, rot), Zellkerne
(DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

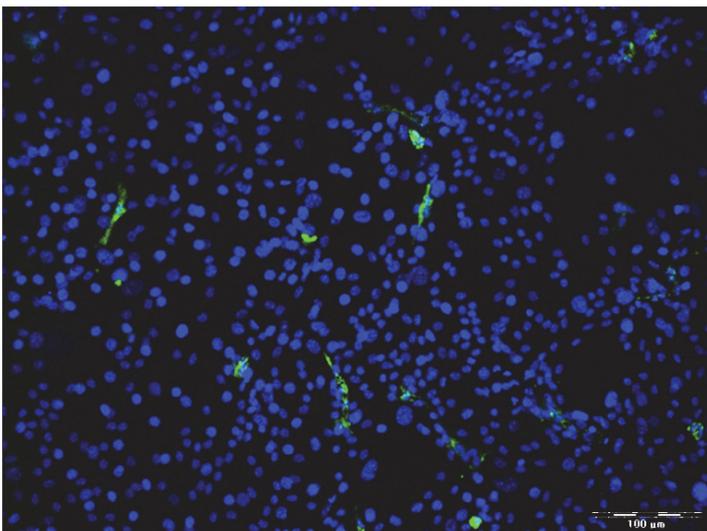


Abb. 3.39:
Fluoreszenzaufnahme der
CD105- und vWF-markierten MAEC:
vWF (FITC, grün), Zellkerne (DAPI,
blau),
Vergrößerung 20-fach

21 von 963 Zellen mit vWF-Nachweis
→ 2,2% Endothelzellen

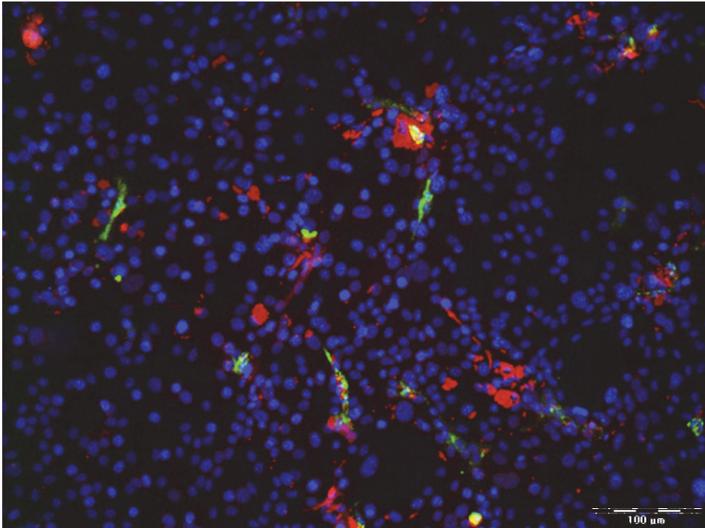


Abb. 3.40:
Fluoreszenzaufnahme der
CD105- und vWF-markierten MAEC:
CD105 (Rhodamin, rot), vWF (FITC,
grün), Zellkerne (DAPI, blau),
 Vergrößerung 20-fach

Bei der Dil-Ac-LDL Färbung zeigte die Mehrzahl der mit Dil-Ac-LDL behandelten Zellen entgegen der bisherigen Ergebnisse eine schwache, aber deutlich erkennbare Rotfluoreszenz als Zeichen der Endothelzell-typischen LDL-Aufnahme. Auf Abbildung 3.42 sind mehrere intensiv rot leuchtende Areale zu erkennen. Diese entsprechen Dil-Ac-LDL Partikeln, die trotz der Waschgänge auf den Zellen verblieben sind. Diese Areale wurden von der Zellzählung ausgeschlossen. Danach verblieben in dem auf Abbildung 3.42 dargestellten Ausschnitt der Kultur insgesamt 589 Zellen, von denen 532 Dil-Ac-LDL aufgenommen hatten und demzufolge rot fluoreszierten. Dies ergab einen Endothelzellanteil gemessen an Dil-Ac-LDL- positiven Zellen von **90,3 %**. Dieses Resultat unterschied sich drastisch von den bisherigen Ergebnissen. Während die anhand der endothelialen Adhäsionsmoleküle und des vWFs ermittelten Endothelzellanteile zwischen **2,2%** und **6,5%** lagen, nahmen über **90%** der MAEC Dil-Ac-LDL auf. Diese Ergebniskonstellation deutete, wie bereits in Experiment II und III beobachtet, auf eine mögliche Dedifferenzierung der Endothelzellen. Der Großteil der in diesem Experiment kultivierten MAEC musste den Phänotyp so verändert haben, dass die Adhäsionsmoleküle CD31, CD102 und CD105 sowie der vWF nicht mehr exprimiert wurden. Der Cholesterin bzw. LDL-Stoffwechsel vermittelt über die *Scavenger*-Rezeptoren der MAEC war von dieser Phänotypwandlung jedoch nicht betroffen, so dass darüber der Nachweis einer weitgehend reinen Endothelzellkultur auch in diesem Experiment gelang. Interessanterweise war der Endothelzellanteil gemessen an der Dil-Ac-LDL-Aufnahme im vierten und fünften Experiment nahezu identisch: **90,5%** und **90,3%**. Würde die Reproduzierbarkeit der Methode nur an diesem Parameter gemessen werden, resultierte daraus eine gute Reproduzierbarkeit.

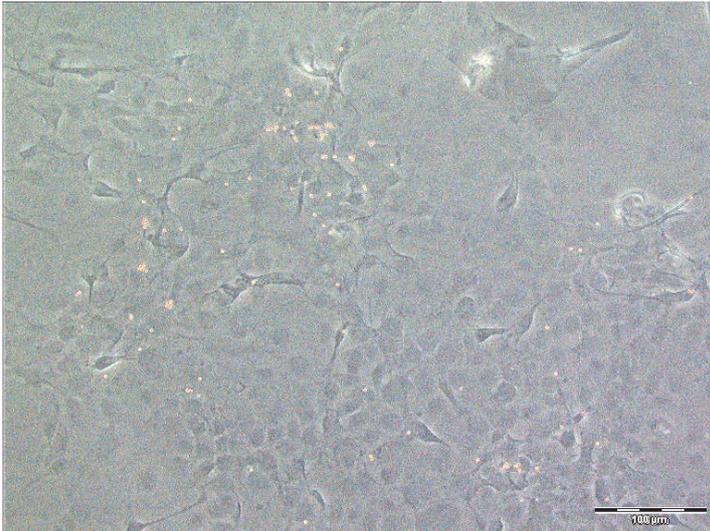


Abb. 3.41:
Hellfeld-Aufnahme der Dil-Ac-LDL
markierten MAEC,
Vergrößerung 20-fach

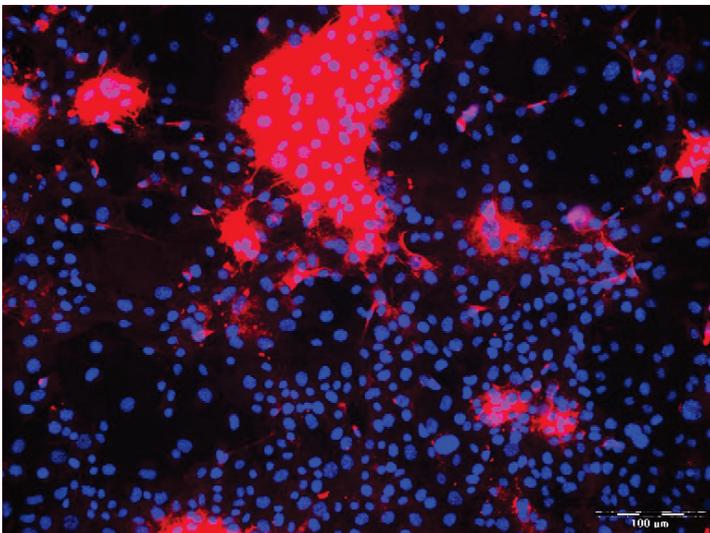


Abb. 3.42:
Fluoreszenz-aufnahme der Dil-Ac-
LDL-markierten MAEC:
Endothelzellen Dil-Ac-LDL (rot),
Zellkerne (DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

532 von 589 Zellen mit Dil-Ac-LDL-
Aufnahme → 90,3% Endothelzellen

Im Vergleich zum vorherigen Experiment wurde in diesem Fall eine wichtige Beobachtung gemacht. Die Nativbilder der MAEC-Kultur des fünften Experiments zeigten, dass sehr viele *Dynabeads* trotz der Waschgänge in der Kultur auf den Zellen verblieben waren. Vor allem in Abbildung 3.37 sowie 3.43 (Abbildung stammt ebenfalls aus Experiment V) sind die magnetischen Kügelchen deutlich zu erkennen. Vor dem Hintergrund der beobachteten Dedifferenzierung der Endothelzellen führte die ausgeprägte *Dynabead*persistenz zu der Frage, ob die in der Literatur beschriebene Toxizität der *Dynabeads* mit Beeinträchtigung von Zellproliferation und –metabolismus (102) auch die besagte Dedifferenzierung bedingt oder mitbedingt hatte.

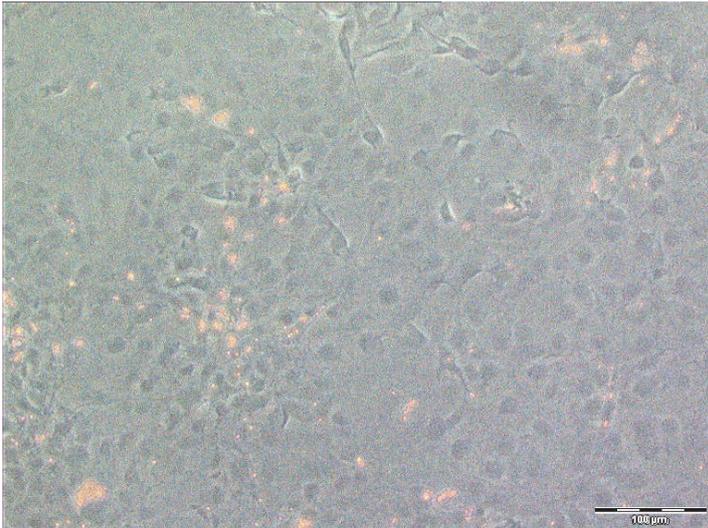


Abb. 3.43:
Hellfeld-Aufnahme von Zellen aus
Exp. V nach der magnetischen
Zellseparation mit verbliebenen
Dynabeads,
 Vergrößerung 20-fach

Obwohl dieses Experiment genauso wie das Vierte konzipiert wurde, konnte zwischen beiden Versuchen ein weiterer bedeutsamer Unterschied beobachtet werden. Der Vergleich sämtlicher Nativbilder beider Experimente zeigte, dass die Zellen des fünften Experiments eine deutlich höhere Zellkonfluenz und einen dichteren Zellrasen ausgebildet hatten. Auf Abb. 3.16 ist die Hellfeld-Aufnahme der CD31-markierten MAEC des vierten Experiments zu sehen und im Vergleich dazu zeigt Abbildung 3.29 das Nativbild der CD31- und vWF-markierten MAEC des fünften Experiments. Der Unterschied ist deutlich zu erkennen. Die Zählung der Zellen in den genannten mikroskopischen Ausschnitten der Zellkulturen ermöglichte auch eine Quantifizierung des beobachteten Unterschieds. In dem Ausschnitt auf Abbildung 3.17 (Experiment IV) wurden insgesamt 407 Zellen gezählt, während es 726 auf Abbildung 3.30 des fünften Experiments waren. Dies deutete auf eine schnellere Proliferation der Zellen im fünften Experiment. Da die Charakterisierung der Endothelzellen des fünften Experiments eine Dedifferenzierung der MAEC vermuten ließ, konnte wie auch schon in Experiment II und III postuliert werden, dass dedifferenzierte MAEC eine schnellere Proliferation aufweisen.

Zusammenfassend wurden die Endothelmarker CD31, CD102, CD105 und der vWF von nur wenigen Zellen der Kultur des fünften Experiments exprimiert, so dass ein geringer Endothelzellanteil vermutet wurde. Die Dil-Ac-LDL Färbung zeigte jedoch, dass 90,3% der Zellen der Kultur Endothelzellen waren. Dies implizierte eine Dedifferenzierung der Zellen des fünften Experiments, die Endothelzellen hatten ihren Phänotyp verändert und exprimierten die genannten konstitutiven Marker nicht mehr. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen waren die in hoher Anzahl in der Kultur verbliebenen *Dynabeads*. Eine Übersicht der Ergebnisse dieses Experiments zeigt Tabelle 3.6.

Endothelzellmarker	Anteil exprimierender Zellen
CD31 / vWF	4,1% / 2,5%
CD102 / vWF	3,9% / 6,5%
CD105 / vWF	n.a. / 2,2%
Dil-Ac-LDL	90,3%

Tab. 3.6: Übersicht Endothelzellmarker und Anteil exprimierender MAEC in Experiment V

n.a.: nicht analysiert

Erläuterungen siehe Text

3.6 Experiment VI

In den ersten fünf Experimenten ergab die entwickelte Isolationsmethode in zwei Fällen (Exp. I und IV) reine Endothelzellkulturen, ein Großteil der Zellen exprimierte die untersuchten Endothelzellmarker. In zwei Experimenten (Exp. II und V) wurde jedoch ein veränderter endothelialer Phänotyp der isolierten MAEC festgestellt. Die untersuchten endothelialen Oberflächenmarker waren auf den Zellen kaum nachweisbar, so dass initial der Verdacht auf eine Kontamination bestand. Nur durch den Nachweis von induzierbaren endothelialen Adhäsionsmolekülen im zweiten Experiment und der Inkorporation von Dil-Ac-LDL im fünften Experiment konnte der Endothelzellnachweis erbracht werden. Demnach lagen auch in diesen beiden Fällen Endothelzellkulturen in hoher Reinheit vor, wobei die Endothelzellen Zeichen der Dedifferenzierung boten.

Dedifferenzierungsprozesse mit Annahme eines nicht-endothelialen Phänotyps während Langzeitkulturen mit multiplen Passagen sind bekannte Phänomene. Ungewöhnlich war jedoch, dass die Dedifferenzierung bereits nach kurzer Kulturdauer, nach drei (Exp. II) bzw. einer (Exp. V) Passage beobachtet wurde. Zusätzlich zu der Frage warum die Dedifferenzierung einsetzt stellte sich jedoch auch die Frage, wann sie einsetzt. Änderten die Endothelzellen ihren Phänotyp bereits während der Prozedur der magnetischen Zellaufreinigung oder im Laufe der Kultivierung? Um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurde ein weiteres, letztes Experiment durchgeführt. Dabei wurden die bei der magnetischen Zellseparation gewonnenen MAEC ohne Zwischenkultivierung direkt auf einem „*Chamber Slide*“ ausgesät und nach einer kurzen Kulturdauer analysiert. Das Ziel war eine Charakterisierung der MAEC unmittelbar nach der Zellseparation mittels *Dynabeads*.

Es wurden aus 32 Mausarten insgesamt 1,59 Mio. Zellen gewonnen und daraus 100.000 (6,3%) MAEC isoliert. Diese wurden direkt auf die „*Chamber Slides*“ ausgesät. Da nur eine geringe Zellzahl für die Untersuchungen zur Verfügung stand, erfolgten auch in diesem Fall Doppelmarkierungen, um den Erkenntnisgewinn zu maximieren. Es wurden die Doppelmarkierungen CD31/vWF und CD73/vWF vorgenommen. Grund für den Einsatz von CD73 war das langfristige Ziel unserer Arbeitsgruppe diese Isolationsmethode an der in unserem Institut generierten CD73-knockout-Maus anzuwenden. Es sollte die Expression bzw. der immunzytochemische Nachweis von CD73 mit den anderen Endothelzellmarkern verglichen werden.

Nach 4-tägiger Kultivierung der MAEC auf dem „*Chamber Slide*“ erfolgte die immunzytochemische Auswertung. Dabei konnte anhand der CD31- und CD73-Färbung ein hoher Endothelzellanteil nachgewiesen werden.

Auf Abbildung 3.45 ist die Färbung von CD31 dargestellt, mit einer deutlichen und intensiven Rotfluoreszenz der meisten Zellen. Die Zellzählung in diesem Ausschnitt der Kultur ergab eine Gesamtzellzahl von 405 Zellen. Davon zeigten 373 Zellen eine Rotfluoreszenz und damit eine CD31-Expression. Demnach lag der Anteil an Endothelzellen bei **92%**.

Die vWF-Färbung zeigte wie bereits beobachtet sehr unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten mit größtenteils schwacher Fluoreszenz (s. Abb. 3.46). Von 405 Zellen war auf 307 Zellen eine Grünfluoreszenz nachzuweisen, so dass ein Endothelzellanteil von **76%** vorlag.

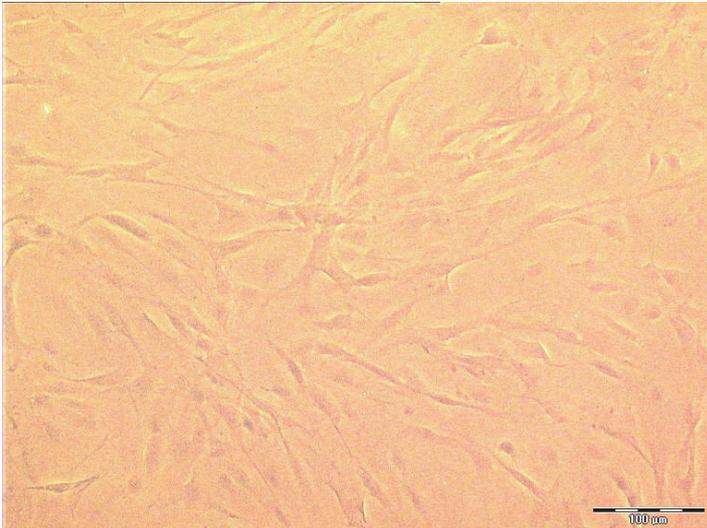


Abb. 3.44: Hellfeld-Aufnahme der CD31- und vWF-markierten MAEC, Vergrößerung 20-fach

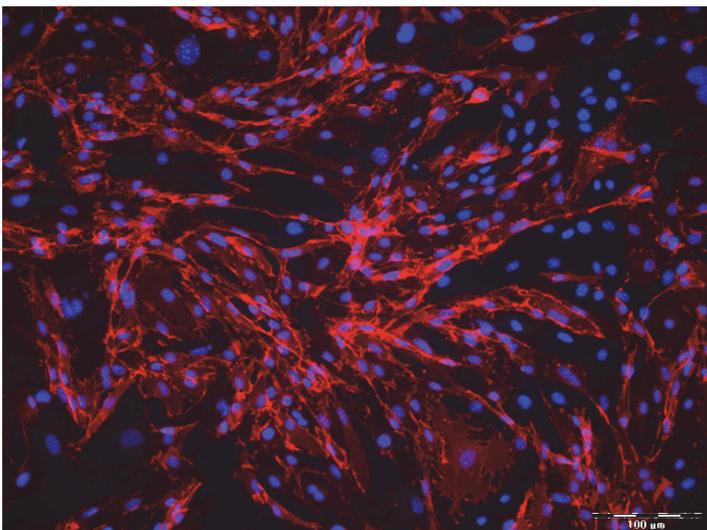


Abb. 3.45: Fluoreszenzaufnahme der CD31- und vWF-markierten MAEC: CD31 (Rhodamin, rot), Zellkerne (DAPI, blau), Vergrößerung 20-fach

373 von 405 Zellen **mit** CD31-Nachweis → 92% Endothelzellen

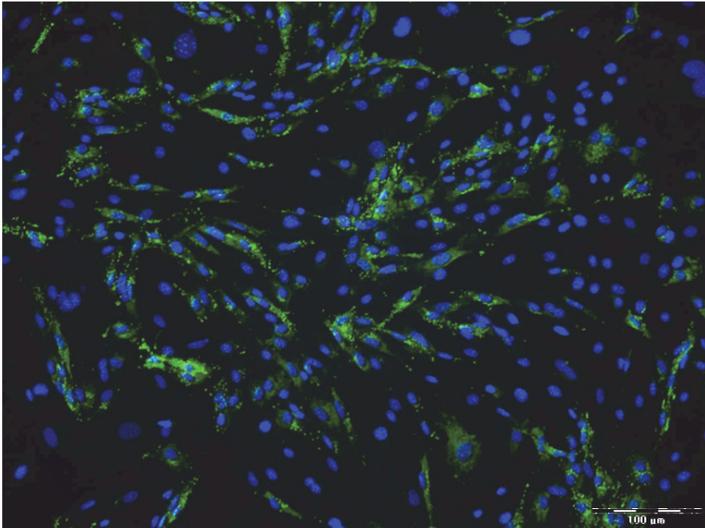


Abb. 3.46: Fluoreszenzaufnahme der CD31- und vWF-markierten MAEC: vWF (FITC, grün), Zellkerne (DAPI, blau), Vergrößerung 20-fach

307 von 405 Zellen mit vWF-Nachweis → 76% Endothelzellen

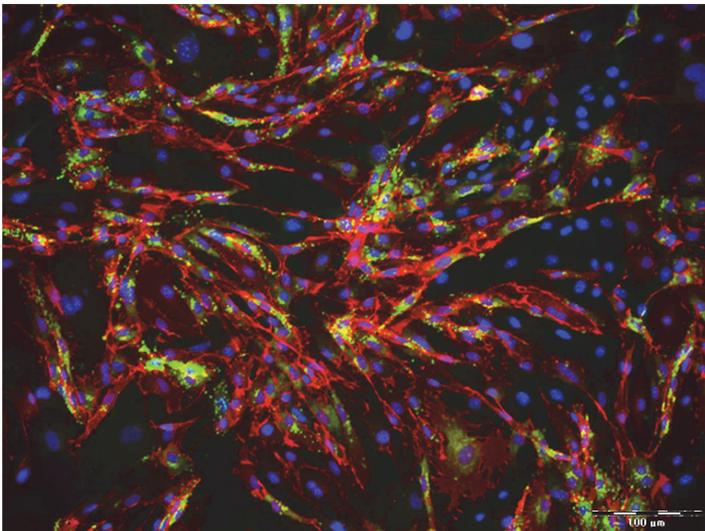


Abb. 3.47: Fluoreszenzaufnahme der CD31- und vWF-markierten MAEC: CD31 (Rhodamin, rot), vWF (FITC, grün), Zellkerne (DAPI, blau), Vergrößerung 20-fach

Die Doppelmarkierung von CD73/vWF fiel vergleichbar aus. Die Färbung von CD73 ergab eine schwache aber deutliche Rotfluoreszenz, die auf 409 von 420 Zellen nachzuweisen war (s. Abb. 3.49). Demzufolge lag ein Endothelzellanteil von **97%** vor. Die Expression des vWF war ähnlich wie bei der CD31/vWF-Doppelfärbung. Bei nur schwacher Grünfluoreszenz waren 331 von 420 Zellen positiv und exprimierten den vWF (s. Abb. 3.50). Somit lag, gemessen an der Expression des vWF, ein Endothelzellanteil von **79%** vor.

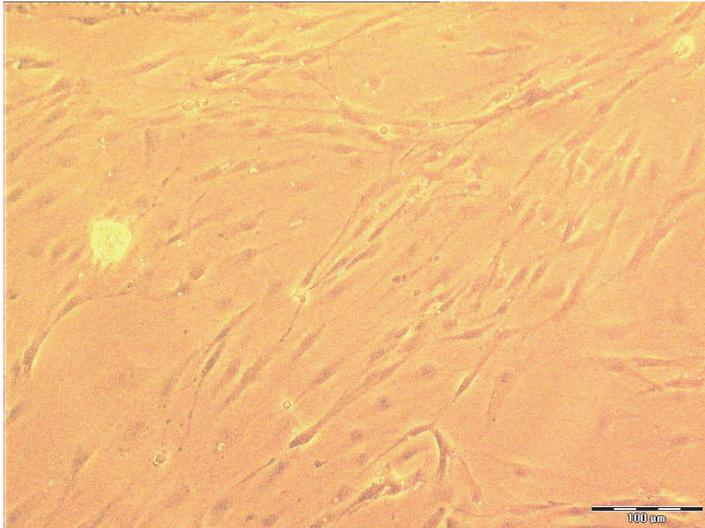


Abb. 3.48:
Hellfeld-Aufnahme der CD73-
und vWF-markierten MAEC,
Vergrößerung 20-fach

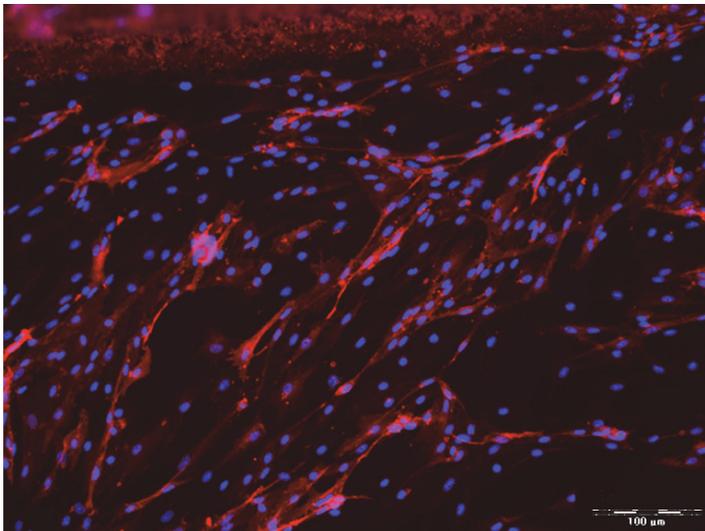


Abb. 3.49:
Fluoreszenzaufnahme der
CD73- und vWF-markierten
MAEC: CD73 (Rhodamin, rot),
Zellkerne (DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

409 von 420 Zellen mit CD73-
Nachweis → 97%
Endothelzellen

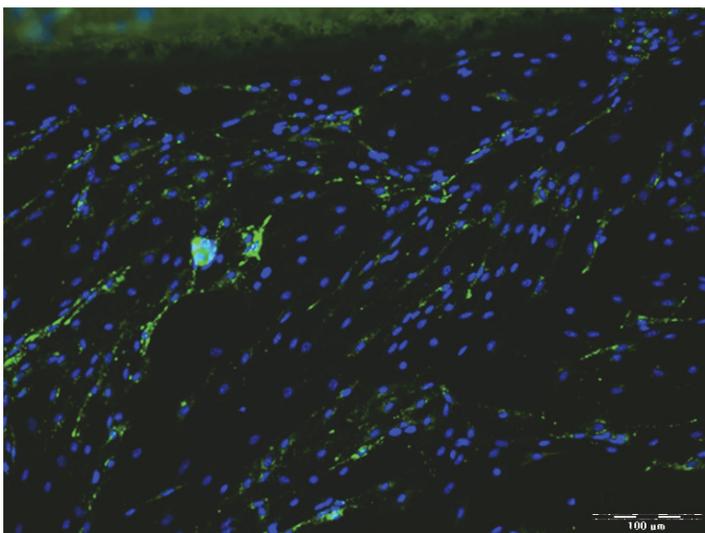


Abb. 3.50:
Fluoreszenzaufnahme der
CD73- und vWF-markierten
MAEC: vWF (FITC, grün),
Zellkerne (DAPI, blau),
Vergrößerung 20-fach

331 von 420 Zellen mit vWF-
Nachweis → 79 %
Endothelzellen

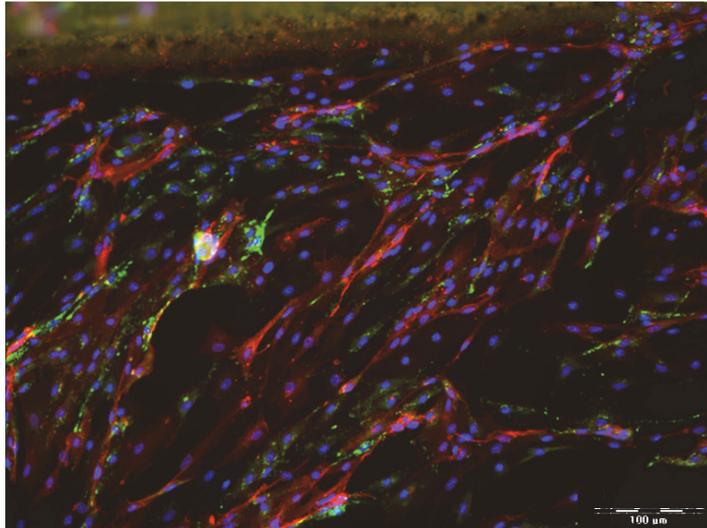


Abb. 3.51:
 Fluoreszenzaufnahme der
 CD73- und vWF-markierten
 MAEC: CD73 (Rhodamin, rot),
 vWF (FITC, grün), Zellkerne
 (DAPI, blau),
 Vergrößerung 20-fach

Zusammenfassend ergab dieses Experiment einen hohen Endothelzellanteil bzw. Endothelzellen mit erhaltenem endothelialen Phänotyp. Während 92% bzw. 97% der Zellen CD31 und CD73 exprimierten, fiel die Expression des vWF mit 76% und 79% gleichermaßen etwas niedriger aus.

Diese Ergebnisse zeigten, dass während der magnetischen Zellseparation noch keine Dedifferenzierung einsetzte. Mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Isolationsmethode konnten folglich Endothelzellen in hoher Reinheit und mit erhaltenem Phänotyp erfolgreich aus der murinen Aorta isoliert werden. Die Dedifferenzierung musste demnach erst ab der 1. Passage im Verlauf einsetzen.

Passend zu der zuvor beschriebenen Beobachtung, dass Endothelzellen mit erhaltenem Phänotyp langsamer zu proliferieren scheinen als dedifferenzierte, wurde in diesem Experiment keine hohe Konfluenz festgestellt. Auch die Zellzählung in den oben aufgeführten Ausschnitten der Kultur ergab 405 und 420 Zellen pro Ausschnitt, während die dedifferenzierten Kulturen des fünften Experiments pro Ausschnitt derselben Dimension eine deutlich höhere Zellzahl von bis zu 963 boten. In Tabelle 3.7 sind die Resultate des sechsten Experiments zusammengefasst.

Endothelzellmarker	Anteil exprimierender Zellen
CD31 / vWF	92% / 76%
CD73/ vWF	97% / 79%

Tab. 3.7: Übersicht Endothelzellmarker und Anteil exprimierender MAEC in Experiment VI
 n.a.: nicht analysiert
 Erläuterungen siehe Text

3.7 Übersicht und Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden insgesamt sechs Experimente nach dem beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die ersten drei Experimente wurden mittels FACS-Analysen ausgewertet, die letzten mittels Immunzytochemie. Bedingt durch unerwartete Resultate nach der magnetischen Zellaufreinigung wurden teilweise geringe Modifikationen am weiteren Versuchsablauf vorgenommen, um einerseits die Methode zu optimieren und andererseits weitere Erkenntnisse über das Verhalten und die Eigenschaften der isolierten MAEC zu gewinnen.

Zusammengefasst konnte mit der entwickelten Isolationsmethode in fünf von sechs Experimenten eine reine Endothelzellkultur etabliert werden (Exp. I, II, IV, V und VI). Die Zellen ließen sich jedoch bis maximal zur vierten Passage kultivieren (Exp. I und II).

In drei von sechs Experimenten konnten Endothelzellen in hoher Reinheit mit erhaltenem endothelialen Phänotyp und Expression von Endothelzellmarkern kultiviert werden. In zwei Fällen wurde eine Dedifferenzierung der Endothelzellen beobachtet, die MAEC exprimierten die analysierten endothelialen Marker nicht mehr, der Endothelzellnachweis gelang über induzierbare Endothelmarker oder die Dil-Ac-LDL Inkorporation. In einem Fall (Exp. III) wurde bereits bei der 2. Passage und 1. Reinheitsanalyse ein sehr geringer Endothelzellanteil festgestellt, es wurde ebenfalls der V.a. eine Dedifferenzierung gestellt. Da eine Fortführung des Experiments keine weiteren Erkenntnisse erbracht hätte, wurde eine zweite magnetische Zellseparation durchgeführt, zwecks Isolierung der MAEC mit erhaltenem endothelialen Phänotyp und Neubeginn der Kultur.

Bei dem **ersten Experiment** lag durchweg über insgesamt vier Passagen ein relativ hoher Endothelzellanteil zwischen ca. **71%** und **79,1%** vor. Die hohe Zellreinheit war jedoch begleitet von einer sehr geringen Zellproliferation, nach vier Passagen bzw. 36 Tagen war die Endothelzellzahl von 56.000 auf nur 210.000 angestiegen. Daher wurde vermutet, dass reine Endothelzellkulturen eine langsame Proliferation aufweisen.

Das **vierte Experiment** wurde bei der 2. Passage mittels Immunzytochemie ausgewertet. Dabei schwankte die Endothelzellreinheit je nach Färbung zwischen **100%** (CD105-Markierung) und **87,5%** (CD102-Markierung), so dass entsprechend der CD105-Färbung von einer absolut reinen Endothelzellkultur ausgegangen werden konnte. Auf nahezu allen Abbildungen war allerdings eine geringe Zelldichte und fehlende Konfluenz der Kultur zu erkennen. Die Zellzählung anhand der immunzytochemischen Mikroskopiebilder ergab Zellzahlen zwischen 407 und 498, bei der Dil-Ac-LDL-Färbung lag die Zellzahl mit 274 Zellen sogar noch niedriger. Im Vergleich dazu lagen die Zellzahlen z.B. im fünften Experiment mit

726 und 963 pro Mikroskopiebild deutlich höher. Diese Beobachtung stützte die bereits erwähnte Vermutung bezüglich des Proliferationsverhaltens reiner Endothelzellkulturen mit erhaltenem endothelialen Phänotyp.

Das **zweite und fünfte Experiment** lieferten interessante Ergebnisse.

Im **zweiten Experiment** wurde über 4 Passagen bzw. 22 Kulturtage ein bis auf **16,9%** (CD31) bzw. **15,6%** (CD102) stetig abnehmender Endothelzellanteil festgestellt. Die Zellzahl stieg dabei von anfänglichen 120.000 auf 1.050.000. Aufgrund des stark gesunkenen Anteils an Endothelzellen bei ausgeprägter Zunahme der Zellzahl bestand der Verdacht auf eine Kontamination der Kultur mit nicht-endothelialen Zellen. Nach der 3. Passage wurde die TNF- α induzierte Expression der induzierbaren endothelialen Oberflächenantigene CD54 und CD106 bestimmt. Dabei zeigte sich, dass **71,8%** der Zellen CD54 und **85,2%** CD106 exprimierten. Diese Beobachtung deutete auf eine Dedifferenzierung der Endothelzellen, bei der die Expression von konstitutiven Oberflächenmarkern herunterreguliert wurde, während die Zellen einen proinflammatorischen Phänotyp annahmen. Entsprechend der CD54- und CD106-Expression lag demnach auch in diesem Fall ein hoher Reinheitsgrad der Endothelzellkultur vor. Die im Gegensatz zum ersten Experiment nach vier Passagen festgestellte hohe Zellzahl von 1.050.000 führte zu der Annahme, dass dedifferenzierte Endothelzellen schneller proliferieren als Endothelzellen mit erhaltenem Phänotyp wie in Experiment I und IV.

Eine ähnliche Feststellung wurde im **fünften Experiment** gemacht. Die Auswertung der Immunzytochemie zeigte für nahezu alle Marker einen sehr geringen Endothelzellanteil, der zwischen **2,2%** und **6,5%** variierte. Bei der Dil-Ac-LDL-Färbung waren jedoch **90,3%** der Zellen positiv und demnach Endothelzellen. Daher wurde auch in diesem Fall eine Dedifferenzierung der Endothelzellen mit Verlust der Expression bestimmter Marker postuliert. Die LDL-Aufnahme im Rahmen des Cholesterinstoffwechsels schien von den Veränderungen des Phänotyps nicht betroffen gewesen zu sein. Folglich lag entsprechend der Dil-Ac-LDL-Markierung eine hohe Reinheit auch in dieser Endothelzellkultur vor. Bei diesem Experiment fiel bei der Auswertung der Mikroskopiebilder auf, dass in den Endothelzellkulturen, vor allem im Vergleich mit den Experimenten IV und VI, relativ viele *Dynabeads* in der Kultur verblieben waren. Daher mussten toxische Effekte der *Dynabeads* mit Einfluss auf den Phänotyp der Endothelzellen in Erwägung gezogen werden. Die anhand der Mikroskopiebilder dieses Experiments bestimmten Zellzahlen von 726 und 963 lagen deutlich höher als bei den Experimenten IV und VI. Die geringe Zellzahl bei der CD102-Färbung war dadurch bedingt, dass der obere, Artefakt-behaftete Bereich der Bilder bei der Zählung nicht berücksichtigt wurde (Abb. 3.34). Die hohen Zellzahlen in diesem Experiment

legten abermals die Vermutung nahe, dass dedifferenzierte Endothelzellen eine höhere Proliferationsrate aufweisen.

Das **dritte Experiment** fiel besonders früh, bereits bei der 2. Passage, durch einen sehr geringen Endothelzellanteil von **18,6%** (CD31) bzw. **17,9%** (CD102) auf. Um das Experiment für weitere Untersuchungen mit einer reinen MAEC-Kultur fortsetzen zu können, erfolgte einige Tage nach der 2. Passage eine erneute magnetische Zellseparation. In Folge der Endothelzellanteile von **18,6%** bzw. **17,9%**, mussten bei der gezählten Gesamtzellzahl von 450.000 bei der 2. Passage zwischen 83.700 und 80.550 Endothelzellen in der Kultur vorliegen. Bei der zweiten magnetischen Zellseparation konnten jedoch nur 20.000 Endothelzellen separiert werden. Diese Differenz deutete auf eine limitierte Effektivität der magnetischen Zellseparationsmethode. Die erneute Reinheitsbestimmung nach 12tägiger Kultur ergab **53,9%** (CD31) bzw. **56,9%** (CD102) Endothelzellen, womit keine besonders hohe Reinheit vorlag.

Um zu klären, ob die Dedifferenzierung der Endothelzellen, wenn sie eintritt, bereits während der magnetischen Zellseparation beginnt, oder erst im Laufe der Kultur, erfolgten die Auswertungen im **sechsten Experiment** sehr früh. Daher wurden die Endothelzellen vier Tage nach der magnetischen Zellseparation analysiert. Die Endothelzellreinheit war mit **92%** (CD31) bzw. **97%** (CD73) sehr hoch. Dieses Ergebnis stellte erstens die prinzipielle Effektivität der Isolationsmethode unter Beweis und zeigte zudem, dass der Dedifferenzierungsprozess im Kulturverlauf einsetzen musste.

Eine Übersicht über den Ablauf und die Ergebnisse der Experimente liefert Tabelle 3.8.

EXPERIMENT	I	II	III	IV	V	VI
Aortenzahl	16	32	24	40	23	32
Gesamtzellzahl	1,16x10 ⁶	2,4x10 ⁶	2,7x10 ⁶	1,84x10 ⁶	3,5x10 ⁶	1,59x10 ⁶
MAEC-Ausbeute	56.000 (4,8%)	120.000 (5%)	90.000 (3,3%)	60.000 (3,3%)	62.500 (1,8%)	100.000 (6,3%)
Reinheitsanalyse mittels:	FACS	FACS	FACS	ICC	ICC	ICC
Anzahl der Passagen	4	4	3*	1	1	0
CD31-⊕ Zellen	1.P: X 2.P:71% 3.P:71,1% 4.P:74,2%	1.P: X 2.P:69,2% 3.P:50,8% 4.P:16,9%	1.P: X 2.P:18,6% 1.P*:53,9%	1.P: X 2.P:99,7%	1.P: X 2.P:4,1%	1.P:92%
CD102-⊕ Zellen	1.P: X 2.P: X 3.P:71,2% 4.P:76,5%	1.P: X 2.P: X 3.P:43,6%	1.P: X 2.P:17,9% 1.P*:56,9%	1.P: X 2.P:87,5%	1.P: X 2.P:3,9%	X

		4.P:15,6%				
CD73-⊕ Zellen	1.P: X 2.P: X 3.P: X 4.P:79,1%	X	X	X	X	1.P: 97%
CD105-⊕ Zellen	X	X	X	1.P: X 2.P:100%	X	X
CD54-⊕ Zellen	X	3.P:71,8%	X	X	X	X
CD106-⊕ Zellen	X	3.P:85,2%	X	X	X	X
vWF-⊕ Zellen	X	X	X	1.P: X 2.P:94,6%	1.P: X 2.P**: • 2,5% • 6,5% • 2,2%	1.P**: • 76% • 79%
Dil-Ac-LDL-⊕ Zellen	X	X	X	1.P: X 2.P:90,5%	1.P: X 2.P:90,3%	X
Endothelzellreinheit	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Hinweis auf Dedifferenzierung	Nein	Ja	(Ja)	Nein	Ja	Nein
Zellproliferation	↓	↑	↑	↓	↑	↓
Dynabeadpersistenz	X	X	X	↓	↑	↓

Tab. 3.8: Übersicht von Ablauf und Ergebnissen der Experimente I bis VI

Erläuterungen siehe Text

MAEC: *mouse aortic endothelial cells* / Anzahl der murinen Endothelzellen nach der Zellseparation

FACS: fluorescence-activated cell sorting

ICC: Immunzytochemie

✓ Analyse durchgeführt

X nicht durchgeführt / nicht analysiert / nicht ausgewertet

P Passage

⊕ positiv

* In diesem Experiment erfolgte nach der zweiten Passage eine erneute magnetische Aufreinigung; die erhaltene MAEC-Kultur wurde noch ein weiteres Mal passagiert

** Bei diesen Versuchen erfolgten Doppelfärbungen, der vWF wurde bei jeder Färbung mit analysiert; daraus resultierten Mehrfachbestimmungen

↑↓ hoch
↓↓ gering

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode, mit der Endothelzellen aus der Mousaorta isoliert und erfolgreich kultiviert werden können. Die Anforderungen an die Methode waren eine hohe Endothelzellausbeute, die Langzeitkultivierung reiner Endothelzellkulturen und Reproduzierbarkeit.

Viele Methoden zur Isolierung von Endothelzellen aus murinem Gewebe basieren auf einer Zerkleinerung von Organen wie Herz, Lunge oder Aorta (95, 96). Eine hohe Kontamination mit nicht-endothelialen Zellen ist dabei vorprogrammiert, so dass eine sehr effektive Zellaufreinigung sich anschließen muss, um reine Endothelzellkulturen zu erhalten. Um die Kontamination von vornherein so gering wie möglich zu halten, wurde eine Technik etabliert, mit der gezielt die Endothelzellen isoliert werden. Die Idee, die den wesentlichen Unterschied zu den bisher bekannten Isolationsmethoden darstellt, war das gezielte Abschaben der *Tunica intima* von der enzymatisch vorbehandelten Aortenwand. Da auch auf diese Weise eine Kontamination durch Nicht-Endothelzellen nicht gänzlich zu vermeiden war, haben wir eine Aufreinigungsprozedur angeschlossen. Die Aufreinigung erfolgte mit nicht kommerziell erhältlichen *Dynabeads*, die von der Firma Invitrogen speziell für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurden. Diese speziellen *Dynabeads* stellten einen weiteren, substantiellen Unterschied zu den anderen Protokollen dar. Es handelte sich dabei um „cleavable“, abtrennbare *Dynabeads*, die nach der Aufreinigung von den Endothelzellen abgetrennt werden konnten. Dadurch sollten zum einen Proliferationsprobleme von *Bead*-beladenen Zellen vermieden und zum anderen weitere Analysen z.B. mittels FACS ermöglicht werden.

Das direkte Abschaben der Endothelzellen und die CD31-vermittelte magnetische Zellseparation mit abtrennbaren *Dynabeads* waren die Hauptmerkmale der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Isolationsmethode.

4.1 Wesentliche Ergebnisse

Zusammengefasst lassen sich aus den Ergebnissen der Experimente folgende **Schlussfolgerungen** ableiten:

1. Grundsätzlich ist mit der entwickelten Endothelzellisolationstechnik die Etablierung und Kurzzeitkultivierung reiner Endothelzellkulturen möglich (Experiment I bis VI, außer III)
2. Die Methode weist durchweg eine geringe Endothelzellausbeute auf, so dass eine höhere Zahl an murinen Aorten *gepoolt* werden müssen (Experiment I bis VI)
3. Die isolierten Endothelzellen unterliegen zum Teil Einflüssen, die zu einer Dedifferenzierung der Zellen mit Verlust des endothelialen Phänotyps führen (Experiment II und V)
4. Endothelzellen mit erhaltenem Phänotyp weisen ein langsames Proliferationsverhalten auf (Experiment I und IV)
5. Dedifferenzierte Endothelzellen proliferieren schneller (Experiment II und V)

Im Umkehrschluss gibt es folgende Nachteile der von uns evaluierten Methode:

1. Geringe MAEC-Ausbeute
2. Dedifferenzierung / Verlust des endothelialen Phänotyps
3. Langsame Proliferation differenzierter Endothelzellen

Nachfolgend wird die Methode chronologisch, entsprechend des Versuchsablaufs, in Hinblick auf mögliche Störfaktoren beleuchtet. Dabei werden zum Teil gleichzeitig Lösungsvorschläge aufgeführt.

4.2 Evaluierung potentieller Störfaktoren der Endothelzellisolationmethode

4.2.1. Alter der Versuchstiere

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse im Alter von 28 bis 35 Tagen eingesetzt. In der Literatur gibt es jedoch Hinweise darauf, dass bei der Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen der Einsatz von wenige Tage alten Jungtieren von Vorteil ist. Fehrenbach et al. isolierten murine Endothelzellen aus der Lunge und machten die Beobachtung, dass Zellen aus adulten Tieren nur über eine bis zwei Passagen kultiviert werden konnten und häufiger von einer Kontamination durch Fibroblasten betroffen waren (104). Der Einsatz von 7- bis 14-Tage alten Jungtieren verhalf zu deutlich besseren Ergebnissen. Diese Beobachtung deutet darauf, dass adulte, ausdifferenzierte Endothelzellen ihre Fähigkeit zu proliferieren verlieren oder proliferationsträge werden. Möglicherweise könnte die Verwendung von derart jungen Mäusen einen Lösungsansatz für die geringe Endothelzellausbeute darstellen. Dadurch könnte auch das Phänomen der zellulären Seneszenz (siehe Kapitel 4.5) vermieden werden, so dass Probleme wie Dedifferenzierung und Proliferationsträgheit der Endothelzellen behoben werden.

4.2.2 Mechanische Ablösung der Endothelzellen aus der Intima

In allen sechs Experimenten lag eine geringe MAEC-Ausbeute vor. Im Durchschnitt gingen aus der magnetischen Zellseparation nur 4,1% der primär aus den Aorten gewonnenen Zellen als Endothelzellen hervor. In absoluten Zahlen entsprach dies im Mittel 81.417 Endothelzellen, die aus ca. $2,2 \times 10^6$ Gesamtzellen isoliert wurden. Vor dem Hintergrund, dass speziell durch das gezielte Abschaben der Endothelschicht von der Aortenwand die Ausbeute an Endothelzellen maximiert und die Kontamination mit nicht-endothelialen Zellen minimiert werden sollten, waren die Ergebnisse ernüchternd.

Doch gerade dieses mechanische Vorgehen mit Hilfe eines Kunststoffschabers könnte einen Störfaktor darstellen. In der Literatur ist beschrieben, dass mechanische Manipulationen einen negativen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen haben können. Heng. et al. demonstrierten an humanen embryonalen Stammzellen, dass das Abkratzen der Zellen nach vorheriger Kollagenasebehandlung zum Absterben von Zellen führte (105). Die Arbeitsgruppe verglich die mechanische Isoliertechnik mit sanftem Auf- und Abpipettieren der Zellen nach Trypsinisierung. Durch die Pipettiermethode war ein deutlich höherer Anteil

an lebenden Zellen zu verzeichnen. Daher ist nicht auszuschließen, dass die mechanische Behandlung Vitalität und Proliferation der Endothelzellen negativ beeinflusst hat und mit ein Grund für die schlechte MAEC-Ausbeute war.

Das gezielte Abschaben der *Intima* mit einem sterilen Wattestäbchen kann eine alternative und schonendere Vorgehensweise sein. Bei der Isolierung von Herzklappenendothelzellen trennten Gould et al. die oberflächliche Zellschicht nach enzymatischer Behandlung sanft mit einem Wattestäbchen ab und konnten so reine Endothelzellkulturen gewinnen, ohne dass eine Aufreinigung der Primärkultur notwendig war (106).

In Hinblick auf die geringe MAEC-Ausbeute musste neben einem systematischen Fehler bzw. Störfaktor, auch eine nicht-beeinflussbare Konstante in Erwägung gezogen werden. Eine solche Konstante, die keinen Ansatz für Veränderungen bzw. Verbesserungen bietet, könnte eine von vornherein geringe Endothelzellzahl der murinen Aorta sein. In der Literatur gibt es nicht viele Daten zu Endothelzellzahlen muriner Organe. Kreisel et al. haben in ihrem Isolationsprotokoll angegeben, dass sie mit Hilfe der *Explant*-Technik aus einer murinen Aorta nach 3 Passagen in einem Monat $5-6 \times 10^6$ Endothelzellen gewinnen konnten (107). Auch Sobczak et al. konnten aus nur 3 Lungen 6-8 Tage alter Jungtiere $1,2 - 1,5 \times 10^6$ Endothelzellen isolieren (108). Diese Zahlen entsprechen einem Vielfachen unserer Resultate, so dass der Eindruck einer ineffizienten Methode entsteht. Kevil et al. hingegen konnten mit der intraluminalen Enzymverdauemethode aus 12 murinen Aorten (10-12 Wochen alte Tiere) 50.000 Endothelzellen isolieren, mit einer Proliferation auf 125.000 bei der 1. Passage. Diese Ergebnisse sind wiederum durchaus mit unseren Resultaten vergleichbar. In einigen Isolationsprotokollen wurde statt absoluter Zellzahlen der Anteil der isolierten Endothelzellen an der Gesamtzellzahl angegeben. Huan Pang beschreibt ein Protokoll zur Isolierung von Endothelzellen aus murinen Lungen und gibt eine Endothelzellausbeute von 0,02 % an (109). Fehrenbach et al. kamen bei ihrer Methode zur Isolierung von Endothelzellen aus Mauslungen auf einen Endothelzellanteil von 1-5 % an der Gesamtzellzahl (104). Die mit unserem Protokoll erzielte durchschnittliche Endothelzellausbeute von 4,1% ist somit vergleichbar bzw. sogar besser als die Ergebnisse der genannten Protokolle. In einem jüngst publizierten Protokoll zur Etablierung einer immortalisierten Endothelzelllinie aus der murinen Aorta nennen die Autoren als eines der Hauptprobleme der diversen Endothelzellisoliationsprotokolle die niedrige Zahl an isolierten Endothelzellen, die sie auf die geringe Größe der Mauseorta zurückführen (110). Dies zeigt, dass das Problem der geringen Ausbeute an MAEC ein generelles Problem ist und am ehesten bedingt ist durch die Dimension der murinen Aorta bzw. der murinen Organe.

4.2.3 Anwendung von Trypsin

Die enzymatische Behandlung mit Trypsin stellt eine weitere mögliche Störgröße dar, die einen Einfluss auf das Vorhandensein und somit auch der Nachweisbarkeit der endothelialen Oberflächenmarker haben könnte. Der Einsatz von Trypsin bei der Passagierung von Zellen dient der Proteolyse interzellulärer Mukoproteine, wodurch Zellen aus konfluenten *Monolayern* herausgelöst werden. Dabei werden neben den interzellulären Proteinen auch zelluläre, membrangebundene Proteine beschädigt, mit Einfluss auf Zellphänotyp, -vitalität und -funktion.

Entsprechend unseres Arbeitsprotokolls erfolgten während dem Versuchsablauf diverse Inkubationen mit Trypsin, angefangen mit einer 5minütigen Trypsinisierung des von der Aortenwand abgeschabten Endothels. Während der nachfolgenden Passagierungen der Zellen fanden weitere, jeweils 10minütige Trypsinisierungen statt.

Wu et al. zeigten im Rahmen ihrer Arbeit zur protektiven Funktion der extrazellulären Proteoglykanmatrix, dass prolongierte Trypsinisierung (12 min) die Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls β 1-Integrin und möglicherweise auch weiterer Adhäsionsmoleküle zur Folge hat (111). Auch Piercy et al. postulierten eine partielle Proteolyse von Zelladhäsionsmolekülen durch Trypsin. Die Gegenüberstellung von Trypsinisierung versus Abschabung bei der Passagierung von konfluenten Zellkulturen ergab einen deutlich geringeren Nachweis von β 1-Integrin bei den mit Trypsin behandelten Zellen (112).

Die Trypsinsensibilität von CD31 wurde durch Marelli-Berg et al. nachgewiesen. Sie zeigten an murinen Endothelzellen eine Trypsin-bedingte Proteolyse von CD31 (95).

Gräbner et al. zeigten an HUVECs, dass es unter den Zelladhäsionsmolekülen Trypsin-sensible und -resistente Formen gibt. E-Selectin (CD62e) wurde als Trypsin-sensibel und ICAM-1 (CD54) als Trypsin-resistent beschrieben, während VCAM-1 (CD106) sowohl in resistenter als auch in sensibler Form vorliegt (113).

Um den negativen proteolytischen Effekt von Trypsin auf die Adhäsionsmoleküle zu minimieren, limitierten Gräbner et al. die Trypsinisierungsdauer auf 2 Minuten. Zudem erarbeitete die Gruppe ein Protokoll, bei dem die Adhäsionsmoleküle durch vorherige Formaldehydfixierung vor der Degradation durch Trypsin geschützt werden konnten. Den größten Effekt in Hinblick auf den Erhalt der endothelialen Oberflächenantigene zeigte jedoch eine, der Passagierung mit Trypsin vorausgehende Antikörpermarkierung der Antigene. Die Besetzung der endothelialen Epitope durch Antikörper stellte einen effektiven Schutzmechanismus dar (113).

In Bezug auf unser Arbeitsprotokoll ist von diesen beschriebenen Maßnahmen lediglich die

Limitierung der Trypsinisierungsdauer auf 2 min praktikabel. Sowohl die Formaldehydfixierung als auch der Schutz durch Antikörpermarkierung stellen einen limitierenden Schritt dar, da die Zellkultur danach nicht mehr so fortgeführt werden kann, dass weitere Analysen mit verschiedenen Antikörpermarkierungen durchgeführt werden können.

Die aufgeführten, potentiellen Effekte von Trypsin könnten die Ergebnisse wie folgt beeinflussen:

1. Trypsinisierung vor und während der magnetischen Zellseparation mit CD31-gekoppelten Dynbeads kann die Endothelzellausbeute minimieren
2. Trypsinisierungen im weiteren Versuchsablauf kann den Endothelzellnachweis reduzieren

Es bleibt letztlich unklar inwiefern die zum Teil mehrfachen Trypsinisierungen das Dasein endothelialer Oberflächenproteine beeinflusst haben. Das Ausmaß der Trypsin-bedingten Proteolyse von CD31 ist dabei von ganz besonderem Interesse, da die magnetische Zellseparation über CD31 erfolgte. Der hohe Anteil an CD31-positiven Endothelzellen bei der ersten Passage in den Experimenten I, II, IV und VI zeigte jedoch, dass durch Trypsin kein gravierender Verlust von CD31 vorliegen konnte. Im Sinne einer Methodenoptimierung wäre die Kontrolle eines solchen Störfaktors nicht eindeutig definierbaren Ausmaßes jedoch erstrebenswert.

Eine erfolgsversprechende Alternative zur Trypsinanwendung wurde 2010 durch Makida-Sano et al. publiziert (114). Die Arbeitsgruppe entwickelte eine trypsinfreie Methode zur Passagierung von HeLa-Zellen und normalen humanen Hautfibroblasten. Dabei wurde als Kultursubstrat Eisen-Alginat verwendet. Alginat bildet mit Eisen wie auch mit anderen mehrwertigen Metallionen eine Gelschicht. Durch Hinzugabe von Chelatbildnern, wie z.B. Citrat, werden die Eisenionen gebunden und die Eisen-Alginat-Gelschicht aufgelöst, so dass die Zellen ohne Trypsin passagiert werden können. In Bezug auf die Endpunkte Zellvitalität, Zellmetabolismus, Zellschaden durch freie Sauerstoffradikale und Zellschaden durch Kryokonservierung erwies sich diese neue Methode der Trypsinbehandlung und der mechanischen Zellpassagierung überlegen. Die Anwendbarkeit dieser Methode an murinen Endothelzellen muss evaluiert werden.

4.2.4 Magnetische Zellseparation / *Dynabeads*

Ein potentieller Störfaktor in Hinblick auf die niedrige MAEC-Zahl und die postulierte Dedifferenzierung der MAEC sind die *Dynabeads*. In vorausgehenden Experimenten hatte unsere Arbeitsgruppe die Beobachtung gemacht, dass nicht abtrennbare, auf den Endothelzellen verbleibende *Dynabeads* einen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen haben. Daher erfolgten die Versuche mit speziell angefertigten, abtrennbaren („cleavable“) *Dynabeads*, die an die Endothelzellen gekoppelt wurden.

Als Ursache für die durchweg geringe MAEC-Ausbeute ist beispielsweise der Verlust von MAEC bei der magnetischen Zellseparation in Erwägung zu ziehen. Nach der Positivselektion der an *Dynabeads* gebundenen MAEC erfolgte die Abtrennung der *Beads* von den Zellen durch den „Release Buffer“. Ob und in welchem Ausmaß nicht-abgetrennte Endothelzellen mit den *Dynabeads* verloren gingen bleibt unklar. Die Möglichkeit, dass eine relevante Menge von Endothelzellen nicht detektiert wurde und im nicht-endothelialen Überstand verblieb, kann weder eindeutig bestätigt noch widerlegt werden. Im III. Experiment wurde auf Grund des rapide abnehmenden Endothelzellanteils eine zweite Aufreinigung durchgeführt. Vor der Aufreinigung lag der Anteil an CD31-positiven Zellen bei 18,6%, an CD102-positiven Zellen bei 17,9%, was ca. 83.700 bzw. 80.550 MAEC entsprach (bei einer Gesamtzellzahl von ca. 450.000). Bei der drei Tage später erfolgten zweiten Aufreinigung konnten allerdings nur ca. 20.000 MAEC isoliert werden. Daher musste der Verdacht auf eine ineffiziente magnetische Zellseparation mit Verlust von MAEC geäußert werden. Im VI. Experiment konnte wiederum gezeigt werden, dass in der während der Zellseparation erhaltenen Nicht-Endothelzellfraktion kaum Endothelzellen nachzuweisen waren, womit eine Detektionsproblematik der *Dynabeads* in diesem Experiment ausgeschlossen werden konnte.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Trypsin-Sensitivität von CD31, setzten Fehrenbach et al. bei der Gewinnung mikrovaskulärer Endothelzellen aus murinen Lungen CD102-gekoppelte *Dynabeads* ein (104). Somit konnte einem Verlust von Endothelzellen, im Falle einer Trypsin-bedingten Proteolyse von CD31, vorgebeugt werden. Marelli-Berg et al. koppelten die *Microbeads* sogar an CD31, CD105 und Isolectin B4, um die Zellseparation noch effizienter zu gestalten (95).

Tiwari et al. zeigten an HUVECs, die mit CD31-gekoppelten *Dynabeads* isoliert wurden, dass eine zu hohe *Dynabeadkonzentration* langfristig Proliferation und Metabolismus von Endothelzellen negativ beeinflusste (102). Eine *Bead-Konzentration* von 50 *Beads* pro

HUVEC führte im Vergleich zu nicht- „Bead“-beladenen HUVECs zu einer deutlich schlechteren Proliferation.

Trotz der Verwendung von abtrennbaren *Dynabeads* wurde bei den immunzytochemischen Analysen deutlich, dass in unseren MAEC-Kulturen z.T. vereinzelt und z.T. in größeren Mengen *Dynabeads* verblieben waren. Vor allem die MAEC-Kulturen des V. Experiments beinhalteten relativ viele *Beads*. Aufgrund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die von Tiwari beschriebenen negativen Effekte der *Dynabeads* auch auf unsere Zellkulturen zutrafen.

Im V. Experiment waren nach lediglich einer Passage nach der magnetischen Zellseparation nur wenige Zellen positiv für die markierten endothelialen Adhäsionsmoleküle. Aufgrund der Dil-Ac-LDL Inkorporation durch die meisten Zellen wurde jedoch das Vorliegen von dedifferenzierten Endothelzellen vermutet. Das Zusammentreffen von vielen persistierenden *Dynabeads* und fehlender Expression endothelialer Oberflächenproteine führte zur Annahme, dass *Dynabeads* möglicherweise auch die Zelldifferenzierung beeinflussen.

Außer der Publikation von Tiwari et al. gibt es in der Literatur keine weitere Arbeit, die sich konkret mit der Toxizität von *Dynabeads* befasst.

Es besteht jedoch ein zunehmendes Interesse an der Erforschung der toxischen Schäden, verursacht durch Eisenoxidverbindungen (Fe_2O_3 , Fe_3O_4), die außer im Kern superparamagnetischer *Beads* (z.B. *Dynabeads*, *Microbeads*) z.B. auch in Nanopartikeln einen breiten Einsatz in der Biomedizin finden. Im Vordergrund stehen dabei die schädlichen Einflüsse auf den menschlichen Organismus, z.B. beim Einsatz von superparamagnetischen Eisennanopartikeln als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie. Es wird angenommen, dass das toxische Potential hauptsächlich von den freigesetzten Eisenionen ausgeht.

He et al. exponierten das Bakterium *Escherichia coli* $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ -Nanopartikeln und konnten zeigen, dass durch die Bindung von Eisen an Proteine und DNA-Stränge Genmutationen verursacht wurden (115). Wu et al. fügten HUVEC Kulturen Dextran- und Citrat-umhüllte Eisennanopartikel hinzu und evaluierten den Einfluss auf Zellviabilität und -funktion (116). Sie stellten fest, dass es zu einer Internalisierung der Nanopartikel durch die HUVECs kommt und konnten einen konzentrationsabhängigen toxischen Effekt beobachten. Zellwachstum und -proliferation waren gestört, über Nacht waren 50% der Zellen abgestorben, am ehesten verursacht durch Apoptose. Weiterhin war durch eine Beschädigung des Zytoskeletts und der Aktin- und Tubulinfilamente die Ausbildung eines

konfluenten *Zellmonolayers* nicht möglich.

Die Arbeitsgruppe um Zhu beschäftigte sich mit den schädlichen Einflüssen speziell auf das Gefäßendothel des menschlichen Organismus, da angenommen wird, dass Eisennanopartikel über die endotheliale Dysfunktion und Inflammation Arteriosklerose verursachen können (117). Die Exposition humaner aortaler Endothelzellen gegenüber Eisennanopartikeln hatte die Zunahme von Zelltod, die Bildung freier Sauerstoffradikale und eine erhöhte NO-Bildung zur Folge. Weiterhin wurde, als Zeichen einer Entzündungsreaktion, eine Expressionszunahme von ICAM-1 (CD54) und IL-8 beobachtet. Zusammengefasst waren Zelltod, erhöhter oxidativer Stress und eine Inflammationsreaktionen die Folge der Exposition. Auch diese Arbeitsgruppe stellte sich die Frage, ob die Internalisierung der Nanopartikel oder die Freisetzung von Eisenionen für die Pathomechanismen verantwortlich ist.

Entsprechend dieser Erkenntnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei Persistenz der *Dynabeads* in den MAEC-Kulturen zu einer Freisetzung der toxischen Eisenoxide, oder von freien Eisenionen kommt. Das durch diverse Gruppen eruierte toxische Potential könnte die langsame Zellproliferation und auch die Dedifferenzierung mit Veränderung des Expressionsprofils der endothelialen Oberflächenproteine erklären.

Zusammenfassend kann eine Toxizität der *Beads* nicht ausgeschlossen werden, so dass die komplette Abtrennung der *Dynabeads* sehr wichtig ist.

Eine sinnvolle Alternative zur magnetischen Zellseparation stellt die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS) dar, die bei entsprechender Verfügbarkeit genutzt werden kann. Vergleiche zwischen magnetischer Zellseparation und FACS zeigten eine Überlegenheit der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung, zumal die magnetische Separation den Nachteil der unspezifischen *Beadbindung* aufwies, wodurch auch nicht-endotheliale Zellen herausgefiltert wurden (118).

4.3 Evaluierung der verwendeten Charakterisierungsmerkmale für MAEC

Die Charakterisierung der gewonnenen murinen Endothelzellen erfolgte über den Nachweis der konstitutiv exprimierten endothelialen Oberflächenproteine CD31, CD73, CD102 und CD105, der induzierbaren endothelialen Oberflächenproteine CD54 und CD106, des von-Willebrand-Faktors und der für Endothelzellen-typischen Dil-Ac-LDL-Aufnahme.

Bei der Isolierung und Charakterisierung von Endothelzellen ist CD31 der am häufigsten eingesetzte Marker mit der höchsten Endothelzellspezifität. Auch in unserem Protokoll erfolgte sowohl die Endothelzellisolierung als auch die -charakterisierung durch den CD31-Nachweis.

Allerdings ist, wie bereits erwähnt, zu beachten, dass für CD31 eine Trypsinsensitivität beschrieben ist. Bei den FACS-Analysen war der Anteil CD31-positiver Zellen jedoch immer vergleichbar mit dem Anteil CD102-positiver Zellen. Ebenso stimmten bei der Immunzytochemie die CD31-Färbungen mit den CD105- (Experiment IV) und CD73-Markierungen (Experiment VI) nahezu überein. Dabei zeigten die CD31-markierten Zellen die eindeutigste und intensivste Fluoreszenz. Zusammenfassend gibt es bei unseren Ergebnissen keinen Anhalt dafür, dass die CD31-Expression durch Trypsin oder andere Faktoren beeinflusst wurde. Insgesamt erweist sich CD31 als ein zuverlässiger Endothelzellmarker.

CD73 ist hingegen kein klassischer und häufig eingesetzter Endothelzellmarker. Ausschlaggebend für den Einsatz in unserem Protokoll war das besondere Interesse unseres Instituts an der *CD73-Knockout-Maus*, was das Bestreben, ein Endothelzellisoliationsprotokoll zu etablieren, begründete. In Hinblick auf ausstehende Untersuchungen an der *Knockout-Maus*, versuchten wir im Vorfeld die CD73-Expression mit der Expression der Standardmarker zu vergleichen. Diesbezüglich kann anhand von 2 Experimenten (Exp. I und VI) festgehalten werden, dass in der Wildtyp-Maus die CD73-Expression mit derjenigen von CD31 vergleichbar ist.

CD102 wird auf Endothelzellen und lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert. Aufgrund der seltenen Kontamination von Endothelzellkulturen mit o.g. Blutzellen, kann auch CD102 als endothelspezifisch gewertet werden und wird auch häufig zur Identifizierung von Endothelzellen eingesetzt. Wie bereits erwähnt gibt es Autoren, die sogar die primäre Selektion von Endothelzellen mit CD102-gekoppelten magnetischen *Beads* machen. In

unseren FACS-Experimenten war der Anteil CD102-positiver Zellen stets vergleichbar mit dem Anteil CD31-positiver Zellen. Das IV. Experiment zeigte jedoch, dass im Gegensatz zu den anderen Färbungen nur wenige der CD102-markierten Zellen eine eindeutige Fluoreszenz aufwiesen. Die meisten Zellen boten eine nur schwache Fluoreszenz. Ein Affinitätsproblem des Antikörpers konnte durch eine deutliche Anfärbung der bEnd.3-Zellen (Positivkontrolle) ausgeschlossen werden. Folglich ist davon auszugehen, dass isoliert die CD102-Expression herabreguliert wurde. Ein konkreter Einflussfaktor auf die CD102-Expression ist in der Literatur nicht beschrieben.

CD105 wurde in unserer Arbeit in den immunzytochemischen Experimenten eingesetzt. In Experiment IV waren, bei insgesamt schwacher Fluoreszenz, nahezu alle Zellen deutlich CD105-positiv. Eine Trypsinempfindlichkeit ist für CD105 nicht beschrieben. CD105 wird von Endothelzellen stark exprimiert, während die Expression auf Nicht-Endothelzellen, wie z.B. Myozyten und Fibroblasten, nur von geringem Ausmaß ist. Trotz der fehlenden Endothelspezifität scheint CD105 ein valider Indikator zu sein. Wenn Kontaminationen nicht auszuschließen sind, sollte CD105 zusammen mit anderen endothelialen Oberflächenmarkern bestimmt werden.

Der vWF wird nur in Endothelzellen und Thrombozyten bzw. Megakaryozyten nachgewiesen, daher eignet er sich prinzipiell gut als Endothelzellmarker. Die Expression des vWFs unterliegt jedoch einer großen Variationsbreite, was die Bewertung erschwert. Gut durchblutete Organe, makrovaskuläre und venöse Gefäße weisen beispielsweise eine deutlich höhere Expressionsrate auf. Die Aussagekraft des vWFs wird durch die von Senis et al. gemachte Beobachtung weiter eingeschränkt. Sie zeigten, dass die Expression des vWFs in der Rattenaorta sogar von Zelle zu Zelle variierte (91). Dabei waren insgesamt nur 20-50% der Zellen aus der Rattenaorta vWF-positiv. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression des vWFs insgesamt stark von Umgebungsfaktoren, z.B. den intravasalen Strömungsbedingungen, abhängig ist (119). Die beschriebene Varianz der vWF-Expression spiegelte sich auch in unseren Experimenten wieder. In den Kulturen mit hohem Anteil an Endothelzellen gab es stets Zellen, die im Gegensatz zu den anderen endothelialen Oberflächenproteinen den vWF nicht exprimierten. Besonders deutlich wurde dieser Unterschied im IV. Experiment bei der Doppelfärbung der MAEC mit Anti-CD105 und Anti-vWF (s. Abb. 3.22, S. 56). Fanburg-Smith et al. hatten bei ihren Untersuchungen an Angiosarkomen der oralen Speicheldrüsen die Beobachtung gemacht, dass vor allem in gering differenzierten Angiosarkomen die Expression vom vWF fehlte, während CD31

nachzuweisen war. Zudem zeigten sich deutliche Unterschiede in der vWF-Expression. Daher bezeichneten sie CD31 als den besten Endothelzellmarker (120). In Folge der aufgeführten Beobachtungen und in Hinblick auf das Fehlen der Expressionsbeeinflussenden Umgebungsfaktoren in *in vitro* Modellen, ist die Eignung des vWFs als Endothelzellmarker fragwürdig. Ein Verzicht auf den vWF erscheint plausibel.

Die Dil-Ac-LDL-Inkorporation ist eine in der Endothelzellsforschung etablierte Methode zum Endothelzellnachweis.

CD54 ist außer auf Endothelzellen unter anderem auch auf Epithelzellen und Fibroblasten nachzuweisen. Nicht-stimulierte Endothelzellen exprimieren CD54 auch in geringem Maße konstitutiv, während die Stimulation durch Zytokine zu einer deutlichen Expressionssteigerung führt. Die induzierbare Expressionssteigerung ist im Gegensatz zur konstitutiven Expression endothelspezifisch. Fibroblasten zeigen unter Einfluss von Zytokinen keine Steigerung der Expressionsrate (121). Somit kann CD54 durchaus als Endothelzellmarker eingesetzt werden. Die Expression von CD106 ist ausschließlich Zytokinabhängig. Auch CD106 ist nicht endothelspezifisch, allerdings werden die nicht-endothelialen CD106-exprimierenden Zellen in Endothelzellkulturen nicht erwartet, so dass CD106 auch bei fehlender Endothelspezifität als Endothelzellindikator gut geeignet ist.

In unserer Arbeit erfolgte im II. Experiment der Nachweis von CD54 und CD106 nach Stimulation durch TNF- α . Während die konstitutiven Endothelzellmarker nur auf wenigen Zellen nachzuweisen waren, waren 71,8% der Zellen CD54-positiv und 85,2% CD106-positiv. Anhand dieser Beobachtung wurde postuliert, dass eine Dedifferenzierung der Endothelzellen mit Verlust der konstitutiven Oberflächenmarker und Überwiegen eines inflammatorischen Phänotyps vorlag. Aufgrund dieser Feststellung spielen die induzierbaren endothelialen Adhäsionsmoleküle CD54 und CD106 beim Nachweis von Endothelzellen eine wichtige Rolle. Bei dedifferenzierten Endothelzellen scheinen sie die Oberflächenmarker zu sein, die auf den endothelialen Ursprung der Zellen hinweisen können.

4.4 Zelluläre Dedifferenzierung / zelluläre Seneszenz

In Experiment II und V wurde die Beobachtung gemacht, dass in den MAEC-Kulturen der Anteil an Endothelzellen rapide abnahm. In Experiment II exprimierten bei der 3. Passage nur noch ca. 50,8% der Zellen CD31 und 43,6% CD102. Zwei Tage später waren sogar nur noch 30,1% der Zellen CD31-positiv. Nach TNF- α Stimulation nach der 3. Passage waren jedoch 71,8% der Zellen CD54- und 85,2% CD106-positiv.

Die immunzytochemische Färbung in Experiment V ergab, dass in der MAEC-Kultur kaum Zellen mit positivem Nachweis für Endothelzellmarker vorhanden waren. Eine Funktionsanalyse der Zellen mit Beurteilung der Dil-Ac-LDL-Aufnahme zeigte hingegen, dass die meisten Zellen Dil-Ac-LDL inkorporierten und sich somit wie Endothelzellen verhielten.

Die Schlussfolgerung beider Experimente war, dass eine Dedifferenzierung oder Alterung der Zellen mit Verlust des endothelialen Phänotyps vorliegen musste. Sowohl die endotheliale Dedifferenzierung als auch die endotheliale Seneszenz sind in der Literatur beschriebene Phänomene, die die gemachten Beobachtungen in Experiment II und V erklären können.

Lacorre et al. demonstrierten anhand von humanen postkapillären venösen Endothelzellen, die sie aus menschlichen Tonsillen isolierten, den Einfluss von Umgebungsfaktoren auf die Ausbildung des endothelialen Phänotyps. Sie zeigten, dass *in vitro* kultivierte Zellen in Abwesenheit ihrer Mikroumwelt binnen 2 Tagen die Expression charakteristischer Gene herabregulieren (122).

Es ist lange bekannt, dass lokale Umgebungsfaktoren wie z.B. Zell-Zellkontakte oder lösliche Faktoren wie z.B. Zytokine für den organ- und gewebespezifischen Phänotyp von Endothelzellen ausschlaggebend sind (42). Daher erscheint es plausibel, dass in Abwesenheit dieser determinierenden Faktoren, wie es in *in vitro* Modellen der Fall ist, eine Dedifferenzierung der Endothelzellen möglich ist.

Dass die Dedifferenzierung der Endothelzellen mit Annahme eines nicht-endothelialen Phänotyps ein häufiges Problem bei der Isolierung und Kultivierung von murinen Endothelzellen ist, wird auch von Ni et al. beschrieben (110).

Das Phänomen der zellulären Seneszenz ist ebenfalls eine mögliche Erklärung für den Verlust des endothelialen Phänotyps. Zelluläre Seneszenz beschreibt einen Zustand, der gekennzeichnet ist durch einen irreversiblen Wachstumsarrest und Veränderungen des Zellphänotyps (123, 124). Dabei kann es sich um einen natürlichen Alterungsprozess in Folge extensiver Zellproliferation, oder aber um eine Stress-induzierte vorzeitige Alterung

handeln. Oxidativer Stress durch freie Sauerstoffradikale ist der bedeutendste Stressfaktor. Die erstgenannte „replikative Seneszenz“ (123) basiert vorwiegend auf der Telomerverkürzung und -dysfunktion.

Der Pathomechanismus der prämaturnen Zellalterung durch oxidativen Stress ist multifaktoriell. Durch freie Sauerstoffradikale verursachte Telomer- oder Telomerasedefekte sind ebenso möglich wie die direkte Schädigung der genomischen DNA oder der Mitochondrien.

Erusalimsky beschrieb, dass alternde Endothelzellen einen proinflammatorischen und prothrombotischen Phänotyp annehmen (123). Dabei kommt es u.a. zu einer Expressionssteigerung von CD54 / ICAM-1 und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Proteins (*PAI-1*). Diese Beobachtung könnte eine Erklärung für die Ergebnisse des II. Experiments sein. Die MAEC des II. Experiments zeigten einen Expressionsverlust für die konstitutiven endothelialen Oberflächenmoleküle, während ein Großteil der Zellen CD54 und -106 exprimierten. Somit könnten der proinflammatorische Phänotyp der Zellen und die regrediente Expression der konstitutiven Endothelzellmarker auf die Alterung der MAEC hinweisen.

Zusammengefasst ist sowohl die Dedifferenzierung als auch die Seneszenz der Endothelzellen als Erklärung für unsere Ergebnisse in Erwägung zu ziehen.

4.5 Neue Methoden zur Isolierung muriner Endothelzellen

In der Literatur finden sich diverse Techniken zur Isolation muriner mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen. Dennoch ist die Suche nach dem optimalen Arbeitsprotokoll nicht abgeschlossen, es werden stets neue Vorgehensweisen entwickelt.

Aber auch die neuesten Arbeitsprotokolle basieren weitgehend auf den bekannten Methoden und weisen lediglich geringe Modifikationen auf. Die neueren Arbeiten zeigen, dass die Tendenz insgesamt in Richtung der Isolierung mikrovaskulärer Endothelzellen geht.

Doch je nach Fragestellungen sind *in vitro* Modelle aus mikro- oder makrovaskulären Endothelzellen erforderlich. Untersuchungen zur Pathogenese der Arteriosklerose z.B. müssten an Endothelzellen makrovaskulären Ursprungs erfolgen, damit valide Resultate gewonnen werden können. Das neueste Protokoll zur Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus der murinen Aorta stammt von der Arbeitsgruppe um Ni (110). Vor dem Hintergrund des Forschungsinteresses an der endothelialen Dysfunktion und dem Vorhandensein diverser transgener Mauslinien hatten Ni et al. besonderes Interesse an murinen makrovaskulären Endothelzellen. Die Grenzen und Schwierigkeiten der üblichen

Protokolle zur Isolierung primärer muriner Endothelzellen wie geringe Zellzahlen, limitiertes Proliferationspotential und die Tendenz zur Transdifferenzierung zu mesenchymalen Zellen mit Verlust des endothelialen Phänotyps waren ihnen jedoch bekannt. Daher sahen sie die Lösung für diese Probleme in der Etablierung einer immortalisierten Endothelzelllinie mit Endothelzellen aus der murinen Aorta. Sie erarbeiteten ein Isolationsprotokoll und setzten dabei die Aorten von vier Wochen alten Mäusen ein. *In situ* wurde die Aorta von umgebenden Fett- und Bindegewebe freipräpariert, entnommen und in kleine Ringe von 1 mm Durchmesser geschnitten, die anschließend eröffnet wurden. Die Ringe wurden mit der Endothelseite nach unten zeigend für 3-5 Tage auf Kollagengel (Typ-I Kollagen) ausgebreitet, so dass die Endothelzellen von der Aortenwand auf das Kollagengel auswandern konnten. Die Immortalisierung der Endothelzellen erfolgte mittels Transduktion mit dem *middle* T-Antigen des murinen Polyomavirus. Die so gewonnen Endothelzellen wurden anschließend charakterisiert. Dabei wurde mit Hilfe von FACS-Untersuchungen die Dil-Ac-LDL-Aufnahme und mittels Immunzytochemie das Vorhandensein von CD31, VE-Cadherin, vWF und α -SMA (*smooth muscle actin*) analysiert. Des Weiteren wurden u.a. Untersuchungen zur Schubspannung und zum Wachstums- und Proliferationsverhalten gemacht. Ni et al. konnten nachweisen, dass sie eine effektive Methode entwickelt hatten, mit der sie immortalisierte Endothelzellkulturen mit erhaltenem Phänotyp und erhaltenen endothelialen Funktionen über mehrere Passagen für mehrere Monate kultivieren konnten. Sie machten dennoch darauf aufmerksam, dass es Unterschiede geben kann zwischen dem Verhalten immortalisierter Endothelzelllinien und primärer Endothelzelllinien und erst Recht zwischen *in vitro* und *in vivo* Zellmodellen. Daher empfehlen sie an immortalisierten Endothelzellen gewonnene Erkenntnisse mit Vorsicht zu interpretieren und an primären Kulturen zu validieren (110). Dieser Hinweis zeigt, dass trotz eines solch vielversprechenden Protokolls, primäre MAEC einen besonderen Stellenwert haben und die Suche nach Isolationsprotokollen für primäre MAEC ihre Berechtigung hat.

Außer der o.g. Arbeit von Ni et al. gibt es keine neueren Arbeiten zur Isolierung von makrovaskulären Endothelzellen. Alle anderen in der Literatur vorhandenen Isolationsprotokolle aus neuerer Zeit haben primäre murine mikrovaskuläre Endothelzellen zum Ziel.

Fehrenbach et al. publizierten 2009 ihre eigene optimierte Methode zur Isolierung muriner mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Lunge, da sie bei der Umsetzung vorhandener Protokolle diverse Probleme hatten (104). Die beschriebenen Schwierigkeiten decken sich

zum Teil mit denen unserer Methode: mit zunehmender Passage durch Kontamination rapide abnehmende Zellreinheit bei initial reinen Endothelzellkulturen, niedrige Proliferationsrate der Endothelzellen, schnelle Zellalterung und uneinheitliche Ergebnisse.

Das neue Protokoll der Autoren beinhaltet Modifikationen der Arbeitsschritte, an denen die Probleme der anderen Methoden vermutet wurden. Im Gegensatz zu den älteren Protokollen verwendeten sie 7- bis 14-Tage alte Mäuse-Jungtiere. Statt einer traumatischen, mechanischen Zerkleinerung der Lungen füllten sie das Bronchialsystem mit Kollagenase A und limitierten den Enzymverdau auf 30 min. Die Zellseparation erfolgte nach 2-3 tägiger Kultur per FACS und zum Vergleich auch mit nicht-abtrennbaren *Dynabeads* über CD102. Die Arbeitsgruppe machte die Beobachtung, dass die FACS-Sortierung der magnetischen Zellseparation überlegen war. Bei der magnetischen Zellseparation wurden durch unspezifische *Beadbindungen* ausgeprägte Kontaminationen mit Fibroblasten beobachtet. Auch eine Wiederholung der magnetischen Zellseparation bei abnehmender Zellreinheit hatte keine zufriedenstellenden Ergebnisse gezeigt, vergleichbar mit unserem III. Experiment.

Die Endothelzellausbeute dieser Methode betrug ca. 1-5%, ebenfalls vergleichbar mit der Ausbeute unserer Methode, die zwischen 1,8 bis 6,3 % variierte. Absolute Zellzahlen wurden nicht aufgeführt.

Mit dieser Methode gelang es der Arbeitsgruppe in 30 von 34 Versuchen reine Endothelzellkulturen zu etablieren. Die Zellen konnten, ohne Verlust des endothelialen Phänotyps, über 8 bis 10 Passagen kultiviert werden. Bei höheren Passagen wurden Zeichen der Zellalterung mit abnehmender Proliferation und Verschwinden der Expression von CD31 und VEGFR-2 beobachtet.

Zusammengefasst sahen die Autoren den Vorteil ihres Protokolls darin, dass sie Jungtiere nutzten, die Organe nicht mechanisch zerkleinerten, den Enzymverdau der Organe auf 30 min reduzierten und die Zellseparation per FACS-Sortierung und nicht unverzüglich nach der Zellisolierung durchführten.

Sobczak et al. beschrieben ihre 2010 veröffentlichte Isolationsmethode auch als zuverlässig und einfach (108). Die Endothelzellen wurden mechanisch aus den Lungen 6 bis 8 Tage alter Mäuse isoliert und nachfolgend erfolgte eine magnetische Zellseparation in 2 Schritten.

Die mechanische Zerkleinerung der Lungen erfolgte durch ca. 100 Schnitte, gefolgt von 12facher Passage durch eine 14 Gauge Kanüle nach der 45-minütigen Enzyminkubation. Die erste magnetische Zellseparation erfolgte mit an Anti-CD31-Antikörper gekoppelten *Dynabeads*. Eine nachfolgende Abtrennung der *Dynabeads* erfolgte nicht. Bei der zweiten

magnetischen Zellseparation nach 3 - 4 tägiger Kultur wurden an Anti-CD102-Antikörper gekoppelte *Dynabeads* eingesetzt. Auch die *Dynabeads* der zweiten Separation verblieben auf den Zellen. Mit dieser Methode erzielten die Autoren ca. $1,2$ bis $1,5 \times 10^6$ Endothelzellen aus 3 Jungtieren nach 6 - 7 tägiger Kultur. Die Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte durch den fluoreszenzspektrometrischen Nachweis von VE-Cadherin und VEGFR-2 und den immunzytochemischen Nachweis von VE-Cadherin.

Da die Zellen binnen 2 Wochen nach der Aufreinigung in Experimenten eingesetzt wurden, trafen die Autoren keine Aussage zur Langzeitkultivierung.

In Anlehnung an das Sobczak-Protokoll beschrieb Huan Pang 2011 ein Protokoll zur Isolierung muriner pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen (109). Pang isolierte Endothelzellen aus 5 bis 6 Wochen alten Mäusen, wobei mindestens 5 Tiere für eine gute Ausbeute nötig waren.

Nach einer ersten mechanischen Zerkleinerung der Lungen erfolgte ein 45minütiger Verdau in Kollagenase I mit anschließend weiterer Gewebszerkleinerung bis auf eine Partikelgröße von 1 mm^3 und erneutem Enzymverdau. Die erhaltene Gewebs-Zellsuspension wurde nach Beenden der Enzymdigestion für eine Stunde auf einer Kulturschale ausgesät. Während dieser Stunde adhärten die Fibroblasten, nicht jedoch die Endothelzellen, so dass eine Vorselektion erfolgte. Nicht-adhärte Zellen wurden nach einer Stunde abgenommen und der magnetischen Zellseparation zugeführt. Die verwendeten *Dynabeads* waren im Vorfeld über 24h an Anti-CD31-Antikörper gekoppelt und dann über 24h Stunden gewaschen worden. Nach der Zellseparation wurden die *Dynabeads* abgetrennt. Die Autoren geben an, dass Endothelzellen an der Primärkultur einen Anteil von ca. 0,02% ausmachten, während die absolute Endothelzellzahl aus 5 Mäusen ca. 10000 - 50000 Zellen betrug.

Mit dem Ziel, ein *in vitro* Modell der Angio- und Vaskulogenese mit Endothelzellen aus *Knockout*-Mäusen zu etablieren, publizierten Jin et al. 2012 eine Methode zur Isolierung muriner mikrovaskulärer Endothelzellen aus Herz und Lungengewebe (125). Auch diese „neue“ Methode, die ebenfalls große Ähnlichkeit hat mit der Methode von Sobczak et al., basiert auf den bekannten Grundprinzipien der Endothelzellisolierung: die Zellgewinnung erfolgte durch Gewebezzerkleinerung und die Zellseparation mit *Dynabeads*.

Auch Jin et al. setzten neonatale Mäuse (7 Tage alt) ein, da die Reinheit und Wachstumseigenschaften der Endothelzellen aus besonders jungen Tieren besser waren.

Herz und Lungen wurden in kleinste Gewebestücke geschnitten und anschließend für 45 min in Kollagenase II verdaut. Im Anschluss erfolgte auch in diesem Fall die weitere

Gewebszerkleinerung durch mehrfache Aspiration durch eine Kanüle und anschließendes Sieben. Die Zellseparation erfolgte mit Anti-CD31-Antikörper gekoppelten *Dynabeads*, die im Anschluss abgetrennt wurden. Mit dieser ersten Aufreinigung konnte die Arbeitsgruppe Endothelzellkulturen mit einer ca. 80%igen Reinheit kultivieren. Um, je nach Bedarf, eine höhere Reinheit zu erzielen, wurde eine zweite Aufreinigung nach 5- bis 9-tägiger Kultur durchgeführt. Dafür wurden Anti-CD102-Antikörper gekoppelte *Dynabeads* eingesetzt, die im Anschluss nicht abgetrennt wurden. Für die nachfolgenden Passagierungen der Zellen wurde nur 0,05% -EDTA eingesetzt. Die Auswertungen erfolgten durch Nachweis von PECAM-1 und VE-Cadherin per FACS-Analysen.

Auch Jin et al. berücksichtigten bei ihren Versuchen die Trypsinsensitivität von CD31. Die erste Zellseparation mit Anti-CD31-Antikörper gekoppelten *Dynabeads* erfolgte ohne vorherige Trypsinbehandlung direkt nach der Zellisolierung aus den Organen. Die Autoren weisen explizit daraufhin, dass eine optionale zweite magnetische Zellseparation aufgrund der vorherigen Trypsinisierung mit Anti-CD102-Antikörper gekoppelten *Dynabeads* erfolgen sollte. Es wurde darauf geachtet, dass vor der Charakterisierung der Endothelzellen durch den Nachweis von CD31 und VE-Cadherin die Zellen nur mit EDTA passagiert werden, um eine mögliche Proteolyse von CD31 durch Trypsin zu vermeiden.

Mit dem beschriebenen Protokoll konnten die Autoren zwar aus den Lungen insgesamt mehr Endothelzellen gewinnen, die Reinheit war allerdings in den Kulturen mit den Herz-Endothelzellen höher. Genaue Zellzahlen wurden nicht genannt. Aussagen zur Langzeitkultivierung wurden ebenfalls nicht getroffen.

In Folge der Ausführungen zu den *Dynabeads* in Kapitel 4.1 sind die Protokolle von Sobczak et al. und Jin et al. aufgrund der nicht abgetrennten *Dynabeads* kritisch zu sehen. Die klassischen Endothelzellmarker wurden von Sobczak et al. nicht bestimmt, so dass die Auswirkung der *Dynabeads* auf die endothelialen Oberflächenmoleküle bzw. den endothelialen Phänotyp nicht ausreichend evaluiert wurde. Ebenso bleibt in beiden Fällen unklar, ob die *Dynabeads* nicht einen Effekt auf die Langzeitkultivierung haben.

Eine Übersicht der beschriebenen Protokolle im Vergleich mit unserer Methode liefert Tabelle 4.1.

	Eigenes Protokoll	Ni et al., 2014	Fehrenbach et al., 2009	Sobczak et al., 2010	Huang Pang et al., 2011	Jin et al., 2012
Zielzellen	Makro-vaskuläre EC	Makro-vaskuläre EC	Mikro-vaskuläre EC	Mikro-vaskuläre EC	Mikro-vaskuläre EC	Mikro-vaskuläre EC
Alter der Mäuse	28 – 35d	28d	7 – 14d	6 – 8d	35 – 42d	7d
Anzahl der Mäuse pro Durchgang	16-40	n.a.	4-6	3	min. 5	2
Max. Anzahl der Passagen	4	81	8-10	n.a.	n.a.	n.a.
Zielorgane	Aorta	Aorta	Lunge	Lunge	Lunge	Herz & Lunge
Zellisolierung durch	Abschaben des Endothels der Aorta	<i>Explant</i> -Technik: Aortenstücke auf Kollagen-gel	Enzym-inkubation endo-tracheal & Schütteln & 70 µm Sieb	Mech. GZ: 100 Schnitte & 12 x Zug durch Kanüle & 70 µm Sieb	Mech. GZ: Zerteilung in 2 Schritten → Partikel von 1mm ³	Mech. GZ: Zerteilung in kleinste Partikel & mehrfach Zug durch Kanüle & 70 µm Sieb
Enzym	Kollage-nase I & II & XI / Hyaluro-nidase Typ 1-s / DNase I / (Trypsin)	Kollage-nase I	Kollage-nase A	Kollage-nase & Dispase	Kollage-nase I	Kollage-nase II
Inkubations-dauer	45 min (5min)	n.a.	30 min	45 min	45 min + 5min	45min
Zwischen-schritte	keine	Immorta-lisierung	keine	keine	Aussaat für 1h	keine
Zielantigen der magne-tischen Zell-separation	CD31	n.a.	CD102	1. CD31 2. CD102	CD31	1. CD31 2. CD102
Abtrennung der Dynabeads	ja	n.a.	nein	nein	ja	nein
FACS-Sortierung, Zielantigen	n.d.	via Dil-Ac-LDL	via CD102	n.d.	n.d.	n.d.

	Eigenes Protokoll	Ni et al., 2014	Fehrenbach et al., 2009	Sobczak et al., 2010	Huang Pang et al., 2011	Jin et al., 2012
CD31-Trypsinsensibilität¹	Nicht beachtet	Nicht beachtet	Beachtet	Beachtet	Beachtet	Beachtet
Zellausbeute	1,8 – 6,3% ≈ 0,56-1,2 x 10 ⁵	n.a.	1-5%	1,2 -1,5 x 10 ⁶	0.02% ≈ 0,1-0,5 x 10 ⁵	10 ⁷ (Lungen > Herz)
Langzeitkultivierung	n.d.	✓	✓	n.a.	n.a.	n.a.

Tab. 4.1: Vergleichende Übersicht des eigenen Protokolls mit den neueren Isolationsmethoden für murine Endothelzellen; Erläuterungen siehe Text

n.a.: *not available* (Daten werden in der Originalarbeit nicht angegeben)

n.d.: *not done* (nicht durchgeführt)

EC: Endothelzellen

Mech. GZ: Mechanische Gewebezerkleinerung

¹: nicht beachtet = Einsatz von Trypsin mit anschließendem Nachweis von CD31, trotz Trypsinsensibilität von CD31

✓: erfolgt / durchgeführt

In Zusammenschau stimmen die aufgeführten neuen Protokolle in Ihren Grundzügen überein. Lediglich das Protokoll von Ni et al. nimmt eine Sonderstellung ein, da eine Immortalisierung der Endothelzellen vorgenommen wird. Daher ist es mit den anderen Protokollen nicht direkt vergleichbar. Aufgrund der guten Resultate in Hinblick auf den erhaltenen endothelialen Phänotyp, die erhaltenen endothelialen Funktionen und die mögliche Langzeitkultivierung überzeugt die Methode jedoch am meisten.

Die Methodik der anderen Protokolle ist in ihren Grundzügen vergleichbar mit unserer Isolationsmethode. Unter diesen überzeugt insgesamt die Methode von Fehrenbach et al., alleine durch die Tatsache, dass es als einziges Protokoll Aussagen macht zur Langzeitkultivierung der Endothelzellen mit der Verlaufsbeurteilung des endothelialen Phänotyps und der Wachstumseigenschaften. Es ist aber auch das einzige Protokoll, dass die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung zur Separierung der Endothelzellen einsetzt. Der Verzicht auf die mechanische Gewebsprozessierung, die Verkürzung des Enzymverdaus und das Nutzen von CD102 als Zielantigen für die Zellseparation sind erfolgsversprechende Ansätze.

Bei der Betrachtung der genannten Protokolle (Ni et al. ausgeschlossen) fällt auf, dass in

drei von vier Protokollen neonatale Mäuse eingesetzt und dadurch bessere Ausbeuten und Proliferationseigenschaften erzielt wurden. Dieser Aspekt scheint zu einem Standard in der Endothelzellisolierung zu werden.

Die Enzymdigestion der Gewebe erfolgte in drei von vier Protokollen mit nur einem Enzym, Kollagenase I oder II, wobei Jin et al. die besondere Eignung von Kollagenase II betonten.

Alle vier Protokolle berücksichtigten die Trypsinsensitivität von CD31 und achteten darauf, dass Trypsin nicht eingesetzt wird, wenn CD31 das Zielantigen darstellt bzw. CD31 nicht angesteuert wird, wenn vorher eine Trypsinisierung erfolgt. Auch diese Maßnahme scheint sich in der Endothelzellisolierung und –charakterisierung zu etablieren.

Eine weitere Gemeinsamkeit von Sobczak, Pang und Jin im Gegensatz zu unserem Protokoll ist, dass die *Dynabeads* zuerst an die Antikörper gekoppelt und erst dann mit den Endothelzellen inkubiert wurden.

Ein interessanter und neuartiger Ansatz der Methode von Pang ist die grobe Vorselektion der Endothelzellen durch das Aussäen des primären Zellgemisches für eine Stunde. Im Gegensatz zu den Endothelzellen adhärten die Fibroblasten in dieser Zeit an das Kulturgefäß und konnten so aus der Primärkultur entfernt werden. Gleichzeitig war während dieser Zeit eine Erholung und Nährstoffversorgung der Endothelzellen möglich.

Diese simple Prozedur könnte auch zur Optimierung unseres Protokolls beitragen.

Es muss jedoch wiederholt darauf hingewiesen werden, dass abgesehen von der Arbeit von Ni et al. die aufgeführten neuen Protokolle primäre murine Endothelzellen aus dem mikrovaskulären Stromgebiet isolieren. Das Ziel unserer Methode war hingegen die Isolierung makrovaskulärer Endothelzellen aus der murinen Aorta.

Dieser Unterschied ist wichtig, denn physiologische wie auch pathophysiologische Prozesse auf makrovaskulärer Ebene können nicht ohne weiteres an mikrovaskulärem Endothel untersucht werden. Zwischen makro- und mikrovaskulärem Endothel gibt es deutliche Unterschiede in Hinblick auf die Proteinexpression und zellulären Funktionen (1). Die wichtigsten funktionellen Unterschiede hat W.C. Aird im Rahmen seiner Ausführungen zur Heterogenität des Endothels am Beispiel der Endothelzellpermeabilität, der Leukodiapedese und der Hämostase erläutert (126, 127). Physiologische basale Austauschvorgänge zwischen Endothel und Gewebe finden hauptsächlich auf Kapillarebene statt. Denn in Kapillaren sind *tight junctions* nur sehr spärlich ausgebildet, wodurch eine erhöhte Endothelzellpermeabilität vorliegt. Im Gegensatz dazu sind im makrovaskulären Gefäßsystem die *tight junctions* ausgeprägt und besonders eng angeordnet, so dass die Endothelzellpermeabilität in Form des parazellulären Transports von Flüssigkeiten und

kleinen gelösten Substanzen in diesem Bereich sehr gering ist. Der transzelluläre Transport von Makromolekülen wird hauptsächlich vermittelt durch Caveolen und vesiculo-vacuolare Organellen (VVO). Die höchste Dichte an Caveolen findet sich im Endothel der Kapillaren. VVO hingegen sind im Endothel venöser Gefäße am deutlichsten nachzuweisen. Die unter inflammatorischen Umständen zunehmende induzierte Permeabilität hingegen hat ihren Schauplatz auf Ebene der postkapillären Venolen. Grund dafür sind rar ausgebildete *tight junctions* sowie die bevorzugte Expression von Rezeptoren für vasoaktive Peptidhormone wie Bradykinin, Histamin H₂ sowie Serotonin.

Die Leukozytendiapedese spielt sich nahezu ausschließlich auf Ebene der postkapillären Venolen ab, da die daran beteiligten endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 sowie VCAM-1 in diesem Bereich stark exprimiert werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Umständen die Leukozytentransmigration auch im Bereich der großen Venen, Kapillaren und Arteriolen erfolgen kann. Die Behandlung der murinen Vena cava inferior mit TNF- α zeigte eine Expression der genannten Adhäsionsmoleküle, die vergleichbar war mit der im Bereich postkapillärer Venolen. Im Bereich der Aorta und der Iliakalgefäße war diese Expression nicht so ausgeprägt, aber auch nachweisbar. Es konnte auch gezeigt werden, dass die mehrschrittige Leukozytendiapedese nicht in allen Bereichen des Gefäßsystems gleich abläuft.

Eine weitere wesentliche Funktion des Endothels, die Beteiligung an der Hämostase, ist ebenfalls in den verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems unterschiedlich ausgeprägt. Die Expression anti- und prokoagulatorischer Moleküle ist je nach Gefäßebene variable. Der endotheliale Protein C Rezeptor wird beispielsweise vorrangig in großen Gefäßen, der antikoagulatorische Serin-Proteasen-Inhibitor TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) im mikrovaskulären Gefäßbett und der ebenfalls antikoagulatorische gewebespezifische Plasminogenaktivator (t-PA, *tissue type plasminogen activator*) in pulmonalen und cerebralen Arterien exprimiert.

Unterschiede zwischen mikro- und makrovaskulärem Endothel können ebenso gut am Beispiel des pulmonalen Endothels demonstriert werden. Mikrovaskuläres pulmonales Endothel exprimiert im Vergleich zum makrovaskulären Endothel mehr VE-Cadherin und weniger endotheliale NO-Synthase (eNOS) (1, 128). Außerdem gibt es Unterschiede bezüglich der Wachstumseigenschaften, mikrovaskuläres Endothel proliferiert schneller als Makrovaskuläres (129).

Diese exemplarisch aufgeführten Unterschiede zwischen dem Endothel verschiedener Gefäßabschnitte zeigen die Heterogenität des Endothels, die zwingend bei der Wahl des Endothels für wissenschaftliche Fragestellungen beachtet werden muss. Sind beispielsweise

Untersuchungen zur eNOS-Expression vorgesehen sollte makrovaskuläres Endothel eingesetzt werden. Die bisherigen Ausführungen deuten daraufhin, dass für Endothelzellen verschiedenen Ursprungs auch verschiedene Isolationsmethoden erforderlich sind.

5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Etablierung einer reproduzierbaren und effektiven Methode zur Isolierung muriner aortaler Endothelzellen nicht zufriedenstellend möglich gewesen ist. Durch das gezielte „Abschaben“ des Endothels von der Aortenwand konnten makrovaskuläre Endothelzellen prinzipiell isoliert werden. Ebenso gelang es die Endothelzellen mit *Dynabeads* aus der Primärkultur zu separieren, so dass initial reine Endothelzellkulturen vorlagen. Allerdings waren das Erzielen einer guten Zellausbeute, der Erhalt der hohen Endothelzellreinheit und die Langzeitkultivierung der Zellen schwierig. Reine Endothelzellkulturen proliferierten schlecht und mehrfach stand man vor dem Problem der Dedifferenzierung der Endothelzellen.

Es werden stetig neue Isolationsmethoden publiziert, wobei jedes Protokoll Modifikationen älterer Protokolle beinhaltet und als Weiterentwicklung dieser zu betrachten ist. Aus der fortwährenden Suche nach der optimalen Technik ist zu folgern, dass die Umsetzung und Resultate der als einfach und effizient deklarierten Protokolle den Anforderungen der Untersucher bisher nicht gerecht wurden. Es gibt nach wie vor kein Standardprotokoll zur Isolierung muriner makrovaskulärer Endothelzellen wie es beispielsweise für HUVECs der Fall ist. Folglich ist das Resultat unserer Arbeit keine Ausnahme, sondern eher die Regel. Die Etablierung einer Isolationsmethode bleibt also weiter eine Herausforderung.

Die neueren Protokolle haben größtenteils mikrovaskuläres Endothel aus Herz- und Lungengewebe zum Ziel und unterscheiden sich untereinander nur gering in einzelnen Arbeitsschritten. Im Groben kann von einer 3-Schritt-Methode mit unterschiedlichen Modifikationen gesprochen werden. In der Mehrheit der Fälle ist der erste Schritt eine mechanische Gewebeminimierung, der Zweite ein enzymatischer Verdau der Gewebe und der Dritte die magnetische Separation der Endothelzellen mit nachfolgendem Beginn der Kultivierung.

Das genannte Modell trifft weitgehend auch auf unsere Methode zu. Der einzige gravierende Unterschied liegt darin, dass wir keine Gewebezerkleinerung durchführten, sondern gezielt versuchten die Endothelschicht zu isolieren, um die Kontamination mit nicht-endothelialen Zellen zu minimieren und die Ausbeute an Endothelzellen zu maximieren. Nach wie vor erscheint dieser Ansatz plausibel, so dass daran festgehalten werden sollte.

Die neueren Arbeiten weisen verschiedene nützliche und erfolgsversprechende Aspekte auf.

Durch die Anwendung und richtige Kombination dieser Ideen erscheint eine Optimierung unseres Protokolls mit Etablierung eines Standards möglich. Dafür ist die Durchführung vieler weiterer Experimente notwendig.

6 Literaturverzeichnis

1. A. R. Pries, W. M. Kuebler, Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 1 (2006).
2. M. Feletou, in *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. (San Rafael (CA), 2011).
3. E. A. Jaffe, Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* **18**, 234 (Mar, 1987).
4. A. R. Pries, T. W. Secomb, P. Gaehtgens, The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* **440**, 653 (Sep, 2000).
5. W. C. Aird, Endothelium as an organ system. *Crit Care Med* **32**, S271 (May, 2004).
6. U. Welsch, Lehrbuch Histologie. 246 (2006).
7. M. Simionescu, A. Gafencu, F. Antohe, Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. *Microsc Res Tech* **57**, 269 (Jun 1, 2002).
8. M. W. Radomski, R. M. Palmer, S. Moncada, Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* **101**, 325 (Oct, 1990).
9. M. W. Radomski, R. M. Palmer, S. Moncada, An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5193 (Jul, 1990).
10. B. K. Luxembourg, Manuela; Lindhoff-Last, Edelgard, Basiswissen Gerinnungslabor. *Dtsch Arztebl International* **104**, 1489 (2007).
11. T. A. Springer, Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* **57**, 827 (1995).
12. G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, T. M. McIntyre, Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* **13**, 93 (Mar, 1992).
13. M. B. Lawrence, T. A. Springer, Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**, 859 (May 31, 1991).
14. W. Risau, I. Flamme, Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 73 (1995).
15. D. Tirziu, M. Simons, Endothelium as master regulator of organ development and growth. *Vascul Pharmacol* **50**, 1 (Jan-Feb, 2009).
16. R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373 (Nov 27, 1980).
17. S. Moncada, M. W. Radomski, R. M. Palmer, Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* **37**, 2495 (Jul 1, 1988).
18. R. M. Palmer, D. D. Rees, D. S. Ashton, S. Moncada, L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* **153**, 1251 (Jun 30, 1988).
19. R. M. Palmer, D. S. Ashton, S. Moncada, Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664 (Jun 16, 1988).
20. P. Milner, P. Bodin, A. Loesch, G. Burnstock, Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem Biophys Res Commun* **170**, 649 (Jul 31, 1990).
21. M. Yanagisawa *et al.*, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411 (Mar 31, 1988).
22. J. Davignon, P. Ganz, Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III27 (Jun 15, 2004).

23. H. Toga, V. Bansal, J. U. Raj, Differential responses of ovine intrapulmonary arteries and veins to acetylcholine. *Respir Physiol* **104**, 197 (Jul, 1996).
24. M. Szentivanyi, Jr. *et al.*, Nitric oxide-dependent opposite effects of somatostatin on arterial and venous caliber in situ. *Am J Physiol* **271**, H2238 (Dec, 1996).
25. C. L. Seidel, J. LaRochelle, Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels. *Circ Res* **60**, 626 (Apr, 1987).
26. G. M. Rubanyi, P. M. Vanhoutte, Heterogeneity of endothelium-dependent responses to acetylcholine in canine femoral arteries and veins. Separation of the role played by endothelial and smooth muscle cells. *Blood Vessels* **25**, 75 (1988).
27. Y. Fukaya, T. Ohhashi, Acetylcholine- and flow-induced production and release of nitric oxide in arterial and venous endothelial cells. *Am J Physiol* **270**, H99 (Jan, 1996).
28. K. Nichols, W. Staines, S. Rubin, A. Krantis, Distribution of nitric oxide synthase activity in arterioles and venules of rat and human intestine. *Am J Physiol* **267**, G270 (Aug, 1994).
29. W. H. Wagner, R. M. Henderson, H. E. Hicks, A. J. Banes, G. Johnson, Jr., Differences in morphology, growth rate, and protein synthesis between cultured arterial and venous endothelial cells. *J Vasc Surg* **8**, 509 (Oct, 1988).
30. M. Liu, M. S. Kluger, A. D'Alessio, G. Garcia-Cardena, J. S. Pober, Regulation of arterial-venous differences in tumor necrosis factor responsiveness of endothelial cells by anatomic context. *Am J Pathol* **172**, 1088 (Apr, 2008).
31. R. S. Cotran, M. A. Gimbrone, Jr., M. P. Bevilacqua, D. L. Mendrick, J. S. Pober, Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med* **164**, 661 (Aug 1, 1986).
32. Y. Iigo *et al.*, Constitutive expression of ICAM-1 in rat microvascular systems analyzed by laser confocal microscopy. *Am J Physiol* **273**, H138 (Jul, 1997).
33. R. A. Swerlick *et al.*, Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* **149**, 698 (Jul 15, 1992).
34. J. Torres-Vazquez, M. Kamei, B. M. Weinstein, Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res* **314**, 43 (Oct, 2003).
35. W. C. Aird, Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* **100**, 174 (Feb 2, 2007).
36. L. Ghitescu, M. Robert, Diversity in unity: the biochemical composition of the endothelial cell surface varies between the vascular beds. *Microsc Res Tech* **57**, 381 (Jun 1, 2002).
37. G. Dai *et al.*, Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14871 (Oct 12, 2004).
38. O. I. Tsukurov *et al.*, The response of adult human saphenous vein endothelial cells to combined pressurized pulsatile flow and cyclic strain, in vitro. *Ann Vasc Surg* **14**, 260 (May, 2000).
39. J. Golledge, R. J. Turner, S. L. Harley, D. R. Springall, J. T. Powell, Circumferential deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. *J Clin Invest* **99**, 2719 (Jun 1, 1997).
40. M. Gosling, J. Golledge, R. J. Turner, J. T. Powell, Arterial flow conditions downregulate thrombomodulin on saphenous vein endothelium. *Circulation* **99**, 1047 (Mar 2, 1999).
41. W. C. Aird, Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* **31**, S221 (Apr, 2003).
42. C. Garlanda, E. Dejana, Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1193 (Jul, 1997).
43. P. N. Belloni, R. J. Tressler, Microvascular endothelial cell heterogeneity: interactions with leukocytes and tumor cells. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 353 (Feb, 1990).

44. H. M. DeLisser, P. J. Newman, S. M. Albelda, Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* **15**, 490 (Oct, 1994).
45. A. Vecchi *et al.*, Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* **63**, 247 (Apr, 1994).
46. J. C. Voyta, D. P. Via, C. E. Butterfield, B. R. Zetter, Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* **99**, 2034 (Dec, 1984).
47. C. J. Jackson, P. K. Garbett, B. Nissen, L. Schrieber, Binding of human endothelium to Ulex europaeus I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *J Cell Sci* **96 (Pt 2)**, 257 (Jun, 1990).
48. M. G. Lampugnani *et al.*, A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* **118**, 1511 (Sep, 1992).
49. T. A. Springer, Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425 (Aug 2, 1990).
50. A. Gougos, M. Letarte, Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**, 1925 (Sep 15, 1988).
51. D. E. Greenwalt *et al.*, Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* **80**, 1105 (Sep 1, 1992).
52. L. Airas, M. Salmi, S. Jalkanen, Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kDa molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium. *J Immunol* **151**, 4228 (Oct 15, 1993).
53. G. S. Kansas, Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**, 3259 (Nov 1, 1996).
54. W. A. Muller, C. M. Ratti, S. L. McDonnell, Z. A. Cohn, A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med* **170**, 399 (Aug 1, 1989).
55. S. M. Albelda, P. D. Oliver, L. H. Romer, C. A. Buck, EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **110**, 1227 (Apr, 1990).
56. J. A. van Mourik, O. C. Leeksa, J. H. Reinders, P. G. de Groot, J. Zandbergen-Spaargaren, Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa. *J Biol Chem* **260**, 11300 (Sep 15, 1985).
57. P. J. Newman, The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* **100**, S25 (Dec 1, 1997).
58. P. J. Newman, The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci* **714**, 165 (Apr 18, 1994).
59. H. M. Delisser, H. S. Baldwin, S. M. Albelda, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1/CD31): A Multifunctional Vascular Cell Adhesion Molecule. *Trends Cardiovasc Med* **7**, 203 (Aug, 1997).
60. J. R. Privratsky, D. K. Newman, P. J. Newman, PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci* **87**, 69 (Jul 17, 2010).
61. P. J. Newman, The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* **99**, 3 (Jan 1, 1997).
62. R. J. Stewart, T. S. Kashour, P. A. Marsden, Vascular endothelial platelet endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF-alpha and IFN-gamma. Evidence for cytokine-induced destabilization of messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells. *J Immunol* **156**, 1221 (Feb 1, 1996).
63. H. Xu *et al.*, Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. *J Immunol* **156**, 4909 (Jun 15, 1996).
64. A. R. de Fougères, S. A. Stacker, R. Schwarting, T. A. Springer, Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* **174**, 253 (Jul 1, 1991).

65. D. E. Staunton, M. L. Dustin, T. A. Springer, Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**, 61 (May 4, 1989).
66. P. Nortamo, R. Salcedo, T. Timonen, M. Patarroyo, C. G. Gahmberg, A monoclonal antibody to the human leukocyte adhesion molecule intercellular adhesion molecule-2. Cellular distribution and molecular characterization of the antigen. *J Immunol* **146**, 2530 (Apr 15, 1991).
67. F. McLaughlin *et al.*, Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-1beta down-regulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 expression on the endothelium. *Cell Adhes Commun* **6**, 381 (1998).
68. T. A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301 (Jan 28, 1994).
69. E. Torsney, R. Charlton, D. Parums, M. Collis, H. M. Arthur, Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res* **51**, 464 (Sep, 2002).
70. F. J. Burrows *et al.*, Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* **1**, 1623 (Dec, 1995).
71. D. W. Miller *et al.*, Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* **81**, 568 (May 17, 1999).
72. R. Schimming, D. Marme, Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* **24**, 151 (Feb, 2002).
73. E. Fonsatti, M. Maio, Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* **2**, 18 (Jun 11, 2004).
74. J. A. Barnard, R. M. Lyons, H. L. Moses, The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* **1032**, 79 (Jun 1, 1990).
75. M. L. Dustin, R. Rothlein, A. K. Bhan, C. A. Dinarello, T. A. Springer, Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**, 245 (Jul 1, 1986).
76. M. L. Dustin, T. A. Springer, Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* **107**, 321 (Jul, 1988).
77. J. S. Pober *et al.*, Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* **137**, 1893 (Sep 15, 1986).
78. M. S. Diamond, D. E. Staunton, S. D. Marlin, T. A. Springer, Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**, 961 (Jun 14, 1991).
79. D. E. Staunton, M. L. Dustin, H. P. Erickson, T. A. Springer, The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* **61**, 243 (Apr 20, 1990).
80. C. Lawson, S. Wolf, ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* **61**, 22 (Jan-Feb, 2009).
81. L. Osborn *et al.*, Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**, 1203 (Dec 22, 1989).
82. P. P. Tak *et al.*, Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* **77**, 236 (Dec, 1995).
83. M. J. Davies *et al.*, The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* **171**, 223 (Nov, 1993).

84. C. Jeanneau, P. Avner, Y. Sultan, Use of monoclonal antibody and colloidal gold in E.M. localization of von Willebrand factor in megakaryocytes and platelets. *Cell Biol Int Rep* **8**, 841 (Oct, 1984).
85. M. B. Zucker, M. J. Broekman, K. L. Kaplan, Factor VIII-related antigen in human blood platelets: localization and release by thrombin and collagen. *J Lab Clin Med* **94**, 675 (Nov, 1979).
86. H. J. Weiss, Sussman, II, L. W. Hoyer, Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* **60**, 390 (Aug, 1977).
87. K. S. Sakariassen, P. F. Nievelein, B. S. Coller, J. J. Sixma, The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Br J Haematol* **63**, 681 (Aug, 1986).
88. D. D. Wagner, Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 217 (1990).
89. N. Isaka, T. Tanigawa, M. Nishikawa, T. Nakano, [High shear stress induced platelet aggregation (h-SIPA) and effects of antiplatelet therapy]. *Nippon Rinsho* **56**, 2624 (Oct, 1998).
90. K. Yamamoto, V. de Waard, C. Fearn, D. J. Loskutoff, Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. *Blood* **92**, 2791 (Oct 15, 1998).
91. Y. A. Senis, M. Richardson, S. Tinlin, D. H. Maurice, A. R. Giles, Changes in the pattern of distribution of von Willebrand factor in rat aortic endothelial cells following thrombin generation in vivo. *Br J Haematol* **93**, 195 (Apr, 1996).
92. R. Magid, D. Martinson, J. Hwang, H. Jo, Z. S. Galis, Optimization of isolation and functional characterization of primary murine aortic endothelial cells. *Endothelium* **10**, 103 (2003).
93. H. Huang, J. McIntosh, D. G. Hoyt, An efficient, nonenzymatic method for isolation and culture of murine aortic endothelial cells and their response to inflammatory stimuli. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **39**, 43 (Jan-Feb, 2003).
94. C. G. Kevil, D. C. Bullard, In vitro culture and characterization of gene targeted mouse endothelium. *Acta Physiol Scand* **173**, 151 (Sep, 2001).
95. F. M. Marelli-Berg, E. Peek, E. A. Lidington, H. J. Stauss, R. I. Lechler, Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J Immunol Methods* **244**, 205 (Oct 20, 2000).
96. Q. G. Dong *et al.*, A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1599 (Aug, 1997).
97. M. Kobayashi, K. Inoue, E. Warabi, T. Minami, T. Kodama, A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **12**, 138 (2005).
98. S. Chen, M. Sega, A. Agarwal, "Lumen digestion" technique for isolation of aortic endothelial cells from heme oxygenase-1 knockout mice. *Biotechniques* **37**, 84 (Jul, 2004).
99. E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, C. R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**, 2745 (Nov, 1973).
100. Y. C. L. a. F. W. Lusinskas, *Isolation and Culture of Murine Heart and Lung Endothelial Cells for In Vitro Model Systems*. S. P. Colgan, Ed., Cell-Cell Interactions (Humana Press, 2006), pp. 111-154.
101. A. A. Neurauter *et al.*, Cell isolation and expansion using Dynabeads. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **106**, 41 (2007).
102. A. Tiwari, G. Punshon, A. Kidane, G. Hamilton, A. M. Seifalian, Magnetic beads (Dynabead) toxicity to endothelial cells at high bead concentration: implication for tissue engineering of vascular prosthesis. *Cell Biol Toxicol* **19**, 265 (Oct, 2003).

103. S. Kumar *et al.*, A chromone analog inhibits TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells via blocking NF-kappaB activation. *Bioorg Med Chem* **15**, 2952 (Apr 15, 2007).
104. M. L. Fehrenbach, G. Cao, J. T. Williams, J. M. Finklestein, H. M. Delisser, Isolation of murine lung endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**, L1096 (Jun, 2009).
105. B. C. Heng, H. Liu, Z. Ge, T. Cao, Mechanical dissociation of human embryonic stem cell colonies by manual scraping after collagenase treatment is much more detrimental to cellular viability than is trypsinization with gentle pipetting. *Biotechnol Appl Biochem* **47**, 33 (May, 2007).
106. R. A. Gould, J. T. Butcher, Isolation of valvular endothelial cells. *J Vis Exp*, (2010).
107. D. Kreisel *et al.*, A simple method for culturing mouse vascular endothelium. *J Immunol Methods* **254**, 31 (Aug 1, 2001).
108. M. Sobczak, J. Dargatz, M. Chrzanowska-Wodnicka, Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice. *J Vis Exp*, (2010).
109. H. Pang, in *bio-protocol*. (2011).
110. C. W. Ni, S. Kumar, C. J. Ankeny, H. Jo, Development of immortalized mouse aortic endothelial cell lines. *Vasc Cell* **6**, 7 (2014).
111. Y. Wu *et al.*, Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix Biol* **24**, 3 (Feb, 2005).
112. K. T. Piercy *et al.*, Effect of harvesting and sorting on beta-1 integrin in canine microvascular cells. *J Surg Res* **100**, 211 (Oct, 2001).
113. R. Grabner, U. Till, R. Heller, Flow cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular cell adhesion molecule-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers. *Cytometry* **40**, 238 (Jul 1, 2000).
114. I. Machida-Sano, Y. Matsuda, H. Namiki, A novel harvesting method for cultured cells using iron-cross-linked alginate films as culture substrates. *Biotechnol Appl Biochem* **55**, 1 (Jan, 2010).
115. S. He, Y. Feng, N. Gu, Y. Zhang, X. Lin, The effect of gamma-Fe₂O₃ nanoparticles on Escherichia coli genome. *Environ Pollut* **159**, 3468 (Dec, 2011).
116. X. Wu, Y. Tan, H. Mao, M. Zhang, Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *Int J Nanomedicine* **5**, 385 (2010).
117. M. T. Zhu *et al.*, Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: Risk factors for early atherosclerosis. *Toxicol Lett* **203**, 162 (Jun 10, 2011).
118. E. Banumathi, R. Haribalaganesh, S. S. Babu, N. S. Kumar, G. Sangiliyandi, High-yielding enzymatic method for isolation and culture of microvascular endothelial cells from bovine retinal blood vessels. *Microvasc Res* **77**, 377 (May, 2009).
119. W. C. Aird *et al.*, Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J Cell Biol* **138**, 1117 (Sep 8, 1997).
120. J. C. Fanburg-Smith, M. A. Furlong, E. L. Childers, Oral and salivary gland angiosarcoma: a clinicopathologic study of 29 cases. *Mod Pathol* **16**, 263 (Mar, 2003).
121. M. Ito, M. Watanabe, T. Ihara, H. Kamiya, M. Sakurai, Increased expression of adhesion molecules (CD54, CD29 and CD44) on fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Microbiol Immunol* **39**, 129 (1995).
122. D. A. Lacorre *et al.*, Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood* **103**, 4164 (Jun 1, 2004).
123. J. D. Erusalimsky, Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol* **106**, 326 (Jan, 2009).
124. J. D. Erusalimsky, D. J. Kurz, Endothelial cell senescence. *Handb Exp Pharmacol*, 213 (2006).

125. Y. Jin, Y. Liu, M. Antonyak, X. Peng, Isolation and characterization of vascular endothelial cells from murine heart and lung. *Methods Mol Biol* **843**, 147 (2012).
126. W. C. Aird, Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* **100**, 158 (Feb 2, 2007).
127. W. C. Aird, Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006429 (Jan, 2012).
128. T. Stevens *et al.*, NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1422 (Nov, 2001).
129. T. Stevens, Bronchial endothelial cell phenotypes and the form: function relationship. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L518 (Sep, 2002).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schrader für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die exzellente Betreuung und Begutachtung während der Erstellung der Arbeit.

Weiterhin danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Stefanie Gödecke für die freundliche und kompetente Anleitung und Betreuung der Experimente, sowie für die unendliche Mühe und Geduld bei der Verfassung der Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke möchte ich für seine wertvollen Hinweise und konstruktiven Vorschläge ebenfalls herzlich danken.

Frau Dr. Barbara Emde gilt mein Dank für die unermüdliche Hilfestellung bei labortechnischen Fragestellungen und der Versuchsdurchführung.

Meinen Freunden, insbesondere Özlem und Alev, danke ich für die unendliche Motivation und geduldige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Sermin Idikut, der ich so viel zu verdanken habe.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

22.07.2016, Meral Saraldi
