

Untersuchungen zur Differenzierung von hepatischen
Sternzellen (HSC) in einen glatten Muskelzell-ähnlichen Phänotyp
und deren funktionelle Charakterisierung in einem sphäroidalen
Kokulturmodell aus Perizyten und Endothelzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Werner Wirz

aus Ohlenhard

Februar 2007

Aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Kiefer

Koreferent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2007

Abkürzungen	VI
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau der Lebersinusoide	1
1.2 Die Differenzierung der hepatischen Sternzellen	3
1.3 Vaskuläre Angiogenese	5
1.4 Angiogenese in der Leber	8
1.5 Das Sphäroidmodell	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien, Medien, Reagenzien und Kits	14
2.2 Geräte	16
2.3 Plastikwaren und Einwegartikel	17
2.4 Antikörper	17
2.5 Oligonukleotidprimer	18
2.6 Biologisches Material	19
2.7 Analytische und molekularbiologische Methoden	20
2.7.1 Nukleinsäurebestimmung	20
2.7.2 Restriktionsverdau von DNA	20
2.7.3 Proteinbestimmung	20
2.7.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	21
2.7.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	21
2.7.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen	22
2.7.7 Reverse Transkription	22
2.7.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	23
2.7.9 Sequenzierung	23
2.8 Allgemeine Proteinmethoden	24
2.8.1 Zellextraktion für Western Blots	24

2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.8.3 Western Blot und Immundetektion	25
2.9 Allgemeine Zellkulturmethoden	26
2.9.1 Auftauen von Zellen	26
2.9.2 Kultivierung von Säugerzellen	26
2.9.3 Lösen und Passagieren von Zellen	26
2.9.4 Bestimmung der Zelldichte von Säugerzellen	27
2.9.5 Kryokonservierung von Zellen	27
2.9.6 Kollagenbeschichtung von Kulturunterlagen	27
2.9.7 Bestimmung der vitalen Zellen	28
2.10 Zellpräparationen	28
2.10.1 Präparation und Isolation von hepatischen Sternzellen aus Rattenleber	28
2.10.2 Präparation und Isolation von sinusoidalen Endothelzellen aus Rattenleber	30
2.11 Spezielle zellbiologische Methoden	32
2.11.1 <i>In-vitro</i> -Aktivierung von hepatischen Sternzellen	32
2.11.2 Zellmembranfärbung mit PKH 26 und PKH 67	32
2.11.3 Proliferationsassay mit Bromdesoxyuridin	32
2.11.4 DAB-Färbung	33
2.11.5 Wounding Assay	33
2.11.6 LDL-Labeling	34
2.11.7 Latex Phagozytose	34
2.11.8 Immunofluoreszenzfärbung von Monolayern	34
2.11.9 Methanol / Acetonfixierung	34
2.12 Methoden für Versuche mit Sphäroiden	35
2.12.1 Herstellung von Methocelllösung	35
2.12.2 Bildung von Solsphäroiden	35
2.12.3 Bildung von Kokultursphäroiden	35

2.12.4 Kollagengewinnung aus Rattenschwanzsehnen	36
2.12.5 Angiogeneseassay mit Sphäroiden	36
2.12.6 Immunfärbung von Sphäroiden	37
2.12.7 Whole-Mount-Staining von Kollagengelen	37
2.12.8 Elektronenmikroskopie	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Das vaskuläre Sphäroidmodell: Differenzielle Expression und Einfluss auf angiogenetische Prozesse	39
3.1.1 Bildung von Solosphäroiden aus vaskulären Endothelzellen	39
3.1.2 Bildung von Kokultursphäroiden aus vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen	41
3.1.3 Sprossung von Endothelzellen aus Sphäroiden	42
3.1.4 Differenzierte räumliche Expression in Sphäroiden	44
3.1.5 Die Bildung von Kapillarsprossen wird durch gleichzeitige Reizung von migrativen und proliferativen Einflüssen veranlasst	47
3.2 Untersuchungen an kultivierten hepatischen Sternzellen	51
3.2.1 Kokultivierung von Monolayern aus glatten Muskelzellen und hepatischen Sternzellen	51
3.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung von glatten Muskelzell-Markern in aktivierten hepatischen Sternzellen	53
3.2.3 Nachweis der mRNA von glatten Muskelzell-Markern in aktivierten Sternzellen und Myofibroblasten-ähnlichen Zellen (sMFB)	54
3.2.4 Expression von typischen Markerproteinen glatter Muskelzellen in aktivierten hepatischen Sternzellen	56
3.2.5 Vergleich des Expressionsmusters von vaskulären glatten Muskelzellen, hepatischen Sternzellen und portalen Myofibroblasten	57
3.2.6 Aktivierte hepatische Sternzellen der Ratte exprimieren Angiopoietin-1 und -2	58
3.3 Bildung und Charakterisierung eines Kokultursphäroids aus vaskulären Endothelzellen und hepatischen Sternzellen	59

3.3.1 Die Organisation der Endothelzellen im Kokultursphäroid ist abhängig von der Differenzierung der Sternzellen	61
3.3.2 Hepatische Sternzellen bilden feste Zellkontakte zum äußeren Endothelzellring	61
3.3.3 Vaskuläre Endothelzellen beeinflussen die Differenzierung benachbarter hepatischer Sternzellen	62
3.3.4 Hepatischen Sternzellen wirken stabilisierend auf vaskuläre Endothelzellen im Kokultursphäroid	64
3.4 Bildung sphäroidaler Strukturen unter Mitwirkung sinusoidaler Endothelzellen	65
3.4.1 Sinusoidale Endothelzellen formieren sich zu kleineren Sphäroiden, die zusammen mit vaskulären Endothelzellen in einem uneinheitlichen Sphäroid integrieren	67
3.4.2 Die Expression von vaskulären Markern in sinusoidalen Endothelzellen wird durch eine Kokultivierung mit glatten Muskelzellen nicht induziert	68
3.4.3 Hepatische Sternzellen induzieren im <i>In-vitro</i> -Modell keine Expression von vaskulären Antigenen durch sinusoidale Endothelzellen	70
3.4.4 Sinusoidale Endothelzellen in Sphäroiden bilden Kapillarsprosse abhängig von zugesetzten Faktoren	72
3.5 Untersuchung der <i>in vitro</i> erzeugten Kapillarsprosse an Kokultursphäroiden mit hepatischen Sternzellen und Endothelzellen	75
3.5.1 Die Sprosse der sinusoidalen Endothelzellen weisen kapillarähnliche, tubuläre Strukturen auf	75
3.5.2 Sinusoidale Endothelzellen exprimieren VE-Cadherin beim Sprossen aus Kokultursphäroiden mit aktivierten Sternzellen	77
3.5.3 Aktivierte hepatische Sternzellen migrieren zusammen mit sinusoidalen Endothelzellen in den Sprossen der Kokultursphäroide	77
4. Diskussion	79
4.1 Das Sphäroidmodell mit vaskulären Zellen	79
4.2 Gemeinsamkeiten von glatten Muskelzellen und differenzierten Sternzellen	83
4.3 Differenzierung von hepatischen Sternzellen im Kokultursphäroid mit vaskulären Endothelzellen	86

4.4 Differenzierung von hepatischen Sternzellen und sinusoidalen Endothelzellen im gemeinsamen Kokultursphäroid	89
4.5 Untersuchung der an Sphäroiden gebildeten Kapillarstrukturen	92
4.6 Ausblick	93
5. Zusammenfassung	95
6. Summary	97
7. Literaturverzeichnis	99
Danksagung	112
Veröffentlichungen	113

Abkürzungen

α -...	anti-...
α SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
°C	Grad Celsius
μ M	mikromolar, μ mol/l
Abb.	Abbildung
ACL P	<i>aortic carboxypeptidase-like protein</i>
Ang	Angiopoietin
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Cy3	Indocarbocyanin
d	Tag(e)
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle(n)
ECGM	Endothelzellmedium
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPO	Erythropoetin
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
Fa.	Firma
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor(en)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung

GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde(n)
d _(d) H ₂ O	<i>Aqua (bi)destillata</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HC	Hepatozyt(en)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HSC	hepatische Sternzelle(n)
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HUASMC	humane glatte Muskelzellen der Nabelschnurarterie
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
IL	Interleukin
KC	Kupfferzelle(n)
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LSEC	sinusoidale Endothelzelle(n) der Leber
M	molar, Mol/l
mA	Milliampere
MFB	Myofibroblast(en)
min	Minute(n)
mM	millimolar, mmol/l
mRNA	Messenger-RNA
mV	Millivolt
N-CAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
nm	Nanometer
nM	nanomolar, nmol/l
NRP	Neuropilin
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PMA	Phorbol 12 – myristat 13 - Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

RpS6	<i>ribosomal protein S6</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion
sMFB	durch <i>In-vitro</i> -Kultivierung von Sternzellen erzeugte Myo-fibroblasten-ähnliche Zellen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM-MHC	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
SMC	glatte (Gefäß-) Muskelzellen
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrose-Faktor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen/Volumen
VE-Cadherin	vasculär-endotheliales Cadherin
VEGF	vasculär-endothelialer Wachstumsfaktor
VWF	Von Willebrand-Faktor
w/v	Gewicht/Volumen

1. Einleitung

In reifen vaskulären Blutgefäßen kleidet eine kontinuierliche Endothelzellschicht das Lumen aus. Sie wird außen von glatten Muskelzellen (SMC) umschlossen und bildet mit diesen eine funktionelle Einheit. Im Gegensatz dazu kommen in den Sinusoiden der Leber, die durch ein diskontinuierliches Endothel gebildet werden, keine SMC vor. Als organspezifische Perizyten treten hepatische Sternzellen (HSC) auf, die im Disse'schen Raum lokalisiert sind und eine Hauptfunktion in der Retinolspeicherung ausüben. Sie umschließen im ruhenden Zustand die sinusoidalen Endothelzellen (LSEC) weitmaschig mit langen zytoplasmatischen Ausläufern. In pathologischen Situationen – wie chronischer Wundheilung mit Fibrosierung oder Metastasierung von Tumoren in die Leber - werden HSC aktiviert und proliferieren. Dabei verlieren sie ihre langen Ausläufer, Lipidtröpfchen und weitere charakteristische Merkmale. Die für diese Arbeit zugrunde gelegte Hypothese war, dass HSC dann morphologisch und funktionell den Phänotyp von glatten Muskelzellen annehmen und sich an der Bildung von vaskulären Gefäßen beteiligen. Bisherige Erkenntnisse stützten sich vorwiegend auf die Untersuchung an histologischen Schnittpräparaten oder auf Einzelzellkulturen, während Methoden zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen in diesem Forschungsgebiet nur unzulänglich eingesetzt werden konnten. Daher wurde ein neuartiges dreidimensionales Sphäroid-Kokulturmodell von glatten Muskelzellen und Endothelzellen etabliert. Eine Adaption auf Leberzellen sollte die Möglichkeit eröffnen, die vermeintliche *In-vivo*-Situation der vaskulären sinusoidalen Angiogenese in der Plastikschaale näherungsweise nachzugestalten und weitere Erkenntnisse über den funktionellen Beitrag differenzierter HSC hierbei zu erlangen.

1.1 Aufbau der Lebersinusoide

Die Leber ist in ihrer mikroskopischen Struktur aus 2-3 mm großen hexagonalen Leberplättchen (Lobuli hepatici) aufgebaut, an deren Eckpunkten, den Periportalfeldern, jeweils ein feiner Ast der Pfortader, ein Ast der Leberarterie und ein kleiner Gallengang als so genannte Glisson-Trias liegen. Von dort aus werden die Leberläppchen durch die Lebersinusoide mit einem Gemisch aus etwa 25% arteriellem und 75 % venösem Blut sternförmig in Richtung zu deren Zentrum, dem Perizentralfeld, durchflossen. Hier finden die Sinusoide Anschluss an eine Zentralvene, über die das Blut aus dem Leberläppchen abfließt. Die Sinusoide stellen somit die Austauschstrecke des Blutes mit den Leberzellen dar (Beck, 1998).

In einem Durchmesser von weniger als 7 μm werden sie von einer Schicht leberspezifischer Endothelzellen ausgekleidet, den sinusoidalen Endothelzellen (LSEC), die sich morphologisch und funktionell von vaskulären und kapillären Endothelzellen anderer Organe unterscheiden: Sie weisen eine Fenestrierung in Form von Siebplatten auf, exprimieren keine typischen Marker vaskulärer Zellen wie Von Willebrand-Faktor (VWF), CD 31 (PECAM-1), CD 34, vaskulär-endotheliales (VE-) Cadherin oder E-Selektin, bilden keine typische Basalmembran sondern nur eine dünne Extrazellulärmatrix, die hauptsächlich aus Fibronektin besteht (Xu *et al.*, 2003).

Durch die Poren der Siebplatten gelangt das Blutplasma in den Disse'schen Raum, der zwischen den LSEC und den Hepatozyten liegt. Die Ausbildung von Mikrovilli in diesen nur locker mit Matrix gefüllten Spalt ermöglicht den Hepatozyten durch die erweiterte Oberfläche einen effizienteren Austausch mit dem Blutplasma. Im Disse'schen Raum sind auch die hepatischen Sternzellen lokalisiert.

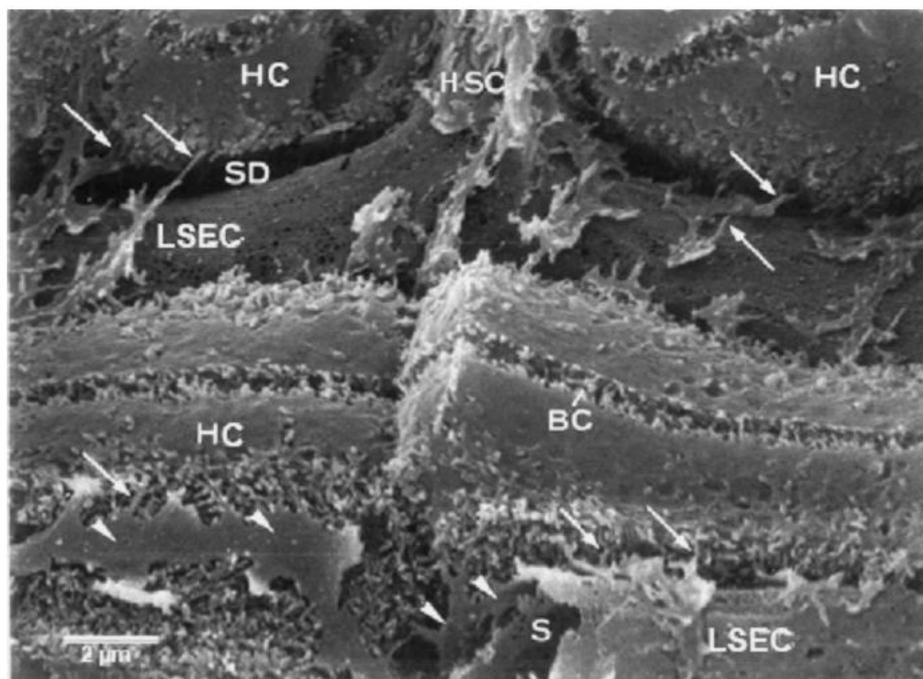


Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Lebersinusoiden und umgebenden Zellen. Fenestrierte Endothelzellen (LSEC) umschließen das Sinusoid (S). Zwischen Endothelzellen und Hepatozyten (HC) liegt der Disse'sche Raum (SD), in dem die Sternzellen (HSC) lokalisiert sind. Ihre zytoplasmatischen Ausläufer liegen eng an den Endothelzellen an (Spitzen: Zelloberfläche der subendothelialen Ausläufer). Einige Fortsätze durchziehen den Disse'schen Raum und stellen Kontakte mit anderen Zellen her (Pfeile). BC: Gallenkanal. (Aus: Wake, 1999)

1.2 Die Differenzierung der hepatischen Sternzellen

Die Morphologie der hinter den sinusoidalen Kapillaren gelegenen hepatischen Stern- oder Itozellen, die zirka 15 % der Zellen einer gesunden humanen Leber ausmachen, wurde 1876 erstmals durch von Kupffer beschrieben. Der Name Sternzellen geht auf die langen zytoplasmatischen Ausläufer zurück, durch die Kontakte mit Hepatozyten, Endothelzellen, Nervenenden und anderen hepatischen Sternzellen hergestellt werden (Li und Friedman, 2001; Geerts, 2001). Die weiteren geläufigen Bezeichnungen als Vitamin-A-Speicherzellen, Lipozyten und Fettspeicherzellen deuten auf die mikroskopischen Beobachtungen hin, bei denen eine große Zahl an Fetttropfchen zu erkennen ist, welche durch ihren Gehalt an Vitamin A Autofluoreszenz aufweisen (Ito und Nemoto, 1952; Wake, 1971). Für die Aufnahme, Speicherung und Freisetzung von Vitamin A und Retinoiden nehmen die HSC eine Schlüsselrolle ein. So werden bei Ratten etwa 80 - 90 % des gesamten Vitamin A in der Leber gelagert, davon drei Viertel in HSC (Hendriks *et al.*, 1985; Sato *et al.*, 2003; Blomhoff und Wake, 1991). Weitere Funktionen der ruhenden HSC sind in der Sekretion verschiedener Mediatoren und der Bildung einer Extrazellulärmatrix (ECM) zur Homöostase von anliegenden Leberzellen zu suchen.

Für HSC, Hepatozyten und LSEC ist bekannt, dass sie zur Beibehaltung ihres ruhenden, *in vivo* ausgeprägten Phänotyps eine spezifische Zusammensetzung und Bindung an enthaltene Integrine der ECM benötigen (Bissell und Choun, 1988; Imai und Senoo, 1998). Die Sekretion umfasst eine Vielzahl parakrin, juxtakrin, autokrin oder chemotaktisch wirkender Faktoren wie beispielsweise HGF, VEGF, TGF- α , EGF, FGF-2, TGF- β , Neurotrophine und EPO. Konträr diskutiert werden vasomotorische Eigenschaften, durch welche die HSC einen Einfluss bei der sinusoidalen Blutflussregulation ausüben könnten (Geerts, 2001).

Eine wesentliche Rolle, deren Entdeckung seit den 80er Jahren ein gesteigertes Interesse an ihnen hervorgerufen hat, spielen aktivierte HSC bei der Entstehung einer Leberfibrose. Die Fibrose wird als das Ergebnis einer Wundheilung nach einer chronischen Schädigung der Leber betrachtet (Friedman, 2003). Als Hauptauslöser gelten dabei weltweit virale Hepatitisinfektionen und in den westlichen Ländern vor allem chronischer Alkoholkonsum. Daneben zählen Wurminfektionen, hohe Eisen- oder Kupferbelastung, Autoimmunreaktionen und Gallenwegverschluss zu den möglichen Ursachen einer Fibrose (Gabele *et al.*, 2003).

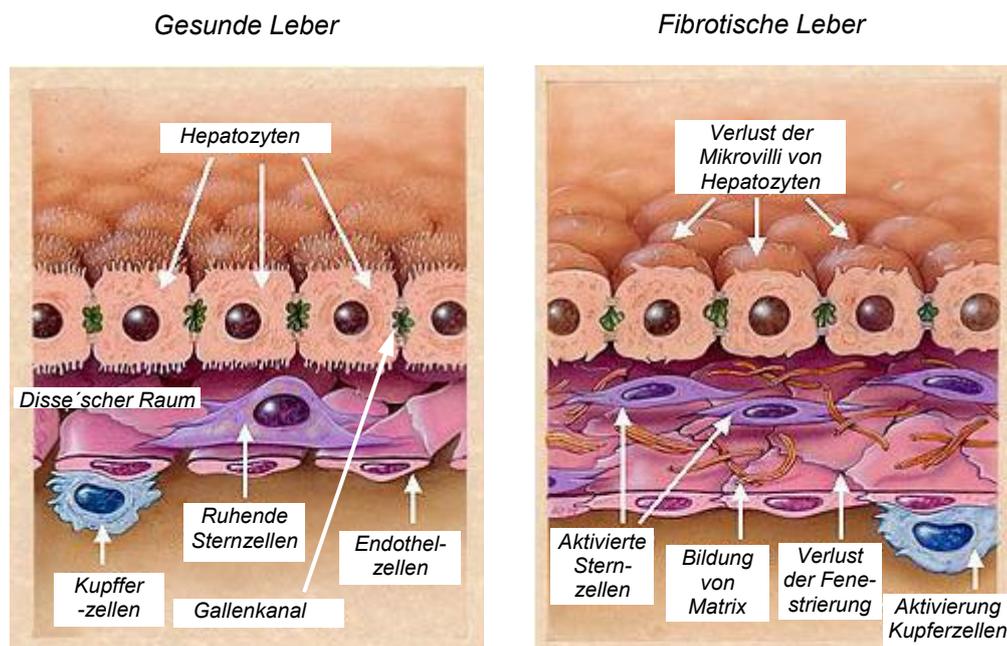


Abb. 1.2: Veränderungen an den Sinusoiden und im Disse'schen Raum während der hepatischen Fibrose. (Nach: Friedman, 2000)

Nach einer akuten Schädigung regenerieren die parenchymalen Zellen und ersetzen die nekrotischen oder apoptotischen Zellen, wobei es zu einer Entzündungsreaktion und einer begrenzten Ablagerung von ECM kommt. Dauert die Schädigung jedoch an, so kann die Leberregeneration versagen und die Hepatozyten werden durch reichlich abgelagerter ECM, inklusive fibrillärem Kollagen, ersetzt (Bataller und Brenner, 2005). Als Hauptproduzent hierfür wurden die hepatischen Sternzellen identifiziert (Friedman *et al.*, 1985). Bei chronischer Schädigung werden sie aktiviert und differenzieren zu einem proliferativen und fibrogenen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, der sich durch den Erwerb kontraktiler, proinflammatorischer und fibrogenetischer Eigenschaften auszeichnet, wobei die ehemals charakteristischen Lipidtröpfchen abgebaut werden und die langen zytoplasmatischen Ausläufer verschwinden. Die vormals ausschließlich im Disse'schen Raum gelegenen HSC können dann migrieren und an den Stellen der Gewebsreparatur akkumulieren, wobei sie große Mengen an Extrazellulärmatrix sekretieren und deren Degradation regulieren (Bataller und Brenner, 2005; Sato *et al.*, 2003). Dabei wirkt TGF- β auf HSC, indem er die Transition zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen fördert, die Synthese von ECM-Proteinen stimuliert und gleichzeitig deren Degradation inhibiert und gilt deswegen als wesentlicher profibrotischer Faktor (Gressner *et al.*, 2002). Einen aktivierten Phänotyp entwickeln HSC nach der Isolation auch in Primärkulturen, wenn sie über einen längeren Zeitraum auf gewöhnlichen Polystyren-Plastikschalen gezogen wer-

den, weshalb sich diese Methode als ein einfaches, weitgehend akzeptiertes Modell für aktivierte HSC etabliert hat. Durch die Ausbildung eines kontraktile Apparates wird hierbei die Expression von α SMA, das häufig zur Unterscheidung zu nicht aktivierten HSC benutzt wird, sowie weiterer Proteine induziert, die auch für Myofibroblasten und SMC typisch sind (Rockey *et al.*, 1992). Wie diese exprimieren aktivierte und nicht aktivierte HSC aber auch Intermediärfilamente (u.a. Vimentin, Desmin, GFAP) und Marker neuraler Zelltypen (u.a. N-CAM, verschiedene Neutrophine und Neutrophinrezeptoren). Deren Vorkommen weist auf einen Ursprung der Zelltypen aus der Neuralleiste hin, der für HSC aber nicht gesichert ist (Burt *et al.*, 1986; Neubauer *et al.*, 1996; Knittel *et al.*, 1996; Niki *et al.*, 1999; Cassiman *et al.*, 2001).

1.3 Vaskuläre Angiogenese

Die Bildung von neuen Blutgefäßen kann auf zwei prinzipiell unterschiedliche Arten erfolgen. Bei der Vaskularogenese, die vor allem im Embryo stattfindet, bildet sich ein primäres vaskuläres Netzwerk aus angioblastischen Zellen. Davon wird die in Adulten vorkommende Angiogenese abgegrenzt, wobei neue Blutgefäße durch ein Aussprossen aus bereits bestehenden Gefäßen entstehen (Augustin, 2001). Hierzu müssen die Endothelzellen der existierenden Gefäße die anliegende Basalmembran degradieren, ins Stroma des Nachbargewebes eindringen, proliferieren und neue Kapillarstrukturen ausbilden. Bei diesem komplexen Prozess ist ein Zusammenspiel von Zellen, löslichen Faktoren und Komponenten der Extrazellulärmatrix erforderlich (Liekens *et al.* 2001). Der Auslöser der normalen und der pathologischen angiogenetischen Aktivität im Adulten ist ein Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen. Besonders Hypoxie wirkt dabei direkt oder indirekt auf eine Reihe von proangiogenetischen Faktoren ein. (Pugh und Ratcliffe, 2003). Diese Angiogenese auslösenden Faktoren können entweder spezifisch auf Endothelzellen zielen, zusammen mit Endothelzellen noch weitere Zelltypen aktivieren oder nur indirekt auf Endothelzellen wirken. Zu letzteren gehören TNF- α (Tumornekrose-Faktor- α) und TGF- β (*transforming growth factor- β*). Ihr indirekter und damit vom zellulären Umfeld abhängiger Einfluss kommt durch gegensätzliche experimentelle Ergebnisse zum Ausdruck. *In vitro* zeigten TNF- α und TGF- β eine Inhibition der Endothelzellproliferation. *In vivo* hingegen induziert TGF- β Angiogenese und stimuliert die Expression von TNF- α , FGF-2, PDGF (*platelet-derived growth factor*) und VEGF durch chemotaktisch an-

gelockte inflammatorische Zellen. TNF- α erhöht *in vivo* die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren, IL-8 (Interleukin-8) und FGF-2 durch Endothelzellen (Liekens *et al.* 2001).

Spezifisch auf Endothelzellen wirken der vaskulär-endotheliale Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und Angiopoietine, die zu den wichtigsten angiogenen Substanzen gehören. An einem frühen Punkt der hierarchischen Ordnung der morphogenen Ereignisse wirkt VEGF, dessen Transkription über den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF-1) direkt durch den Sauerstoffgehalt des Gewebes beeinflusst wird und als Hauptschaltpunkt in der angiogenen Kaskade gilt. (Forsythe *et al.*, 1996 ; Augustin, 2001). Neben dem VEGF (=VEGF-A) gibt es weitere Mitglieder in der Familie vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktoren, die alle in verschiedenen Isoformen vorliegen, entweder hervorgegangen aus alternativem Spleißen (VEGF, PlGF [*placental growth factor*], VEGF-B) oder proteolytischer Prozessierung (VEGF-C, VEGF-D), wobei die jeweils größeren Isoformen an Heparin und Heparansulfatproteoglykane (HSPG) binden (Olofson *et al.*, 1996; Joukov *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 2003; Stacker *et al.*, 1999). Als spezifische Rezeptoren sind VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4) bekannt, die als Homodimere oder als VEGFR-1/VEGFR-2-Heterodimer auftreten können. Daneben werden als Korezeptoren auch Neuropiline, Nrp-1 und Nrp-2, gebunden. (Huang *et al.*, 2001; Klagsbrun *et al.*, 2002).

Die Wirkung von VEGF auf Endothelzellen ist vielfältig: Der Wachstumsfaktor ist an praktisch allen wesentlichen Schritten der Angiogenese beteiligt und induziert Proliferation, Sprossung, Migration und Gefäßbildung, ist Überlebensfaktor für Endothelzellen und induziert antiapoptotische Proteine. VEGF erhöht auch die Permeabilität des Endotheliums und verursacht Vasodilatation, indem es die endotheliale Stickoxid-Synthase (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) erhöht. (Tammela *et al.*, 2005). Die besondere Rolle des VEGF wird auch dadurch deutlich, dass die Funktion beider Allele für die Entwicklung überlebenswichtig ist. Expressionsschwankungen durch den Verlust eines Allels können nicht kompensiert werden und heterozygot mutante transgene Mäuse sterben zwischen dem elften bis zwölften Tag der Embryonalentwicklung (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Klinisch relevante Bedeutung gewinnt zunehmend ein antiangiogenetischer Ansatz durch VEGF-Inhibition in der Krebstherapie. Im Menschen wird VEGF in fast allen untersuchten soliden Tumoren exprimiert. Dabei sind signifikante Zusammenhänge zwischen dem Level der VEGF-Expression, des Krankheitsfortschritts und der Überlebensrate gefunden worden. Medikamentöse Behandlung mit einem anti-VEGF-Antikörper (Bevacizumab) zeigt hier vielversprechende Ansätze (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Ferrara 2002).

Eine zweite wichtige Familie von Wachstumsfaktoren, die spezifisch auf Endothelzellen wirken, ist die der Angiopoietine. Sie gelten als hauptverantwortlich für die Gefäßstabilität und greifen im Ablauf der Gefäßneubildung nach dem VEGF durch eine antagonistische Wirkungsweise ein (Maisonpierre *et al.*, 1997). Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2) binden beide als Liganden den Tyrosin-Kinase-Rezeptor Tie-2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2*) auf Endothelzellen, wobei jedoch nur die Bindung des vorwiegend in Perizyten und glatten Muskelzellen gebildeten Angiopoietin-1 zur Signaltransduktion führt. Ein Tie-2 Signal soll für die Gefäßstabilität wichtig sein, indem die Endothelzellen in ruhendem Zustand gehalten werden. Angiopoietin-2 verhindert diese Wirkung des Angiopoietin-1 dadurch, dass es selbst an den Tie-2 Rezeptor bindet, ohne hierbei jedoch ein Signal auszulösen. Diese Suppression des Rezeptors scheint unabdingbar zu sein für eine effektive proliferatorische und migratorische Wirkung des VEGF, welches umgekehrt auch auf den Rezeptorkomplex einwirkt. (Tsiamis *et al.*, 2002; Scharpfenecker *et al.*, 2005).

Viele Zytokine, Chemokine und angiogenetische Enzyme wirken direkt auf Endothelzellen, haben daneben aber ein breites Wirkungsspektrum anderer Zielzellen. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF oder FGF-2). Er gehört zu einer Polypeptidfamilie mit bisher 23 bekannten Mitgliedern, die in Adulten als hämostatische Faktoren in Gewebsreparatur und Antwort auf Verletzung involviert sind. Während der Entwicklung üben FGF Funktionen in der Regulation von Zellproliferation, Migration und Differenzierung aus. Ihre Übereinstimmung in der Aminosäurestruktur beträgt 13 – 71 %, wobei allen eine für die Affinität zum Rezeptor notwendige Bindungsstelle für Heparansulfat gemeinsam ist. (Ornitz und Itoh 2001; Shimada *et al.* 2001). Als spezifische Rezeptoren sind der CFR (*cystein-rich FGR receptor*) und bislang 4 Tyrosinkinaserzeptoren (FGFR-1 bis FGFR-4) bekannt, deren Ligandenspezifität durch alternative Spleißformen verändert werden kann (Burrus *et al.*, 1992; Powers *et al.*, 2000). Die größte Wirkung auf kultivierte Endothelzellen wurde bisher mit FGF-2 nachgewiesen, der Proliferation und Chemotaxis induziert, Integrinexpression moduliert und u. a. VEGF hochreguliert. (Liekens *et al.*, 2001)

Bei der vaskulären Angiogenese werden durch das Aussprossen zuerst Kapillaren gebildet, die allein aus Endothelzellen bestehen. Diese primitiven Gefäße sind instabil, undicht und werden leicht zurückgebildet, wenn sie nicht von stabilisierenden Zellen umschlossen werden. Periendotheliale Zellen, SMC und Perizyten, werden durch die Freisetzung von PDGF rekrutiert und bilden mit den Endothelzellen ein reifes Blutgefäß. Durch den Kontakt mit den pe-

riendothelialen Zellen beenden die kapillarbildenden Endothelzellen Proliferation und Migration und gehen in den ruhenden Zustand über (Lindahl *et al.*, 1997; Hellström *et al.*, 2001; Carmeliet und Conway, 2001). SMC und Perizyten scheinen überall für die Ausbildung eines stabilen vaskulären Gefäßes unabdingbar zu sein. In Geweben, wo sie nicht vorkommen, wie in den Sinusoiden der Leber, muss ihre Funktion beim Auftreten von vaskulären Gefäßbildungen daher von anderen Zelltypen erfüllt werden.

1.4 Angiogenese in der Leber

In der Regel tritt Angiogenese im Adulten nur bei der Zunahme an Gewebsmasse und einer Reduktion des Sauerstoffgehalts auf, was beides hauptsächlich bei pathologischen Prozessen in vielen Organen der Fall ist (Sivakumar *et al.*, 2004). In der Leber findet auch eine physiologische Angiogenese während Regenerationsvorgängen statt und führt zur Bildung neuer funktionaler Sinusoide, während pathologische Angiogenese vor allem bei einer Fibrosierung und beim Tumorwachstum zu beobachten ist. Unterschiede zur nicht hepatischen Angiogenese ergeben sich aus

- der Produktion von leberspezifischen proangiogenetischen Faktoren,
- der Existenz von zwei Typen mikrovaskulärer Strukturen - einerseits den großen Gefäßen wie Portal-, Zentralvene und hepatische Arteriolen, die mit kontinuierlichen Endothelzellen ausgekleidet sind und andererseits den Sinusoiden mit den diskontinuierlichen, fenestrierten LSEC und
- der Annahme, dass sich hepatische Sternzellen mit von denen mikropapillärer Perizyten abweichenden Mechanismen an der Angiogenese beteiligen (Medina *et al.*, 2004).

Die physiologische Angiogenese kann am Tiermodell nach einer partiellen Hepatektomie (PH) nachvollzogen werden. Hier kommt es nach 24 h zuerst zur Proliferation der Hepatozyten im Periportalbereich, die zu einer Bildung von avaskulären Inseln aus anfangs 10 – 14 Parenchymzellen führt. Verzögert beginnt, ebenfalls vom Periportalbereich ausgehend, die Wiederherstellung sinusoidaler Strukturen. Die Proliferation der LSEC mit einer maximalen DNA-Synthese 48 – 72 Stunden nach PH erfolgt leicht verzögert dem Proliferationsgipfel der HSC (nach 48h) und wird durch Hypoxie-induzierte Faktoren des avaskulären Hepatozytenhaufens, u. a. VEGF, parakrin stimuliert. Nach der Proliferation migrieren LSEC und HSC gemeinsam in die parenchymatischen Inseln, bilden dort Gefäßverzweigungen und bauen die

typischen sinusoidalen Anordnungen auf. (Martinez-Hernandez und Amenta, 1995; Taniguchi *et al.*, 2001; Wack *et al.*, 2001).

Bei der pathologischen hepatischen Angiogenese treten wesentliche Unterschiede zu diesem Prozess auf. Durch eine chronische Schädigung wird ein Prozess eingeleitet, bei dem der vorher permeable Disse'sche Raum durch Ablagerungen großer Mengen Kollagene, Proteoglykane und anderem ECM-Material zu einem dichten fibrösen Interstitium umgewandelt wird. Dabei kommt es zu tiefgreifenden Veränderungen an HSC und LSEC. Die Sternzellen differenzieren zum myofibroblastischen Phänotyp ohne Ausläufer und Lipidtröpfchen, während die sinusoidalen Endothelzellen durch den Verlust ihrer typischen Fenestrierung die Kapillare mit einer kontinuierlichen Schicht auskleiden und eine Basalmembran ausbilden (Fukuda *et al.*, 1986; Babbs *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 2003; Bataller und Brenner, 2005). Im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf zur Zirrhose findet eine Umwandlung der normalen Leberarchitektur statt, bei der die entstandenen fibrösen Narben regenerative Knoten von Hepatozyten einschließen. Eine normale Funktion ist nicht mehr möglich, da durch die sinusoidalen Umwandlungen ein Austausch von Makromolekülen, der für die Leberfunktion essentiell ist, im Disse'schen Raum nicht mehr stattfindet. (Ballater und Brenner, 2005). Gleichzeitig zeigt das fibrotische Gewebe auch Widerstand gegen Blutstrom und die Versorgung mit Sauerstoff und wird daher hypoxisch. Die Stimulation von hypoxisch induzierbaren Faktoren führt zum angiogenetischen Switch, zur Hochregulation von proangiogenen Faktoren und der Bildung von neuen Gefäßen. (Garcia-Monzon *et al.*, 1995; Martinez-Hernandez und Amenta, 1995)

Die Umgestaltungen im fibrotischen Gewebe scheinen sowohl die Entwicklung von Primärtumoren als auch die Metastasierung in die Leber zu begünstigen. Der wichtigste Primärtumor ist das Leberzellkarzinom, das sich aus transformierten Hepatozyten entwickelt. Es ist assoziiert mit Hepatitis B und C, genetischen Krankheiten und chronischer Hepatoxinexposition und tritt fast immer mit fortgeschrittener Fibrose oder Zirrhose auf (Bissell, 2001). Metastasierende Krebszellen gelangen durch die Blutfilterfunktion vor allem von kolorektalen Karzinomen in die Leber. Nach der Ablösung vom Primärtumor gelangen sie über das portale venöse System in die Mikrogefäße der Leber, wo es nach einer Adhäsion an das Endothelium zur Ausbildung einer ins Leberparenchym wuchernden drüsenartigen Metastase kommen kann (Wagner *et al.*, 1984; Shimizu *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2001). Der Erfolg der Festsetzung, der Beginn der Wucherung und die Manifestierung eines soliden Tumors hängen dabei wesentlich von der zellulären Umgebung ab. Der Umbau der Sinusoide und die veränderte Komposition der Extrazellulärmatrix im fibrotischen Gewebe begünstigen zusammen mit verringerten Scherkräften eine Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an das Endothelium

(Konstantinopoulos und McIntire, 1996; Zvibel *et al.*, 2000). Ein weiteres Stadium in der Ausbildung einer Metastase ist die Proliferation der adhärenzten Tumorzelle und das Einwachsen in das neue Gewebe. In einer gesunden Leber zeigen lösliche Faktoren, die von Hepatozyten produziert werden, einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Krebszellen (Zvibel *et al.*, 2000). Hingegen scheinen die aktivierten hepatischen Sternzellen in fibrösem Gewebe die maligne Entwicklung zu begünstigen. Allgemein modifizieren Tumorzellen das mesenchymale Gewebe, in dem sie wachsen, durch eine Aktivierung von Fibroblasten oder einer Transformation zu Myofibroblasten und erhöhter Sekretion von Matrixproteinen. In der fibrotischen oder zirrhotischen Leber sind in dieser Hinsicht bereits ideale Vorbedingungen geschaffen und es kann zu einer gegenseitigen proliferativen Stimulation von Tumorzellen und Myofibroblasten kommen (Neaud *et al.*, 1997; Faouzi *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2000).

Begrenzt wird das initiale Wachstum der avaskulären Metastasen, wie auch das der Primärtumoren, auf einen Durchmesser von 2-3 mm, die Distanz, über die Sauerstoff in das neoplastische Gewebe diffundieren kann (Gimbrone *et al.*, 1972, Takeda *et al.*, 2002). Die meisten Tumoren verweilen als Mikrometastasen in diesem Stadium. Nur wenn es gelingt, die Versorgung durch Hinzuziehen von Blutgefäßen und deren Neovaskularisierung zu gewährleisten, kann eine weitere Vergrößerung erfolgen. Bis zum Auftreten vaskularisierter, weiter wachsender Metastasen kann dabei ein Zeitraum von mehreren Jahren nach der Behandlung des Primärtumors liegen (Holmgreen *et al.*, 1995; Chambers *et al.*, 2002).

In dieser Spanne ist durch Mutationen oder veränderte Genregulation eine stärkere Expression von angiogenetischen Faktoren oder der Verlust von Inhibitoren erfolgt und die Balance zwischen den pro- und antiangiogenetischen Faktoren, die von Tumor und Wirtszellen freigesetzt werden, ist in Richtung Angiogenese verschoben worden. (Hanahan und Folkman, 1996; Compagni und Christofori, 2000). Dabei spielen die Faktoren eine starke Rolle, die auch bei der physiologischen Angiogenese den größten Einfluss ausüben: Angiopoietin-2 wird von hepatozellulären Karzinomen wie Kolonkarzinom-Metastasen in der Leber gleichermaßen überexprimiert, während das Ang-1 Level nicht zunimmt (Ahmad *et al.*, 2001; Sugimachi *et al.*, 2003). Die Mehrzahl von Tumoren exprimiert VEGF, das aber auch von aktivierten HSC produziert wird. (Warren *et al.*, 1995 ; Ankoma-Sey *et al.*, 2000; Rosmorduc *et al.*, 1999). Dessen Rolle bei der Tumorangiogenese in der Leber wird allerdings skeptisch betrachtet. Einerseits, weil bei Untersuchungen keine Korrelation zwischen Tumorgroße und VEGF-Expression gefunden werden konnte (El-Assal *et al.*, 1998). Zum anderen, weil die VEGF(-A) bindenden Rezeptoren (VEGF1 und VEGF2) auf sinusoidalen Endothelzellen eine geringere Expression als auf vaskulären Endothelzellen zeigen und auch eine unterschiedliche

Signaltransduktion hervorrufen (Warren *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 2001; LeCouter *et al.*, 2003). Die LSEC scheinen an der Tumorangiogenese aber zumindest mitzuwirken. So wurde eine Kapillarisation von sinusoidalen Gefäße beschrieben, die Tumoren umgaben und direkte Verbindungen zwischen Lebersinusoiden und Tumorgefäßen festgestellt (Terayama *et al.*, 1996; Paku und Lapis, 1993). Auch wurde beobachtet, dass LSEC von der Peripherie in metastatisches Gewebe eindringen und sich zu einer tubulären Struktur formierten (Gervaz *et al.*, 2000). Zur Aktivierung der sinusoidalen Endothelzellen könnte FGF-2 beitragen. Hepatozyten, die in der Nähe des Tumors lokalisiert sind, weisen eine stark erhöhte Expression des Faktors auf (Terayama *et al.*, 1996). Auf einen maßgeblichen Einfluss bei der Bildung von Tumorgefäßen deutet die effektive therapeutische Verwendung von Interferonen hin, die als anti-angiogenetische Reagenzien eingesetzt werden und den FGF-2 Spiegel reduzieren (Singh *et al.*, 1995).

Um die Stabilität der gebildeten Kapillaren zu erreichen, werden auch in Tumoren Endothel unterstützende Zellen benötigt, welche die Funktion von vaskulären Perizyten erfüllen. Die Herkunft dieser Zellen in Lebertumoren wird divers diskutiert, neben aktivierten HSC wird auch die Beteiligung von portalen Myofibroblasten erwogen. Das Auftreten von zwei unterschiedlichen Angiogenesetypen in Lebermetastasen, ein sinusoidaler Typ mit gewundenen Gefäßen und Fehlen einer Basalmembran sowie ein portaler Typ mit hoher Mikrogefäßdichte und positiver Färbung für Basalmembran, könnte aus einer Beteiligung unterschiedlicher Perizyten folgen (Paku und Lapis, 1993; Olaso *et al.*, 2003). Der überwiegende Teil der Metastasen (70 %) entsteht im perizentralen Bereich und entwickelt ein Gefäßsystem nach dem sinusoidalen Muster. Es wird vermutet, dass zumindest hier Myofibroblasten rekrutiert werden, die aus aktivierten HSC hervorgegangen sind. Diese Annahme gründet auf der engen strukturellen Beziehung von HSC zu LSEC, in der physiologischen Anordnung der Sinusoide und der Akkumulation von aktivierten HSC im Bereich von Tumoren bei beginnender Angiogenese. (Shimizu *et al.*, 2000; Olaso *et al.*, 2003). Für eine gemeinsame Beteiligung von sinusoidalen Endothelzellen und hepatischen Sternzellen spricht die bessere angiogenetische Versorgung neoplastischen Gewebes in zirrhotischer Leber gegenüber nicht zirrhotischer. Die Mikrogefäßdichte der sich in zirrhotischer Leber entwickelnden Metastasen ist hier, wo die beiden Zelltypen in ihrer aktivierten, bzw. dedifferenzierten Form vorliegen, signifikant erhöht. (El-Assal *et al.*, 1998).

1.5 Das Sphäroidmodell

Um das Mit- und Zusammenwirken definierter Leberzelltypen bei angiogenetischen Vorgängen zu erforschen, wurde ein Modell gesucht, an dem die *in vivo* vorhandene räumliche Lage der Zellen zueinander nachgestellt werden konnte. *In-vivo*-Assays wurden ausgeschlossen, da ihre Verwendung nicht nur sehr zeitaufwendig und teuer, sondern die Ergebnisse daraus auch schlecht zu interpretieren sind (Jain *et al.*, 1997). Demgegenüber stehen *In-vitro*-Assays, die es erlauben, einen bestimmten Schritt der angiogenetischen Kaskade zu untersuchen. Einfachere *In-vitro*-Methoden, wie Proliferations- und Migrationsassays, bieten die Möglichkeit, diese Mechanismen an kultivierten Endothelzellen mit einer Geschwindigkeit und Einfachheit zu untersuchen, die durch die komplexen *In-vivo*-Assays nicht erreicht werden können (Auerbach *et al.*, 2000). Techniken, bei denen die Endothelzellen zur Ausbildung von Kapillarsprossen angeregt werden, benötigen zusätzlich eine Matrix, die aus Fibrin, Kollagen oder speziellen Gelen mit Extrazellulär- und Basalmembranproteinen bestehen kann. Diese künstliche Matrix enthält weitere Faktoren, die Bindung, Migration und Differenzierung zu gefäßartigen Strukturen stimulieren. Eine andere Möglichkeit bieten Kokultivierungsmethoden mit Zellen als Gewebsgerüst, z. B. Fibroblasten oder glatte Muskelzellen, die die nötige Matrix für die Kapillarbildung sekretieren (Donovan *et al.*, 2001). Eine Kokultivierung mit hepatischen Sternzellen wäre die Voraussetzung, um die spezifischen Wirkungen durch Zell-Zell-Kontakte und parakrine Einflüsse im Lebermodell dokumentieren zu können. Neben den zweidimensionalen Assays sind in der Vergangenheit auch eine Reihe von angiogenetischen Versuchsansätzen mit räumlichem Aufbau entwickelt worden. Dabei werden Monolayer als „Sandwich“, Zellen als Aggregate oder auf Trägermaterial wie Nylongaze und Mikrobeads in Kollagen oder Fibringle eingebettet (Korff und Augustin, 1999; Vailhé *et al.*, 2001). Allen gemeinsam jedoch, ob zwei- oder dreidimensional, als Solo- oder als Kokultur angesetzt, ist die Unfähigkeit, einen ruhenden Phänotyp der Endothelzellen *in vitro* hervorzubringen, der mit dem sehr niedrigen Grundumsatz *in vivo* übereinstimmt (Cines *et al.*, 1998).

Ein Versuchsansatz, der dieses grundlegende Problem lösen konnte, ist das von Korff und Augustin entwickelte dreidimensionale Sphäroidmodell mit vaskulären Endothelzellen (Korff und Augustin, 1998; Korff und Augustin, 1999; Korff *et al.*, 2001). Das Modell basiert auf Techniken, die zuvor für die Bildung von Sphäroiden aus Tumorzellen oder embryonalen Stammzellen genutzt worden waren (Sutherland, 1988; Keller, 1995; Vittet *et al.*, 1996; Lincz *et al.*, 1997). Die in definierter Zahl in einer viskosen Suspensionskultur ausgesäten Endothelzellen formieren sich nach wenigen Stunden zu einem einzigen Sphäroid, das nach etwa

24 Stunden eine Differenzierung in einen Oberflächenlayer von elongierten und einen Kern von unorganisierten Zellen aufweist. Nicht integrierte und die Zellen im Kern werden apoptotisch, während der Oberflächenlayer zahlreiche Zell-Zell-Kontakte ausbildet und einen ruhenden Phänotyp aufweist, der dem *In-vivo*-Zustand der Endothelzellen gleicht (Korff und Augustin, 1988). Zudem zeigten die Zellen des Oberflächenlayers die Fähigkeit zur Expression von Differenzierungsantigenen wie CD34, die bei *In-vitro*-Kultivierung gewöhnlich abhanden gekommen ist (Delia *et al.*, 1993). Nach der Differenzierung können die Sphäroide für einen Angiogeneseassay genutzt werden, indem man sie in ein Kollagengel einbettet. Eine nur sehr geringe spontane Sprossungsaktivität bestätigt den ruhenden Phänotyp der Zellen. Durch den Zusatz angiogenetisch wirksamer Faktoren, wie VEGF oder FGF-2, kann diese allerdings ausgelöst werden und es kommt zur Bildung einer Vielzahl kapillarartiger Strukturen (Korff und Augustin, 1999). Bei einer gleichzeitigen Aussaat von vaskulären Endothelzellen mit glatten Muskelzellen kommt es zur Bildung eines gemeinsamen Kokultursphäroids, wobei sich die Muskelzellen spontan als Kern und die Endothelzellen als Oberflächenmonolayer anordnen. Das Sphäroid ahmt damit den korrekten dreidimensionalen Aufbau der normalen Gefäßwand in *Inside-Out*-Ausrichtung der luminalen Seite nach. Die Endothelzellen weisen einen ruhenden Phänotyp mit einem *in-vivo*-ähnlichen Expressionsmuster auf und sind beim Angiogeneseassay im Kollagengel nicht mehr durch einzeln zugesetzte Faktoren zur Sprossung zu aktivieren (Korff *et al.*, 2001).

Im Rahmen meiner Arbeit sollte versucht werden, dieses System auf Leberzellen zu übertragen. Nach einer einleitenden Analyse, inwieweit die Differenzierung von auf Plastikschalen *in-vitro*-aktivierten HSC zu einer Änderung des Expressionsmusters in Richtung vaskulärer SMC führt, sollte im dreidimensionalen Modell überprüft werden, ob sie funktionell in der Lage wären vaskuläre Perizyten zu ersetzen. Hier bestand bei einem Einbau in Kokultursphäroide mit vaskulären Endothelzellen die Möglichkeit, das räumliche Verhalten und die Wirkung im Angiogeneseassay zu testen und mit der von SMC zu vergleichen. Wenn in diesem relativ naturnahen Modell mit der *in vivo* postulierten Zellkonstellation differenzierte hepatische Sternzellen die Bildung von kapillären Strukturen ähnlich wie glatte Muskelzellen beeinflussen würden, wäre das ein entscheidender Hinweis darauf, dass sie auch bei der pathologischen Angiogenese der Lebersinusoiden deren perizytäre Rolle an vaskulären Gefäßen übernehmen können. Gleichzeitig könnten durch den Einbau von sinusoidalen Endothelzellen in Kokultursphäroide auch Erkenntnisse über deren Beteiligung und Differenzierung bei diesem Prozess gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Medien, Reagenzien und Kits

Die verwendeten Chemikalien, Medien, Enzyme und Kits wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Roche, Invitrogen, Merck, Qiagen, Roth, Serva oder Sigma in p.A. Qualität bezogen und sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Substanz	Firma
Agarose	Qbiogene
BrdU Labeling Kit	Roche
Bromphenolblau	Serva
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
Dil-Ac-LDL	Paesel + Lorei
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM	PAA
DNA Marker (100 bp ladder plus)	Fermentas
Dnase I	Roche
EDTA	Merck
Endothelzell-Basalmedium	Promocell
Endothelzell-Wachstumsmedium (ECGM)	Promocell
Fetales Kälberserum (FKS)	Hyclone
Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF)	Peprtech EC
GBSS	Sigma
Glycerin	Roth
HBSS	PAA
Hämatoxilin	Dako
Heparin (Liquemin N 500)	Roche
Hepatozyme - SFM	Gibco
Isofluran (Forene)	Abbott
Ketamin	Ceva Tiergesundheit
Kollagenase A	Roche
Kollagenase H	Boehringer
Kristallviolett	Sigma

Substanz	Firma
L –Glutamin (200 mM)	Cambrex
Latex beads (Fluoresbrite plain YG)	Polysciences
Medium 199 (10fach)	Sigma
Methylcellulose	Sigma
Muskelzellmedium (SMCGM2)	Promocell
Normal Ziegenserum	Vector Laboratories
Nycodenz	Nyegaard
Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen
Paraformaldehyd	Riedel de Haen
PBS (10x)	Cambrex
Penicillin / Streptomycin	Biowhittaker
Percoll	Amersham Biosciences
PKH-Kit	Sigma
Polylysin	Sigma
Rattenschwanzkollagen Typ I	BD
Restriktionsendonukleasen	Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Taq DNA Polymerase	Qiagen
Trichloressigsäure	Merck
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA
Vectahield Mounting Medium	Vector Laboratories
VEGF	R & D Systems
Xylazinhydrochlorid	Medistar
Xylencyanol	Serva

Tabelle 1: *Chemikalien und Medien*

2.2 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind mit Angaben der Hersteller in Tabelle 3 zusammengefasst.

Gerät	Modell	Firma
Dokumentationssystem	Image Station 440	Kodak
Elektrotransfergerät	Semi-Dry	Biorad
Gelelektrophoresekammer	i-Mupid	Cosmo Bio Co.
Kapillarelektrophoresegerät	ABIPRISM 310	Applied Biosystems
Lasermikroskop (Aachen)	TCS-NT	Leica
Lasermikroskop (Düsseldorf)	LSM 510	Zeiss
Mikroskop	Axiovert 135 M	Zeiss
Mikroskopkamera (am Axiovert)	Spot 1.3.0	Diagnostic Instruments
Mikroskop (Zellkultur)	DMLB	Leica
PAGE-Kammer	Maxigelzelle	Biometra
pH-Meter	inoLab 720	WTW (Nova Analytics)
Pumpe für Zellpräparationen	Pericor	Heraeus Instruments
Schüttler	WT 17	Biometra
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus
Thermoblock	Trio	Biometra
Tischzentrifuge	1 K 15	Sigma Laborzentrifugen
UV/VIS Spektrometer	Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Zellinkubatoren		Heraeus
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Heraeus Instruments
Zentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Zentrifuge (Zellkultur)	Variofuge K	Heraeus Christ
Zentrifuge (Zellpräparation)	Megafuge 1.0	Heraeus Instruments

Tabelle 2: *Verwendete Geräte*

2.3 Plastikwaren und Einwegartikel

Soweit nicht in Tabelle 4 aufgeführt, wurden die Einwegmaterialien für die Zellkultur von den Firmen Greiner und Sarstedt bezogen.

Bezeichnung	Firma
96-well Suspensionskultur, U-Form	Greiner Bio-One
10 cm Kulturschalen	Sarstedt
24-well Suspensionskultur	Greiner Bio-One
Nylongaze	Nytal
Braunülen (MT2-G1, 2/G 16)	Braun
24-well Adhäsionskultur	Becton Dickinson
Kryoröhrchen	Nalgene

Tabelle 3: Plastikwaren für Zellpräparation und -kultur

2.4 Antikörper

Bezeichnung	Quelle	Spezifität	Verdünnung IF	Firma
α -VE-Cadherin	Ziege, polyklonal	hu, ms, rat	1:100	Santa Cruz
α -Calponin	Maus, monoklonal	hu, rat, ms	1:200	Sigma
α -CD 31	Maus, monoklonal	hu, rat	1:100	Santa Cruz
α -CD 32	Maus, monoklonal	rat	1:100	BD Biosciences
α -N-Cadherin	Kaninchen, polyklonal	hu, ms, rat	1:200	Santa Cruz
α -Pan-Cadherin	Maus, monoklonal	hu, rat, ms	1:100	DPC Biermann
α -PTP ζ	Ziege, polyklonal	hu, rat, ms	1:100	Santa Cruz
α -PTP γ	Ziege, polyklonal	hu, rat, ms	1:100	Santa Cruz
α -SM 22a	Ziege, polyklonal	hu, rat	1:100	Abcam
α -SMA	Maus, monoklonal	hu, ra, ba	1:100	Abcam
α - β -Catenin	Maus, monoklonal	hu, rat, ms, ch, dg	1:200	BD Biosciences
α -VWF	Maus, monoklonal	hu, rat	1:50	Dako

Tabelle 4: Primärantikörper. Abkürzungen: ba: Pavian (*Baboon*); hu: Mensch (*Human*); ra: Ratte; ms: Maus; ch: Huhn (*Chicken*); dg: Hund (*Dog*); IF: Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung IF	Firma
α -Maus-IgG, Fluorescein-gekoppelt	Schaf, polyklonal	1:100	Jackson ImmunoRes.
α -Maus-IgG, cy-3-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:100	Jackson ImmunoRes.
α -Ziege-IgG, Alexa Fluor 568 [®] -gekoppelt	Esel, polyklonal	1:100	Molecular Probes
α -Kaninchen-IgG, Fluorescein-gekoppelt	Schaf, polyklonal	1:100	Jackson ImmunoRes.
α -Kaninchen-IgG, cy-3-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:100	Jackson ImmunoRes.

Tabelle 5: Sekundärantikörper.

2.5 Oligonukleotidprimer

	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Ann. Temp.	Zyklen
N-CAM	rNCAM-5	TGC ATC GCT GTT AAC CTG TGC	59 °C	30
	rNCAM-3	CTT TCG TTT GTG TGG CTT CAT		
N-Cadherin	rN-cad-5	CAT TAG CTA AGG GGA TCC AGC A	56 °C	30
	rNad-3	CAA AAA CTT GAT CTT TAA ATT GA		
NT-3	NT-3 forward	GAT TAT GTG GGC AAC CCG GTG G	59 °C	30
	NT-3 reverse	GTG TCT ATT CGT ATC CAG CGC CAG C		
Trk-B	Trk-B1 forward	ACG TCA CCA ATC ACA CGG AGT ACC	62 °C	30
	Trk-B2 reverse	CTG GCA GAG TCA TCG TCG TTG C		
Trk-C	Trk-C forward	AAC GCC AGC ATC AAC ATC ACG G	64 °C	30
	Trk-C reverse	CCT TCT CGG ACA GTC AGG TTC ACG		
Smoothelin	smoothelin-rat 5	AGT TGC CCT CAA GAG GAG GGC CCT G	65 °C	30
	smoothelin-rat 3	ATC AGC CGC CCT CTG GCT GTG CCT G		
Calponin	rcalponin-5	CGC ATC GGG AGC AAC TTC ATG	60 °C	30
	rcalponin-3	CAG ACC TGG CTC AAA GAT CTG		
Myocardin	myocardin-rat 5	CGG TTC AGC TAC CCT GGG ATG CA	60 °C	35
	myocardin-rat 3	GGT GCA CTG GGG GCT GAG AAA TG		
SM-MHC	sm-mhc-5	TGG TGT GGG TCC CTT CAG AGA	60 °C	30
	sm-mhc-3	GGA TGC CAC CAC AGC CAA GTA		

	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Ann. Temp.	Zyk- len
ACL P	rACL P-3'	CTC CAG CTC CTC GCC CTT CCG	65 °C	30
	rACL P-5'	AGG CGC CAG AAG CAG CCC AGA C		
Caldesmon	caldesmon-5	AGA AAG AAT CAA AGC TGA GC	55 °C	25
	caldesmon-3	GTG GGT CAT GAA TTC TCC		
SM22 α	sm22alpha-5	AAC ATG GCC AAC AAG GGT CAA	60 °C	20
	sm22alpha-3	TTC TAA CTG ATG ATC TGC CGG		
NGF	NGF forward	CTG CTG AAC CAA TAG CTG CCC G	60 °C	30
	NGF reverse	CGC CTT GAC AAA GGT GTG AGT CG		
rps6	rS6 sense	GAC TGA CAG ATA CCA CTG TGC CT	60 °C	20
	rS6 r	TTA TTT TTG ACT GGA CTC AGA T		
α -SMA	rActin a sm-For	GGC TTC TCT ATC TAC CTT CC	57 °C	20
	rActin a sm-Rev	ACA TTC ACA GTT GTG TGC TA		
Ang-2	RATANG-2-5	GTA TTG GCT GGG CAA CGA GTT TGT	62 °C	35
	RATANG-2-3	TTC AAG TTG GAA GGA CCA CAT G		
Ang-1	RATANG-1-5	AGT CGG AGA TGG CCC AGA TAC	65 °C	35
	RATANG-1-3	TGA GGT TAT GGA CTG TGTCCA T		

Tabelle 6: *Primer*

2.6 Biologisches Material

Bezeichnung	Firma
HUVEC	PromoCell
HUASMC	PromoCell

Tabelle 7: *Humane Zellen*

Bezeichnung	Firma
Wistar	Harlan Winkelmann
Sprague - Dawley	Harlan Winkelmann

Tabelle 8: *Ratten für die Leberzellisolierung*

2.7 Analytische und molekularbiologische Methoden

2.7.1 Nukleinsäurebestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde am Spektralphotometer (*Gene Quant II*, Fa. Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 wurde für 50 µg doppelsträngige und 40 µg einzelsträngige DNA oder RNA zugrunde gelegt. Dabei sollte als Reinheitskriterium der Probe ein Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 erreicht werden.

2.7.2 Restriktionsverdau von DNA

Doppelsträngige DNA aus der PCR-Amplifizierung wurde mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II an spezifischen Erkennungssequenzen verdaut. Die verwendeten Enzyme wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen bei 37 °C über 2 h in mitgeliefertem Puffer eingesetzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer gestoppt.

Reaktionsansatz

10 µg	DNA
1 µl	Enzym
2,5 µl	10 x Puffer
ad 25 µl	adH ₂ O

2.7.3 Proteinbestimmung

Die Messung des Proteingehaltes wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der Kollagenkonzentration wurde hierbei anhand eines Standards mit Kollagenlösung bekannter Konzentration ermittelt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

2.7.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1,5 % Agarosegelen in einer Gelkammer (*i-Mupid*, Fa. Cosmo Bio) bei einer konstanten Spannung von 50 V. Die Agarose wurde zum Lösen in TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt und die Lösung in die Gelkammer gegossen. Jeweils 20 µl der mit DNA-Auftragspuffer versehenen Proben wurden zur Auftrennung in die Taschen des erkalteten, mit 0,5 x TAE-Puffer überdeckten Geles gefüllt. Als Größenstandard wurde ein Marker mit definierten DNA-Fragmenten verwendet. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht an der *Kodak Image Station 440*.

50 x TAE – Puffer

242 g	Tris-Base
57,1 ml	Essigsäure (100 %)
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1 l	H ₂ O

autoklavieren

DNA – Auftragspuffer

0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF
30 % (w/v)	Glycerol
50 mM	EDTA

autoklavieren

2.7.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von aufgetrennten DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Isolierung erfolgte über Säulen eines Präparationskits (*Gel Extraction Kit*, Fa. Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.7.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem *RNAeasy Kit* von Qiagen, nach den Angaben des Herstellers. Abweichend wurde bei HSC oder sMFB der Lysispuffer des Kits durch *QIAzol Lysis Reagent* (Fa. Qiagen) ersetzt.

2.7.7 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit dem *Omniscript RT Kit* von Qiagen durchgeführt. Hierbei wurde 1 µg RNA auf 12 µl H₂O (RNase- und DNase-frei) versetzt und 5 min auf 65 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 8 µl RT-Mix dazugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

RT – Mix

2 µl	10 x RT-Puffer
2 µl	dNTPs
2 µl	Oligo-dT (20 µM)
1 µl	Ribonuclease-Inhibitor (1000 U)
1 µl	Reverse Transkriptase (4 U)

2.7.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die PCR wurde am *Trio Thermoblock* (Biometra) mit dem *Taq DNA Polymerase Kit* von Qiagen durchgeführt.

PCR – Reaktionsansatz (auf Eis)

2 µl	10 x PCR-Puffer
4 µl	5 x Q-Solution
0,1 µl	5'-Primer (100 µM)
0,1 µl	3'-Primer (100 µM)
2 µl	dNTP-Mix (je 2 mM)
0,5 µl	Taq DNA Polymerase
10,3 µl	dH ₂ O
1 µl	Template-DNA

Reaktionsbedingungen

3 min	94 °C	} 20 - 35 Zyklen
1 min	94 °C	
1 min	Annealing Temperatur	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	
abkühlen auf	4 °C	

2.7.9 Sequenzierung

Zur Überprüfung von PCR-Produkten wurde deren DNA-Sequenz ermittelt. Die Durchführung erfolgte durch eine Sequenzier-PCR mit dem *BigDye Terminator V 1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers. Ein Ansatz bestand entsprechend einer dem Kit beigegeführten Tabelle aus 10 - 100 ng PCR-Produkt, 8 µl Sequenzierungsmix und 1 µl 5'- oder 3'-Primer (10 µM), aufgestockt auf 20 µl mit H₂O. Die Annealing Temperatur betrug 50 °C.

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden im Anschluss mit *Centri-Sep Spin Columns* (Applied Biosystems) aufgereinigt, in einer Speed Vac getrocknet und in 25 µl deionisiertem Formamid aufgenommen. Der Ansatz wurde 2 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in den *ABIPRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) geladen.

2.8 Allgemeine Proteinmethoden

2.8.1 Zellextraktion für Western Blots

Die adhären wachsenden Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen, in 1 x Probenpuffer abgeschabt und 1 min aufgekocht.

SDS-Probenpuffer

20 % (v/v)	Glycerol
2,15 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
2 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
22,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8

2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurde das Zellextrakt unter denaturierenden Bedingungen in einem 12,5 % Polyacrylamidgel (Sammelgel 3 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte in einer Maxigel-Zelle (Fa. Biometra) für ca. 3 h bei einer konstanten Stromstärke von 30 bzw. 60 mA.

Sammelgel

2,66 ml	Acrylamid (30 %)
5 ml	4 x Sammelgelpuffer
200 µl	SDS (10 %)
12,2 ml	H ₂ O
200 µl	APS
20 µl	TEMED

Trenngel

12,5 ml	Acrylamid (30 %)
7,5 ml	4 x Sammelgelpuffer
300 µl	SDS (10 %)
9,5 ml	H ₂ O
300 µl	APS
30 µl	TEMED

Sammelgelpuffer

60,6 g	Tris/HCl
ad 1 l	H ₂ O
	auf pH 6,8 einstellen

Trenngelpuffer

181,5 g	Tris/HCl
ad 1 l	H ₂ O
	auf pH 8,8 einstellen

Elektrodenpuffer (10 x)

30 g	Tris
144 g	Glycin
10 g	SDS
ad 1 l	H ₂ O

2.8.3 Western Blot und Immundetektion

Zur Überführung der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein elektrophoretischer Transfer mit einer *Semidry*-Transfer-Zelle (Fa. Bio-rad) durchgeführt. Die Dauer des Transfers betrug 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 2,5 mA pro cm² Membranfläche. Anschließend wurde die Membran mit 5 % Magermilchpulver in TBS/Tween geblockt. Erstantikörper wurden über Nacht bei 4 °C in Blockierlösung inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern wurde der Filter 3 mal für insgesamt eine Stunde in TBS/Tween gewaschen. Die Immundetektion erfolgte mit dem *ECL-Western-Blotting-Kit* (Fa. Amersham).

Transferpuffer		TBS/Tween	
25 mM	Tris	50 mM	Tris
192 mM	Glycin	200 mM	NaCl
0,01 %	SDS	0,1 %	Tween 20
20 %	Methanol		pH auf 8,0 einstellen
	pH auf 8,5 einstellen		

2.9 Allgemeine Zellkulturmethoden

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Alle verwendeten Materialien, Medien und Lösungen wurden, soweit sie nicht bereits steril erworben waren, autoklaviert (2 h bei 121 °C und 2 bar), sterilfiltriert (Porengröße 2 µm) oder mit Flächendesinfektionsmittel behandelt.

2.9.1 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von kryokonservierten Zellen wurden die Röhrchen mit den Zellen sofort nach der Entnahme aus flüssigem Stickstoff im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, auf Kulturplatten mit vorgewärmtem Medium ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach der Anheftung der Zellen wurde das DMSO-enhaltende Medium gegen frisches Medium gewechselt.

2.9.2 Kultivierung von Säugerzellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank bei 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Anzucht erfolgte in der Regel auf Plastikkulturschalen (Fa. Sarstedt) mit 10 cm Durchmesser. Zur Kultur wurden für Endothel- und Muskelzellen serumreduzierte Spezialmedien (Fa. Promocell) eingesetzt. Hepatische Sternzellen wurden in DMEM mit 10 % FKS, L - Glutamin (4 mM Endkonzentration) und mit Zusatz von Penicillin/Streptomycin aktiviert.

2.9.3 Lösen und Passagieren von Zellen

Zum Lösen der adhärennten Zellen von der Kulturschale wurde diese nach dem Absaugen des Mediums 2 x mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen. Trypsin/EDTA-Lösung wurde auf die Kulturschalen gegeben und nach mehrmaligem Schwenken wieder abgesaugt, die Platte mit der restlichen Lösung bei RT inkubiert. Abweichend wurde bei HSC-Kulturen die Schale mit 1 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und auf neuen Platten anwachsen lassen.

2.9.4 Bestimmung der Zelldichte von Säugerzellen

Die Bestimmung der Dichte von Zellen wurde nach deren Ablösung von der Kulturschale und Aufnahme in Medium mit einer Neubauerkammer durchgeführt.

[Zahl der Zellen / μl = ausgezählte Zellen / mm^2 x Verdünnungsfaktor x 10 (Kammerfaktor bei 0,1 mm Tiefe)]

2.9.5 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen konfluent bewachsener 10 cm Kulturschalen wurden mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen, mit Trypsinlösung von den Platten gelöst, in Kulturmedium aufgenommen und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μl FKS (pro Schale) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und tropfenweise das gleiche Volumen 20 % DMSO in FKS zugegeben. Die Kryoröhrchen wurden 10 min auf Eis gekühlt und durch Papier isoliert mit weniger als 2 °C/min auf -80 °C eingefroren. Zur längerfristigen Lagerung der Zellen wurden die Röhrchen am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.9.6 Kollagenbeschichtung von Kulturuntergründen

Eine Lösung von 50 $\mu\text{g/ml}$ Rattenschwanzkollagen wurde durch Verdünnen in 0,1 % Essigsäure hergestellt. Kulturschalen oder Deckgläschen wurden etwa 1 mm hoch damit bedeckt und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Absaugen der Kollagenlösung und zweifachem Waschen mit PBS konnten die beschichteten Flächen entweder sofort zur Zellkultur benutzt werden, oder sie wurden trocknen lassen und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.9.7 Bestimmung der vitalen Zellen

Zur Vitalitätsbestimmung wurde die Zellsuspension vor der Zählung in der Neubauerkammer mit einem gleichen Anteil Trypanblaulösung [0,4 % (w/v)] gemischt. Die Zellen, die im Inneren nach fünf Minuten nicht blau gefärbt waren, wurden als vital eingestuft.

2.10 Zellpräparationen

2.10.1 Präparation und Isolation von hepatischen Sternzellen aus Rattenleber

Zur Präparation wurden Sprague Dawley Ratten mit einem Lebendgewicht von etwa 650 g verwendet. Den mit Isofluran sedierten Tieren wurde ein Gemisch von 100 µl Ketamin und 10 µl Medistar pro 100 g Körpergewicht in die Bauchhöhle injiziert. Die betäubten Ratten wurden auf einem Präparationskasten fixiert, die Bauchregion mit 70 % Ethanol abgerieben und die Bauchhöhle geöffnet. In die freigelegte Vena portae wurde eine Braunüle (MT2-G1) gesteckt, die nach dem Herausziehen der Metallkanüle und dem Durchtrennen der Aorta abdominalis luftblasenfrei mit einem Perfusionsschlauch verbunden wurde. Mit Lösung I wurde die Perfusion *in situ* mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min gestartet. Während der Perfusion wurde die Leber vorsichtig freipräpariert und in einen Inkubationsschrank überführt. Hier wurde die Perfusion bei 37 °C mit Lösung II fortgesetzt. Nach deren Durchfluss wurde in einem rezirkulierenden System mit Lösung III über ca. 30 min perfundiert, bis zur sichtbar beginnenden Auflösung der Leber. Bindegewebs- und Gefäßreste wurden entfernt und die Leber in Inkubationslösung zu kleinen Stückchen zerrupft. Der pH-Wert der entstandenen Suspension wurde mit 1 M NaOH auf 7,3 eingestellt und während einer 10minütigen Inkubation unter Rühren (200 rpm) bei 37 °C wiederholt kontrolliert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch Nylongaze (Weite 100) gefiltert und bei 450 x g 7 min zentrifugiert. Ab hier erfolgten alle Schritte bei 4 °C mit vorgekühlten Lösungen und Gefäßen. Das Sediment wurde nach Absaugen des Überstandes ad 28,5 ml HBSS mit BSA (0,25 %) resuspendiert und mit 11,5 ml Nycodenzstocklösung (28,7 % w/v) gemischt. In zwei Zentrifugenröhrchen mit 6 ml HBSS und BSA wurden je 20 ml der Suspension unterschichtet. Nach der Gradientenzentrifugation, 22 min bei 1400 x g, war eine weiße Bande mit Sternzellen zwischen den beiden Schichten entstanden, die mit einer Spritze abgehoben wurde. Die Zellen wurden in 50 ml HBSS 7 min bei 450 x g gewaschen und das Pellet in 5 ml HBSS mit 1 % FKS aufgenom-

men. Reinheit und Zellzahl wurden in einer Neubauerkammer bestimmt. Eine Aussaat erfolgte in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung, standardmäßig in einer Dichte von 2×10^3 Zellen pro cm^2 .

Perfusionslösung I

200 ml HBSS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Perfusionslösung II

350 mg Pronase E
ad 100 ml HBSS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Perfusionslösung III

15 mg Kollagenase H
ad 60 ml HBSS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Inkubationslösung

10 mg Dnase I
ad 100 ml HBSS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Erst kurz vor Gebrauch anfertigen

Nycodenz - Stocklösung

71,75 g Nycodenz
ad 250 ml HBSS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Bei RT vollständig lösen, auf pH 7,3 einstellen und sterilfiltrieren.
Lagerung bei 4 °C.

2.10.2 Präparation und Isolation von sinusoidalen Endothelzellen aus Rattenleber

Verwendet wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 350 g. Nach einer Sedierung der Ratte mit Isofluran wurde eine Mischung von Ketamin und Medistar in die Bauchhöhle gespritzt. Pro 100 g Körpergewicht wurden 15 µl Medistar und 150 µl Ketamin verwendet. Der betäubten Ratte wurden anschließend 150 U Heparin in die Schwanzvene injiziert. Der auf einem Präparationskasten fixierten Ratte wurde die Bauchhöhle aufgeschnitten, die Pfortader freigelegt und mit einer Kanüle (2/G 16) mit Plastikmantel kanuliert.

Nach Entfernung der Kanüle und Aufschneiden der Aorta abdominalis erfolgte eine zweistufige Perfusion durch den Plastikmantel. Zuerst wurde 39 °C warmes HBSS ohne Calcium und Magnesium mit einer Flussrate von 10 ml/min bis zur Blutleere (< 200 ml) durch die Leber gepumpt. Die zweite Perfusionslösung wurde mit einer Flussrate von 5 ml/min bei 39 °C in die Leber geleitet. Nach dem Heraustrennen wurde die Leber in einem Teil der Inkubationslösung überführt, die umgebenden Glisson-Kapseln entfernt, die Leberlappen mit Pinzetten sorgfältig zerrupft und mit der restlichen Lösung weitere 10 min unter Rühren bei 39 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch Gaze, Weite 100, in zwei Zentrifugenröhrchen filtriert. Eine erste Zentrifugation erfolgte 5 min bei 100 x g. Der Überstand wurde 10 min bei 350 x g zentrifugiert, dessen Pellet in 50 ml PBS gewaschen, in 20 ml PBS resuspendiert und auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Durch Unterschichtung mit je 20 ml 25 %iger und 15 ml 50 %iger Percolllösung wurde ein Dichtegradient hergestellt, der 20 min bei 900 x g zentrifugiert wurde. Der zwischen den beiden Percollschichten gebildete Ring wurde vorsichtig abgehoben, mit einer gleichen Menge PBS verdünnt und 10 min bei 900 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Kulturmedium (ECGM) resuspendiert und auf unbehandelten Petrischalen zur selektiven Anheftung von Kupferzellen 10 min bei 37 °C inkubiert. Die sinusoidalen Endothelzellen wurden danach sorgfältig von der Platte abgewaschen und entweder sofort für Proben verwendet oder auf kollagenbeschichteten Schalen ausgesät. Eine Vitalzählung erfolgte mit Trypanblau in einer Neubauerkammer. Nach Adhärenzen der ausgesäten Zellen erfolgte nach 2 – 4 Stunden ein Mediumwechsel.

Perfusionslösung I

HBSS ohne Ca/Mg

Perfusionslösung II

50 mg	Kollagenase A
5 ml	FKS
ad 100 ml	GBSS

Inkubationslösung

50 mg	Kollagenase A
5 ml	FKS
1 mg	DNase I
ad 100 ml	GBSS

Percoll Stocklösung (SPS)

2,5 ml	10 x PBS
22,5 ml	Percoll

mit 0,1 N HCl auf pH 7,4 einstellen

25% Percoll

10 ml	SPS
30 ml	PBS

50% Percoll

15 ml	SPS
15 ml	PBS

2.11 Spezielle zellbiologische Methoden

2.11.1 *In-vitro*-Aktivierung von hepatischen Sternzellen

Die frisch isolierten hepatischen Sternzellen wurden in einer Dichte von 4×10^6 auf Plastik-kulturschalen von 10 cm Durchmesser ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel der adhärenierten Zellen. Als Myofibroblasten (sMFB) wurden die Zellen definiert, die nach siebentägiger Aktivierung mit Trypsin gelöst und erneut ausgesät wurden.

2.11.2 Zellmembranfärbung mit PKH 26 und PKH 67

Das Einfärben von Zellmembranen mit den Fluoreszenzfarbstoffen PKH 67 (Emission im grünen Bereich, $E_{\max}=502$ nm) und PKH 26 (Emission im roten Bereich, $E_{\max}=567$ nm) erfolgte mit Variationen zu den Angaben des Herstellers (Fa. Sigma). Die Zellen wurden gelöst, gezählt und die gewünschte Zellzahl bei $400 \times g$ über 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in serumfreiem Medium gewaschen und in $100 \mu\text{l}$ *Diluent C* resuspendiert. Für $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurde ein 2facher PKH-Stock angefertigt aus $100 \mu\text{l}$ *Diluent C* und $0,2 \mu\text{l}$ PKH. In diesen wurde die Zellsuspension sorgfältig und homogen durch Pipettieren eingemischt. Die Inkubation erfolgte über 5 min mit gelegentlichem Kippeln und wurde durch die Zugabe von $200 \mu\text{l}$ FKS beendet. Nach einer weiteren Minute wurden $400 \mu\text{l}$ Kulturmedium zugegeben und die Zellen zwei Minuten bei $200 \times g$ abzentrifugiert. Das in Medium resuspendierte Pellet wurde in neue Röhrchen überführt und noch drei Mal gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden als Monolayer auf beschichteten Deckgläschen ausgesät oder zur Bildung von Sphäroiden verwendet.

2.11.3 Proliferationsassay mit Bromdesoxyuridin

Zur Proliferationsbestimmung mit Bromdesoxyuridin (BrdU) wurden HUVEC auf Kollagen beschichteten 8-Kammer-Gläschen bis zur 50 %igen Konfluenz wachsen lassen. Danach

wurden sie in Serum reduziertem Medium (1 % ECGM in Basalmedium, 5 µg/ml Heparin) 48 h hungern lassen. Die ruhenden Zellen wurden nach Zugabe von Testfaktoren (FGF) für weitere 20 h inkubiert, wobei nach 16 h BrdU (*BrdU Labeling Kit*, Roche) in einer Endkonzentration von 10 µM beigelegt wurde. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit den Reagenzien des Kits nach Angaben des Herstellers: Nach einem Waschschrift wurden die Zellen fixiert und denaturiert. Ein Peroxidase markierter anti-BrdU-Antikörper wurde für 90 min bei RT gebunden. Nach dem Abwaschen des Antikörpers erfolgte eine Färbung mit DAB (2.11.4).

2.11.4 DAB-Färbung

Zu 1 ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Sigma)-Chromogenlösung wurden 0,75 µl 30 % H₂O₂ gegeben. Das mit PBS abgewaschene Präparat wurde mit der Chromogenlösung ganz bedeckt. Die Entwicklung der bräunlichen Färbung des Präparates, die nach einer bis wenigen Minuten auftrat, wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Ein Abbruch der Reaktion erfolgte durch Waschen in Wasser.

2.11.5 Wounding Assay

HUVE-Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten 6-well Platten wachsen lassen bis sie fast konfluent waren. Danach wurden sie über 48 h in Serum-reduziertem Medium (1 % ECGM in Basalmedium, 5 µg/ml Heparin) gehalten. In einer Weiterentwicklung der Methode, die erstmals von Bürk (1973) unter Verwendung einer Rasierklinge durchgeführt worden war, erfolgte das Wounding mit einem speziell hierfür präparierten Zellschaber. Das Gummi des Zellschabers war auf 2 mm Breite zugeschnitten und wurde auf einer Seite durch die eingesteckte Spitze einer Injektionsnadel begrenzt. Hiermit wurde eine definierte, 2 mm breite Schneise durch den Monolayer gezogen. Die Nadelspitze kratzte dabei eine Furche in den Plastikuntergrund, die einerseits zur späteren Erkennung der Schneisengrenze diente, aber gleichzeitig auch als Barriere gegen einwachsende Zellen von dieser Seite wirkte. Der verwundete Zellrasen wurde mit Wachstumsfaktoren stimuliert, nach 24 h in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Zur Färbung wurden die Zellen 1 min mit Kristallviolett (1 %ige wässrige Lösung) bedeckt und anschließend mit Leitungswasser abgewaschen.

2.11.6 LDL-Labeling

Zellen aus der Leberpräparation wurden auf 24-Well-Schalen ausgesät und nach der Adhäsion mit PBS gewaschen. Auf einen Napf wurden 400 µl Medium und 10 µl Dil-Ac-LDL (Acetyliertes Low Density Lipoprotein, gebunden mit fluoreszierendem 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindo-Carboxyamin-Perchlorat, 200 µg/ml, Fa. Paesel+Lorei) gegeben und 4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen erfolgte eine Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einen Grünfilter.

2.11.7 Latex Phagozytose

Zellen aus der Leberpräparation wurden auf 24-Well-Schalen ausgesät und nach der Adhäsion mit PBS gewaschen. Auf einen Napf wurden 400 µl Medium und 4 µl einer Suspension mit Fluorescein-gebundenen Latexkügelchen (*Fluoresbrite plain YG 1.0 micron microspheres*, Fa. Polysciences) gegeben und 30 – 40 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach sorgfältigem Abwaschen der Kügelchen mit PBS erfolgte eine Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem vorgeschalteten Blaufilter.

2.11.8 Immunfluoreszenzfärbung von Monolayern

Zellmonolayer wurden auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen wachsen lassen, in 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert und mit 0,2 % Triton 4 min permeabilisiert. Nach einem Blocken mit 3 % BSA erfolgte die Bindung des Erstantikörpers 90 min bei RT. Im Anschluss wurde das Präparat 30 min mit der Zweitantikörperlösung bei 37° C inkubiert und mit Mounting Medium (*Vectashield*, Fa. Vector Laboratories) auf einem Objektträger fixiert. Die Betrachtung erfolgte mit einer 63er Ölimmersionslinse auf einem Zeiss Mikroskop mit Filtern für Fluorescein oder Texas Red.

2.11.9 Methanol / Acetonfixierung

Auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden 10 min in –20 °C kaltem Methanol fixiert, anschließend 4 min in –20 °C kaltem Aceton. Danach wurden die fixierten Zellen trocknen lassen.

2.12 Methoden für Versuche mit Sphäroiden

2.12.1 Herstellung von Methocellösung

Zur Herstellung einer Methocel-Stocklösung wurden 6 g Methylzellulose (4000 Centipoises) zusammen mit einem Magnetrührstab autoklaviert. Hierzu wurden 250 ml auf 60 °C erwärmtes EC-Basalmedium zugegeben und bis zum vollständigen Lösen der Methylzellulose gerührt. Mit zusätzlichen 250 ml kaltem Basalmedium wurde die Lösung ü. N. bei 4 °C weitergerührt. Danach erfolgte eine zweistündige Zentrifugation bei 4500 x g. Der Überstand wurde bei 4 °C gelagert und für die Sphäroidbildung (2.12.2 und 2.12.3) und das Sprossen der Sphäroide im Angiogeneseassay (2.12.5) eingesetzt.

2.12.2 Bildung von Solosphäroiden

Zur Herstellung von Sphäroiden einheitlicher Zellzahl und Größe wurden Zellen in einem viskosen Medium auf nichtadhärenten 96-Loch Platten mit Rundboden ausgesät. Als Standardansatz für 4 x 96 HUVEC Solosphäroide mit 750 Zellen pro Sphäroid wurden die Endothelzellen nach dem Lösen mit Trypsin in Endothelmedium (ECGM) aufgenommen, eine Zellsuspension mit 3×10^5 Zellen in ein (50 ml) Röhrchen pipettiert und mit ECGM auf 36 ml aufgefüllt. Dazu kamen 4 ml FKS und 10 ml Methocel. Je 125 µl dieser viskosen Zellsuspension wurden in die Näpfe der Kulturschalen gefüllt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 48 h wurden die gebildeten Sphäroide für Angiogeneseassays oder Immunfärbungen eingesetzt.

Solosphäroide aus LSEC wurden in der gleichen Weise hergestellt, jedoch mit frisch aus der Rattenleber präparierten und isolierten Zellen.

2.12.3 Bildung von Kokultursphäroiden

Kokultursphäroide wurden gebildet, indem ein Suspensionsgemisch zweier verschiedener Zelltypen, in der Regel 1500 Zellen jedes Typs pro Sphäroid, mit der Mischung aus Methocel, Kulturmedium und FKS in die Näpfe gefüllt wurde. Für die kleineren sinusoidalen EC wurde abweichend ein größeres Verhältnis gewählt, das im Einzelnen angegeben ist.

2.12.4 Kollagengewinnung aus Rattenschwanzsehnen

Zur Herstellung einer Kollagen-Stocklösung wurden zwei frische oder zuvor tiefgefrorene Rattenschwänze für 20 min in 70 % Ethanol gelegt und anschließend das Fell entfernt. Die Wirbel der nackten Schwänze wurden im Abstand von ca. einem Zentimeter gebrochen und die Sehnen ohne anhaftendes Gewebe mit einer Pinzette herausgezogen. Die gesammelten Sehnen wurden in frischem 70 %igen Ethanol gesammelt und weitere 20 min inkubiert, bevor sie unter der Sterilbank zum Trocknen auf einer Kulturschale ausgelegt wurden. Die trockenen Sehnen wurden in 250 ml sterilfiltrierte 0,1 %ige Essigsäure 48 Stunden bei 4 °C gelegt und 2 – 3 mal täglich umgeschüttelt. Die entstandene Kollagenlösung wurde in autoklavierten Röhrchen eine Stunde mit 17000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des klaren Überstandes wurde photometrisch (2.7.3) ermittelt, wobei eine Kollagenlösung bekannter Konzentration als Standard diente. Eine Verdünnung des Überstandes erfolgte mit 0,1 % Essigsäure auf 2 mg Protein/ml. Diese Kollagenstocklösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und nach frühestens vier Wochen für die Einbettung der Sphäroide (2.12.5) oder zur Beschichtung von Kulturplatten (2.9.6) verwendet.

2.12.5 Angiogeneseassay mit Sphäroiden

Standardmäßig wurden für 8 Ansätze die Sphäroide von vier 96er-Platten verwendet. Die äußeren Näpfe einer 24-Loch-Platte wurden mit PBS gefüllt und im Brutschrank auf 37 °C vorgewärmt. Außerdem wurden Metallheizblöcke vorgewärmt, die später zur schnelleren Polymerisierung des Kollagens unter die Platten gelegt werden konnten. Die Sphäroide wurden in 50 ml Kunststoffröhrchen zusammen pipettiert und bei 400 x g über 3 min abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Sphäroidpellet (durch Schrappen des Röhrchens über den Lüftungsrost der Sterilbank) aufgelockert. Zu dem Pellet wurden 4 ml Methocel und 1 ml FKS gegeben. Auf Eis wurden 4 ml Kollagenlösung (2mg/ml) mit 0,5 ml 10fach Medium 199 versetzt und mit ca. 0,5 ml 0,1 M NaOH bis zum Farbumschlag (pH 7,4) neutralisiert. Die neutralisierte Kollagenlösung wurde mit den Sphäroiden, dem Methocel und dem FKS zügig, sorgfältig und luftblasenfrei mit der Pipette gemischt. Unmittelbar danach wurde je 1 ml in die freien Näpfe der vorgewärmten und auf den Heizblock gestellten Kulturplatte gefüllt und anschließend in den Brutschrank gestellt. Testfaktoren wurden nach 10 min in 100 µl PBS gelöst auf das polymerisierte Gel gegeben. Nach der weiteren Inkubation wurden

Aufnahmen von einzelnen Sphäroiden unter dem Mikroskop angefertigt. Eine statistische Auswertung erfolgte durch das Ausmessen der drei bzw. fünf längsten auf einer zweidimensionalen Abbildung sichtbaren Sprosse von standardmäßig 10 zufällig ausgewählten Sphäroiden pro Ansatz.

2.12.6 Immunfärbung von Sphäroiden

Sphäroide wurden in gewünschter Zahl zusammenpipettiert und 3 x 1 min bei 200 x g in PBS gewaschen. Das Fixieren erfolgte in 4 % Paraformaldehyd/PBS 2 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Nach 1 h Waschen in 0,1 % Triton X-100/PBS (PBSTX) wurde mit 3 % BSA/PBSTX bei RT geblockt. Eine Inkubation mit Erstantikörper wurde ü. N. in 3 % BSA/PBSTX bei 4 °C durchgeführt. Die Sphäroide wurden dann 3 x 10 min gewaschen und 30 min geblockt, bevor mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper ü. N. bei 4 °C gebunden wurde. Nach 3 x 10 min Waschen wurde die Flüssigkeit weitestgehend entfernt und durch Mounting Medium (*Vectashield*, Fa. Vector Laboratories) ersetzt. Nach dem Einsinken der Sphäroide in das Medium wurden sie in einem Rahmen aus Parafilm zwischen Objektträger und Deckglas eingebettet. Die Betrachtung und Dokumentation erfolgte am Laserfluoreszenzmikroskop mit einem 20er Ölimmersions-Objektiv.

2.12.7 Whole-Mount-Staining von Kollagengelen

Zur Immunfärbung von Kollagengelen wurden diese 20 min in Methanol bei –20 °C fixiert und drei mal eine Stunde in PBS gewaschen. Geblockt wurde eine Stunde mit einer 10 % Ziegenserumlösung. Die Inkubation mit Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:25 erfolgte mit Schwenken über 90 min bei RT. Zwischen weiteren Waschschrritten (wie oben) wurde Fluoreszenz-markierter Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:50 ebenfalls für 90 min bei RT unter Schwenken zugegeben. Das Präparat wurde mit Mounting Medium (*Vectashield*, Fa. Vector Laboratories) unter einem Deckgläschen mit Parafilmrand als Abstandhalter eingebettet.

2.12.8 Elektronenmikroskopie

Sphäroide wurden nach der Entnahme aus dem Medium 3 x 1 min bei 200 x g in PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden sie ü. N. bei 4 °C in einer 3 %igen Glutaraldehydlösung inkubiert. Die weiteren praktischen Arbeiten – Epoxidharzeinbettung, Semidünnschnitte, Hämatoxylinfärbung, Ultradünnschnitte und elektronenmikroskopische Aufnahmen - wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hollweg und Team am Institut für Pathologie des UK Aachen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Das vaskuläre Sphäroidmodell: Differenzielle Expression und Einfluss auf angiogenetische Prozesse

Die Grundlage der Untersuchungen mit hepatischen Sternzellen und Endothelzellen sollte ein dreidimensionales Sphäroid-Kokulturmodell bilden, wie es von Korff *et al.* an vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen entwickelt worden war. Diese neuartige Technik wurde bislang ausschließlich von dessen Arbeitsgruppe angewandt. Vor der Übertragung auf Leberzellen war daher eine Etablierung des komplexen vaskulären Modellsystems in unserem Labor erforderlich. Neben den speziellen Kultivierungsmethoden mussten dabei auch spezifisch angepasste Färbemethoden für die Sphäroide entwickelt werden, wobei die Verfahren für Ganzkörperfärbung (*whole mount staining*) von Embryogewebe als Grundlage genommen wurde.

Zur Analyse der differenzierten Expression im dreidimensionalen Aufbau wurde die Lokalisation verschiedener Proteine innerhalb der Sphäroide anhand von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die Besonderheiten, die sich auf Migration und Proliferation der Endothelzellen im Angiogenesemodell ergeben, wurden im Vergleich mit einem *Wounding*- und einem Proliferationsassay ermittelt. Das Kapillarsprossungsverhalten der Sphäroide im Kollagengel sollte gleichzeitig später als Basis für die Beurteilung ähnlicher Experimente mit einer Beteiligung von Leberzellen herangezogen werden.

3.1.1 Bildung von Solosphäroiden aus vaskulären Endothelzellen

Bei der Bildung von Sphäroiden formieren sich vaskuläre Endothelzellen innerhalb von 24 Stunden zu einem Zentrum aus unorganisierten und einer Oberflächenschicht aus elongierten Zellen. Letztere weisen gut ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte auf und werden im Gegensatz zu Endothelzellen in anderen zwei- oder dreidimensionalen Modellen in einen stabilen ruhenden Zustand versetzt (Korff und Augustin, 1998). Die Verteilung des für die homotypischen Bindungen der Endothelzellen verantwortlichen VE-Cadherins innerhalb des Sphäroids wurde unter dem Laserfluoreszenzmikroskop untersucht. Für die Färbungen wurden zwei Tage alte Sphäroide aus 750 HUVE-Zellen in Paraformaldehyd fixiert und anschließend permeabilisiert. Nach der Erstantikörperinkubation erfolgte eine Markierung mit FITC-gekoppelten

Zweitantikörpern. Die räumliche Expressionsanalyse konnte mit der Betrachtung verschiedener fiktiver Sphäroid-Schnittebenen durchgeführt werden (Abb. 3.1).

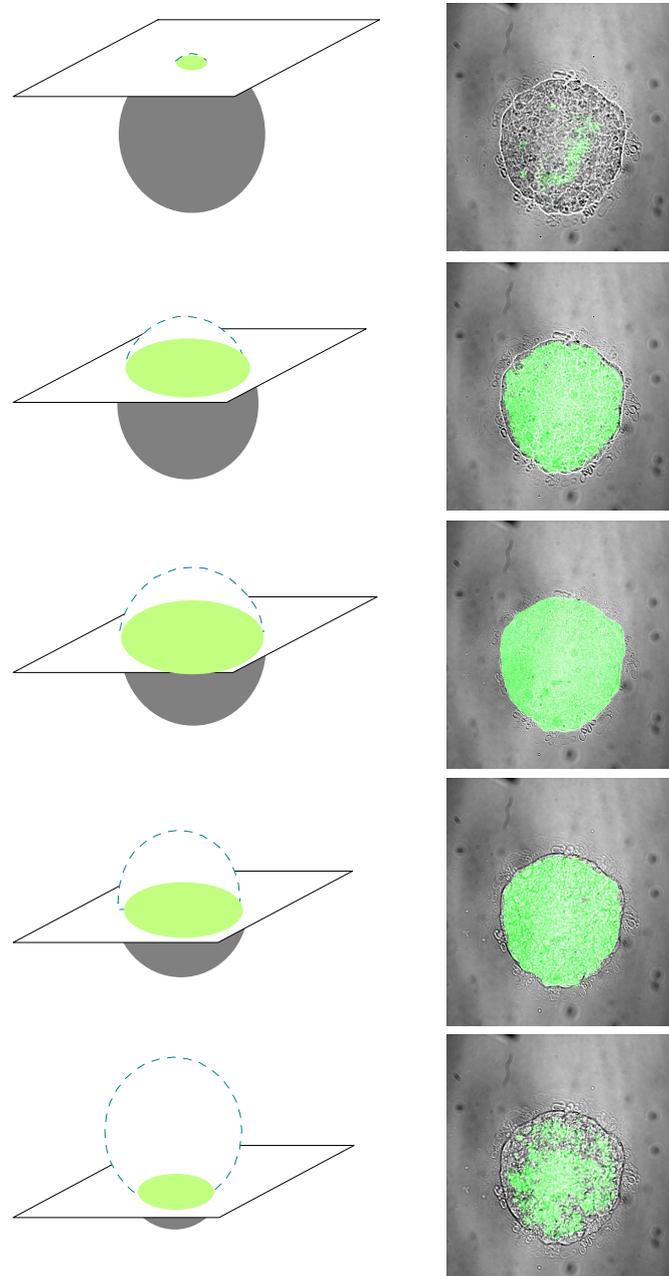


Abb. 3.1: Immunmarkierung von VE-Cadherin im Sphäroid aus vaskulären Endothelzellen. Zwei Tage alte Solosphäroide aus je 750 HUVEC wurden in Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Nach der Erstantikörperinkubation gegen vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-Cadherin) erfolgte eine Bindung mit FITC-gekoppeltem Zweitantikörper. Zu sehen ist die VE-Cadherin Markierung eines Sphäroids (rechts) mit graphischer Darstellung der jeweiligen Schnittebene (links). Die Fluoreszenzaufnahmen am Lasermikroskop sind überlagert mit einer Transmissionsaufnahme.

Die Fläche des medialen Schnittes, bei der VE-Cadherin nachgewiesen wurde, war deckungsgleich mit der Durchlichtaufsicht des Sphäroids. Das weist auf ein Vorhandensein des Bindegemoleküls in allen Zellen vom Kern des Sphäroids bis in die Außenschicht. Die durchgehende Verteilung diente auch als Beleg, dass mit der verwendeten Methode eine Markierung der Antigene im gesamten Sphäroid mit einer anschließenden Detektion möglich war.

3.1.2 Bildung von Kokultursphäroiden aus vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Werden vaskuläre Endothelzellen mit glatten Muskelzellen zusammen als Suspensionskultur in viskosem Methocelmedium ausgesät, so bilden sie ein gemeinsames Sphäroid. In diesem Kokultursphäroid ordnen sich die Muskelzellen innerhalb von zwei Tagen als Kern an, umgeben von einer Endothelzellschicht (Korff *et al.*, 2001). Nachdem die Kultivierung von gemeinsamen Sphäroiden aus einer gleichen Anzahl HUVEC und HUASMC erfolgreich verlaufen war, wurde zur Überprüfung dieses inneren Aufbaus eine Immunfluoreszenzfärbung mit VE-Cadherin Antikörpern in gleicher Weise wie zuvor am EC-Solosphäroid durchgeführt. Eine Markierung erfolgte hierbei nur an einem äußeren Ring bzw. an der Oberfläche, während keine VE-Cadherin exprimierende Endothelzellen im Innern des Sphäroids vorhanden waren (Abb. 3.2).

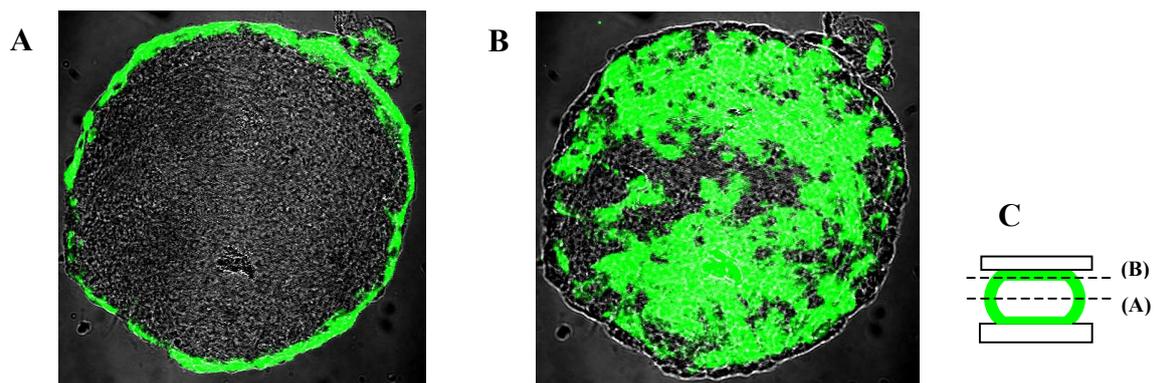


Abb. 3.2: Immunfärbung des Kokultursphäroids aus vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen mit VE-Cadherin. Je 1500 HUVEC und HUASMC wurden zusammen in einem Napf einer 96-Well-Schale mit Methocelmedium ausgesät. Nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank waren die Zellen in einem gemeinsamen Sphäroid integriert. Zur Kennzeichnung der Endothelzellen wurde eine Immunfärbung gegen VE-Cadherin mit FITC-gekoppeltem Zweitantikörper durchgeführt. Aufnahme am konfokalen Lasermikroskop in medialer Schnittebene (A) und apikal versetzter Schnittebene (B). [Die relativ große gefärbte Fläche am apikalen Schnittes resultiert aus der Verformung des Sphäroids durch das Eindeckeln des Präparates (C).]

3.1.3 Sprossung von Endothelzellen aus Sphäroiden

Die angiogenetischen Veränderungen, die zur Loslösung der Endothelzellen aus ihrer Verankerung in der Gefäßwand, ihrer Proliferation und Migration führen, sind auf das Aussprossen neuer Kapillaren gerichtet. Bisherige Sprossungstests hatten den Nachteil, dass entweder *Ex-vivo*-Material wie Aortenringe verwendet werden musste, oder mit Endothelzellen agiert wurde, die sich nicht wie *in vivo* im ruhenden Zustand befanden (Auerbach *et al*, 2000; Tarabietti und Giavazzi, 2004). Dagegen konnten in Übereinstimmung zu Korff und Mitarbeitern die ruhenden Endothelzellen in einem Angiogeneseassay mit Sphäroiden nicht ohne zugesetzte Wachstumsfaktoren zu einer deutlichen Sprossung angeregt werden. Für diesen dreidimensionalen Test wurden 2 Tage kultivierte Sphäroide aus HUVEC und 5 Tage kultivierte Sphäroide aus HUVEC und HUASC verwendet, die in ein Gel aus Rattenschwanzkollagen mit Vollmedium, Methocel und insgesamt 10 % FKS eingegossen wurden. Sowohl im Solosphäroid, als auch im Kokultursphäroid waren beim Kontrollansatz nach zweitägiger Kollageneinbettung nur vereinzelte Ansätze zur Kapillarbildung festzustellen, die sich auch durch eine längerfristige Inkubation bis zu einer Woche nicht vermehrt induzieren ließen (Abb. 3.3 A)

Die exogene Stimulation mit den angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF oder FGF-2 führte nach zweitägiger Inkubation zu einer deutlichen Verstärkung der Aussprossung am Solo-Endothelzellsphäroid, die sich in der vermehrten Ausbildung von über 100 µm langen, voluminösen kapillarähnlichen Strukturen äußerte. Demgegenüber ließ sich an Endothelzellen, die sich im Kokultursphäroid in direktem Kontakt mit glatten Muskelzellen formiert hatten, nach zwei Tagen durch VEGF oder FGF-2 nicht die vermehrte Ausbildung von Sprossen auslösen. Eine Auswertung, bei der die Ausdehnung der 5 längsten Sprosse eines Sphäroids addiert wurde, ergab eine mehr als 6fache Steigerung gegenüber der Kontrolle bei Solosphäroiden, während der Wert bei den Kokultursphäroiden nach der Stimulation nicht erhöht wurde (Abb. 3.3 B). Auch eine weitere Inkubation der Kokulturansätze bis zu einer Woche mit den Faktoren führte zu keiner Veränderung gegenüber dem negativen Kontrollansatz. Als Positivkontrolle wurde ein Test mit PMA (Phorbol-Myristat-Acetat) durchgeführt. Beim Zusatz des direkt auf Proteinkinase C wirkenden Stimulators wurde auch an Kokultursphäroiden eine deutliche Sprossung ausgelöst.

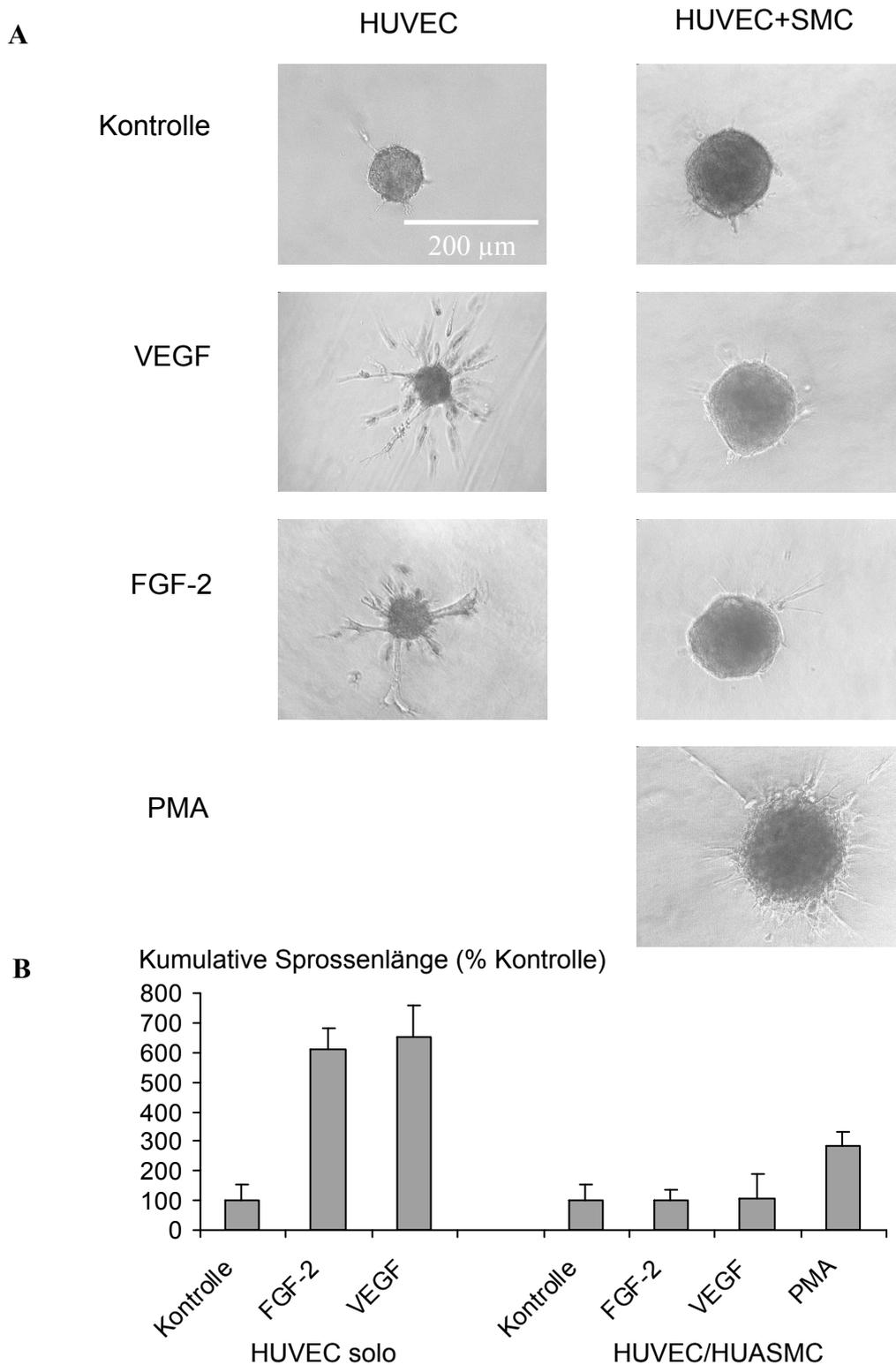


Abb. 3.3: Angiogeneseassay mit Sphäroiden aus vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen. 2 Tage alte Solosphäroide aus HUVEC und 5 Tage alte Kokultursphäroide aus HUVEC und HUASC wurden in Kollagen eingebettet und zwei Tage inkubiert. 5 µg/ml Heparin sowie 50 ng/ml VEGF 50 ng/ml FGF-2, oder 15 ng/ml PMA (Positivkontrolle für Kokultursphäroide) wurde den entsprechenden Ansätzen zugegeben. (A) Repräsentative Auswahl. (B) Statistische Auswertung der Stimulation nach der kumulativen Länge der 5 längsten Sprosse je Sphäroid (n=8).

3.1.4 Differenzierte räumliche Expression in Sphäroiden

An der Außenschicht von Solosphäroiden wurde eine intensivere Expression des für vaskuläre Endothelzellen typischen Zelladhäsionsmoleküls CD 31 (PECAM-1), sowie die selektive Stimulierbarkeit für die ebenfalls untersuchten VCAM-1 und ICAM-1 nachgewiesen (Korff und Augustin, 1998).

Während diese Moleküle die Bindung von Blutzellen an das Endothelium vermitteln, sind für die Bindungen der Gefäßzellen untereinander hauptsächlich Cadherine verantwortlich. Die homotypischen Kontakte zwischen Endothelzellen entstehen durch VE-Cadherin und für die heterotypische Verbindung mit glatten Muskelzellen oder Perizyten wird N-Cadherin als Hauptbindemolekül vermutet (Konstantopoulos und McIntire, 1996; Navarro *et al.*, 1998). Neben parakrinen Einflüssen, wie der Produktion von Angiopoitin-1 durch die glatten Muskelzellen könnte durch deren Bindung an die Endothelzellen auch eine Cadherin-vermittelte Signaltransduktion regulierend wirken, wie das von anderen Zelltypen her bekannt ist (Whelock und Johnson, 2003a). Bei der Verankerung an das Actingerüst ist β -Catenin beteiligt, das bei den Endothelzellen an der Signaltransduktion zur Regulation und Organisation in der Angiogenese mitwirkt (Vincent *et al.*, 2004). Eine Immunfärbung gegen die Bindeproteine sollte veranschaulichen, ob und wie deren Verteilung durch die Organisation der Zellen im Sphäroid bestimmt wird. Außerdem sollte die Markierung von zwei Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP γ und PTP ζ) zeigen, wie die Expression von Oberflächenrezeptoren der Endothelzellen in dem Modell beeinflusst wird.

Zur Immunfärbung wurden zwei Tage alte Solosphäroide aus 750 HUVE-Zellen und fünf Tage alte Kokultursphäroide aus je 1500 HUVEC und HUASMC verwendet. Wie bei der Verteilung von VE-Cadherin (Abb. 3.1) wurde die Expression von N-Cadherin im Solosphäroid ebenfalls nicht durch eine Differenzierung der Zellen beeinträchtigt und war im gesamten Medianschnitt zu beobachten. Ein anderes Bild zeigt die Verteilung von β -Catenin, das im Zentrum eine gleichförmige Verteilung aufweist, während es in den Randzellen mehr im Bereich der Membran konzentriert zu sein scheint. Die Rezeptoren PTP γ und PTP ζ sind im Kern nicht nachzuweisen und werden nur im äußeren Bereich der Sphäroide exprimiert (Abb. 3.4).

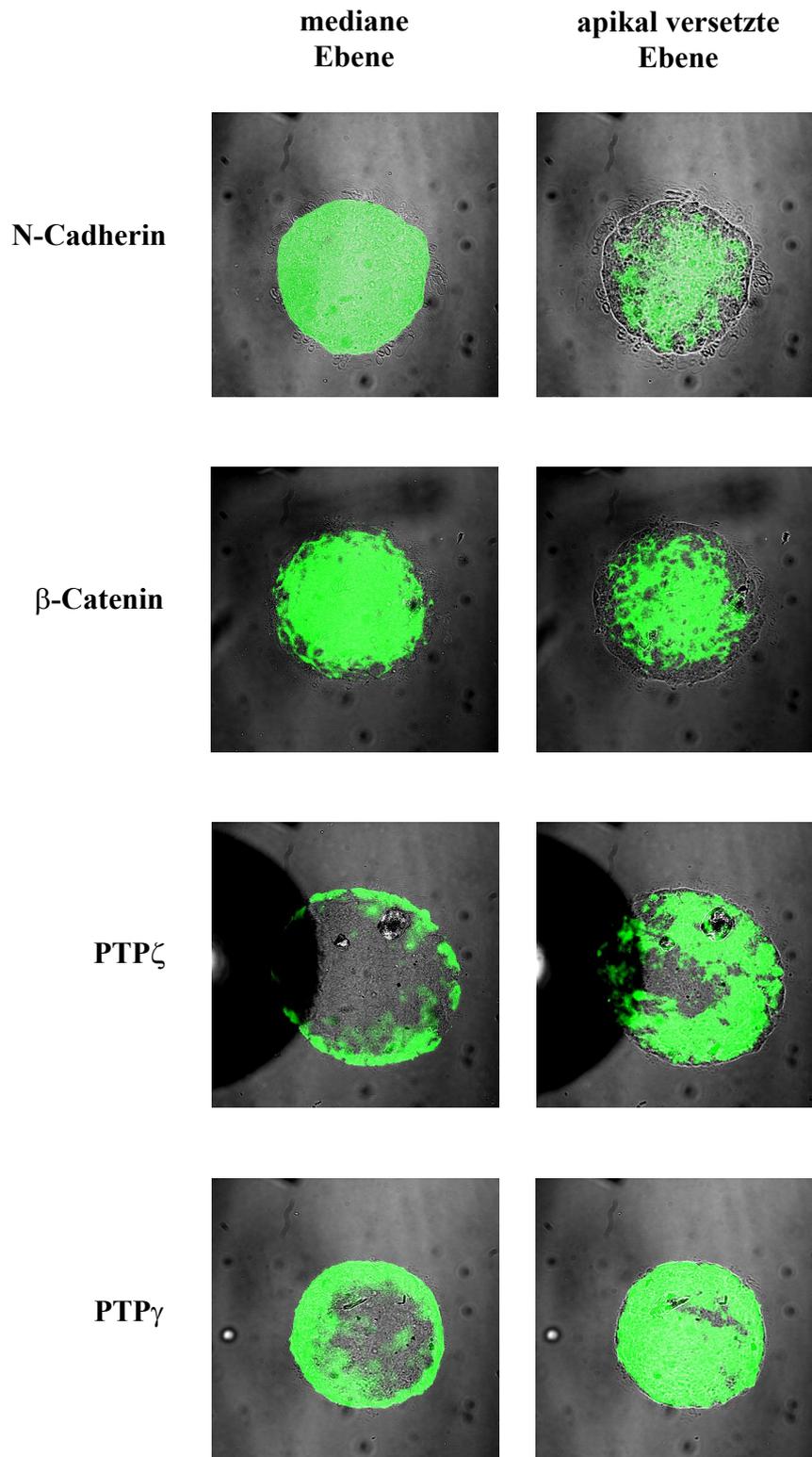


Abb. 3.4: Differenzielle räumliche Expression im Sphäroid aus vaskulären Endothelzellen. Zwei Tage alte Solosphäroide aus je 750 HUVEC wurden in Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Nach der Erstantikörperinkubation erfolgte eine Bindung mit FITC-gekoppelten Zweitantikörpern. Die Aufnahmen zeigen links je einen Median- und rechts einen apikal versetzten Schnitt von Färbungen mit Antikörpern gegen N-Cadherin, β -Catenin, PTP ζ und PTP γ .

Analog zu den Versuchen bei den Solosphäroiden wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen auch untersucht, wie der zelluläre Aufbau im Kokultursphäroid die Anordnung von N-Cadherin und β -Catenin beeinflusst (Abb. 3.5). In der medialen Schnittebene ist N-Cadherin in einem breiten Ring der Muskelzellschicht auszumachen, der lediglich den inneren Kernbereich ausnimmt und bis an die Endothelzellen reicht. β -Catenin ist im größten Teil des Zentrums nicht nachzuweisen, sondern zeigt sich in einem mehrzellschichtigen Außenring des Sphäroids. Antikörper gegen PTP γ , PTP ζ und Von Willebrand-Faktor banden, wie jene gegen VE-Cadherin, ausschließlich einen Monolayer an der Oberfläche, der den elongierten Endothelzellen zugeordnet werden konnte.

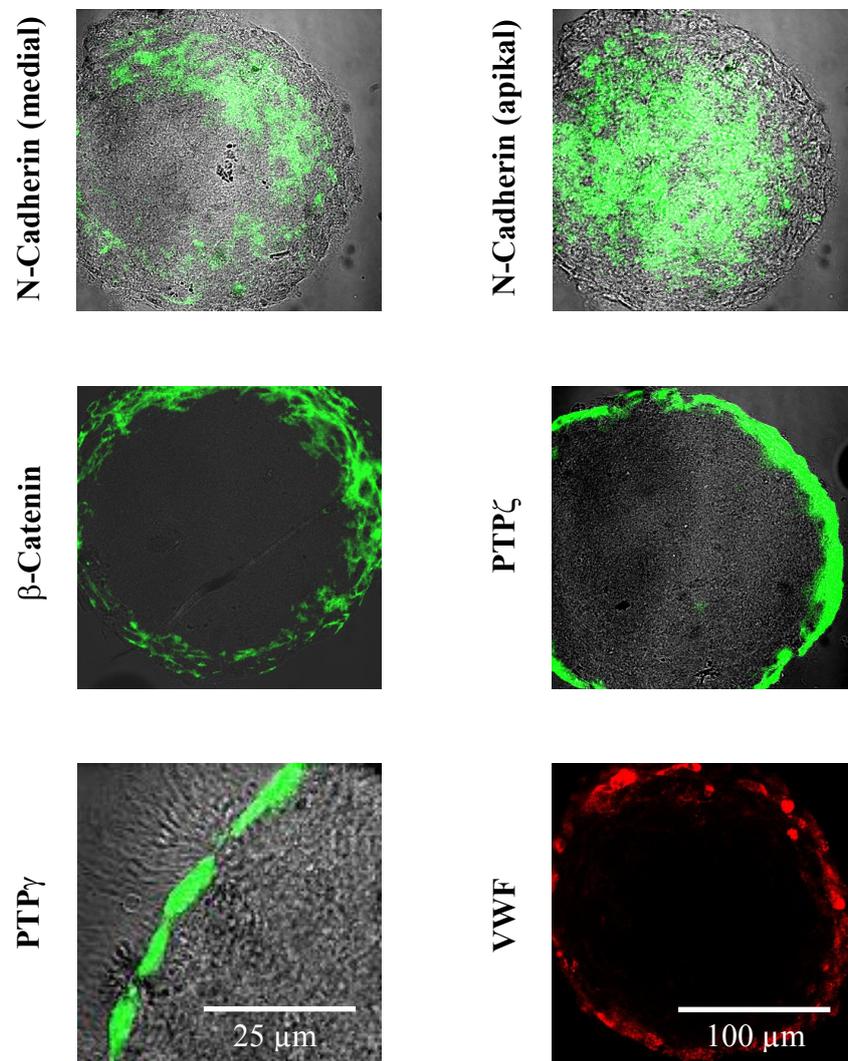


Abb. 3.5: Immunfluoreszenzfärbungen von Kokultursphäroiden aus vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen. 5 Tage alte Kokultursphäroide aus je 1500 HUVE- und HUASM-Zellen wurden wie unter 2.12.6 beschrieben fixiert und gefärbt. Primäntikörper wurden eingesetzt gegen N-Cadherin (zu sehen sind die mediale und eine apikal versetzte Schnittebene), β -Catenin, PTP ζ , PTP γ (vergrößerter Ausschnitt) und Von Willebrand-Faktor (mediale Schnittebenen). Die Zweitantikörper waren FITC- (grün) oder Texas Red-konjugiert (rot).

3.1.5 Die Bildung von Kapillarsprossen wird durch gleichzeitige Reizung von migrativen und proliferativen Einflüssen veranlasst

Zur Analyse der Wirkung von migratorischen und proliferatorischen Effekten wurden in einer ersten Untersuchung zwei Tage alte Sphäroide aus vaskulären Endothelzellen im Gel mit zugesetzten Fibroblastenwachstumsfaktoren inkubiert, bei denen neben dem FGF-2 auch andere Familienmitglieder als angiogenetisch wirksam beschrieben worden sind. Hierzu zählen FGF-1 und FGF-4, von FGF-5 wird eine pro-angiogenetische Aktivität vermutet (Nabel *et al.*, 1993; Rissanen *et al.*, 2003; Powers *et al.*, 2000). Neben diesen wurden mit FGF-16 und FGF-18 zwei Faktoren eingesetzt, deren Wirkung auf Endothelzellen nicht bekannt war. Nach eintägiger Inkubation war in einigen Ansätzen eine deutliche Aussprossung zu erkennen. Nach zwei Tagen erfolgte eine Auswertung, indem die Ausdehnung der drei längsten Sprosse eines Sphäroids in einer zweidimensionalen Ansicht addiert wurde. Gegenüber der Kontrolle ohne Faktorzusatz zeigten neben FGF-2 auch FGF-1 und FGF-4 eine deutliche Zunahme der Sprossung, FGF-5 schien einen leicht positiven Effekt auszuüben, während FGF-16 und FGF-18 ohne Wirkung blieben (Abb. 3.6).

In einem weiteren Ansatz wurde die Analyse von migratorischen und proliferativen Einflüssen mit den Faktoren, die im Sprossungsversuch ein signifikantes positives (FGF-1, -2 und -4) oder negatives Ergebnis (FGF-16 und -18) aufwiesen, in einem *Wounding Assay* durchgeführt. Dazu wurde durch einen konfluenten Endothelzellrasen auf einer Kulturschale eine gleichmäßig breite Schneise abgeschabt. In dem zellfreien Bereich konnte dann verfolgt werden, ob unter dem Einfluss des zugesetzten Fibroblastenwachstumsfaktors ein beschleunigtes Einwachsen vom Seitenrand erfolgte und ob dabei eine Teilung der Zellen stattfand.

Bei allen Testansätzen konnte im Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Migration der Endothelzellen beobachtet werden. Der abgeschabte zellfreie Bereich war nach spätestens fünf Tagen - außer bei der Kontrolle ohne zugesetzten Faktor - überbrückt worden. Aber nur bei FGF-2, -1 und -4, in der Reihenfolge der abnehmenden Stärke, war auch eine proliferative Wirkung zu beobachten (Abb. 3.7).

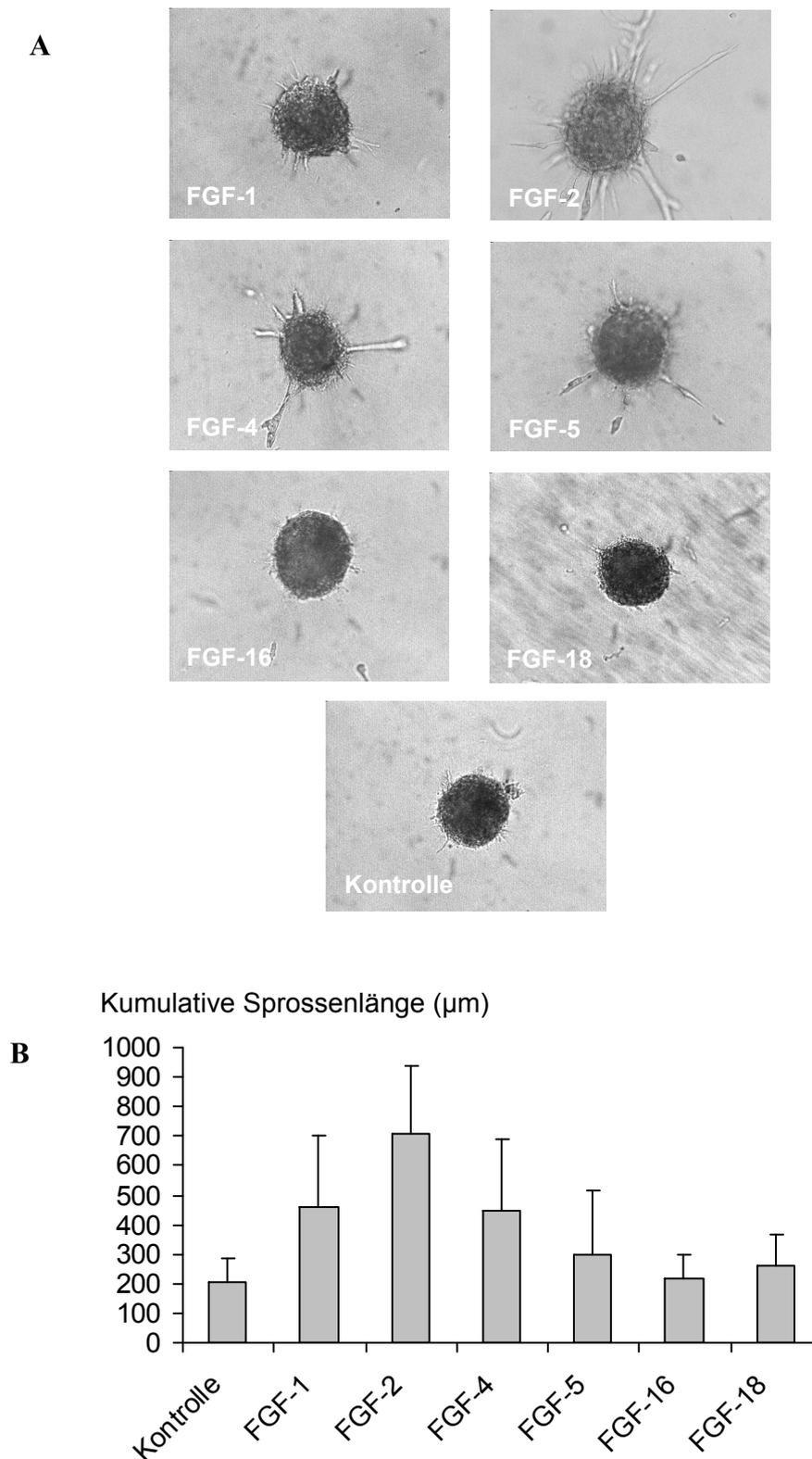


Abb. 3.6: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Sprossung von Sphäroiden aus vaskulären Endothelzellen. Solosphäroide wurden generiert aus jeweils 750 HUVE Zellen. Nach zwei Tagen wurden die Sphäroide in Kollagen eingebettet, unter Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin und 50 ng/ml der entsprechenden Wachstumsfaktoren. Die Auswertung erfolgte nach 48stündiger Inkubation. (A) Repräsentative Aufnahmen der Sphäroide im Kollagengel. (B) Statistische Auswertung nach der kumulativen Länge der 3 längsten Sprosse an einem Sphäroid. Pro Ansatz sind n=10 zufällig ausgewählte Sphäroide zur Berechnung verwendet worden.

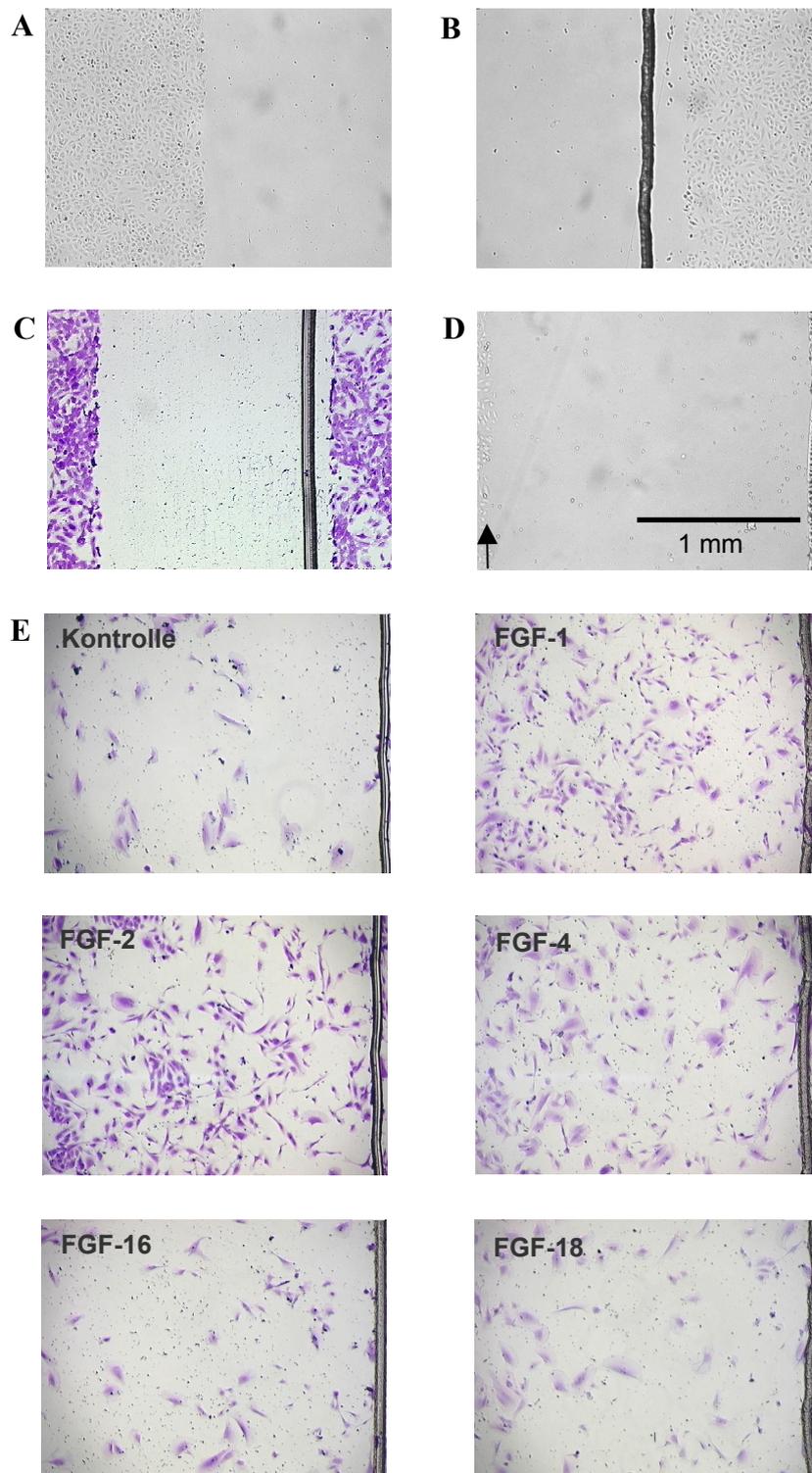


Abb. 3.7: *Wounding Assay mit vaskulären Endothelzellen.* Auf kollagenbeschichteten Kulturschalen wurden HUVE-Zellen zu einem konfluenten, ruhenden Monolayer wachsen lassen. Ein schmaler Zellstreifen wurde abgeschabt, wobei an einer Seite eine Furche als Zellbarriere in den Plastikuntergrund gezogen wurde (B; C nach Färbung mit Kristallviolett), während die Zellen von der anderen Seite der Wunde die ungehinderte Möglichkeit zur Migration hatten (A, C). Zum Test migrativer und proliferativer Wirkung erfolgte eine Inkubation von Zellrasen mit jeweils 2 mm breiter Schneise (D, der Rand des Zellrasens ist mit einem Pfeil markiert) in Minimalmedium ohne (Kontrolle) oder mit Zusatz von jeweils 50 ng/ml FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-16 und FGF-18 (E). Nach fünftägiger Inkubation wurden die Proben mit Paraformaldehyd fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Um den fehlenden Einfluss von FGF-16 und FGF-18 auf die Zellvermehrung zu bestätigen, wurde ein Test mittels Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) durchgeführt. Auch hier war gegenüber der Negativkontrolle kein positiver Effekt dieser Fibroblastenwachstumsfaktoren zu verzeichnen (Abb. 3.8). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass Solosphäroide aus vaskulären Endothelzellen durch Zugabe eines einzigen Wachstumsfaktors zur Bildung von Kapillarsprossen angeregt werden können. Die untersuchten Faktoren mussten allerdings gleichzeitig auf mehrere angiogenetische Teilprozesse (Migration und Proliferation) einwirken, nur migrative Eigenschaften reichten dazu nicht aus.

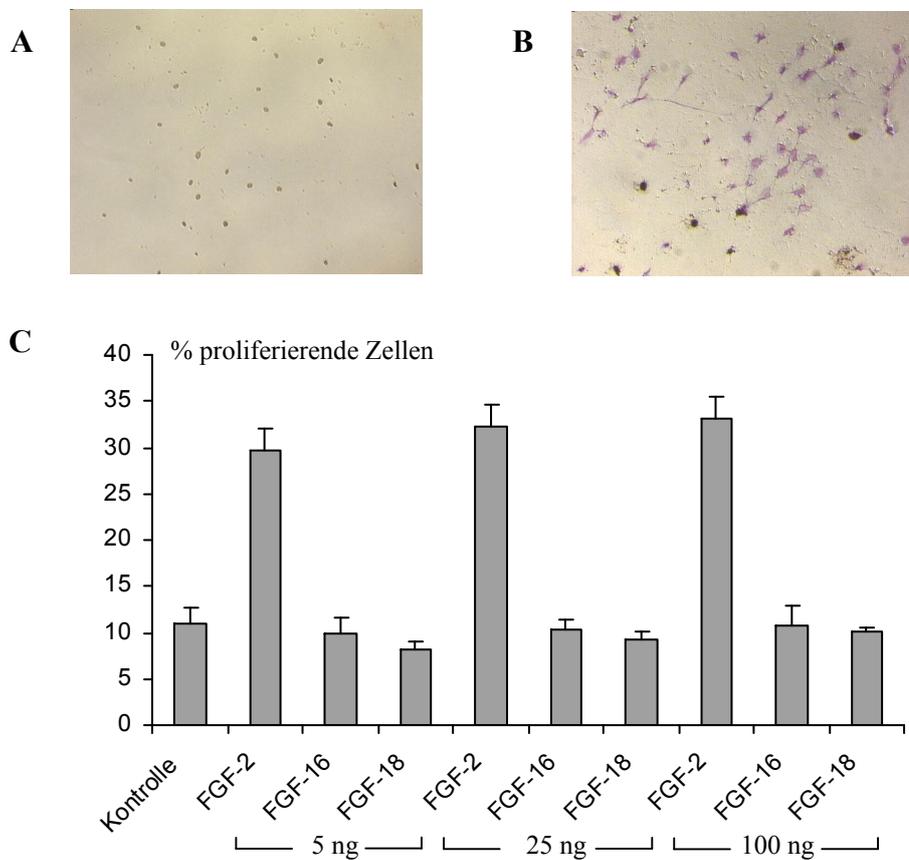


Abb. 3.8: *BrdU*-Proliferationsassay mit vaskulären Endothelzellen. HUVEC wurden auf Kollagen-beschichtetem Untergrund bis zur 50 %igen Konfluenz kultiviert, in Basalmedium mit 1 % ECGM und 5 μ g/ml Heparin 48 Stunden hungern lassen und im Anschluss mit Zusatz von FGF-2, FGF-16 und FGF-18 in Konzentrationen von je 5, 25 und 100 ng/ml weitere 20 Stunden inkubiert. Vier Stunden vor Ende der Inkubation wurde BrdU in einer Endkonzentration von 10 μ M zugesetzt. Nach Fixierung und Denaturierung erfolgte eine Markierung mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper. Durch eine Färbung mit DAB wurden die Kerne mit eingebautem BrdU gekennzeichnet (A). Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde mit Kristallviolett gefärbt (B). In der Tabelle sind die durch DAB-Färbung gekennzeichneten Zellkerne im prozentualen Verhältnis zur Gesamtzellzahl aufgeführt (n=1000) (C).

3.2 Untersuchungen an kultivierten hepatischen Sternzellen

HSC sind Perizyten der sinusoidalen Endothelzellen. Bei chronischer Schädigung der Leber werden HSC aktiviert und transdifferenzieren zu einem myofibroblastischen Phänotyp aus. Diese gelten als möglicher Kandidat für perizytäre Zellen in neu gebildeten vaskulären Strukturen im Bereich der Sinusoide. Anlass zu dieser Vermutung, die jedoch bis heute nicht nachgewiesen ist, gibt neben der natürlichen Lage der HSC im angrenzenden Disse'schen Raum die Ähnlichkeit des transdifferenzierten Typus zu SMC. Ich wollte untersuchen, wieweit HSC auf der Linie zu vaskulären SMC differenzieren. Eine offensichtliche Übereinstimmung gibt es bei der Ausbildung eines kontraktilen Apparates, dessen Gemeinsamkeit in der α SMA-Komponente am eingehendsten dokumentiert ist (Rockey *et al.*, 1992). Untersuchungen an Sternzellen, die aus Rattenleber isoliert und *in vitro* aktiviert wurden, sollten zeigen, inwieweit eine Transdifferenzierung in Richtung eines glatten Muskelzell-ähnlichen Phänotyps festzustellen ist. Hierzu wurden Stern- und Muskelzellen als Monolayer kokultiviert und die Expression von typischen SMC-Markern in den HSC mit Immunfluoreszenz und über RT-PCR analysiert. Die Expressionsmuster der beiden Zelltypen wurden untereinander und mit dem portalen Myofibroblasten verglichen, die ebenfalls als Perizyten in den pathologisch veränderten Sinusoiden in Erwägung gezogen werden. Ob aktivierte HSC durch die Produktion von Angiopoitin-1 dazu befähigt sind, Endothelzellen eines vaskulären Blutgefäßes parakrin stabilisieren zu können, sollte durch den Nachweis des Transkriptionsproduktes geklärt werden.

3.2.1 Kokultivierung von Monolayern aus glatten Muskelzellen und hepatischen Sternzellen

Das Erscheinungsbild von hepatischen Sternzellen, die auf Plastikschalen aktiviert wurden, gleicht dem von kultivierten vaskulären glatten Muskelzellen. Um die optische Übereinstimmung zu veranschaulichen und das Verhalten an den Zellgrenzen zu erkunden, wurden HUASMC, die mit einem fluoreszierenden Membranfarbstoff (PKH 26) markiert worden waren, als Kokultur zusammen mit sieben Tage voraktivierten HSC auf kollagenbeschichteten Deckgläschen ausplattiert. Es bildete sich ein einschichtiger Zellrasen, an dem eine eindeutige phänotypische Unterscheidung in der Durchlichtansicht nicht möglich war. Die Fluoreszenzmarkierung der SMC zeigte, dass beide Zelltypen in einer gemischten Population vor-

lagen. Dabei wurden teilweise enge Zellkontakte zwischen benachbarten Stern- und Muskelzellen gebildet (Abb. 3.9).

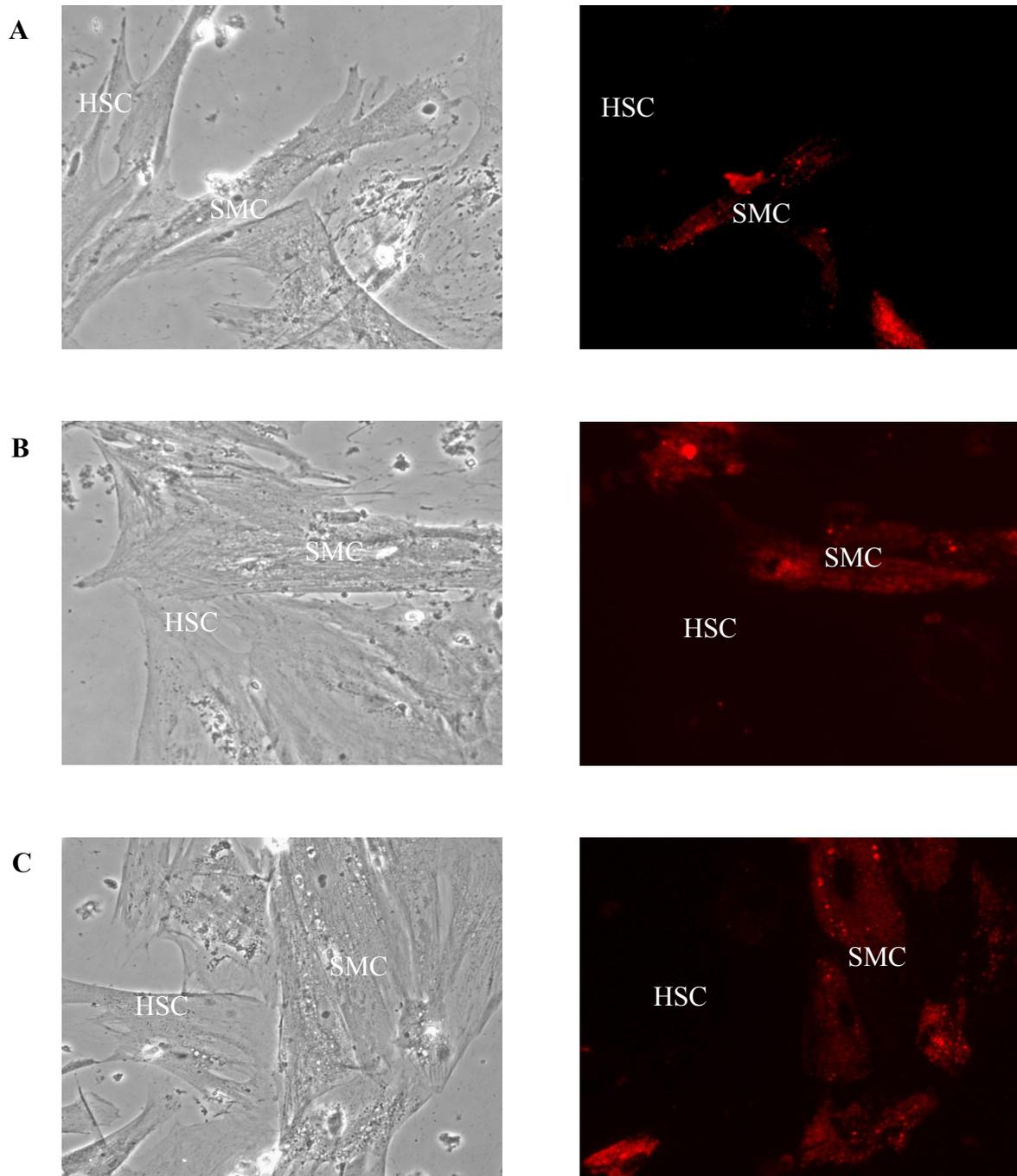


Abb. 3.9: *Benachbarte glatte Muskel- und aktivierte hepatische Sternzellen in einer Monolayer-Kokultur.* Nach der Präparation 7 Tage auf Plastikschalen kultivierte HSC wurden gemeinsam mit HUASMC für weitere drei Tage inkubiert. Die Muskelzellen waren zuvor mit einem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff (PKH 26) markiert worden. Die Bilderpaare (A, B und C) zeigen jeweils gleiche Ausschnitte des Zellraums, links als Transmissions- und rechts als Fluoreszenzaufnahme.

3.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung von glatten Muskelzell-Markern in aktivierten hepatischen Sternzellen

Bei der Transdifferenzierung von HSC verläuft die Rückbildung der typischen zellulären Merkmale, Lipidtröpfchen und lange zytoplasmatische Ausläufer, parallel mit der Ausbildung von kontraktilen Strukturen und der damit verbundenen Expression von Proteinen, die als typische Marker von vaskulären SMC bekannt sind. Zu den Genen, die als Isoformen von Proteinen des kontraktilen Apparates bevorzugt durch vaskuläre SMC exprimiert werden, zählen α -Smooth Muscle Actin (α SMA), Calponin und Smooth Muscle 22 α (SM22 α) (Weissberg *et al*, 1995). Myofibroblasten-ähnliche Zellen (sMFB), die aus der *In-vitro*-

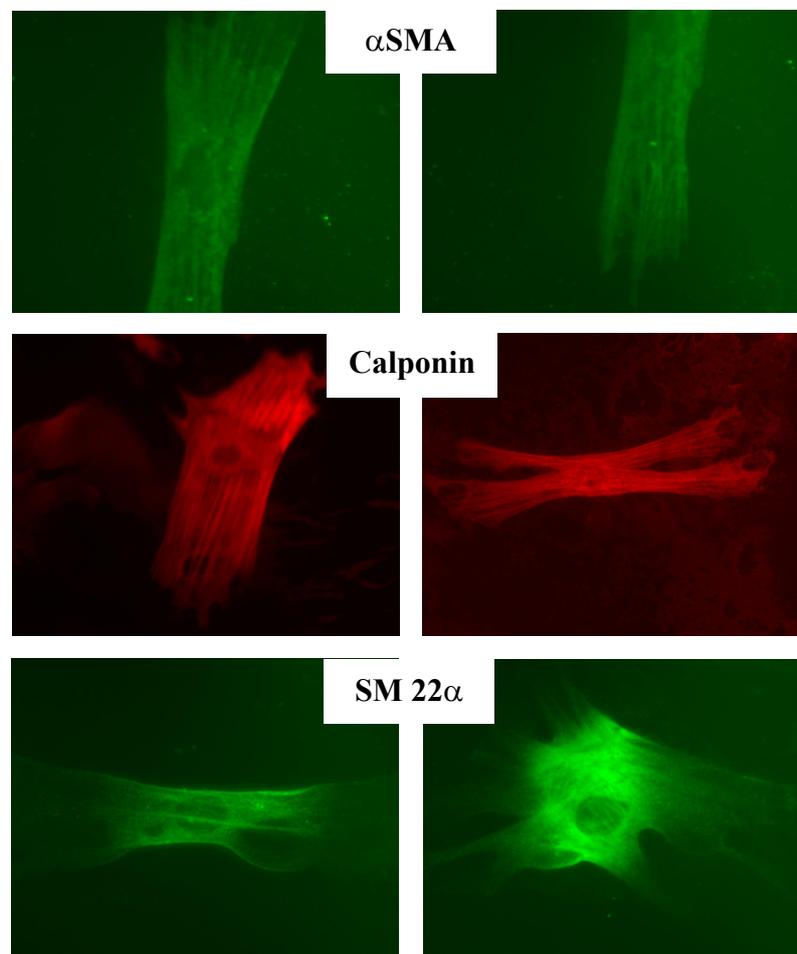


Abb. 3.10: Immunmarkierung von glatten Muskelzell-typischen Antigenen in aktivierten Sternzellen. Aus HSC *in-vitro*-differenzierte Myofibroblasten-ähnliche Zellen (sMFB) wurden nach dreitägiger Kultivierung auf Kollagen-beschichteten Glasplättchen fixiert und permeabilisiert. Eine Immunmarkierung erfolgte mit Antikörpern gegen α SMA (Zweitantikörper FITC-gekoppelt), gegen Calponin (Zweitantikörper Texas-Red-gekoppelt) und gegen SM 22 α (Zweitantikörper FITC-gekoppelt).

Differenzierung von kultivierten hepatischen Sternzellen der Rattenleber gewonnen worden waren, wurden phänotypisch auf diese drei Marker mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 3.10). Die Färbungen zeigten eine deutliche Markierung von den in den Myofibroblasten ausgebildeten kontraktile Strukturen an denen α SMA, Calponin und SM22 α beteiligt waren.

3.2.3 Nachweis der mRNA von glatten Muskelzell-Markern in aktivierten Sternzellen und Myofibroblasten-ähnlichen Zellen (sMFB)

Um den Verlauf der mRNA-Synthese für die SMC-typischen Marker während der Aktivierung von HSC zu untersuchen, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden mit Caldesmon, SM MHC, Smoothelin und ACLP weitere Komponenten des kontraktile Apparates ausgewählt, sowie die Transkription von Myocardin und N-Cadherin untersucht.

Caldesmon, Smoothelin und ACLP gehören wie SM22 α und Calponin zu den frühen SMC-Differenzierungs- und Reifungsmarkern, die in verschiedenen Entwicklungsstadien und -bedingungen auch in einigen anderen Zelltypen nachgewiesen worden sind. Im Gegensatz zu diesen scheint SM MHC nach bisherigen Untersuchungen nur in SMC exprimiert zu werden und positive Ergebnisse von Immunfärbungen stellten sich als Kreuzreaktion der Erstantikörper mit einer nichtmuskulären Isoform heraus (Owens *et al.*, 2004). Auch die Expression von Myocardin, einem Koaktivator des *Serum Response Factors* (SRF), wurde bislang nicht in Myofibroblasten oder Myofibroblasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen.

Getestet wurden frisch isolierte, auf Plastikschalen bis zu 7 Tagen aktivierte HSC und sMFB (Abb. 3.11). Bei der Wahl der Primer wurde auf die Auswahl eines nicht zu den Isoformen komplementären Bindungsbereiches geachtet. Zur Absicherung des Ergebnisses wurde im Anschluss zur PCR eine Sequenzierung durchgeführt.

Bei der Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel konnten alle untersuchten Marker in HSC nachgewiesen werden, in den Ansätzen von SM22 α , α SMA, Calponin, Caldesmon und SM-MHC jedoch erst ab Tag 1 der Aktivierung. Eine Zugabe von TGF- β zu den 7 Tage inkubierten sMFB zeigte keine Wirkung auf die Transkription von SMC-Markern.

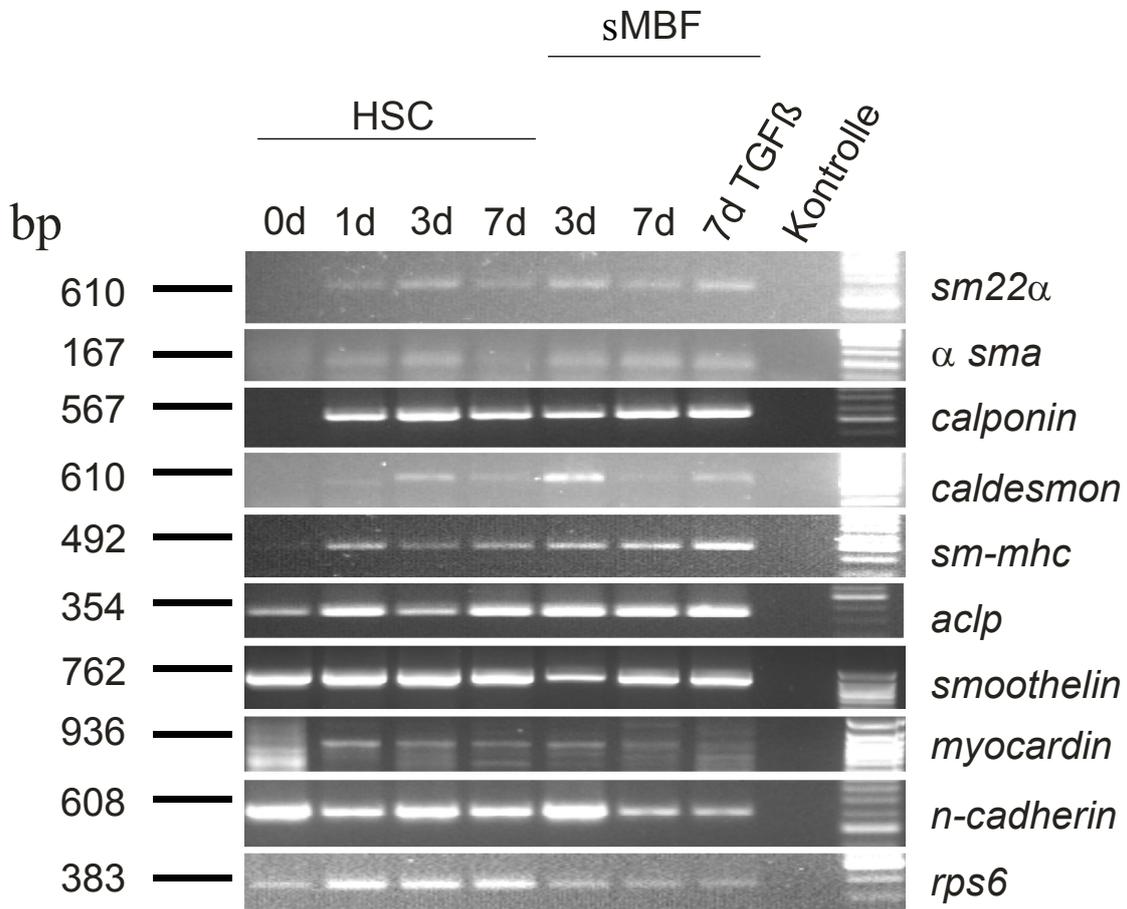


Abb. 3.11: RT-PCR von glatten Muskelzell-Markern in primären und in-vitro-aktivierten Sternzellen. Aus Rattenleber isolierte HSC wurden entweder frisch (HSC 0d) oder nach unterschiedlicher Voraktivierungsdauer verwendet. Die Aktivierung erfolgte durch Kultivierung der Zellen auf Plastikschalen von einem bis sieben Tage (HSC 1d, 3d und 7d). Für sMBF wurden sieben Tage kultivierte HSC trypsiniert und neu ausplattiert (sMBF 3d und 7d), teilweise mit Zusatz von 5 ng/ml TGFβ im Medium. Nach RT der isolierten RNA wurden Primer für die SMC-typischen Marker SM22α, αSMA, Calponin, Caldesmon, SM-MHC, ACLP, Smoothelin, Myocardin und N-Cadherin zur Amplifizierung eingesetzt. Zum Vergleich ist das Ergebnis für die RNA des ribosomalen Proteins S6 aufgeführt.

3.2.4 Expression von typischen Markerproteinen glatter Muskelzellen in aktivierten hepatischen Sternzellen

Für α SMA, SM22 α , Calponin und Myocardin wurde die Proteinexpression während der *In-vitro*-Aktivierung von HSC untersucht. Hierzu wurden die Proteine aus Zellextrakten von frisch isolierten sowie verschieden lange auf Plastikschalen kultivierten HSC im SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran gebロットet und die spezifischen Banden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Es zeigte sich bei Myocardin eine Expression ab Tag 1, bei α SMA, SM22 α und Calponin eine Expression ab Tag 3 der HSC-Aktivierung, mit einer weiteren Verstärkung bei andauernder Aktivierung (Abb. 3.12).

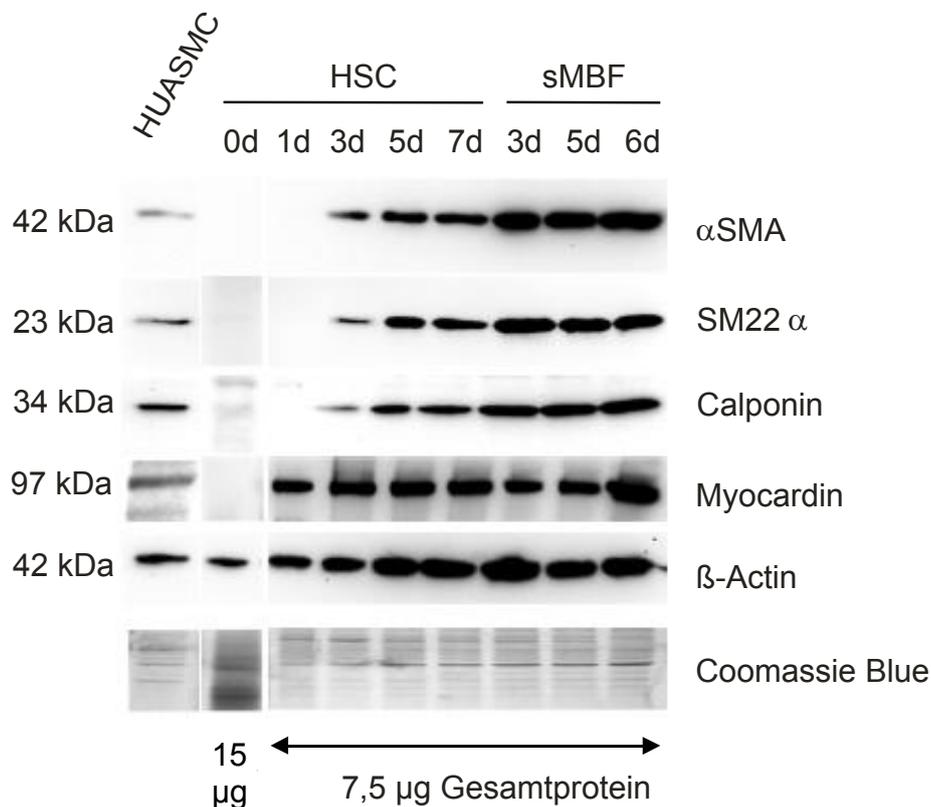


Abb. 3.12: Western-Blot-Analyse der Expression von glatten Muskelzell-Markern in primären und in-vitro-aktivierten hepatischen Sternzellen. Zellextrakte wurden verwendet von kultivierten HUASMC und aus Rattenleber isolierten HSC, entweder frisch (HSC 0d) oder nach unterschiedlicher Voraktivierungsdauer (HSC 1d – 7d, sMFB 3d – 6d). Oberer Teil: Immundetektion nach Western-Blot. Unten: Gesamtproteinfärbung mit *Coomassie-Blue* zur Ladungskontrolle.

3.2.5 Vergleich des Expressionsmusters von vaskulären glatten Muskelzellen, hepatischen Sternzellen und portalen Myofibroblasten

In neueren Untersuchungen wurde die Expression von Neurotrophinen und Neurotrophinrezeptoren an hepatischen Sternzellen der Leber gezeigt, was zuvor bereits bei vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen worden war (Cassiman *et al.*, 2001; Donovan *et al.*, 1995; Nemoto *et al.*, 1998). Im Hinblick auf die Diskussion, ob in den Sinusoiden der Leber bevorzugt aktivierte Sternzellen oder portale Myofibroblasten glatte Muskelzell-ähnliche Aufgaben und Funktionen beim Aufbau vaskulärer Strukturen übernehmen, sind in Tabelle 3.1 die Expressionsmuster der drei Zelltypen mit ausgewählten SMC-Differenzierungsmarkern, Neurotrophinen und Neurotrophinrezeptoren gegenübergestellt. Im Vergleich zeigt sich eine fast vollständige Deckung des Expressionsmusters von aktivierten HSC mit vaskulären glatten Muskelzellen, während die portalen Myofibroblasten eine weniger gute Übereinstimmung aufweisen.

	aHSC	Portale MF	VSMC
α -SMA	+	+	+
Calponin	+	n.d.	+
SM22 α	+	n.d.	+
Caldesmon	+	n.d.	+
SM MHC	+	n.d.	+
ACLP	+	n.d.	+
Smoothelin	+	n.d.	+
Myocardin	+	n.d.	+
GFAP	+	±	±
N-CAM	+	+	+
NGF	+	±	+
NT-3	+	-	+
Trk-B	+	-	+
Trk-C	+	-	+

Tabelle 3.1: *Expressionsmuster von HSC, portalen Myofibroblasten und vaskulären SMC der Ratte.* Den eigenen Ergebnissen mit aktivierten HSC (linke Spalte) sind zum Vergleich Literaturwerte von portalen Myofibroblasten (MF) und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) gegenübergestellt (rechte Spalten). ACLP: *carboxypeptidase-like Protein*; GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; N-CAM: *neural-cell adhesion molecule*; NGF: *nerve growth factor*; NT-3: Neurotrophin-3; Trk: Tyrosinkinase; +: positiv; -: negativ; ±: schwach positiv; n.d.: nicht ermittelt. (Literaturwerte ergänzt nach Cassiman *et al.*, 2002.)

3.2.6 Aktivierte hepatische Sternzellen der Ratte exprimieren Angiopoietin-1 und -2

Eine Schlüsselstellung bei der Interaktion zwischen glatten Muskelzellen und vaskulären Endothelzellen nimmt die Bindung der Angiopoietine an den Tie-2 Rezeptor ein. Nur ein kontinuierliches Signal durch das parakrin wirkende Angiopoietin-1 und ein ausreichend hohes Verhältnis zum autokrin agierenden Ang-2 hält die Endothelzellen der Gefäße in einem stabilen, ruhenden Zustand (Jain und Munn, 2000; Scharpfenecker *et al.*, 2005). Der Nachweis der Expression von Angiopoietin-1 sollte belegen, dass die Möglichkeit der Übernahme dieser grundlegenden perizytären Funktion durch aktivierte Sternzellen gegeben ist. Dazu wurde RNA von aktivierten HSC aus Rattenleber in einer RT-PCR auf die Produktion von Angiopoietinen untersucht. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zeigt, dass eine mRNA-Produktion sowohl von Angiopoietin-1, wie auch Angiopoietin-2 durch *in-vitro*-kultivierte hepatische Sternzellen erfolgt (Abb. 3.13).

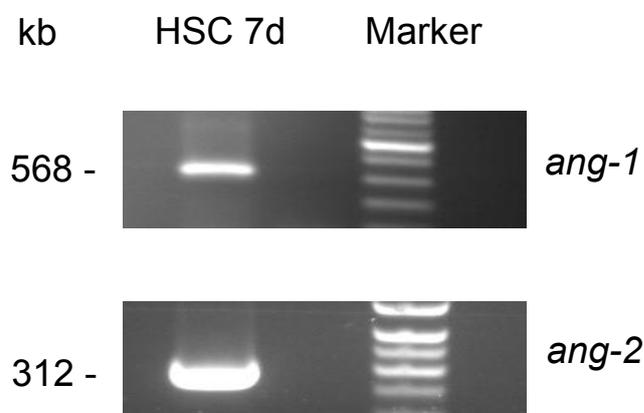
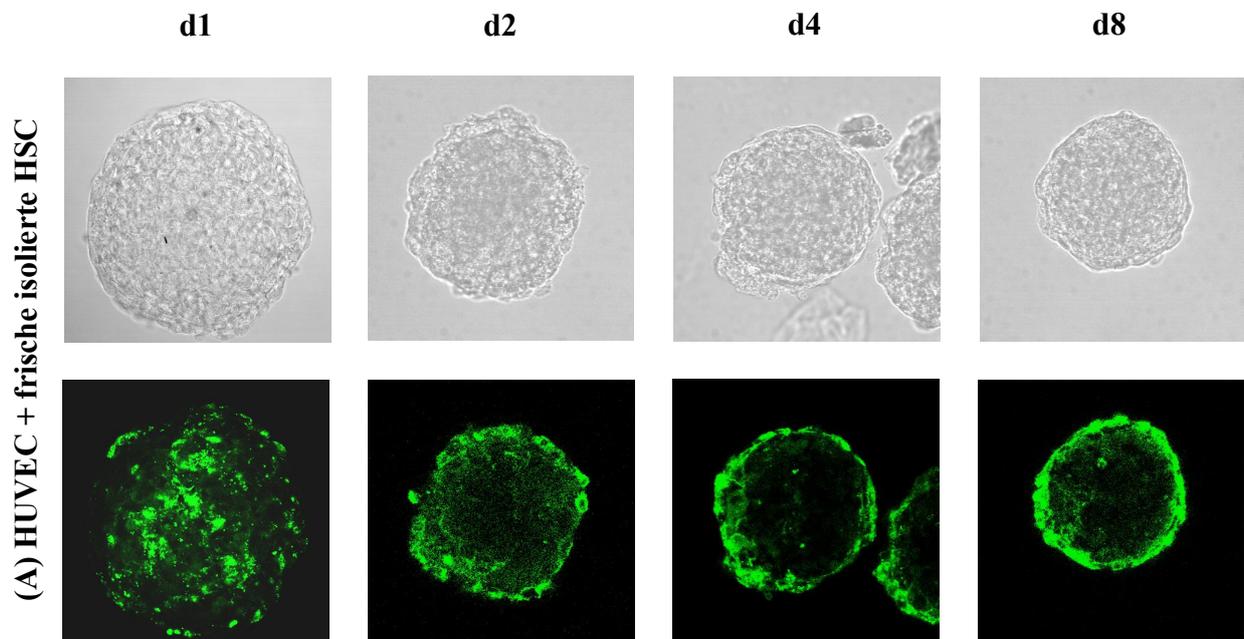


Abb. 3.13: Expression von Angiopoietin in aktivierten hepatischen Sternzellen. RNA wurde aus 7 Tage *in-vitro*-aktivierten HSC der Rattenleber (HSC 7d) isoliert. Eine RT-PCR erfolgte mit Primern für Angiopoietin-1 (*ang-1*) und Angiopoietin-2 (*ang-2*).

3.3 Bildung und Charakterisierung eines Kokultursphäroids aus vaskulären Endothelzellen und hepatischen Sternzellen

Zur Übertragung des Modells auf Leberzellen sollte zuerst untersucht werden, ob sich hepatische Sternzellen als Ersatz der glatten Muskelzellen in einem Kokultursphäroid mit vaskulären Endothelzellen formierten. Die Möglichkeit der Bindung über N-Cadherin war theoretisch gegeben, da eine Expression auch in aktivierten Sternzellen stattfindet (Abb. 3.11). Daher und aufgrund der festgestellten Ähnlichkeiten im Expressionsmuster der SMC-Marker (Tab. 3.1) bestand die Erwartung, dass eine ähnliche Organisation wie beim EC/SMC-Sphäroid zustandekam. Zur Charakterisierung der Sphäroide wurde der zelluläre Aufbau durch Immunfluoreszenzen und Hämatoxylinfärbungen von Schnittpräparaten untersucht. Ein detaillierterer Einblick, insbesondere auf die Kontaktzone zwischen Endothel- und Sternzellen, sollte durch Aufnahmen am Transmissions-Elektronenmikroskop ermöglicht werden. Zur Beurteilung des Differenzierungsstatus wurde die räumliche Verteilung von α SMA als typischem Marker der HSC-Aktivierung analysiert. Die Auswirkungen, die sich im Modell aus dem direkten Kontakt der Sternzellen auf das Sprossungsverhalten der Endothelzellen ergaben, wurden in einem Angiogeneseassay durch Kollageneinbettung der Sphäroide ermittelt.



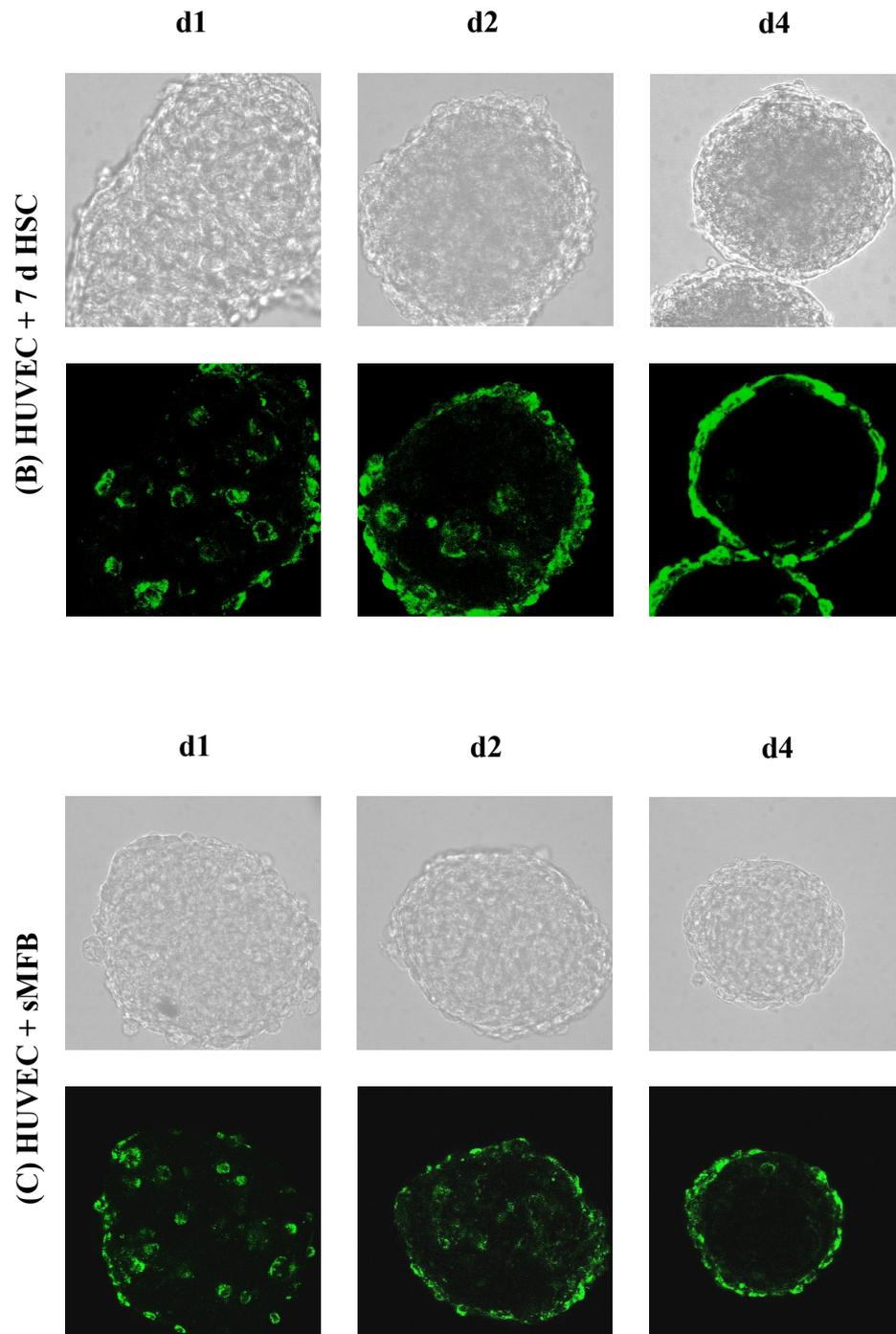


Abb. 3.14: Verlauf der Bildung eines Kokultursphäroids aus Stern- und Endothelzellen. Sternzellen aus der Rattenleber wurden zusammen mit HUVEC als Suspensionskultur in Methocelmedium ausgesät. Zu 1500 Endothelzellen pro Napf einer 96-Loch Schale kamen 1500 frisch isolierte Sternzellen (A), 1500 sieben Tage auf Plastikschalen voraktivierte Sternzellen (B), oder 1000 Myofibroblasten (sMFB), die durch Trypsinieren der voraktivierten Sternzellen und erneuter Kultivierung über drei Tage gewonnen wurden (C). Die Bilder zeigen in der unteren Reihe die Sphäroide nach Immunfärbung gegen Von Willebrand-Faktor (Zweitantikörper FITC gekoppelt) als mediale Schnittansicht im Laserfluoreszenzmikroskop, in der oberen Reihe als Durchlichtansicht. *d1*, *d2*, *d4*, *d8*: Tage nach der Aussaat in Methocelmedium.

3.3.1 Die Organisation der Endothelzellen im Kokultursphäroid ist abhängig von der Differenzierung der Sternzellen

Um zu sehen, ob und wie der Differenzierungsgrad sich auf die Bildung von Sphäroiden auswirkt, wurden verschiedene Ansätze getestet mit frisch isolierten, sieben Tagen auf Plastikschalen voraktivierten HSC und mit drei Tage alten sMFB, jeweils zusammen mit HUVEC. Unter den beibehaltenen Kulturbedingungen in viskosem Methocelmedium hatte bereits nach einem Tag in allen drei Kombinationen die Anordnung zu einem Sphäroid stattgefunden. In den Ansätzen mit voraktivierten HSC wurden dabei fast alle der ausgesäten Zellen integriert, während sich in den Näpfen mit nicht vorkultivierten zusätzliche kleinere Zellgruppen formierten. Mit fortschreitender Inkubation nahmen die Sphäroide eine glatte abgerundete Gestalt an (Abb. 3.14). Eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den in vaskulären Endothelzellen exprimierten Von Willebrand-Faktor zeigte, dass die im Lichtmikroskop erkennbare Annahme einer äußeren abgerundeten Form einherging mit der zellulären Organisation innerhalb des Sphäroids. Entsprechend der Kokultur mit SMC formierten sich die Endothelzellen auch hier zu einer äußeren Schicht, die HSC bildeten den Kern. Die Geschwindigkeit der Organisation war dabei abhängig von der Voraktivierung der Leberzellen. Bei einer Kultivierung mit frisch isolierten HSC waren die Endothelzellen erst nach acht Tagen als Oberflächenschicht klar vom Kern getrennt, während dieser Prozess mit aktivierten oder zu Myofibroblasten transdifferenzierten HSC deutlich schneller vonstatten ging. Hier waren nach zwei bis vier Tagen fast alle Endothelzellen nur noch in einer einzelligen Schicht auf der Außenseite des Sphäroids lokalisiert.

3.3.2 Hepatische Sternzellen bilden feste Zellkontakte zum äußeren Endothelzellring

Zur eingehenden Untersuchung wurden 5 Tage alte Sphäroide aus HUVEC mit aktivierten HSC für eine Transmissionselektronenmikroskopie vorbereitet. Die im Vorfeld angefertigten Semidünnschnitte der in Epoxidharz eingebetteten Präparate wiesen durch das unterschiedliche Färbeverhalten mit Hämatoxylin ebenfalls eine Strukturierung auf, bei der sich ein äußerer Endothelzellring deutlich hervorhob (Abb. 3.15 A). In dem Ergebnis der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich, dass von den hepatischen Sternzellen im Kern ein Großteil nicht vital ist. Vor allem im Zentrum nimmt die Zahl von apoptotischen oder nekrotischen Zellen zu, während die meisten vitalen Zellen an der Grenzschicht zu den Endothelzellen zu finden sind. Nur hier lagern sie sich auch in Längsrichtung zur Oberfläche an, wie das von der

In-vivo-Situation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand her bekannt ist, während mit der Entfernung zum Endothelzellring eine Abnahme der Ordnungsstruktur zu erkennen ist. Dort, wo die aktivierten Sternzellen direkt an die Endothelzellen stoßen, liegen die Zellmembranen dicht aneinander an (Abb. 3.15 B). Durch eine *Whole-Mount*-Immunfärbung wurde die Verteilung von Cadherinen innerhalb der Sphäroide untersucht. Eine Markierung durch N-Cadherin- und Pan-Cadherin-Antikörper (die nach Herstellerangaben an alle bekannten Cadherine binden) weist bei der Betrachtung der medialen Ansicht einer Laser-Scanning-Aufnahme eine besonders starke Expression der Adhäsionsmoleküle in dem äußeren Bereich auf, der die Kontaktzone von Endothel- und Sternzellen bildet (Abb. 3.15 C).

3.3.3 Vaskuläre Endothelzellen beeinflussen die Differenzierung benachbarter hepatischer Sternzellen

Ein Kennzeichen der Sternzellendifferenzierung ist die Expression von α SMA. Dieser glatte Muskelzell- und Myofibroblasten-typische Marker erscheint *in vitro* und *in vivo* nur in aktivierten HSC. In frisch isolierten Zellen der gesunden Leber ist er hingegen nicht vorhanden, wie das auch die RT-PCR und der Western Blot in Kap. 3.2 dargelegt haben. Zur Analyse der Differenzierung wurden Kokultursphäroide aus HUVEC und frisch isolierten HSC hergestellt, die nach einwöchiger Inkubation in einem *Whole-Mount*-Verfahren gegen α SMA immungefärbt wurden. Eine Markierung zeigte sich hierbei nur in einem schmalen Bereich nahe der Oberfläche der Kokultursphäroide, während im Zentrum keine Expression nachweisbar war. In der medialen Ebene einer Laserfluoreszenzaufnahme, die mit einer Transmissionsaufnahme überlagert ist, erscheint α -SMA als ein Ring, der den äußersten Kernbereich markiert. Eine Differenzierung beschränkt sich somit in diesem Kokulturmodell nur auf die HSC, die in unmittelbarem Kontakt mit den EC stehen. (Abb. 3.15 D).

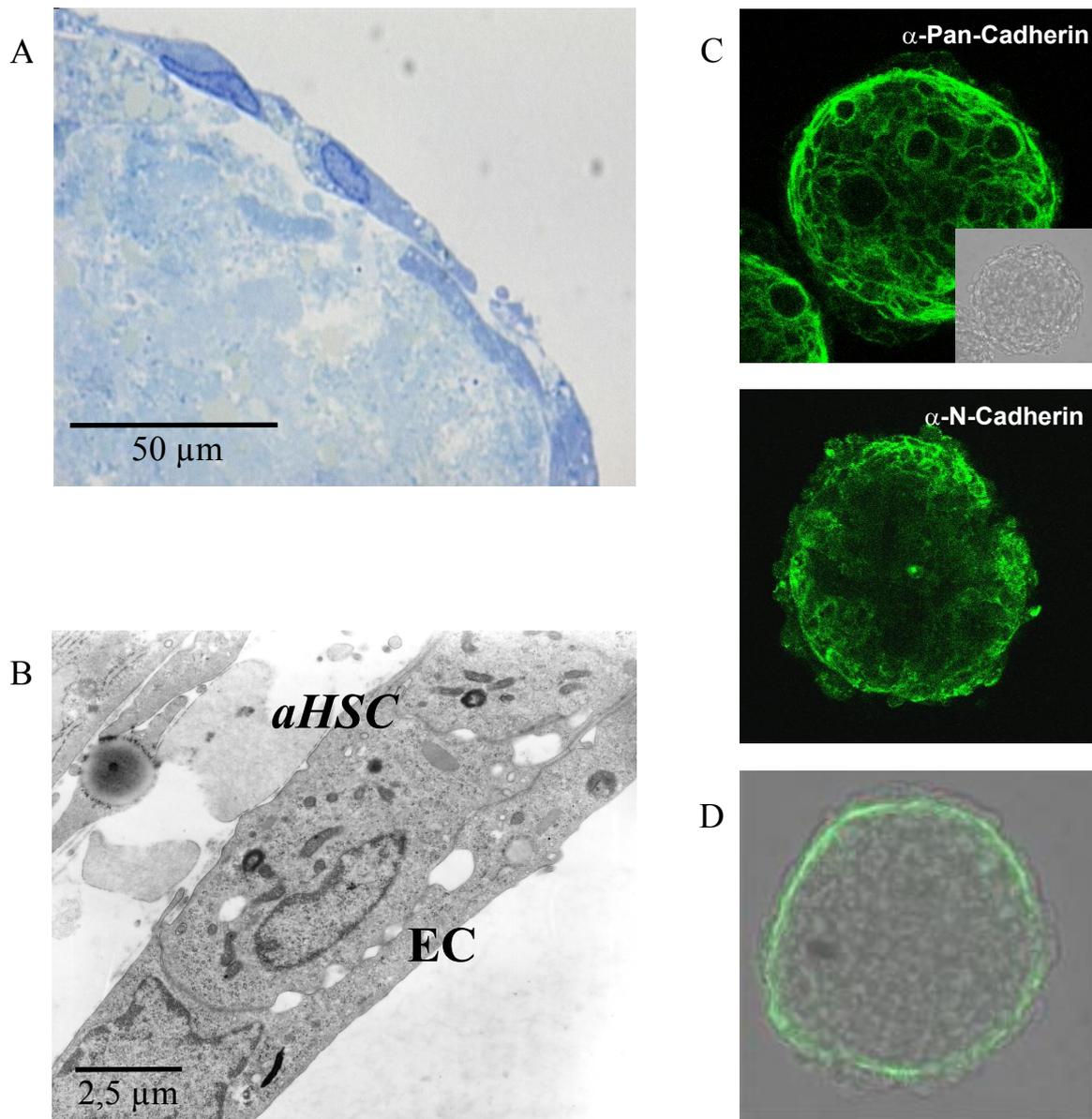


Abb. 3.15: Charakterisierung der Struktur von Kokultursphäroiden aus hepatischen Stern- und vaskulären Endothelzellen. (A-C) Sieben Tage auf der Platte voraktivierte HSC wurden zur Sphäroidbildung gemeinsam mit HUVEC in Methocelmedium inkubiert. Fünf Tage alte Sphäroide wurden für die Untersuchungen verwendet. (A) Am Semidünnschnitt (1 μm Dicke) eines in Epoxidharz eingebetteten Sphäroids nach der Behandlung mit Hämatoxylin zeigt eine intensivere Färbung der EC deren Anordnung als äußeren Ring. (B) Transmissionselektronische Aufnahme am Randbereich eines Sphäroids. Die Zell-Zell-Kontakte zwischen den aktivierten HSC und den EC sind sichtbar. (C) *Whole-Mount*-Immunfärbungen mit Pan- und N-Cadherin-Antikörpern (Sekundäntikörper FITC-gekoppelt). Fluoreszenz- (mediale Ebene) und Transmissionsaufnahme (kleines Bild) am Lasermikroskop. (D) 7 Tage alte Sphäroide aus frisch isolierten HSC und HUVEC nach *Whole-Mount*-Färbung von αSMA (Sekundäntikörper Texas Red-gekoppelt). Kombinierte Transmissions- und Laserfluoreszenzaufnahme der medialen Schnittebene.

3.3.4 Hepatischen Sternzellen wirken stabilisierend auf vaskuläre Endothelzellen im Kokultursphäroid

Im Angiogeneseassay wurde untersucht, wie sich die anliegenden aktivierten bzw. differenzierten HSC, verglichen mit HUASMC, auf das Sprossungsverhalten von HUVEC im Kokultursphäroid auswirkten. Während die Endothelzellen im Solosphäroid durch angiopoetisch wirksame Wachstumsfaktoren deutlich stimuliert werden konnten, wurde ihr ruhender Zustand im Kokultursphäroid mit den SMC nicht beeinträchtigt (vgl. Kapitel 3.1.3). Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch an Kokultursphäroiden aus aktivierten HSC und HUVEC. Nach der Einbettung in Kollagen wurde die Sprossung deutlich unterdrückt, verglichen mit dem von Solo-EC-Sphäroiden. Der repressive Effekt konnte auch durch Zugabe von FGF-2 oder VEGF nicht aufgehoben werden, das Sprossen blieb entsprechend dem Wert der Basalsprossung der Kontrollsphäroide auf niedrigem Niveau. Eine deutliche Stimulation konnte durch eine gleichzeitige Zugabe von VEGF mit Ang-2 erzielt werden (Abb. 3.16).

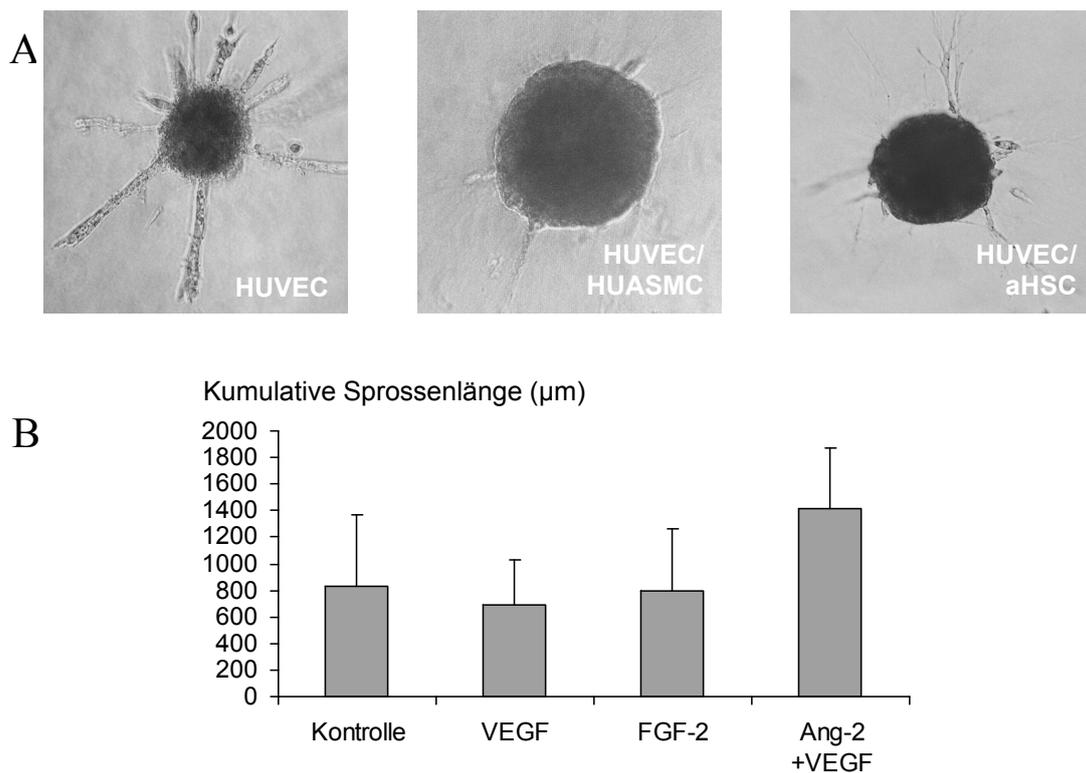


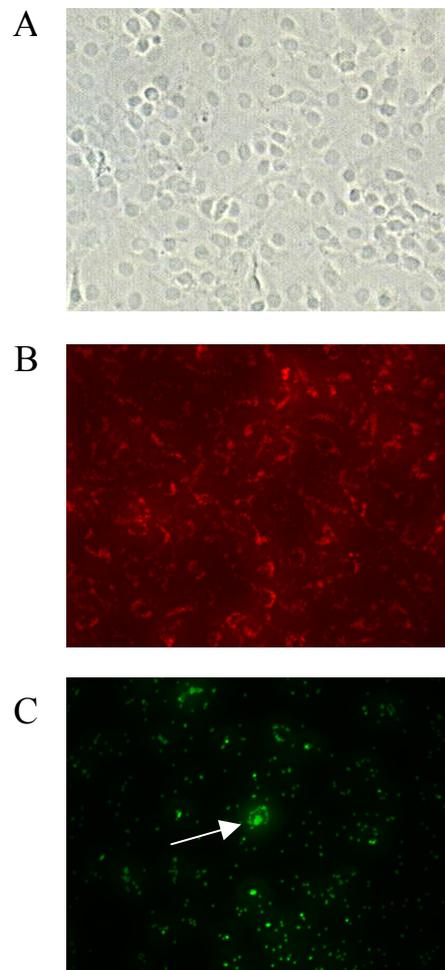
Abb. 3.16: Sprossungsverhalten von Kokultursphäroiden aus vaskulären Endothel- und aktivierten Sternzellen im Angiogeneseassay. Zwei Tage alte Sphäroide wurden in Kollagen eingebettet und für weitere zwei Tage unter Zusatz angiogener Faktoren inkubiert. (A) Vergleich von Sphäroiden aus aktivierten HSC und HUVEC gegenüber HUVEC Solo- und HUVEC/HUASMC-Sphäroiden nach FGF-2 Stimulation. Zur Darstellung sind repräsentative Beispiele ausgewählt worden. (B) Auswertung der kumulativen Länge der 5 längsten Sprosse an Sphäroiden aus HUVEC und aktivierten HSC bei Zusatz von 50 ng/ml FGF-2, 50 ng/ml VEGF und 200 ng/ml Ang-2.

3.4 Bildung sphäroidaler Strukturen unter Mitwirkung sinusoidaler Endothelzellen

In der Leber treten zwei pathologisch wichtige Formen von Kapillarwachstum im Bereich der Sinusoide auf. Im fibrotischen Gewebe kommt es durch eine Umgestaltung der Endothelzellen, die mit dem Verlust typischer Merkmale wie der Fenestrierung verbunden ist, zu einer Vaskularisierung der Mikrogefäße. Auch bei der Angiogenese in Tumoren sollen sinusoidale Endothelzellen an der Bildung der entstehenden Blutbahnen beteiligt sein. An ihnen wurden mit fortschreitender Tumorentwicklung phänotypische Veränderungen beobachtet, zu denen die Expression von Von Willebrand-Faktor und anderer typischer Antigene kapillärer Endothelzellen gehören (Nakamura *et al.*, 1997). Im Bezug zur Stabilisierung dieser Gefäße stellt sich dann die Frage, ob aktivierte hepatische Sternzellen als mögliche Perizyten hier eine Rolle spielen könnten. Beobachtungen an Metastasen mit einer Kollokalisierung von α SMA im

Abb. 3.17: Kultivierung von isolierten Endothelzellen aus Rattenleber. Die LSEC wurden nach der Isolation und selektiver Kupferzelladhäsion auf Kollagen-beschichtete Kulturplatten ausgebracht (A, Durchlichtaufnahme).

Nach einer Inkubation mit gelabeltem LDL ist eine erfolgte Inkorporation in die rot fluoreszierenden Zellen (Endothel- und Kupferzellen) des Monolayers nachweisbar (B). Vorhandene Kupferzellen konnten durch die Phagozytose von FITC gelabelten Latexkügelchen von Endothelzellen unterschieden werden. Eine positive Zelle mit einer Vielzahl aufgenommenener Latexkügelchen ist in der Bildmitte (Pfeil) zu erkennen (C).



Bereich von Endothelzellen, in Abwesenheit von Muskelzellen, deuten in diese Richtung (Olaso *et al.*, 2003). Ob sich LSEC in Abhängigkeit von umgebenden perizytischen Zellen in Richtung eines vaskulären Phänotyps verändern können, sollte durch eine Integration in Koltursphäroide herausgefunden werden. Dabei bestand die Aussicht, dass die räumliche Organisation der Zelltypen, in Analogie zur Anordnung von vaskulären Endothel- und Muskelzellen, auch einen Rückschluss auf die Möglichkeit der gemeinsamen Gefäßbildung erlaubte. Durch eine Kollageneinbettung der Sphäroide sollte dann getestet werden, inwieweit die LSEC die ihnen *in vivo* unterstellte Fähigkeit zur Mitwirkung an der Bildung von Blutbahnen in Tumormetastasen durch ihr Kapillarsprossungsverhalten in diesem Modell bestätigen konnten.

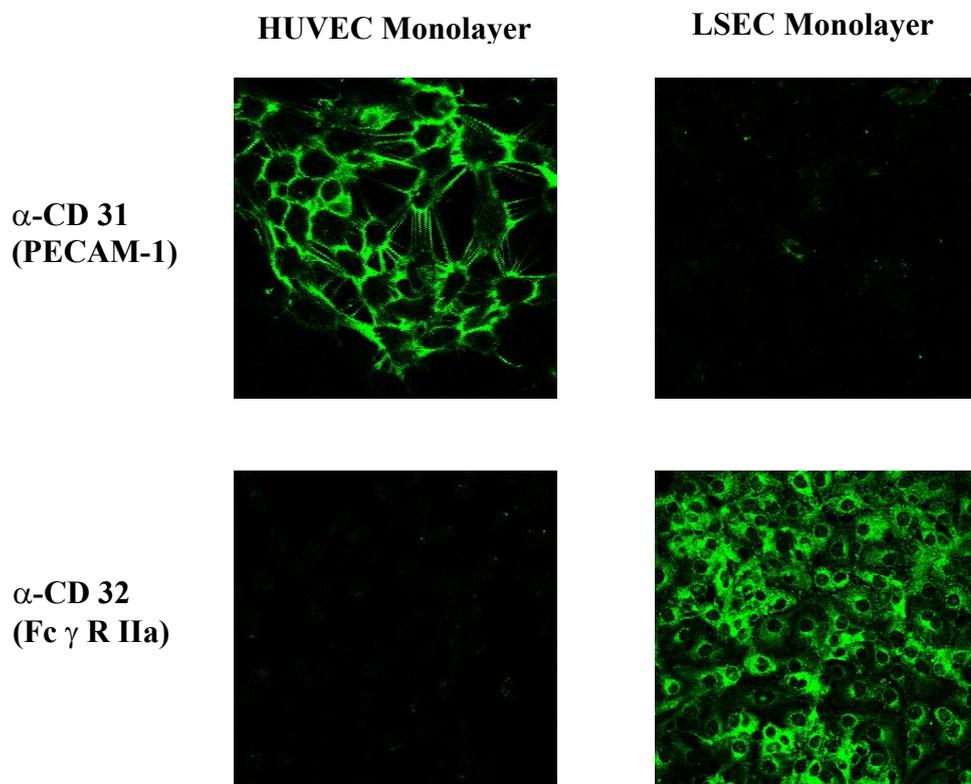


Abb. 3.18: Spezifische Antikörpermarkierung von sinusoidalen und von vaskulären Endothelzellen . Monolayer von HUVEC (links) und LSEC (rechts) wurden mit anti-CD 31 Antikörpern (anti-PECAM-1, oben) und anti-CD 32 Antikörpern (anti-Fc γ Rezeptor IIa, unten) markiert.

3.4.1 Sinusoidale Endothelzellen formieren sich zu kleineren Sphäroiden, die zusammen mit vaskulären Endothelzellen in einem uneinheitlichen Sphäroid integrieren

Für die Versuche wurden sinusoidale Endothelzellen aus der Rattenleber verwendet, die durch einen Verdau mittels Kollagenaseperfusion und über eine Dichtegradientenzentrifugation gewonnen worden waren. Um die hiernach noch in größerer Zahl vorhandenen Kupfferzellen zu entfernen, erfolgte im Anschluss eine kurze Inkubation auf unbehandelten Plastikschaalen, an die Makrophagen selektiv adhärirten. Die so gereinigte Suspension wurde zur Herstellung von Sphäroiden unmittelbar eingesetzt. Da eine Kultivierung von LSEC auf Plastikschaalen wie bei den HSC zu phänotypischen Veränderungen führt, die der Dedifferenzierung in vaskulären Kapillaren ähnelt, wäre der Einsatz solcher voraktivierter Zellen ebenfalls interessant gewesen. Dieser Ansatz scheiterte jedoch, weil keine Möglichkeit existiert, die adhärirten LSEC in intaktem Zustand zu lösen. Eine Probe der verwendeten Zellen wurde zur Vitalitätsprüfung mit Trypanblau gefärbt und ausgezählt, wobei auch Verunreinigungen mit HSC und Hepatozyten phänotypisch erkannt werden konnten. Der Anteil vitaler Zellen betrug mehr als 95 %, vitale HSC oder Hepatozyten traten kaum auf ($\ll 1$ %). Zur Reinheitskontrolle wurden ausgesäte Zellen inkubiert mit fluoreszenzmarkiertem LDL, das nur durch Endothel- und Kupfferzellen aufgenommen wird. Die Makrophagen konnten über die Inkorporation FITC-gekoppelter Latexkügelchen nachgewiesen werden (Abb. 3.17). Insgesamt wiesen die Präparationen weniger als zwei Prozent Verunreinigungen auf, hauptsächlich Kupfferzellen. Um sicherzustellen, dass keine Verunreinigungen von vaskulären Endothelzellen vorlagen, wurden kultivierte Proben gegen CD 31 (PECAM-1) oder Von Willebrand-Faktor immungefärbt, die in LSEC nicht exprimiert werden. Als positiver Marker für LSEC diente das CD 32 (Fc γ RIIa), welches im Gegenzug nicht bei vaskulären Endothelzellen vorkommt. CD 31 exprimierende Zellen traten sehr selten auf (Abb. 3.18).

Zur Bildung von Sphäroiden wurden LSEC allein und zusammen mit HUVEC als Suspensionskultur in Methocel ausgesät. Die LSEC integrierten sich hierbei nicht zu einem einzigen Sphäroid. Vielmehr formierten sie sich zu einer Gruppe aus mehreren kleinen Einheiten. Zusammen mit vaskulären Endothelzellen wurden LSEC jedoch in ein Kokultursphäroid mit eingebaut. Eine räumliche Organisation, wie bei den bisher untersuchten Kokultursphäroiden, schien sich hier aber nicht zu vollziehen. Die mit CD 31 bzw. CD 32 spezifisch immungefärbten Zelltypen lagen beide verteilt im Sphäroid vor, wobei die LSEC zum Teil wiederum zu kleinen Einheiten zusammengefasst waren (Abb. 3.19).

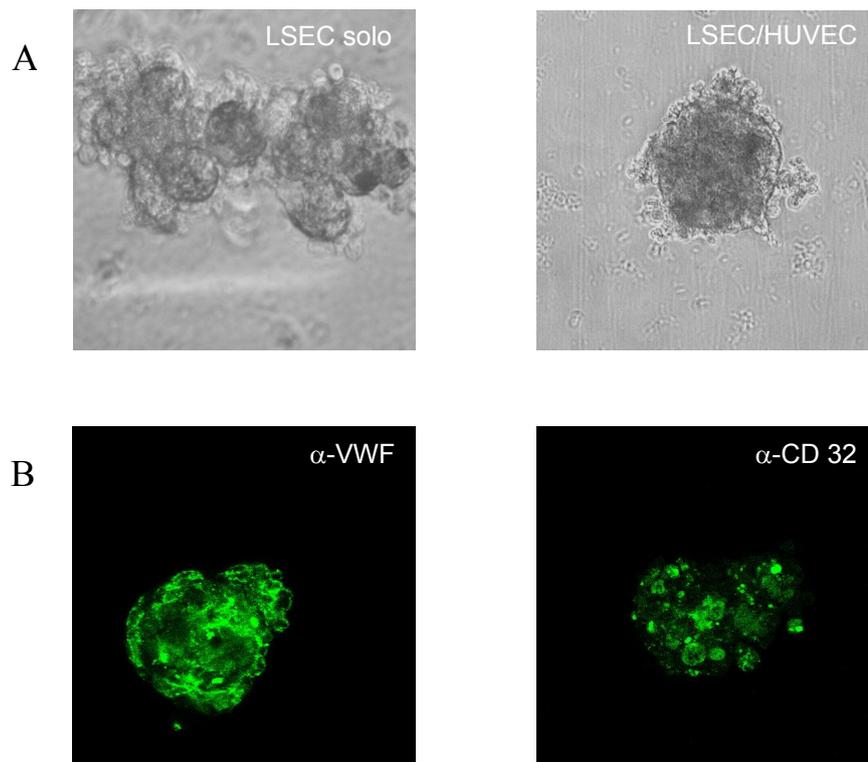


Abb. 3.19: Organisation von sinusoidalen Endothelzellen in Solosphäroiden und in Kokultur mit vaskulären Endothelzellen. Zur Herstellung von Solosphäroiden wurden 750 frisch isolierte LSEC pro Napf einer 96-Loch-Schale in Methocelmedium inkubiert. Kokultursphäroide wurden generiert aus 1500 HUVEC mit 1500 LSEC. (A) Transmissionsaufnahmen einer 7 Tage alten Solo-LSEC-Formation und eines 4 Tage alten Kokultursphäroids aus LSEC und HUVEC. (B) Spezifische Antikörpermarkierungen gegen Von Willebrand-Faktor (vaskuläre EC) und CD 32 (sinusoidale EC), Zweitantikörper FITC-gekoppelt. Die Bilder zeigen Laserfluoreszenzaufnahmen durch die medialen Schnittebenen.

3.4.2 Die Expression von vaskulären Markern in sinusoidalen Endothelzellen wird durch eine Kokultivierung mit glatten Muskelzellen nicht induziert

Zur Untersuchung, ob sich der Einfluss von HUASMC auf eine vaskuläre Differenzierung von sinusoidalen Endothelzellen auswirkt, wurde deren Kokultivierung getestet. Bei der Aussaat von 1500 frisch isolierten LSEC mit 1500 HUASMC war nach einem Tag ein gemeinsames Sphäroid geformt worden. Die räumliche Verteilung wurde nach zwei, vier und acht Tagen nach Ansatz durch eine Markierung mit CD 32 analysiert (Abb. 3.20).

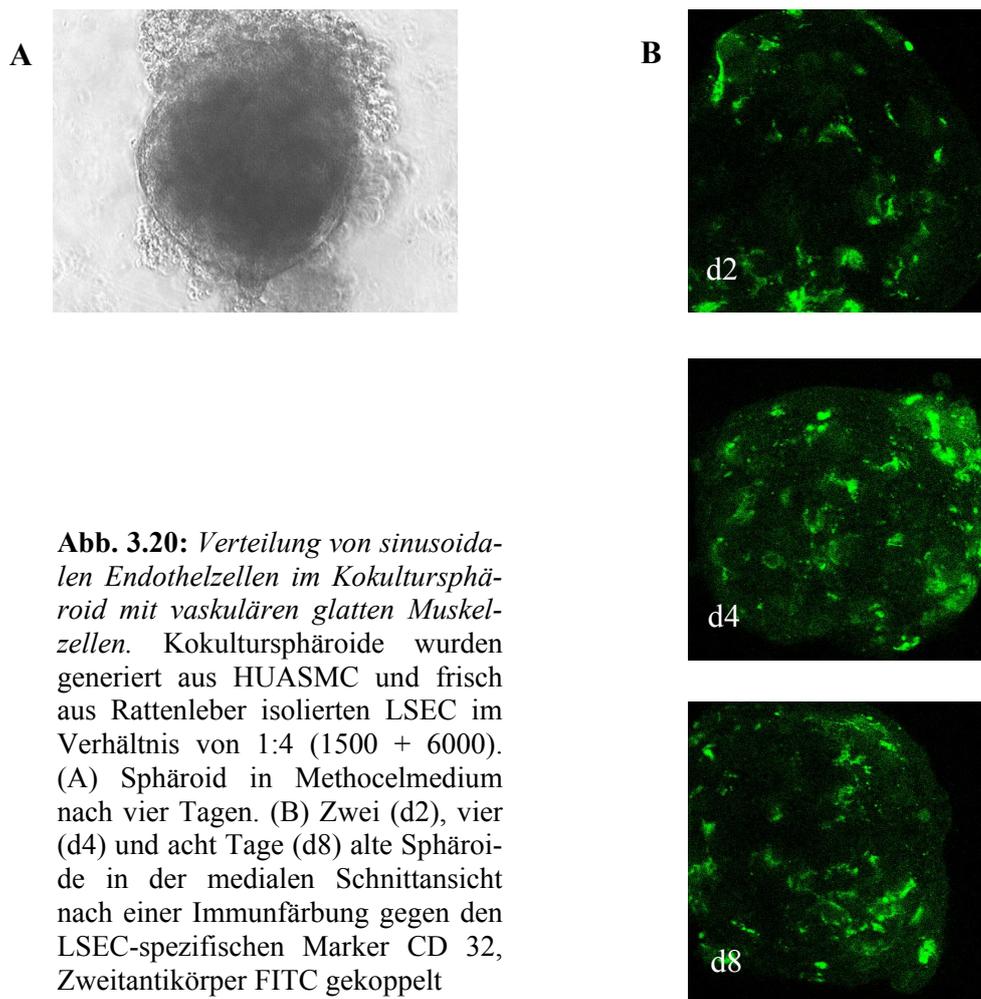


Abb. 3.20: *Verteilung von sinusoidalen Endothelzellen im Kokultursphäroid mit vaskulären glatten Muskelzellen.* Kokultursphäroide wurden generiert aus HUASMC und frisch aus Rattenleber isolierten LSEC im Verhältnis von 1:4 (1500 + 6000). (A) Sphäroid in Methocelmedium nach vier Tagen. (B) Zwei (d2), vier (d4) und acht Tage (d8) alte Sphäroide in der medialen Schnittansicht nach einer Immunfärbung gegen den LSEC-spezifischen Marker CD 32, Zweitantikörper FITC gekoppelt

Es zeigte sich kein geordneter Aufbau von Oberflächenschicht und Kern, vielmehr lagen die sinusoidalen Zellen zwischen den glatten Muskelzellen verteilt im gesamten Sphäroid vor. Ob es trotz dieses Unterschiedes zur Anordnung im analogen Modell mit HUVEC und HUASMC zu einer Differenzierung der LSEC in Richtung eines vaskulären Phänotyps kam, wurde anhand der Expression des Von Willebrand-Faktors und CD 31 überprüft. Hierzu wurden Kokultursphäroide, die über acht Tage im Methocelmedium inkubiert blieben, mit frisch formierten, einen Tag alten verglichen. Bei einer Immunfärbung zeigten sich in den Ansätzen vereinzelt positive Zellen, sowohl für Von Willebrand-Faktor, wie auch für CD 31. Ein Anstieg der Markierungen vaskulärer Antigene war über einen Zeitraum von einer Woche jedoch nicht zu erkennen (Abb. 3.21).

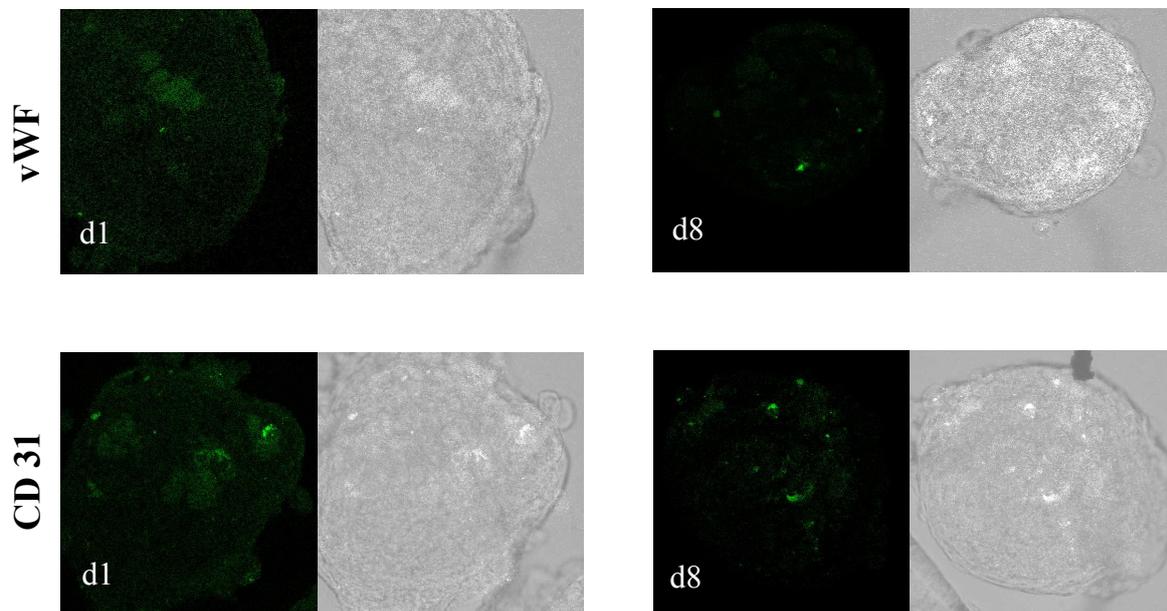


Abb. 3.21: Expression von vaskulären Endothelzellmarkern im Kokultursphäroid aus sinusoidalen Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Kokultursphäroide aus HUASMC und frisch aus Rattenleber isolierten LSEC im Verhältnis von 1:4 wurden einen Tag nach der Bildung (d1) und nach sieben weiteren Tagen der Inkubation (d8) immungefärbt. Als vaskuläre Endothelzellmarker wurden Antikörper gegen Von Willebrand-Faktor und CD 31 eingesetzt. Zweitantikörper waren FITC-gekoppelt. Fluoreszenzaufnahmen, jeweils rechts mit Durchlicht kombiniert.

3.4.3 Hepatische Sternzellen induzieren im *In-vitro*-Modell keine Expression von vaskulären Antigenen durch sinusoidale Endothelzellen

Anders als SMC und LSEC, von denen in *In-vivo*-Situationen kein gemeinsames Auftreten im Gewebe bekannt ist, sind LSEC und HSC in der Leber direkt beieinanderliegende, durch Zellkontakte verbundene Nachbarn. Die Aussicht auf eine geordnete Organisation der Zelltypen im Sphäroidmodell schien dadurch eine eher reale Möglichkeit darzustellen. Um die Auswirkungen einer bereits vorhandenen Aktivierung zu berücksichtigen, wurden zwei verschiedene Kokulturansätze gestartet, einmal mit frisch isolierten und zum anderen mit *in vitro* zu Myofibroblasten (sMFB) differenzierten Sternzellen. Zusammen mit LSEC erfolgte eine Aussaat in Methocelmedium.

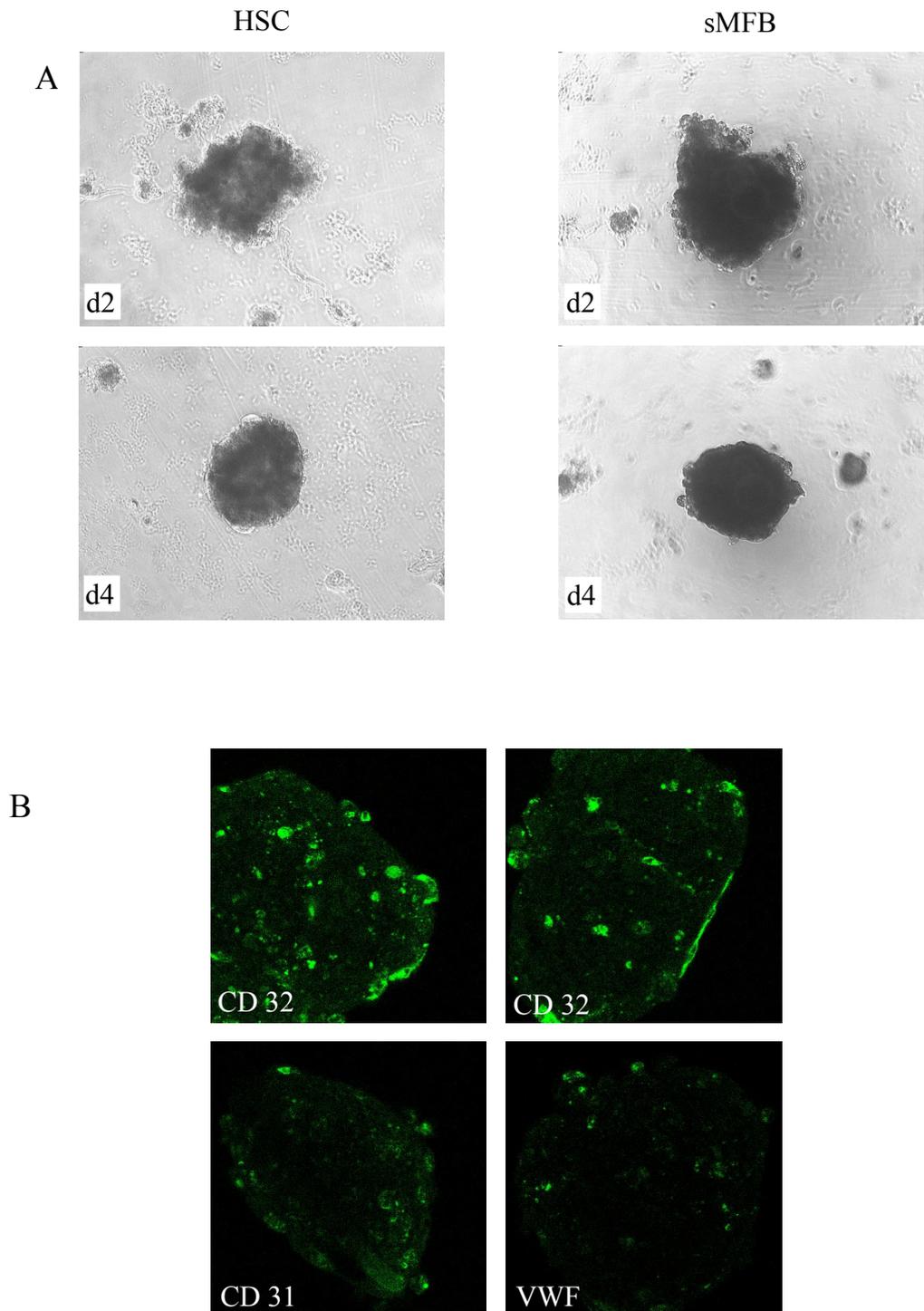
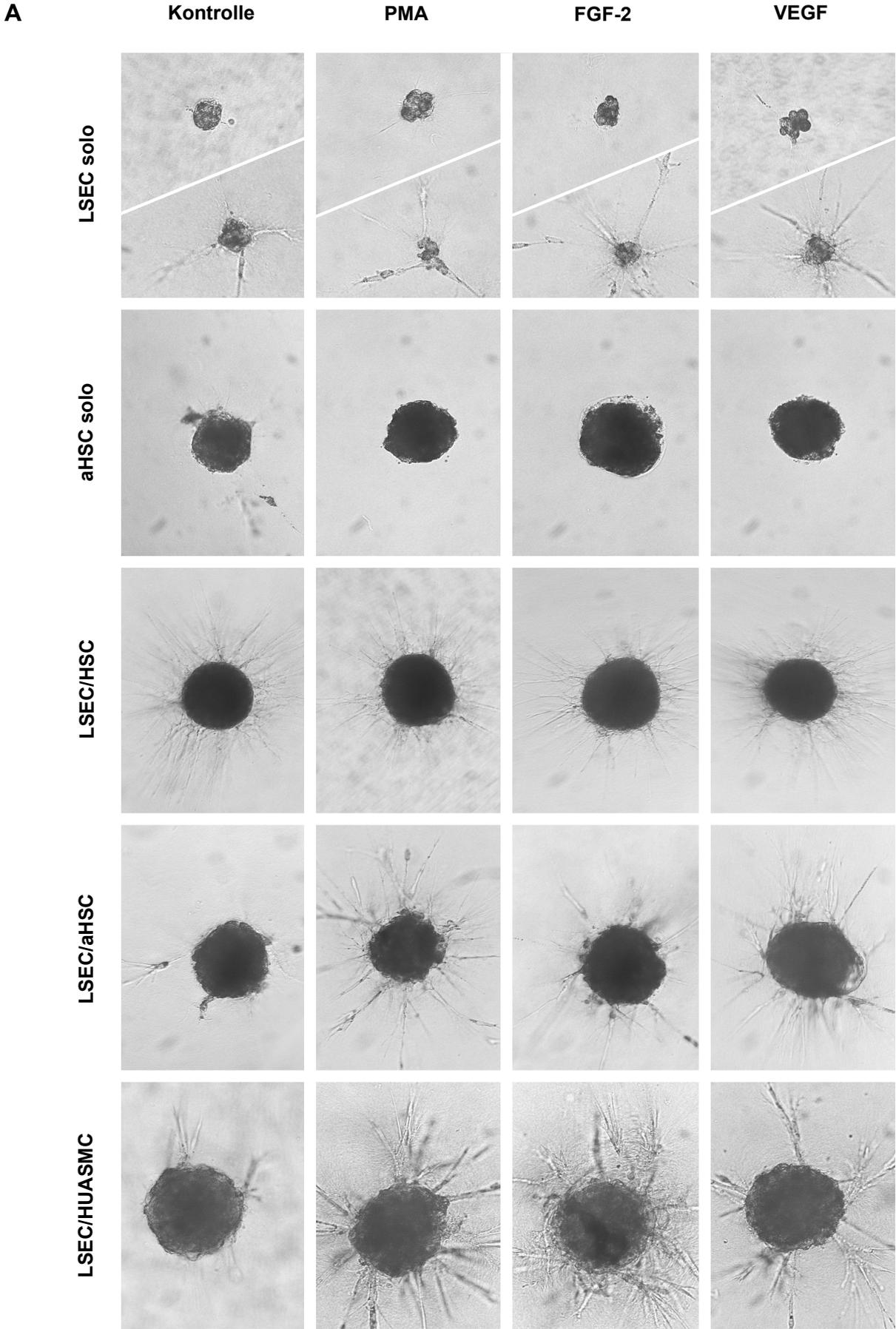


Abb. 3.22: Bildung von Kokultursphäroiden aus sinusoidalen Endothelzellen und hepatischen Sternzellen. Zur Sphäroidbildung wurden 1500 LSEC mit 1500 frisch isolierten HSC oder 1000 *in vitro* erzeugten sMFB kokultiviert. (A) Formierung zum Sphäroid im Methocelmedium nach 2 (d2) und 4 (d4) Tagen. (B) Immunfluoreszenzfärbungen (mediale Ebenen) von 8 Tage inkubierten LSEC/sMFB Sphäroiden gegen CD 32, CD 31 und VWF. Zweitantikörper jeweils FITC-gekoppelt.

Bei beiden Ansätzen kam es zur Ausbildung eines Sphäroids, in dem mit wenigen Ausnahmen alle Zellen integriert wurden. Eine abgerundete Form wurde in etwa vier Tagen nach Inkubationsbeginn erreicht, wobei keine zeitlichen Unterschiede zwischen den Ansätzen mit frisch eingesetzten und zuvor aktivierten HSC festgestellt werden konnte. (Abb. 3.22 A). Eine Markierung des CD 32 zeigte, dass die LSEC, wie bei der Kokultur mit HUASMC, auch hier nicht als Oberflächenschicht geordnet, sondern im gesamten Sphäroid verteilt vorlagen. Eine Untersuchung auf die Expression der vaskulären Marker CD 31 und Von Willebrand-Faktor ließ wenige positive Zellen erkennen, die vor allem im Außenbereich des Sphäroids lagen (Abb. 3.22 B).

3.4.4 Sinusoidale Endothelzellen in Sphäroiden bilden Kapillarsprosse abhängig von zugesetzten Faktoren

Zur Untersuchung, ob LSEC in diesem Modell zur Ausbildung von Kapillaren angeregt werden konnten, wurde ein Angiogeneseassay in gleicher Weise wie bei den vaskulären Zellen durchgeführt. Dazu wurden sie als Solosphäroide und als Kokultursphäroide mit HUASMC, frischen oder aktivierten HSC in Kollagengele eingebettet. Außerdem wurden Proben mit Solosphäroiden aus aktivierten HSC angesetzt. Der Einfluss von angiogenetisch wirksamen Faktoren wurde durch Zusatz von FGF-2 und VEGF getestet, als Positivkontrolle wurde PMA verwendet (Abb. 3.23). Nach zwei Tagen der Inkubation war bei den LSEC-Solosphäroiden eine Aussprossung zu beobachten. Es zeigte sich ein stimulierender Einfluss durch die zugesetzten Faktoren, der im Mittel zu einer Verdopplung der kumulativen Sprossenlänge führte. Allerdings traten sehr starke Abweichungen auf, indem einerseits auch bei den Negativkontrollen Sphäroide mit gut ausgebildeten kapillarähnlichen Strukturen vorhanden waren, andererseits an einigen Sphäroiden in Proben mit Faktorzusatz keine Sprossungsaktivität festzustellen war. An Kokulturen von frischen HSC mit LSEC traten eine Vielzahl von Ausläufern hervor, die dünner waren als die bislang in diesem Modellsystem beobachteten Sprosse und durch keinen der Zusätze beeinflusst werden konnten. Wurden statt der frischen Zellen voraktivierte HSC oder HUASMC verwendet, konnte eine Ausbildung von Kapillarstrukturen mit einer Stimulierbarkeit ähnlich wie bei den LSEC-Solosphäroiden beobachtet werden, jedoch mit geringerer Varianz. An Solosphäroiden aus *in-vitro*-aktivierten HSC konnte keine Sprossung induziert werden.



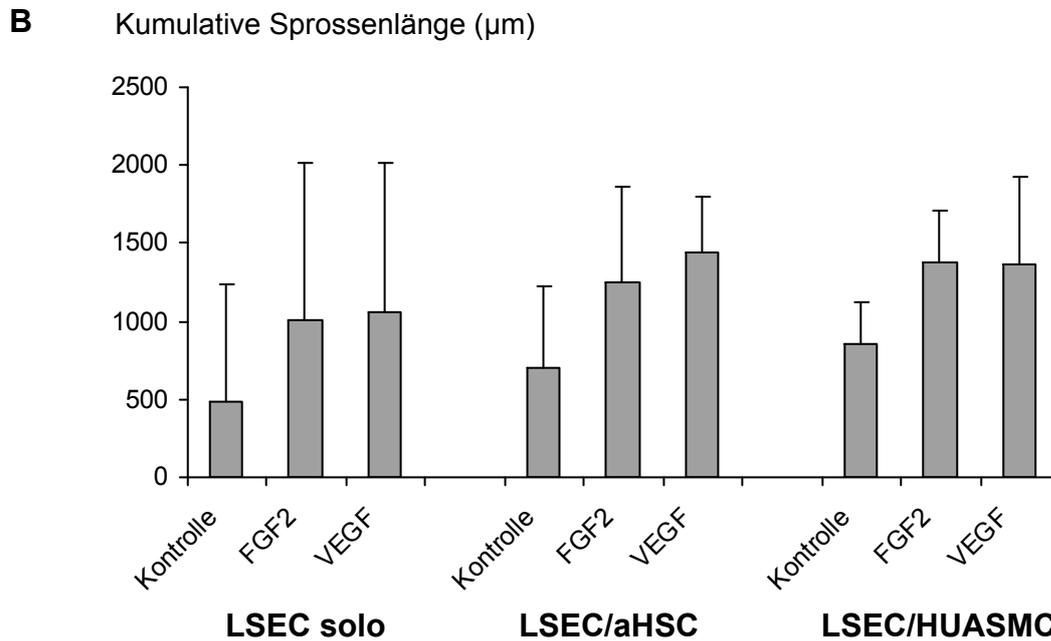


Abb.: 3.23: *Sprossung von sinusoidalen Endothelzellen in Sphäroiden.* (A) Zwei Tage alte Solosphäroide aus LSEC oder *in-vitro*-aktivierten HSC (aHSC) sowie vier Tage alte Kokultursphäroide mit LSEC und frisch isolierten HSC, aHSC oder HUASMC wurden in Kollagengelen ohne oder mit Zusatz von FGF-2 (50 ng/ml), VEGF (50 ng/ml) oder PMA (50 ng/ml) eingebettet. Alle Ansätze enthielten 5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin. Die Bilder zeigen repräsentativ ausgewählte Phasenkontrast-Aufnahmen nach zwei Tagen Inkubation. (B) FGF-2- und VEGF-Induktion an LSEC-Solosphäroiden, LSEC/aktivierte HSC- und LSEC/HUASMC-Kokultursphäroiden. Statistische Auswertung nach der kumulativen Länge der 5 längsten Sprosse.

3.5 Untersuchung der *in vitro* erzeugten Kapillarsprosse an Kokultursphäroiden mit hepatischen Sternzellen und Endothelzellen

Von Metastasen des sinusoidalen Typs wird angenommen, dass ihre Gefäße durch LSEC gebildet werden können, die in Richtung vaskulärer Endothelzellen differenziert sind. Sinusoid-ähnliche Kapillaren, die den vaskulären Marker CD 31 exprimieren, treten nachweisbar bei Mikrometastasen in der Leber auf (Olaso *et al.*, 2003). Auch wenn in den vorangegangenen Untersuchungen durch die Kokultivierung mit Perizyten keine Differenzierung der LSEC zu einem vaskulären Phänotyp zu beobachten gewesen war, könnte eine Veränderung der Expression durch die Aktivierung der LSEC bei der Kapillarbildung eintreten. Eine nähere Charakterisierung der *In-vitro*-Sprosse, die in den Angiogeneseassays mit Sphäroiden aus HSC und Endothelzellen gebildet wurden, sollte die potentielle Rolle der LSEC klären. Nach einer Immunfärbung im Kollagen wurde untersucht, ob voluminöse kapillarähnliche Strukturen auch mit LSEC entstehen und ob an diesen vaskuläre Marker exprimiert werden. Das wurde *in vitro* durch die Untersuchung der Sprosse auf VWF, CD 31 und VE-Cadherin getestet.

Bei der Rekrutierung der LSEC deuten Untersuchungen an den Tumoren darauf hin, dass zuerst eine Infiltration mit aktivierten hepatischen Sternzellen stattfindet, denen dann die LSEC nachfolgen (Olaso *et al.*, 2003). Durch eine Kofärbung von LSEC und aHSC sollte versucht werden, ob sich dieser Ablauf im *In-vitro*-Prozess an den Sprossen der Sphäroide nach einer Kollageneinbettung nachvollziehen und bestätigen lässt.

3.5.1 Die Sprosse der sinusoidalen Endothelzellen weisen kapillarähnliche, tubuläre Strukturen auf

Zur eingehenderen Charakterisierung der Sprosse wurde versucht, eine Immunfärbung im Gel durchzuführen. Dazu wurden die Kollagengele im Anschluss an einen standardmäßigen Angiogeneseassay als Ganzes durch eine variierte Technik der Immunfluoreszenzmethode mit Antikörpern gegen CD 32 markiert. Die Präparate wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Dabei zeigte die Struktur der aus LSEC hervorgegangenen Sprosse ein voluminöses Netzwerk, das den Kapillarsprossen ähnelt, die aus vaskulären Zellen gebildet wurden (Abb. 3.24).

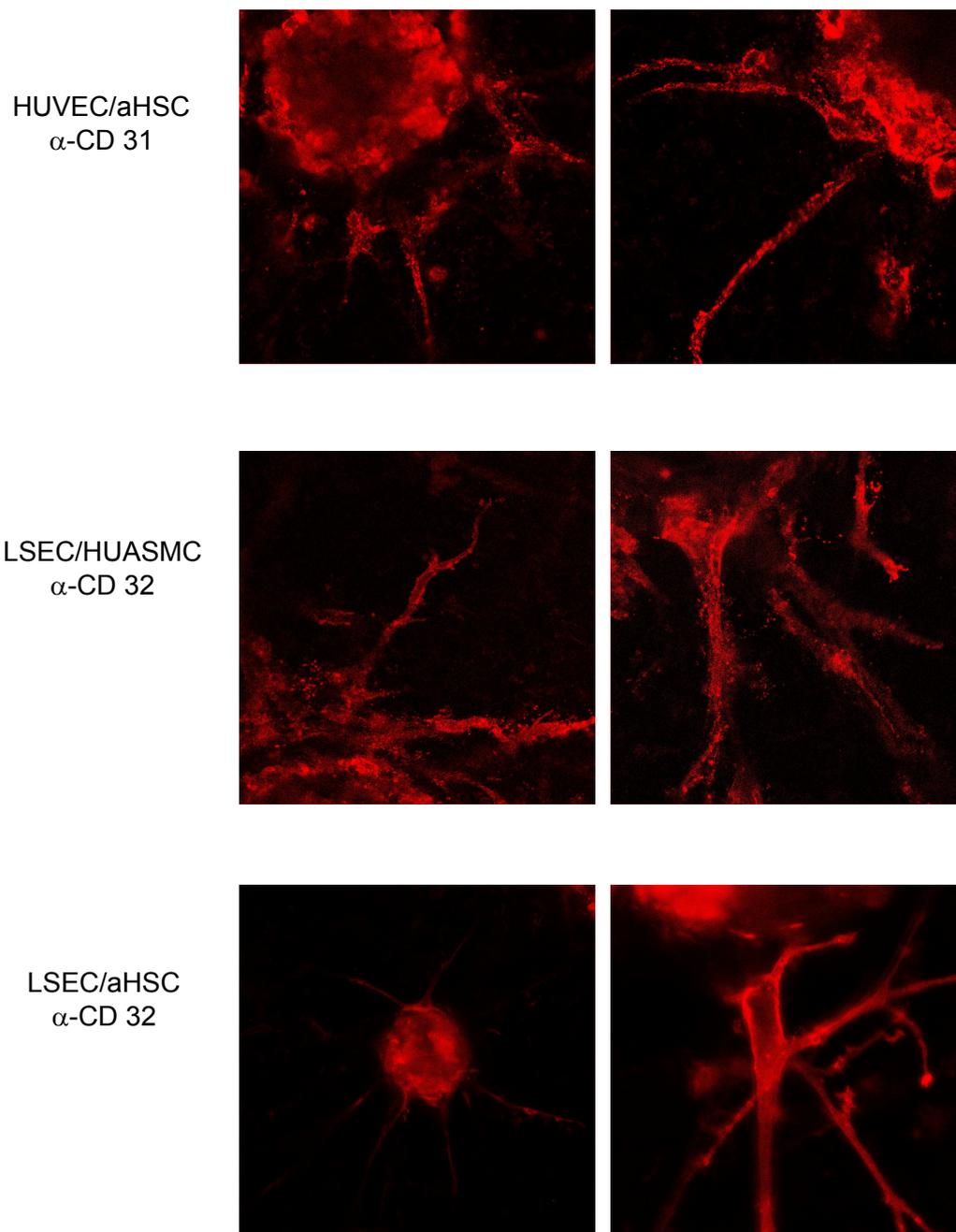


Abb. 3.24: *Immunfärbung von Sprossen aus vaskulären und sinusoidalen Endothelzellen.* Vier Tage alte Sphäroide wurden in einem Angiogeneseassay im Kollagengel eingesetzt. Nach einwöchiger Inkubation wurde das Gel mit den Sphäroiden in Methanol fixiert und anschließend immungefärbt (*whole mount staining*). Laser-Scanning-Aufnahmen von den Sprossen eines Kokultursphäroids aus vaskulären Endothelzellen und aktivierten HSC (aHSC) mit Erstantikörperinkubation gegen CD 31, Zweitantikörper Cy3-gekoppelt (oben). Für Kokultursphäroide aus LSEC und HUASMC (mitte) sowie aus LSEC und aktivierten HSC (unten) wurden Erstantikörper gegen CD 32 und Cy3-gekoppelte Zweitantikörper eingesetzt.

3.5.2 Sinusoidale Endothelzellen exprimieren VE-Cadherin beim Sprossen aus Kokultursphäroiden mit aktivierten Sternzellen

Nach der Einbettung von Kokultursphäroiden aus LSEC mit HUASMC oder aktivierten HSC in Kollagen wurden die entstandenen Kapillarsprosse auf die Expression von vaskulären Endothelzellmarkern hin untersucht. Zur immunologischen Detektion wurden Antikörper gegen CD 31, Von Willebrand-Faktor und VE-Cadherin benutzt und die Gele, wie zuvor mit CD 32 durchgeführt, als Ganzes zur Färbung eingesetzt. An den Sprossen aus Sphäroiden mit glatten Muskelzellen erfolgte mit keinem der eingesetzten Antikörper eine Markierung (ohne Bild). Auch an den Sprossen, die aus der Kokultivierung mit hepatischen Sternzellen hervorgegangen waren, ließ sich die Expression von CD 31 und Von Willebrand-Faktor innerhalb der Inkubationszeit von 7 Tagen nicht nachweisen. Hier zeigte die Fluoreszenz allerdings ein positives Ergebnis für VE-Cadherin und damit die Expression eines vaskulären Markers in den Kapillarstrukturen (Abb. 3.25 A, B).

3.5.3 Aktivierte hepatische Sternzellen migrieren zusammen mit sinusoidalen Endothelzellen in den Sprossen der Kokultursphäroide

Um eine Mitwirkung der aktivierten HSC an der Kapillarsprossung und gegebenenfalls die zelluläre Anordnung in den Sprossen zu überprüfen, wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Nach dem Lösen der voraktivierten HSC von den Kulturschalen wurde deren Membran mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (PKH 65) markiert, der nach eventuell auftretenden Zellteilungen auch auf alle Tochterzellen weitergegeben wird. Zur Bildung von Kokultursphäroiden wurden die gefärbten aktivierten HSC mit frisch isolierten LSEC ausgesät. Die gesprossenen Sphäroide wurden nach dem Angiogeneseansatz im Gel immungefärbt gegen CD32 mit anschließender Bindung eines rot fluoreszierenden Sekundärantikörpers. Diese Doppelfärbungen zeigten ein Auftreten von beiden Zelltypen im gleichen Spross. Die LSEC als potentielle Kapillarzellen und die aktivierten HSC als potentielle Perizyten waren parallel an der Ausbildung eines neuen Gefäßsystems in diesem Modell beteiligt (Abb. 3.25 C). Zum Vergleich wurde ein Sphäroid aus aktivierten HSC mit HUVEC in entsprechender Weise untersucht. Hier wurden die Sprosse allein durch die Endothelzellen gebildet (Abb. 3.25 D).

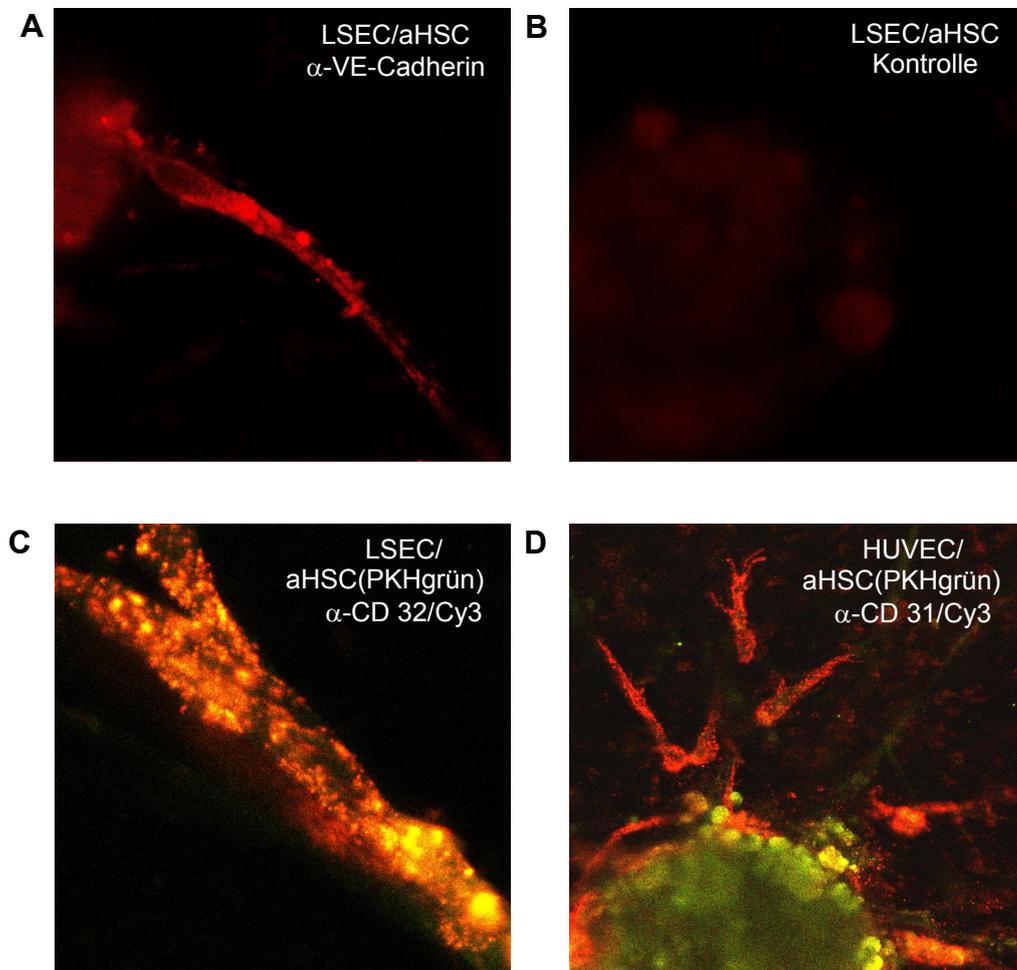


Abb. 3.25: Charakterisierung der kapillarähnlichen Sprosse aus Kokultursphäroiden mit aktivierten hepatischen Sternzellen. Zur Bildung der Sphäroide wurden HSC eingesetzt, die 7 Tage auf Plastikschalen voraktiviert worden waren. Für Doppelfärbungen wurden aktivierte HSC vor der Generierung der Sphäroide mit PKH 67 (grün fluoreszierend) behandelt. Vier Tage alte Kokultursphäroide wurden in Kollagen eingebettet und zur Ausbildung von Kapillarsprossen im Brutschrank gelagert. Nach einer Woche wurde das Gel mit den Sphäroiden in Methanol fixiert und immungefärbt (*whole mount staining*) mit Erstantikörpern gegen VE-Cadherin (A, Zweitantikörper Alexa Fluor 568-gekoppelt) und gegen CD 32 (C, Zweitantikörper Cy3-gekoppelt). Zum Vergleich ist ein gesprosses Sphäroid aus aktivierten HSC und HUVEC abgebildet, das gegen CD 31 immungefärbt wurde (D, Zweitantikörper Cy3-gekoppelt).

4. Diskussion

4.1 Das Sphäroidmodell mit vaskulären Zellen

Eine wesentliche Grundlage für die Untersuchungen in dieser Arbeit war die Entwicklung eines *In-vitro*-Modells, an dem möglichst naturnah eine Differenzierung von HSC nachvollzogen werden konnte. In der Leber sind HSC in engem Kontakt mit EC am Aufbau der Sinusoide beteiligt und treten bei pathogenen Situationen im aktivierten Zustand ebenfalls mit EC bei Gefäßneubildungen auf. Um diesen *In-vivo*-Situationen gerecht zu werden, wurde ein Modellsystem benötigt, das eine korrekte räumliche Anordnung von HSC zu EC gewährleistete und idealerweise gleichsam auch für die Nachgestaltung angiogenetischer Prozesse geeignet war. Die Voraussetzungen konnte das von Korff *et al.* (2001) entwickelte Modell von SMC und vaskulären EC liefern, wenn es gelang, dieses System auf Leberzellen zu übertragen. Die aus den vaskulären Zellen gebildeten Sphäroide wurden beschrieben als eine spontane Anordnung mit einem SMC-Kern, umgeben von einer einlagigen EC-Schicht, entsprechend der räumlichen Konstellation in einer Gefäßwand mit einer *Inside-Out*-Orientierung. Im Gegensatz zu anderen Modellen wiesen die elongierten EC in diesem Oberflächenlayer einen dem *In-vivo*-Zustand entsprechenden ruhenden Phänotyp auf. Durch eine Einbettung der Sphäroide in ein Kollagengel bestand somit die Möglichkeit, die Entwicklung angiogenetischer Prozesse am Aussprossen aus ruhenden EC im Zellverband mit SMC nachzuvollziehen.

Obwohl sich dieses System für meine Zwecke sehr eignen würde, war ein wesentlicher Nachteil, dass es sich nicht um ein allgemein etabliertes Modell handelte und die Anwendung sich nur auf eine einzige Arbeitsgruppe in Freiburg beschränkte. Die Etablierung des Systems gelang in Düsseldorf in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Korff/Augustin nach einer Einarbeitungszeit und es konnten routinemäßig gleichförmige, standardisierte Sphäroide hergestellt und in Angiogeneseassays eingesetzt werden. Die ersten Ergebnisse zeigten einen *in-vivo*-ähnlichen ruhenden Zustand der EC an der Sphäroidoberfläche, die nach der Einbettung in ein Kollagengel nur minimal Ansätze zur Kapillarbildung aufwiesen und bestätigten damit die Ergebnisse, die Korff *et al.* beschrieben hatten (Abb. 3.3). Das unterscheidet sich deutlich vom Verhalten in gebräuchlichen *In-vitro*-Angiogeneseassays wie Matrigel- oder Fibroblasten-Kokulturassays, bei denen im Kontakt mit einer unterstützenden Matrix eine spontane Bildung von Kapillaren stattfindet. Deren Zahl und durchschnittliche Länge von etwa 20 bzw. 40 μm wird dort durch den potentesten bekannten angiogenetischen Faktor VEGF weniger als 20 % gesteigert (Donovan *et al.*, 2001). Am EC-Solosphäroid induzierten

VEGF und auch FGF-2 aufgrund der geringen Basalsprossung (i. e. ohne Faktorzusatz) eine Vervielfachung der gebildeten voluminösen, kapillarähnlichen Strukturen, von denen meist mehrere länger als 200 μm waren. Diese Abhängigkeit von äußerer angiogener Stimulation machte eine signifikante Auswertung zugesetzter Testsubstanzen möglich (Abb. 3.3 B und Abb. 3.6 B).

Nach der erfolgreichen Etablierung des Solo-EC-Modells konnte mit der Kokultivierung von HUVEC und HUASMC der Einstieg in dieses komplexere System begonnen werden. Durch die gleichzeitige Aussaat der beiden Zelltypen in viskoser Suspensionskultur wurde die Herstellung einheitlicher Sphäroide erreicht. Nach zwei Tagen war die Bildung mit der Integration der ausgesäten Zellen in eine abgerundete Kugelform äußerlich sichtbar abgeschlossen. Der synchron abgelaufene innere Aufbau zeigte sich mit einer Immunfärbung gegen VE-Cadherin in einer markierten dünnen Endothelzellschicht an der Oberfläche und einem nicht angefärbten SMC Kern (Abb. 3.2). Somit konnte *in vitro* ein gewebeähnlicher Verbund hergestellt werden, bei dem die EC wie in Blutgefäßen in direkter Nachbarschaft mit SMC oder Perizyten angeordnet sind.

Im Angiogeneseassay konnte die Nicht-Induzierbarkeit der Kokultursphäroide durch VEGF bestätigt werden (Korff *et al.*, 2001). In einem weiteren Ansatz wurde ein gleiches Resultat auch mit FGF-2 erzielt. Keiner der zugesetzten Faktoren konnte die Endothelzellen aus ihrem ruhenden Zustand im Kokultursphäroid heraus vermehrt zur Bildung von Kapillarstrukturen anregen, wie es bei den Solosphäroiden erfolgt war (Abb. 3.3).

Ein Unterschied, den die SMC in den beiden Systemen ausmachen, ist die Produktion von Ang-1. Das Verhältnis von autokrin gebildetem Ang-2 und parakrin von den Muskelzellen beigesteuertem Ang-1 gilt als hauptverantwortlich für den ruhenden Zustand der EC (Scharpfenecker *et al.*, 2005). Weitere maßgebliche Einflüsse durch die SMC könnten durch eine Membranverankerung über heterotypische Bindungen zustandekommen, für die höchstwahrscheinlich N-Cadherin verantwortlich ist (Navarro *et al.*, 1998). Da dies entscheidend auch für die Bindung mit anderen Perizyten wäre, insbesondere im Hinblick auf aktivierte HSC, wurde die Cadherinverteilung innerhalb des Sphäroids untersucht, zusammen mit β -Catenin und im Vergleich mit zwei in EC exprimierten Oberflächenrezeptoren.

Mit einer Immunfärbung ließ sich beim Solosphäroid eine gleichmäßige Expression von VE-Cadherin und N-Cadherin im gesamten Querschnitt nachweisen. β -Catenin war ebenfalls in allen Bereichen vorhanden, konzentrierte sich in der Nähe der Außenschicht allerdings auf die Zellmembranen. Die Oberflächenrezeptoren PTP ζ und PTP γ zeigten sich nur an den äußeren Zellen und fehlten im Zentrum (Abb. 3.1 und Abb. 3.4). Somit trat hier eine differenzierte

räumliche Expression auf, die übereinstimmte mit den zwei Zellbereichen des Sphäroids, dem unorganisierten Zentrum und der Oberflächenschicht mit elongierten, differenzierten Zellen (Korff und Augustin, 1998). Die homogene Markierung von N-Cadherin in beiden Bereichen entspricht den Beobachtungen an EC-Monolayerkulturen. Dort wird N-Cadherin in allen Zellen produziert, aber es kommen keine homotypischen Bindungen zustande, ohne die es diffus und ungebunden vorliegt. VE-Cadherin wird ebenfalls in den EC in gleichem Maß exprimiert, ist allerdings an den Kontaktzonen als Cluster in *Adherens Junctions* organisiert (Navarro *et al.*, 1998). Die vermehrte Ausbildung von *Adherens Junctions* in differenzierten Zellen erklärt die Konzentration des β -Catenins an den Zellmembranen der Sphäroidaußenseite. Als Bindeglied, welches das zytoplasmatische Ende des VE-Cadherins über α -Catenin mit dem Actingerüst der Zelle verknüpft, wird es hier vermehrt eingebaut, während gleichzeitig der Pool an freiem β -Catenin im Zytosol erniedrigt wird (Vincent *et al.*, 2004).

Im Kokultursphäroid von Endothel- und Muskelzellen zeigte eine Anfärbung von N-Cadherin eine Lokalisation in dem Bereich, der an den äußeren Endothelzellring angrenzt (Abb. 3.5). Diese Ergebnisse stützen die These, dass N-Cadherin für die EC-SMC-Bindung verantwortlich ist. Beim Ausbleiben von homotypischen VE-Cadherin-Bindungen wird N-Cadherin nicht mehr aus den *Adherens Junctions* verdrängt und es können sich heterotypische Verbindungen zwischen den angrenzenden Zellschichten ausbilden (Navarro *et al.*, 1998). Die Abnahme von N-Cadherin zum Zentrum des Sphäroids hin deutet darauf, dass in diesem Modell nicht nur die SMC die Differenzierung der EC beeinflussen, sondern umgekehrt auch die Bindung und parakrine Interaktionen von EC auf die Organisation der SMC wirken. Die Einschaltung durch N-Cadherin vermittelte Zellkontakte ist in mehreren *In-vitro*-Versuchen an verschiedenen Signalwegen beobachtet worden und konnte auch zur Aktivierung muskelspezifischer Promotoren führen (Wheelock und Johnson, 2003b).

Zu den wesentlichen Vorgängen, die an der Kapillarbildung beteiligt sind, gehören die Proliferation und die Migration von Endothelzellen aus dem bestehenden Zellverband. Zur näheren Charakterisierung der Sprossung an Sphäroiden wurde untersucht, in welchem Umfang sich unterschiedliche Reize für die beiden Vorgänge in diesem Modellsystem auswirkten. Die Einbettung der Sphäroide in Kollagen wurde als ein potenter Angiogeneseassay entwickelt, bei dem der Einfluss von zugesetzten Testfaktoren anhand der Zahl und der Länge der entstehenden Sprosse festgestellt werden kann. Zur Quantifizierung wurde ein vereinfachtes Verfahren benutzt, bei dem die Ausdehnung der drei bzw. fünf längsten Sprosse addiert wurde. Durch die starke Stimulationsabhängigkeit des Angiogeneseassays konnten auf diese Weise

signifikante Auswertungen erreicht werden. Untersuchungen wurden mit den Fibroblastenwachstumsfaktoren-1, -2, -4, -5, -16 und -18 durchgeführt, Vertretern einer Polypeptidfamilie, deren Mitglieder in vielfacher Weise in Angiogenese und Neovaskularisation involviert sind und über die auf Endothelzellen exprimierten Rezeptoren FGFR-1 und -2 wirken können. Als prototypisches Familienmitglied ist FGF-2 bekannt, während bisher keine stimulierenden Einflüsse von FGF-16 und FGF-18 auf Endothelzellen beschrieben wurden (Presta *et al.*, 2005). Dementsprechend demonstrierte die quantitative Auswertung des Angiogeneseassays die größte Stimulation durch FGF-2. Einen geringeren Effekt zeigten FGF-1, FGF-4 und FGF-5, während FGF-16 und FGF-18 keinen Einfluss auf das Sprossungsverhalten der Sphäroide aufwiesen (Abb. 3.6). Dagegen konnte in einem *Wounding Assay* eine biologische Aktivität von FGF-16 und FGF-18 beobachtet werden, indem die Migration von Endothelzellen verstärkt wurde. Anders als bei FGF-2 und in geringerem Maße auch bei FGF-1 und FGF-4 fand jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle keine gleichzeitig erhöhte Vermehrung der Zellen statt (Abb. 3.7). Mit dem Einbau von BrdU konnte das in einem Proliferationsassay bestätigt werden. In diesem Versuch stagnierte die Zahl der markierten Kerne der Zellen, die mit FGF-16 oder FGF-18 behandelt worden waren auf dem Kontrolllevel, FGF-2-Zusatz führte jedoch zu einer deutlichen Erhöhung der DNA-synthetisierenden Zellen (Abb. 3.8). Eine effektive mitogene Wirkung von FGF-16 und FGF-18 ist für Zelltypen bekannt, welche die FGF-Rezeptoren 3 und 4 exprimieren (Konishi *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2005). Aus der Bindung an die endothelialen Rezeptoren 1 und 2 folgte in den Versuchen hingegen nur eine schwache Aktivierung, die sich gegenüber dem durch FGF-2 erzeugten Reiz offenbar auch in einem qualitativen Unterschied der Signaltransduktion äußert. Die verschiedenen Faktoren scheinen an den gleichen Rezeptoren eine unterschiedliche Zellresonanz auslösen zu können, die beim FGF-2 zu einer pleiotropen Stimulation, bei FGF-16 und FGF-18 einzig zur verstärkten Migration der Zellen führt.

Im Bezug auf den Angiogeneseassay lässt sich rückfolgern, dass eine rein migratorische Stimulation des differenzierten Solosphäroids nicht ausreicht, um eine Sprossung quantitativ zu beeinflussen. Die Aktivierung wurde nur durch das Zusammenwirken mehrerer angiogenetischer Impulse, zumindest Proliferation und Migration, erzielt. Ob rein proliferatorische Einflüsse genügten, konnte in den Untersuchungen nicht festgestellt werden, da die proliferatorisch wirksamen Faktoren auch gleichzeitig die Migration verstärkten. Die eingeschränkte Induzierbarkeit unterstreicht den *in-vivo*-ähnlichen Zustand der EC in diesem Modell. Andererseits zeigt das Beispiel des *Wounding Assays*, dass eine durch Konfluenz und Serumreduktion imitierte „Pseudoquiescence“ nicht einhergeht mit einer eingeschränkten Aktivierbarkeit

der Zellen, wie das bei den Sphäroiden selbst bei einer Einbettung in proangiogenem Kollagen mit standardmäßigen 10 % FKS der Fall ist.

Zusammengenommen konnte mit dem Sphäroidmodell ein System etabliert werden, das die Möglichkeit zur Untersuchung der wesentlichen angiogenetischen Teilschritte bot. Ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen *In-vitro*-Assays war die Schaffung einer *in-vivo*-ähnlichen Ausgangslage mit definierten Zelltypen zu einem „ruhenden“ Modell, wodurch eine Analyse von Zell-Zell-Kontakten und die Expressionslokalisation vor einer angiogenen Stimulation ermöglicht wurde. Nach einer Aktivierung durch Kollageneinbettung und Zusätze wurden in Abhängigkeit zu dieser initialen Situation die Sprossungsschritte bis zur Formung voluminöser Kapillaren durchlaufen. In den späteren Arbeiten nach Übertragung des Systems auf die Leberzellen konnte somit direkt verglichen werden, ob die aktivierten HSC oder sMFB im Angiogenesemodell über ähnliche funktionelle Eigenschaften verfügten wie die glatten Muskelzellen im Verbund mit vaskulären Endothelzellen.

4.2 Gemeinsamkeiten von glatten Muskelzellen und differenzierten Sternzellen

Eine sichtbare phänotypische Übereinstimmung von aktivierten HSC und glatten Muskelzellen zeigt sich in der Ausbildung eines kontraktilen Apparates. Bei der *In-vitro*-Differenzierung von isolierten HSC verschwinden innerhalb von wenigen Tagen deren charakteristische phänotypische Merkmale, Lipidtröpfchen und lange zytoplasmatische Ausläufer. Gleichzeitig verleihen gut ausgebildete Stressfasern des Actinzytoskelettes den Zellen ein Myofibroblasten-ähnliches Aussehen (Sato *et al.*, 2003). Gut zu beobachten war das gleichförmige Erscheinungsbild an kultivierten glatten Muskelzellen, die zusammen mit 7 Tage voraktivierten HSC ausplattiert worden waren. In dem sich bildenden Zellrasen lagen Muskel- und Sternzellen als gemischte Population vor und konnten eindeutig nur durch eine Fluoreszenzmarkierung unterschieden werden (Abb. 3.9). In der Kokultur konnte auch festgestellt werden, dass zwischen benachbarten Muskel- und Sternzellen enge Zellkontakte gebildet wurden. Dieses Verhalten legte eine Konkordanz in der Cadherinbindung nahe, die eine Hauptaufgabe in der Zellsortierung ausübt. Wie an Transfektionsexperimenten mit L-Zellen festgestellt wurde, findet eine Segregation von zwei Zelltypen statt, wenn es zur Expression eines qualitativ oder sogar nur quantitativ unterschiedlichen Satzes von Cadherinen kommt (Wheelock und Johnson, 2003a). Entsprechend könnte eine N-Cadherin-Expression nach den

bisherigen Erkenntnissen für den Ersatz der SMC durch aktivierte HSC im Sphäroidmodell zur Bindung von vaskulären EC ausschlaggebend werden.

Inwieweit die phänotypische Konversion eine Entsprechung auf expressioneller Ebene findet, wurde mit der Detektion von muskelspezifischen Genprodukten in HSC untersucht. SMC besitzen eine Reihe von Differenzierungs- und Reifungsmarkern, die zur Diskriminierung gegenüber anderen Zellen herangezogen werden können. Eine eindeutige Zuordnung aufgrund eines einzelnen Merkmals bereitet jedoch Schwierigkeiten, da vaskuläre SMC in Adulten eine bemerkenswerte Plastizität behalten und in Abhängigkeit zu lokalen Umweltsignalen tiefgehende und reversible Änderungen durchmachen können. Wegen dieser Diversität wird zur Identifizierung der vaskulären SMC eine Vielzahl von Übereinstimmungen der typischen Marker herangezogen. Zu diesen zählen u. a. α SMA, SM22 α , Calponin, Caldesmon, SM-MHC, ACLP und Smoothelin als Bestandteile des kontraktiven Apparates sowie Myocardin, das als kardialer/SMC-selektiver Koaktivator des SRF (*serum response factor*) fungiert (Owens *et al.*, 2004). Durch RT-PCRs mit anschließender Sequenzierung der Produkte konnte die mRNA jedes dieser untersuchten Marker in aktivierten HSC nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Die frühen SMC-Markern α SMA, h1-Calponin, SM 22 α , ACLP und h-Caldesmon, werden zwar nicht ausschließlich in glatten Muskelzellen exprimiert, sondern sind auch in einigen anderen Zelltypen während verschiedener Entwicklungsstadien oder pathophysiologischer Prozesse vorhanden, eine Expression in aktivierten HSC war bisher jedoch nur von α SMA bekannt. Smoothelin kommt selektiv in differenzierten viszeralen und vaskulären SMC vor, erscheint aber ebenfalls in stimulierten Bindegewebszellen, die ansonsten nicht viele SMC-typische Marker exprimieren (Owens *et al.*, 2004). Mit aktivierten HSC konnte Smoothelin hier erstmals in einem Myofibroblasten-ähnlichen Zelltyp nachgewiesen werden. Als die spezifischsten Marker gelten SM-MHC und Myocardin, von denen kein gesicherter Beleg außerhalb von SMC bekannt war (Owens *et al.*, 2004). Auch deren Vorkommen zeigte sich nach eintägiger *In-vitro*-Aktivierung von HSC. Weiterhin wurde die Transkription des für eine postulierte heterotypische Endothelzellbindung notwendigen N-Cadherins, sowohl in frisch isolierten wie auch in den aktivierten HSC nachgewiesen. Die Proteinexpression von typischen SMC-Markern, α SMA, SM22 α , Calponin und Myocardin, wurde im Western Blot mit etablierten Antikörpern untersucht und war ab dem dritten Tag der HSC-Kultivierung detektierbar. Im weiteren Verlauf war eine Zunahme der Proteinmengen bis zum zehnten Tag der Aktivierung (3 Tage alte sMFB) festzustellen (Abb. 3. 12). Die Expression ging somit zeitlich einher mit der bekannten Umgestaltung der Zellstruktur zum Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Zu diesem Zeitpunkt war auch in Immunfluoreszenzaufnahmen, bei de-

nen mit den gleichen Antikörpern gearbeitet worden war, ein gut ausgebildeter kontraktiler Apparat sichtbar (Abb. 3.10).

Insgesamt resultiert aus diesen, bei der RT-PCR durch Sequenzierung bestätigten Analysen eine weitgehende Übereinstimmung zwischen aktivierten HSC und SMC. Diese umfasst sogar Marker, deren Vorkommen bisher an Myofibroblasten oder Myofibroblasten-ähnlichen Zellen nicht bekannt war. Eine Ursache der ähnlichen Expression könnte in einer gemeinsamen Abstammung von HSC und SMC verankert sein. Der Ursprung der HSC ist nicht geklärt. Als eine Möglichkeit wird die Neuralleiste diskutiert, aus der auch ein Teil der SMC hervorgeht. Das Neuralgewebe generiert migrierende multipotente Progenitorzellen. Diese können unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zu verschiedenen Zelltypen differenzieren, wie das in Richtung SMC und Myofibroblasten durch TGF- β bewirkt wird (Hirschi und Majesky, 2004; Geerts, 2004; Sato *et al.*, 2003). Nach einer Hypothese stellen Myofibroblasten einen alternativen Phänotyp oder einen Progenitor von vollständig differenzierten SMC dar. So wird die Entstehung der Muskelzellschicht an den hepatischen Arterienverzweigungen während der Organogenese auf portale Myofibroblasten zurückgeführt (Owens *et al.*, 2004; Libbrecht *et al.*, 2002).

Der Ursprung der SMC aus den neuronalen Progenitoren wird auch in den Zusammenhang mit deren Expression von Neurotrophinen und Neurotrophinrezeptoren gebracht. Mittels RT-PCR konnten ebenfalls in aktivierten HSC die Genprodukte von GFAP (*glial acidic fibrillary protein*), N-CAM (*neural-cell adhesion molecule*), NGF (*nerve growth factor*), NT-3 (Neurotrophin-3), Trk-B (Tyrosinkinase B) und Trk-C nachgewiesen werden. In portalen Myofibroblasten werden NT-3, Trk-B und Trk-C hingegen nicht exprimiert. Eine Gegenüberstellung der drei Zelltypen verdeutlicht die größte Übereinstimmung zwischen aktivierten HSC und SMC (Tabelle 3.1). Anhand dieses Expressionsmusters wäre es daher eigentlich treffender, die aktivierten HSC statt Myofibroblasten-ähnlich, besser als SMC-ähnlich zu bezeichnen. Die Differenzierung zu einem SMC-ähnlichen Phänotyp lässt auch eine Übernahme von perizytären Funktionen bei der Gefäßbildung wahrscheinlich erscheinen, wie sie an den zirrhotischen Septen und in den bei fibrotischer Leber gehäuft entstehenden primären und sekundären Tumoren angenommen wird.

Eine der wichtigsten Funktionen von vaskulären SMC und Perizyten ist die Stabilisierung von Blutgefäßen. Die bei der Angiogenese neugebildeten Kapillaren bestehen nur aus EC, sie fallen leicht auseinander, sind undicht, schlecht durchblutet und bilden sich leicht zurück. Erst durch das Hinzuziehen von SMC oder Perizyten entstehen reife Gefäße, in denen die EC ihre

proliferativen und migrativen Aktivitäten beenden, differenzieren, ruhend werden und längerfristig überleben (Carmeliet und Conway, 2001). Eine Schlüsselstellung nehmen dabei die Angiopoietine ein, die antagonistisch den endothelialen Tyrosinkinase-Rezeptor Tie-2 binden. Das endokrine Angiopoietin-2 (Ang-2) wirkt destabilisierend und bewirkt kein Signal bei seiner Bindung. Parakrin in SMC produziertes Angiopoietin-1 (Ang-1) verdrängt Ang-2 vom Rezeptor und löst die Signaltransduktion aus. Nur durch ein dauerhaftes Tie-2 Signal erhalten die EC ihre ruhenden Eigenschaften (Scharpfenecker *et al.*, 2004). Eine Expression von Ang-1 durch HSC wurde daher als Voraussetzung erachtet, um eine mögliche Rolle als effektiver parakriner Stabilisator bei der sinusoidalen Angiogenese ausüben zu können. Zum Nachweis wurde die RNA von *in-vitro*-aktivierten HSC auf Ang-1 und Ang-2 untersucht. In beiden Proben konnte nach RT-PCR ein entsprechendes Transkript amplifiziert werden (Abb. 3.13). Zusammen mit der Muskelzell-gleichen Markerexpression, dem Bindeverhalten in der Kokultur und dem Nachweis von N-Cadherin deutet das Vorhandensein von Ang-1 darauf hin, dass die aktivierten HSC eine Funktion im Zusammenhang mit vaskulären EC ausüben. Die „natürliche“ Rolle wäre in der Kapillarisation der Sinusoide zu finden. Als fataler Nebeneffekt könnte sich das vaskuläre Potenzial bei der Tumorentwicklung in den Sinusoiden auswirken.

4.3 Differenzierung von hepatischen Sternzellen im Kokultursphäroid mit vaskulären Endothelzellen

In malignen Tumoren der Leber sind Myofibroblasten-ähnliche Zellen identifiziert worden, die als Perizyten an der Ausbildung eines Gefäßsystems beteiligt sein könnten. Wegen der Lokalisation im sinusoidalen Bereich und aufgrund von immunohistochemischen Untersuchungen wird oft darauf geschlossen, dass es sich hierbei um Zellen handelt, die aus HSC hervorgegangen sind (Verhoeven und Buysens, 1988; Olasso *et al.*, 2003). Infolge ihrer Heterogenität und des Fehlens eines HSC-spezifischen Antigens ist eine eindeutige Zuordnung allerdings nicht erreichbar und es bleibt offen, ob es sich um aktivierte HSC, eine Subklasse, oder einen myofibroblastischen Zelltyp anderen Ursprungs handelt. Die bisherigen Ergebnisse einer vaskulär-SMC-ähnlichen Ausrichtung der HSC-Differenzierung sprechen allerdings für eine Beteiligung an angiogenetischen Vorgängen, die sich im unmittelbaren Umfeld ihres natürlichen „Reviere“ ereignen. Ein weiteres Indiz wäre ein *in vitro* erbrachter Nachweis, dass aktivierte HSC auf vaskuläre EC bei der Ausbildung von Gefäßstrukturen einen gleichartigen Einfluss ausüben wie Perizyten. Eine Möglichkeit das zu untersuchen, bot sich durch das

Sphäroidsystem, indem die HSC mit den vaskulären EC als Kokultur eingesetzt wurden und somit einen direkten Vergleich zum SMC/EC Sphäroid erlaubten. Hierzu wurde zuerst überprüft, ob überhaupt die Bildung eines gemeinsamen Grundkörpers zustandekam. Verwendet wurden aus Rattenleber frisch isolierte, sowie über verschiedene Zeiträume *in-vitro*-aktivierte HSC, zusammen mit HUVEC. Die Formation zu einer äußerlich erkennbar abgerundeten Struktur erwies sich abhängig von der Kultivierungszeit der Sternzellen. Die Sphäroide mit nicht voraktivierten HSC bildeten sich deutlich langsamer aus als mit voraktivierten oder mit sMFB. Zudem integrierten in den Ansätzen mit frisch isolierten HSC nicht alle Zellen in einem einzigen zentralen Sphäroid, sondern bildeten zusätzlich einige kleinere Aggregate in der Peripherie. Eine Immunfärbung mit VWF Antikörpern zeigte, dass die äußerlich sichtbare Formierung zu Sphäroiden zeitlich parallel zur Anordnung der Endothelzellen als Oberflächenschicht verlief (Abb. 3.14). Der Differenzierungsstatus der HSC schien also direkten Einfluss auf die Schaffung einer gemeinsamen Struktur mit den EC auszuüben. Im Ansatz mit frisch isolierten HSC könnte eine geringere Migrationsfähigkeit erklären, weshalb nicht alle Zellen in ein gemeinsames Sphäroid gelangten. Neben den mechanischen Voraussetzungen eines gut ausgebildeten Actin-Zytoskeletts fehlt den nicht differenzierten Sternzellen auch der PDGF-Rezeptor β . Der von vaskulären EC gebildete Wachstumsfaktor PDGF-B bewirkt durch die Bindung an diesen Rezeptor auf SMC und Perizyten deren chemotaktische Attraktion, sie wandern zu neu gebildeten Kapillaren und umschließen sie. In HSC wird die Expression des Rezeptors erst durch die Aktivierung hochreguliert und eine Bindung mit PDGF-B wirkt dann ebenfalls als starker Stimulus auf die Migration der Zellen (Hellström *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 1999). Das Hinzuziehen der HSC bei der Organisation des Sphäroids kann daher mit den voraktivierten direkt nach dem Ansetzen im Methocelmedium erfolgen, während die frisch isolierten zuerst noch einen Differenzierungsprozess durchlaufen müssen. Im Endeffekt führte die Kokultivierung jedoch in allen Ansätzen zum gleichen dreidimensionalen Aufbau. Im Kern waren nach spätestens acht Tagen kaum noch Endothelzellen nachzuweisen, die jetzt eine einzellige Außenschicht bildeten. Damit ordneten sich die vaskulären EC mit den HSC spontan zu exakt der gleichen *Inside-out*-Anordnung eines Blutgefäßes an, wie es auch zusammen mit vaskulären SMC vollzogen worden war. Im Falle der voraktivierten HSC auch in einem annähernd entsprechenden Zeitrahmen von zwei bis vier Tagen. Dass die aktivierten HSC hierbei tatsächlich in der Lage waren, eine perizytäre Funktion zu übernehmen, zeigten enge Kontakte zwischen den beiden Zelltypen, wie sie an elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu sehen waren. Eine bei der Immunfärbung erkennbare besonders starke Markierung in der Kontaktzone deutet darauf hin, dass Cadherine in diesem Modell einen wesentlichen

Beitrag zu der heterotypischen Bindung zwischen EC und aktivierten HSC leisten. Wahrscheinlich ist vorwiegend N-Cadherin daran beteiligt, das in diesem Bereich eine ähnliche Konzentration erkennen ließ wie Pan-Cadherin (Abb. 3.15). Für das Überleben und die Beibehaltung des Differenzierungsstatus (oder eine weitere Differenzierung) der HSC im Sphäroid erwies sich die Nähe zu den Endothelzellen als notwendig. Die gestreckte Struktur der Zellen war nur in den äußersten Schichten ausgeprägt und nahm im Kernbereich ab, einhergehend mit der Zunahme von apoptotischen oder nekrotischen Zellen. Bei einer Entfernung von 150 μm zum Zentrum war eine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff durch Diffusion gewährleistet und konnte nicht die Ursache für diese Zunahme darstellen. Ein direkter Einfluss auf das Überleben der Sternzellen durch die Bindung an die Endothelzellen und deren parakrine Interaktionen ist daher anzunehmen. Der Einfluss auf die Differenzierung wurde durch die Expression von αSMA verdeutlicht. Dieser typische Marker für SMC war bei der *In-vitro*-Kultivierung auf Plastikschalen durchgängig aktiviert worden. Im Sphäroid konnte er dagegen nur in dem unmittelbar an die Endothelzellen angrenzenden Bereich nachgewiesen werden (Abb. 3.15 D). Die Differenzierung benachbarter Sternzellen kann somit dem direkten Einfluss von vaskulären Endothelzellen zugeschrieben werden. In der anderen Richtung wirkte sich auch die Anwesenheit der Sternzellen auf die Aktivierungsfähigkeit der Endothelzellen aus. Im Angiogeneseassay durch Einbettung der Sphäroide im Kollagengel führte die Kokultivierung zu deren deutlicher Stabilisierung. Die Zugabe des potenten angiogenetischen Faktors FGF-2, die am Solo-Endothelzellsphäroid zu der Ausbildung einer Vielzahl von Sprossen geführt hatte, erwies sich am Kokultursphäroid mit HSC als wirkungslos. Hier zeigte sich kein Unterschied des Sprossungsverhaltens gegenüber den Kontrollen ohne Faktorzusatz (Abb. 3.16). Damit hatten die HSC für die Kapillarbildung in diesem Modell einen gleichartigen Einfluss, wie es für vaskuläre glatte Muskelzellen festgestellt worden war. Der repressive Effekt, der bei SMC der parakrinen Wirkung des Angiopoietin-1 zugeschrieben wird, kann entsprechend der nachgewiesenen Expression in aktivierten Sternzellen hier ebenfalls ausschlaggebend sein. Aber auch die von beiden vollzogene heterotypische Cadherinbindung ist als zusätzliche Barriere für Migration und Proliferation der Endothelzellen sicher von Bedeutung. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Kokultivierungsversuche, dass wesentliche Funktionen vaskulärer glatter Muskelzellen bei der Ausbildung und Festigung von Gefäßen mit vaskulären Endothelzellen von aktivierten HSC als Perizyten übernommen werden können.

4.4 Differenzierung von hepatischen Sternzellen und sinusoidalen Endothelzellen im gemeinsamen Kokultursphäroid

In der fibrotischen Leber kommt es zu einer Vaskularisierung der Sinusoide, in deren Verlauf die typischen Eigenschaften der zuvor diskontinuierlich und porösen Endothelzellen verschwinden und durch ein kontinuierliches Endothelium ersetzt werden. Diese Umgestaltung soll nicht durch einen Einbau von vaskulären Endothelzellen erfolgen, sondern aus einer Dedifferenzierung der vorhandenen sinusoidalen Endothelzellen resultieren (Xu *et al.*, 2003). Gleichzeitig kommt es u. a. mit dem vermehrten Einbau von Collagen Typ IV und Laminin zur Ausbildung einer dichten Basalmembran, während in der gesunden Leber eine weniger dichte Basalmembran-ähnliche Matrix mit charakteristischen Fibronektin- und Collagen-Typ-I-Bestandteilen vorhanden war (Zeisberg *et al.*, 2006; Martinez-Hernandez und Amenta, 1995). Welche perizytären Zellen die neuartigen Gefäße umschließen, ist nicht geklärt. Zumeist wird transdifferenzierten HSC diese Rolle zugeschrieben, aufgrund der räumlichen Lage des undifferenzierten Typus zu den LSEC und ihrer relativ großen Anzahl. Im Disse'schen Raum sind allerdings weitere Myofibroblasten und Myofibroblasten-ähnliche Zellen vorhanden, die in der gesunden Leber nur in geringer Zahl auftreten. Es ist jedoch nicht bekannt, wie sich das Verhältnis der Populationen und Subpopulationen über den Jahre andauernden fibrotischen Verlauf tatsächlich entwickelt (Cassiman und Roskams, 2002). Ebenso kommt es innerhalb von Tumoren, die sich in der Leber entwickeln, zu Gefäßbildungen, bei denen die beteiligten Perizyten aus HSC hervorgegangen und an deren Aufbau auch dedifferenzierte LSEC beteiligt sein könnten (Terayama *et al.*, 1996; Gervaz *et al.*, 2000). Aber auch hier kann man letztendlich nur vaskuläre Strukturen als Ergebnis feststellen, jedoch nicht bestimmen, ob die beteiligten Zellen tatsächlich aus LSEC und aktivierten HSC hervorgegangen sind. Der Nachweis, dass beide Zelltypen im differenzierten bzw. dedifferenzierten Zustand zur Ausbildung gemeinsamer vaskulärer Strukturen fähig sind, war bislang weder aus *In-vivo*-, noch aus *In-vitro*-Untersuchungen bekannt. Wie zuvor das Sphäroid mit aktivierten HSC und HUVEC, so sollte die Entwicklung eines Kokulturmodells aus aktivierten HSC und LSEC Aufschluss darüber geben, ob die Ausbildung einer funktionellen Einheit hier gleichermaßen möglich ist. In diesem *In-vitro*-Ansatz bestand die Möglichkeit, die definierten isolierten Zelltypen zusammenzufügen und zu testen, ob es in Parallelität zu den bisher untersuchten Kokultursphäroiden zur Ausbildung einer ähnlich geordneten *Inside-out*-Struktur eines Blutgefäßes kam

und inwieweit sich die beiden Zelltypen dabei gegenseitig in ihrer Differenzierung beeinflussen.

In den vorab durchgeführten Ansätzen wurde das Verhalten von LSEC in Sphäroiden untersucht. Bei der Kultivierung von Solosphäroiden zeigte sich ein deutlicher Unterschied zu vaskulären EC. Während letztere ein gemeinsames Sphäroid mit nahezu allen Zellen eines Ansatzes bilden, entstanden aus den Leberzellen mehrere kleinere Sphäroide mit weniger als 100 Zellen und etwa 20 μm Durchmesser (Abb. 3.19). Dieser Wert liegt etwas höher als der Innendurchmesser der Sinusoide ($< 7 \mu\text{m}$). Möglicherweise stellt er ein Maximum für den Gewebeverband dar, der aufgrund struktureller Eigenschaften der LSEC in einer dreidimensionalen Anordnung nicht überschritten werden kann.

In einer Kokultivierung wurde der Unterschied von sinusoidalen und vaskulären Endothelzellen im Hinblick auf die Zellbindungen verdeutlicht. Zwar entstand ein gemeinsames Sphäroid, aber es erfolgte keine erkennbare innere Ordnung. Aggregate von sinusoidalen Zellen lagen verstreut im gesamten Querschnitt vor (Abb. 3.19). Über die Zell-Zell-Adhäsion zwischen sinusoidalen Endothelzellen *in vivo* gibt es kaum Erkenntnisse, eine Cadherinbindung nicht dedifferenzierter Zellen ist nicht bekannt. Unter Scherstress wurde jedoch die Expression von VE-Cadherin *in vitro* beobachtet (Braet *et al.*, 2004). Eine Aktivierung des VE-Cadherins im Sphäroid durch den Kontakt mit den vaskulären Endothelzellen schien nicht zu erfolgen. Anderenfalls wäre durch die dann entstandenen heterotypischen Bindungen auch der Aufbau einer gemeinsamen Struktur zu erwarten gewesen. Ob eine Dedifferenzierung durch Perizyten induziert werden konnte, wurde durch eine Kokultivierung von LSEC mit HUASMC und HSC in verschiedenen Aktivierungsstadien getestet. Bei der Fibrosierung des Lebergewebes geht die Differenzierung der HSC einher mit der Kapillarisation der Sinusoide. Wenn hierbei ein direkter Einfluss der Sternzellen einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung der Endothelzellen spielen sollte, könnte das theoretisch auch im *In-vitro*-Experiment nachvollzogen werden. In den Versuchen erfolgte die Bildung eines gemeinsamen Kokultursphäroides gleichermaßen mit HUASMC, frisch isolierten oder voraktivierten HSC und war bei allen nach zwei bis vier Tagen abgeschlossen. Die Endothelzellen lagen auch hier wieder in Gruppen verteilt im gesamten Sphäroid vor (Abb. 3.20 und 3.22). Eine Expression der vaskulären Marker Von Willebrand-Faktor, dessen Auftreten bei der Kapillarisation der Sinusoide beobachtet wird (Urashima *et al.*, 1993; Terayama *et al.*, 1996), oder CD 31 wurde bei einer weiteren Inkubation bis zu acht Tagen nicht nachgewiesen. Wenige vorhandene positive Zellen können auf die Verunreinigungen durch vaskuläre Endothelzellen bei der Präparation zurückzuführen sein. Eine Zunahme der positiven Zellen trat während des beobachteten Zeit-

raumes jedoch nicht auf, so dass ein differenzierender Einfluss durch die aktivierten Sternzellen in diesem Modell und in diesem Zeitraum ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.21 und 3.22). Obwohl sich das Verhalten der sinusoidalen damit deutlich von dem der vaskulären Endothelzellen unterschied, wurde im dreidimensionalen Angiogeneseassay untersucht, ob es dennoch zur Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen durch die nicht erkennbar aktivierten Endothelzellen kommen konnte.

Im Kollagengel kam es sowohl in Solosphäroiden, wie auch in Kokultursphäroiden mit aktivierten HSC oder HUASMC zu Aussprossungen, deren Zahl und Größe zum Teil eine Abhängigkeit von angiopoetisch wirksamen Zusätzen aufwiesen (Abb. 3.23). Ausgehend von einer geringen Basalsprossung ließen sich die Solo-LSEC-Sphäroide durch FGF-2 und VEGF stimulieren, vergleichbar mit den Ergebnissen, die zuvor bereits für die Solosphäroide aus vaskulären Endothelzellen festgestellt worden waren. Im Kokultursphäroid von LSEC mit frisch isolierten HSC wurden Faktor unabhängig strahlenartige Ausläufer in allen Ansätzen gebildet, die allerdings dünner waren als die bisher an Sphäroiden gebildeten Sprosse. Sie scheinen daher nicht aus migrierenden Endothelzellen hervorgegangen zu sein, zumal ähnliche Ausläufer auch an Solosphäroiden aus frisch isolierten HSC hervortraten (ohne Abbildung). An Sphäroiden aus voraktivierten HSC waren diese dünnen Ausläufer nicht mehr zu beobachten. Kokultursphäroide aus aktivierten HSC oder HUASMC mit LSEC zeigten im Kontrollansatz die Ausbildung weniger kapillarähnlicher Sprosse, die durch FGF-2-, VEGF- und PMA-Stimulation deutlich verstärkt wurde. Anders als bei vaskulären Endothelzellen, die im Kokultursphäroid nicht durch FGF-2 oder VEGF induziert worden waren, konnte hier durch HSC oder SMC kein ruhender Zustand der LSEC herbeigeführt werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass LSEC innerhalb des Sphäroidsystems nicht durch ein Umfeld aus muralen oder Myofibroblasten-ähnlichen Zellen zur Dedifferenzierung in Richtung vaskulärer Endothelzellen induziert werden konnten. Trotz wesentlicher Unterschiede zu HUVEC im dreidimensionalen Aufbau und zur Stimulierbarkeit der Kokultursphäroide kam es aber zur Bildung ähnlicher Sprosse. Bisher waren von sinusoidalen Endothelzellen lediglich minimale Kapillarbildungen auf Matrigel bekannt (Murakami *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003). Im Angiogeneseassay mit Sphäroiden konnte hier gezeigt werden, dass sinusoidale Endothelzellen in geeigneter Umgebung durchaus in der Lage sind, lange gefäßartige Sprosse zu bilden. Deren genauere Charakterisierung wurde mit verschiedenen Färbetechniken durchgeführt.

4.5 Untersuchung der an Sphäroiden gebildeten Kapillarstrukturen

An den gebildeten Kapillarstrukturen wurde untersucht, wie sich der Aufbau durch die LSEC gestaltete, ob es durch den Vorgang der Sprossung zur Differenzierung mit der Expression vaskulärer Marker gekommen war und wie die HSC bei der Bildung beteiligt waren. Zur Färbung wurden die gesprossenen Sphäroide im Kollagengel mit einer *Whole-Mount*-Technik immunmarkiert. Wie bei den Sprossen aus vaskulären EC, die aus einem Kokultursphäroid mit HSC hervorgingen, zeigte sich auch bei LSEC die Bildung kapillarähnlicher Strukturen. Sowohl in Kokultur mit HUASMC, wie auch mit aktivierten HSC entstanden zum Teil voluminöse Röhren mit Verzeigungen, wie sie von der Bildung vaskulärer Gefäßsysteme her bekannt sind (Abb. 3.24). Aus diesen Ergebnissen des Angiogenesemodells mit sinusoidalen Endothelzellen lässt sich schließen, dass LSEC und aktivierte HSC die strukturellen Voraussetzungen schaffen können für eine Vaskularisierung. Auf die Expression der getesteten vaskulären Marker Von Willebrand-Faktor, CD 31 und VE-Cadherin hatte die Kapillarbildung am LSEC/HUASMC-Sphäroid keinen Einfluss. Alle drei eingesetzten vaskulären Marker wurden unter bestimmten Bedingungen schon in dedifferenzierten sinusoidalen Endothelzellen beobachtet. In fibrotischer Leber tritt VWF in den Sinusoiden auf und CD 31 erscheint an der Oberfläche der Zellen. Eine Aktivierung von VE-Cadherin in kultivierten sinusoidalen Endothelzellen wurde unter dem Einfluss von Scherkräften an der Zellmembran lokalisiert (Rosmorduc *et al.*, 1999; DeLeve *et al.*, 2004; Braet *et al.*, 2004). Am Sphäroid aus LSEC und aktivierten HSC konnten VWF und CD 31 nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch eine Expression des als interendotheliales Bindeprotein fungierenden VE-Cadherins (Abb. 3.25 A). Da in Kokultur mit SMC kein VE-Cadherin in den Sprossen nachgewiesen werden konnte, sieht es hier aus, als ob die hepatischen Sternzellen bei der Sprossung der Endothelzellen spezifisch vaskuläre Adhäsionsmoleküle induzieren könnten. In einer Doppelfärbung zeigte sich, dass die aktivierten HSC zusammen mit den LSEC an der Ausbildung der Kapillarsprosse beteiligt waren (Abb. 3.25 C). Im Gegensatz zu vaskulären Endothelzellen, die Perizyten erst nach der Bildung von Kapillaren über parakrine Reize hinzuziehen, entspricht dieses Verhalten eher der Situation in der Leberregeneration, wo nach einer partiellen Hepatektomie die (nicht differenzierten) hepatischen Sternzellen vorausgehen. Sinusoidale Endothelzellen folgen erst danach auf der Bahn der HSC (Martinez-Hernandez und Amenta, 1995). Im Sphäroid-Angiogenesemodell könnte durch die Einbettung in Kollagen die Bahn bereits geebnet sein, die z. B. bei der Invasion in Tumore durch HSC bereitgestellt werden muss. Die

gemeinsame Bildung der Kapillarsprosse ist ein Beleg für das Zusammenwirken von aktivierten HSC mit dedifferenzierten LSEC, die aufgrund der bisherigen histologischen Untersuchungsmethoden nur vermutet werden konnte. Durch die definierte Zusammensetzung in diesem Kultursystem mit den beiden isolierten Zelltypen kann erstmals nachgewiesen werden, dass die LSEC mit den aktivierten HSC in der Lage sind, alleine tubuläre, kapillarähnliche Strukturen zu bilden. Die zelluläre Situation entspricht der in fibrotischen Sinusoiden mit dedifferenzierten LSEC und differenzierten HSC bzw. sMBF. Durch die pathogenen Umstrukturierungen der Leber ist hier bereits ein Milieu geschaffen, das durch verringerte Scherkräfte, die vermehrte Produktion und Komposition der ECM, sowie verminderte Ausschüttung von inhibitorischen Faktoren durch Hepatozyten zu einer Begünstigung einer Adhäsion und Proliferation von zirkulierenden Tumorzellen beiträgt (Zwibel *et al.*, 2000). Generell werden diese ersten Schritte einer Metastasierung relativ effizient durchlaufen. Das Hinzuziehen von Endothelzellen und Perizyten für die notwendige Blutversorgung stellt hingegen eine entscheidende Barriere für ein weiteres Wachstum dar (Chambers *et al.*, 2002). Die demonstrierte vaskuläre Gefäßbildung durch dedifferenzierte LSEC und differenzierte HSC bedeutet für die Tumorangio-genese im fibrotischen sinusoidalen Umfeld, dass keine weiteren Endothelzellen oder Perizyten benötigt werden. Das könnte ein wesentlicher Grund dafür sein, weshalb so viele Mikrometastasen bevorzugt in diesem Bereich einen angiogenetischen Switch durchlaufen und sich weiter entwickeln können.

4.6 Ausblick

Es existiert eine Vielzahl an Lebermodellen, die jeweils für die Untersuchungen von Perfusion, Metabolismus, Regeneration, Fibrose und Tumorbildung eingesetzt werden können. Auch angiogenetische Vorgänge können *in vivo*, eventuell auch anhand *Ex-vivo*-Gewebe wie Schnittpräparaten, jedoch bisher nicht *in vitro* untersucht werden (Ito und Houston, 2004; Heijstek *et al.*, 2005; Palmes und Spiegel, 2004; Guillouzo, 1998; Verrill *et al.*, 2002). Die Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass diese Lücke durch das entwickelte Kokultursphäroids-system mit isolierten hepatischen Zellen geschlossen werden kann. Die Vorteile zu den bisherigen Modellen ergeben sich neben den geringeren Kosten und der Möglichkeit, in kurzer Zeit tausendfach parallele Ansätze aus der gleichen Präparation zu generieren, vor allem aus der Zusammensetzung mit definierten Zelltypen. Das eröffnet neue Möglichkeiten insbesondere für Untersuchungen der Tumorangio-genese, bei der die Typen und Subklassen der beteiligten Myofibroblasten-ähnlichen Zellen nicht eindeutig aus der histologischen Betrachtung hervorgehen (Cassiman und Roskams, 2002). Für meine Versuche habe ich mich im

wesentlichen auf die Isolierung von Lipid-speichernden Sternzellen und LSEC beschränkt, jedoch ist eine Erweiterung des Systems mit Hepatozyten vorstellbar, an dem HC- Proliferation und HC-HSC Interaktionen untersucht werden könnten. Ein Kokulturtest von Hepatozyten mit Endothelzellen führte zu einer sphäroidalen Anordnung mit einem Kern aus vitalen Hepatozyten und einer endothelialen Außenschicht (Daten nicht gezeigt). Mit geeigneten adaptiven Kulturbedingungen könnte ein Drei-Zell-Sphäroid aus HC, HSC und EC und damit ein einzigartiges generelles *In-vitro*-Lebermodell geschaffen werden.

5. Zusammenfassung

Die Mitwirkung Myofibroblasten-ähnlicher Zellen als Perizyten bei der fibrotisch bedingten Vaskularisierung und bei der Tumorangiogenese wird im Bereich der Lebersinusoide beobachtet. Eine Vermutung ist, dass es sich hierbei um aktivierte HSC handelt, die *in vivo* bei chronischen Leberschädigungen auftreten und deren Differenzierung zum myofibroblastischen Phänotyp im Modell durch *In-vitro*-Kultivierung auf Plastikschaalen erreicht werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte HSC wichtige Voraussetzungen erfüllen, um die im normalen Gefäßsystem von SMC erbrachten Funktionen zu übernehmen und in einem neuartigen Kokulturmodell sowohl mit vaskulären wie auch mit dedifferenzierten sinusoidalen Endothelzellen kapillarähnliche Strukturen bilden konnten.

Die im Erscheinungsbild den SMC ähnelnden *in-vitro*-aktivierten HSC bildeten mit diesen einen gemischten Zellrasen. Enge heterotypische Kontakte deuteten auf eine von den Muskelzellen her bekannte Bindung über N-Cadherin hin, dessen Expression auch in aktivierten HSC erfolgt und für die Verbindung zu vaskulären Endothelzellen verantwortlich sein soll. Ergänzend zu den bisher bekannten phänotypischen Übereinstimmungen in den kontraktile Strukturen konnten die SMC-typischen Marker SM22 α , Calponin, Caldesmon, Smoothelin, ACLP, SM MHC und Myocardin über eine RT-PCR in aktivierten HSC nachgewiesen werden, ACLP und SM MHC damit erstmals außerhalb von Muskelzellen. Ferner konnte gezeigt werden, dass mit der Bildung von Angiopoietin-1 eine wesentliche Voraussetzung zur parakrin bewirkten Stabilisierung von Endothelzellen in vaskulären Blutgefäßen erfüllt wurde. Zusammen mit weiteren Literaturwerten ließ sich im Expressionsmuster eine weitgehende Übereinstimmung zu SMC erkennen, die eine perizytäre Ausrichtung der Sternzellendifferenzierung nahe legt.

Mit dem Einbau von isolierten LSEC in Kokultursphäroide konnte das bestätigt werden. Das an vaskulären Zellen entwickelte System hatte sich als ein überzeugendes *Inside-out*-Modell eines Gefäßes erwiesen, an dem die Aktivierung von ruhenden Endothelzellen bis zur Bildung von Kapillarsprossen studiert werden konnte. Beim Vergleich wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu konventionellen *In-vitro*-Assays Endothelzellen in diesem Modell nicht durch singular migrative Reize angeregt werden konnten. Bewirkt werden könnte das durch verstärkte Zell-Zell-Kontakte an der Sphäroidoberfläche, worauf eine gleichzeitig hohe Cadherin- und β -Catenindichte in diesem Bereich deuten.

Beim Austausch von vaskulären SMC gegen HSC bildete sich in der Kokultur mit vaskulären Endothelzellen spontan ein gemeinsames Sphäroid, dessen Bildungsgeschwindigkeit durch

eine *In-vitro*-Aktivierung der Leberzellen begünstigt wurde. Analog zu den SMC bildeten die HSC den Kern, dessen äußere Zellen elektronenmikroskopisch sichtbare heterotypische Verbindungen zu einer Endothelschicht an der Oberfläche ausgebildet hatten. Eine gegenseitige Beeinflussung zeigte sich einerseits in einer Aktivierung von α SMA in den HSC an der Kontaktzone, zum anderen in einer Stabilisierung der Endothelzellen bei einem Angiogeneseassay durch Kollageneinbettung der Sphäroide. Der repressive Effekt der aktivierten HSC äußerte sich hier in der Nicht-Induzierbarkeit von Kapillarsprossung durch VEGF und FGF-2 - im Gegensatz zum Solo-EC-Sphäroid - und dürfte neben den zusätzlich zu überwindenden Bindungskräften auf die parakrine Wirkung von Ang-1 zurückzuführen sein. Die Ergebnisse dieser Kokultivierung belegen, dass aktivierte HSC die Fähigkeit besitzen, als Perizyten an vaskulären Strukturen mitzuwirken.

Als Partner kommen dabei LSEC in Betracht, die bei chronischen Wundheilungsprozessen oder Metastasierung in die Leber eine synchrone Dedifferenzierung vollziehen, die zur Vaskularisierung der Sinusoide führt. Im gemeinsam gebildeten Sphäroid konnte jedoch keine Interaktion von LSEC und aktivierten HSC festgestellt werden. Zu einer gefäßtypischen Anordnung kam es selbst nach einer bis zu achttägiger Inkubation nicht und eine Induktion von vaskulären Markern (VWF, CD 31) war nicht nachzuweisen. Dennoch führte die Kollageneinbettung im Angiogeneseassay zur Ausbildung zahlreicher voluminöser und verzweigter Kapillarsprosse, die durch den Zusatz angiogener Faktoren (VEGF, FGF-2) verstärkt werden konnten. In diesen Sprossen konnte mit VE-Cadherin ein vaskulärer Marker nachgewiesen werden. Eine Kofärbung der beiden Zelltypen zeigte, dass am Aufbau der Kapillaren aktivierte HSC mit den LSEC zusammenwirkten. Die in diesem *In-vitro*-Modell vollzogene Anordnung entspricht damit derjenigen eines Gefäßes mit dedifferenzierten Endothelzellen und Myofibroblasten-ähnlichen Zellen, wie sie in vaskularisierten Sinusoiden vorliegt. Die leichte Induzierbarkeit dieser Kapillarsprosse durch kollagenöse Umgebung kann dazu beitragen, dass die Angiogenese von Metastasen vorwiegend im perizentralen Bereich auftritt und eine Erklärung bieten, weshalb die Zirrhose der Leber das Tumorwachstum extrem begünstigt.

6. Summary

The involvement of myofibroblast-like cells as pericytes in fibrotically caused vascularisation and in tumor angiogenesis can be observed in the area of liver sinusoids. These are presumed to be activated hepatic stellate cells (HSC), which appear *in vivo* in case of chronic liver diseases, and whose differentiation into a myofibroblastic phenotype can be achieved by *in vitro* cultivation on plastic dishes. In this study I was able to demonstrate, that activated HSC fulfil important preconditions to adopt functions rendered by smooth muscle cells (SMC) in the normal vascular system and were able to form capillar-like structures in a novel coculture model both with vascular and with dedifferentiated sinusoidal endothelial cells (LSEC). Resembling SMC in visual phenotype, *in vitro* activated HSC formed a mixed cell layer with them. Tight heterotypic contacts pointed to a binding via N-Cadherin, as known from muscle cells. N-Cadherin expression also occurred in activated HSC and is assumed to be responsible for the junctions with vascular endothelial cells. In addition to hitherto existing phenotypical concordance in contractile structures the SMC-typic markers SM22 α , calponin, caldesmon, smoothelin, ACLP, SM MHC and myocardin were detected by RT-PCR in activated HSC, thus ACLP and SM MHC for the first time beyond muscle cells. Furthermore production of Angiopoietin-1, which is an essential prerequisite for paracrine effected stabilisation of endothelial cells in the vascular system, could be demonstrated. Along with further data the expression profile revealed an extensive accordance to SMC, suggesting a pericytal orientation of HSC differentiation. This was confirmed by the integration of isolated sinusoidal liver cells into coculture spheroids. This system, developed with vascular cells, had been proven a convincing *inside-out* model of a vessel, allowing the study of the activation of quiescent endothelial cells to the point of forming capillary-like sprouts. Comparison showed, that in this model - in contrast to conventional *in vitro*-assays - endothelial cells could not be activated by singular migrative stimuli. This may be caused by intensified cell-cell contacts on the surface of the spheroids, indicated by a simultaneous occurring high density of cadherin and β -catenin in this area. By replacing vascular SMC with HSC in coculture with vascular endothelial cells, a joint spheroid was formed spontaneously. The assembling velocity was promoted by *in vitro* activation of the liver cells. HSC, in analogy to SMC, formed the core, whose outer cells developed heterotypic junctions with an endothelial layer on the surface, visible by electron microscopy. Interaction appeared on the one hand by activation of α -SMA in HSC of the contact zone, on the other hand by stabilisation of endothelial cells in an angiogenesis assay, performed by embedding spheroids into a collagen gel. In this assay, the repressive effect of activated HSC became manifest in non-inducibility of capillary sprouts by VEGF and FGF-2 – contrary to solo-EC-spheroids – and, beside the need to overcome additional cohesion, may be attributed to paracrine effects of Angiopoietin-1. The results of this cocultivation substantiate the assumption, that activated HSC have the ability to function as pericytes in vascular structures. LSEC are suitable partners that perform a synchronous dedifferentiation in chroni-

cal wound healing processes or metastasis into the liver, leading to vascularisation of the sinusoids. Yet, in the collectively formed spheroid, no interaction of LSEC and activated HSC could be detected. Even after eight days of incubation there was no vessel-typic alignment, and an induction of vascular markers (VWF, CD 31) could not be found. However, embedding into collagen gel in an angiogenesis assay led to the formation of numerous voluminous and branching capillary-like sprouts, that could be increased by adding angiogenic factors (VEGF, FGF-2). Within these sprouts, the vascular marker VE-Cadherin was identified. Co-staining of the two cell types showed activated HSC and LSEC coacting in assembling the capillary. The resulting arrangement in this *in vitro* model thus resembles that of a vessel with dedifferentiated endothelial cells and myofibroblast-like cells, as existing in vascularised sinusoids. Easy inducibility of these capillary sprouts by collagenous environment may contribute to the appearance of metastatic angiogenesis predominantly in the pericentral area and offers an explanation for the fact that cirrhosis of the liver promotes tumour growth extremely.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Reinmuth N, Bucana CD, and Ellis LM (2001): Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. *Cancer*. 92: 1138-1143.
- Ankoma-Sey V, Wang Y, and Dai Z (2000): Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 31: 141-148.
- Antoine M, Wirz W, Tag CG, Mavituna M, Emans N, Korff T, Stoldt V, Gressner AM, and Kiefer P (2005): Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Growth factors*. 23: 87-95.
- Auerbach R, Akthar N, Lewis RL, and Shinnars BL (2000): Angiogenesis assays: Problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev.* 19: 167-172.
- Augustin HG (2001): Tubes, branches and pillars. The many ways of forming a new vasculature. *Circ Res* 89: 645-647.
- Babbs C, Haboubi NY, Mellor JM, Smith A, Rowan BP, and Warnes TW (1990): Endothelial cell transformation in primary biliary cirrhosis: a morphological and biochemical study. *Hepatology*. 11: 723-729.
- Battaller R and Brenner DA (2005): Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 115: 209-218.
- Beck T (1998): Zur Anatomie des Menschen: Aufbau und Funktion der Leber. *Pharm Ztg.* 13: 11-18.
- Bissell DM (2001): Chronic liver injury, TGF- β , and cancer. *Exp Mol Med.* 33: 179-190.
- Bissell DM and Choun MO (1988): The role of extracellular matrix in normal liver. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 151: 1-7.
- Blomhoff R and Wake K (1991): Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J.* 5: 271-277.

- Braet F, Shleper M, Paizi M, Brodsky S, Kopeiko N, Resnick N, and Spira G (2004): Liver sinusoidal endothelial cell modulation upon resection and shear stress in vitro. *Comp Hepatol.* 3: 7.
- Bürk RR (1973): A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 70: 369-372.
- Burrus LW, Zuber ME, Lueddecke BA, and Olwin BB (1992): Identification of a cystein-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol.* 12: 5600-5609.
- Burt AD, Robertson JL, Heir J, and MacSween RN (1986): Desmin-containing stellate cells in rat liver; distribution in normal animals and response to experimental acute liver injury. *J Pathol.* 150: 29-35.
- Carmeliet P and Conway EM (2001): Growing better blood vessels. *Nature Biotechnology* 19: 1019-1020.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vendenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, and Nagy A (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439.
- Cassiman D, Denef C, Desmet VJ, and Roskams C (2001): Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology.* 33: 148-158.
- Cassiman D and Roskams T (2002): Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol.* 37: 527-535.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet VJ, Denef C, and Roskams T (2002): Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 36: 200-209.
- Chambers AF, Groom AC, and MacDonald IC (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2: 563-572.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmermann GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, and Stern DM (1998): Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 91: 3527-3561.

- Compagni A and Christofori G (2000): Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer*. 83: 1-5.
- Davidson D, Blanc A, Filion D, Wang H, Plut P, Pfeffer G, Buschmann MD, and Henderson JE (2005): Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol Chem*. 280: 20509-20515.
- Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, and Greaves MF (1993): CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*. 81: 1001-1008.
- DeLeve LD, Wang X, Hu L, McCuskey MK, and McCuskey RS (2004): Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 287: G757-G736.
- Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, and Lewis CE (2001): Comparison of three in vitro human "angiogenesis" assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* 4: 113-121.
- Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, and Parada L (1995): Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cell. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol*. 147: 309-324.
- El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, and Nagasue N (1998): Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology*. 27: 1554-1562.
- Faouzi S, Lepreux S, Bedin C, Dubuisson L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A, and Rosenbaum J (1999): Activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes. *Lab Invest*. 79: 485-493.
- Ferrara N (2002): Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 29: 10-14.
- Ferrara N and Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 18: 4-25.

- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, and Moore MW (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, and Semenza GL (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cell Biol.* 16: 4604-4613.
- Friedman SL (2003): Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol.* 38: S38-S53.
- Friedman SL (2000): Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 275: 2247-2250.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, and Bissell DM (1985): Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82: 8681-8685.
- Fukuda Y, Nagura H, Imoto M, and Koyama Y (1986): Immunohistochemical studies on structural changes of the hepatic lobules in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol.* 86: 1149-1155.
- Gabele E, Brenner DA, and Rippe RA (2003): Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci.* 8: d69-d77.
- Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey, Garcia-Arroyo A, Garcia-Sanchez A, and Moreno-Otero R (1995): Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology.* 108 : 231-241.
- Geerts A (2004): On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuroectodermal? *J Hepatol.* 40: 331-334.
- Geerts A (2001): History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease* 21: 311-335.
- Gervaz P, Scholl B, Mainguene C, Poitry S, Gillet M, and Wexner S (2000): Angiogenesis of liver metastases. *Dis Colon Rectum.* 43: 980-986.
- Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, and Folkman J (1972): Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* 136: 261-276.

- Guillouzo A (1998): Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ Health Perspect.* 106 Suppl 2: 511-532.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, and Dooley S (2002): Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 7: d793-d807.
- Hanahan D and Folkman J (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86: 353-364.
- Heijstek MW, Kranenburg O, and Borel Rinkes IHM (2005): Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surch.* 22: 16-25.
- Hellström M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, and Betsholtz C (1999): Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in mouse. *Development.* 126: 3047-3055.
- Hellström M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, and Betsholtz C (2001): Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 153: 543-553.
- Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Leeuw AM, and Knook DL (1985): Perisinusoidal fat storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res* 160: 138-149.
- Hirschi KK and Majesky MW (2004): Smooth muscle stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 276: 22-33.
- Holmgren L, O'Reilly MS, and Folkman J (1995): Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1: 149-153.
- Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, and Claesson-Welsh L (2001): Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol.* 33: 315-324.
- Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, and Kaneda K (1999): *In vitro* migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology.* 29: 1760-1767.

- Imai K and Senoo H (1998): Morphology of sites of adhesion between hepatic stellate cells (vitamin-A storing cells) and a three-dimensional extracellular matrix. *Anat Rec.* 250: 430-437.
- Ito K and Houston JB (2004): Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using *in vitro* kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm Res.* 21: 785-792.
- Ito T, Nemoto M (1952): Über die Kupfferschen Sternzellen und die „Fettspeicherungszellen“ (fat storing cells) in der Blutkapillarenwand der menschlichen Leber. *Okajima Folia Anat Jpn.* 24: 243-258.
- Jain RK and Munn LL (2000): Leaky vessels? Call Ang 1! *Nat Med.* 6: 131-132.
- Jain RK, Schlenger K, Hockel M, and Yuan F (1997): Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med.* 3: 1203-1208.
- Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao J, Saksela O, Kalkkinen N, and Alitalo K (1997): Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 16: 3898-3911.
- Keller GM (1995): *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 862-869.
- Klagsbrun M, Takashima S, and Mamluk R (2002): The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol.* 515: 33-48.
- Knittel T, Aurisch S, Neubauer K, Eichhorst S, and Ramadori G (1996): Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during *in vitro* activation and in hepatic tissue repair. *Am J Pathol.* 149: 449-462.
- Koch M, Weitz J, Kienle P, Benner A, Willeke F, Lehnert T, Herfarth C, and von Knebel Doeberitz M (2001): Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central, and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer. *Arch Surg.* 136: 85-89.

- Konishi M, Mikami T, Yamasaki M, Miyake A, and Itoh N (2000): Fibroblast growth factor-16 is a growth factor for embryonic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 275: 12119-12122.
- Konstantopoulos K and McIntire LV (1996): Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest.* 98: 2661-2665.
- Korff T and Augustin HG (1998): Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J. Cell Biol.* 143: 1341-52.
- Korff T and Augustin HG (1999): Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J. Cell Sci.* 112: 3249-58.
- Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G and Augustin HG (2001): Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* 15: 447-457.
- Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, Miamoto Y, Tateno C, Seki S, Kuroki T, and Yoshizato K (2000): Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 32: 268-277.
- LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan K, and Ferrara N (2003): Angiogenesis-independent endothelial protection of liver. Role of VEGFR-1. *Science.* 299: 890-893.
- Lee SJ, Sakurai H, Oshima K, Kim SH, and Saiki I (2003): Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of a new matrix metalloproteinase inhibitor, TN-6b. *Eur J Cancer.* 39: 1632-1641.
- Li D and Friedman SL (2001): Hepatic stellate cells: Morphology, function, and regulation. In *The liver: Biology and Pathobiology.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, pp. 445-468.
- Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, and Roskams T (2002): The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver.* 22: 252-258.

- Liekens S, De Clercq E, and Neyts J (2001): Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 61: 253-270.
- Lincz LF, Buret A, and Burns GF (1997): Formation of spheroid structures in a human colon carcinoma cell line involves a complex series of intercellular rearrangements. *Differentiation*. 61: 261-274.
- Lindahl P, Johansson PR, Leeven P, Betsholtz C (1997): Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 277: 242-245.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, and Yancopoulos GD (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60.
- Martinez-Hernandez A and Amenta PS (1995): The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J*. 9: 1401-1410.
- Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, and Moreno-Otero R (2004): Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 39: 1185-1195.
- Murakami K, Sakukawa R, Sano M, Hashimoto A, Shibata J, Yamada Y, and Saiki I (1999): Inhibition of angiogenesis and intrahepatic growth of colon cancer by TAC-101. *Clin Cancer Res*. 5: 2304-2310.
- Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, and Nabel GJ (1993): Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries *in vivo*. *Nature*. 362: 844-846.
- Nagy JA, Dvorak AM, and Dvorak HF (2003): VEGF-A (164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 13: 169-175.
- Nakamura S, Hiroyuki M, Suzuki S, Sakaguchi T, Konno H, Baba S, and Syed A (1997): Immunohistochemical studies on endothelial cell phenotype in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 26: 407-415.
- Navarro P, Ruco L, and Dejana E (1998): Differential Localization of VE- and N-Cadherins in human endothelial cells: VE-Cadherin competes with N-Cadherin for junctional localization. *J Cell Biol*. 140: 1475-1484.

- Neaud V, Faouzi S, Guirouilh J, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, and Rosenbaum J (1997): Human hepatic myofibroblasts increase invasiveness of hepatocellular carcinoma cells: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Hepatology* 26: 1458-1466.
- Nemoto K, Fukamachi K, Nemoto F, Miyata S, Hamada M, Nakamura Y, Senba E, and Ueyama T (1998): Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 245: 284-288.
- Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, and Ramadori G (1996): Glial fibrillary acidic protein – a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* 24: 719-730.
- Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, and Geerts A (1999): Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29: 602-603.
- Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, and Vidal-Vanaclocha F (2003): Proangiogenic role of tumor-activated HSC in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 37: 674-685.
- Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, and Eriksson U (1996): Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem.* 271: 19130-19317.
- Ornitz D and Itoh N (2001): Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2: reviews 3005.1-3005.12.
- Owens GK, Kumar MS, and Wamhoff BR (2004): Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 84: 767-801.
- Paku S and Lapis K (1993): Morphological aspects of angiogenesis in experimental liver metastases. *Am J Pathol.* 143: 926-936.
- Palmes D and Spiegel HU (2004): Animal models of liver regeneration. *Biomaterials.* 25: 1601-1611.

- Powers CJ, McLeskey SW, and Wellstein A (2000): Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 7: 165-197.
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, and Rusnat M (2005): Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16: 159-178.
- Pugh CW and Ratcliffe PJ (2003): Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 9: 677-684.
- Rissanen TT, Markkanen JE, ArveK, Rutanen J, Kettunen MI, Vajanto I, Jauhiainen S, Cashion L, Gruchala M, Narvanen O, Taipale P, Kauppinen RA, Rubanyi GM, and Yla-Herttuala S (2003): Fibroblast growth factor-4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J*. 17: 100-1002.
- Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, and Friedman SL (1992): Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation *in vivo* and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 24: 193-203.
- Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, and Stolz DB (2001): Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology*. 34: 1135-1148.
- Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housset C, and Poupon R (1999): Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol*. 155: 1065-73.
- Sato M, Suzuki S, and Senoo H (2003): Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct*. 28: 105-112.
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, and Augustin HG (2004): The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci*. 118: 771-80.

- Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, and Yamashita T (2001): Cloning and characterization of FGF-23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 6500-6505.
- Shimizu S, Yamada N, Sawada T, Ikeda K, Kawada N, Seki S, Kaneda K, and Hirakawa K (2000): *In vivo* and *in vitro* interactions between human colon carcinoma cells and HSC. *Jpn J Cancer Res.* 91: 1285-1295.
- Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, and Fidler IJ (1995): Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 4562-4566.
- Sivakumar B, Harry LE, and Paleolog EM (2004): Modulating angiogenesis. More vs less. *JAMA.* 292: 972-977.
- Sleeman M, Fraser J, McDonald M, Yuan S, White D, Grandison P, Kumble K, Watson JD, and Murison JG (2001): Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* 271: 171-182.
- Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, Roufail S, Simpson RJ, Moritz R, Karpanen T, Alitalo K, and Achen MG (1999): Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem.* 274: 32127-32136.
- Sugimachi K, Tanaka S, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Sugimachi K, and Tsuneyoshi M (2003): Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol.* 56: 854-861.
- Sutherland RM (1988): Cell and environment interactions in tumor microregions: the multi-cell spheroid model. *Science.* 240: 177-184.
- Takeda A, Stoelzing O, Ahmad SA, Reinmuth N, Liu W, Parikh A, Fan F, Akagi M, and Ellis LM (2002): Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *Ann Surg Oncol.* 9: 610-616.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, and Paavonen K (2005): The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 65: 550-563.

- Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K, and Sata M (2001): Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem.* 49: 121-129.
- Taraboletti G and Giavazzi R (2004): Modelling approaches for angiogenesis. *Eur J Cancer.* 40: 881-889.
- Terayama N, Terada T, and Nakanuma Y (1996): An immunohistochemical study of tumour vessels in metastatic liver cancers and the surrounding liver tissue. *Histopathology.* 29: 37-43.
- Tsiamis AC, Morris PN, Marron MB, and Brindle NPJ (2002): Vascular endothelial growth factor modulates the TIE-2: TIE-1 receptor complex. *Micovascular Research* 63: 149-158.
- Urashima S, Tsutsumi M, Nakase K, Wang JS, and Takeda A (1993): Studies on capillarization of the hepatic sinusoids in alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1B: 77-84.
- Vailhe B, Vittet D, and Feige JJ (2001): In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest.* 81: 439-452.
- Verhoeven D and Buysens N (1988): Desmin-positive stellate cells associated with angiogenesis in a tumour and non-tumour system. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 54: 263-272.
- Verrill C, Davies J, Millward-Sadler H, Sundstrom L, and Sheron N (2002): Organotypic liver culture in a fluid-air interface using slices of neonatal rat and adult human tissue - a model of fibrosis *in vitro.* *J Pharmacol Toxicol Methods.* 48: 103-110.
- Vincent PA, Kanyan X, Buckley KM, and Kowalczyk AP (2004): VE-Cadherin: Adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286: C987-C997.
- Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, and Uzan G (1996): Embryonic stem cells differentiate *in vitro* to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood.* 88: 3424-3431.

- Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, and Stolz DB (2001): Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating liver. *Hepatology*. 33: 363-378.
- Wagner JS, Adson MA, Van Heerden JA, Adson MH, and Ilstrup DM (1984): The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer. A comparison with resective treatment. *Ann Surg*. 199: 502-508.
- Wake K (1999): Cell-cell organization and functions of 'sinusoids' in liver microcirculation system. *J Electron Microsc.* 48: 89-98.
- Wake K (1971): "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 132: 429-462.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N (1995): Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*. 95: 1789-1797.
- Weissberg PL, Cary NR, and Shanahan CM (1995): Gene expression and vascular smooth muscle cell phenotype. *Blood Press Suppl*. 2: 68-73.
- Wheelock MJ and Johnson KR (2003): Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19: 207-235.
- Wheelock MJ and Johnson KR (2003): Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr opin Cell Biol*. 15: 509-514.
- Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenba K, Christenson B, Ericzon BG, Holgersson J, and Sumitran-Holgersson S (2003): Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol* 163: 1275-1289.
- Zeisberg M, Kramer K, Sindhi N, Sarkar P, Upton M, and Kalluri R (2006): De-differentiation of primary human hepatocytes depends on the composition of specialized liver basement membrane. *Mol Cell Biochem*. 283: 181-189.
- Zvibel I, Mintz Y, Brill S, Halpern Z, and Papa M (2000): The role of the liver environment in the regulation of colon cancer metastasis. *Isr Med Assoc J*. 2: 48-51.

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich hierfür bei...

...Herrn Prof. Dr. Paul Kiefer für die Überlassung des höchst interessanten Themas und die engagierte Betreuung meiner Arbeit, verbunden mit vielen anregenden Gesprächen, der Vermittlung zahlreicher neuer Kenntnisse und Sichtweisen

...Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn für die freundliche Übernahme des Koreferats

...Herrn Prof. Dr. R. E. Scharf für die Möglichkeit, Räumlichkeiten am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin zu nutzen

...Herrn Dr. Volker Stoldt, Herrn Dr. Neil Emmans und Mitarbeitern für die Einarbeitung und Hilfe am Laserfluoreszenzmikroskop

...Herrn Prof. Dr. H. Bojar, der unserer Gruppe eine Arbeitsmöglichkeit am Institut für Onkologische Chemie gewährt hat

...Herrn Dr. Christiaan und Frau Dr. Simone Karreman für die freundliche Aufnahme

...Herrn Prof. Dr. A. M. Gressner für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum Aachen

...Frau Sibille Sauer-Lehnen für die Einarbeitung in die Leberzellpräparationen und die stetige Unterstützung durch Rat und Tat in der Folgezeit

...allen Kollegen aus den anderen Arbeitsgruppen für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft im Labor-Alltag

...Dr. Thomas Korff, der mich in das von ihm und seiner Arbeitsgruppe entwickelte Sphäroidsystem eingeführt hat

...Herrn Dr. Hollweg und Mitarbeitern für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen

...natürlich Herrn Dr. Roman Köhl, Frau Dr. Marianne Antoine, Frau Carmen Tag und Frau Dr. Meltem Mavituna, die mich während verschieden langer Zeitspannen in unserer Arbeitsgruppe begleitet haben und auf deren praktische Unterstützung, Ratschläge und konstruktive Kritik ich mich immer verlassen konnte.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Antoine M, **Wirz W**, Tag GC, Mavituna M, Emans N, Korff T, Stoldt V, Gressner AM, Kiefer P: Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Growth Factors*. (2005) 23(2):87-95.

Antoine M, **Wirz W**, Tag GC, Gressner AM, Wycislo M, Müller R, Kiefer P: Fibroblast growth factor 16 and 18 are expressed in human cardiovascular tissues and induce on endothelial cells migration but not proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. (2006) 346(1):224-33.

Wirz W, Antoine M, Tag CG, Gressner AM, Korff T, Hellerbrand C, Kiefer P: Hepatic stellate cells display a functional vascular smooth muscle cell phenotype in a three-dimensional spheroidal co-culture model with endothelial cells: *Differentiation*. (2008) [Jan 2; Epub ahead of print].

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 01. 02. 2007