

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Endothelzellen	2
2.1.1. Molekulare Struktur und Funktion der Zellmembran	2
2.1.2. Molekulare Struktur und Funktion der Glykokalix	2
2.1.3. Endotheliale Heterogenität	3
2.1.4. Apoptose	4
2.1.5. In vitro Kultivierung von Endothelzellen	5
2.2. Blutgefäße	6
2.2.1. Entwicklung des vaskulären Systems	6
2.2.1.1. Vaskulogenese	6
2.2.1.2. Angiogenese	6
2.2.1.2.1. Angiogene Kaskade	6
2.2.1.2.2. Regulation der Angiogenese	7
2.2.1.3. Intussuszeption	7
2.2.2. Vaskularisation von Neoplasien	8
2.2.3. Angiotherapie	9
2.2.3.1. Pro-angiogene Therapie	9
2.2.3.2. Anti-angiogene Therapie zur Behandlung von Tumoren	9
2.3. Liposomen	10
2.3.1. Morphologie der Liposomen	10
2.3.2. Reaktivität der Liposomen	10
2.3.3. Interaktionen der Liposomen mit der Zelle	11
2.3.3.1. Fusion	12
2.3.3.2. Endozytose	14
2.3.3.2.1. Phagozytose	14
2.3.3.2.2. Clathrin-vermittelte Endozytose	15
2.3.3.2.3. Caveolae-vermittelte Endozytose	15

Inhaltsverzeichnis

2.3.4. Therapeutisches Potential der Liposomen	16
2.3.4.1. Gentransfer	16
2.3.4.2. Drug Targeting	17
2.3.4.3. Diagnostik mittels Liposomen	18
2.3.5. Zytotoxizität von Liposomen	19
3. Materialien	20
3.1. Zellen	20
3.2. Zellkulturmedien	20
3.2.1. Medien und Supplemente	20
3.2.2. Zusammensetzung des Erhaltungsmediums DMEM+ zur Kultivierung muriner Endothel- und Fibrosarkomzellen	20
3.2.3. Zusammensetzung des Selektivmediums P0 zur Kultivierung boviner Endothelzellen	20
3.2.4. Zusammensetzung des Selektivmediums MECGM zur Kultivierung humaner Endothelzellen	21
3.2.5. Zusammensetzung des Einfriermediums	21
3.3. Liposomen	21
3.4. Chemikalien	21
3.5. Lösungen für die Elektronenmikroskopie	22
3.5.1. Standard-Lösungen	22
3.5.1.1. Cacodylatpuffer 0,1M	22
3.5.1.2. Karnovsky-Lösungen	22
3.5.1.3. Epon	22
3.5.1.4. Richardson-Lösungen	22
3.5.1.5. Kontrastierungslösungen	22
3.5.2. Spezielle Lösungen für die Glykokalix-Färbung	22
3.5.2.1. Ruthenium-Rot	22
3.5.3. Spezielle Lösungen für das Silver-Enhancement	23
3.5.3.1. 0,05 M HEPES-Puffer mit 0,2 M Saccharose	23
3.5.3.2. Silver Enhancement	23
3.5.3.3. Fixierlösungen mit Natriumthiosulfat	23
3.6. Apoptose-Kit: Apo-Annexin V-FITC	23
3.7. Verbrauchsmaterialien	23
3.8. Geräte	24
3.9. Software	24

4. Methoden	25
4.1. Zellkultur	25
4.1.1. Kultivierung der Endothelzellen	25
4.1.1.1. Gelatinieren der Zellkulturschalen	25
4.1.1.2. Kultivierung der murinen Sarkomzellen S180 und Gewinnung des S180-konditionierten Mediums	25
4.1.1.3. Kultivierung der humanen Endothelzellen	25
4.1.1.4. Kultivierung der murinen Endothelzellen	25
4.1.1.5. Kultivierung der bovinen Endothelzellen	26
4.1.2. Subkultivierung der Endothelzellen	26
4.1.3. Kryokonservierung der Endothelzellen	26
4.1.4. Auftauen von Zellen	26
4.1.5. Bestimmung der Zellzahl	27
4.2. Herstellung der Liposomen	27
4.2.1. Filmmethode zur Herstellung der Liposomen (SN 230)	27
4.2.2. Ethanol Injektion zur Herstellung der Liposomen (SN 307, SN 334, SI 295, TM 235)	27
4.3. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	27
4.3.1. Transmissionselektronische Untersuchungen der Glykokalix mikrovaskulärer Endothelzellen	28
4.3.2. Transmissionsmikroskopische Untersuchung der Liposomen	28
4.3.3. Transmissionsmikroskopische Untersuchung der Aufnahme und intrazellulären Verteilung gold-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	29
4.4. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	30
4.4.1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	30
4.4.1.1. Quantitative Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	30
4.4.1.2. Qualitative Untersuchung der Aufnahme Rhodamin-markierter Liposomen durch mikrovaskuläre Endothelzellen	30
4.5. Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch Inkubation mikrovaskulärer Endothelzellen mit unmarkierten Liposomen	31
4.6. Statistische Verfahren	31

5. Ergebnisse	33
5.1. Untersuchungen zur Glykokalix der Endothelzellen	33
5.1.1. Glykokalix boviner Endothelzellen	33
5.1.1.1. Qualitative Beschreibung der Glykokalix boviner Endothelzellen	33
5.1.1.2. Vermessung der Glykokalix boviner Endothelzellen	36
5.1.2. Glykokalix muriner Endothelzellen	37
5.1.2.1. Qualitative Beschreibung der Glykokalix muriner Endothelzellen	37
5.1.2.2. Vermessung der Glykokalix muriner Endothelzellen	39
5.1.3. Glykokalix humaner Endothelzellen	40
5.1.3.1. Qualitative Beschreibung der Glykokalix humaner Endothelzellen	40
5.1.3.2. Vermessung der Glykokalix humaner Endothelzellen	42
5.1.4. Vergleichende Darstellung der Vermessung der Glykokalix unterschiedlicher Endothelzellen	43
5.2. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der kationischen Liposomen	45
5.3. Quantitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	47
5.3.1. Bovine Endothelzellen	47
5.3.1.1. Bindung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	47
5.3.1.2. Internalisierung kationischer Liposomen durch bovine Endothelzellen	49
5.3.2. Murine Endothelzellen	50
5.3.2.1. Bindung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	50
5.3.2.2. Internalisierung kationischer Liposomen durch murine Endothelzellen	51
5.3.3. Humane Endothelzellen	53
5.3.3.1. Bindung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	53
5.3.3.2. Internalisierung kationischer Liposomen durch humane Endothelzellen	54

5.4. Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	56
5.4.1. Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen	57
5.4.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	59
5.4.2.1. Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch bovine Endothelzellen	59
5.4.2.2. Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch murine Endothelzellen	59
5.4.2.3. Aufnahme und Verteilung Rhodamin-markierter Liposomen durch humane Endothelzellen	60
5.5. Transmissionsmikroskopische Untersuchungen	67
5.5.1. Aufnahme und Verteilung Gold-markierter Liposomen durch bovine Endothelzellen	67
5.5.2. Aufnahme und Verteilung Gold-markierter Liposomen durch murine Endothelzellen	70
5.5.3. Humane Endothelzellen	74
5.6. Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch kationische Liposomen	74
5.6.1. Bovine Endothelzellen	74
5.6.2. Murine Endothelzellen	76
5.6.3. Humane Endothelzellen	78
6. Diskussion	81
6.1. Untersuchungen zur Glykokalix der Endothelzellen	82
6.1.1. Besonderheiten der Glykokalix boviner Endothelzellen	83
6.1.2. Besonderheiten der Glykokalix muriner Endothelzellen	84
6.1.3. Besonderheiten der Glykokalix humaner Endothelzellen	85
6.2. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der kationischen Liposomen	85
6.3. Quantitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	86
6.3.1. Schwankungen der Ergebnisse der Versuche mit bovinen Endothelzellen	89
6.4. Qualitative Untersuchungen zur Aufnahme kationischer Liposomen durch Endothelzellen	89
6.4.1. Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen während der Inkubation	90
6.4.2. Bindung und Fusion der Liposomen mit den Endothelzellen	90

Inhaltsverzeichnis

6.4.3.	Phagozytose der Liposomen durch die Endothelzellen	91
6.4.4.	Besonderheiten der bovinen Endothelzellen	93
6.4.5.	Besonderheiten der murinen Endothelzellen	93
6.5.	Untersuchungen zur Induktion der Apoptose durch kationische Liposomen	94
7.	Zusammenfassung	97
8.	Summary	99
9.	Literaturverzeichnis	101