

Isolierung CD31⁺ Endothelzellen für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen Vaskulärer Anomalien des Kopf-Hals-Bereiches

Robert Mandic, Behfar Eivazi, Susanne Wiegand, Jarmila Jedelská, Jochen A. Werner, Udo Bakowsky

Universitäts-Hals-Nasen-Ohrenklinik Marburg, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Philipps-Universität Marburg

Einleitung. Bei den sogenannten vaskulären Anomalien (VAs) des Kopf- und Halsbereiches handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Gefäßfehlbildungen^{1,2}. Hierbei lassen sich vaskuläre Malformationen, wie z.B. arteriovenöse, venöse sowie lymphatische (Lymphangiom, LA) Malformationen von Hämangiomen abgrenzen. Das Ausmaß der Vaskularisierung von VAs kann in höchstem Maße variieren³. Ein Vergleich der Expression möglicher Kandidatenproteine zwischen verschiedenen VA-Geweben kann hierdurch extrem verzerrt werden und falsch-positive bzw. falsch-negative Resultate liefern. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist es VA-Endothelzellen (ECs), welche das zentrale pathomorphologische Korrelat der Gefäßfehlbildungen darstellen, aus diesen zu isolieren und weiterführenden Untersuchungen zugänglich zu machen. Unterschiede in der Vaskularisierung bzw. des Anteils an ECs bei verschiedenen VAs sollten bei Untersuchungen daher weniger ins Gewicht fallen, da unabhängig von der untersuchten VA gleiche Mengen an ECs miteinander verglichen werden.

Material & Methoden. Untersuchungen an VA Geweben wurden nach schriftlicher Einwilligung der Patienten entsprechend eines positiven Votums der Ethikkommission des FB Medizin durchgeführt. Die Isolierung von ECs aus VAs wurde entsprechend eines modifizierten Protokolls nach *van Beijnum et al.* durchgeführt⁴. Kurz, hierbei wurde VA-Frischgewebe nach Zerkleinerung mittels Kollagenase/Dispase verdaut, wonach eine Filtrierung sowie Zellisolierung in einem Ficoll Dichtegradienten erfolgte. Anschließend wurde eine positive Selektion von CD31⁺ Zellen aus der Zellsuspension nach Inkubation mit paramagnetischen anti-CD31 *beads* und nachfolgender MACS (*Magnetic Cell Separation*) durchgeführt. Zur Expansion des Zellpools erfolgte eine Kultivierung von CD31⁺ und CD31⁻ (Kontrolle) Zellen in speziellem EC Medium mit anschließendem Einsatz in nachfolgenden Untersuchungen (Abb. 1). Die etablierte Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 sowie normale Endothelzellen (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) wurden als Kontrolle für CD31⁻ und CD31⁺ Zellen mitgeführt.

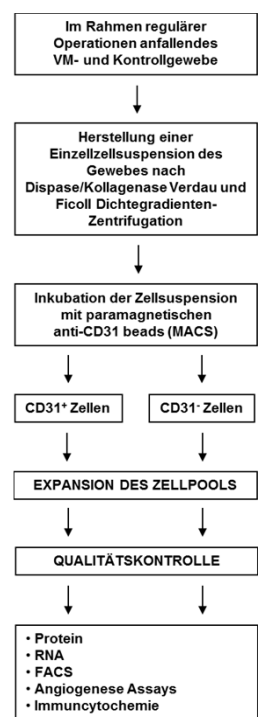


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Endothelzell-isolierung aus Vaskulären Anomalien.

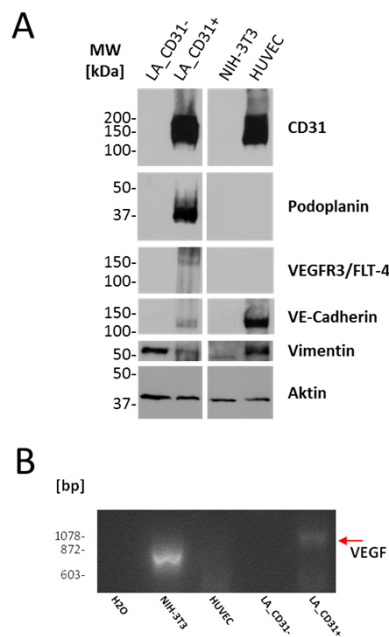


Abbildung 2. (A) Expression von CD31, Podoplanin (D2-40), VEGFR3/FLT-4, VE-Cadherin und Vimentin in MACS-selektierten CD31⁺ und CD31⁻ Lymphangiomzellen sowie in Kontrollzellen (NIH-3T3 Fibroblasten und HUVEC Endothelzellen) im Westernblot. Ladekontrolle=Aktin (B) Nachweis von VEGF mittels PCR (roter Pfeil=erwartete Größe des VEGF Amplikons).

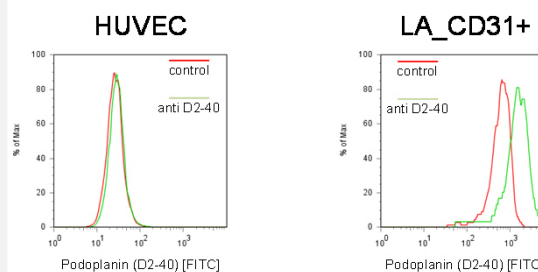


Abbildung 3. Die Expression des lymphatischen Endothelzellmarkers Podoplanin (D2-40) in CD31⁺ HUVEC ECs und mittels MACS aus einem Lymphangiom isolierter ECs (LA_CD31⁺) zeigt in der FACS Analyse nur bei den lymphatischen ECs eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz, was in Übereinstimmung ist mit den Beobachtungen in der Western blot Analyse. Der starke Fluoreszenz Shift der negativen Kontrolle bei den LA_CD31⁺ Zellen ist vermutlich auf ein Miterkennen der auf den MACS *beads* befindlichen anti CD31 Antikörper zurückzuführen, die den Zellen noch anhaften.

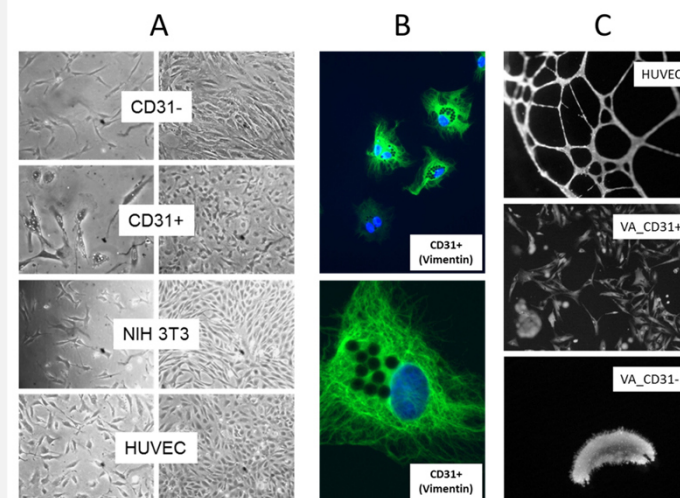


Abbildung 4. (A) Darstellung von MACS anti-CD31 selektierten Zellen und Kontrollzellen in der Zellkultur (links subkonfluentes, rechts konfluentes Wachstum). (B) Immunfluoreszenz-mikroskopische Darstellung von Vimentin in CD31⁺ Endothelzellen nach MACS-Isolierung (para-magnetische Beads als schwarze Kugeln sichtbar). (C) Einsatz von MACS selektierten Angiomzellen in einem Angiogenese Assay (*tube formation assay*, BioCat GmbH, Heidelberg, Germany) mit HUVEC Zellen als positive Kontrolle.

Ergebnisse. Die Isolierung von VA Zellen erfolgte mittels einer von *van Beijnum und Mitarbeitern* publizierten Methode⁴ wie in M&M und Abb. 1 beschrieben. Das starke CD31 Signal im Western blot bestätigt den hohen Reinheitsgrad der aus einem Lymphangiom mittels MACS isolierten Endothelzellen (Abb. 2A). Die CD31⁺ Endothelzellen des Lymphangioms sind, im Gegensatz zu den nicht-lymphatischen HUVEC Endothelzellen, ebenfalls stark positiv für den lymphatischen Endothelzellmarker Podoplanin (D2-40) (siehe auch FACS Analyse in Abb. 3) sowie für VEGFR3/FLT4. MACS negativ selektierte CD31⁻ Zellen aus dem gleichen Lymphangiom sowie die Kontrollfibroblastenzelllinie NIH-3T3 sind hingegen negativ für beide Marker. Das Endothelzell-typische Adhensionsprotein VE-Cadherin ist positiv in CD31⁺ Lymphangiom- und HUVEC-Zellen. In einer durchgeführten PCR zeigten nur CD31⁺ Lymphangiomzellen eine Bande der erwarteten Größe für VEGF (959 bp), wohingegen bei NIH-3T3 Zellen eine kleinere Bande unklarer Spezifität beobachtet werden konnte (Abb. 2B). Abb. 4A illustriert die *in vitro* Kultivierung von MACS isolierten Angiomzellen. Diese so isolierten Zellen können weiterführenden Untersuchungen zugeführt werden, wie z.B. immunzytochemischen Untersuchungen (Abb. 4B) aber auch funktionellen Untersuchungen (Abb. 4C). CD31⁺ Zellen einer Vaskulären Anomalie bilden im Angiogenese Assay eine angeordnete Gefäßstruktur aus, wie es deutlich bei den HUVEC Kontrollzellen dargestellt ist. Bei CD31⁻ Zellen hingegen fehlt diese Tendenz (Abb. 4C).

Zusammenfassung und Schlussfolgerung. Auch aus kleinen VA-Gewebeproben konnten nach Expansion in der Zellkultur ausreichende Mengen an CD31⁺ ECs generiert werden, welche den Einsatz in nachfolgenden Untersuchungen wie z.B. Western Blot, PCR, FACS, Immunzytochemie und Angiogenese Assays erlauben. Ein Vergleich isolierter ECs aus verschiedenen VAs könnte daher zukünftig zu einer präziseren Klassifikation dieser Gefäßfehlbildungen beitragen.

Literatur.

- Mulliken and Glowacki. *Plast Reconstr Surg.* 1982 Mar;69(3):412-22.
- Eivazi and Werner. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2014
- Nagy et al., *Semin Thromb Hemost.* 2010 Apr;36(3):321-31.
- van Beijnum et al., *Nat Protoc.* 2008;3(6):1085-91.