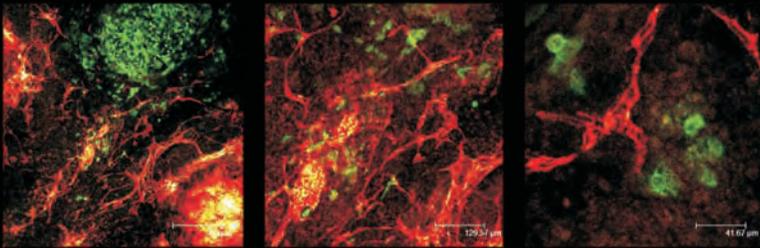


NADA MILOSEVIC

**TUMORINDUZIERTE ANGIOGENESE IN TUMOR
STAMMZELL-KONFRONTATIONSKULTUREN:**

Ein neues Tierversuchersersatzmodell für das
Screening antiangiogener Substanzen



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär- Anatomie, -Histologie und -Embryologie

Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Bergmann

und

dem Physiologischen Institut

Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H. Sauer

**Tumorinduzierte Angiogenese in Tumor-Stammzell-
Konfrontationskulturen: ein neues Tierversuchersatzmodell für das
Screening anti-angiogener Substanzen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Nada Milosevic

Tierärztin aus Wuppertal

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Bergmann

Prof. Dr. H. Sauer

Prof. Dr. M. Diener

Tag der Disputation: 15.11.2010

für meine Familie

„Die Hartnäckigen gewinnen die Schlachten.“

Napoleon I. Bonaparte

Erklärung zur Dissertation

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich von folgenden Personen Unterstützung erhalten:

Professor Dr. Heinrich Sauer

Professor Dr. Martin Bergmann.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. Heinrich Sauer von mir selbst ausgeführt worden.

Gez. Nada Milosevic

Gießen, den 10. Juli 2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGEN	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Stammzellen	2
1.2 Vaskulo- und Angiogenese	5
1.3 Kardiomyogenese.....	6
1.4 Tumorinduzierte Angiogenese	8
1.5 Multi Drug Resistance.....	11
1.6 Wachstumsfaktoren	13
1.6.1 VEGF.....	13
1.7 Reaktive Sauerstoffspezies.....	15
1.7.1 ROS im zellulären System.....	15
1.8 NADPH-Oxidase.....	16
1.9 Mitochondrien als Quelle der ROS	18
1.10 Stickstoffmonoxid	19
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
3. MATERIAL.....	23
3.1 Firmen	23
3.2 Geräte und Laborbedarf.....	24
3.3 Chemikalien und Substanzen	26
3.4 Antikörper	28
3.4.1 Primäre Antikörper:	28
3.4.2. Sekundäre Antikörper:.....	28
3.5 Primer	29
3.6 Zellen.....	30
3.7 Medien.....	31
3.8 Puffer.....	33
3.9 Wachstumsfaktoren	34
3.9.1 VEGF.....	34
3.10 Inhibitoren	35
3.10.1 SU5614.....	35
3.10.2 ZM323881.....	35
3.10.3 (-)-Thalidomid	36
3.10.4 VAS2870.....	36
3.10.5 Rotenon.....	37
3.10.6 L-NAME.....	37
3.11 Substanzen.....	38
3.11.1 DCFH-DA.....	38
3.11.2 DAF-FM Diacetat.....	38
3.11.3 SNAP	39
3.11.4 Carboxy-PTIO	39
3.11.5 NMPG.....	40
3.11.6 ATP.....	40
4. METHODEN.....	42
4.1 Embryonale Stammzellkultur der Maus	42
4.1.1 Isolierung von mausembryonalen Fibroblasten	42
4.1.2 Kultivierung mausembryonaler Fibroblasten.....	43
4.1.3 Kultivierung mausembryonaler Stammzellen	43
4.1.4 Passagieren mausembryonaler Stammzellen.....	43
4.1.5 Differenzierung mausembryonaler Stammzellen	44
4.1.6 Humane embryonale Stammzellen.....	45
4.1.7.Kultivierung mausembryonaler Fibroblasten für die humane Stammzellkultur.....	45
4.1.8 Auftauen und Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen.....	46

Inhaltsverzeichnis

4.1.9 Passagieren von humanen embryonalen Stammzellen	48
4.1.10 Einfrieren von humanen embryonalen Stammzellen.....	49
4.1.11 Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen.....	49
4.1.12 Kultivierung von Tumorzellen	50
4.1.13 Ansetzen einer Kokultur.....	50
4.2 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen und Wachstumsfaktoren.....	52
4.3 Lebendzellfärbung mit CMFDA	52
4.4 Immunzytochemie	52
4.5 Konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM).....	54
4.6 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	55
4.7 Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO)	56
4.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	56
4.9 Western Blot.....	57
4.9.1 Proteinextraktion.....	58
4.9.2 Proteinbestimmung.....	58
4.9.3 Gelelektrophorese und Blotten	59
4.9.4 Spezifischer Proteinnachweis	59
4.9.5 Proteindetektion	59
4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	60
4.10.1 RNA Isolierung	60
4.10.2 cDNA Synthese	61
4.10.3 Quantitative PCR.....	62
4.11 Statistik.....	63
5. ERGEBNISSE	64
5.1 Der zeitliche Verlauf der Vaskularisierung von Tumorsphäroiden in Kokultur	64
5.2 Einfluss des Tumorsphäroids auf die endotheliale Differenzierung des EBs	66
5.3 Tumorinduzierte Richtungsweisung der neu entstandenen Gefäße.....	69
5.4 Einfluss der Kokultur auf die MDR-1 Expression	74
5.5 Effekt von Tyrosinkinase Rezeptor Inhibitoren auf die Vaskularisierung der EBs und der Tumorsphäroide in Kokultur	78
5.6 FACS Messung zum Nachweis und Quantifizierung vaskulärer Zellen nach Behandlung mit Tyrosinkinase Inhibitoren.....	81
5.7 Effekte von (-)-Thalidomid auf die Vaskularisierung von EBs und Tumorsphäroiden in Kokultur	83
5.8 FACS Messung zum Nachweis und Quantifizierung vaskulärer Zellen nach Behandlung der EBs und Kokulturen mit (-)-Thalidomid	86
5.9 Einfluss der (-)-Thalidomidbehandlung auf die kardiale Differenzierung	88
5.10 Nachweis kardialer Gene und deren Proteinexpression	90
5.11 Einfluss von (-)-Thalidomid auf die intrazelluläre ROS Bildung.....	92
5.12 Bedeutung von freien Radikalen für die Thalidomid-induzierte Kardiomyogenese	95
5.13 NADPH-Oxidase und Mitochondrien als Quelle der (-)-Thalidomid bedingten ROS Entstehung	97
5.14 Einfluss der Koapplikation des NADPH-Oxidase Inhibitors VAS2870 und (-)-Thalidomid auf die Vaskularisierung.....	99
5.15 Einfluss des NADPH-Oxidase Inhibitors VAS2870 auf die Thalidomid-induzierte kardiale Differenzierung	100
5.16 Expression der NOX-Isoformen nach Thalidomidbehandlung	103
5.17 Einfluss des mitochondrialen Komplex I Inhibitors Rotenon auf die kardiovaskuläre Differenzierung	104
5.18 Bedeutung von Thalidomid für den intrazellulären NO Spiegel	106
5.19 Einfluss von NO auf die endotheliale Differenzierung	109
5.20 Die Bedeutung der eNOS für die Thalidomid vermittelte NO Senkung	110
5.21 Bedeutung von Carboxy-PTIO und L-NAME für die durch (-)-Thalidomid inhibierte Vaskulogenese	111
5.22 Die Bedeutung von NO für die kardiale Entwicklung.....	113
5.23 Gegenseitige Beeinflussung von ROS und NO im zellulären System	115
5.24 Endotheliale Differenzierung im humanen EB-Modell.....	117
6. DISKUSSION	120
7. ZUSAMMENFASSUNG	132
8. SUMMARY	134
9. LITERATURÜBERSICHT	136
10. ANHANG.....	154

Inhaltsverzeichnis

10.1 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	154
<i>Bisherige Veröffentlichungen</i>	154
<i>Vorträge</i>	154
<i>Poster Präsentationen</i>	154
10.2 Danksagung	156

Abkürzungen

μM	mikromolar
μm	Mikrometer
Ak	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD31	Blutplättchen Endothelzelladhäsionsmolekül (PECAM = platelet endothelial cell adhesion molecule)
c-DNA	komplementäre (complementary) Desoxyribonukleinsäure
CLSM	konfokales Laser Raster Mikroskop (confocal laser scanning microscope)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy 3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxy-Nukleosid-Triphosphate
EB	Embryonalkörperchen (embryoid body)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flk-1	fetale Leberkinase-1
g	Beschleunigung 1g = 9,81m/s ²
h	Stunde

Abkürzungen

H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Il-8	Interleukin 8
IMDM	Basal Iscoves Modified Dulbecco's Medium
kDa	kilo Dalton
LIF (ESGRO®)	Leukämie Inhibierender Faktor (Leucemia inhibitory factor)
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginin-methyl Ester
L-NOARG	L-NG-nitro-arginin
M	molar
MDR	Mehrfachresistenz gegenüber Arzneimitteln (Multi Drug Resistance)
MEF	mausembryonale Fibroblasten
MEM	essentielle Aminosäuren (minimal essential aminoacids)
mg	milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMLV RT	muriner Maloney-Leukämie Virus reverse Transkriptase
mmol	Millimol
MPO	Merrettichperoxidase
m-RNA	messanger- Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug Resistance-Related Protein
NaCl	Natriumchlorid
NADPH- Oxidase	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat-Oxidase
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
nM	nanomolar
NMPG	N-(2-Mercaptopropionyl)glycin oder Tiopronin
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung (mit Triton)
PCR	Polymerase- Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin

Abkürzungen

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PIGF	plazentärer Wachstumsfaktor (placental growth factor)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor- Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Sek	Sekunde
Sog.	Sogenannt(e)
SR	Serumersatz (Serum Replacement)
Syn.	Synonym
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung (mit Tween-20)
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
VE-Cadherin	vaskuläres endotheliales Cadherin (Syn. CD144)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR-2	VEGF Rezeptor-2
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Tumorerkrankungen zählen heutzutage zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Wie eine 2006 in Amerika durchgeführte Studie belegt, stehen Todesfälle infolge einer Krebserkrankung mit 22,8% an zweiter Stelle, direkt hinter den Herz-Kreislauf bedingten Todesfällen. Die genauen Mechanismen des Krebsgeschehens werden intensiv erforscht, sind jedoch noch nicht komplett entschlüsselt. Es ist allerdings allgemein akzeptiert, dass die Schwere der Erkrankung mit der Gefäßversorgung des Tumors einhergeht. Deshalb wird die klassische Chemotherapie bei vielen Krebsarten mit einer antiangiogenen Therapie kombiniert, um nicht nur das Wachstum der Zellen an sich, sondern auch die Blutversorgung des Tumors (und die damit einhergehende Nährstoffzufuhr und erhöhte Metastasierungsgefahr) zu unterbinden. Die Erforschung neuer Wirkstoffe, deren Anwendungsgebiete und galenischer Formen nimmt somit eine wichtige Rolle in der Krankheitsbekämpfung ein, da es aufgrund der unterschiedlichen Krebsarten und deren Ursachen kein Einheitsrezept für eine Therapie gibt. In der präklinischen Forschung werden neue Wirkstoffe identifiziert, in ihrer Struktur optimiert und im Tierversuch auf Toxizität und Wirksamkeit getestet, bevor sie in klinischen Studien an Menschen getestet werden. Das wachsende Empfinden der Bevölkerung für das Tier als Mitgeschöpf sowie die damit verbundenen tierschutzrechtlichen Bestimmungen, haben zu einem Umdenken in der pharmazeutischen Forschung geführt, was zur Folge hat, dass vermehrt nach Alternativmodellen zum Tierversuch gesucht wird, sei es um sie im Ganzen zu ersetzen oder die Anzahl der für die Tests notwendigen Tiere zu reduzieren. Mit großem Erfolg haben sich bereits Hautmodelle durchgesetzt, vorwiegend in der Kosmetikindustrie. Sie werden aber auch schon zur experimentellen Forschung an Hauttumoren genutzt (Slivka *et al.*, 1993). Ein Nachteil jedoch ist, dass dieses Modell die für das Überleben des Tumors wichtige Gefäßversorgung, die bisher in Tierversuchen wie dem „Rabbit corneal assay“, „Hamster cheek pouch assay“ oder dem „Skin chamber assay“ nachgewiesen wurde, nicht berücksichtigt. Um den Einfluss des Tumors auf die Entstehung von Gefäßen zu untersuchen, muss dieser sich in einer Umgebung befinden, welche die vom Tumor ausgehenden Signale körperähnlich empfängt und darauf entsprechend reagiert. Solche Eigenschaften weisen unter anderem Stammzellen und aus ihnen gewonnene embryonale Körperchen auf. Diese ahmen die frühe embryonale Entwicklung nach und antworten auf entsprechende Stimuli mit gezielter Differenzierung, wie zB. der Gefäßbildung. Es lassen sich daher aus embryonalen

Stammzellen vaskularisierte Gewebe züchten, die mit Tumorgewebe konfrontiert werden können und das Einwachsen von Gefäßen in den Tumor erlauben.

1.1 Stammzellen

Unter dem Begriff „Stammzelle“ versteht man eine Art Ursprungszelle, die zur unbegrenzten Vermehrung und Differenzierung fähig ist. Die Vermehrung ermöglicht die Generierung von Tochterzellen, die ihrerseits Stammzeleigenschaften aufweisen, während die Differenzierung die Entstehung spezialisierter Zelltypen und später auch Gewebe zur Folge hat. Dem Prozess der Selbsterneuerung liegt eine asymmetrische Zellteilung zugrunde, bei der eine Vorläuferzelle und eine neue Stammzelle entstehen (Doetschman *et al.*, 1985; Smith, 2001).

Je nach ihrem Differenzierungspotential unterscheidet man totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen.

Totipotente Stammzellen sind in der Lage, durch Zellteilung ein eigenständiges Lebewesen hervorzubringen (z.B. die Entstehung eineiiger Zwillinge). Allerdings sind nur Zellen in sehr frühen embryonalen Stadien totipotent (2-8 Zellstadium).

Pluripotente Stammzellen können durch Differenzierung alle Zelltypen der drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) bilden, jedoch keinen lebensfähigen Organismus hervorbringen.

Multipotente Stammzellen haben ein eingeschränktes Differenzierungspotential und dienen hauptsächlich dem Ersatz untergegangener Zellen in deren unmittelbarer Umgebung.

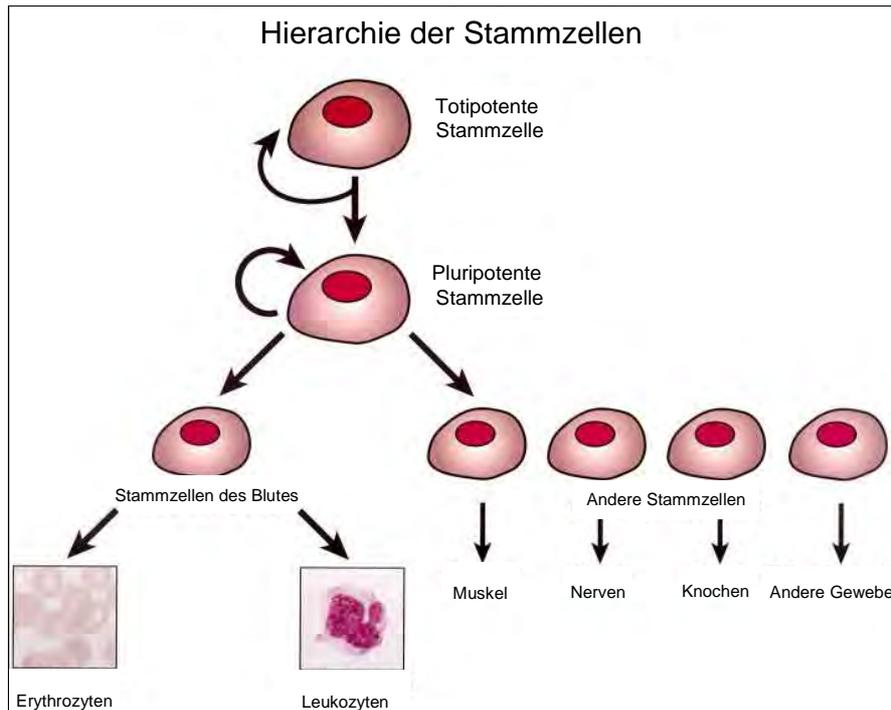


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Stammzelltypen bezogen auf ihr Differenzierungspotential (modifiziert nach www.patentbaristas.com/.../04/stem-cells.jpg).

Je nach Herkunft der isolierten Stammzellen unterscheidet man zwischen embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen.

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse einer Blastocyste gewonnen. Sie sind pluripotent und können unter optimierten Laborbedingungen unbegrenzt vermehrt und im undifferenzierten Stadium weiterkultiviert werden. Es sind Stammzellen aus verschiedenen Spezies isoliert worden, wie Maus, Hamster, Mensch usw. (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Doetschman *et al.*, 1988; Thomson *et al.*, 1998).

Fetale Stammzellen werden aus 5- bis 9-wöchigen abgetriebenen Föten gewonnen. Es sind primordiale Keimzellen, die im Labor zu embryonalen Keimzellen weiterentwickelt werden. Sie sind ebenfalls pluripotent und unterscheiden sich nicht von aus der Blastocyste entnommenen Stammzellen (Shamblott *et al.*, 1998).

Adulte Stammzellen sind im adulten Organismus vorhanden und werden mittels spezifischer Methoden aus verschiedenen Geweben (Knochenmark, Fettgewebe, Hirn, Leber, Muskel, Epidermis) isoliert. Sie sind multipotent und ersetzen abgestorbene Zellen in den jeweiligen Organen. Unter Laborbedingungen ist ihre Vermehrbarkeit limitiert und somit ihre

1. Einleitung

Lebensdauer begrenzt (Stemple and Anderson, 1992; Gage *et al.*, 1995; Goodell *et al.*, 1996; Quirici *et al.*, 2002; Beltrami *et al.*, 2007).

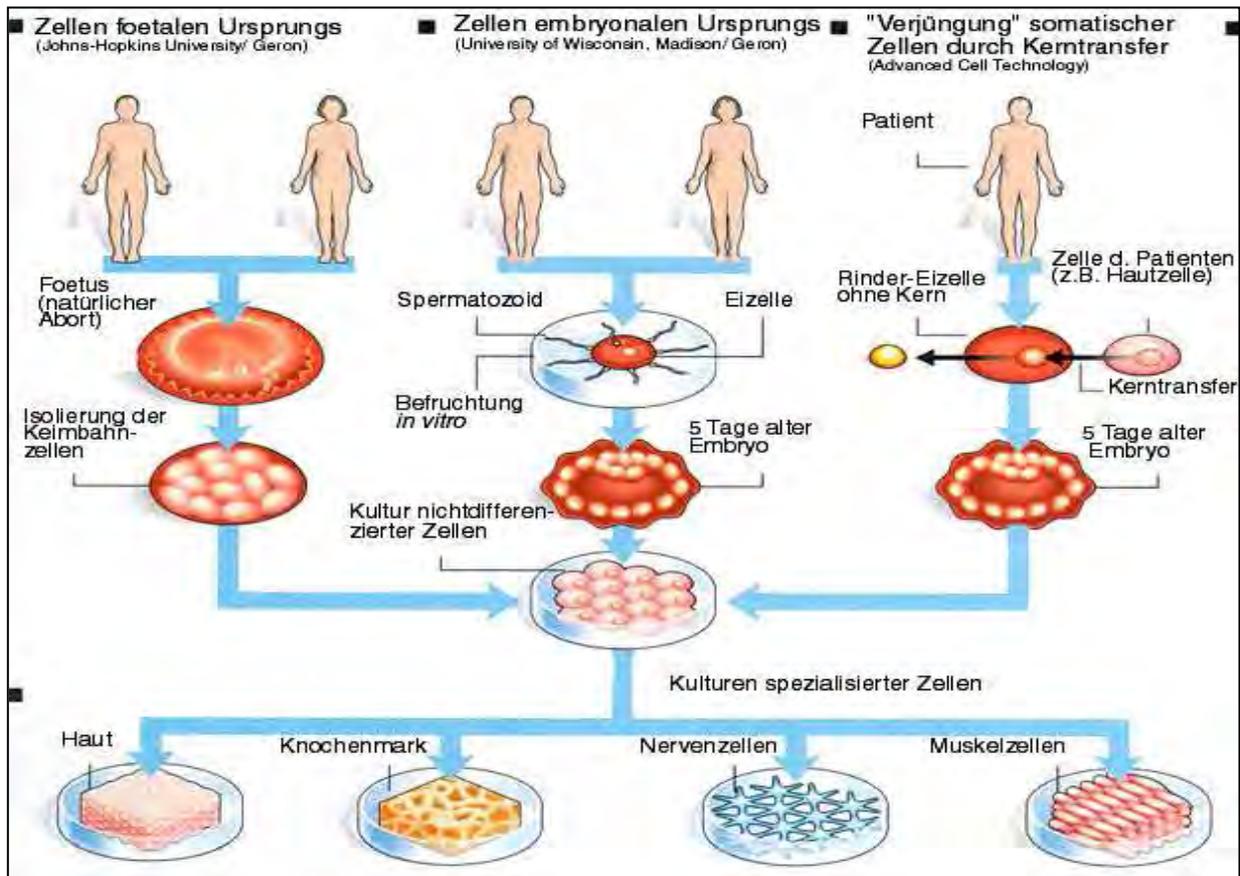


Abb. 1.1.2: Schematische Darstellung des Ursprunges der verschiedenen Stammzellarten (Modifiziert nach <http://home.arcor.de/sabine.marsch/>).

Die Stammzellen sind in der Lage, wie schon erwähnt, durch Differenzierung verschiedene Zelltypen hervorzubringen. Für die Vermehrung der undifferenzierten Stammzellen der Maus hat sich das Zytokin LIF (leukemia inhibitory factor) bewährt. Für die Vermehrung der humanen Embryonalen Stammzellen jedoch der basische Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF (basic fibroblast growth factor). Um eine Differenzierung einzuleiten, ist es nötig, den Zellen LIF bzw. bFGF zu entziehen. Die Zellen können dabei auf Stromazellen (Nakano *et al.*, 1994) oder auf Proteinen der extrazellulären Matrix (Nishikawa *et al.*, 1998) kultiviert werden. Ein weiterer Ansatz beschreibt die Generierung dreidimensionaler Zellaggregate, den sog. Embryoid Bodies (EBs) (Keller, 1995).

Es ist allgemein akzeptiert, dass Angioblasten, Kardiomyozyten und Neurone zu den ersten Zellarten gehören, die im Verlauf der embryonalen Entwicklung entstehen. In der *in vitro*

Zellkultur werden diese frühen Schritte der Organentwicklung ebenfalls durchlaufen, was die Nutzung dieses Systems zur Erforschung früher Entwicklungsprozesse ermöglicht macht.

Die Differenzierung der Muskelzellen ist durch Beobachtung sich entwickelnder kontrahierender Areale relativ leicht nachweisbar. Um die Differenzierung anderer Strukturen nachweisen zu können, müssen die Proben aufbereitet und Immunfärbungen oder Transkriptionsanalysen durchgeführt werden. So werden z. B. die Vaskulo- und Angiogenese, Neurone, Fibroblasten usw. dargestellt.

1.2 Vaskulo- und Angiogenese

Die Gefäßentstehung ist einer der frühesten und wichtigsten Prozesse in der embryonalen Entwicklung sowie später im adulten Organismus, da nur ein komplettes und funktionierendes Gefäßsystem den Transport von Nährstoffen, Sauerstoff und Metaboliten gewährleisten kann. Deshalb befinden sich alle Zellen im Körper im Abstand von maximal 200 µm vom nächsten Gefäß entfernt, was der Diffusionsgrenze des Sauerstoffs entspricht. Im Allgemeinen kann die Gefäßbildung durch zwei Prozesse erfolgen: den der Vaskulogenese und den der Angiogenese.

Unter **Vaskulogenese** versteht man die *de novo* Entstehung von Gefäßen während der Embryogenese. Durch Aggregation multipotenter mesenchymaler Progenitorzellen (Angioblasten) entsteht ein primitives vaskuläres Netzwerk - der primäre kapilläre Plexus. Dieser dient dann als Gerüst für die Angiogenese (Risau *et al.*, 1988; Drake, 2003).

Angiogenese beschreibt die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen. Dieser Prozess verläuft in mehreren Etappen: zuerst müssen murale Zellen (Perizyten) von der Außenseite des Gefäßes entfernt werden. Danach wird die Basalmembran der Endothelzellen und die extrazelluläre Matrix durch Proteasen, wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen, degradiert und remodelliert, wonach eine neue Matrix entsteht, die durch die Stromazellen erschaffen wird. Diese fördert die Proliferation und Migration der Endothelzellen. Nachdem eine ausreichende Zellzahl erreicht wurde, arretieren die Zellen im Monolayer und formen tubuläre Strukturen. Murale Zellen werden rekrutiert und lagern sich an der basalen Seite des Endothels an. Gefäße ohne Pericyten unterliegen der Regression (Hughes *et al.*, 2000). Angiogenese findet im Embryo statt. Bei Adulten ist sie beschränkt auf

das weibliche Reproduktionssystem, die Wundheilung und pathologische Prozesse, wie z.B. die diabetische Retinopathie, Atherosklerose und Tumorangiogenese (Risau, 1997; Carmeliet, 2000).

Es wurde lange geglaubt, dass sich Vaskulogenese auf den Embryo beschränkt, Angiogenese dagegen sowohl im Embryo als auch im adulten Organismus vorkommt. Neueren Studien zufolge laufen beide Prozesse in beiden Stadien ab (Risau, 1997; Ribatti *et al.*, 2001; Drake, 2003).

Lange Zeit wurde ebenfalls akzeptiert, dass der erste primitive vaskuläre Plexus im extraembryonalen Gewebe (Dottersack) entsteht, wogegen durch neuere Untersuchungen isolierte Gruppen an Endothelzellen auch im Embryo selbst identifiziert wurden. Dies lässt vermuten, dass die Gefäßentstehung eher einer intraembryonalen Quelle als einer Kolonialisierung aus dem Dottersack zuzuordnen ist (Ferguson, III *et al.*, 2005).

Die Vorläuferzellen, die im primären vaskulären Plexus mitwirken, sind ursprünglich im Mesoderm verstreut, lagern sich dann am Ort ihrer Entstehung zusammen oder wandern zum Entstehungspunkt neuer Gefäße, was die Fähigkeit zur Migration als kritischen Punkt im Entstehen neuer Gefäßnetzwerke hervorhebt (Cleaver and Krieg, 1998).

Unter physiologischen Bedingungen sind alle Prozesse, die zur Neuentstehung oder Remodellierung bereits vorhandener Gefäße führen, selbstlimitierend und benötigen ein streng ausbalanciertes Milieu aus pro- und antiangiogenen Faktoren, um eine unerwünschte Überwucherung bzw. Unterversorgung des Gewebes zu vermeiden. Unter speziellen pathologischen Zuständen ist dieser Regelkreis jedoch aufgehoben und es kommt zur vermehrten Vaskularisierung des Gewebes. Einen dieser pathologischen Prozesse beschreibt die tumorinduzierte Angiogenese.

1.3 Kardiomyogenese

Differenzierungsprozesse können bereits 6 bis 10 Tage nach LIF- bzw. bFGF-Entzug beobachtet werden. Dabei kann insbesondere die kardiale Entwicklung ohne aufwendige

Hilfsmittel verfolgt werden, da ab Tag 8-10 der Differenzierung spontan kontrahierende Bereiche mikroskopisch sichtbar werden (Hescheler *et al.*, 1997; Kehat *et al.*, 2002).

Im EB sind die Kardiomyozyten zwischen der epithelialen und basalen Schicht mesenchymaler Zellen lokalisiert (Hescheler *et al.*, 1997). Diese Bereiche nehmen mit fortlaufender Differenzierung an Zahl, Fläche und Frequenz zu. Ausgereifte Zellen zeigen dagegen eine Abnahme der mittleren Kontraktionsrate, hören oft auf zu kontrahieren, können jedoch über Wochen in Kultur gehalten werden. Allerdings kann *in vitro* nicht die physiologische Schlagfrequenz erreicht werden (*in vitro* 60-100 Schläge/min, *in vivo* 450-650 Schläge/min).

Im Allgemeinen können bei der kardialen Entwicklung 3 Differenzierungsstadien ausgemacht werden: ein frühes Stadium (schrittmacherähnliche oder myokardähnliche Zellen), ein intermediäres und ein terminales Stadium (atrial-, ventrikulär-, nodal-, his- und purkinjeähnliche Zellen). Während der frühen Stadien der Differenzierung sind die Kardiomyozyten von der Morphologie her klein und rund, die Myofibrillen noch selten und unorganisiert oder fehlen ganz. Mit der Reifung ändert sich die Morphologie und die Zellen werden stabformig. Sie haben gut entwickelte Myofibrillen und Sarkomeren und ihre Zell-Zell Kontakte stimmen im Wesentlichen mit denen eines embryonalen Herzens überein (Westfall *et al.*, 1997).

Aus embryonalen Stammzellen generierte Kardiomyozyten zeigen zudem stadiumspezifische Genexpressionen: Während der frühen kardialen Entwicklung steigen die Gehalte der Transkriptionsfaktoren GATA-4 und Nkx2.5, wonach es zur Steigerung der mRNA Spiegel des ANF (atrial natriuretic factor), – und –MHC (mysin heavy chain), MLC-2v (mysin light chain) und des Na⁺/Ca⁺-Austauschers kommt (Boheler *et al.*, 2002).

Während der *in vitro* Differenzierung entstehen so unterschiedliche Typen von Herzzellen. Einige davon sind durch folgende Proteine charakterisiert:

HCN4 (Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4) ist ein durch Membranhyperpolarisation aktivierbarer und durch cAMP gesteuerter Ionenkanal. HCN Ströme werden mit der Schrittmacheraktivität im Herzen und Gehirn, der Kontrolle des Ruhemembranpotentials (Alig *et al.*, 2009; DiFrancesco, 2010) und neuronaler Plastizität

(Surges *et al.*, 2006; Kanyshkova *et al.*, 2009) in Verbindung gebracht. HCN4 Kanäle fungieren als Rezeptoren für Saures (Stevens *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2009) und generieren das Schrittmacherpotential des sinoatrialen (SA) Knotens (Baruscotti *et al.*, 2010).

MLC-1a (Syn. MYL4, myosin light chain) gehört zu den regulatorischen leichten Ketten des Myosins und wurde in fetalen Muskel und im adulten Atrium nachgewiesen (Cohen-Haguenaer *et al.*, 1989). MLC-2a ist ein Myosin spezifisch vorkommend im Atrium von Säugetieren (Doevendans *et al.*, 2000), während MLC-2v ein für die Herzventrikel von Säugern spezifisch vorkommendes Myosin ist (Franco *et al.*, 1999). Das muskuläre Myosin gehört zur Klasse II der Myosine (Motorproteine). Es liegt als Dimer in der Zelle vor und besteht aus 6 Untereinheiten: 2 schweren Ketten, 2 leichten nicht phosphorylierenden und 2 leichten phosphorylierenden (regulatorischen) Ketten.

1.4 Tumorinduzierte Angiogenese

Ohne ausreichende Blutversorgung ist es einem Tumor nicht möglich, über eine kritische Größe hinaus zu wachsen oder zu metastasieren.

Typischerweise entstehen die meisten Tumore durch genetische Mutationen. Diese verschaffen den Mutanten einen proliferativen Vorteil gegenüber dem gesunden Gewebe. Der Vorteil besteht nicht immer in einer gesteigerten Proliferationsrate, sondern in manchen Fällen in einer Herabsetzung bzw. Aufhebung des programmierten Zelltodes. In einem großen Teil humaner Tumore hat die Mutation des apoptose-induzierenden Tumorsuppressorgens *p53* zur Folge, dass die geschädigte DNA weiter vervielfältigt wird (Santini *et al.*, 2000).

Die meisten Tumore wachsen in sog. Clustern und sind auf passive Diffusion angewiesen (Sutherland, 1988). Der Bedarf des Tumors an Nährstoffen und Sauerstoff ist proportional zu seinem Volumen. Die Diffusion wird jedoch durch die Größe des Clusters, zu dessen Oberfläche sie sich proportional verhält, limitiert. Dadurch entsteht eine kritische Grenze des tumorösen Wachstums, über die hinaus eine Unterversorgung der Zellen im Inneren der Masse stattfindet. Zellen dieser Region stellen ihre Zellteilung ein, während der äußere Ring

proliferiert. Wird diese Unterversorgung nicht aufgehoben, unterliegen die dormanten Zellen der Nekrose (Sutherland, 1986).

Der Tumor entwickelt somit drei Schichten: ein nekrotisches Zentrum, eine mittlere dormante Schicht und eine äußere, proliferierende (Folkman and Hochberg, 1973).

Um eine effizientere Versorgung zu bekommen, muss das Cluster an das körpereigene Gefäßsystem angeschlossen sein. Um dies zu erreichen, muss das Mikromilieu der Umgebung geändert werden.

Es ist mittlerweile akzeptiert, dass es einen angiogenen „Switch“ gibt, der ausgeschaltet ist, wenn die angiogenen Signale durch die antiangiogenen ausbalanciert sind und anspringt, wenn die proangiogenen Faktoren überwiegen. Diese können sein: metabolischer Stress (z.B. verminderter Sauerstoffpartialdruck, Abfall im pH oder Hypoglykämie), mechanischer Stress (Platzmangel aufgrund wachsender Zellen), Entzündungsreaktionen und genetische Mutationen (z.B. Aktivierung der Onkogene oder Deletion von Tumorsuppressorgenen). Die pro- bzw. antiangiogenen Faktoren werden von den Tumorzellen, Endothelzellen, Stromazellen, Blut und der extrazellulären Matrix sezerniert (Carmeliet and Jain, 2000).

Tumoröse Gefäße entwickeln sich durch Sprossung oder Invagination von bereits bestehenden Gefäßen. Tumorzellen können aber auch um ein Gefäß herumwachsen und so eine Art perivaskuläre Manschette bilden (Holash *et al.*, 1999).

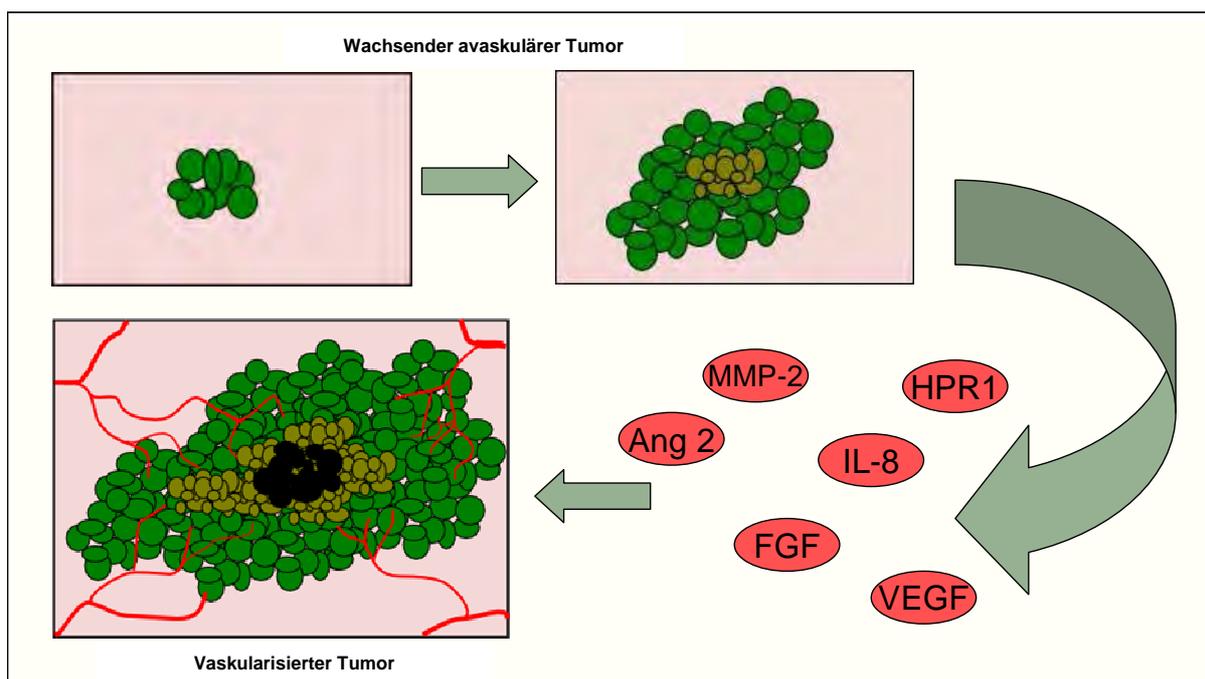


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der tumorinduzierten Angiogenese. Die Tumorentwicklung nimmt ihren Ursprung in einer kleinen Gruppe abnormaler Zellen, die bis zum Erreichen einer kritischen Größe proliferiert. Um das Nährstoffdefizit aufzuheben, werden proangiogene Faktoren, welche die Gefäßzellen mobilisieren und einen Umbau der extrazellulären Matrix begünstigen, in die Umgebung des Tumors sezerniert. An das Gefäßsystem angeschlossen kann der Tumor weiter proliferieren und metastasieren.

Obwohl Tumore in der Lage sind, Gefäßbildung zu induzieren, unterscheidet sich deren Struktur von physiologisch entstandenen Gefäßen. Die pathologischen Gefäße sind desorganisiert, hämorrhagisch und neigen zur Ruptur. Viele weisen eine mosaikartige Struktur auf, d.h. sie bestehen aus Endothelzellen mit eingelagerten Tumorzellen. Es wurde auch schon von Gefäßen, die zur Gänze aus Tumorzellen aufgebaut sind, berichtet, was durch den Prozess der vaskulären Mimicry erklärt wird. Der Blutfluss in diesen Gefäßen ist chaotisch und das Blut an sich nur schwach oxygeniert (Carmeliet *et al.*, 1996; Benjamin *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000).

Wie auch in der normalen Angiogenese, wird die tumorinduzierte Gefäßneubildung durch diverse Wachstumsfaktoren reguliert. Die wichtigsten stimulierenden Faktoren sind VEGF, FGF, Heparanase, Ang2, IL-8 und MMP-2.

VEGF wird von einer Vielzahl an Tumoren sezerniert und die Expression korreliert mit intratumoröser Gefäßdichte und negativer Patientenprognose (Senger *et al.*, 1986; Takahashi *et al.*, 1997; Borgstrom *et al.*, 1999).

FGF ist wichtig für die Induktion bzw. Erhaltung der tumorinduzierten Angiogenese. Es wirkt synergetisch zu VEGF und induziert VEGF Expression in Tumorzellen und VEGF Rezeptor Expression in Endothelzellen. Eine Inhibition dieses Wachstumsfaktors unterdrückt die Entstehung der Tumorgefäße *in vitro* und *in vivo*, sowie das Tumorwachstum *in vivo* (Deroanne *et al.*, 1997; Compagni *et al.*, 2000).

Heparanase stimuliert die Invasion und Sprossung der Endothelzellen und setzt bFGF aus der extrazellulären Matrix frei. Metastasierende Tumore zeigen, verglichen mit normalen Geweben, höhere mRNA- und Proteingehalte. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Heparanase solide Tumore zu metastasierenden konvertiert und die Tumolvaskularisierung erhöht (Vlodavsky *et al.*, 2008; Nadir *et al.*, 2008; Purushothaman *et*

al., 2008; Cohen-Kaplan *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009; Masola *et al.*, 2009; de, Jr. *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Barash *et al.*, 2009).

Angiopoetin-2 wurde eine zweifache Wirkung zugeschrieben: Wird seine Expression in bereits bestehenden Gefäßen, die in einen Tumor integriert werden, induziert, führt sie zur Regression des Gefäßes. Wird die Expression jedoch in neu geformten tumorösen Gefäßen induziert, führt sie zu Gefäßplastizität und VEGF-abhängigem Wachstum (Holash *et al.*, 1999).

Interleukin-8 zeigt eine erhöhte mRNA Expression in neoplastischem Gewebe verglichen mit gesundem, wobei die Expression mit dem Grad der Neuvaskularisierung korreliert. Eine Überexpression erhöht somit die Invasivität, Vaskularisation und das Metastasierungspotential von Tumorzellen. Zusätzlich wurde auch eine IL-8 vermittelte Stimulation der Transkription von MMP-2 beschrieben (Luca *et al.*, 1997; Kitadai *et al.*, 1999).

Die Matrix-Metalloproteinase-2 hat einen direkten Effekt auf Zelladhäsion und Ausbreitung in der extrazellulären Matrix bei Melanomzellen. (Ray and Stetler-Stevenson, 1994; Chetty *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2009; No *et al.*, 2009). Es gibt jedoch auch eine Reihe von Inhibitoren der Angiogenese, die hauptsächlich in 4 Gruppen unterteilt sind: Interferone, Interleukine, Gewebs- Inhibitoren der Metalloproteinasen und proteolytische Fragmente (Ray and Stetler-Stevenson, 1994; Ferrara and Alitalo, 1999; Hajitou *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2004; Teoh *et al.*, 2009).

Ein weit verbreiteter therapeutischer Ansatz besteht darin, die Gefäßversorgung des Tumors zu unterbinden, entweder durch chemische Antagonisten der proangiogenen Faktoren und deren Rezeptoren oder durch Verabreichung von Antikörpern, welche die Bindungsstellen abdecken (Kim *et al.*, 1993; Millauer *et al.*, 1994; Millauer *et al.*, 1996; Borgstrom *et al.*, 1996; Borgstrom *et al.*, 1998; Ferrara and Alitalo, 1999; Hajitou *et al.*, 2001; Boosani *et al.*, 2010).

1.5 Multi Drug Resistance

Die Multi Drug Resistance (MDR) erklärt die Beobachtung, dass einige Zellen in der Lage sind, Resistenzen gegenüber verschiedenen Arzneistoffen bzw. deren Wirkstoffen zu

entwickeln oder diese bereits aufweisen. Sie wurde ursprünglich in kultivierten Tumorzellen im Anschluss an Selektionen auf ein bestimmtes antitumoröses Agens entdeckt, wobei auffiel, dass diese Zellen auch gegen eine Reihe anderer, chemisch unterschiedlicher Substanzen resistent geworden waren. Diese Zellen zeigen eine geringere intrazelluläre Akkumulation toxischer Substanzen verglichen mit nicht selektierten Zellen. Die Multi Drug Resistance wird u.a. über die ABC-Transporterproteine gewährleistet.

Die Familie der ABC-Transporter umfasst membranständige Proteine, die eine ATP bindende Kasette aufweisen und durch Hydrolyse von ATP Substanzen entgegen einem Konzentrationsgradienten aktiv durch die Zellmembran transportieren können. Diese Transportsysteme sind wegen ihrer protektiven Wirkung gegenüber Xenobiotika und endogenen Metaboliten physiologisch von hoher Bedeutung. In pathologischen Prozessen sind sie, in Bezug auf die Entstehung von Therapieresistenzen von zentraler Bedeutung. Drei dieser Efflux Pumpen sind als Verursacher von Chemoresistenzen beschrieben: das P-Glycoprotein (ABCB1), MRP (ABCC1) und ABCG2 (BCRP) (Sharom, 2008).

Das P-Glykoprotein (Syn. MDR-1, P170, ABCB1) ist das bisher am besten untersuchte Protein dieser Familie. Es wird im Gehirn an der Oberfläche von Endothelzellen, Leber, Nieren, Darm, Plazenta und Hoden exprimiert und dient neben der Elimination körperfremder Stoffe der Regulation des Transportes von Cortisol und Cortikosteron in das Gehirn und beeinflusst somit die Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinden-Achse.

Wird der MDR-1 Transporter durch einen Gendefekt, wie er zum Beispiel bei Collies und Collie-verwandten Hunderassen vorkommt, nicht exprimiert, kommt es zu Arzneimittelüberempfindlichkeiten und erniedrigten Cortisolwerten im Blut. Die betroffenen Hunde zeigen bei Verabreichung von bestimmten Antiparasitika, Zytostatika, Durchfallmitteln und Antibiotika starke neurotoxische Symptome bis hin zum Tod (Geyer *et al.*, 2009a; Geyer *et al.*, 2009b).

Entstehen andererseits Tumore aus Geweben, die physiologischerweise den MDR-1 Transporter besitzen, können ihn diese unter Umständen konstitutiv exprimieren und dadurch vermindert anfällig gegenüber Therapien sein. In den meisten Fällen jedoch, wird die multiple Drug Resistance im Laufe der Chemotherapie erworben, insbesondere bei Brust-, Blasen-, Lungen- und Ovarialtumoren. *In vitro* tritt diese Resistenz als Folge verlängerter Exposition

der Zellen gegenüber zytotoxischen Substanzen auf, wodurch eine Selektion der Zellen mit MDR-1 Genamplifikation stattfindet. MDR-1 Expression kann auch durch kurzzeitige Applikation zelltoxischer Agentien neu induziert werden z.B. durch UV-Licht, Actinomycin D und Chemotherapeutika (Vilaboa *et al.*, 2000).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Vaskularisierung des Tumors mit einer erhöhten MDR-1 Expression einhergeht (Wartenberg *et al.*, 2001; Sawada *et al.*, 1999).

1.6 Wachstumsfaktoren

Wegen seiner führenden Bedeutung sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Angiogenese, soll an dieser Stelle detaillierter auf die Struktur und Funktion von VEGF eingegangen werden.

1.6.1 VEGF

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) bildet eine Subfamilie von Wachstumsfaktoren mit Schlüsselfunktionen der Signalübermittlung bei Vaskulo- und Angiogenese. Er ist charakterisiert als heparinbindender angiogener Wachstumsfaktor mit hoher Spezifität für Endothelzellen (Ferrara and Henzel, 1989; Gospodarowicz *et al.*, 1989).

Zur VEGF-Familie gehören VEGF-A, der plazentäre Wachstumsfaktor (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und VEGF-F. Alle Formen des VEGF entstehen durch alternatives mRNA Splicing eines einzigen VEGF Gens (Keck *et al.*, 1989; Tischer *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1989). Obwohl sich die verschiedenen Formen nur minimal voneinander unterscheiden, besitzen sie in Bezug auf die nachgeschalteten Signalkaskaden funktionell unterschiedliche Eigenschaften. Sie werden unter hypoxischen Bedingungen und im Zusammenhang mit der Sekretion von anderen spezifischen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren von einer Vielzahl an Zellen exprimiert, vor allem von hämatopoetischen, stromalen und endothelialen Zellen (Namiki *et al.*, 1995; Forsythe *et al.*, 1996; Brogi *et al.*, 1996).

VEGF-A ist der älteste bekannte VEGF und spielt besonders in der Angiogenese, in der Chemotaxis von Granulozyten und Makrophagen und in der Vasodilatation eine Rolle (Senger *et al.*, 1983; Leung *et al.*, 1989). VEGF-B wird für die embryonale Angiogenese benötigt, während VEGF-C in die Lymphangiogenese involviert ist (Olofsson *et al.*, 1996; Joukov *et al.*, 1996). Für die lymphatische Endothelentwicklung, speziell in der Lunge, wird auch VEGF-D gebraucht (Achen *et al.*, 1998), PlGF spielt vor allem in der Vaskulogenese und in der Angiogenese während ischämischer und inflammatorischer Prozesse, bei der Wundheilung und Krebs eine Rolle. Zusätzlich wurden verschiedene virale VEGF-Homologa, die unter dem Oberbegriff VEGF-E zusammengefasst sind und VEGFs aus Schlangengift (VEGF-F) beschrieben (Ogawa *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2003).

Alle VEGFs binden an Typ III Tyrosinkinase Rezeptoren an der Zelloberfläche, den sog. VEGFRs (VEGF Rezeptoren), die dann Dimere bilden und phosphoryliert werden. Die Rezeptoren haben einen aus sieben Immunglobulinähnlichen Bereichen bestehenden extrazellulären Anteil, eine transmembranäre Region und einen intrazellulären Anteil. Es gibt insgesamt drei VEGFRs, die verschiedene VEGFs binden: VEGFR-1 (Syn. Flt-1), VEGFR-2 (Syn. KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (Syn. Flt-4) (Shibuya *et al.*, 1990; Terman *et al.*, 1991; Pajusola *et al.*, 1992; Ferrara, 2004). Diese Rezeptoren befinden sich auf der Zelloberfläche vieler aus Knochenmark abstammenden Zellen, wie hämatopoetischen Zellen (Kabrun *et al.*, 1997), Makrophagen und Endothelzellen; sowie auf einigen malignen Zellen und glatten Muskellzellen (Ishida *et al.*, 2001; Bellamy, 2002). Die VEGF-Isoformen zeigen unterschiedliche Spezifität zu den jeweiligen Rezeptoren. So bindet VEGF-A an VEGFR-1 und -2, sowie an Heterodimere der Rezeptoren mit dem Axonguidance Protein Neuropilin-1 und -2 (NRP-1, NRP-2). VEGF-C und -D binden an VEGFR-2 und -3, VEGF-F an VEGFR-1 und -2. Rezeptorspezifische Bindungen sind für VEGF-B und PlGF (interagiert mit VEGFR-1), VEGF-E (bindet an VEGFR-2) (Joukov *et al.*, 1996; Olofsson *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1998; Achen *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2003; Errico *et al.*, 2004) nachgewiesen worden. VEGF-A, -B und PlGF werden hauptsächlich für die Bildung von Blutgefäßen benötigt, VEGF-C und -D für die Lymphangiogenese (Kaipainen *et al.*, 1993; Takahashi and Shibuya, 2005). Die verschiedenen VEGF-Mitglieder und deren Rezeptoren sind in Abbildung 1.6.1 noch einmal vereinfacht dargestellt.

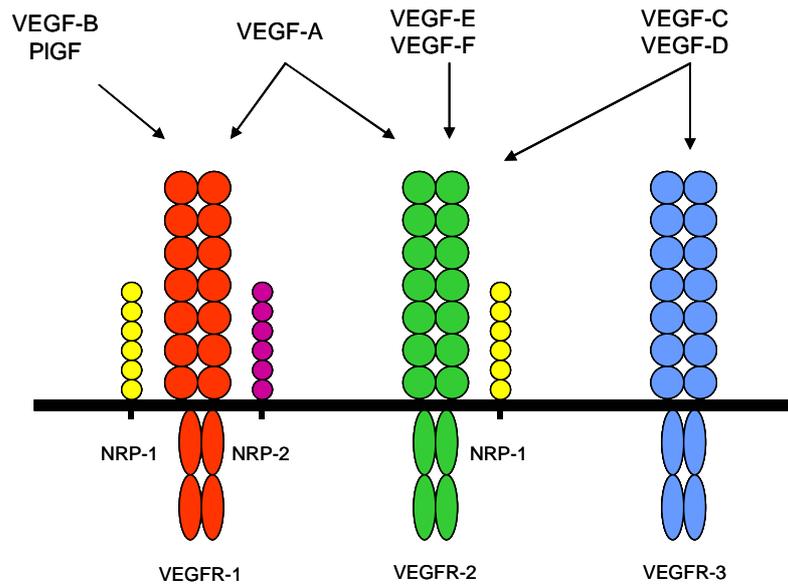


Abb. 1.6.1: Schematische Darstellung der VEGF-Isoformen und deren Rezeptoren

1.7 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) entstehen als Nebenprodukte des oxidativen Metabolismus. Sie beinhalten freie Radikale, stabile molekulare Oxidantien und angeregte Sauerstoffmoleküle. Die Reaktionsfähigkeit der Radikale erklärt sich durch die Tatsache, dass diese ein unpaariges Elektron in der äußeren atomaren Hülle besitzen, das mit seiner Umgebung mit dem Ziel reagiert, eine stabile Elektronenkonfiguration zu erreichen. Dadurch werden ihren Reaktionspartnern Elektronen entzogen, die diese wiederum ersetzen müssen, was eine Kettenreaktion in Gang setzt, die nur durch Enzyme oder Radikalfänger unterbrochen werden kann. In Abhängigkeit von ihrem Bildungsort, ihrem Reaktionspartnern, ihrer Menge und Lebensdauer können sie verschiedene Auswirkungen auf zellulärer Ebene haben. So kann es zu DNA-Strangbrüchen, Onkogenaktivierung, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Enzymen und Proteinen und gesteigerter Lipidperoxidation kommen. Diese strukturellen und funktionellen Veränderungen können bis zum Zelltod führen.

1.7.1 ROS im zellulären System

Hohe ROS Konzentrationen können Zellen im Sinne von oxidativem Stress und Apoptose nachhaltig schädigen. Diese Konzentrationen werden auch mit kardio-vaskulären Krankheiten

wie Bluthochdruck, Herzversagen, Atherosklerose und Diabetes assoziiert (Griendling *et al.*, 2000). Um die Menge der Sauerstoffradikale gering zu halten, werden körpereigene Enzyme und Hormone sowie die Vitamine A, E und C benötigt. Die Neutralisierung erfolgt entweder durch direkte Bindung der freien Radikale oder durch schrittweisen Abbau über die Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase.

Niedrige Konzentrationen an ROS haben dagegen einen stimulierenden Effekt und entstehen bei der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, Gewebshypoxie und -ischämie. (Ushio-Fukai, 2007). Sie regulieren die Expression von Transkriptionsfaktoren, ebenso wie von anderen sekundären Botenstoffen und funktionieren somit als Mediatoren der Zellproliferation und Migration von z.B. Endothelzellen (Stone and Collins, 2002; Luczak *et al.*, 2004). Exogenes ROS stimuliert die Induktion von VEGF in verschiedenen Zelltypen, einschließlich glatter Muskelzellen (Ruef *et al.*, 1997) und Endothelzellen (Chua *et al.*, 1998) und die Reorganisation des Zytoskeletts (Vepa *et al.*, 1999). VEGF und Angiopoetin I induzieren ihrerseits durch Erhöhung des intrazellulären ROS eine Proliferation und Migration der Endothelzellen (Yamaoka-Tojo *et al.*, 2004; Harfouche *et al.*, 2005). Substanzen wie z.B. Ethanol stimulieren in diesen Zellen eine ROS vermittelte Reorganisation des zytoskeletalen Aktins, der Zellmotilität und Lumenbildung (Qian *et al.*, 2003).

In der Zelle gibt es einige Quellen von ROS: die NADPH-Oxidase, die Mitochondrien, die Xanthin-Oxidase, das Cytochrom p450 und die Stickstoffoxid-Synthase (NOS).

1.8 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase ist eine der Hauptquellen von ROS im vaskulären System (Griendling *et al.*, 2000). Sie ist ein Multienzymkomplex, der sich aus einem membranständigen Anteil, dem Cytochrom *b558* und drei zytosolischen Untereinheiten zusammensetzt. Das Cytochrom *b558* ist wiederum aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt: dem gp91phox (Syn. Nox2) und p22phox Protein. Zu den zytosolischen Untereinheiten gehören p47phox, p67phox und die kleine Rho GTPase Rac1. Im inaktiven Zustand liegen zytosolische und membranständige Komponenten getrennt voneinander vor. Eine Aktivierung erfolgt über die Phosphorylierung

der zytosolischen Untereinheiten und deren anschließenden Translokation an das Cytochrom *b558*.

Es gibt Hinweise auf zwei weitere Proteine: Rap1 und p40phox, die mit dem membranständigen Anteil wechselwirken und denen eine mögliche regulatorische Funktion zugeschrieben wird (Vignais, 2002).

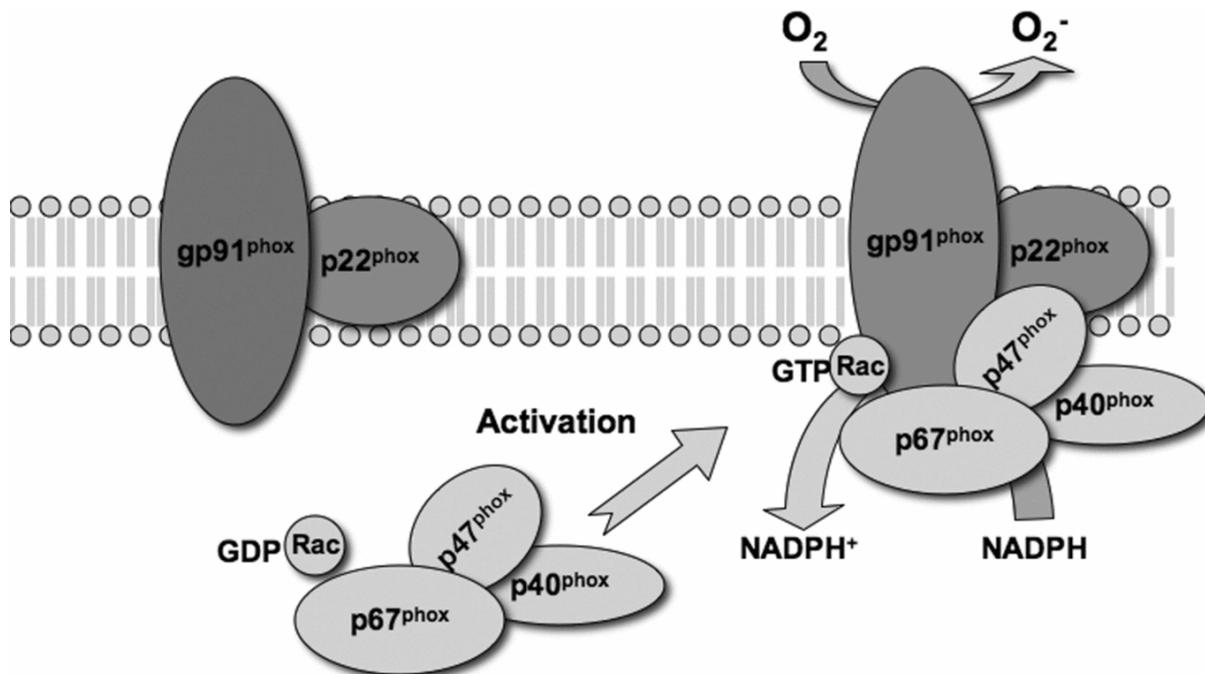


Abb. 1.8: Struktur und Aktivierung der NADPH-Oxidase. Das Cytochrom *b558* und die zytosolischen Untereinheiten sind im inaktiven Zustand getrennt. Erst durch Phosphorylierung des zytosolischen Anteils kommt es zum Zusammenfügen des funktionellen Enzymkomplexes (modifiziert nach www.biochemsoctrans.org).

Die NADPH-Oxidase bildet aus molekularem Sauerstoff das reaktive Superoxid-Anion, das spontan oder durch die Superoxiddismutase zu H₂O₂ reduziert werden kann. Sie wurde erstmals in phagozytierenden Zellen nachgewiesen, wo sie am „oxidativen Burst“ beteiligt ist. Später wurden weitere Nox2 Homologa, Nox1, Nox3, Nox4 und Nox5 in nicht phagozytierenden Zellen beschrieben (Lambeth *et al.*, 2000; Lassegue and Clempus, 2003). Für die Zytosolkomponenten p47phox und p67phox sind ebenfalls die Homologe NoxO1 (NADPH oxidase organiser 1) und NoxA1 (NADPH oxidase activator 1) identifiziert worden (Geiszt *et al.*, 2003).

Die neutrophile NADPH-Oxidase generiert in Schüben hohe ROS Konzentrationen, wohingegen die vaskuläre NADPH-Oxidase kontinuierliche, niedrig konzentrierte ROS Mengen produziert. Sie kann jedoch durch Agonisten und Wachstumsfaktoren zu höherer

Produktion stimuliert werden. Endothelzellen exprimieren neben allen phagozytären Untereinheiten auch Nox1 und Nox4 (Babior, 2000; Li and Shah, 2004).

Einige Studien zeigen Nox2 als kritischen Baustein der VEGF- und der Angiopoetin-1 vermittelten ROS Produktion auf. p22phox dagegen, wird für die Ang II und Thrombin-stimulierte ROS Entstehung benötigt (Ushio-Fukai *et al.*, 2002). Zudem führt eine Überexpression der aktiven Form von Rac1 durch erhöhten H₂O₂ Gehalt in der Zelle zum Verlust der Zell-Zell Kontakte (van Wetering *et al.*, 2002) und zytoskeletaler Reorganisation (Moldovan *et al.*, 1999). p47phox ist als Aktin-assoziierte Komponente der NADPH-Oxidase beschrieben worden (Li *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2003; Li and Shah, 2003). Nox1 wird bei oszillatorischem Scherstress hochreguliert und vermittelt die ROS abhängige Leukozytenadhäsion an Endothelzellen (Sorescu *et al.*, 2004), reguliert die Apoptose und stimuliert die Verzweigung sinusoidaler Endothelzellen (Kobayashi *et al.*, 2004). Nox4 wird, verglichen mit den anderen Nox-Formen, stärker exprimiert und spielt vermutlich eine Rolle bei der basalen Superoxidproduktion (Ago *et al.*, 2004).

1.9 Mitochondrien als Quelle der ROS

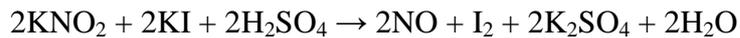
ROS werden des Weiteren in Mitochondrien im Rahmen der Atmungskette generiert. Bei pathologischen Prozessen, wie dem ischämischen Myokard und der Reperfusion, stellen mitochondriale ROS sogar den Hauptanteil der gesamten zellulären ROS dar.

Während des Elektronentransports werden ROS am Komplex I und III gebildet, wobei in die Reaktion des Komplexes III die Substrate von Komplex I und II eingehen, was Komplex III eine zentrale Rolle in der Produktion von ROS verschafft (Chen *et al.*, 2003). Somit hat eine Inhibition des Komplex I durch einen spezifischen Inhibitor eine reduzierende Wirkung auf die ROS Entstehung an Komplex III, da weniger Substrat in die Reaktion eingeht. Durch diese Blockade kann daher ein gewisser protektiver Effekt am Herzen erzielt werden.

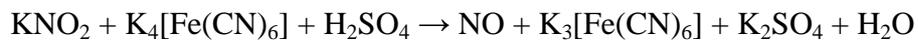
1.10 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses und giftiges Gas. Labortechnisch kann man es aus verschiedenen chemischen Reaktionen gewinnen, wie z.B. aus:

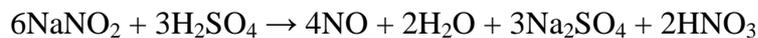
Kaliumnitrit und Kaliumiodid mit Schwefelsäure:



Kaliumnitrit und Kaliumhexacyanoferrat(II) mit Schwefelsäure:



Natriumnitrit und Schwefelsäure:



Im zellulären System wird NO durch die NO-Synthase (NOS) gebildet, welche die Oxidation der Aminosäure L-Arginin katalysiert, wodurch Citrullin und NO entstehen. Durch molekulares Klonen wurden drei Isoformen der NOS entdeckt: die beiden konstitutiv exprimierten Isoformen neuronale NO-Synthase (nNOS) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS) sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Alderton *et al.*, 2001b).

Es sind homodimere Proteine, welche essenzielle Ko-faktoren benötigen: NADPH, reduzierte Flavine, Häm-gebundenes Eisen und 6(R) 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (H4B) (Moncada *et al.*, 1991; Alderton *et al.*, 2001).

Für die Entstehung der Dimere ist H4B essenziell, da es die Untereinheiten miteinander verbindet. Diese Verbindung ist wichtig, da nur das Dimer in der Lage ist, Substrat und Kofaktor zu binden (Crane *et al.*, 1998).

Im Körper hat NO eine erweiternde Wirkung auf die Blutgefäße, was in der Medizin genutzt wird. So wird es als Gasgemisch der Atemluft zugesetzt (20ppm), um Lungenhochdruck bei Neugeborenen zu behandeln. Zudem verwendet man es in der Herzchirurgie, bei Angina pectoris und bei bestimmten Hirnoperationen.

NO hat im zellulären System zahlreiche und unterschiedliche Funktionen. So haben einige Studien gezeigt, dass NO sowohl pro- als auch antiangiogene Eigenschaften besitzt. Niedrige Konzentrationen (<1-10 nmol/L), die vorwiegend bei der Signalübermittlung von VEGF und anderen angiogenen Faktoren entstehen, haben einen stimulierenden Effekt auf die Gefäßbildung, hohe Konzentrationen (> 300 nmol/L), wie sie z.B. bei Entzündungen zu beobachten sind, einen inhibitorischen (Ridnour *et al.*, 2005; Isenberg *et al.*, 2005).

Zusätzlich zu NO können alle Isoformen der NOS auch Superoxid Anion bilden (O_2^-). Diese Bildung ist Ca^{2+} / Calmodulin abhängig, v.a. in Abwesenheit von L-Arginin und H4B. Ergebnisse verschiedener Studien legen nahe, dass H4B Depletion und die damit verbundene eNOS abhängige Generation von O_2^- mitverantwortlich für Krankheitsbilder wie Bluthochdruck und Artherosklerose ist. Der Abbau von H4B findet durch Oxidation mit Peroxynitrit zu Dihydrobiopterin statt, was zu einer Abschwächung der eNOS Aktivität führt (Pou *et al.*, 1992; Cosentino and Katusic, 1995; Xia *et al.*, 1998). Unter diesen Konditionen wird kalziumabhängig eher O_2^- als NO gebildet und der intrazelluläre oxidative Stress erhöht.

2. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll zum einen die tumorinduzierte Angiogenese in Konfrontationskulturen analysiert werden. Die Kokultur stellt ein *in vitro* Modell dar, das aus zwei Anteilen besteht: dem embryonalen Körperchen (embryoid body, EB) und einem Tumorsphäroid. EBs werden aus embryonalen Stammzellen gezüchtet. Sie haben den Vorteil, dass sie Signale aus ihrer Umgebung empfangen und mit gezielter Differenzierung auf diese antworten können. Tumorsphäroide verhalten sich *in vitro* ähnlich nicht vaskularisierten Tumoren *in vivo* und können deshalb gut zu Studien von tumorinduzierten Signalwegen eingesetzt werden. In Zusammenhang hiermit sollte auch die humane embryonale Stammzellkultur etabliert und die Möglichkeit einer Kokulturherstellung untersucht werden, da die Nutzung von Zellen menschlichen Ursprungs die Sicherheit der gewonnenen Daten aus Tierversuchen erhöhen könnte.

Zum anderen soll das EB Modell genutzt werden, um Substanzen (SU5614, ZM323881 und Thalidomid) auf ihre antiangiogenen Eigenschaften zu testen. Der antiangiogene Effekt von Thalidomid wird hierbei auch im Zusammenhang mit der Kardiomyogenese genauer untersucht, da der Signalweg dieser Substanz vielfältig und zum großen Teil noch unbekannt ist. Es soll untersucht werden, inwieweit reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) für die kardiovaskuläre Differenzierung nach Thalidomidbehandlung verantwortlich sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen helfen, das EB Modell und die Kokultur als *in vitro* Tierversuchersersatzmodell zu präsentieren und die Mechanismen antiangiogener Therapien besser zu verstehen.

Folgende Punkte werden untersucht:

1. Etablierung des Kokultur Modells zur Analyse des Prozesses der Tumor-induzierten Angiogenese.
2. Einfluss der Vaskularisierung auf die Expression von P-Glykoprotein.

3. Untersuchung der antiangiogenen Eigenschaften von SU5614 und ZM323881 im EB Modell und ihres Einflusses auf die Vaskularisierung von Tumoren in Kokultur.
4. Untersuchung der kardiovaskulären Differenzierung nach Behandlung mit Thalidomid im EB Modell und des Einflusses einer Behandlung auf die Vaskularisation von Tumoren in Kokultur.
5. Bedeutung und Herkunft von ROS für die kardiovaskuläre Differenzierung nach Behandlung mit Thalidomid im EB Modell.
6. Bedeutung von NO für die kardiovaskuläre Differenzierung nach Behandlung mit Thalidomid im EB Modell.

3. Material

3.1 Firmen

1. Abcam Limited, Cambridge CB OTP, Cambridgeshire, UK
2. Alexis, 35305 Grünberg, Deutschland
3. Ambion Europe Ltd, Huntington Cambridgeshire, UK
4. AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt, Deutschland
5. BD Biosciences GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
6. Biochrom, 12247 Berlin, Deutschland
7. Biorad GmbH, 80901 München, Deutschland
8. BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
9. Biozym Scientific GmbH, 31833 Oldendorf, Deutschland
10. Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65796 Bad Soden, Deutschland
11. Cell Signaling, 159 J Cummings Center Beverly, MA 01915, USA
12. Cell Systems GmbH, 53562 St. Katharinen, Deutschland
13. Chemicon International, Hampshire SO53 4NF, UK
14. Dianova, 20354 Hamburg, Deutschland
15. Dunn Labortechnik, 53567 Asbach, Deutschland
16. Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
17. Gilson International B.V., 65520 Bad Camberg, Deutschland
18. Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
19. Heidolph Elektro GmbH, 93309 Kelheim, Deutschland
20. Heraeus Instruments, 63452 Hanau, Deutschland
21. Hirschmann® Laborgeräte, 74246 Eberstadt, Deutschland
22. IKA® Werke GmbH & Co.KG, 79219 Staufen, Deutschland
23. Integra Biosciences, 35463 Fernwald, Deutschland
24. Invitrogen, 76131 Karlsruhe, Deutschland
25. Kendro Laboratory Products, 63505 Langenselbold, Deutschland
26. Langenbrick, 79312 Emmendingen, Deutschland
27. Leica, 64625 Bensheim, Deutschland
28. Menzel-Gläser, 38116 Braunschweig, Deutschland
29. Merck, 64293 Darmstadt, Deutschland
30. Mettler-Toledo, 35353 Gießen, Deutschland

31. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
32. NatuTec GmbH, 60528 Frankfurt am Main, Deutschland
33. New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, USA
34. PAA, 35091 Cölbe, Deutschland
35. Perbio Science Deutschland GmbH, 53113 Bonn, Deutschland
36. Promega, 68199 Mannheim, Deutschland
37. R&D Systems GmbH, 65205 Wiesbaden, Deutschland
38. Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Deutschland
39. Roth, 76231 Karlsruhe, Deutschland
40. Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz California, USA
41. Sarstedt, Inc. P.O. Box 468, Newton, NC 28658
42. Sartorius, 37075 Göttingen, Deutschland
43. Schülke-Mayr-GmbH, 22851 Norderstedt, Deutschland
44. Sefar GmbH, 83501 Wasserburg/ Inn, Deutschland
45. Serotec / Morphosys AbD GmbH, 40210 Düsseldorf, Deutschland
46. Serva, 69115 Heidelberg, Deutschland
47. Sigma –Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland
48. Synaptic Systems GmbH, 37079 Göttingen, Deutschland
49. Techne Progene, 97877 Wertheim-Bestenheid, Deutschland
50. VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland
51. Zeiss, 07745 Jena, Deutschland

3.2 Geräte und Laborbedarf

24- Multiwell Schalen	BD
Bakteriologische Schalen	Greiner
Cellspin Rührsystem	Integra
Deckgläschen	Roth
FACS Calibur™	BD
Filtrationsgewebe (ø 70µm)	Sefar

3. Material

Gewebekulturschalen	BD
Glasplättchen	Roth
Homogenisator	Sigma
iBlot™ System	Invitrogen
iBlot™ Transfehrmembran	Invitrogen
Immersionsöl	Roth
Inkubationsschalen	Roth
Inkubationsschalen	Roth
Inkubatoren	HERAcell® 240, Kendro
Konfokales Lasermikroskop	Leica
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	IKA
NuPAGE® 10% Bis-Tris Minigele	Invitrogen
Objektträger	Roth
Petriperm-Schalen	Greiner
pH-Meter digital	Sartorius
Pipetten	Pipetus®-standard von Hirschmann®, Glaspipetten von Roth, Plastikpipetten von BD
Röhrchen 15ml und 50ml	Greiner
Schüttler	VWR
Spinnerflaschen	CELLspin 240, Integra
Sterilbank	Heraeus
Vortexer	Heidolph
Waage	Mettler - Toledo
Wasserbad	Hirschmann
Zellkultutflaschen (75cm ²)	Sarstedt
Zentrifugen	5417C Eppendorf, Labofuge 300 Heraeus, Biofuge 15R Heraeus

3.3 Chemikalien und Substanzen

1-Thioglycerol	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
ATP	Sigma
BSA	Sigma
Carboxy-PTIO	Calbiochem
CMFDA	Molecular Probes
DAF	Invitrogen
Dispase	Gibco
DMEM	Sigma
DMF	Fluka
DMSO	Calbiochem
Dulbecco's PBS ohne Ca & Mg	PAA
ECL Detektionssystem	Perbio Science
ESGRO® (LIF)	Chemicon
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
Fluoromount-G™	Biozol
Gelatine	Cell Systems
H ₂ -DCF	Invitrogen
H ₂ O ₂	Sigma
Ham's F-10	PAA
IMDM	Biochrom
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Ko-DMEM	Gibco
Kollagenase B	Roche
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA
L-NAME	Alexis
Magermilchpulver	AppliChem
MEM (50x)	Biochrom
MES Laufpuffer	Invitrogen
Mitomycin C	Sigma
MOPS Laufpuffer	Invitrogen

3. Material

Natriumchlorid	Roth
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumpyruvat 100mM	Biochrom
NEA (100x)	Biochrom
Nonidet P-40	AppliChem
NuPAGE® Probenreduktionsmittel	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin (100x)	PAA
Phosphatase Inhibitor Cicktail I	Sigma
Ponceau S	AppliChem
Probenpuffer 4x	Invitrogen
Protease Inhibitor Cocktail	BIOCAT
Proteinstandard, NOVEX® Sharp	Invitrogen
Rotenon	Calbiochem
Serum Replacer	Invitrogen
Sigmacote	Sigma
SNAP	Calbiochem
SU5614	Calbiochem
Thalidomid	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA	Invitrogen
Tween-20	Sigma
VAS2870	Vasopharm
ZM323881	Calbiochem
L-NAME	Alexis
NMPG	Sigma
Carboxy-PTIO	Calbiochem

3.4 Antikörper

3.4.1 Primäre Antikörper:

Immunzytochemie:

Maus-anti-phospho eNOS	BD (#p5633)
Monoclonal Maus-anti-VEGF (clone C-1)	Santa Cruz (#sc-7269)
Monoclonal Ratte-anti-Maus-CD31 (clone 390)	Chemicon (#CBL 1337)
Monoklonal Maus-anti-Human-MDR-1	Chemicon (#MAB4161)
Monoklonal Maus-anti- α -Aktinin (clone EA-53)	Sigma (#A7811)
Polyclonal Kaninchen-anti-GFP	Abcam (#ab290)

Durchflusszytometrie:

Monoclonal Ratte-anti-Maus-CD144 (clone 11D4.1)	BD (#555289)
Monoclonal Ratte-anti-Maus CD31-PE (clone Mec 13.3)	BD (#553373)

Western Blot:

Monoclonal Maus-anti-HCN4 (clone S114-10)	Abcam (#ab85023)
Monoclonal Maus-anti-MLC-2a (clone 56F5)	SYSY (#311 011)
Monoclonal Maus-anti-MLC-2v (clone 330G5)	SYSY (#310 111)
Monoclonal Maus-anti-MYL4 Syn. MLC-1a	Abcam (#ab55462)
Monoclonal Maus-anti-Vinculin (clone hVIN-1)	Sigma (#V9131)
Polyclonal Kaninchen-anti- β -Actin	Cell Signaling (#4967)

3.4.2. Sekundäre Antikörper:

Immunzytochemie:

Cy 5-konjugiert Kaninchen-anti-Ratte IgG	Chemicon (#AP164S)
Cy 5-konjugiert Schaf-anti-Maus IgG	Dianova (#515-175-072)
Cy 5-konjugiert Ziege-anti-Kaninchen IgG	Dianova (#111-175-144)
FITC-konjugiert Schaf-anti-Kaninchen IgG	Sigma (#F7512)
ALEXA® 488-konjugiert Esel-anti-Ziege IgG	Invitrogen (#A11055)

Durchflusszytometrie:

PE-Cy5-konjugiert-Ziege-anti-Ratte IgG Santa Cruz (#sc-3830)

Ratte IgG Kontrolle, IgG2a,k-PE Biozol (#400508)

Western Blot:

Merrettichperoxidase-konjugiert Ziege-anti-Kaninchen IgG Cell Signaling (#7074)

Merrettichperoxidase-konjugiert Ziege-anti-Maus IgG Cell Signaling (#7076)

3.5 Primer

Die Primer wurden mit Hilfe des Primer3 Programms entworfen und über Invitogen bezogen. Sie wurden mit DEPC Wasser zu einer 10µM Lösung verdünnt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Folgende Primer wurden verwendet:

Primer		5' → → → 3'	Temperatur
GAPDH	forward	GGA GCG AGA CCC CAC TAA CAT	62°C
GAPDH	reverse	GCG GAG ATG ATG ACC CTT TT	62°C
M-HCN4	forward	TCC CTC CCT CTT CTT TTT	55°C
M-HCN4	reverse	CTG GTT ATT TTC TGC TGT CTT	55°C
M-MLC1a	forward	AGA GCT TCG GCA TGT CCT TG	60°C
M-MLC1a	reverse	TGC TTT ACC CAG ACA TGA TGT GC	60°C
M-MLC2a	forward	GAC CCG AGG CAA GGC TG	62°C
M-MLC2a	reverse	CTG ATT TGC AGA TGA TCC CAT	62°C
M-MLC2v	forward	GGC TGA CTA TGT CCG GGA GA	58°C
M-MLC2v	reverse	CTC CGT GGG TAA TGA TGT GGA C	58°C

3.6 Zellen

CCE Mausembryonale Stammzelllinie, isoliert aus Embryonen des Mäusestammes 129/Sv (Robertson *et al.*, 1986).

H1 / H9 humane embryonale Stammzelllinien, erhalten vom WiCell Research Institute, Madison / Wisconsin, USA. Die Zellen wurden aus überzähligen Embryonen der in vitro Fertilisationen gewonnen, bei denen die Erlaubnis der Elternpaare zur Nutzung dieser Embryos für Forschungszwecke vorlag. Die Einfuhr der Stammzellen erfolgte nach Genehmigung durch das Robert Koch Institut, erteilt nach §11 des Stammzellgesetzes.

MEF Mausembryonale Fibroblasten (Feeder Zellen) wurden aus 13 Tage alten Embryonen des Mäusestammes C57BL/6 gewonnen. Die trächtigen Mäuse wurden von Charles River Laboratories bezogen und die Präparation laborintern durchgeführt.

CF1 Mausembryonale Fibroblasten bezogen von der Firma Millipore. Dieser spezielle Mausstamm, aus dem die Feeder gewonnen wurden, wird für die humane embryonale Stammzellkultur benötigt.

KB3.1 Derivat der Elternzelllinie HELA, die 1951 aus einem Cervixkarzinom einer 31 Jahre alten Frau isoliert wurde. Die Linie KB-3-1 wird hauptsächlich in Studien zu Zytostatikaresistenz genutzt, da sie Ursprung einiger wirkstoffresistenter Mutanten ist (zB. KB-V1 resistent gegen Vinblastin, KB-CH R-8-5 resistent gegen Colchizin).

DU-145 Adenokarzinom der Prostata, isoliert aus einer cerebralen Metastase eines 68-jährigen Patienten. Diese Zelllinie zeigt ein androgenunabhängiges Wachstum.

3.7 Medien

MEF-Medium:

Dulbecco's Medium (DMEM)

L-Glutamin 2mM

NEA 0,1mM

Penicillin / Streptomycin 1%

Hitzeinaktiviertes FCS 10%

CCE-Stammzellmedium:

Iscove's Medium (IMDM)

L-Glutamin 2mM

NEA 0,1mM

Pyruvat 1mM

β -Mercaptoethanol 0,1mM

FCS 7,5%

Hitzeinaktiviertes FCS 7,5%

LIF 1000 U/ml

CCE-Differenzierungsmedium:

Iscove's Medium (IMDM)

L-Glutamin 2mM

NEA 0,1mM

Pyruvat 1mM

β -Mercaptoethanol 0,1mM

Penicillin / Streptomycin 1%

FCS 7,5%

Hitzeinaktiviertes FCS 7,5%

Einfriermedium:

50% FCS

40% des jeweiligen komplettierten Nährmediums

10% DMSO

Humanes Stammzellmedium:

Ko-DMEM

L-Glutamin/ β -Merkaptoethanol-Lösung 0,5%

(5ml 200mM L-Glutamin + 7 μ l β -Merkaptoethanol)

NEA 1%

Ko-Serum Replacement 20%

bFGF 4ng/ml

Humanes Differenzierungsmedium 1:

Ko-DMEM

L-Glutamin/ β -Merkaptoethanol-Lösung 0,5%

NEA 1%

FCS 20%

Humanes Differenzierungsmedium 2:

Ko-DMEM

L-Glutamin/ β -Merkaptoethanol-Lösung 0,5%

NEA 1%

FCS 2%

Einfriermedium für humane embryonale Stammzellen (doppelt konzentriert):

60% FCS

20% humanes Stammzellmedium

20% DMSO

Tumorzellmedium:

Hams F-10 Medium

L-Glutamin 2mM

MEM 2mM

β -Mercaptoethanol 0,1mM

Penicillin/Streptomycin 100 U/ml

Hitzeinaktiviertes FCS 10%

Die Inaktivierung des Komplementsystems (im FCS) erfolgte durch Inkubation im Wasserbad (30min bei 56°C).

Kollagenaselösung:

Kollagenase B 1mg/ml

Ko-DMEM (humane Stammzellkultur), oder

1 x PBS (murine Stammzellkultur)

Dispaselösung:

Dispase 1mg/ml

Ko-DMEM

3.8 Puffer

10x PBS:

KCl 26,8mM

K₂HPO₄ 14,7mM

NaCl 1,4M

Na₂HPO₄ x 2H₂O 64,6mM

→ in H₂O (Bidest) gelöst, pH 7,4

1x PBS:

100ml 10x PBS + 900ml

0,1% PBST:

100ml 10x PBS + 899ml H₂O (Bidest) + 1ml Triton X-100

0,01% PBST:

100ml 10xPBS +899,9ml H₂O (Bidest) + 0,1ml Triton X-100

RIPA-Lysis Puffer:

Tris 50mM

NaCl 150mM

Nonidet P-40 1%

Natriumdeoxycholat 0,5%

SDS 0,1%

→ in H₂O (bidest) gelöst, pH 7,4

→ kurz vor Gebrauch wurden noch hinzugefügt:

Phosphatase Inhibitor Cocktail I 1%

Protease Inhibitor Cocktail 0,2%

1x TBS:

Tris 50mM

NaCl 150mM

→ in H₂O (bidest) gelöst, pH 7,4

0,1% TBS-T:

999ml 1x TBS + 1ml Tween-20

3.9 Wachstumsfaktoren

3.9.1 VEGF

VEGF (vascular endothelial growth factor) gehört zur Gruppe der Wachstumsfaktoren, die insbesondere in der Vaskulo- und Angiogenese von Bedeutung sind. Die Isoform VEGF-A ist bei Erwachsenen fast im gesamten vaskulären Gewebe vorhanden und spielt vermutlich in der vaskulären Homöostase eine Rolle. Siehe auch Kapitel 1.5.1.

3.10 Inhibitoren

3.10.1 SU5614

SU5614 (Syn: 5-Chloro-3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylen]-2-Indolinon) ist ein potenter Inhibitor der VEGF und PDGF Rezeptor-Tyrosinkinasen. Es inhibiert die VEGF-vermittelte Sprossung von Endothelzellen *in vitro*, bei Zellen der akuten myeloiden Leukämie (AML-Zellen) induziert es eine Arretierung der Zellproliferation und Apoptose (Spiekermann *et al.*, 2002; Spiekermann *et al.*, 2003).



Abb. 3.10.1: Strukturformel von SU5614

3.10.2 ZM323881

ZM323881 (Syn: 5-((7-(Benzyloxy)quinazolin-4-yl)amino)-4-fluoro-2-methylphenol bzw. VEGF Rezeptor 2 Inhibitor V) ist ein zellpermeabler, reversibler und selektiver Inhibitor der VEGFR-2 Kinase ($IC_{50} = 2nM$) und bei höheren Konzentrationen auch anderer Rezeptor Tyrosinkinasen ($IC_{50} > 50\mu M$). Zudem inhibiert es die VEGF-A induzierte Proliferation der Endothelzellen *in vitro* ($IC_{50} = 8nM$). Aufgrund von Patentrechten wurde diese Substanz während der Herstellung dieser Arbeit vom Markt genommen, so dass sie nicht für alle Versuche verwendet wurde.

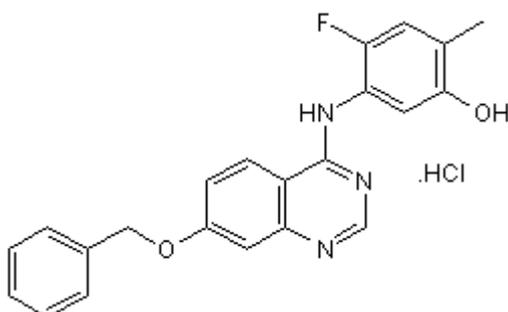


Abb. 3.10.2: Strukturformel von ZM323881

3.10.3 (-)-Thalidomid

Thalidomid (Syn: S(-)-2-(2,6-Dioxo-3-piperidiny)-1H-isoindol-1,3(2H)-dione) ist von seiner chemischen Struktur her ein Phthalimidoglutarimid, das 1956 von der Firma Grünenthal entwickelt wurde. 1957 kam es als Schlaf- und Beruhigungsmittel unter dem Namen Contergan erstmals auf den Markt. Als besonderer Vorzug galt seine „nicht toxische Wirkung“, weshalb es insbesondere jungen und werdenden Müttern verschrieben wurde. Schon 1960 gab es auffallend viele Korrelationen zwischen missgebildeten inneren Organen und Gliedmaßen bei Neugeborenen und der Einnahme von Contergan. 1961 wurde dieser Zusammenhang nachgewiesen und das Medikament vom Markt genommen.

Thalidomid ist ein Abkömmling des Schlafmittels Doriden (Barbiturat) und liegt als Racemat vor. Doch anders als bei Doriden ist nicht nur eine der Komponenten chemisch aktiv, sondern beide. Die (+)- Isoform ist ein selektiver Inhibitor des Tumornekrosefaktors α (TNF- α), hat sedative und immunsuppressive Wirkung. Die (-)-Form ist mittlerweile als Inhibitor des TNF- α , der Angiogenese und für seine teratogenen Effekte bekannt.

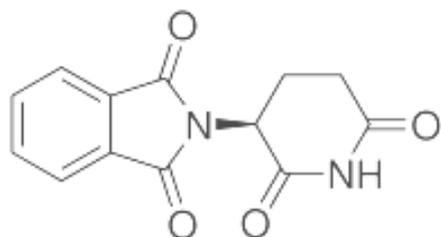


Abb. 3.10.3: Strukturformel von Thalidomid

3.10.4 VAS2870

VAS2870 (3-benzyl-7-(benzoxazolyl) thio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidin) ist ein Inhibitor der NADPH-Oxidase. Die Substanz wird zur Behandlung peripherer arterieller Verschlusskrankheiten getestet. Bei firmeninternen Tests konnte eine Absenkung der ADP-induzierten Plättchenaggregation beim Menschen sowie eine Relaxation von Aortenringen spontan hypertensiver Ratten nach Verabreichung von VAS2870 beobachtet werden. Des Weiteren attenuiert VAS2870 PDGF-vermittelte Anstiege der intrazellulären ROS Spiegel glatter Muskelzellen (ten Freyhaus *et al.*, 2006).

3.10.5 Rotenon

Rotenon ist ein Inhibitor des Elektronentransports des mitochondrialen Komplex I. Es wird als Insektizid hergestellt und entfaltet seine Wirkung als Ionophor durch die Entkopplung der Oxidation von der Phosphorylierung, so dass die ATP-Synthese verhindert wird.

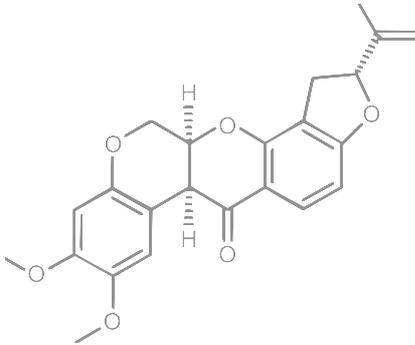


Abb. 3.10.5: Strukturformel von Rotenon

3.10.6 L-NAME

L-NAME (Syn: N^G-Nitro-L-arginin-methyl ester) ist ein Inhibitor der NO Synthase, der seine inhibitorischen Eigenschaften nach Hydrolyse zu L-NOARG (L-NG-nitro-arginin) erlangt. Diese Aktivierung ist in Blut und Endothel gesteigert (Pfeiffer *et al.*, 1996).

L-NAME verhindert die Freisetzung von NO aus Endothelzellen. Eine kontinuierliche Verabreichung führt somit zu Bluthochdruck, was in Tierversuchen genutzt werden kann, um blutdrucksenkende Substanzen zu analysieren (Ledingham and Laverty, 1997; Pechanova *et al.*, 2004). Zudem kommt es nach Verabreichung von L-NAME zu Leukozytenadhäsion im arteriellen Endothel, was bei Krankheiten wie Bluthochdruck und Atherosklerose ein zusätzliches Risiko für den Patienten darstellt (Nabah *et al.*, 2005).

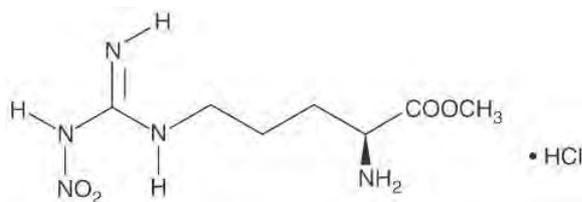


Abb. 3.10.6: Strukturformel von L-NAME

3.11 Substanzen

3.11.1 DCFH-DA

DCFH-DA (2',7'- Dichlorofluoreszein-Diazetat) dient dem Nachweis von ROS (Reactive Oxygen Species / reaktive Sauerstoffintermediate). Es ist eine zellpermeable Substanz, die nach Eindringen in die Zelle durch Esterasen polarisiert wird, so dass ein Herausdiffundieren nicht mehr möglich ist. Der Kontakt mit ROS führt zur Oxidation von DCFH und macht es zu einem Fluorochrom (DCF). Die Fluoreszenz ist proportional zu der Menge an intrazellulären ROS und kann mit dem konfokalen Lasermikroskop sichtbar gemacht werden (Argon Laser 488nm, Emissionsmaximum 525nm). Da die Reaktion jedoch nicht spezifisch ist, kann sie nur Informationen über die Quantität, jedoch nicht über die Qualität der ROS geben.

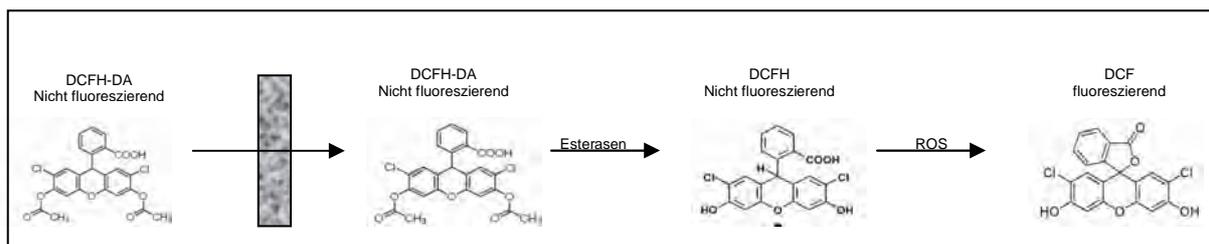


Abb. 3.11.1: Wirkungsmechanismus von DCFH-DA. DCFH-DA dringt in die Zelle ein und wird von zellulären Esterasen oxidiert, wobei DCFH entsteht, das mit ROS reagiert und das fluoreszierende DCF bildet.

3.11.2 DAF-FM Diacetat

DAF-FM Diacetat (4-amino-5-methylamino-2',7'- difluorofluorescein Diacetat) dient der Quantifizierung von Stickstoffoxiden. Es ist eine zellpermeable Substanz, die mittels passiver Diffusion ins Zellinnere gelangt und dort durch die intrazellulären Esterasen deacetyliert wird. Das deacetylierte Produkt kann nun mit intrazellulärem $\text{NO}\cdot$ reagieren und die Fluoreszenz detektiert werden. Das Anregungsmaximum liegt bei 495nm, das der Emission bei 515nm.

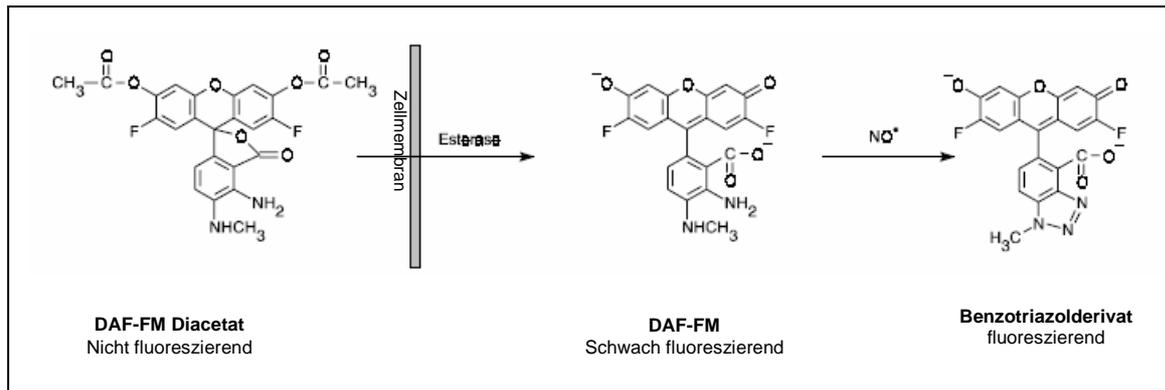


Abb. 3.11.2: Strukturformeln und Wirkungsweise des NO-Indikators DAF. DAF-FM Diacetat ist zellpermeabel und nicht fluoreszierend. Nach Deacetylierung im Zellinneren entsteht das schwach fluoreszierende DAF-FM, das mit NO reagiert und ein fluoreszierendes Benzotriazolderivat hervorbringt.

3.11.3 SNAP

SNAP ((±)-S-Nitroso-N-acetylpenicillamin) ist ein NO Donor mit sehr geringer Halbwertszeit ($t_{1/2} = 10$ Std). SNAP ahmt NO Effekte, wie die Relaxation von isolierten bovinen Koronararterien, Aktivierung der Guanylatcyklase, reversible Hemmung der Proteinkinase C nach (Figueroa *et al.*, 2005; Dasgupta and Aquart, 2005; Aquart and Dasgupta, 2005).

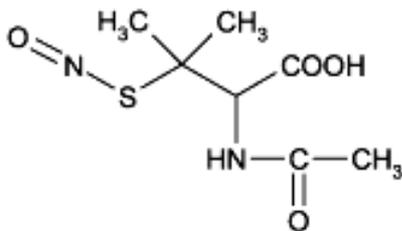


Abb. 3.11.3: Strukturformel von SNAP

3.11.4 Carboxy-PTIO

Carboxy-PTIO (Syn: 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid) ist ein wasserlösliches Kaliumsalz, das in seiner Eigenschaft als freier Radikalfänger mit NO reagiert. Hierbei wird NO ca. 2-mal stärker inhibiert als durch Verabreichung einiger Inhibitoren der NO Synthese, wie N-omega-nitro-L-Arginin und N-omega-monomethyl-L-Arginin (Akaike *et al.*, 1993). In Tierversuchen mit Endotoxinverabreichung konnte gezeigt werden, dass Carboxy-PTIO die toxischen NO Gehalte neutralisiert, wodurch ein

Schockzustand der Tiere verhindert und die Überlebensrate gesteigert wird (Yoshida *et al.*, 1994).

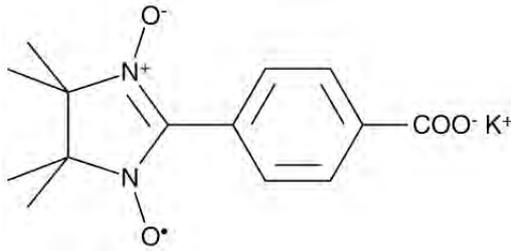


Abb. 3.11.4: Strukturformel von Carboxy-PTIO

3.11.5 NMPG

NMPG (Syn: N-(2-Mercaptopropionyl)glycin oder Tiopronin) ist ein Thiol-Gemisch. Es setzt den Gehalt der ROS in der Zelle herab, indem der Pool eigener Radikalfänger erhöht wird. Zudem ist es ein Substrat der Glutathion- Transferase (De Flora *et al.*, 1991). In der Medizin wird NMPG als Lebertherapeutikum, Urologikum und Antidot bei Schwermetallvergiftungen genutzt. Die Wirkung erfolgt über die Bildung von Chelatkomplexen, die eine renale Ausscheidung ermöglichen.

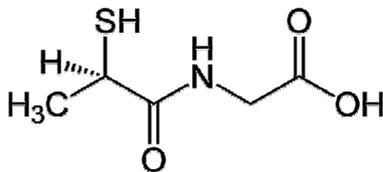


Abb: 3.11.5: Strukturformel von NMPG

3.11.6 ATP

ATP (Syn: Adenosin 5'-triphosphat) ist ein Nukleotid bestehend aus einem Adenosinrest, Ribose und 3 Phosphatresten in Ester- bzw. Anhydridbindung. Es ist zum einen der wichtigste Energieträger der Zellen, was durch die 3 energiereichen Phosphatbindungen gewährleistet wird (Dzeja *et al.*, 2002; Ketzer and de Meis, 2008). Zum anderen fungiert es auch als wichtiges Signalmolekül. Als Cosubstrat von Kinasen, u.a. Proteinkinasen ist es an der intrazellulären Signalvermittlung beteiligt (da Silva *et al.*, 2009). Extrazellulär wirkt es als Agonist purinergere Rezeptoren bei der Regulation der Durchblutung (Jankowski, 2008; da

Silva *et al.*, 2009) und Vermittlung von Entzündungsreaktionen mit (Marques-da-Silva *et al.*, 2010).

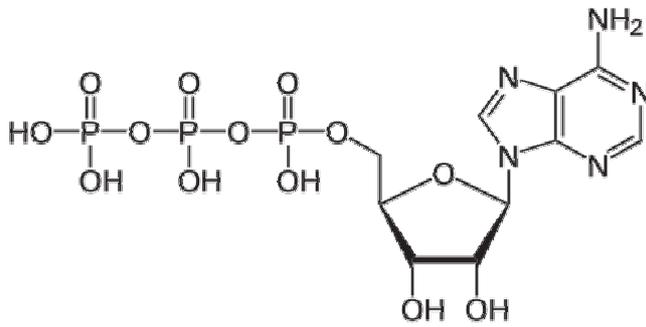


Abb. 3.11.6: Strukturformel von ATP

4. Methoden

4.1 Embryonale Stammzellkultur der Maus

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden embryonale Stammzellen der Maus (Zelllinie CCE S103) verwendet (Robertson *et al.*, 1986). Um die Stammzellen in einem undifferenzierten Stadium zu erhalten, ist es erforderlich, deren Medium mit dem leukemia inhibitory factor (LIF) zu ergänzen. Dies geschieht zum einen durch Aussäen der Stammzellen auf mitotisch inaktive embryonale Fibroblasten (Feeder- bzw. Nährzellen). Zum anderen wird dem Medium zusätzlich eine bestimmte Menge an LIF zugegeben (1000 U/ml).

4.1.1 Isolierung von mausembryonalen Fibroblasten

Um Fibroblasten zu gewinnen, wurde eine Maus der Linie Black6 am 13.-14. Trächtigkeitstag durch Genickbruch getötet und in einer sterilen Umgebung sezirt. Die beiden Uterushörner wurden herausgenommen und in einer Petrischale mit lauwarmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Öffnen der Uterushörner samt Fruchtblasen wurden die Embryonen entnommen und dreimal mit PBS gewaschen. Um zu vermeiden, dass die Fibroblasten durch zu viele Fremdzellen beeinflusst werden, wurde das viscerele embryonale Gewebe entfernt und die Embryonen abermals dreimal gewaschen. Im nächsten Schritt zerkleinerte man die Embryos, unter Zugabe von Trypsin mit Hilfe einer gebogenen Schere, ca. 5 min lang in möglichst kleine Stücke. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wurde das Gewebe in 50 ml Röhrchen überführt und durch mehrmaliges Pipettieren noch einmal mechanisch zerkleinert. Die enzymatische Reaktion des Trypsins wurde durch Zugabe von 20 ml Feeder-Medium unterbrochen und die Zellen auf vorbereitete Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Schalen auf das Vorhandensein von Knochenstücken und größeren, nicht dissoziierten Gewebsverbänden untersucht und diese entweder ganz verworfen oder weiter kultiviert, je nachdem ob besagte Fremdzellen und Knochen darin waren und entfernt werden konnten oder nicht. Der Mediumwechsel erfolgte täglich. Bei 90%iger Konfluenz wurden die Fibroblasten zwecks Expansion passagiert.

4.1.2 Kultivierung mausembryonaler Fibroblasten

Die konfluenten Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin-EDTA für einige Minuten inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurden diese in ein 15 ml Röhrchen gesammelt, mit 10 ml Feeder-Medium (MEF- Medium) abgestoppt und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert und auf neue Schalen aufgetragen. Die Expansion der Fibroblasten erfolgte bis Passage 3, danach wurde der Zellstock weggefroren.

Bei Bedarf wurden die Fibroblasten auf Gewebekulturschalen aufgetaut und bei Konfluenz mit Mitomycin C (10µg/ml, 3 h, bei 37°C) inaktiviert. Nach der Inkubationszeit erfolgten 3 Waschschrte mit MEF- Medium. Der anschließende Mediumwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt. Die Aufbewahrungszeit der inaktivierten Zellen betrug maximal eine Woche.

4.1.3 Kultivierung mausembryonaler Stammzellen

Die Stammzellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 10 ml Stammzellmedium überführt und bei 200 g für 5 min abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren verteilte man die Zellen auf die mit Stammzellmedium vorbereiteten Feederschalen. Die weitere Kultivierung erfolgte in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

4.1.4 Passagieren mausembryonaler Stammzellen

Das Passagieren der Stammzellen erfolgte bei 70%iger Konfluenz. Dafür wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin für 2-3 min im Brutschrank inkubiert und anschließend mit einer Pipette vereinzelt. Ein Teil der Zellsuspension (70 µl) übertrug man zwecks Weiterkultivierung auf eine neue Feederschale. Die restlichen Zellen überführte man bei Bedarf in Spinnerflaschen mit Differenzierungsmedium.

4.1.5 Differenzierung mausembryonaler Stammzellen

Um eine Differenzierung herbeizuführen, wurden die Zellen wie bereits beschrieben trypsinisiert und mit 6 ml Differenzierungsmedium (siehe auch 3.7) abgestoppt. Von dieser Zellsuspension transferierte man die Hälfte in eine mit 125 ml Medium vorbereitete silikonisierte Spinnerflasche (Cellspin system lief bei 25 Umdrehungen/min). Am folgenden Tag wurde die Spinnerflasche auf 250 ml Medium aufgefüllt und bis Tag 4 der Differenzierung bei täglichem Mediumwechsel weiterkultiviert.

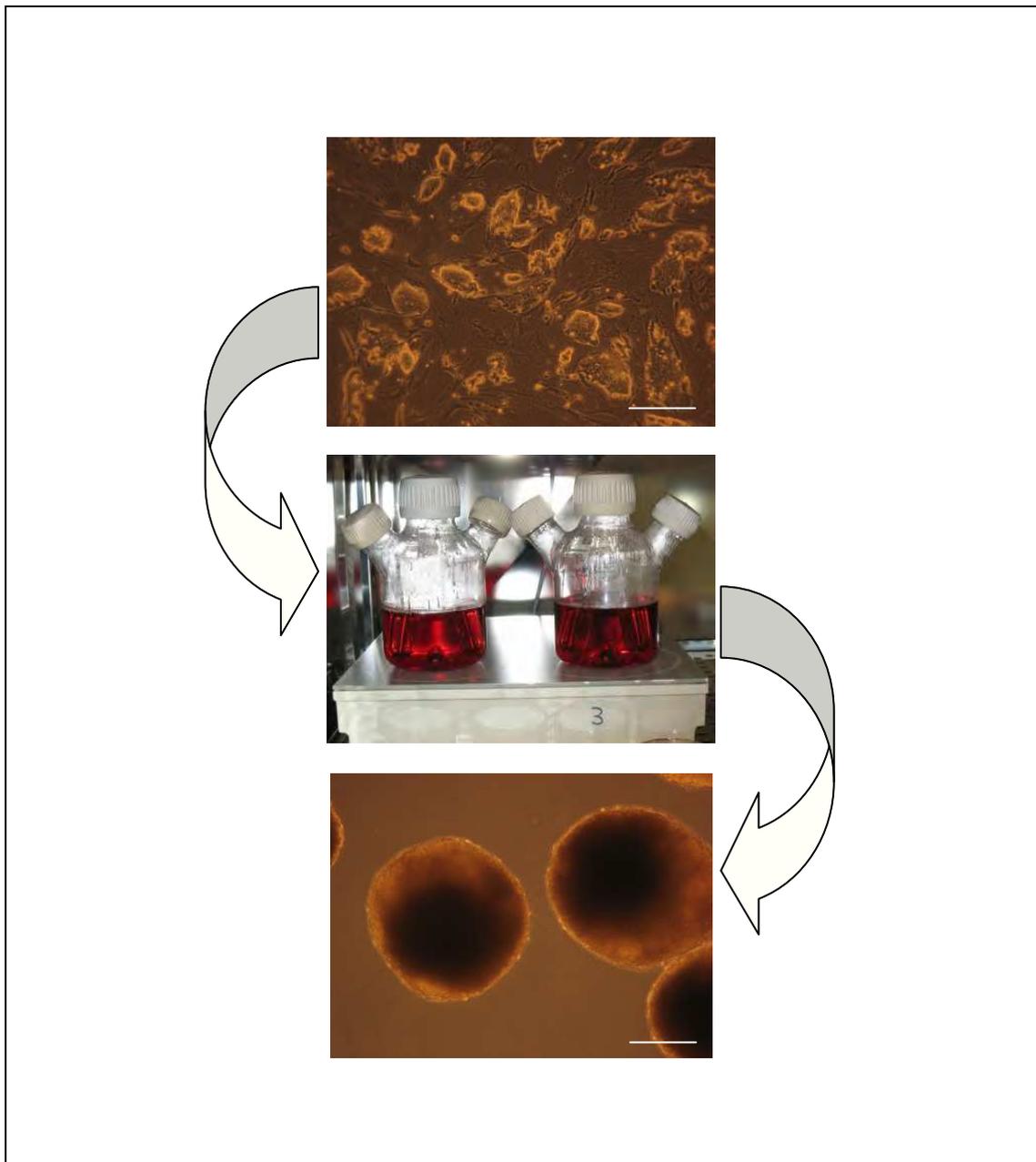


Abb. 4.1.5: Schematische Darstellung der Herstellung von EBs. Stammzellen werden auf inaktivierten Fibroblasten kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent sind, werden sie enzymatisch vereinzelt und in Spinnerflaschen mit Differenzierungsmedium überführt. Schon nach einem Tag bilden sich dreidimensionale Aggregate (EBs), die bis zu Tag 4 in der Spinnerflasche verbleiben. Danach werden die EBs für die entsprechenden Versuche genutzt. Balkengröße entspricht 300 µm.

4.1.6 Humane embryonale Stammzellen

Die erfolgreiche Isolation und Etablierung stabiler humaner embryonaler Stammzellen erfolgte fast 2 Jahrzehnte (Thomson *et al.*, 1998) nach der erstmalig veröffentlichten Kultivierung von embryonalen Stammzellen der Maus (Evans and Kaufman, 1981). Für die recht späte Entwicklung dieses Gebietes scheinen zum einen ethische Gründe vorherrschend gewesen zu sein. Zum anderen existieren auch wesentliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Kulturen. In dieser Arbeit wurden die humanen Stammzellen der Linien H1 und H9 verwendet. Im Gegensatz zu mausembryonalen Stammzellen ist der Zusatz von LIF nicht notwendig, um die Zellen in einem undifferenzierten Stadium zu erhalten. Stattdessen wird dem humanen Medium 4ng/ml basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF, basic Fibroblast Growth Factor) zugesetzt. Zusätzlich ist es nötig, die Stammzellkolonien mehrmals wöchentlich auf Differenzierungsprozesse hin zu untersuchen, da auch der Zusatz von bFGF nicht mit absoluter Sicherheit gewährleisten kann, dass die Zellen undifferenziert bleiben. Die humanen embryonalen Stammzellen wachsen ebenfalls auf inaktivierten Fibroblasten der Maus, allerdings ist hier die Wahl des Mausstammes (CF1) und der Inaktivierung (erfolgt ohne chemische Zusätze) entscheidend. Die Isolierung der embryonalen Fibroblasten erfolgt wie unter 4.1.1 bereits beschrieben.

4.1.7. Kultivierung mausembryonaler Fibroblasten für die humane Stammzellkultur

Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte weitgehend wie unter 4.1.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass der konfluente Zellstock vor dem Wegfrieren mitotisch inaktiviert wurde. Die Fibroblasten wurden trypsinisiert und abgestoppt, deren Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt, auf Eis aufbewahrt und bestrahlt (13 min bei 35 Gray). Nach der

Bestrahlung und einem Zentrifugationsschritt (200 g für 5 min) wurde das Pellet im Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen gegeben und bei -80°C eingefroren. Nach 24 h erfolgte der Transfer in Flüssigstickstoff.

Vor dem Aufbringen der Fibroblasten wurden 6-well Platten mit Gelatine beschichtet und diese mindestens 4 h bei 37°C inkubiert. Dies ist deshalb wichtig, da die Stammzellen zum einen eine extrazelluläre Matrix benötigen und zum anderen durch Kontakt mit Plastik Differenzierungsprozesse einleitet werden. Nach der Inkubationszeit wurde die überschüssige Gelatine entfernt und die inaktiven Fibroblasten in einer Dichte von $0,75 \times 10^5$ Zellen/ml auf die Platte ausgesät. Die Zelldichte ist hierbei geringer als die der Fibroblasten, die für die mausembryonale Stammzellkultur benötigt wird, da die humanen Stammzellen nicht auf den Feedern anwachsen, sondern zwischen den Feederzellen auf der Gelatinebeschichtung und ihre Kolonien zweidimensionales Wachstum aufweisen.

Die benötigte Fibroblastenzellzahl wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Nr. Zellen} = 0,75 \times 10^5 \text{ Zellen/ml} \times 2,5\text{ml/well} \times 6 \text{ wells/Platte} \times \text{Nr. Platten}$$

Diese Bestimmung erfolgte bereits vor dem Einfrieren, so dass bekannt war, auf wie viel Platten man ein Kryoröhrchen auftauen konnte, um die gewünschte Zelldichte zu erhalten.

Nachdem die Fibroblasten fest angewachsen waren, konnten die humanen Stammzellen ausgesät werden. Vor dem Aussäen wurden die Feederplatten zweimal mit PBS gewaschen, um alle Reste vom FCS zu entfernen, da dieses ein Differenzierungsstimulus für die humanen Stammzellen ist.

4.1.8 Auftauen und Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen

Der Transfer des Kryoröhrchen zum Auftauen vom flüssigen Stickstoff ins Wasserbad erfolgte zügig. Nachdem der Hauptanteil aufgetaut war, wurde der Inhalt in ein 15ml Röhrchen überführt und warmes Medium tröpfchenweise unter leichtem Schütteln auf die Zellen gegeben, um den osmotischen Schock möglichst gering zu halten. Nach einen Zentrifugationsschritt (200 g für 5 min) wurde das Pellet in 2 ml hESC Medium resuspendiert

und die Suspension tröpfchenweise auf die Platte verteilt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und täglichem Mediumwechsel.

Bei frisch aufgetauten Stammzellen kann es bis zu zwei Wochen dauern, bis Kolonien sichtbar werden, was im Gegensatz zur mausembryonalen Stammzellkultur einen erhöhten zeitlichen Aufwand darstellt. Zusätzlich ist es nötig, die entstandenen Kolonien regelmäßig auf Anzeichen von Differenzierungsprozessen zu untersuchen, da auch unter optimalen Bedingungen diese Zellen sehr empfindlich sind und viel extremer auf verschiedene Stressfaktoren (Platten die unzureichend mit Gelatine bedeckt wurden, Reste von FCS auf den Fibroblasten, falscher Mausstamm als Fibroblastenquelle, chemische Inaktivierung der Fibroblasten, Antibiotika im Medium, zu viele oder zu große Kolonien) reagieren als andere Zellen.

Im Falle von optisch sichtbarer Differenzierung wurden die entsprechenden Kolonien markiert und mit einer über der Flamme ausgezogenen Pasteurpipette entweder ganz oder nur das differenzierte Areal ausgekratzt. Nach dem Auskratzen wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen, um alle Reste der differenzierten Zellen zu entfernen und bis zum Passagieren weiterkultiviert. Abbildung 4.1.8 soll den morphologischen Unterschied zwischen undifferenzierten und differenzierten Stammzellkolonien verdeutlichen.

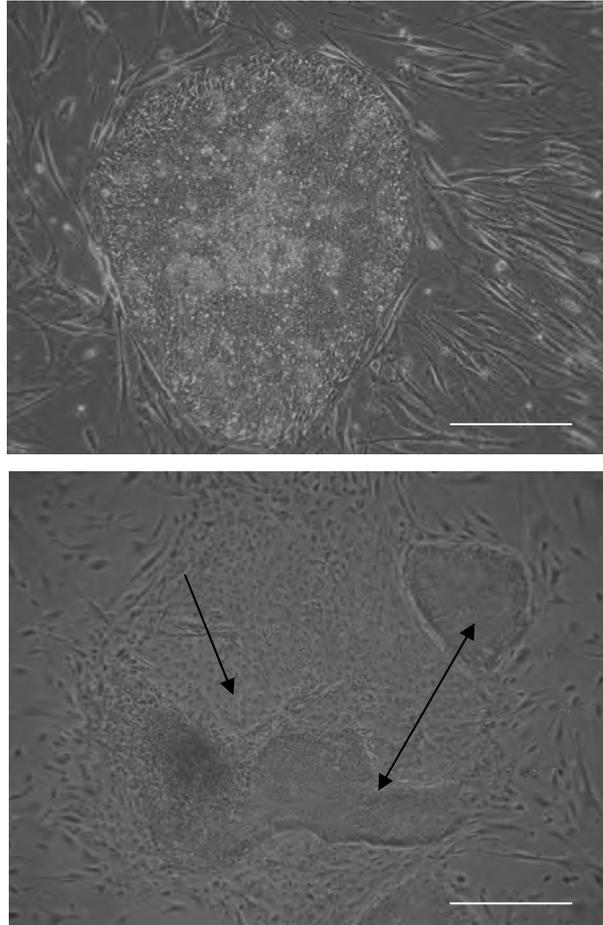


Abb. 4.1.8: Humane embryonale Stammzellen auf einem inaktivierten Fibroblastenrasen. a) Undifferenzierte humane Stammzellkolonie mit klar abgegrenztem Rand und kleinen Zellen. Balkengröße entspricht 100 μm . b) Hochgradig differenzierte Kolonie (Pfeil) mit fibroblastenähnlichen Zellen, die in zwei Kolonien (Doppelpfeil) hineinwächst und diese ebenfalls zum Differenzieren bringt. Balkengröße entspricht 300 μm .

4.1.9 Passagieren von humanen embryonalen Stammzellen

Das Passagieren der Stammzellen erfolgte idealerweise zweimal wöchentlich. Falls vorher differenzierte Areale entfernt wurden, wurde das Passagieren nicht am gleichen Tag durchgeführt, um eine mögliche Kontamination nicht zu übertragen.

Im Gegensatz zur Mauszellkultur wurden hierbei nicht die Zellen vereinzelt, sondern nur so weit enzymatisch aufgeschlossen, wie nötig war, um kleine zusammenhängende Zellverbände auf neue Platten zu geben. Für diesen Zweck wurde Kollagenase B (1mg/ml) im Medium angesetzt und für 5 min auf die Zellen gegeben (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Nach dieser Zeit kontrollierte man, ob sich die Ränder der Kolonien aufrollten und ggf. erfolgte

eine Verlängerung der Inkubationszeit um weitere 5-10 min. Die Kollagenase wurde abgenommen und 2ml/Well Medium gegeben, wonach mit einer 5ml Pipette die Kolonien vorsichtig abgespült und gleichzeitig mit der Pipettenspitze der Boden des Wells abgeschabt wurde, um sie zu Lösen und zu Zerkleinern. Nachdem alle Wells der Platte so behandelt wurden, überführte man die Zellen in 15ml Röhrchen. Bei Bedarf zerkleinerte man die Kolonien nochmal durch Pipettieren, um die gewünschte Größe zu erreichen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 200 g für 5min. Im Anschluß resuspendierte man das Pellet im frischen Medium, ohne die Kolonien weiter zu brechen und gab diese auf neue Feederplatten, meistens im Verhältnis 1:3.

4.1.10 Einfrieren von humanen embryonalen Stammzellen

Um humane Stammzellen wegzufrieren, verwendete man möglichst große Kolonien. Diese wurden, wie bereits unter 4.1.9 beschrieben, enzymatisch gelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass beim Aufbrechen der Kolonien keine Einzelzellsuspension entstand. Nach dem Zentrifugieren (200 g für 5 min) wurde das Pellet in der Hälfte des Endvolumens im Stammzellmedium gelöst. Die zweite Hälfte des Endvolumens bestand aus doppelt konzentriertem Einfriermedium, das tröpfchenweise unter leichtem Schütteln zupipettiert wurde. Nachdem die Suspension auf Kryoröhrchen verteilt und in einem Isopropanolcontainer, der langsames Einfrieren ermöglicht, 24 h bei -80°C gelagert wurde, erfolgte am darauffolgenden Tag die Überführung in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff.

4.1.11 Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen

Um die Zellen zur Differenzierung zu bringen, wurde auch hier die EB Methode verwendet, jedoch mit leicht modifiziertem Protokoll. Um EBs herzustellen, wurden die Stammzellen mit 1 ml Dispaselösung/Well (1mg/ml Dispase) für 20-30 min inkubiert (37°C, 5%CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit), bis sich die Kolonien im Ganzen von ihrem Untergrund lösten. Diese wurden dann mit einer Pipette vorsichtig in 15ml Röhrchen überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Kolonien intakt bleiben. Um eventuell an den Schalen hängengebliebene Kolonien zu lösen, spülte man jedes Well mit 1 ml Medium und gab es ebenfalls in das

Röhrchen. Um keine Kolonien zu brechen wurde auf Zentrifugationsschritte verzichtet und 2-3 min gewartet, bis die Kolonien absinken, wonach das dispasehaltige Medium abgenommen und frisches EB-Medium (siehe auch 3.7) zugegeben wurde. Insgesamt wurden die Aggregate dreimal gewaschen. Die Kolonien resuspendierte man im Differenzierungsmedium (humanes Differenzierungsmedium 1) und gab sie auf bakteriologische Schalen, um EBs zu formen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und täglichem Mediumwechsel für die ersten 6 Tage. Danach wurde die Mediumzusammensetzung geändert (humanes Differenzierungsmedium 2), indem die FCS Konzentration auf ein Zehntel der Ursprungskonzentration reduziert wurde. Die EBs wurden bis Tag 14 der Differenzierung in Kultur gehalten.

4.1.12 Kultivierung von Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden im Wasserbad aufgetaut und im angesetzten Hams F-10 Medium in T-75 Zellkulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit, der Mediumwechsel alle zwei Tage. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA vereinzelt, davon 50 µl Zellsuspension auf eine neue T-75 Zellkulturflasche überführt und 2 ml bei Bedarf für das Ansetzen einer Spinnerflasche verwendet. Das Medium der Spinnerflasche wurde täglich gewechselt und die Tumorsphäroide ab Tag 10 für Kokulturversuche genutzt.

4.1.13 Ansetzen einer Kokultur

Zum Ansetzen einer Kokultur wurde die „hanging drop“ Methode genutzt. Hierfür wurden auf die Unterseite eines Deckels einer bakteriologischer Schale 35 µl fassende Mediumstropfen gesetzt und in diese je ein 4 Tage (bzw. 6 Tage im Falle humaner EBs) altes EB und ein Tumorsphäroid mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze transferiert. Der Boden der Schale wurde mit destilliertem Wasser gefüllt, um ein Austrocknen der Tropfen zu verhindern. Der Deckel der Schale wurde vorsichtig umgedreht und auf diese platziert. Dieses Vorgehen brachte beide Gebilde nah aneinander, was das Zusammenwachsen von EB und Tumorsphäroid ermöglichte. Nach 24 - 48 h entstand i.d.R. eine stabile Kokultur, die aus den

Tropfen genommen werden konnte. Dafür wurde mit einer Weithalspipette 5 ml Medium langsam über die Tropfen gegeben, so dass sich die Kokulturen an einem Ende des Schalendeckels sammelten, von wo aus man sie mit der Pipette aufnehmen und in eine bereitstehende Petripermschale überführen konnte. Je nach Versuchsplan wurden die Kokulturen für eine bestimmte Zeitspanne weiterkultiviert (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit, täglicher Mediumwechsel).



Abb. 4.1.13: Schematische Darstellung eines Kokultur Versuchs. 4 bzw. 6 Tage alte EBs wurden zusammen mit einem Tumorsphäroid in einen 35µl Tropfen gegeben, der Deckel der Schale umgedreht und die angesetzte Kokultur für 2 Tage weiterkultiviert. Nachdem die Gebilde zusammengewachsen waren, wurden sie aus dem Tropfen entnommen und auf Petripermschalen ausplattiert. Je nach Versuchsansatz wurden sie dann für einen bestimmten Zeitraum weiterkultiviert, wie z. B. im Schema dargestellt, bis Tag 8, um anschließend eine Immunfärbung für CD31 (Endothel) durchzuführen. Balkengröße entspricht 300µm.

4.2 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Substanzen und Wachstumsfaktoren

Um die verschiedenen Substanzen und deren Einfluss auf die Kokultur zu untersuchen, wurden diese ab Tag 4 täglich mit den jeweiligen Inhibitoren (SU5614, ZM323881, Thalidomid, L-NAME), Wachstumsfaktoren (VEGF) und Radikalfängern (NMPG, Carboxy-PTIO) behandelt. Wenn ein Versuchsplan die vorherige Inhibition oder Aktivierung bestimmter Signalwege erforderte, wurden die Inhibitoren bzw. Aktivatoren jeweils 2 h vor den Substanzen auf die Proben gegeben.

4.3 Lebendzellfärbung mit CMFDA

Die Lebendfärbung mit CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetat) diente zur Erkennung von Tumorzellen (-sphäroiden) in der Kokultur. Hierfür wurden die Tumorsphäroide mit CMFDA-haltigem Medium (10 mM) 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit frischem Medium gewaschen. Das Ansetzen der Kokultur erfolgte wie bereits unter 4.1.13 beschrieben. Die Färbung war 4-6 Tage nachweisbar und wurde durch die unterschiedlichen Fixierungsmethoden nicht zerstört. Der CMFDA Farbstoff konnte mit dem Argon Laser (488nm) angeregt werden (Absorptionsmaximum 492nm, Emissionsmaximum 517nm).

Die Bildaufnahme und Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Mikroskop und der dazugehörigen Software.

4.4 Immunzytochemie

Immunzytochemie beschreibt den Prozess der Proteinlokalisierung in Zellen und Geweben unter Zuhilfenahme des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“ der Antigen-Antikörper Bindung. In diesem Fall ist das gesuchte Protein das Antigen, das mittels spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper erkannt wird. Diese sog. primären Antikörper, können bereits mit einem Fluorophor konjugiert sein. Solch eine Färbung wird als direkte Färbung bezeichnet

oder aber es folgt auf einen unkonjugierten Antikörper noch eine sekundäre Bindung mit einem Fluorophor konjugierten Antikörper, der spezifisch die Spezies des primären Antikörpers erkennt. Solch eine Färbung wird als indirekt bezeichnet. Die Anregung der Fluorophore durch Laserlicht hebt ein Elektron des Fluorophormoleküls auf ein höheres Energieniveau. Dieses angeregte Elektron geht sehr schnell in den Grundzustand zurück und gibt die überschüssige Energie in Form eines Photons ab. Der Energietransfer selbst wird als Fluoreszenz bezeichnet. Der Energiebereich des Lichtes, der zur Anregung benötigt wird, wird Absorptionsspektrum genannt, der Bereich der emittierten Wellenlängen, Emissionsspektrum.

Fluorophor	Absorptionsspektrum (nm)	Emissionsspektrum (nm)
Alexa Fluor® 488	495	519
Cy-2 (Carbocyanin)	492	510
Cy-3 (Indocarbocyanin)	550	570
Cy-5 (Indodicarbocyanin)	650	670
FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	492	520

Tabelle 4.4: Antikörper-konjugierte Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Absorptions- und Emissionsmaxima

Für die Immunfärbungen müssen die Proben erst entsprechend vorbereitet werden. Die Zellen werden durch Fixation mit 100% Methanol (20 min, -20°C) oder 4% Paraformaldehyd (PFA, 20 min, RT) konserviert. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird das Fixativ entfernt und die Zellen dreimal mit 0.1% PBST gewaschen. PFA hat die Eigenschaft, Oberflächenproteine miteinander zu vernetzen, was so fixierte Zellmembranen für Antikörper unpassierbar macht. Deshalb wurden PFA fixierte Proben im nächsten Färbeschritt permeabilisiert (1% PBST, 20 min, RT). Nach der Permeabilisierung erfolgen wieder 3 Waschschrte und eine Inkubation mit 10% FCS (45 min, RT). In diesem Schritt werden unspezifische Antikörperbindungsstellen abgedeckt. Als nächstes werden die Zellen mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert (2 h, RT oder über Nacht, 4°C), gefolgt von 3 Waschschrten mit 0.01% PBST. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1 h, RT,

dunkel) wird ebenfalls mit 3 Waschschrinen beendet, wobei im Falle nicht ausplattierter EBs die Antikörper mit 3%iger Formaldehydlösung nachfixiert werden können, so dass sie auch nach längerer Zeit analysierbar sind. Bei ausplattierten Zellen wurden die Membranen der Petripermschalen zugeschnitten und auf Objektträger übertragen. Diese Proben wurden mit Fluomount G und Deckgläschen versiegelt.

4.5 Konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM)

Die konfokale Lasermikroskopie zeichnet sich durch eine erhöhte Auflösung der Bilder aus. Die Grundlage dafür liefert das konfokale Prinzip. Dieses ermöglicht, dass nur Daten aus einer bestimmten Schnittebene gesammelt und analysiert werden. Emittiertes Licht aus dieser Ebene gelangt über einen dichroitischen Spiegel zu einer Lochblende, die es passiert und auf einen Detektor trifft, der das Lichtsignal als elektrischen Impuls weiterleitet und über eine entsprechende Software zu einem Bild zusammensetzt. Dabei können Lichtsignale außerhalb der Fokalebene die Lochblende nicht passieren und werden somit auch nicht vom Detektor erfasst, wodurch Auflösung und Kontrast erhöht werden.

Zur Erzeugung dreidimensionaler Bilder wird die Probe in allen drei Raumrichtungen abgescannt und die einzelnen Schnittbilder zusammengefügt.

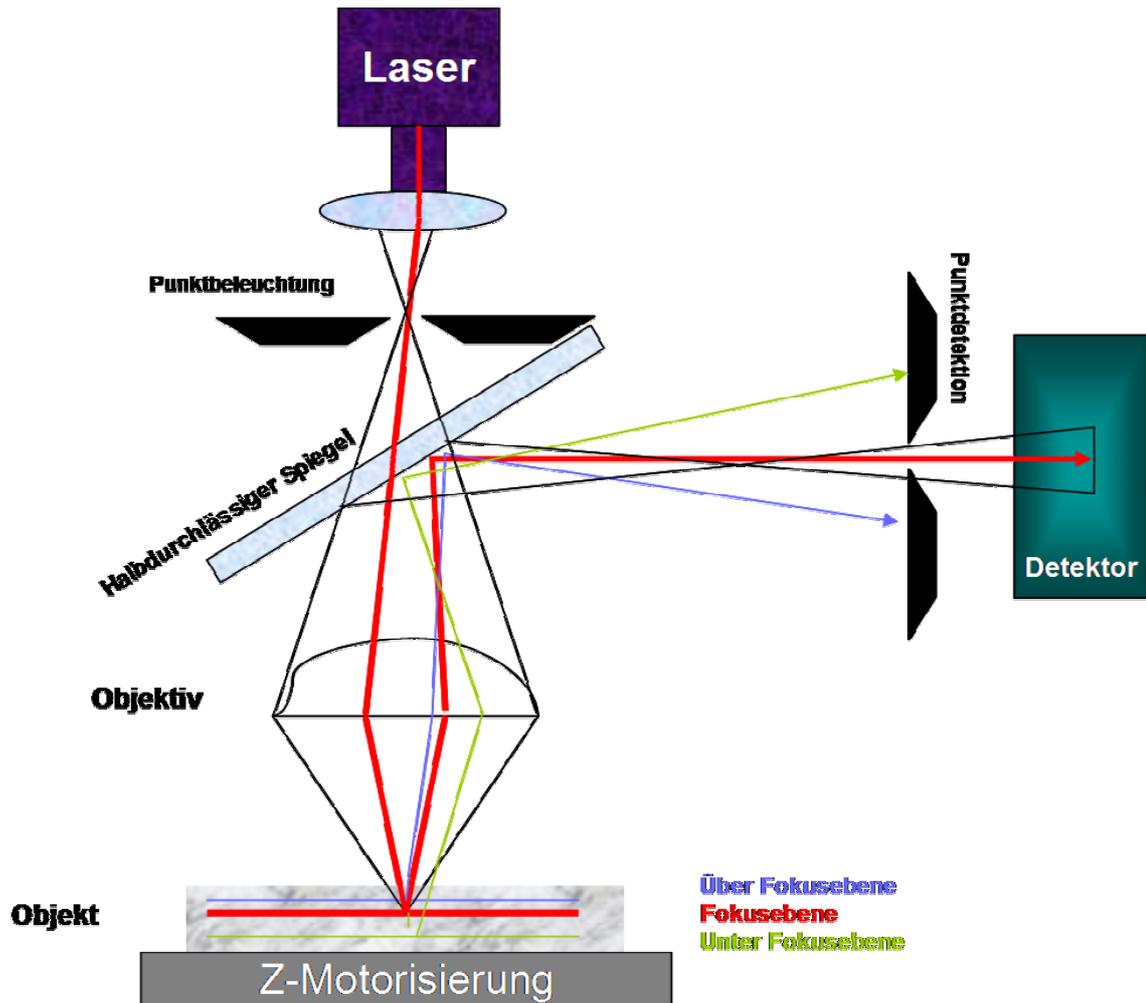


Abb 4.5: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines konfokalen Mikroskops. Das Licht einer punktförmigen Lichtquelle wird über einen dichroischen Spiegel in den Strahlengang des Mikroskops gelenkt und über die Objektivlinse in das Objekt fokussiert. Emissionslicht aus der Fokusebene gelangt in umgekehrter Richtung durch eine Lochblende auf den Detektor. (modifiziert nach www.uni-magdeburg.de/iwf/labore/)

4.6 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte über die Fluoreszenzbestimmung des ROS Indikators DCFH-DA. Vier Tage alte EBs wurden mit Thalidomid behandelt (bei Einsatz von Inhibitoren wurden diese 2 h vorher zugegeben) und 4 bzw. 24 h später mit DCFH-DA im serumfreien Medium beladen. Nach 30minütiger Inkubation wurden die EBs in frisches Medium überführt und die Fluoreszenz der Proben mittels konfokaler Mikroskopie

(Argon Laser, 488nm) bestimmt. Da mit zunehmender Dauer der Laseraktivität auch die ROS in den Zellen steigen, wurde die Messung auf maximal 10 min begrenzt.

4.7 Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid wurde ebenfalls über eine Fluoreszenzbestimmung nachgewiesen. Hierzu wurden 4 Tage alte EBs mit Thalidomid behandelt, bei Einsatz von Aktivatoren (SNAP) wurden diese 2 h vorher zugegeben. 4 bzw. 24 h später wurden die EBs im serumfreien Medium mit dem NO Indikator DAF-FM für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die EBs einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und nochmals 30 min bei 37°C zwecks Deesterifikation des Farbstoffes belassen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 488nm.

4.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine Form der Durchflusszytometrie. Dabei werden verschiedene physikalische Eigenschaften einzelner Zellen gemessen und analysiert, während sie nacheinander in einem Flüssigkeitsstrom einen Laser passieren. Der Durchflusszytometer besteht aus drei Hauptkomponenten: dem Flüssigkeitssystem, das die Zellen transportiert und hydrodynamisch fokussiert, dem optischen System, das die Zellen im Flüssigkeitsstrom anstrahlt (Laser) und die austretenden Lichtsignale zu den entsprechenden Detektoren leitet (optische Filter). Das elektronische System wandelt die Lichtsignale in elektronische und digitale Signale um. Gemessen werden die relative Partikelgröße, die relative Granularität und die relative Fluoreszenzintensität. Die Eigenschaften der Zellen basieren auf deren Lichtstreuung und den Fluoreszenzmerkmalen. Die FACS-Analyse dient vorwiegend der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf Grundlage von Antigen-Antikörper-Reaktionen. Obwohl das FACS-System nur

über einen Laser verfügt, ist eine gleichzeitige Messung mit verschiedenen Farbstoffen möglich, da sich die Farbstoffe durch unterschiedliche Emissionsspektren unterscheiden.

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission (nm)
FITC	495	519
PE	492/565	578
PE-Cy5	492/565	670

Tabelle 4.8: Antikörper-konjugierte Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Absorptions- und Emissionsmaxima

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: 8 Tage alte EBs wurden einmal mit lauwarmem PBS gewaschen und mit Kollagenase B (1mg/ml) 15 min bei 37°C verdaut. Nach Vereinzelung der Zellen wurde der Kollagenasegehalt der Proben durch Zugabe von Medium verringert und die Proben abzentrifugiert (200 g, 4 min). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in eiskaltem PBS resuspendiert und auf Eis gestellt. Um nicht dissoziierte Zellverbände zu entfernen, wurde die Zellsuspension durch ein 0.2 µm Sieb gefiltert. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und 10⁶ Zellen für die Färbung entnommen. Die Proben wurden für 30 min in 10% FCS auf Eis geblockt, um unspezifischen Antikörperbindungen vorzubeugen. Nach dem Blocken folgte die Antikörperfärbung für 30 min auf Eis. Bei direkt konjugierten Antikörpern wurden die Zellen durch zweifache Zentrifugationsschritte (200 g, 4 min) und Resuspension in PBS gewaschen, in FACS Röhrchen überführt und mit dem FACS-Zytometer aufgenommen und detektiert. Bei nicht konjugierten Antikörpern erfolgte nach dem Waschen ein zweiter Inkubationsschritt mit einem sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, der nach 30 min mit abermals zwei Waschschritten endete.

Nach der FACS-Messung wurden die Daten mit der CellQuestPro[®] Software analysiert.

4.9 Western Blot

Die Western Blot Methode dient dem Nachweis aus Zellen gelöster Proteine, die mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt wurden. Der Blot ist eine Membran aus Nitrocellulose

oder Polyvinylidenfluorid (PVDF), auf die sich im Gel befindenden Proteine transferiert werden. Dies geschieht, indem man einen elektrischen Strom durch das Gel auf die Membran richtet. Als Kontrolle für einen erfolgreichen Transfer dient die Ponceau Färbung, die unspezifisch und reversibel an alle Proteine bindet, diese für das Auge sichtbar macht und Auskunft über Stärke und Gleichmäßigkeit der Banden gibt. Die nun auf der Membran lokalisierten Proteine können mittels direkter und indirekter Antikörperfärbungen spezifisch erkannt werden. Im Gegensatz zur Immunzytochemie sind die für den Western Blot benötigten Antikörper enzymkonjugiert. Am meisten werden alkalische Phosphatase (AP) und Meerrettichperoxidasekonjugate (MPO) verwendet, die hierbei eine Farb- oder Chemilumineszenzreaktion katalysieren. Die entstehende Lumineszenz wird über ein Detektionssystem aufgezeichnet und die antikörpermarkierten Banden werden sichtbar gemacht.

4.9.1 Proteinextraktion

Um die Proteine aus den Zellen zu lösen, wurden die EBs in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach zweimaligem Waschen der Proben im eiskalten PBS wurden sie in 100 µl komplettierten RIPA-Lysis Puffer resuspendiert und mit einem Pestil mechanisch zerkleinert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die Proben wurden in einer vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (30 min, 12500 RpM, 4°C). Die im Überstand gelösten Proteine wurden in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C aufbewahrt.

4.9.2 Proteinbestimmung

Die Konzentration der Proteine wurde mit der sog. Lowry-Methode durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine photometrische Bestimmung, die es erlaubt, Proteine quantitativ zu erfassen (Lowry *et al.*, 1951).

4.9.3 Gelelektrophorese und Blotten

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 40 µg Protein der jeweiligen Proben mit einem Probenpuffer und einem Reduktionsmittel nach Angaben des Herstellers aufbereitet und für 10 min. bei 70°C erhitzt. Die Proben wurden auf ein 10% NUPAGE® Bis-Tris Gel aufgetragen und in einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Dauer der Auftrennung und Stärke des Stroms wurden nach Angaben des Herstellers gewählt. Im Anschluss wurden die Gele in das iBlot™ System (Invitrogen) eingelegt und die Proteine auf PVDF Membranen transferiert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Auftrennung und Proteintransfer wurden die Proteine mit Ponceau S gefärbt. Eine Entfärbung wurde mit mehrmaligen Waschschritten mit 0,1% TBS-T erreicht.

4.9.4 Spezifischer Proteinnachweis

Dem Nachweis spezifischer Proteine dient, wie bereits erwähnt, eine Antikörperfärbung. Hierfür wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen abgedeckt, (5% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, 1h bei RT) bevor der primäre Antikörper (gelöst in 3% BSA in 0,1% TBS-T, über Nacht bei 4°C) auf die Membran gegeben wurde. Am nächsten Tag wurde der Antikörper abgenommen und zwecks Wiederverwertung bei -20°C gelagert. Die Membran wurde in 3 Waschschritten (0,1% TBS-T, je 10 min) von Antikörperresten befreit und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert (gelöst in 3% Magermilchpulver in 0,1% TBS-T, 1h bei RT). Es folgten wiederum 3 Waschschrritte mit 0,1% TBS-T.

4.9.5 Proteindetektion

Um die gefärbten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran mit den ECL-Lösungen 1 und 2 inkubiert (Mischverhältnis 1:1, 3-5min), worauf die mit dem sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase eine chemische Reaktion eingeht und ein Lichtsignal erzeugt, das mit Hilfe eines ECL Systems (ECL= enhanced chemoluminescence) detektiert und visualisiert wird.

4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode, die es ermöglicht, das Erbgut der Zelle in vitro zu vervielfältigen. Hierbei werden immer wieder Zyklen durchlaufen, die in drei Schritte unterteilt sind:

- 1) Denaturierung: Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Erhitzen und Entstehung von Einzelstrang DNA
- 2) Hybridisierung: Primer binden komplementär an die zu amplifizierenden Regionen der DNA Matrize
- 3) Elongation: die DNA-Polymerase bindet an die Primerenden und verlängert den neuen Strang mit weiteren komplementären Nukleotiden (dNTPs). Diese neuen Stränge werden im nächsten Zyklus mit amplifiziert, wodurch deren Zahl exponentiell zunimmt.

Um Rückschlüsse auf die Transkriptionsrate von bestimmten Genen ziehen zu können, muss deren Transkriptionsprodukt, die m-RNA, analysiert werden. Dies ist nur möglich, wenn zuvor die m-RNA durch reverse Transkription in eine komplementäre cDNA umgeschrieben wird. Diese generierte cDNA dient dann als Matrize, die in die PCR geht, um spezifische Sequenzen zu amplifizieren.

4.10.1 RNA Isolierung

Zur RNA Isolierung wurden die Proben in sterile Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, einmal mit PBS gewaschen und dann mit 1ml Trizol bei RT inkubiert, bis die EBs komplett lysiert waren. Auf jede Probe wurden nun 200 µl Chloroform gegeben, kräftig geschüttelt und 3-10 min auf Eis belassen, bis 2 Phasen sichtbar wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in einer vorgekühlten Zentrifuge (11000 g, 20 min bei 4°C). Nach dem Zentrifugieren waren 3 Phasen sichtbar: eine wässrige obere RNA-haltige Phase, eine proteinhaltige Interphase und eine untere Phenol-Chloroform-Phase, die DNA enthielt. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wiederum mit 200 µl Chloroform versetzt, um eine bessere Aufreinigung zu erzielen. Die Proben wurden

erneut zentrifugiert (11000 g, 20 min bei 4°C) und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Nun erfolgte die Ausfällung der RNA mit 500 µl Isopropanol (20 min oder über Nacht bei -20°C). Die Proben wurden erneut abzentrifugiert (11000 g, 20 min, 4°C) und das Pellet in 70%-igem eiskaltem Ethanol resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (4500 g, 5 min bei 4°C) wurde das gewonnene Pellet getrocknet und in 33 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Um das Vorhandensein genomischer DNA-Reste auszuschließen, wurde zusätzlich ein enzymatischer Verdau mit der unspezifischen Endonuklease DNase I durchgeführt. Je vorhandener Probe wurde dabei folgender Ansatz hinzugefügt: 5 µl 10xPCR Puffer, 5 µl MgCl₂ (50 mM), 5 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNAsin und 1 µl DNase I. Die Proben wurden eine Stunde lang bei 37°C inkubiert, dann mit 150 µl RNase-freiem Wasser und 200 µl Phenol/Chloroform Gemisch (1:1) aufgefüllt, gemischt und abzentrifugiert (11000 g, 20 min bei 4°C). Die obere Phase wurde abermals mit 200 µl Chloroform abzentrifugiert und mit 500 µl absoluten Ethanol und 20 µl Natriumacetat (3 M) gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20-30 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Der RNA Gehalt der Proben wurde photometrisch mit einem Nano Drop Gerät bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

4.10.2 cDNA Synthese

Um weiter mit der RNA arbeiten zu können, muss diese erst in ihre komplementäre DNA (cDNA, c=complementary) revers transkribiert werden. Dieses Transkript hat wie seine Ausgangs-RNA keine Introns, ist aber deutlich stabiler, da es eine DNA ist und auch reiner, da nur die m-RNA in cDNA umgewandelt wird, nicht aber die anderen in der Zelle vorkommenden RNA Arten.

Für die reverse Transkription wurden 2 µg RNA benutzt und das Volumen auf 10 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt, diese dann in einem Thermocycler denaturiert (15 min bei 60°C) und 1 min bei 4°C gekühlt. Nach diesem Schritt wurde auf jede Probe ein Mix bestehend aus 4 µl 5xReverse-Transkription-Puffer, 1µl DTT (0,1 M), 2 µl oligo dT, 2 µl

dNTPs (40 mM), 0,4 µl RNAsin 0,6 µl MMLV RT (reverse Transkriptase des murinen Maloney-Leukämie-Virus) zupipettiert. Die reverse Transkription wurde im Thermocycler für 1 h bei 37°C fortgesetzt, mit anschließender Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 94°C für 5 min.

Die entstandene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt und bis zur späteren Nutzung bei -20°C aufbewahrt.

4.10.3 Quantitative PCR

In der PCR werden bestimmte (vom Primer erkannte) cDNA Abschnitte vervielfältigt. Diese Amplifikation ist proportional zur Menge des PCR Produkts und kann mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. dem in dieser Arbeit verwendeten SYBR® Green, sichtbar gemacht werden. Jede Probe wurde dreifach aufgetragen, um Pipettierfehler zu minimieren. Das Reaktionsgemisch hatte ein Volumen von 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 3 µl cDNA, 6,4 µl Wasser, 0,3 µl forward Primer (10 µM), 0,3 µl reverse Primer (10 µM) und 10 µl SYBR® Green PCR Supermix.

Die PCR erfolgte im iCycler der Firma Biorad und setzte sich aus den in der Tabelle 4.10.3 dargestellten Zyklen und Schritten zusammen.

Zyklus 1 (1x)		Aktivierung der Polymerase	95°C, 15min
Zyklus 2 (45x)	Schritt 1	Denaturierung	95°C, 30 s
	Schritt 2	Annealing	Primerspezifisch, 30 s
	Schritt 3	Amplifikation	72°C, 30 s
Zyklus 3 (46x)			55-95°C, 10 s

Tabelle 4.10.3: Programmwahl des iCyclers für die quantitative PCR.

Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Biorad iCycler iQ Software. Die Werte der jeweiligen Gene wurden in Relation zu einem Referenzgen (hier GAPDH) gebracht. Diese Methode bezeichnet man auch als Vergleichende Schwellenwert Methode ($\Delta\Delta C_T$ Methode).

4.11 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei pro Versuch und Probe mindestens 30 EBs bzw. Kokulturen oder Tumorsphäroide ausgewertet wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Student-t-Test bzw. ANOVA ermittelt. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant (*) angesehen.

5. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss von Tumorgewebe auf die endotheliale Differenzierung von Stammzellen in einem System, das bis zu einem gewissen Teil die Entstehung physiologischer Bedingungen erlaubt, untersucht werden. Dazu sollte zuerst der Prozess der tumorinduzierten Angiogenese analysiert werden.

5.1 Der zeitliche Verlauf der Vaskularisierung von Tumorsphäroiden in Kokultur

Die Tatsache, dass EBs im Konfrontationskulturmodell in der Lage sind, durch Vaskulo- und Angiogenese Tumore zu versorgen, konnte schon früher gezeigt werden (Wartenberg *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der Vaskularisation der Tumorsphäroide gewonnen aus der Zelllinie DU-145 untersucht.

Hierfür wurden Kokulturen mit der im Kapitel 4.1.13 beschriebenen „Hanging-drop“ Methode hergestellt und im Abstand von zwei Tagen ein Teil der Kokulturen fixiert und mit der Immunfärbung für CD31 (Syn. PECAM-1= platelet endothelial cell adhesion molecule-1) auf Endothel gefärbt. Die Probennahme erfolgte ab Tag 4 bis Tag 10 der Differenzierung der EBs.

Die Protokollierung des Differenzierungsverhaltens erfolgte mittels CLSM. Die Tumorsphäroide wurden vor Zusammenführung mit dem EBs mit dem Lebendfarbstoff CMFDA gefärbt, der auch nach Fixierung der Zellen im Argonlaserbereich (488nm) sichtbar ist.

Ermittelt wurde hierbei der relative Anteil an gefäßversorgten Tumoren nach unterschiedlich langem Zeitraum in Kokultur. Die meisten Tumore wurden nach 4 Tagen in Kokultur (Alter des EBs beträgt dabei 8 Tage) vaskularisiert, wonach sich ein Plateau ausbildete. Wie in Abb. 5.1 b) dargestellt, konnte gezeigt werden, dass nach 4 Tagen in Kokultur ca. $70 \pm 1,6\%$ der Tumore eine Vaskularisierung durch den EB aufwiesen. Durch eine Verlängerung des Kultivierungszeitraums konnte kein weiterer Anstieg der Zahl gefäßversorgter Tumore erreicht werden ($68 \pm 8,1\%$ vaskularisierter Tumorsphäroide nach 6 Tagen in Kokultur).

Allerdings konnte beobachtet werden, dass mit zunehmendem Alter der Kokultur das Gefäßnetzwerk im Bereich des Tumorsphäroids dichter wurde als im umliegenden Gewebe (Abb. 5.1 a).

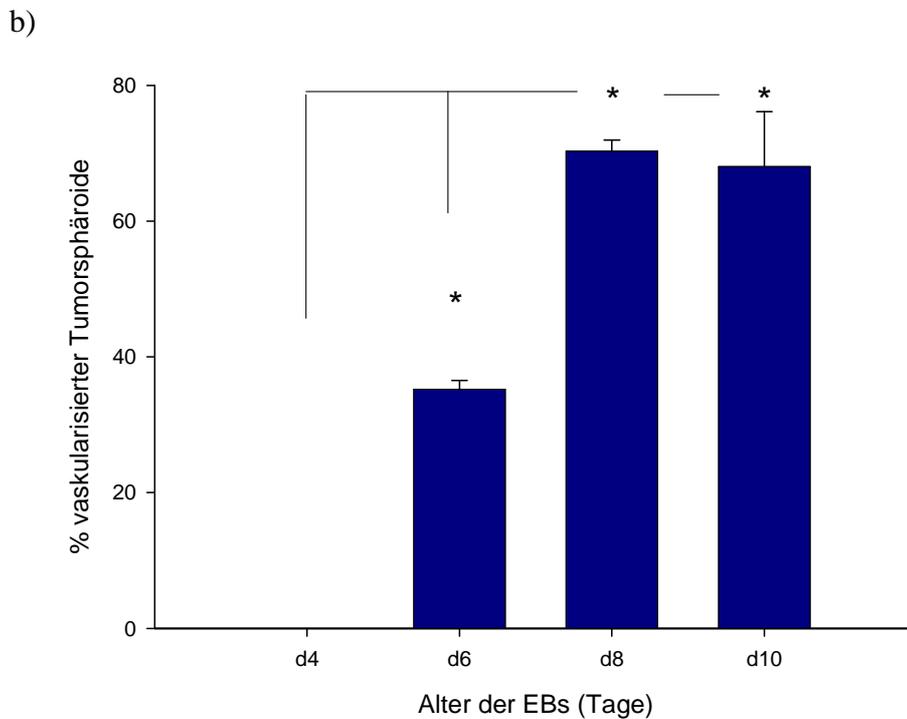
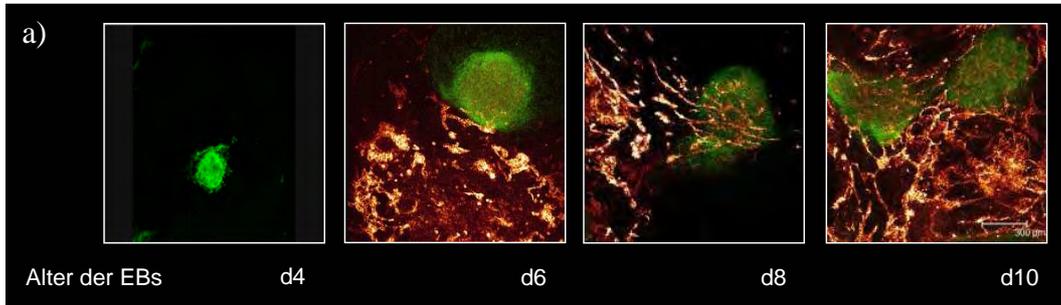


Abb. 5.1: Zeitabhängigkeit der Vaskularisierung der Tumorsphäroide.

a) Bei einer neu angesetzten Kokultur ist der Tumorsphäroid nicht vaskularisiert. Dies ändert sich jedoch bereits nach 48 Stunden, wo erste versorgte Tumorsphäroide beobachtet werden konnten. Mit zunehmenden Alter der Kokultur wird das Gefäßnetzwerk im Bereich des Tumors dichter als in der „nicht-tumorösen“ Umgebung. Die Balkengröße entspricht 300µm.
b) Die maximale Anzahl vaskularisierter Tumore konnte nach viertägiger Kultivierung beobachtet werden (n = 4, p<0,05).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass es zu einer Auswanderung von Tumorzellen aus dem dreidimensionalen Gebilde des Tumorsphäroids kam. *In vivo* wird so ein Verhalten oft im Zusammenhang mit der Entstehung von Mischgefäßen, die aus normalen Gefäßbausteinen und entarteten Zellen zusammengesetzt sind, beobachtet (Holash *et al.*, 1999). Somit zeigen unsere Experimente, dass sich das *in vitro* Modell der Kokultur ähnlich verhält wie gängige *in vivo* Modelle und deshalb zur Erforschung tumorinduzierter Prozesse, wie auch antitumoröser Therapien geeignet ist.

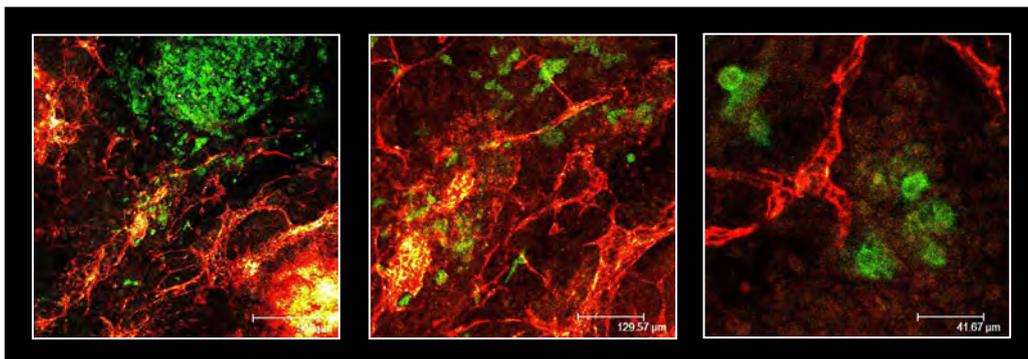


Abb. 5.1.2: Migrationsverhalten der Tumorzellen. Vereinzelt Tumorzellen (grün markiert mit dem Lebendfarbstoff CMFDA) wandern aus dem Tumorsphäroid aus und lagern sich um die CD31 positiven Strukturen. Die Größenbalken entsprechen 300, 130 und 42 µm.

5.2 Einfluss des Tumorsphäroids auf die endotheliale Differenzierung des EBs

Um die Tumorinduzierte Angiogenese weiter zu bestimmen, sollte die endotheliale Differenzierung zwischen EBs allein und Tumor-assoziierten EBs verglichen werden. Hierfür wurde die Vaskularisierung über die Anzahl der Verzweigungspunkte des Gefäßnetzes bestimmt, welche in Verhältnis zur Größe des EBs bzw. der Kokultur gebracht wurden. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme ($50 \pm 22,9\%$) der Vaskularisation bei EBs, die mit Tumorsphäroiden konfrontiert worden waren.

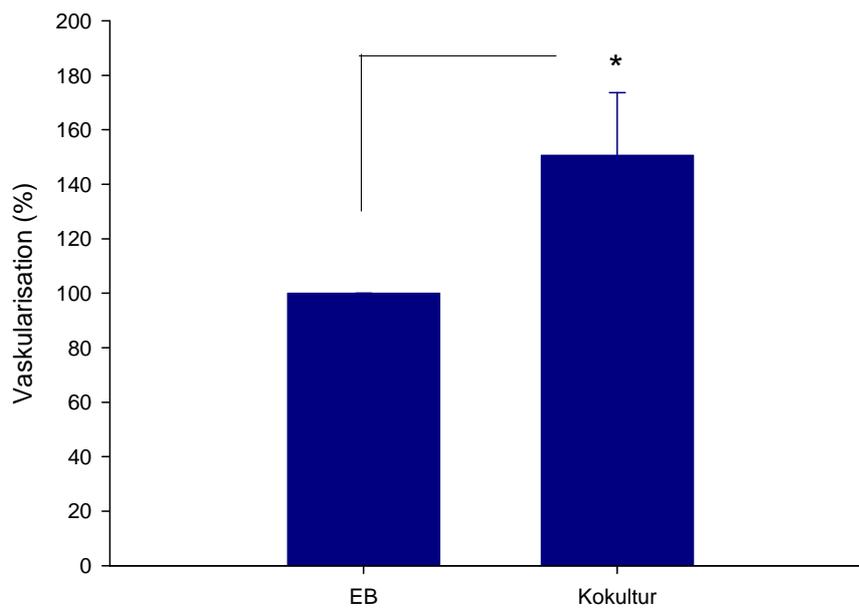
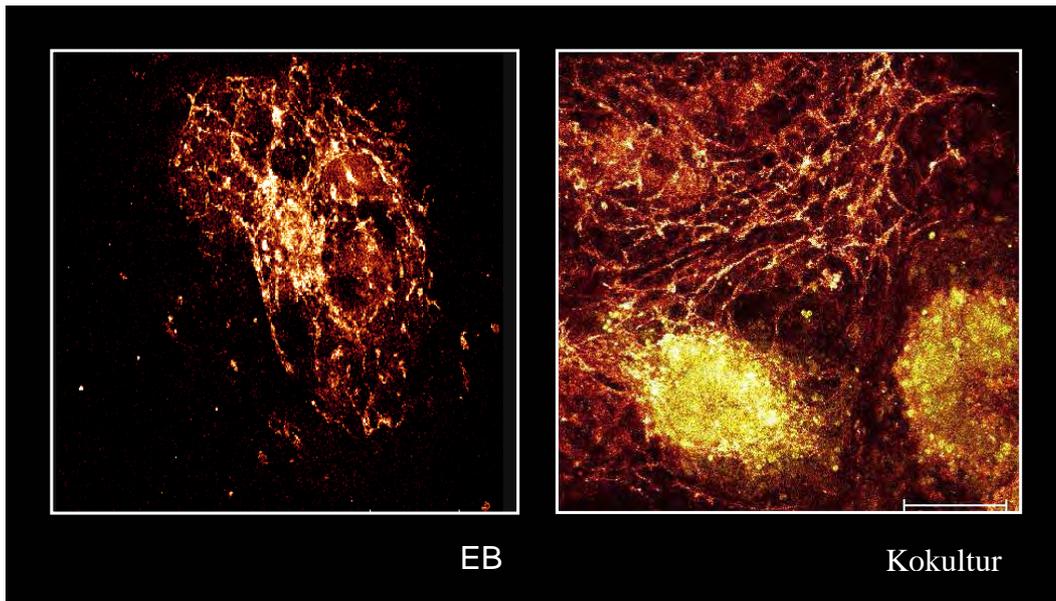


Abb. 5.2: Vaskuläre Entwicklung in Kokulturen im Vergleich zu Kontroll-EBs. Gezeigt werden repräsentative Bilder der Immunfärbung für den endothelspezifischen Marker CD31, sowie die graphische Auswertung der Vaskularisierung von EB und Kokulturt (n = 3, p<0,05). Die Balkengröße entspricht 300µm.

Es stellte sich die Frage, ob es sich bei der erhöhten Verzweigungsrate neben der Migration von Endothelzellen auch um Zellproliferation handelt. Dies wurde über eine Bestimmung des relativen Anteils an CD31⁺ Zellen ermittelt.

Acht Tage alte EBs und Kokulturen wurden wie in Kapitel 4.8 beschrieben, dissoziiert, immunzytochemisch angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Kokulturen wiesen hierbei ca. 10% mehr CD31⁺ Zellen auf, verglichen mit dem Anteil dieser Zellen in den Kontrollgruppen (13,4 ± 4,6% CD31⁺ Zellen in Kontroll EBs, 23,15 ± 3,5% CD31⁺ Zellen in Konfrontationskulturen).

Das Ergebnis weist auf eine, durch den Tumorsphäroid verursachte, erhöhte Proliferation von Endothelzellen hin.

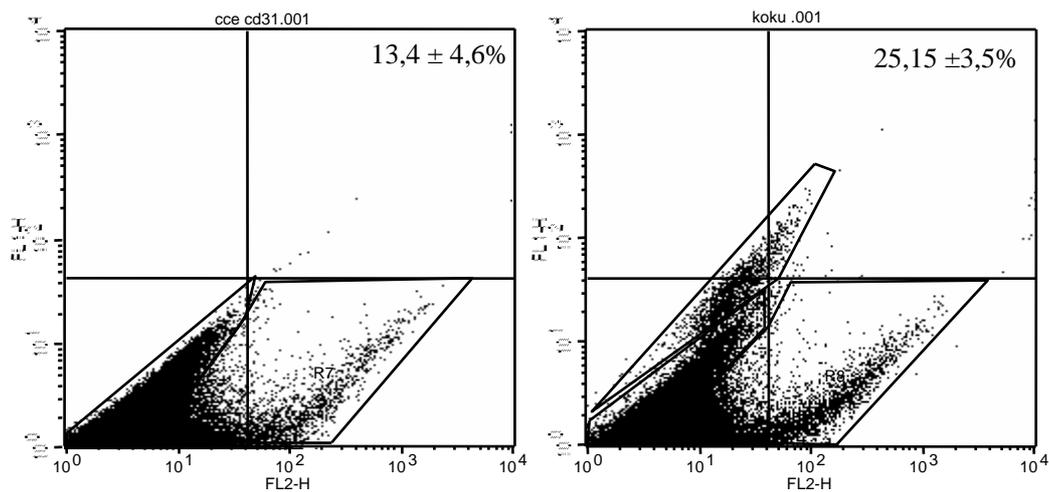


Abb. 5.2.1: Repräsentative Dot-Plots der CD31⁺ Zellen in EBs und Kokulturen. Nach Dissoziation der Gebilde und Immunfärbung wurde der relative Anteil der CD31⁺ Zellen im FACS Gerät bestimmt (n = 4, p>0,05).

5.3 Tumorinduzierte Richtungsweisung der neu entstandenen Gefäße

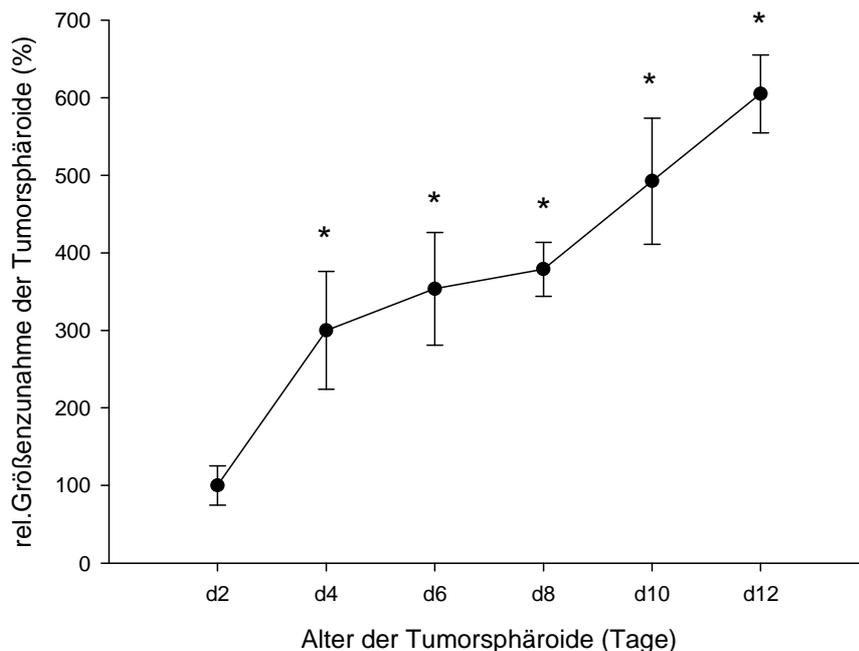
Wie im Kapitel 1.3 bereits erwähnt, schüttet der Tumor proangiogene Faktoren in seine Umgebung aus, um Angiogenese zu induzieren und somit seine Versorgung zu sichern. Einer der am meisten untersuchten Faktoren in diesem Zusammenhang ist VEGF.

Um festzustellen, ob dies auch für das Kokulturmodell zutrifft, wurde zunächst untersucht, ob die verwendete Tumorzelllinie VEGF ausschüttet.

Es wurde eine Tagesreihe erstellt, welche die Abhängigkeit der VEGF-Expression von der Größenzunahme des Tumorsphäroids darstellt. Hierfür wurden wie unter 4.1.12 beschrieben, Tumorsphäroide in Spinnerflaschen generiert und von Tag 2 bis Tag 12 Proben entnommen. Nach Immunfärbung auf VEGF wurde dessen Expression durch Fluoreszenzmessung am CLSM bestimmt. Die Größenzunahme erfolgte mit Hilfe der dazugehörigen CLSM Software.

Es zeigte sich eine alters- und größenabhängige Steigerung der VEGF-Fluoreszenz. Da die Tumorsphäroide erst ab Tag 10 für die Herstellung der Kokulturen genutzt wurden, kann man davon ausgehen, dass EBs in Kokulturen dem Einfluss von VEGF ausgesetzt waren.

a)



b)

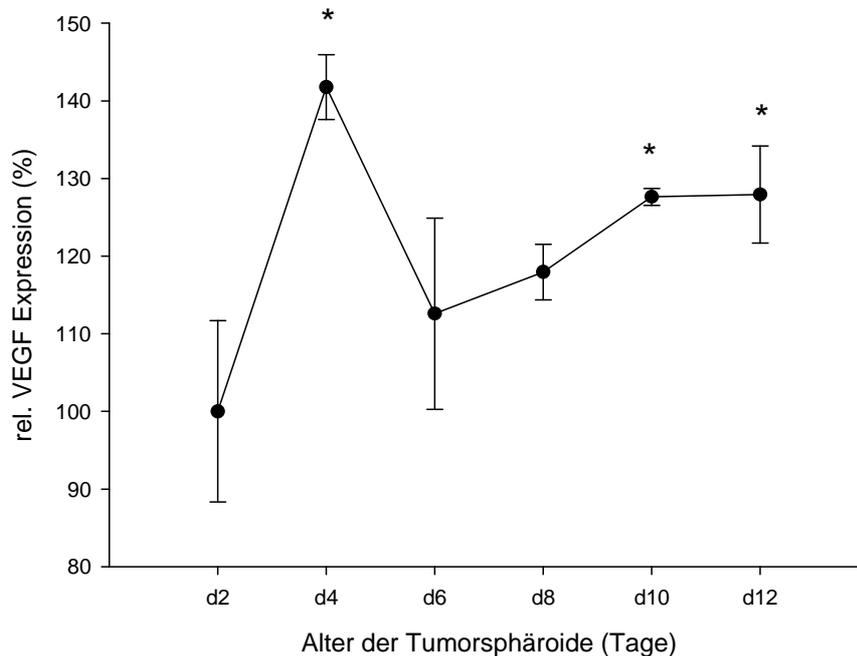


Abb. 5.3.1: Alters- und größenabhängiger Anstieg der VEGF-Expression in multizellulären Tumorsphäroiden. a) zeigt die altersabhängige Größenzunahme, **b)** die mit steigendem Alter erhöhte VEGF-Fluoreszenz der Sphäroide (n = 3, p < 0,05).

In dieser Arbeit wurde bereits auf die Bedeutung von VEGF für die Angiogenese hingewiesen. Nach bisherigem Kenntnisstand beginnt die endotheliale Differenzierung in den EBs vier Tage nach LIF-Entzug.

Um zu untersuchen, wie sich die VEGF-Expression in den EBs verhält, wurde auch hier eine Tagesreihe hergestellt. Es wurden wie im Kapitel 4.1.5 beschrieben EBs hergestellt und beginnend am Tag 2 der Differenzierung bis Tag 10 Proben aus den Spinnerflaschen entnommen. Die Probenentnahme erfolgte in 2-tägigem Abstand. Nach Immunfärbung für VEGF wurde die Fluoreszenz der Proben mit dem CLSM aufgenommen und mit der entsprechenden Software ausgewertet.

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz am Tag 4 der Differenzierung ($197,76 \pm 23,69\%$). Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass VEGF auch im EB-System eine kardinale Rolle im Einleiten der vaskulären Entwicklung spielt.

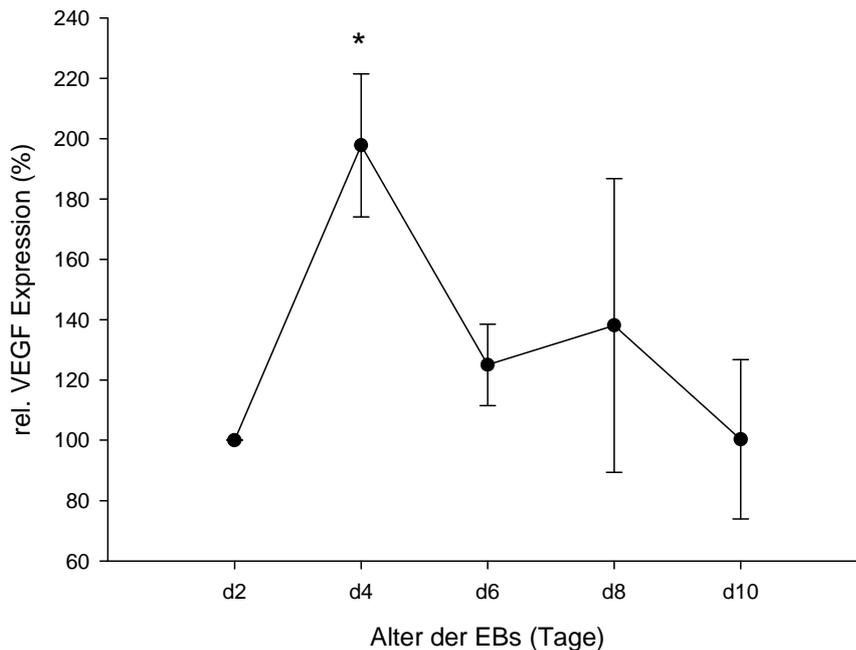


Abb. 5.3.2: Darstellung der altersabhängigen VEGF-Expression in EBs. Der Nachweis erfolgte über eine Immunfärbung für VEGF (n = 3, p < 0,05).

Im Körper erfolgt eine gerichtete Gefäßversorgung des Tumors. Um dies auch im *in vitro* System der Kokultur zu zeigen, wurden Kokulturen nach Entnahme aus dem hängenden Tropfen auf Petripermschalen ausplattiert. Das Ausplattieren ermöglicht den Zellen freie Richtungswahl des Wachstums, nicht nur auf das Tumorsphäroid hin. Es kann daher der Einfluss des Tumors auf die Richtungsweisung der neuen Gefäße sichtbar gemacht werden.

Am Tag 8 der Differenzierung der EBs (Kokultur ist 4 Tage alt) erfolgten die Fixierung der Proben und eine Immunfärbung für CD31. Die Bilder wurden mit dem CLSM aufgenommen und mit Hilfe des Image J Programms analysiert. Untersucht wurden hierbei die Winkel, in denen die Gefäße auf den Tumor zuwachsen, wobei ein 90° Winkel der direkten und somit kürzesten Strecke entsprach. Im Vergleich zu Kontroll-EBs bei denen keine Richtungspräferenz beobachtet werden konnte (radiär auswachsende endotheliale Strukturen), war bei EBs in Kokultur eine deutliche Tendenz des Wachstums der Gefäßstrukturen zum Tumorsphäroid hin sichtbar ($46 \pm 3\%$ aller gezählter Gefäße).

Des Weiteren sollte bewiesen werden, dass das gerichtete Wachstum von Gefäßen in unserem *in vitro* System VEGF-abhängig ist. Um dies zu erreichen, wurde VEGF exogen hinzugefügt

(50ng/ml) und die Winkelbestimmung, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Es zeigte sich eine Aufhebung des gerichteten Gefäßwachstums, was einen vom Tumor ausgehenden VEGF-Gradienten vermuten lässt.

In Abbildung 5.3.3 ist nochmals das Prinzip der Winkelmessung in repräsentativen graphischen Darstellungen gezeigt. In den Darstellungen befindet sich das EB im Zentrum und der Tumorsphäroid auf dem 90° Punkt. Die Linie zwischen Zentrum und 90° repräsentiert die kürzeste und somit direkte Strecke, die Endothel zurücklegen kann, um zum Tumor zu gelangen. Im Falle der Kontroll-EBs ist lediglich ein Schnitt durch die EBs gemacht worden, um eine Basis für die Winkelmessung zu haben.

Abbildung 5.3.4 zeigt die graphische Darstellung der Auswertung.

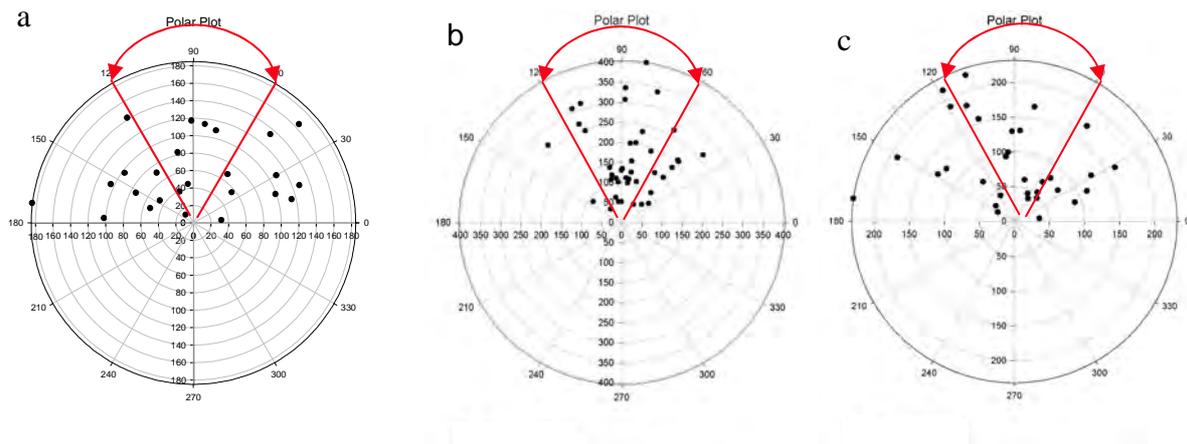


Abb. 5.3.3: Darstellung der Gefäßwinkelmessung im 360° Kreis. Der Tumor befindet sich an der 90° Position und der EB im Zentrum des Kreises. **a)** Die Gefäßsprössung im Kontroll-EB, wobei das Tumorsphäroid in der 90° Position in diesem Falle hypothetisch ist. **b)** Starke Beeinflussung des Gefäßwachstums durch den Tumor in einer Kokultur. **c)** Aufhebung des tumorgerichteten Gefäßwachstums in einer Kokultur die mit VEGF (50ng/ml) behandelt wurde.

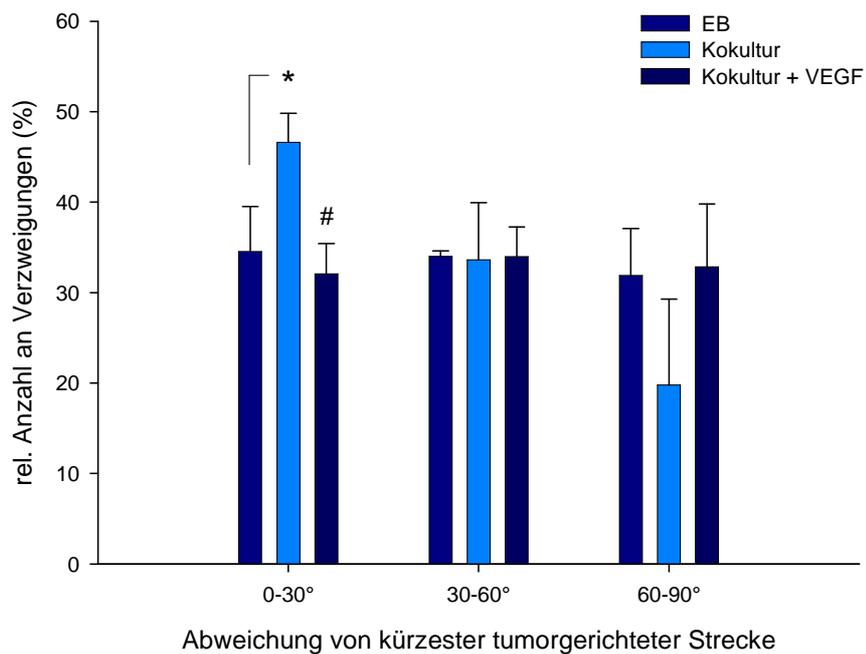


Abb. 5.3.4: Analyse des tumorgerichteten Gefäßwachstums in Kokulturen. Von allen ausgezählten Winkeln wurde der Anteil der von der kürzesten Strecke abweichenden Gefäße ermittelt und in der Graphik als wenig (0-30°), mittel (30-60°) und hoch (60-90°) abweichend dargestellt (n = 3, p < 0,05).

5.4 Einfluss der Kokultur auf die MDR-1 Expression

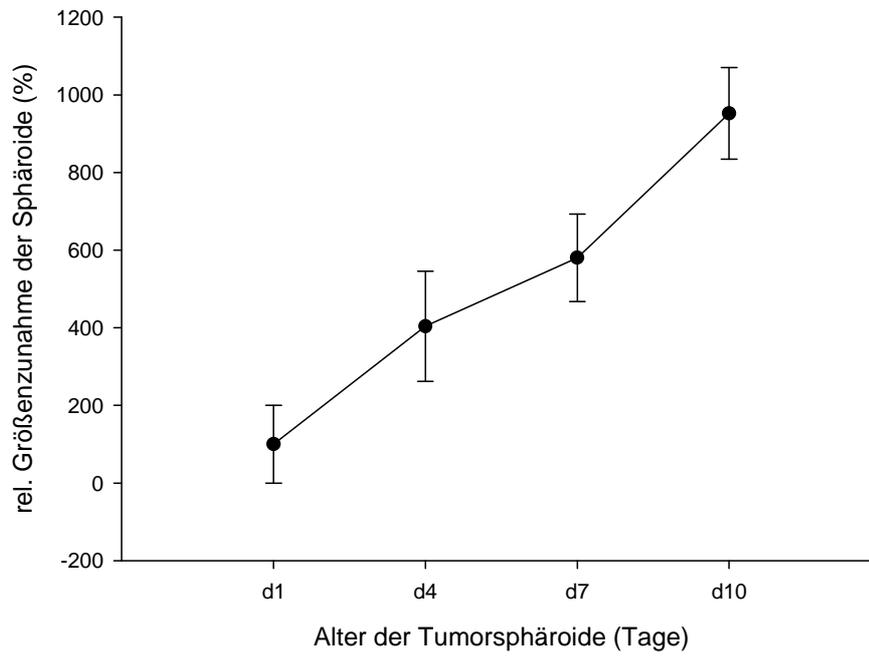
P-gp, das Genprodukt des MDR-Gens (MDR-1), wird in vielen Tumoren exprimiert und ist einer der Hauptverursacher von auftretenden Zytostatikaresistenzen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die MDR-1 Expression mit der Größe des Tumorsphäroids zusammenhängt und ob die Versorgung des Tumors mit Gefäßen durch eine Kokultivierung mit EBs einen Einfluss auf die MDR-1 Expression hat.

Für diese Fragestellung wurde eine MDR-1-GFP-transfizierte Tumorzelllinie (KB 3.1) verwendet, die es ermöglicht, die MDR-1 Expression durch Fluoreszenzmessungen zu untersuchen (Petritz *et al.*, 2004).

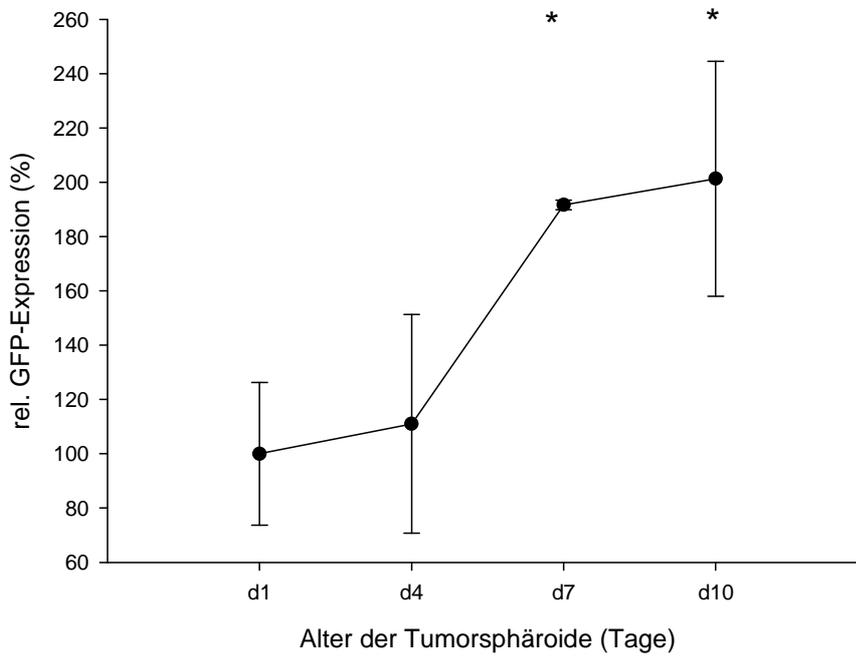
Zuerst wurde eine altersabhängige Größenmessung der KB 3.1 Tumorsphäroide durchgeführt, um festzustellen, ob MDR-1 größen- und altersabhängig exprimiert wird. Hierfür wurden Tumorsphäroide 13 Tage lang in Spinnerflaschen kultiviert und alle 3 Tage Proben entnommen. Die Größenmessung erfolgte mit der dem Mikroskop zugehörigen Leica Software. Die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des CLSM und der zugehörigen Software.

Es zeigte sich eine kontinuierliche Größenzunahme mit steigendem Alter der Kultur sowie eine Zunahme der GFP-Fluoreszenz in älteren Sphäroiden. Um zu verifizieren, dass diese Fluoreszenz in der Tat von der Expression des P-gp herführt, wurde zusätzlich eine Immunfärbung für P-gp durchgeführt. Beide Messungen zeigten einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz ab Tag 7.

a)



b)



c)

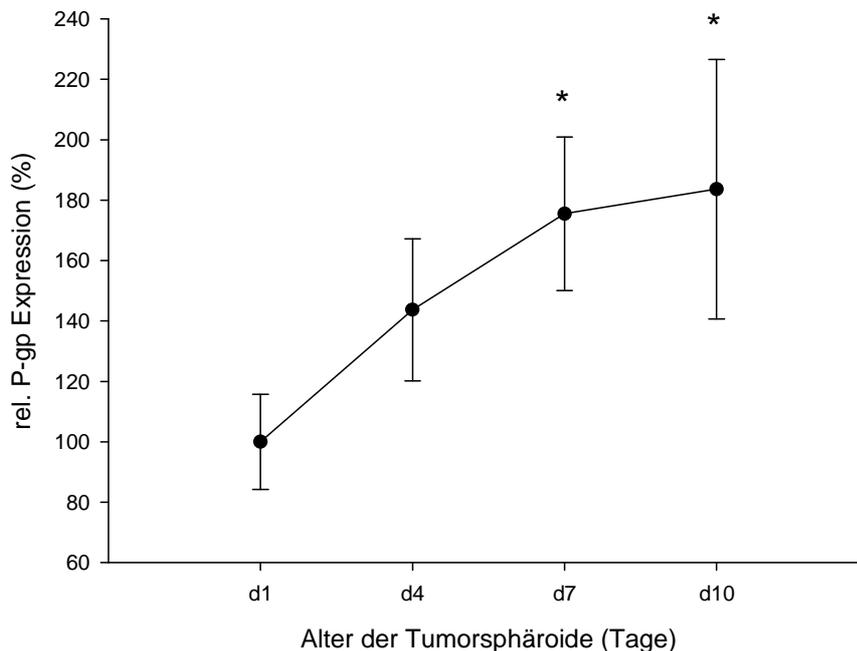


Abb. 5.4.1: Altersabhängige a) Größenzunahme der Tumorsphäroide, b) Zunahme der GFP-Fluoreszenz und c) der P-gp Immunfluoreszenz. ($n \geq 3$, $p < 0.05$).

Um den Einfluss der Gefäßversorgung auf die Expression von P-gp zu untersuchen, wurden Kokulturen mit 10 Tage alten KB 3.1 Tumorsphäroiden wie unter 4.1.13 beschrieben, hergestellt. Am Tag 8 der embryonalen Differenzierung wurde die GFP-Fluoreszenz der Proben untersucht und mit der CLSM Software ausgewertet.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte MDR-1 Expression von sich in Kokultur befindenden Tumoren im Vergleich zu avaskulären Tumorsphäroiden.

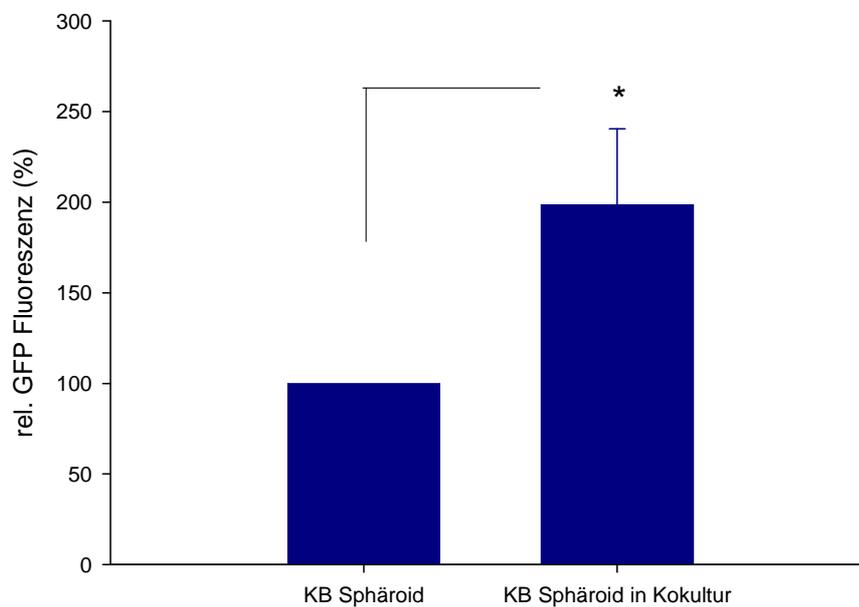
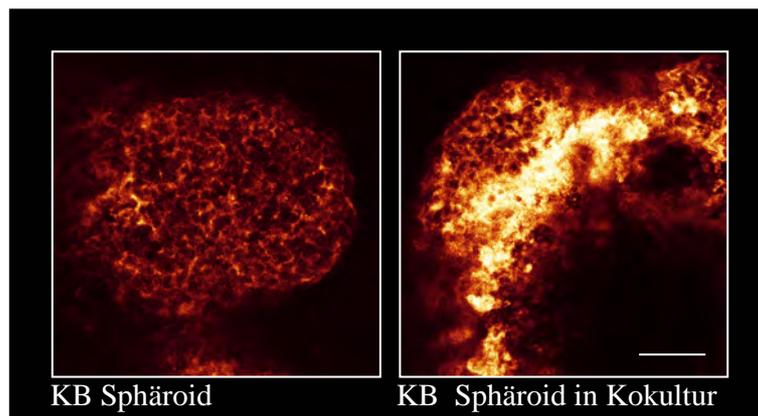


Abb. 5.4.4: Auswirkung der Kokultivierung von Tumorsphäroiden mit EBs auf die MDR-1 Expression. Dargestellt sind repräsentative Bilder der GFP-Fluoreszenz in einzelnen KB Sphäroiden und KB Sphäroiden in Kokultur, sowie die graphische Darstellung der Auswertung. Der Größenbalken entspricht 300 μ m. (n = 3, p < 0,05).

5.5 Effekt von Tyrosinkinase Rezeptor Inhibitoren auf die Vaskularisierung der EBs und der Tumorsphäroide in Kokultur

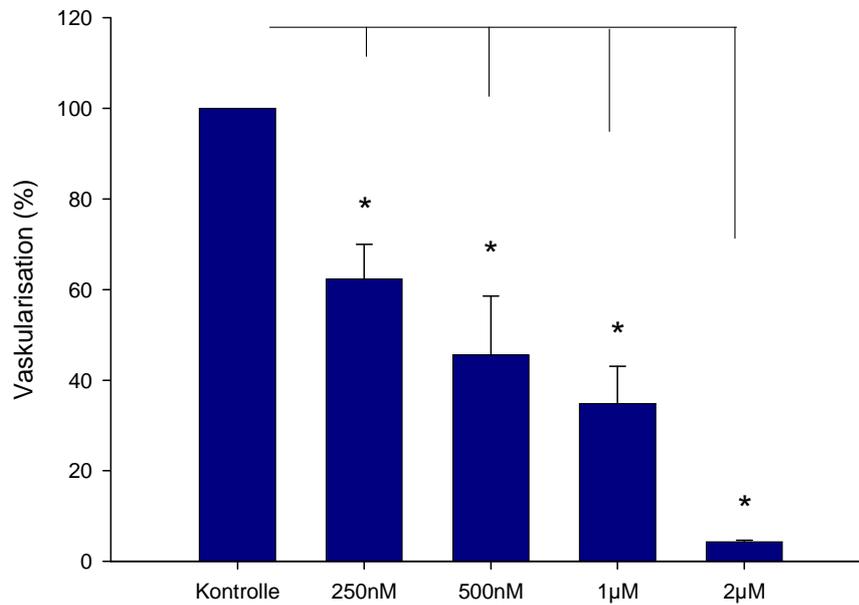
Nachdem gezeigt werden konnte, dass VEGF einen Einfluss auf die Tumor-induzierte Angiogenese hat, sollte der antiangiogene Effekt von Tyrosinkinase Rezeptor Inhibitoren untersucht werden. Es wurden zwei Substanzen gewählt: SU5614 als Inhibitor von VEGF und PDGF Rezeptor Kinasen und ZM323881 als Inhibitor, der spezifisch für den VEGF Rezeptor 2 ist. Da während der Durchführung der Versuche die letztere Substanz durch Patentrechte geschützt worden ist und für längere Zeit vom Markt genommen wurde, konnte dieser Inhibitor nicht für alle Experimente genutzt werden.

Zunächst wurden optimale Arbeitskonzentrationen beider Substanzen bestimmt.

Die EBs wurden von Tag 4 bis Tag 8 der Differenzierung mit SU5614 (250 nM, 500 nM, 1 μ M und 2 μ M) bzw. ZM323881 (2.5n M, 5 nM und 10 nM) behandelt und unter normalen Kulturbedingungen weiterkultiviert. Der Kontrollgruppe wurde die gleiche Menge an DMSO (Lösungsmittel für SU5614 und ZM323881) wie den behandelten Gruppen zugesetzt, um einen unspezifischen Effekt des Lösungsmittels in der Auswertung zu vermeiden.

Als optimale Arbeitskonzentrationen wurden für SU5614 500 nM und für ZM323881 10 nM ermittelt. Die Vaskularisation der EBs betrug bei diesen Konzentrationen $45,48 \pm 13,08\%$ (SU5614) und $33,5 \pm 10,7\%$ verglichen zur Vaskularisierung der Kontrolle.

a)



b)

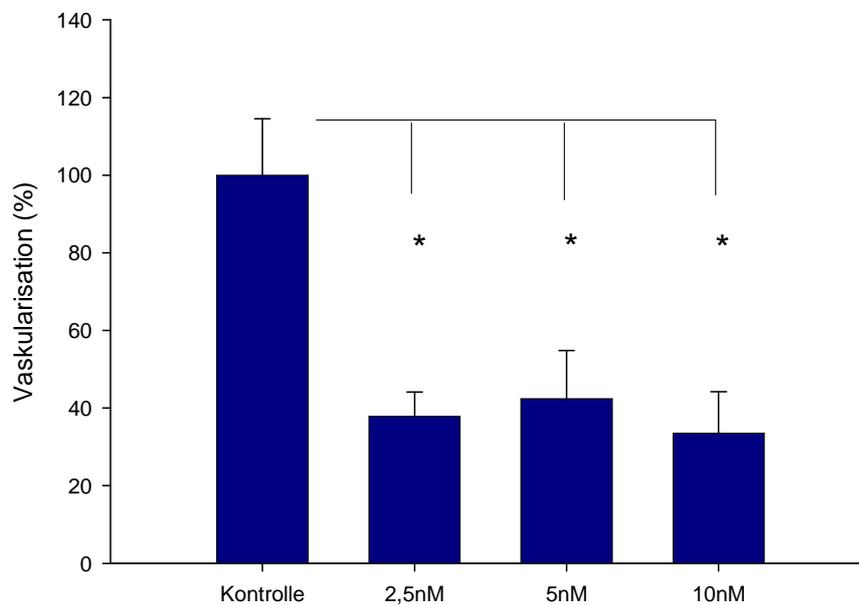


Abb. 5.5.1: Konzentrationsabhängiger Effekt der Tyrosinkinase Inhibitoren auf die Vaskularisierung der EBs. a) Konzentrationsabhängige Inhibition der Vaskulogenese durch SU5614. b) Konzentrationsabhängige Inhibition der Vaskulogenese durch ZM323881 (n = 3, p < 0,05).

Daraufhin sollte der anti-angiogene Effekt dieser Substanzen im Kokulturmodell in Bezug auf die Zahl der vaskularisierten Tumore hin näher untersucht werden.

Die Kokulturen wurden wie in Kapitel 4.1.13 hergestellt, wobei die Inhibitoren SU5614 (500 nM) und ZM323881 (10 nM) bereits in den hängenden Tropfen gegeben wurden. Nach Entnahme der Kokulturen aus dem hängendem Tropfen setzte sich die Behandlung täglich fort bis zum Tag 8 der Differenzierung. Nach diesem Zeitraum wurden die Kokulturen fixiert und für CD31 immungefärbt.

Es wurde der antiangiogene Effekt in Bezug auf die Zahl der vaskularisierten Tumore untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme von ca. 60% (SU5614: $43 \pm 31\%$, ZM323881: $44,3 \pm 28\%$ vaskularisierter Tumorsphäride in Kokultur), verglichen mit der Anzahl vaskularisierter Tumore in der Kontrollgruppe.

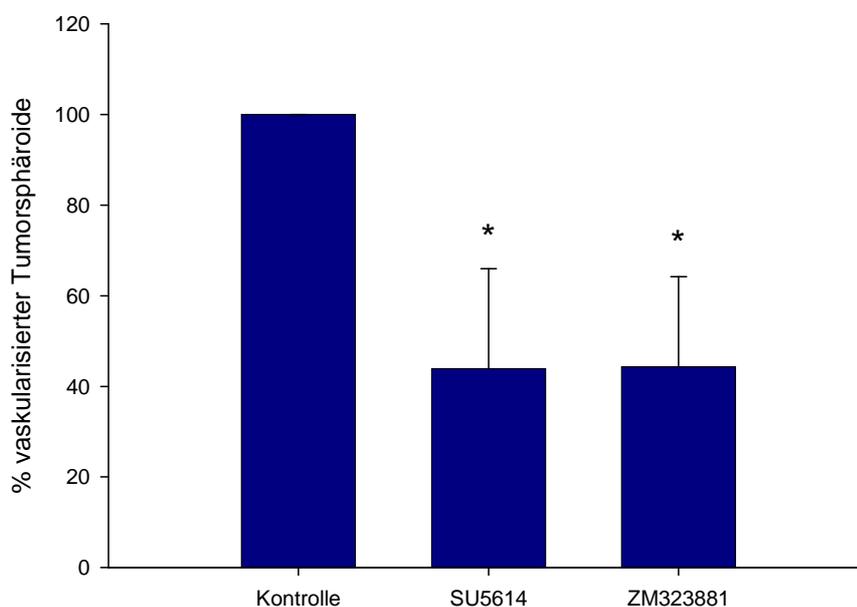
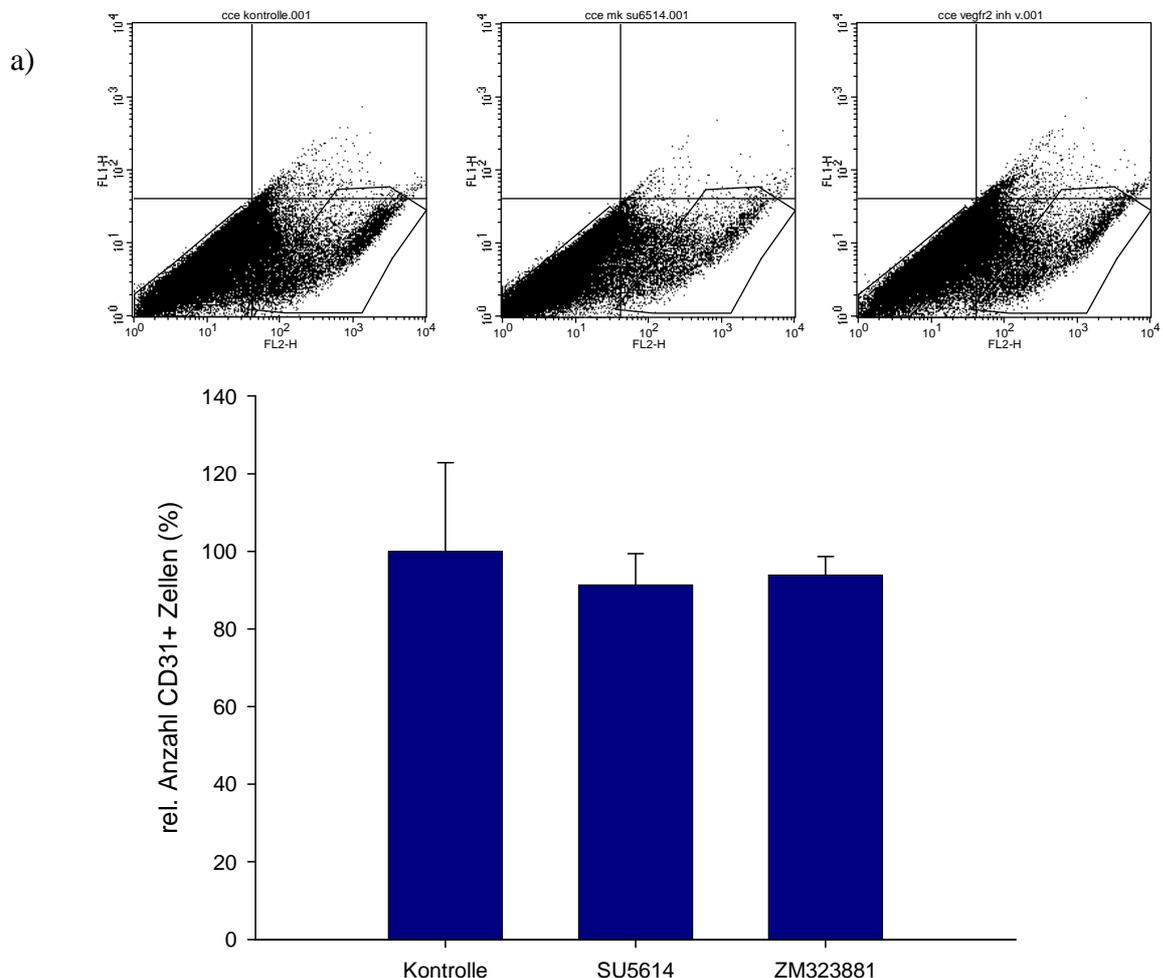


Abb. 5.5.3: Effekt von SU5614 (500nM) und ZM323881 (10nM) auf die relative Anzahl gefäßversorgter Tumore in Konfrontationskulturen. Der Kontrolle wurde das Lösungsmittel der Substanzen (DMSO) zugesetzt. Am Tag 8 der EBs (Tag 4 der Kokultur) wurden die Proben fixiert und mit einer Immunfärbung für CD31 der Anteil an vaskularisierten Tumoren festgestellt (n=4, p< 0,05).

5.6 FACS Messung zum Nachweis und Quantifizierung vaskulärer Zellen nach Behandlung mit Tyrosinkinase Inhibitoren

Während der Bestimmung der optimalen Arbeitskonzentrationen von SU5614 und ZM323881 wurden Zellareale mit hoher CD31 Expression beobachtet, die keine tubulären oder netzwerkartigen Strukturen aufwiesen. Da bezogen auf die Verzweigungsrate die Vaskularisierung der EBs abnahm, stellte sich die Frage, ob auch die endotheliale Zellzahl von der Behandlung betroffen war. Um dies zu klären, erfolgte eine FACS Analyse, die Aufschluss über Veränderungen in der Zellzahl von Endothelzellen nach Behandlung mit den anti-angiogenen Substanzen geben sollte. Die Probenaufbereitung erfolgte nach dem unter 4.11 beschriebenen Protokoll. Untersucht wurde neben den Anteil an CD31 auch der Anteil VECadherin (CD144) positiver Zellen.

Interessanterweise hat sich der Anteil an CD31⁺ bzw. CD144⁺ Zellen durch die Behandlung nicht signifikant verändert.



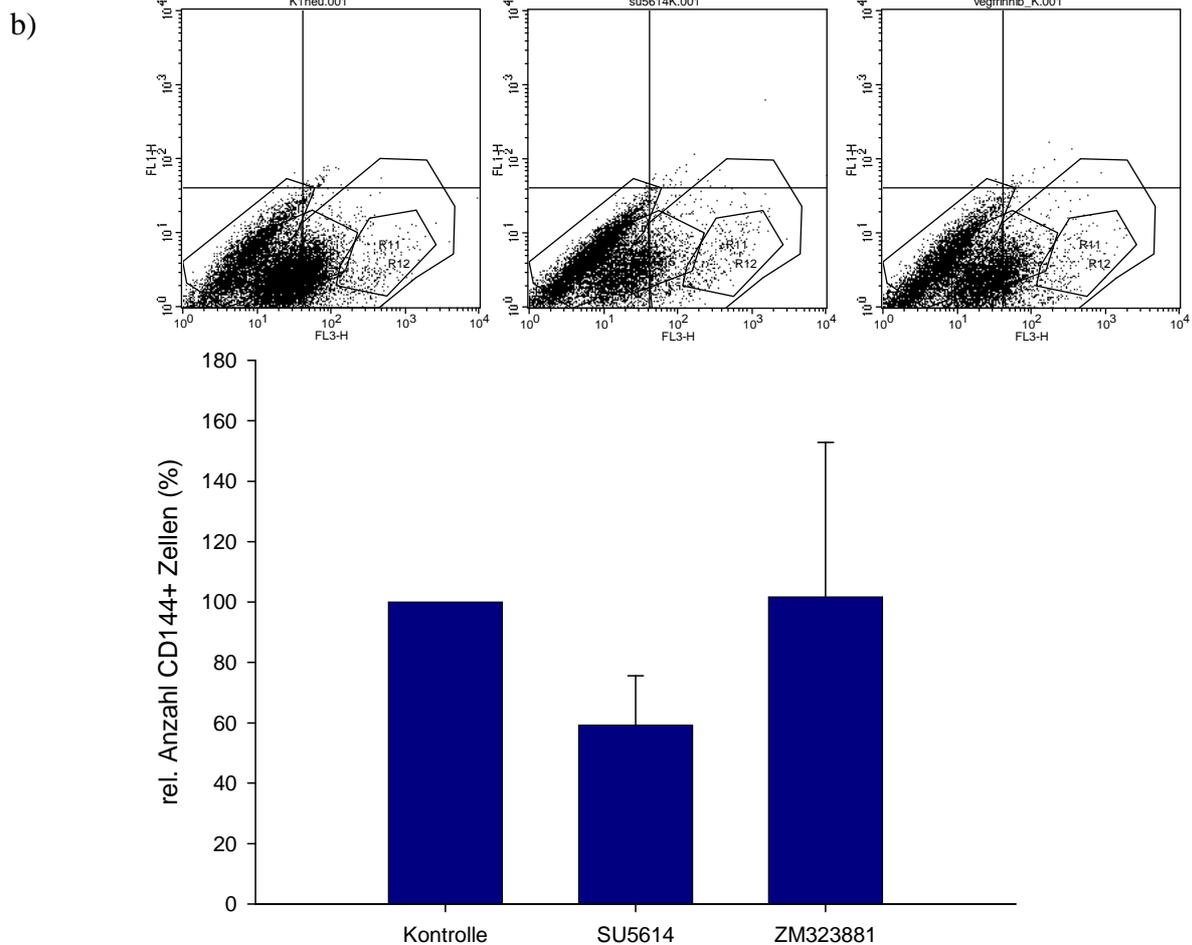


Abb. 5.6.: FACS Analyse zur Quantifizierung vaskulärer Zellen nach Behandlung mit **SU5614** und **ZM323881**. **a)** Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots der Kontrolle, der SU5614 und der ZM323881 behandelten EBs (von links nach rechts) und die graphische Darstellung der Auswertung von CD31⁺ Zellen. (n=6, p > 0,05). **b)** Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots der Kontrolle, der SU5614 und der ZM323881 behandelten EBs (von links nach rechts) und die graphische Darstellung der Auswertung von CD144⁺ Zellen. (n=5, p > 0,05).

5.7 Effekte von (-)-Thalidomid auf die Vaskularisierung von EBs und Tumorsphäroiden in Kokultur

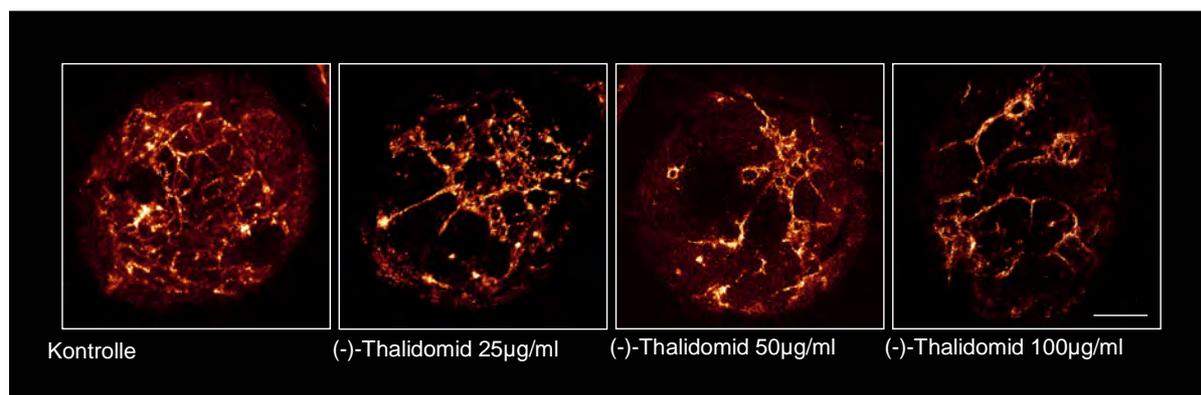
Es wurde bereits nachgewiesen, dass Thalidomid antiangiogen wirkt (Sauer *et al.*, 2000) und unter anderem den VEGF Spiegel im Serum senken kann (Li *et al.*, 2003; Kuwabara *et al.*, 2008). Da wir in unserem System die Beobachtung gemacht haben, dass VEGF eine entscheidende Rolle in der Tumorinduzierten Angiogenese spielt, wurde auch diese Substanz im EB Modell auf ihre antiangiogenen Eigenschaften und bezüglich der Auswirkung, die sie auf die Anzahl gefäßversorgter Tumore in Konfrontationskulturen hat, untersucht.

Da Thalidomid als Razemat vorliegt, jedoch nur die (-) Isoform für den antiangiogenen Effekt verantwortlich ist, wurde eben diese Isoform für die Behandlung der EBs und Kokulturen verwendet. Der Versuch wurde wie folgt durchgeführt: EBs wurden vom Tag 4 bis Tag 8 der Differenzierung mit (-)-Thalidomid (25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml) behandelt und unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Der Kontrollgruppe wurde die gleiche Menge an DMF (Lösungsmittel für Thalidomid) wie den behandelten Gruppen zugesetzt, um unspezifische Effekte des Lösungsmittels auszuschließen.

Auf den repräsentativen Bildern in Abbildung 5.7.1 a) ist zu erkennen, dass es, wie bei den vorherigen antiangiogenen Substanzen (SU5614 und ZM323881), zu einer Abnahme der Verzweigungsstellen im vaskulären Netzwerk kommt.

Als optimale Arbeitskonzentration für Thalidomid wurden nach der Auswertung 50 µg/ml gewählt. Bei dieser Konzentration betrug die Vaskularisation der EBs $29,9 \pm 9\%$ bezogen auf die Vaskularisation der Kontrolle, was dem maximalen inhibitorischen Effekt der getesteten Arbeitskonzentrationen entsprach ($47,2 \pm 9,8\%$ Vaskularisation bei 25 µg/ml und $46,6 \pm 8,36\%$ bei 100 µg/ml Thalidomid).

a)



b)

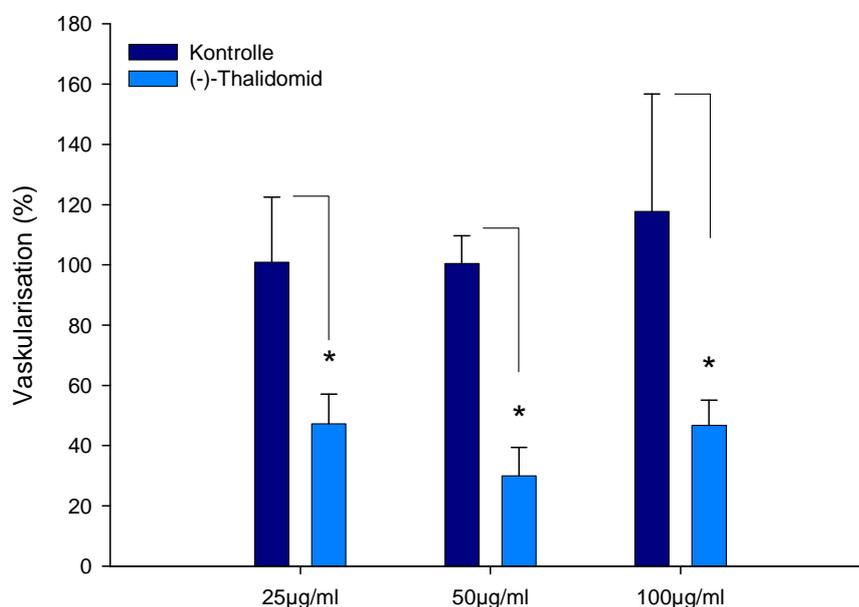


Abb. 5.7.1: a) **Repräsentative Bilder von EBs nach (-)-Thalidomidbehandlung.** Gezeigt wird die Immunfärbung für CD31. Der Balken entspricht 300µm. b) **Konzentrationsabhängiger Effekt von (-)-Thalidomid auf die Vaskularisierung der EBs.** Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Verzweigungsstellen, die ins Verhältnis zur Größe der EBs gebracht wurden. (n = 4, p < 0,05).

Nachdem die optimale Arbeitskonzentration bestimmt worden war, erfolgte im nächsten Schritt die Behandlung der Konfrontationskulturen mit 50 µg/ml (-)-Thalidomid. Hierbei wurden die Kokulturen, wie bereits beschrieben, hergestellt und kultiviert. Am Tag 8 der Differenzierung der EBs wurden sie fixiert und gegen CD31 immungefärbt. Es erfolgte eine Auswertung des relativen Anteils an gefäßversorgten Tumoren, wobei deren Anzahl in thalidomidbehandelten Kokulturen signifikant verringert war, in bezug auf unbehandelte

Kokulturen (0% vaskularisierter Tumorspheroide an den Tagen 4 und 6 der Differenzierung, $14,8 \pm 9,96\%$ am Tag 8 und $27,33 \pm 4,04\%$ am Tag 10). Siehe auch den zeitlichen Verlauf der Vaskularisierung von Tumorsphäroiden in Abbildung 5.1.

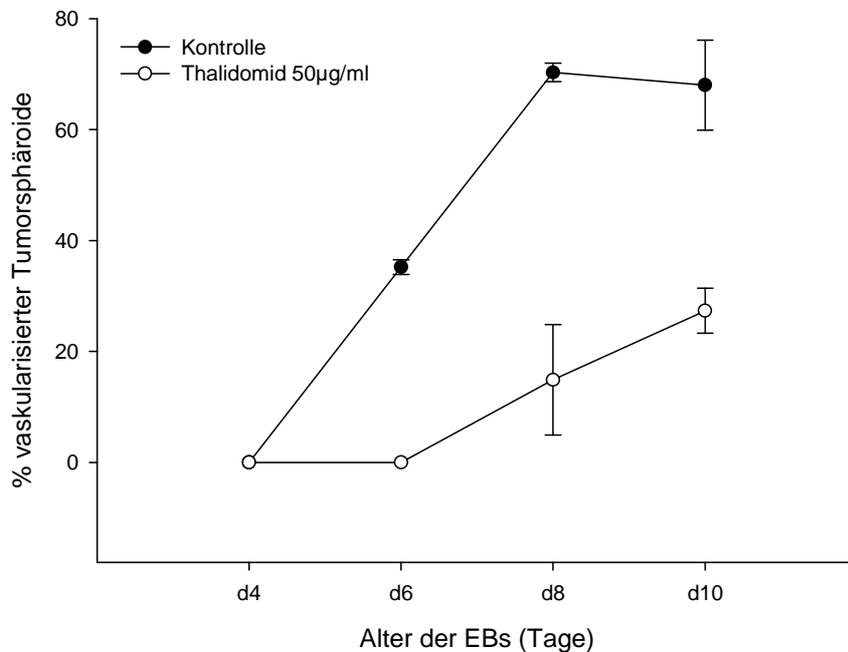
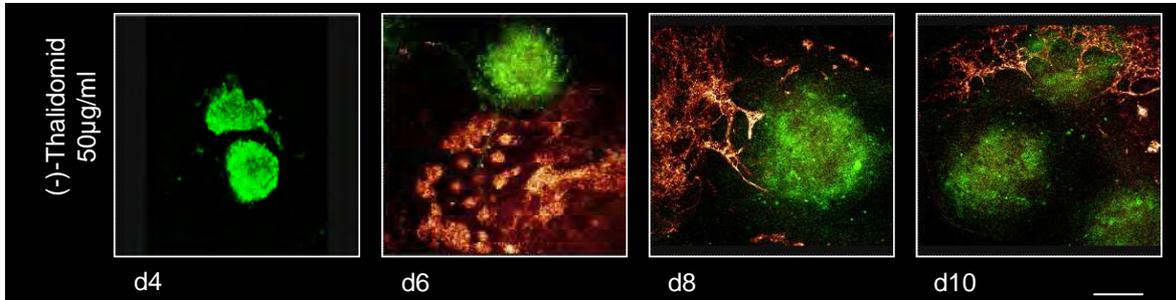


Abb. 5.7.2: Thalidomidabhängige Reduktion der Vaskularisierung von Tumorsphäroiden in Kokulturen. Tumorsphäroide wurden vorher mit CMFDA markiert, um sie vom embryonalen Gewebe zu diskriminieren. Es zeigt sich eine deutlich verringerte Vaskularisierung der Sphäroide verglichen zu unbehandelten Kokulturen. Die Balkengröße beträgt $300\mu\text{m}$. ($n = 3$, $p < 0,05$)

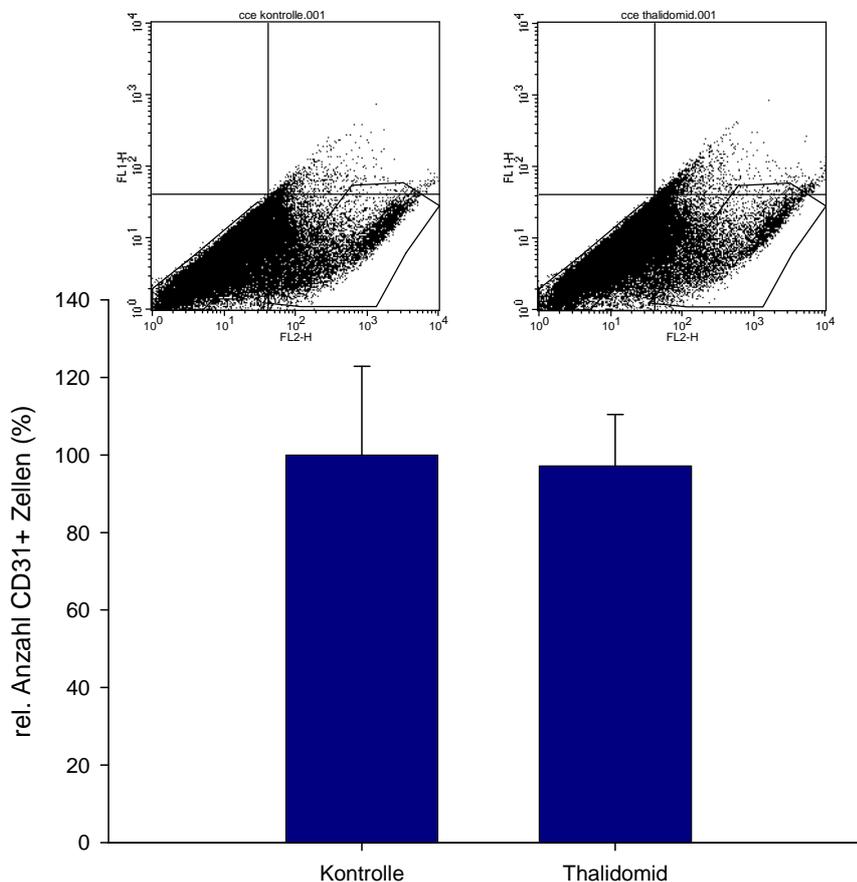
5.8 FACS Messung zum Nachweis und Quantifizierung vaskulärer Zellen nach Behandlung der EBs und Kokulturen mit (-)-Thalidomid

Wie bereits bei den Behandlungen mit Tyrosinkinase Inhibitoren, wurde auch bei Thalidomid-behandelten EBs eine FACS Analyse durchgeführt, um den Anteil an CD31⁺ bzw. CD144⁺ Zellen zu ermitteln. Die EBs wurden hierfür von Tag 4 bis Tag 8 mit Thalidomid inkubiert und unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Am Tag 8 wurden die Proben mit Kollagenase B (1mg/ml) verdaut und mittels Immunfärbung der Anteil an CD31⁺ und CD144⁺ Zellen bestimmt.

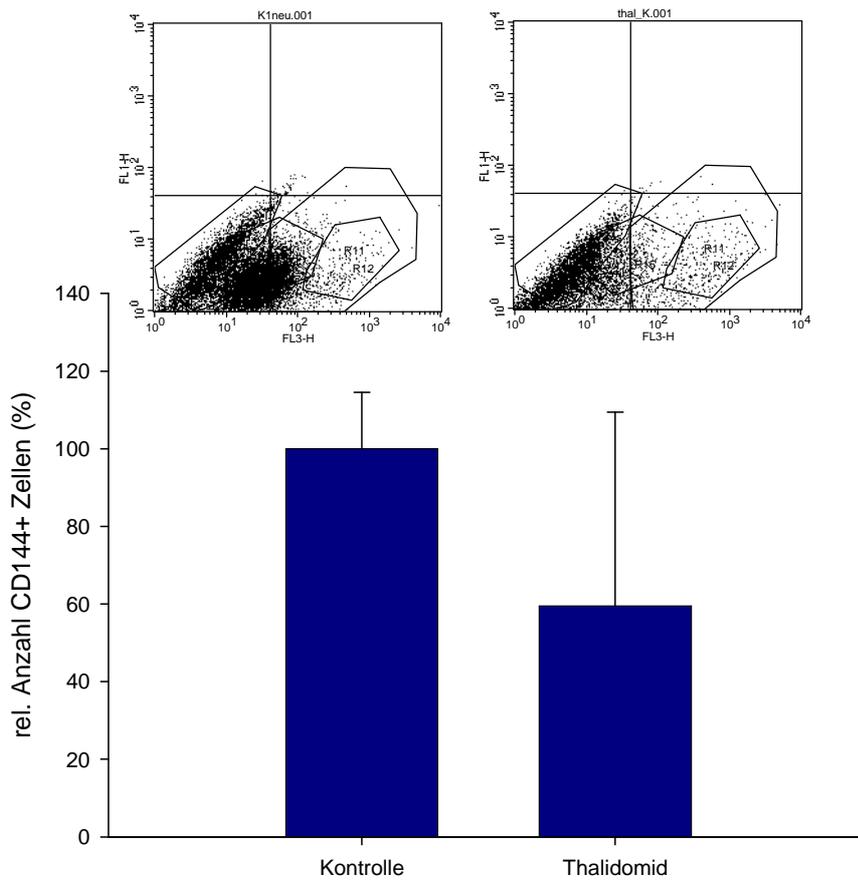
Auch nach Behandlung der EBs mit Thalidomid konnte kein Unterschied in der Anzahl an CD31⁺ Zellen zwischen behandelten und unbehandelten EBs festgestellt werden (Abb. 5.9-a). Im Falle von CD144 (VE-Cadherin) zeigte sich eine Tendenz zur Abnahme der CD144⁺ Zellzahl, jedoch war die Streuung zwischen den Versuchen zu hoch und es konnte keine Signifikanz erreicht werden (Abb. 5.9-b).

Ebenfalls unverändert verhielt sich die Anzahl an CD31⁺ Zellen in Kokultur nach Thalidomidbehandlung (Abb. 5.9-c).

a)



b)



c)

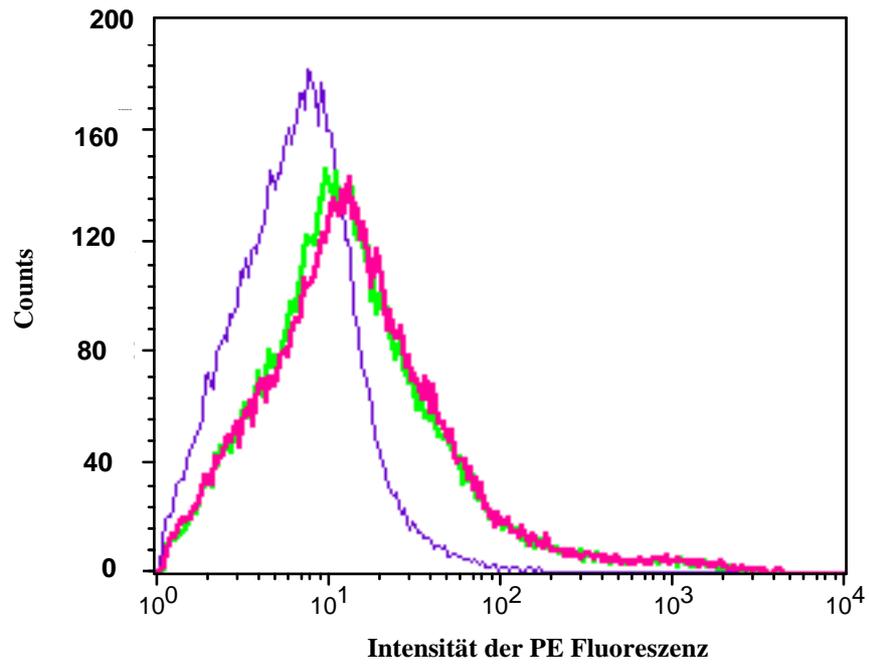


Abb. 5.8: FACS Analyse der CD31⁺ und CD144⁺ Zellen nach Behandlung mit Thalidomid. Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots der Kontrolle und der (-)-Thalidomid behandelten EBs, sowie die jeweilige graphische Auswertung. **a)** CD31⁺ Zellen in EBs nach Thalidomidbehandlung. (n=5, p > 0,05) **b)** CD144⁺ Zellen in EBs nach Behandlung mit Thalidomid. (n=10, p > 0,05) **c)** CD31⁺ Zellen in Kokultur nach Behandlung mit (-)-Thalidomid. Dargestellt ist ein repräsentativer Histogramm Plot, wobei lila die IgG Kontrolle darstellt, grün die unbehandelten und rot die mit Thalidomid behandelten Proben (n = 3, p > 0,05).

5.9 Einfluss der (-)-Thalidomidbehandlung auf die kardiale Differenzierung

Die Entstehung von kontraktilen Bereichen im EB Modell ist schon öfter beobachtet worden (Hescheler *et al.*, 1997), da die Zellen ebenso zu Kardiomyozyten wie zu anderen Zelltypen differenzieren. Diese Differenzierung tritt spontan auf und kann durch Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen verhindert oder gefördert werden.

Während der embryonalen Entwicklung entsteht das kardiovaskuläre System aus gemeinsamen Flk-1 und Brachyury exprimierenden progenitor Zellen, was auch im ES-Zell Modell nachgewiesen werden konnte (Kattman *et al.*, 2006).

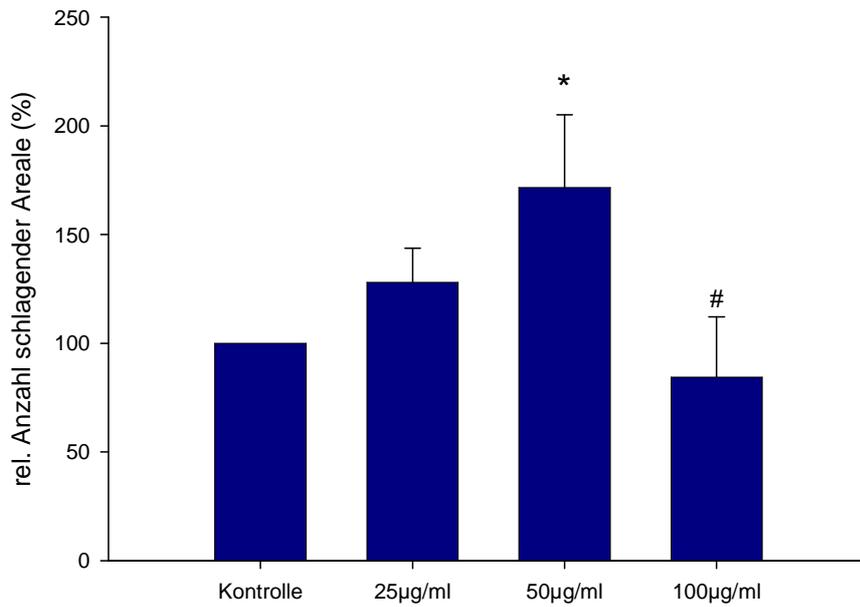
Während der (-)-Thalidomidbehandlung wurde ein positiver Effekt auf die Anzahl der kontrahierenden Areale in ausplattierten EBs beobachtet. Diese Stimulation erwies sich als konzentrationsabhängig, (Abb. 5.11-a) und hatte eine maximale Wirkung bei 50 µg/ml Thalidomid (171,65 ± 33,39% schlagender Areale verglichen zur Anzahl schlagender Areale der Kontrolle).

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden Immunfärbungen für kardiales α-Aktinin durchgeführt. Hierfür wurden 4 Tage alte EBs ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von (-)-Thalidomid (25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml) bis Tag 10 behandelt. Am Tag 10 wurden die EBs fixiert und für das kardiale α-Aktinin immungefärbt. Die Proben wurden lasermikroskopisch untersucht und die α-Aktinin positive Fläche bestimmt. Das Ergebnis wurde ins Verhältnis zur Größe der ausplattierten EBs gesetzt (Abb. 5.11-b und-c).

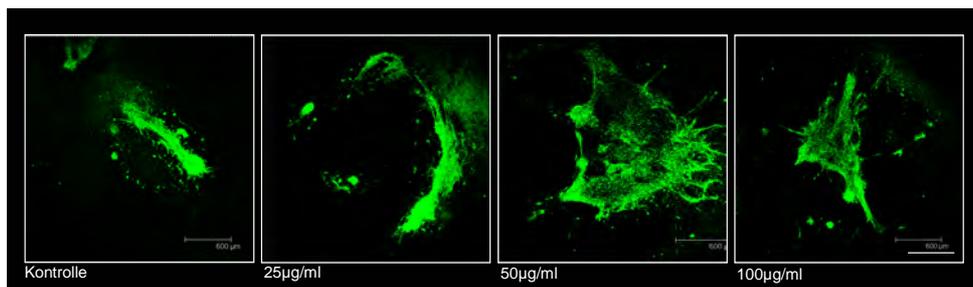
Der Effekt auf die Größe α-Aktinin positiver Areale ist ebenfalls konzentrationsabhängig und zeigte ein Maximum bei 50µg/ml (-)-Thalidomid (154,8 ± 23,7% bezogen auf den Wert der Kontrolle).

5. Ergebnisse

a)



b)



c)

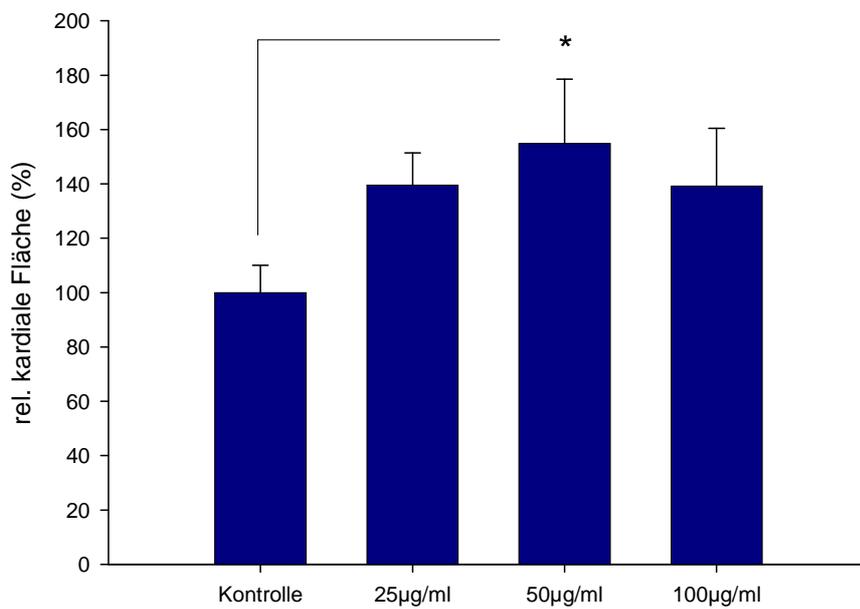


Abb. 5.9: Konzentrationsabhängiger Effekt von (-)-Thalidomid auf die Differenzierung von Kardiomyozyten. **a)** Am Tag 10 wurden die schlagenden Areale ausgezählt und das Ergebnis ins Verhältnis zu der Anzahl an ausplattierten EBs gesetzt. ($n=4$, $p < 0,05$). **b)** Danach wurden die EBs fixiert und für das kardiale α -Aktinin immungefärbt. Dargestellt sind repräsentative Bilder. Der Größenbalken beträgt $600\mu\text{m}$. **c)** Die α -Aktinin gefärbten Flächen wurden vermessen und ins Verhältnis zur Größe des EBs gesetzt. Dargestellt ist das graphische Ergebnis der Auswertung. ($n = 4$, $p < 0,05$).

5.10 Nachweis kardialer Gene und deren Proteinexpression

Im EB finden, wie bereits erwähnt, unterschiedliche Differenzierungsprozesse statt. So entstehen während der kardialen Differenzierung spezialisierte Kardiomyozyten. Diese exprimieren bestimmte kardiale Gene und im Anschluß an deren Transkription und Translation, spezifische Proteine. Je nach Protein lassen sich somit Schrittmacherzellen, atriale und ventrikuläre Zellen im EB Modell nachweisen (siehe auch Kapitel 1.3).

Im vorherigen Kapitel konnte ein pro-kardiogener Effekt von (-)-Thalidomid nachgewiesen werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt genauer untersucht, inwieweit (-)-Thalidomid die Entstehung spezieller Herzzellen beeinflusst.

Hierfür wurden die EBs, wie im Kapitel 5.9 erläutert, behandelt und am Tag 8 Proben für die RT-PCR gesammelt. Diese wurden, wie unter 4.10 beschrieben, aufbereitet und das Ergebnis mit der entsprechenden Software analysiert.

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der intrazellulären mRNA-Spiegel aller analysierten Gene in den mit (-)-Thalidomid ($50\mu\text{g/ml}$) behandelten Proben. So stieg der mRNA-Gehalt des Schrittmachermarkers HCN4 auf $216 \pm 16\%$, während die beiden atrialen Marker MLC1a und MLC2a $240 \pm 13\%$ und $220 \pm 21\%$ des Kontrollwertes erreichten. Der ventrikuläre Marker MLC2v zeigte mit $177 \pm 12\%$ ebenfalls eine signifikant erhöhte Transkription. Abbildung 5.10.1 zeigt die graphische Auswertung der durchgeführten RT-PCRs.

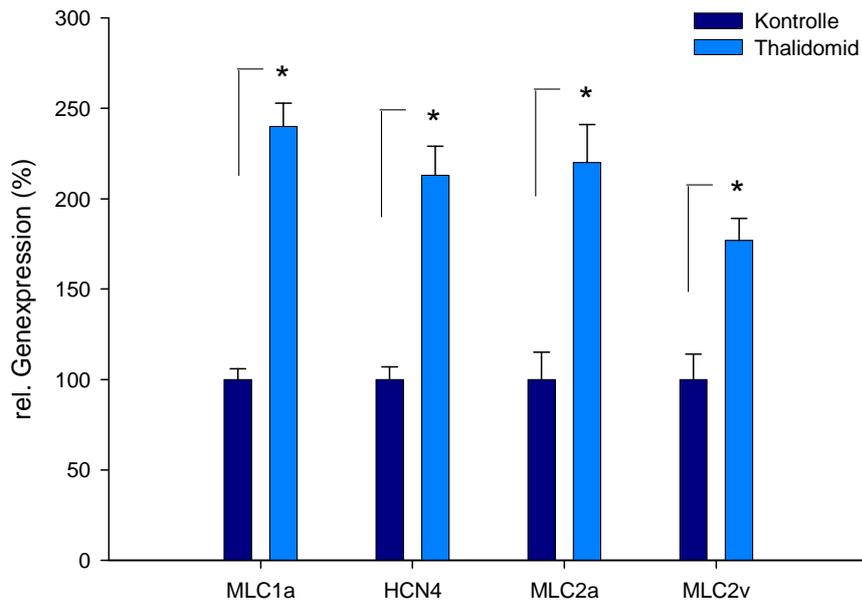
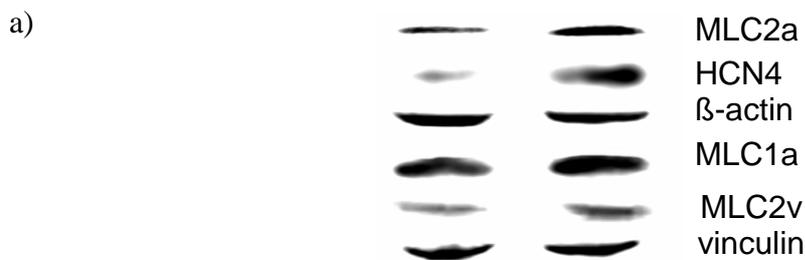


Abb. 5.10.1: mRNA Expression herzspezifischer Gene. Vier Tage alte EBs wurden ausplattiert und mit 50 µg/ml (-)-Thalidomid bis Tag 8 behandelt. Am Tag 8 erfolgte die Probenaufbereitung für die RT-PCR. (n = 3, p < 0,001)

Um neben einer gesteigerten Transkription auch eine erfolgreiche Translation nachzuweisen, wurde die Proteinexpression der eben erwähnten kardialen Marker untersucht. Hierfür benutzte man die im Kapitel 4.9 beschriebene Western Blot Methode.

Nach der Auswertung konnte auch auf Proteinebene eine signifikant erhöhte Expression der Marker MLC1a ($161 \pm 35\%$), HCN4 ($151 \pm 25\%$) und MLC2a ($145 \pm 21\%$) nachgewiesen werden. Die Expression von MLC2v ($121 \pm 14\%$) war zwar erhöht, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($145 \pm 25\%$).



b)

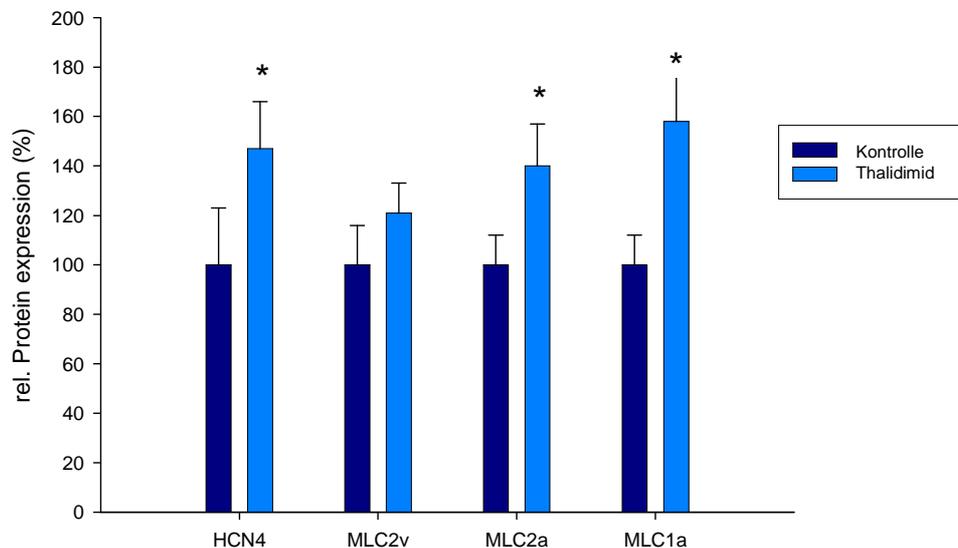


Abb. 5.10.2: Proteinexpression herzspezifischer Gene. a) Repräsentative Blots der kardialen Marker. Die jeweils erste Bande zeigt die Kontrolle, die zweite zeigt Thalidomidbehandelte Proben. b) Graphische Darstellung der Auswertung (n = 3, p < 0,05).

5.11 Einfluss von (-)-Thalidomid auf die intrazelluläre ROS Bildung

Der genaue Wirkungsmechanismus von Thalidomid ist noch nicht geklärt.

So ist Thalidomid ein potentes Teratogen für den Menschen und das Kaninchen, wohingegen die meisten anderen Spezies keine teratogenen Effekte aufweisen. Die Sensitivität einiger Spezies auf Thalidomid steht vermutlich im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Glutathiondepletion. So haben Thalidomid-sensitive Spezies, wie z.B. Kaninchen, eine erhöhte Glutathiondepletion im Vergleich zu Thalidomid-resistenten Spezies, wie z.B. Ratten (Knobloch *et al.*, 2008).

Es wirkt auch anti-angiogen durch Senkung der VEGF Spiegel im Überstand von in vitro kultivierten humanen Endothelzellen (Komorowski *et al.*, 2006); zudem senkt es die VEGF und bFGF Expression in humanen Cisplatin resistenten Lungentumorzellen (Li *et al.*, 2003).

Applikationen von Thalidomid führen in der adulten Erythropoese zur gesteigerten p38 MAPK Signalübertragung und Histon H4 Acetylierung vermittelt durch erhöhte ROS Produktion (Aerbajinai *et al.*, 2007).

In EBs führt ein Anstieg von ROS nach Thalidomidapplikation zu einer gestörten vaskulären Differenzierung (Sauer *et al.*, 2000).

In dieser Studie konnte der inhibitorische Einfluss von Thalidomid auf die vaskuläre Differenzierung bei gleichzeitiger Stimulation der kardialen Differenzierung gezeigt werden. Da es, wie bereits erwähnt, gemeinsame Progenitorzellen für die kardiovaskuläre Entwicklung gibt, stellte sich die Frage nach der Signalvermittlung dieser beiden Differenzierungsprozesse.

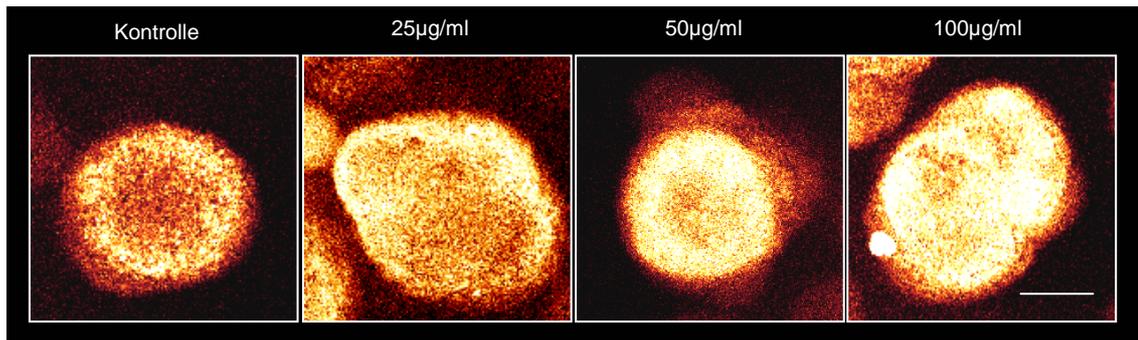
Unter die bedeutendsten Signalvermittler auf zellulärer Ebene fallen die ROS (siehe auch Kapitel 1.6). Eine gesteigerte ROS Produktion hat zudem einen stimulierenden Einfluss auf die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und Gene (Buggisch *et al.*, 2007), wogegen zu hohe Konzentrationen an freien Radikalen toxisch wirken (Sauer *et al.*, 2000).

Da in der Literatur die Thalidomid-vermittelte ROS Produktion unter Verwendung des Razemates beschrieben wurde, sollte geprüft werden, ob auch die (-)-Form einen Anstieg von ROS bewirken kann.

Hierfür wurden 4 Tage alte EBs zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen von (-)-Thalidomid inkubiert und deren relative DCF Fluoreszenz nach 4 und nach 24 h gemessen. Das Protokoll der DCF Messung wurde unter 4.6 beschrieben.

Es zeigte sich ein signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg des zellulären ROS Spiegels bereits nach 4 h bei allen eingesetzten Thalidomidkonzentrationen ($140,17 \pm 19\%$ Steigerung bei $25 \mu\text{g/ml}$, $155,45 \pm 5,5\%$ bei $50 \mu\text{g/ml}$, $165,13 \pm 11,44\%$ bei $100 \mu\text{g/ml}$). Nach 24 h war der intrazelluläre Spiegel an ROS noch erhöht, jedoch konnte nur bei $50 \mu\text{g/ml}$ Thalidomid eine statistische Signifikanz erreicht werden ($177 \pm 37,36\%$ Steigerung im Vergleich zur Kontrolle).

a)



b)

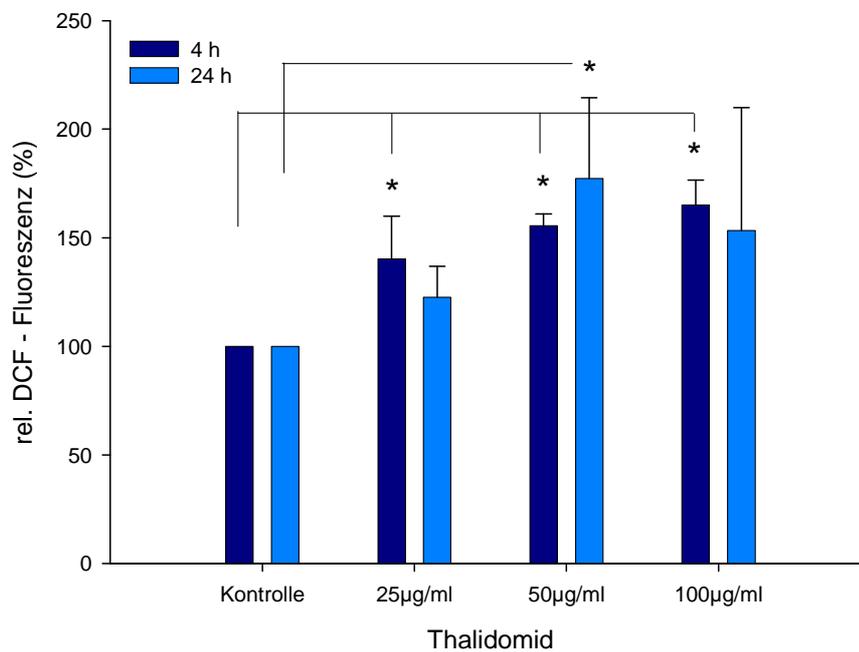


Abb. 5.11: Konzentrationsabhängiger Effekt von (-)-Thalidomid auf die Produktion von ROS. **a)** zeigt repräsentative Fluoreszenzbilder der DCF-DA Färbung. Die Balkengröße entspricht 150µm. **b)** Zeigt die graphische Darstellung der relativen DCF Fluoreszenz. (n = 4, p < 0,05).

5.12 Bedeutung von freien Radikalen für die Thalidomid-induzierte Kardiomyogenese

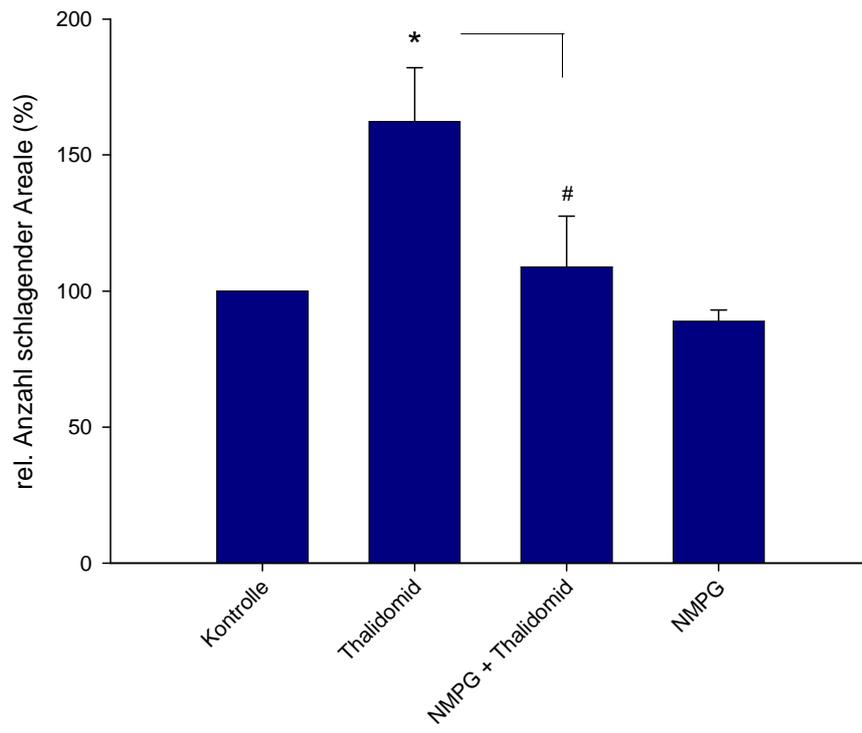
Wie bereits erwähnt, sind Hydroxylradikale bedeutend für die kardiale Entwicklung (Buggisch *et al.*, 2007). Dies wurde nun auch im Zusammenhang mit der Thalidomid-induzierten Kardiomyogenese untersucht.

Um eine Aussage über diesen Zusammenhang treffen zu können, wurde die Kardiomyogenese der thalidomidbehandelten Proben mit der von Proben verglichen, bei denen freie Radikale durch Applikation von Radikalfängern (NMPG 100 μ M) verringert, bzw. neutralisiert wurden. Dafür wurden die EBs, wie bereits mehrfach beschrieben, ab Tag 4 bis Tag 10 der Differenzierung mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Im Fall der Koapplikation mit dem Radikalfänger wurde dieser 2 h vor Zugabe von (-)-Thalidomid (50 μ g/ml) auf die Proben gegeben. Am Tag 10 wurden die schlagenden Areale der EBs ausgezählt, diese danach fixiert und auf α -Aktinin immungefärbt.

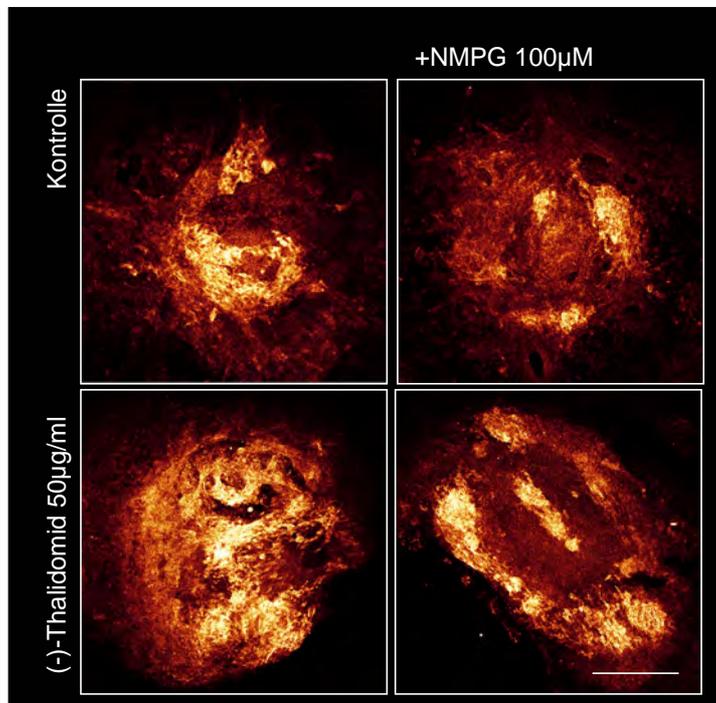
Es konnte eine deutliche Abhängigkeit der Thalidomid-induzierten kardialen Differenzierung von der Anwesenheit von freien Radikalen nachgewiesen werden, da eine Koapplikation von Thalidomid und NMPG zu einer reduzierten Differenzierung sowohl in Bezug auf die Anzahl schlagender Areale (108,9 \pm 18,5% NMPG + Thalidomid, 162,2 \pm 19% Thalidomid), als auch in Bezug auf die Größe der α -Aktiningefärbten Flächen führte (143,8 \pm 6,6% NMPG + Thalidomid, 171,1 \pm 29% Thalidomid) .

5. Ergebnisse

a)



b)



c)

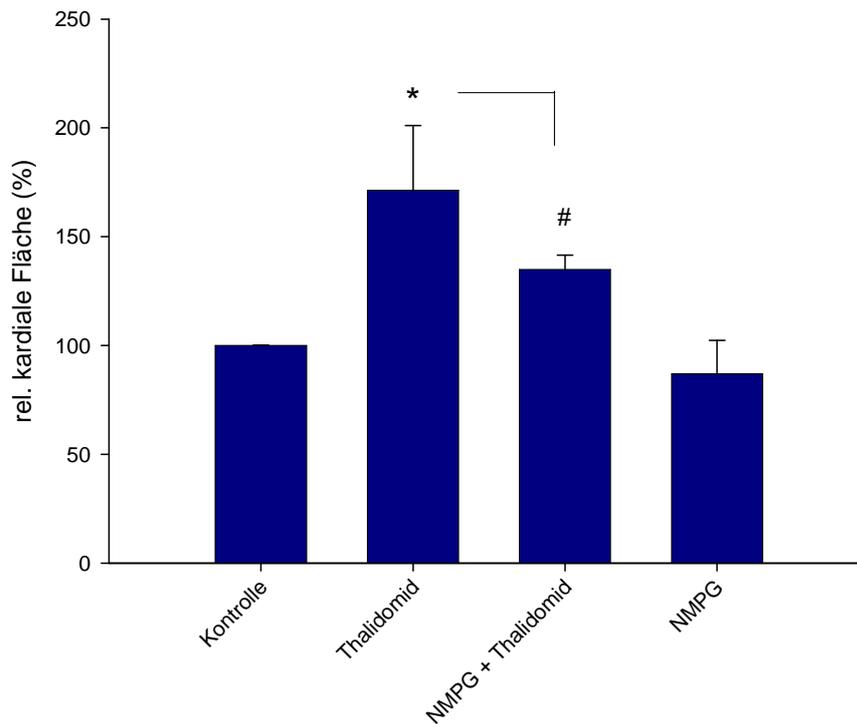


Abb. 5.12: Einfluss von Radikalfängern auf die Thalidomid-induzierte Kardiomyogenese. a) Dargestellt ist der Einfluss von NMPG auf die Zahl schlagender Areale ($n = 3$, $p < 0,05$). b) Repräsentative Bilder α -Aktinin positiver Areale. Der Größenbalken beträgt $300\mu\text{m}$. c) Graphische Auswertung der Größe α -Aktinin positiver Areale ($n = 4$, $p < 0,05$)

5.13 NADPH-Oxidase und Mitochondrien als Quelle der (-)-Thalidomid bedingten ROS Entstehung

Nachdem bewiesen wurde, dass durch Zugabe von (-)-Thalidomid ROS entstehen, interessierte die Herkunft dieser Sauerstoffspezies. Die Zelle hat zwei Hauptproduzenten von ROS, zum einem die NADPH-Oxidase und zum anderen die Mitochondrien. Um nun zu entschlüsseln, woher das gebildete ROS kommt, wurden die Proben mit dem NADPH-Oxidase spezifischen Inhibitor VAS2870 ($50\ \mu\text{M}$) und dem Inhibitor des Komplex I der Mitochondrien Rotenon ($2,5\ \mu\text{M}$) 2 h vor der Zugabe von (-)-Thalidomid ($50\ \mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach weiteren 4 h wurde die DCF Fluoreszenz der Proben und der damit korrelierende ROS Gehalt bestimmt.

Wie in den Abbildungen 5.13.1 und 5.13.2 zu erkennen ist, konnte der (-)-Thalidomid vermittelte ROS Anstieg durch Zugabe von VAS2870 und Rotenon vollständig inhibiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die (-)-Thalidomid induzierte ROS Bildung sowohl von der NADPH-Oxidase als auch von Mitochondrien - insbesondere vom Komplex I, abhängig ist.

Zudem senkt VAS2870 auch die endogene ROS Produktion signifikant unter das Niveau der Kontrolle ($30,6 \pm 14,3\%$, bezogen auf den Wert der Kontrolle), wogegen die Applikation von Rotenon keinen Einfluss auf die endogene ROS Entstehung zu haben scheint ($100,4 \pm 16,7\%$, bezogen auf den Wert der Kontrolle). Es kann daher geschlussfolgert werden, dass an der endogenen ROS Generierung vorwiegend die NADPH-Oxidase beteiligt ist, jedoch nicht die Mitochondrien.

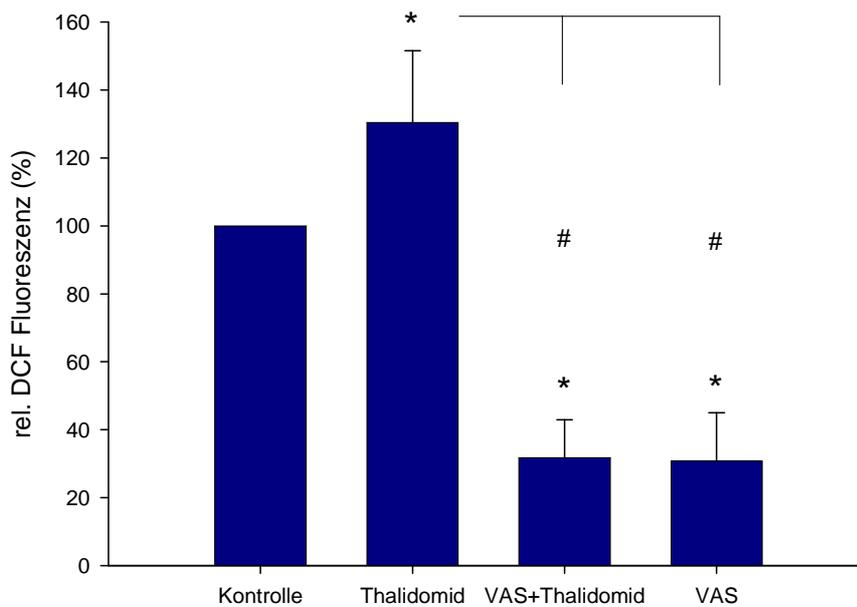


Abb. 5.13.1: Inhibition der Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten durch Hemmung der NADPH-Oxidase. Die ROS Produktion wurde als relative DCF Fluoreszenz graphisch dargestellt. (n = 4, p < 0,05).

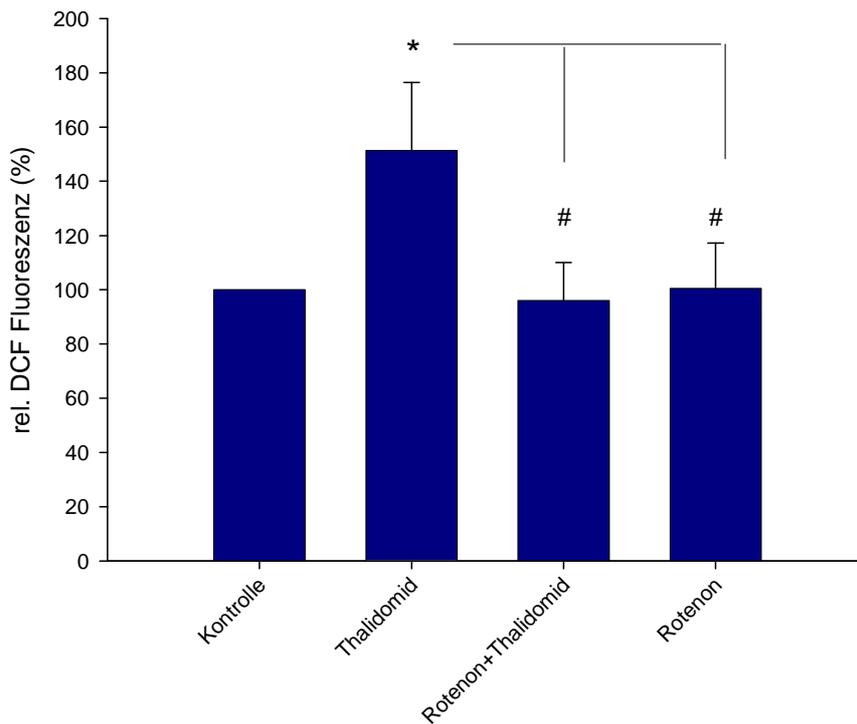


Abb. 5.13.2: Inhibition der ROS Produktion durch Hemmung des mitochondrialen Komplex I. Die ROS Produktion wurde als relative DCF Fluoreszenz graphisch dargestellt. (n = 3, p < 0,05).

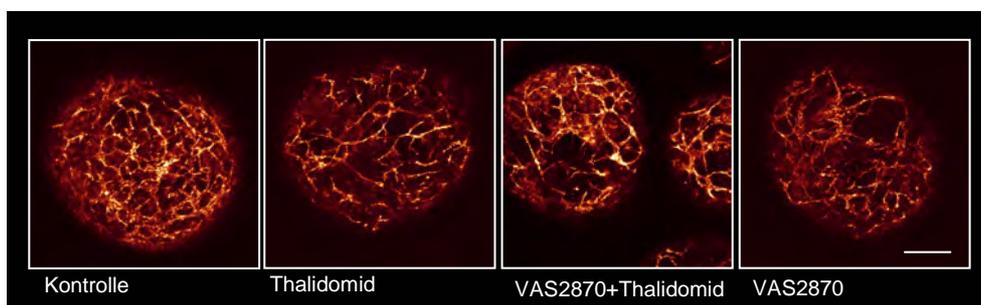
5.14 Einfluss der Koapplikation des NADPH-Oxidase Inhibitors VAS2870 und (-)-Thalidomid auf die Vaskularisierung

Nachdem die Abhängigkeit der Thalidomid-induzierten ROS Produktion von der NADPH-Oxidase bestätigt wurde, sollte der Einfluss dieses Enzymkomplexes auf die Vaskularisierung dargestellt werden. Hierfür wurde der Versuchsansatz, wie bereits bei der Ermittlung der NADPH-abhängigen ROS Bildung im Kapitel 5.13 beschrieben, durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die EBs bis Tag 8 weiterkultiviert wurden. Daraufhin erfolgte eine Immunfärbung für CD31 und die Bestimmung des Vaskularisierungsgrades.

Wie die Abbildungen 5.14 a) und b) zeigen, ist bei allen drei Behandlungen die Vaskularisation der EBs im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt, was darauf schließen lässt,

das sich sowohl zu hohe als auch zu geringe ROS Spiegel negativ auf die Gefäßentwicklung auswirken.

a)



b)

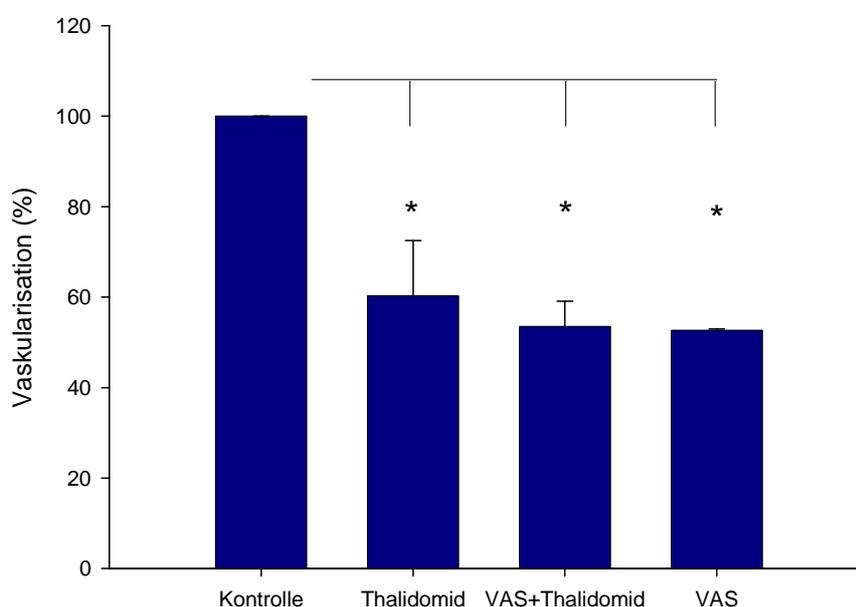


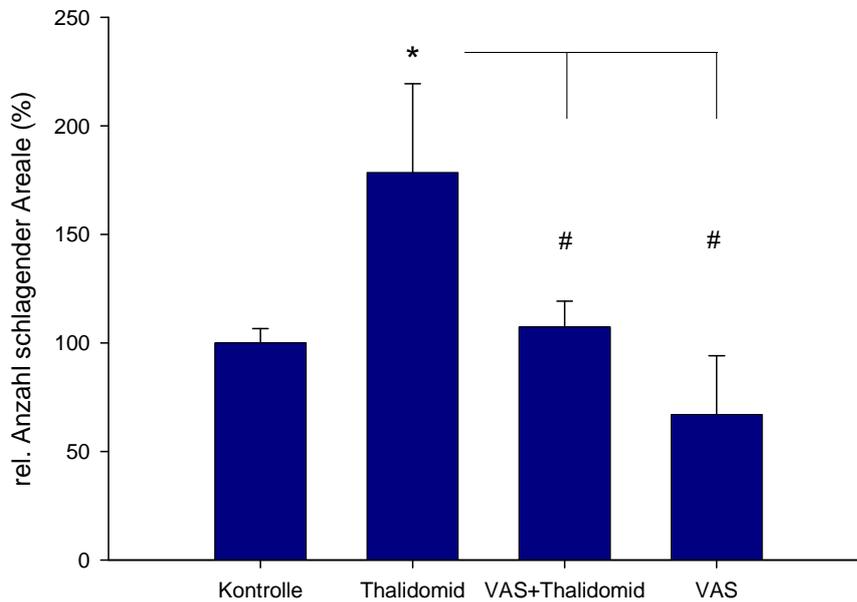
Abb. 5.14: Einfluss von NADPH-Oxidase Inhibition auf die Vaskularisierung von EBs. Vier Tage alte EBs wurden 2 h vor Thalidomidzugabe mit dem NADPH-Oxidase Inhibitor VAS2870 (50 μ M) inkubiert und bis Tag 8 weiterkultiviert. **a)** Repräsentative Bilder der CD31 Färbung. Die Balkengröße beträgt 300 μ m. **b)** Die Vaskularisation wurde mit einer Immunfärbung für CD31 dargestellt und die Anzahl an Verzweigungspunkten im Verhältnis zur Größe der EBs bestimmt. (n = 3, , p < 0,05).

5.15 Einfluss des NADPH-Oxidase Inhibitors VAS2870 auf die Thalidomid-induzierte kardiale Differenzierung

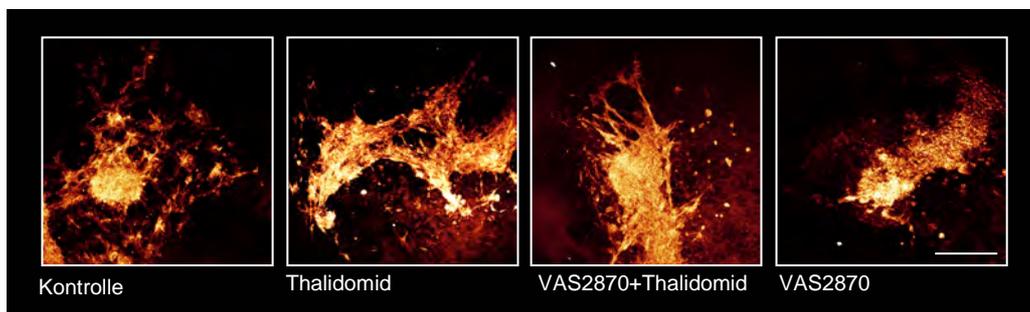
Ergänzend zu den bisherigen Beobachtungen des Einflusses von (-)-Thalidomid auf die Entstehung von Kardiomyozyten, sollte auch der Zusammenhang zwischen kardialer

Differenzierung und dem durch (-)-Thalidomid erhöhten ROS Gehalt der EBs näher untersucht werden. Ähnlich dem unter 5.14 beschriebenen Versuchsansatz erfolgte auch hier zuerst eine zweistündige Vorinkubation der Proben mit dem Inhibitor VAS2870 (50 μ M), bevor (-)-Thalidomid (50 μ g/ml) zugegeben wurde. Die Proben wurden bis Tag 10 weiterkultiviert, wonach die EBs auf das Vorhandensein kontrahierender Areale untersucht wurden. Anschließend wurden die Proben auf α -Aktinin immungefärbt und die Fläche dieser Areale bestimmt.

a)



b)



c)

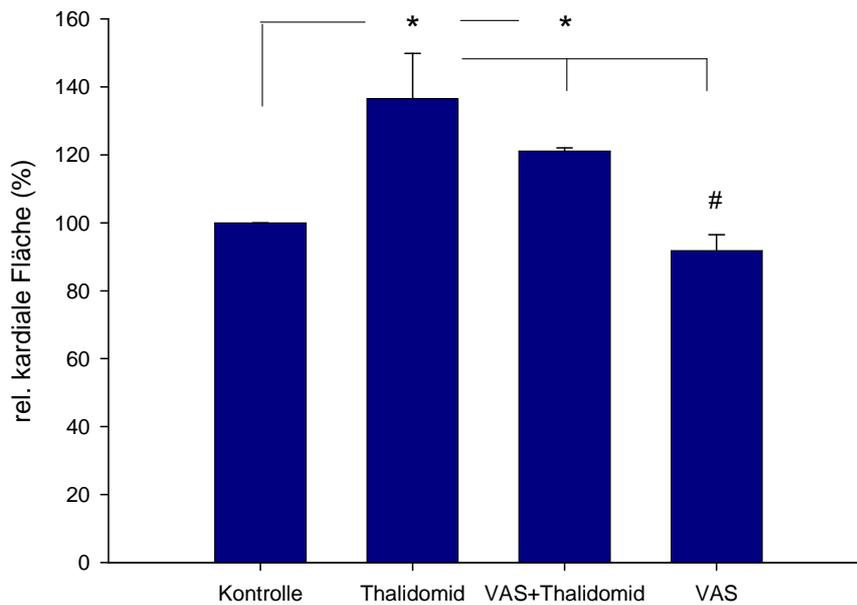


Abb. 5.15: Einfluss von NADPH-Oxidase Inhibition auf die kardiale Differenzierung. a) Untersucht wurde die Anzahl schlagender Areale im Verhältnis zur Anzahl an ausplattierten EBs. b) Repräsentative Bilder der immungefärbten kardialen Areale. Balkengröße entspricht 300µm. c) Graphische Darstellung der Größenverhältnisse kardialer Areale. (n = 3, p < 0,05).

Wie in den Abbildungen 5.15-a und -c sichtbar, erkennt man einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer funktionellen NADPH-Oxidase und der Anzahl schlagender Areale. So wird deren Anzahl durch Koinkubation von VAS1870 und Thalidomid signifikant verringert ($107,2 \pm 12\%$) in Bezug auf die durch Thalidomid stimulierte Probe ($178,5 \pm 40,8\%$). Die Größe der α -Aktinin-positiven Flächen nimmt durch Koinkubation mit VAS2870 tendenziell ab ($121,15 \pm 0,9\%$), diese Abnahme ist jedoch im Bezug auf die thalidomidbehandelte Probe nicht signifikant ($136,4 \pm 13\%$).

5.16 Expression der NOX-Isoformen nach Thalidomidbehandlung

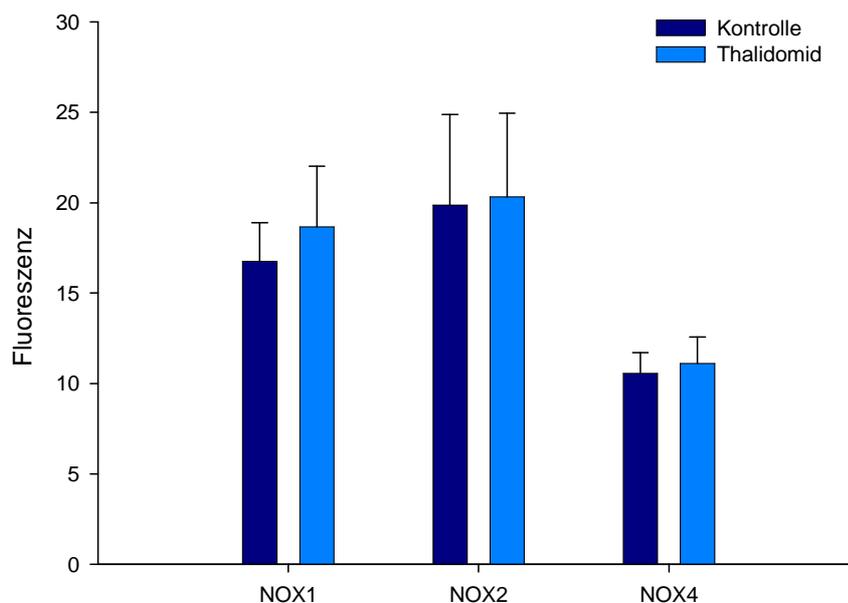
In Kapitel 5.11 wurde die Bedeutung von Thalidomid für die intrazelluläre ROS Entstehung nachgewiesen und in Kapitel 5.13 die NADPH-Oxidase als eine der Hauptquellen der ROS identifiziert.

In den Kapiteln 5.14 und 5.15 konnte die Bedeutung eben dieser ROS für die anti-angiogenen und pro-kardiogenen Prozesse in der embryonalen Differenzierung aufgezeigt werden. Nun sollte ermittelt werden ob die Zugabe von Thalidomid das Expressionsmuster der NADPH-Oxidase, bzw. ihrer Isoformen NOX-1, -2 und -4 beeinflusst.

Hierfür wurden vier Tage alte EBs mit 50 µg/ml Thalidomid behandelt, 24 h später fixiert und auf die einzelnen Isoformen immungefärbt. Die Fluoreszenz wurde mit dem CLSM gemessen und mit der entsprechenden Software ausgewertet.

Es konnte keine gesteigerte Expression der Isoformen der NADPH-Oxidase festgestellt werden, was eine gesteigerte Aktivität der Isoformen vermuten lässt.

a)



b

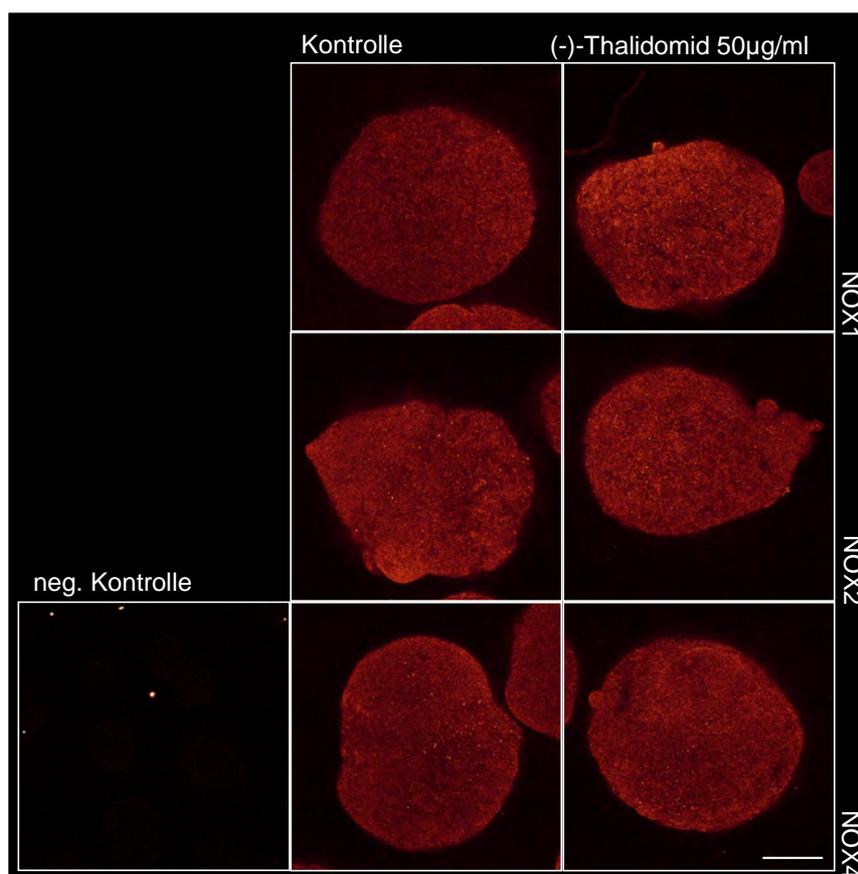


Abb. 5.16: Expression von NOX1, -2 und -4 nach Thalidomidbehandlung. a) Graphische Darstellung der Fluoreszenz der jeweiligen NOX-Isoformen. b) Repräsentative Bilder der Immunfärbungen. Der Größenbalken entspricht 300µm. (n=4, p > 0,05).

5.17 Einfluss des mitochondrialen Komplex I Inhibitors Rotenon auf die kardiovaskuläre Differenzierung

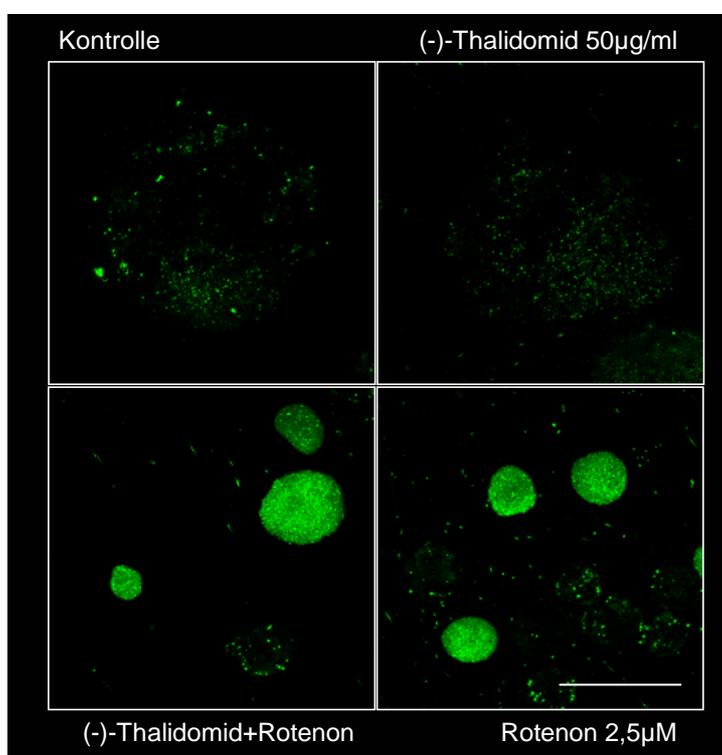
In Kapitel 5.13 wurden Mitochondrien als eine der Thalidomid-induzierten Quellen der ROS identifiziert. Um den mitochondrialen Einfluss auf die kardiovaskuläre Differenzierung genauer zu untersuchen, wurden Thalidomid-behandelte Proben mit Rotenon (2,5 µM) koinkubiert und bis Tag 10 kultiviert. Der Inhibitor wurde 2 h vor der Zugabe von (-)-Thalidomid (50 µg/ml) auf die EBs gegeben.

Bereits nach 48 h zeigte sich eine deutliche Diskrepanz im Größenwachstum zwischen Proben, die mit Rotenon behandelt wurden und Rotenon-freien Proben.

An Tag 10 konnten keine schlagenden Areale in den Rotenon beinhaltenden Proben gezählt werden. Aufgrund des nekrotischen Aussehens derselben, wurde auf weitere Analysen der kardiovaskulären Differenzierung verzichtet.

Die Toxizität von Rotenon wurde über die Fluoreszenz von Sytox Green, einer Substanz die beschädigte Zellkerne aufzeigt, dargestellt. Abbildung 5.17-b zeigt die Korrelation der Größenabnahme der EBs mit der gesteigerten Sytox Green Fluoreszenz.

a)



b)

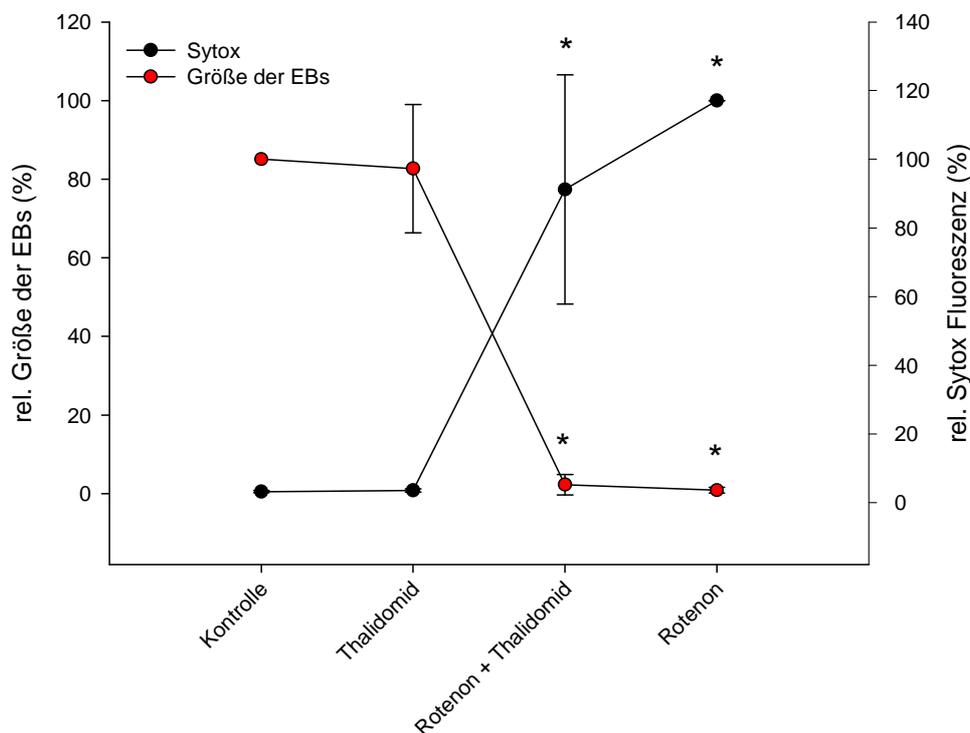


Abb. 5.17: Toxizität von Rotenon. a) Repräsentative Bilder der Sytox Green Fluoreszenz. Die Balkengröße entspricht 300 μm . b) Graphische Darstellung der relativen Größen der EBs (roter Datenpunkt) und der Sytox Fluoreszenz (schwarzer Datenpunkt). (n = 3, p < 0,05)

5.18 Bedeutung von Thalidomid für den intrazellulären NO Spiegel

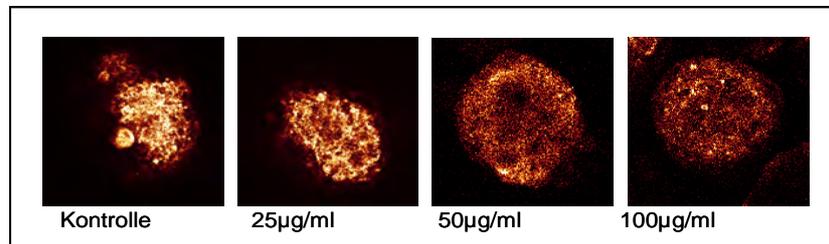
Angiogenese wird durch das pro-angiogene Molekül NO stimuliert, welches durch die endotheliale NO Synthase gebildet wird (Sessa, 2009). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Thalidomid einen senkenden Effekt auf intrazelluläre NO-Spiegel hat (Lopez-Talavera *et al.*, 1996; Shimazawa *et al.*, 2004). Die Vermutung liegt daher nahe, dass der anti-angiogene Effekt von (-)-Thalidomid auf einer Absenkung des NO Spiegels und/oder auf einer Inhibition der eNOS beruht, die eine Absenkung von NO mit sich zieht.

Im ersten Schritt sollte in unserem EB Modell untersucht werden, ob eine Behandlung der EBs mit Thalidomid eine Absenkung von NO zur Folge hat. Dafür wurde die Wirkung unterschiedlicher Thalidomidkonzentrationen auf den intrazellulären NO Spiegel getestet.

Vier Tage alte EBs wurden mit unterschiedlichen Thalidomidkonzentrationen (25, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und nach 4 h mit dem NO sensitiven Farbstoff DAF-FM-diacetat inkubiert (siehe auch Kapitel 4.7). Die NO Verhältnisse wurden über die Veränderungen der DAF Fluoreszenz ermittelt.

Nach 4 h zeigte sich bereits eine Abnahme des NO Gehaltes mit zunehmender Thalidomidkonzentration ($68,16 \pm 16,9\%$ bei 25 $\mu\text{g/ml}$, $57,7 \pm 22,5\%$ bei 50 $\mu\text{g/ml}$, $37,47 \pm 13,95$ bei 100 $\mu\text{g/ml}$, bezogen auf den Wert der Kontrolle). Nach 24 h blieben die NO Werte der Zellen weiterhin erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle ($69,2 \pm 17,7\%$ bei 25 $\mu\text{g/ml}$, $70,33 \pm 11,22\%$ bei 50 $\mu\text{g/ml}$ und $52,1 \pm 11,6\%$ bei 100 $\mu\text{g/ml}$).

a)



b)

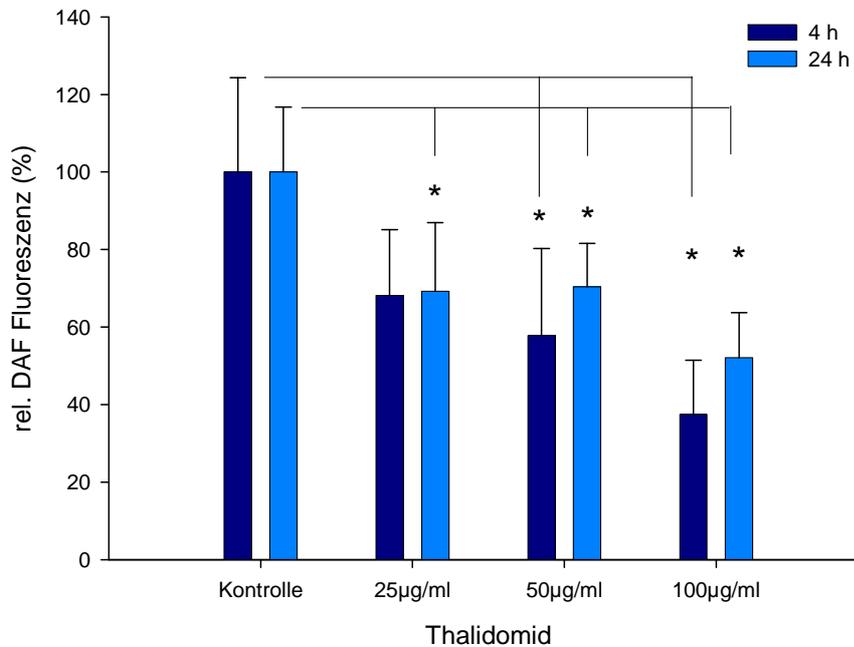


Abb. 5.18.1: Effekt von (-)-Thalidomid auf die intrazellulären NO Spiegel. a) Repräsentative Bilder der DAF-Fluoreszenz, der Größenbalken entspricht 150 μm . b) Die graphische Darstellung der Auswertung. ($n = 4$, $p < 0,05$).

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die Messung durch Zugabe des NO-Donors SNAP (250 nM) und Koinkubation mit Thalidomid (50 µg/ml) wiederholt.

Der Versuchsansatz war wie folgt: 4 Tage alte EBs wurden 2 h vor der Zugabe von (-)-Thalidomid (50 µg/ml) mit SNAP (250 nM) vorinkubiert. Nach 4 und 24 h wurden die EBs wie oben beschrieben, mit dem NO sensitiven Farbstoff DAF-FM-diacetat gefärbt und der Gehalt an NO über die relative DAF Fluoreszenz bestimmt.

Die Zugabe von SNAP erhöhte den NO Gehalt über den Wert der Kontrolle (ca. 130%). Dieser Effekt wurde durch Koinkubation mit (-)-Thalidomid aufgehoben (ca. 87,35%).

Dies bestätigt die Vermutung, dass (-)-Thalidomid ein NO modulierendes Agens ist.

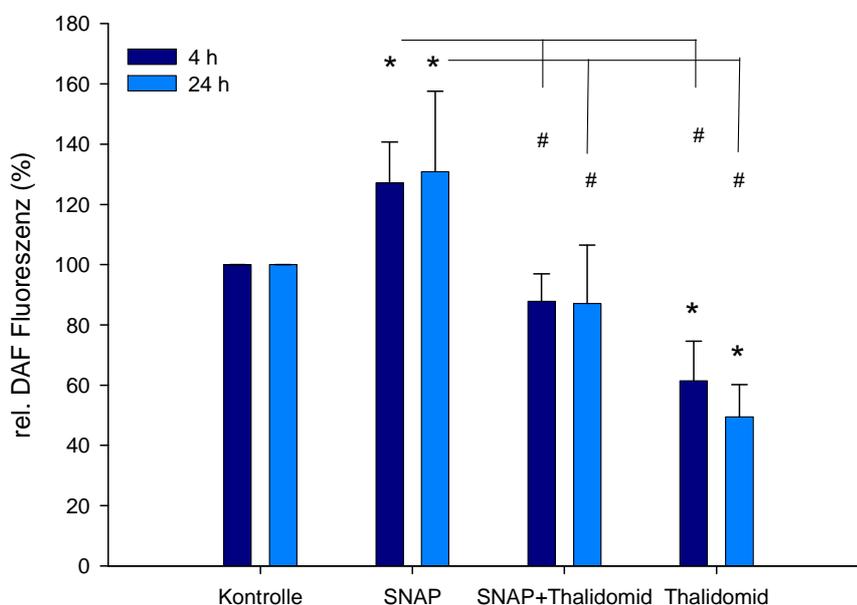
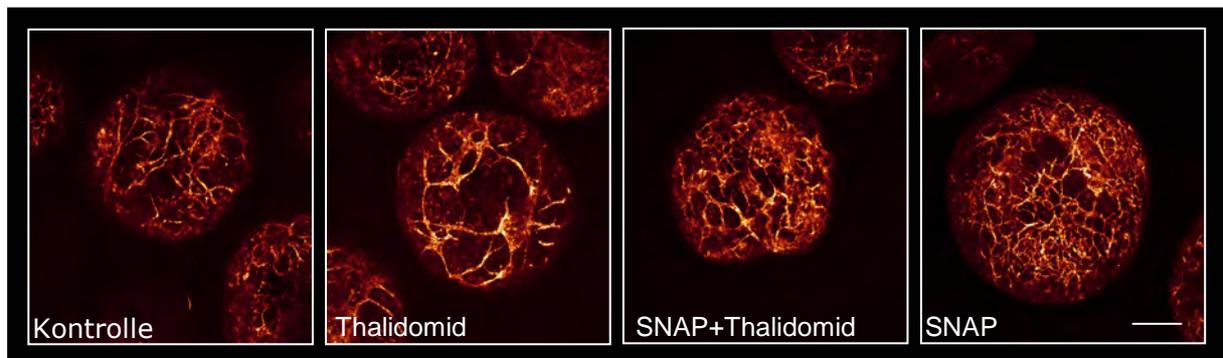


Abb. 5.18.2: Einfluss von (-)-Thalidomid auf die NO-Produktion. Gezeigt wird der thalidomidvermittelte Abfall des NO Spiegels nach 4 bzw. 24 h ab Beginn der Behandlung. (n = 6, p < 0,05).

5.19 Einfluss von NO auf die endotheliale Differenzierung

Da NO als proangiogener Stimulus bekannt ist, wurde der Langzeiteffekt des NO Donors SNAP im EB Modell untersucht. Um festzustellen, ob die antiangiogene Wirkung von (-)-Thalidomid mit einer Abnahme der NO Konzentration in den Zellen verbunden ist, wurde eine Koinkubation von Thalidomid (50 µg/ml) mit SNAP (250 nM) durchgeführt. Hierbei wurde der NO Donor 2 h vor Thalidomid zu den Proben gegeben. Die Behandlung erfolgte täglich von Tag 4 bis Tag 8, wonach die Proben mit Methanol fixiert wurden. Die Vaskularisierung wurde mittels Immunfärbung für CD31 sichtbar gemacht und als Verhältnis der Anzahl der Verzweigungspunkte zur Größe der EBs bestimmt.

a)



b)

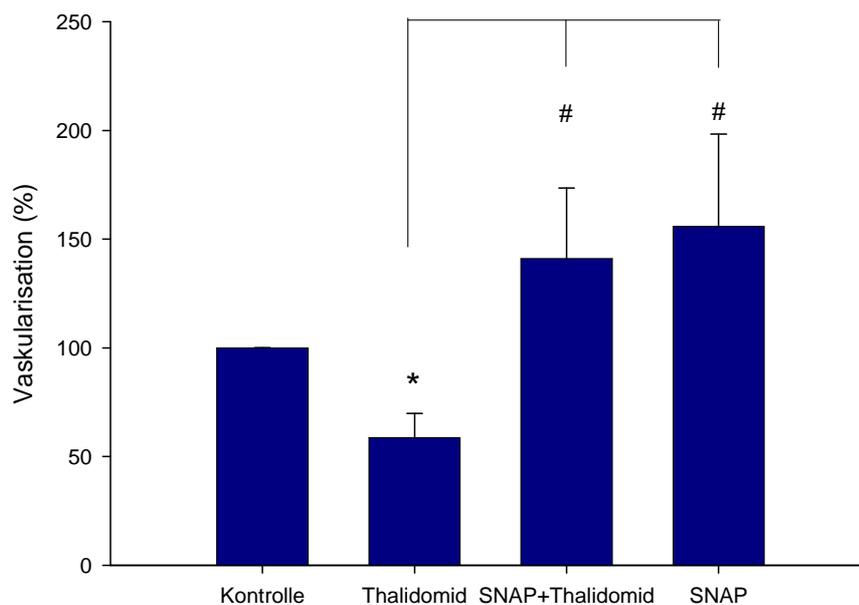


Abb. 5.19: NO abhängiger Effekt von (-)-Thalidomid auf die Angiogenese. a) Gezeigt sind repräsentative Bilder der CD31 Färbung, sowie b), die graphische Darstellung der Auswertung. Die Balkengröße entspricht 300µm. (n = 3, p < 0,05)

Verglichen mit der Vaskularisierung Thalidomid-behandelter Proben ($58,6 \pm 11,2\%$ bezogen auf den Wert der Kontrolle), zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Vaskularisierung in den Proben, die mit SNAP behandelt worden waren ($155,8 \pm 42,5\%$), auch nach Zugabe von (-)-Thalidomid ($141,05 \pm 32,5\%$).

Dies zeigt, dass NO essenziell für die endotheliale Entwicklung ist und dass die Thalidomid-bedingte Senkung des intrazellulären NO Spiegels in EBs den anti-angiogenen Effekt von Thalidomid zur Folge hat.

5.20 Die Bedeutung der eNOS für die Thalidomid vermittelte NO Senkung

NO wird durch NO Synthasen generiert (NOS). Durch Phosphorylierung wird der Enzymkomplex aktiviert und NO gebildet. Die bedeutendste NOS in Zusammenhang mit dem vaskulären System ist die eNOS (Sessa, 2009).

In den Kapiteln 5.18 und 5.19 wurde der Einfluss von Thalidomid auf die Abnahme der NO Gehalte der Zellen sowie die essenzielle Bedeutung von NO für die vaskuläre Entwicklung gezeigt. Es stellte sich somit die Frage nach der Quelle des NO. Wegen ihrer prominenten Bedeutung im Zusammenhang mit endothelialen Signalkaskaden, wurde die phosphorylierte (aktive) Form der eNOS (phospho-eNOS) auf ihre Dephosphorylierung untersucht.

Dafür wurden 4 Tage alte EBs mit (-)-Thalidomid (50 µg/ml) behandelt und eine Zeitreihe erstellt. Die Proben wurden in Abstand von 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 240 min. entnommen und mit 4% PFA fixiert. Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit ATP (10 µM) über einen Zeitraum von 30 min. Der Nachweis der Phospho eNOS erfolgte immunzytochemisch.

Bereits nach 5 min. zeigte sich eine deutliche Dephosphorylierung der eNOS, was die Abnahme der eNOS Aktivität beweist.

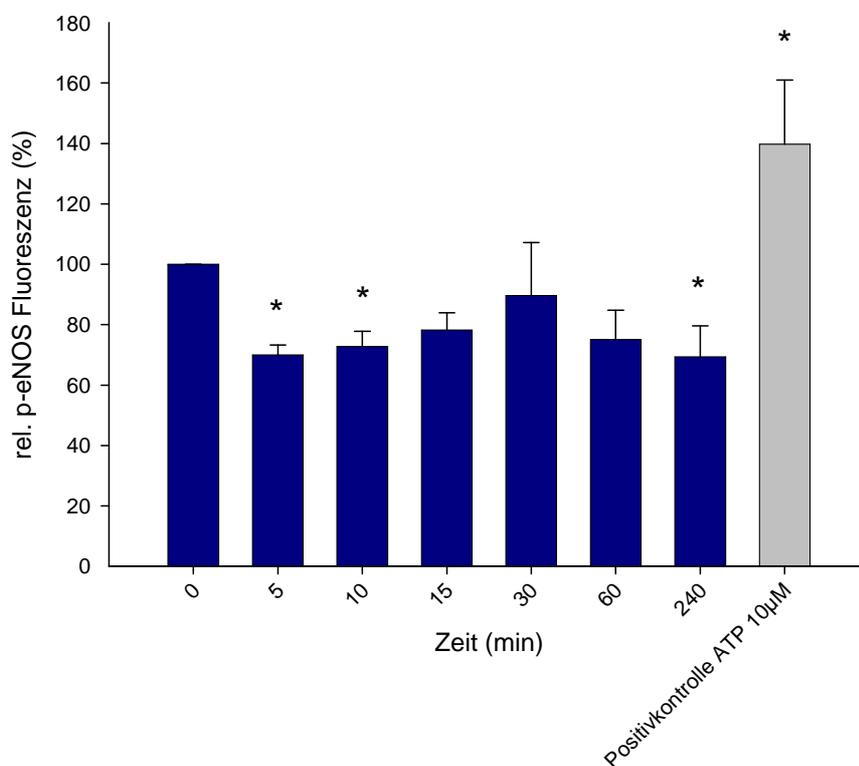
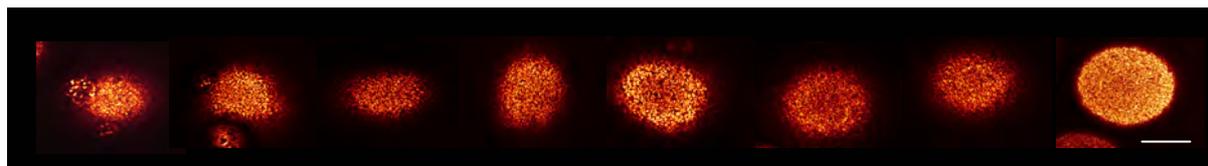


Abb. 5.20: Die Beteiligung der eNOS an der NO Produktion nach (-)-Thalidomidzugabe. Die Auswertung erfolgte über eine Immunfärbung für die phosphorylierte Form der eNOS. Gezeigt sind repräsentative Bilder der Immunfärbung und die graphische Darstellung der Auswertung. Die Balkengröße entspricht 150µm. (n = 3, p < 0,05).

5.21 Bedeutung von Carboxy-PTIO und L-NAME für die durch (-)-Thalidomid inhibierte Vaskulogenese

Nachdem in Kapitel 5.20 der Einfluss von Thalidomid auf die Deaktivierung der eNOS gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Bedeutung funktionierender NO Synthasen für die Vaskulogenese untersucht. Dies wurde mit Hilfe des unspezifischen NOS Inhibitors L-NAME (100 µM) ermittelt. Zusätzlich wurde die Wichtigkeit von NO für die

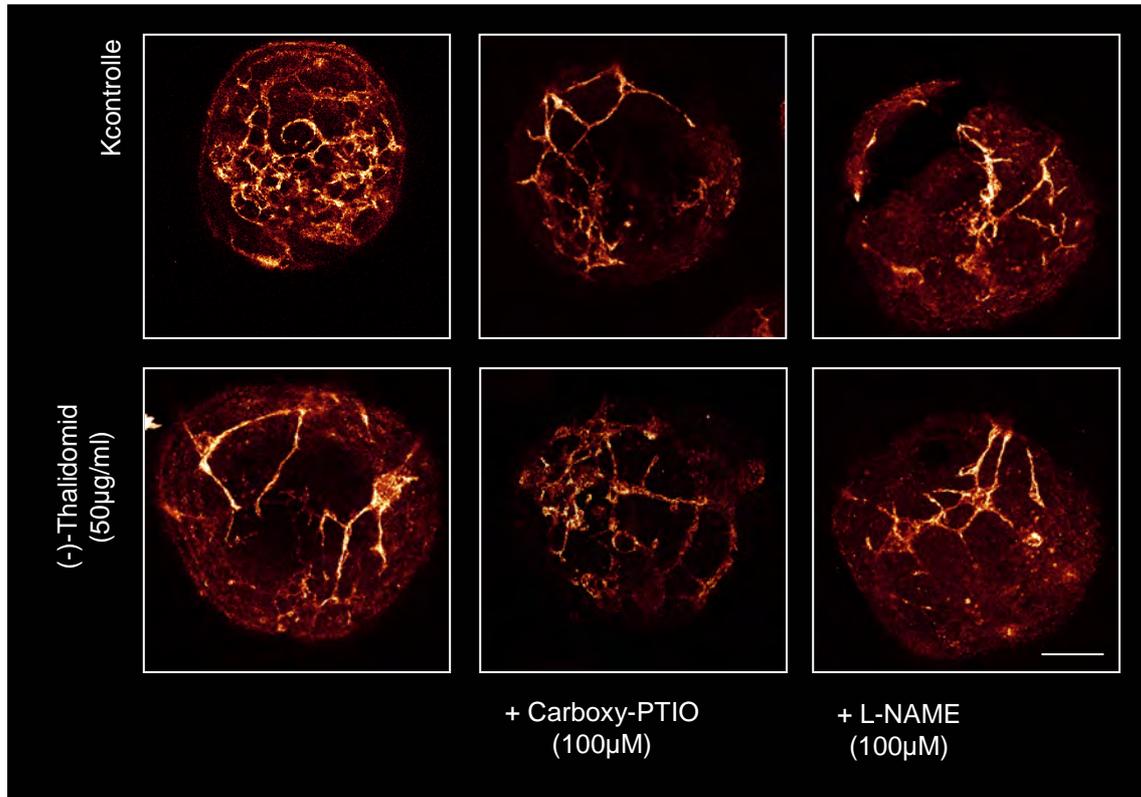
Vaskulogenese durch Einsetzen des NO Fängers Carboxy-PTIO (100 μ M) nochmal unterstrichen.

Die EBs wurden ab Tag 4 täglich mit den Substanzen behandelt, wobei auf Proben, die mit Thalidomid koinkubiert wurden, die Inhibitoren 2 h vor Thalidomidzugabe (50 μ g/ml) gegeben wurden. Am Tag 8 der Differenzierung wurden die EBs mit Methanol fixiert und auf CD31 immungefärbt.

Alle Proben zeigten signifikant verringerte Vaskularisierung der EBs im Vergleich zur Kontrolle (Thalidomid: $22,5 \pm 6,68\%$, Carboxy-PTIO + Thalidomid: $29,3 \pm 9,6\%$, Carboxy-PTIO: $24,8 \pm 9,66\%$, L-NAME + Thalidomid $23,3 \pm 7,7\%$, L-NAME: $16,35 \pm 4\%$).

Das Ergebnis verdeutlicht die Bedeutung von NO für die Vaskulogenese und die der NO Synthasen für die zelluläre NO-Produktion. Zudem scheint es in den EBs keinen anderen Weg zu geben, NO in ausreichender Menge für die vaskuläre Entwicklung herzustellen, wenn die NOS inhibiert sind.

a)



b)

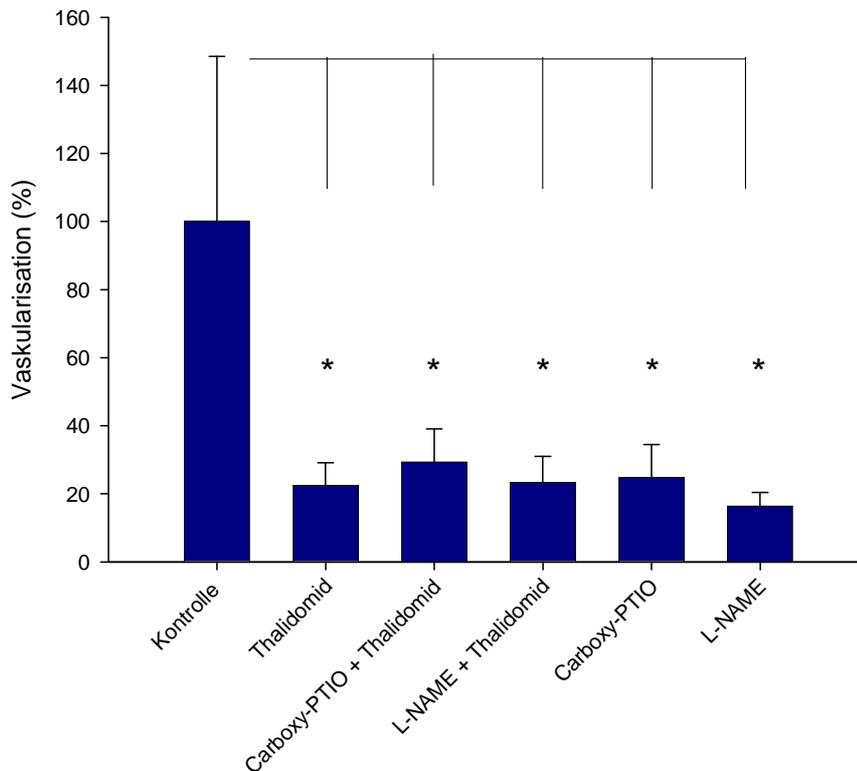


Abb. 5.21: Einfluss von L-NAME und Carboxy-PTIO auf die vaskuläre Entwicklung. a) Gezeigt sind repräsentative Bilder der CD31 Färbung sowie b) die graphische Darstellung der Auswertung. Die Balkengröße entspricht 300 μm . (n = 3, p < 0,05).

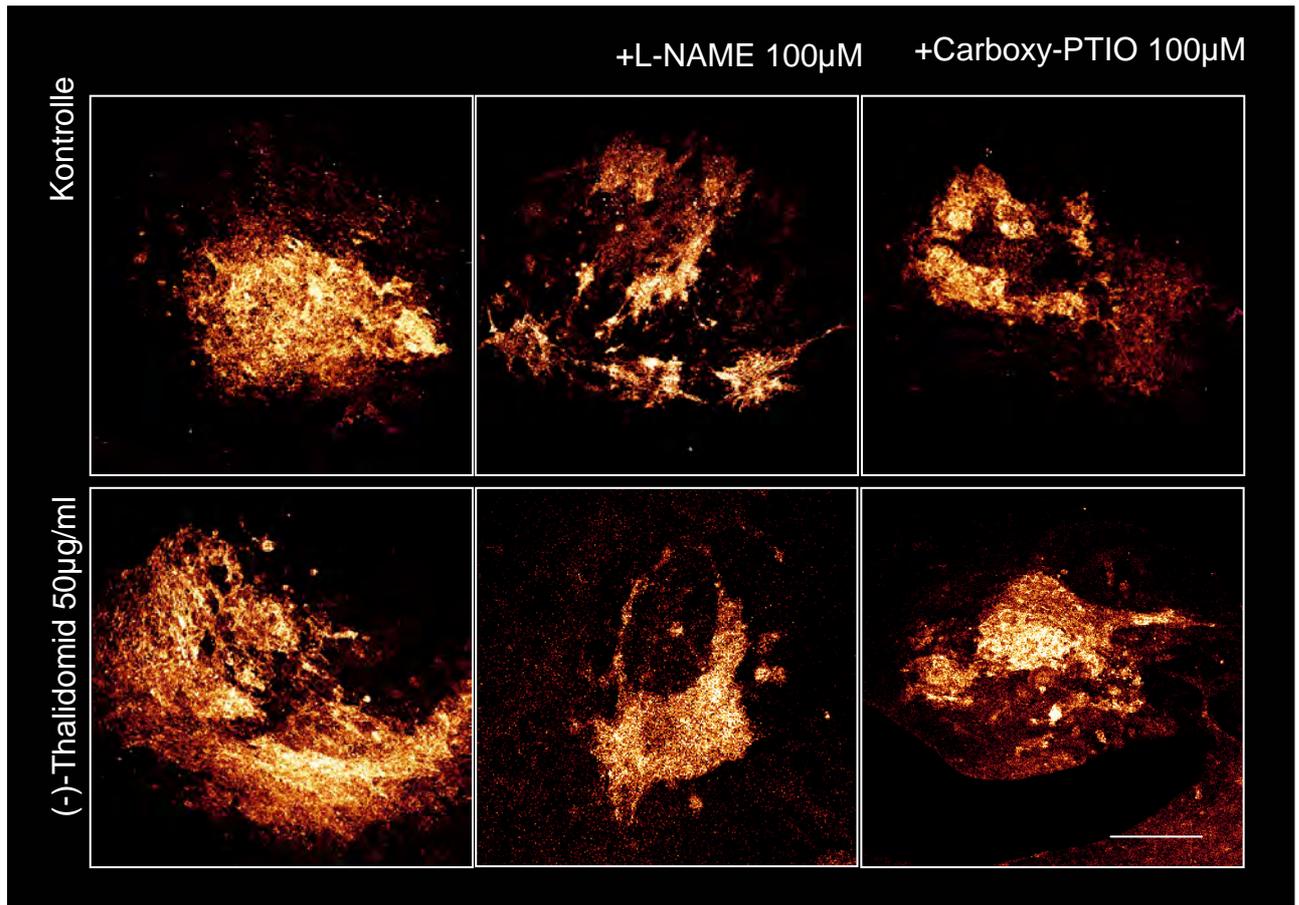
5.22 Die Bedeutung von NO für die kardiale Entwicklung

Zusätzlich wurde der Langzeiteffekt von NO auf die Entwicklung von Kardiomyozyten untersucht. Die EBs wurden, wie unter 5.21 beschrieben, behandelt, ausplattiert und bis Tag 10 weiterkultiviert. Danach erfolgte eine Bestimmung der kardialen Differenzierung über die Immunfärbung auf α -Aktinin. Es zeigte sich eine signifikante, jedoch nicht zur Gänze aufgehobene kardiale Differenzierung in EBs, die mit L-NAME (72,4 \pm 8,9%), bzw. Carboxy-PTIO (71,15 \pm 12,26%) behandelt wurden. Die durch Thalidomid gesteigerte Kardiomyogenese war in EBs die mit L-NAME und Carboxy-PTIO koinkubiert waren, im Vergleich zu EBs die nur mit Thalidomid behandelt wurden (131,7 \pm 4,2%) signifikant reduziert (88,6 \pm 4%, bzw. 79,5 \pm 9,4%).

5. Ergebnisse

Im Gegensatz zur endothelialen Entwicklung, scheint die kardiale Differenzierung nicht im gleichen Maße von NO abhängig zu sein. Das Ergebnis zeigt aber auch, dass NO auch zur Kardiomyogenese beiträgt, vermutlich durch eine weiter laufende Reaktion zu Peroxynitrit, welches als freies Radikal in den ROS-Pool der Zelle mit einfließt und so indirekt einen stimulierenden Effekt auf die kardiale Differenzierung hat.

a)



b)

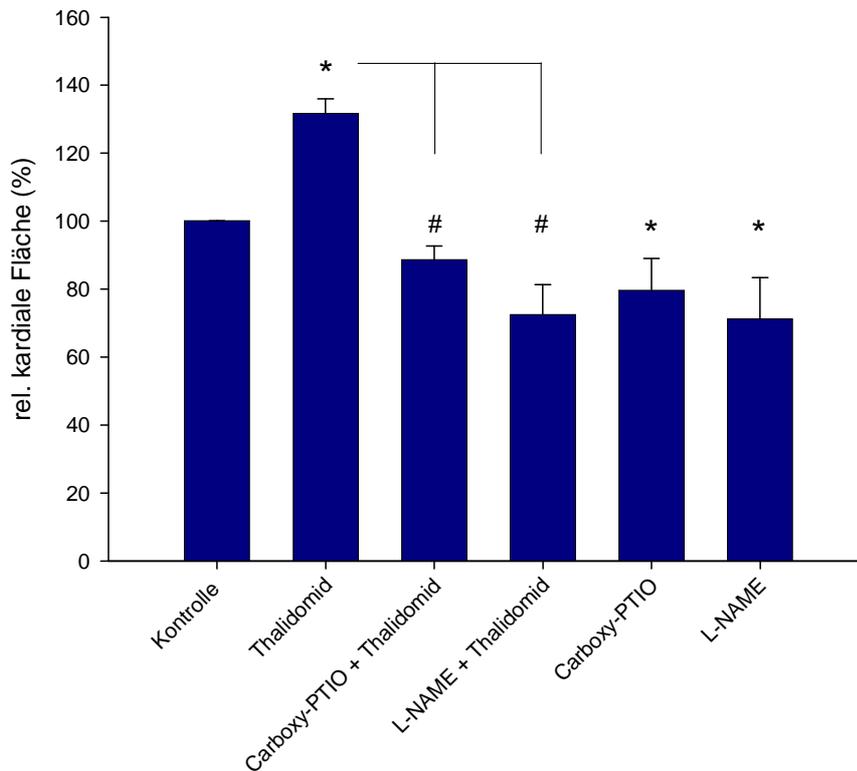


Abb. 5.22: Bedeutung von NO für die kardiale Differenzierung. a) Gezeigt sind repräsentative Bilder der α -Aktinin Färbung, sowie b) die graphische Darstellung der Auswertung. Der Größenbalken repräsentiert 200 μm . (n = 3, p < 0,05).

5.23 Gegenseitige Beeinflussung von ROS und NO im zellulären System

In dieser Arbeit wurde bislang gezeigt, dass Thalidomid 2 Wege beschreitet. Zum einen führt es zur einer von NADPH-Oxidase und den Mitochondrien ausgehenden erhöhten ROS-Produktion. Diese scheint vor allem der Kardiomyogenese förderlich zu sein, während die Vaskulogenese zum Erliegen kommt. Zum anderem führt es zu einem Absinken der intrazellulären NO Spiegel durch Dephosphorylierung der eNOS, was wiederum für die endotheliale Entwicklung essenziell ist. Die Kardiomyogenese scheint hiervon nicht betroffen, obwohl unsere Versuche mit L-NAME eine Beteiligung von NO in der kardialen Differenzierung aufzeigen.

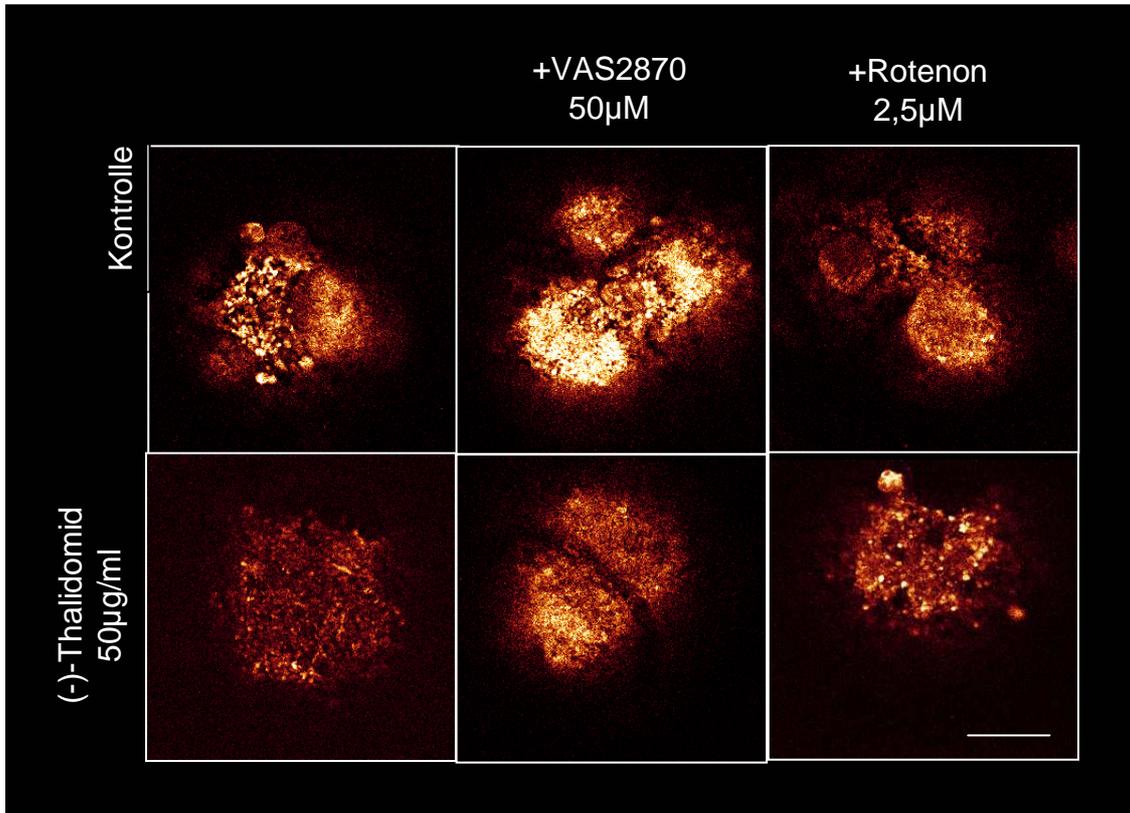
5. Ergebnisse

Es stellte sich nun die Frage, ob sich ROS und NO gegenseitig beeinflussen oder ob beide unabhängig von einander entstehen.

Hierfür wurde eine NO Messung an EBs durchgeführt, die vorher mit den Inhibitor der NADPH-Oxidase VAS2870 (50 μ M) und des mitochondrialen Komplex I Rotenon (2,5 μ M) inkubiert worden waren. Wenn sich ROS und NO gegenteilig beeinflussen, sollte die Inhibition von ROS zu einer gesteigerten Detektion von NO führen. Um dies in Bezug auf Thalidomid zu verifizieren, wurden ebenfalls Proben gemessen, die mit Thalidomid und den ROS Inhibitoren koinkubiert waren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Thalidomid-vermittelte Absenkung des NO Gehalts (60,9 \pm 9,5%) der EBs durch Koapplikation mit VAS2870 und Rotenon aufgehoben wird (87,6 \pm 30,9%, bzw. 85,3 \pm 40,6%). VAS2870 allein führte zu einem signifikanten Anstieg von NO (183,28 \pm 42,6%), wogegen Rotenon keinen Einfluss auf die intrazelluläre NO Bildung zu haben scheint (90,82 \pm 51,5%).

a)



b)

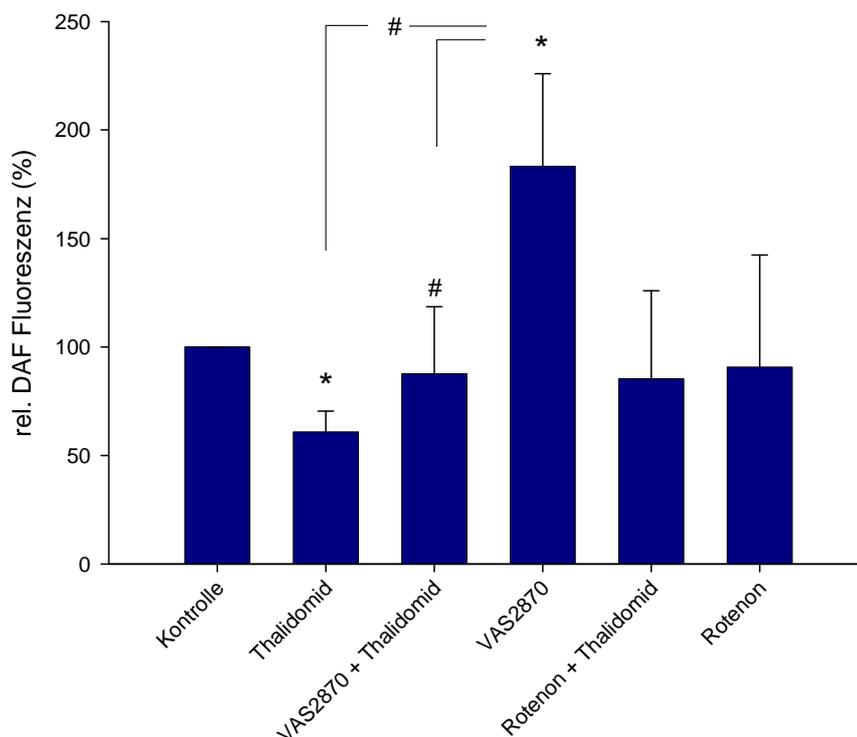


Abb. 5.23: Effekt von Inhibitoren der NADPH-Oxidase und des mitochondrialen Komplex I auf die Entstehung von NO. a) Gezeigt sind repräsentative Bilder sowie b) die graphische Darstellung der Auswertung. Der Balken entspricht 150 μ m. (n = 3, p < 0,05).

5.24 Endotheliale Differenzierung im humanen EB-Modell

Um die Ergebnisse von *in vitro* Tests in Zukunft übertragbarer auf den Menschen zu machen, sollte die humane embryonale Stammzellkultur und die Herstellung von Konfrontationskulturen aus humanen EBs etabliert werden. Die Zellkultur wurde, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden zwei humane Stammzelllinien getestet: H1 und H9, bezogen vom WiCell Research Institute in Wisconsin, USA.

Um EBs herzustellen, wurden die Kolonien, wie in Kapitel 4.1.7, 4.1.8 und 4.1.9 beschrieben, angezüchtet, mit einer Dispase-Lösung von der Fibroblastenschicht getrennt und in

bakteriologischen Schalen kultiviert (siehe auch 4.1.11). Da die Differenzierung der humanen Stammzellen längere Zeit in Anspruch nimmt, wurden die Proben erst am Tag 10 und 13 der Differenzierung fixiert und mit einer Immunfärbung für CD31 gefärbt.

Obwohl es sich bei beiden Zelllinien um embryonale Stammzellen humanen Ursprungs handelt, wurde ein erheblicher Unterschied in den Differenzierungseigenschaften dieser Linien festgestellt. Besonders in Bezug auf die endotheliale Differenzierung lag die H1 Linie weit hinter der H9 Linie zurück.

In Abbildung 5.24.1 wird die endotheliale Differenzierung in einer direkten Gegenüberstellung gezeigt.

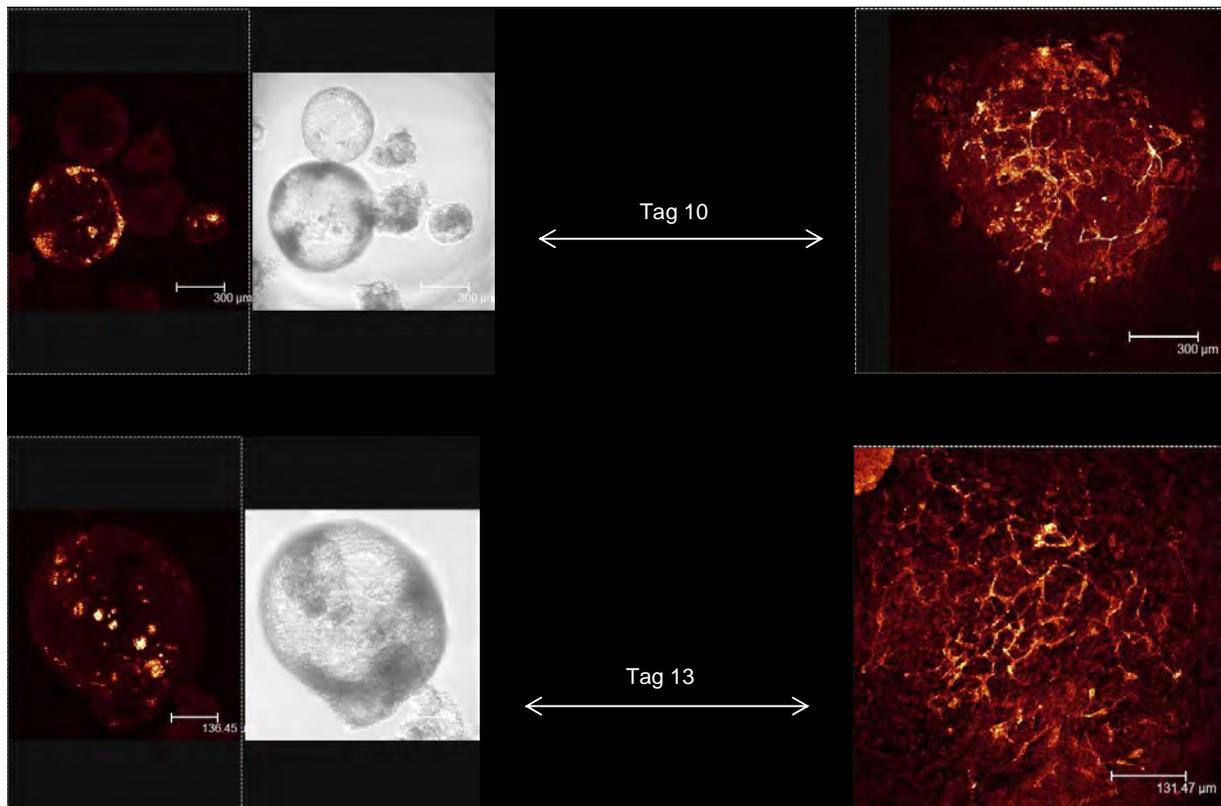


Abb. 5.24.1: Repräsentative Bilder der endothelialen Differenzierung humaner Stammzellen. Links im Bild befinden sich EBs der Linie H1, rechts gleich alte EBs der Linie H9.

Im nächsten Schritt wurden Kokulturen mit EBs beider Zelllinien hergestellt (siehe auch Kapitel 4.1.13). Die jeweiligen EBs wurden am Tag 8 der Differenzierung mit den Tumorsphäroiden in Kokultur gebracht und bis Tag 13 weiterkultiviert. Anschließend wurden

die Proben mit Methanol fixiert und mit einer Immunfärbung für CD31 markiert. Der Tumor wurde zuvor mit dem Lebendfarbstoff CMFDA behandelt, der die Diskriminierung zwischen tumorösem und embryonalem Gewebe erlaubt.

Auch hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied des endothelialen Differenzierungspotentials der beiden Zelllinien. H1 EBs zeigten in Kokultur tendenziell mehr Vaskularisierung als in den Kontroll-EBs, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass der Tumor auch hier einen proangiogenen Effekt hat. Allerdings ist auch hier eine deutlich bessere Vaskularisierung der Kokultur sichtbar, dessen embryonaler Anteil aus H9 gewonnenen EBs bestand.

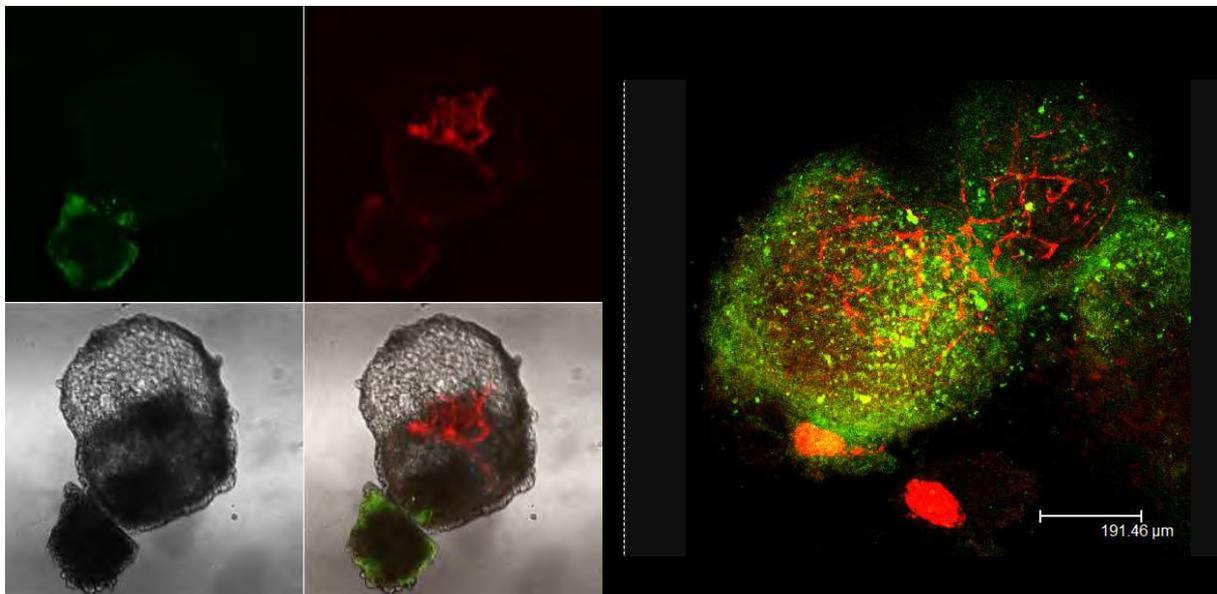


Abb. 5.24.2: Repräsentative Bilder von humanen Konfrontationskulturen. Links im Bild befindet sich eine Kokultur deren embryonalen Anteil die Stammzelllinie H1 darstellt, rechts eine Kokultur mit einem aus der Zelllinie H9 hergestellten EB.

6. Diskussion

Die Entstehung des Herzkreislaufsystems stellt einen der wichtigsten Prozesse der embryonalen Entwicklung dar. Blutgefäße werden benötigt, um Gewebe mit den nötigen Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, zudem um Abfallprodukte, Metabolite und Botenstoffe abzutransportieren. Das Myokard gewährleistet dabei die Entstehung und Aufrechterhaltung der Strömung in den Gefäßen.

Die Vaskulo- und Angiogenese beschränken sich jedoch nicht nur auf die Embryogenese. Im adulten Organismus sind sie bei Prozessen wie der Wundheilung und malignen Entartungen von zentraler Bedeutung. Das Ziel der medizinischen Forschung ist hierbei die regenerative physiologische Angiogenese zu fördern und die pathologische zu unterbinden.

Zahlreiche Studien werden durchgeführt, um die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Geschehen zu entschlüsseln. Es konnten schon einige bedeutende regulierende Faktoren und Bedingungen aufgezeigt und als pro- (Carmeliet, 2000; Grunewald *et al.*, 2009; Lyons, III *et al.*, 2009) bzw. antiangiogen eingestuft werden (O'Reilly *et al.*, 1994; Maisonpierre *et al.*, 1997; O'Reilly *et al.*, 1997). Um eine möglichst genaue Aussage über einen wissenschaftlichen Sachverhalt zu bekommen, ist die Wahl des Forschungsmodells entscheidend (Vailhe *et al.*, 2001).

Ein Modell allein ist oft nicht aussagekräftig genug, wie an folgenden Beispielen sichtbar wird: so wird die Angiogenese *in vitro* meistens in zweidimensionalen Zellkulturmodellen erforscht, die den physiologischen Verbund mit anderen Zelltypen und extrazellulären Matrixproteinen nicht berücksichtigen. Folglich entsprechen die Reaktionen solcher Zellkulturmodelle nicht in Gänze denen eines vollständigen Organismus.

Für *in vivo* Studien werden meistens Maus- und Kaninchenmodelle genutzt, die jedoch Einschränkungen bezüglich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Spezies aufweisen. Zugleich sind die zu untersuchenden Gewebe unter Umständen schwer zugänglich. Bei Behandlungen mit verschiedenen Substanzen muß deren Verstoffwechslung durch das Tier berücksichtigt werden, da speziesspezifische Unterschiede auftreten können. So führt z.B. das Unvermögen der Katze zur Glucuronidierung zu sehr geringer Toleranz gegenüber bestimmten Wirkstoffgruppen, die sich bei anderen Spezies inkl. Mensch als weit weniger

risikoreich darstellen. *In vivo* Genmanipulationen unterliegen ebenfalls gewissen Einschränkungen, da einige Mutationen lethal sind.

Als geeignetes Ersatz- oder Ergänzungsmodell bietet sich das aus Stammzellen generierte EB-Modell an, das die frühe embryonale Entwicklung nachahmt. Da es sich um ein dreidimensionales Modell handelt, das durch Differenzierungsprozesse nicht aus nur einer homogenen Zellpopulation besteht, wird die Zell-Zell sowie Zell-extrazelluläre Matrix Komponente berücksichtigt, was einer physiologischen Umgebung gleichkommt. Zusätzlich sind Behandlungen einfacher durchzuführen und die Verstoffwechslung der Substanzen als minimal zu betrachten. Durch Wahl der stammzellenspendenden Spezies kann die Übertragbarkeit von Daten aus *in vitro* auf *in vivo* Studien erhöht werden. Einige Forscher heben besonders die Eignung des EBs als Modell für die spontane und induzierte Angiogenese hervor (Risau *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurde das EB-Modell allein, wie auch in Kombination mit multizellulären Tumorsphäroiden zur Untersuchung der Angiogenese und ihrer Inhibitoren genutzt.

Der Einsatz der Tumorsphäroide bietet sich an, da diese in der Lage sind, unter Zellkulturbedingungen die gleiche Entwicklung durchzumachen wie avaskuläre Tumore *in vivo*. So zeigen sie mit steigender Größe eine dormante Zellschicht, die bei anhaltendem Wachstum in eine zentrale Nekrose übergeht (Wartenberg *et al.*, 1998). Durch Zusammenfügen von Tumorzellen mit anderen Zellarten, wie z.B. Fibroblasten, können Differenzierungsprozesse innerhalb des Tumors verfolgt werden (Beaupain, 1999).

Während der Herstellung der Kokulturen werden EBs und Tumorsphäroide in so engen räumlichen Kontakt zueinander gebracht, dass sie den Einflüssen des jeweils anderen Partners ausgesetzt sind. Bereits nach 48 h sind erste CD31 positive Areale an der Grenzfläche zwischen EB und Tumor sichtbar (Wartenberg *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass 4 Tage nach Erstellen der Kokultur die meisten Sphäroide mit Gefäßen versorgt waren. Obwohl durch Verlängerung des Kultivierungszeitrahmens der Kokultur keine signifikante Zunahme der Zahl gefäßversorgter Tumore beobachtet werden konnte, fiel auf, dass die Dichte des vaskulären Netzwerks im Bereich des Tumors zunahm. Zudem konnte eine Auswanderung der CMFDA-gefärbten

Tumorzellen aus dem Sphäroid und deren Anlagerung an die CD31 positiven Gefäßstrukturen beobachtet werden.

Bei einem Vergleich der Vaskularisierung von EBs, die sich in Kokultur befanden, mit Kontroll-EBs gleicher Passagen, konnte eine 50%-ige Steigerung der Vaskularization von EBs in Kokultur festgestellt werden. Dies wurde durch FACS Messungen bestätigt, die ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Zellzahl verzeichneten.

Der Übergang des Endothels von statischer zu migratorischer Phase wird von Tumoren durch proliferative und promigratorische Faktoren, die sie in ihre Umgebung abgeben, gefördert. Als besonders wichtig haben sich dabei das in vielen Tumoren vermehrt exprimierte und direkt auf Endothelzellen wirkende VEGF (Klagsbrun and D'Amore, 1996; Shweiki *et al.*, 1992) sowie bFGF (Shing *et al.*, 1984) erwiesen. Es ist aber noch eine Reihe anderer proangiogener Faktoren entdeckt worden, wie die Angiopoietine 1 und -2 (Davis *et al.*, 1996; Maisonpierre *et al.*, 1997) und der Blutplättchenwachstumsfaktor (platelet-derived growth factor; PDGF) (Carmeliet, 2000).

Da Tumore besagte Wachstumsfaktoren in ihre unmittelbare Umgebung abgeben, sollten sie auch *in vitro* einen direkten Einfluss auf die Endothelzellmigration haben.

Dies wurde im Kokulturmodell durch Richtungswachstumsanalysen der Gefäße bestätigt. Es zeigte sich ein deutliches tumorgerichtetes Wachstum der Endothelzellen in Kokulturen. Als eines der in Frage kommenden Zytokine wurde VEGF untersucht, das in der embryonalen Entwicklung eine maximale Expression zu Beginn der Differenzierungsprozesse am Tag 4 zeigte und bei Tumorsphäroiden mit steigendem Alter und Größe zunehmend exprimiert wurde. Es konnte beobachtet werden, dass exogen appliziertes VEGF das tumorgerichtete Wachstum der Gefäße aufhebt, was auf einen möglichen, vom Tumor ausgehenden VEGF-Gradienten hindeutet.

Wie bereits erwähnt, durchlaufen multizelluläre Tumorsphäroide mehrere Entwicklungsphasen. Ab einer gewissen Größe des Sphäroids hat das die Entstehung einer dormanten Zellschicht mit hoher P-Glykoproteinexpression zur Folge (Wartenberg *et al.*, 1998), die wahrscheinlich durch kalziumvermittelte Signale in ihrer Entstehung und Rücktransformation zur proliferativen Zellschicht reguliert wird (Sauer *et al.*, 1998;

Wartenberg *et al.*, 1999). Diese Zellschicht ist vermutlich auch für therapeutische Misserfolge verantwortlich, da eine vorhandene intrinsische Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie im Verlauf einer Chemotherapie erworbene Resistenzen einiger Tumorarten, mit der Expression der ABC-Transporter, darunter auch P-gp, verbunden ist (Sharom, 2008). ABC-Transporter sind als membranständige Proteine verantwortlich für den Export toxischer Stoffe und Metaboliten aus nicht entarteten und aus Tumorzellen. P-Glykoprotein (ABCB1) ist das klinisch bedeutsamste Protein der ABC Transporterfamilie.

Einige Studien belegen die Abhängigkeit des P-Glykoproteins vom hypoxischen Status der Zellen. Dieser wirkt vorwiegend durch das Hochregulieren des Hypoxieinduzierbaren Faktors 1 α (HIF-1 α), der ein Schlüsselregulator einiger sauerstoffregulierter Gene ist (Comerford *et al.*, 2002; Wartenberg *et al.*, 2003). Als Folge der hypoxischen Bedingungen und Störungen der mitochondrialen Atemkette zeigen Tumore meist eine gesteigerte Glykolyse um ATP zu generieren (DeBerardinis, 2008). Dieses Phänomen ist auch unter dem Namen Warburg Effekt bekannt.

Während der Kultivierung der Tumorspheroide konnte eine altersabhängige Zunahme der P-Glykoproteinexpression beobachtet werden. Dieses wurde durch Fluoreszenzmessungen der MDR-1-GFP-transfizierten Tumorzelllinie KB 3.1 sowie durch Analysen von Antikörperfärbungen gegen das P-gp verifiziert. Parallel durchgeführte Versuche kooperierender Arbeitsgruppen zeigten zudem einen Anstieg an Laktat- und Abfall von Pyruvatzellspiegeln und glykolytischen Enzymen. Hierbei konnte die enge Verbindung zwischen der P-gp Expression (und der damit verbundenen multiplen Wirkstoffresistenz) und dem Wechsel des Metabolismus der Tumorzellen von oxidativer Phosphorylierung zur Glykolyse demonstriert werden. (Wartenberg *et al.*, 2009).

Im Kokulturmodell zeigte sich eine signifikante Zunahme der P-gp Expression bei KB-Tumorsphäroiden, die sich im Verbund mit einem EB befanden, verglichen mit Kontroll-Tumorsphäroiden. Dies korreliert mit Ergebnissen früherer Studien, die ebenfalls erhöhte P-gp und HSP27 Werte in Kokulturen mit DU145 Tumorsphäroiden feststellen konnten (Wartenberg *et al.*, 2001).

In der vaskulären Forschung wurden ausser den bereits erwähnten proangiogenen Faktoren auch einige natürlich vorkommende antiangiogene Faktoren entdeckt, wie das Interferon- α und - β (Dvorak and Gresser, 1989), Thrombospondin-1 (Good *et al.*, 1990), Angiostatin

(O'Reilly *et al.*, 1994) und Endostatin (O'Reilly *et al.*, 1997). Durch diese Entdeckungen sieht man heute die Unterbindung der Tumorversorgung als einen vielversprechenden Therapieansatz, sei es durch die Hemmung der Ausschüttung von proangiogenen Faktoren, die Blockade ihrer Rezeptoren und Applikationen von neutralisierenden Antikörpern oder durch Stimulation der Sekretion von antiangiogenen Faktoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das EB-Modell genutzt, um den antiangiogenen Effekt einiger Substanzen zu testen. Ausgewählt wurden einerseits 2 Inhibitoren der Tyrosinkinase-Rezeptoren (SU5614 und ZM323881) und das neuerdings zur Behandlung des multiplen Myeloms (Breitkreutz and Anderson, 2008) und Erythema leprosum nodosum (Okafor, 2003) wieder zugelassene Thalidomid. Die Substanzen wurden gewählt, um VEGF und seine Rezeptoren als Ziele der Krebstherapie bzw. das EB-Modell als Testsystem für antiangiogene Screenings aufzuzeigen.

SU5614 wurde als Inhibitor von FLT3 in AML-Zelllinien (AML = acute myeloid leucemia) mit konstitutiver FLT3 Expression beschrieben (Spiekermann *et al.*, 2002; Spiekermann *et al.*, 2003). Ein anderer FLT3 Inhibitor, SU5416, wird bereits in klinischen Studien zur Krebstherapie solider Tumoren getestet (O'Donnell *et al.*, 2005), z.B. beim Kolonkarzinom (Hoff *et al.*, 2006), als antiangiogene Medikation in erstauftretenden und rezidivierenden Tumoren im Hals- und Kopfbereich (Fury *et al.*, 2007) und bei refraktären Tumoren des zentralen Nervensystems bei Kindern (Kieran *et al.*, 2009).

ZM323881 ist ein selektiver Inhibitor des VEGFR-2 und die geringe Dosis, die nötig ist, die Vaskularisierung signifikant zu vermindern, verdeutlicht die Bedeutung dieses Rezeptors für die Vaskulo- und Angiogenese.

Thalidomid und seine Derivate zeigen vielfältige Auswirkungen auf biologische Funktionen von Zellen und Organen, u.a. die Aktivierung des Immunsystems, antiangiogene Effekte und Inhibition von Zytokinen (Therapontos *et al.*, 2009). Aufgrund seiner teratogenen Effekte wurde Thalidomid Anfang der 60-er Jahre vom Markt genommen. Einige der früheren Thalidomidstudien sehen eben diese Teratogenität als Folge der antiangiogenen Eigenschaften dieser Substanz (D'Amato *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 2000; Therapontos *et al.*, 2009). Zudem könnten die antiangiogenen Effekte von Thalidomid ebenso Ursache seiner bewiesenen Effizienz in der Krebstherapie sein. Einige der bislang untersuchten Tumore, bei

denen Thalidomid anti-angiogen wirkt, sind: Prostata-, Brust- und Nierenkrebs, Karposi Sarkom, Melanome, Gliome, Leber- und Lungenkrebs (Kumar *et al.*, 2004).

Zunächst wurde der anti-angiogene Effekt der Substanzen im EB-Modell getestet. Es konnte gezeigt werden, dass SU5614, ZM323881 und Thalidomid dosisabhängig die Vaskularisierung der EBs inhibieren. Des Weiteren konnte eine deutliche Abnahme der Anzahl gefäßversorgter Tumore verzeichnet werden, was die Tyrosinkinaserzeptoren allgemein und VEGFR-2 im Speziellen als wichtige Komponenten der Tumor-Wirt Kommunikation hervorhebt.

Interessanterweise konnte auf Zellzahlebene kein Unterschied zwischen behandelten Proben und Kontrolle in Bezug auf die Anzahl CD31⁺ Zellen mit allen 3 Substanzen festgestellt werden. Bei Behandlung mit SU5614 und Thalidomid konnte eine nicht signifikante Reduktion der Anzahl CD144⁺ Zellen beobachtet werden, wogegen ZM323881 keine Auswirkungen zeigte.

Sowohl CD31 als auch CD144 (VE-Cadherin) sind endothelspezifische Marker. Sie befinden sich auf der Zelloberfläche und sind an der Zellmigration und Elongation (CD31), bzw. an der Lumenbildung der neu entstandenen Gefäße (CD144) beteiligt.

Eine Abnahme der Verzweigungspunkte in Verbindung mit gleichbleibender Zellzahl könnte darauf hindeuten, dass sich die Behandlung mit den besagten Substanzen auf das Migrationsverhalten der Endothelzellen auswirkt, die vaskulären Differenzierungsprozesse jedoch unberührt lässt. Diese Beobachtung wird durch Studien anderer Gruppen gestützt, die zeigten, dass das Thalidomidanalogon Lenalidomid dosisabhängig die Sprossung aus Arterienringen und die Ausbildung von netzartigen Strukturen aus ausplattierten Endothelzellen unterbindet (Lu *et al.*, 2009)

Die Wirkung von Thalidomid wurde im EB-Modell genauer untersucht, da diese Substanz, wie bereits erwähnt, nach längerer Zeit eine Neuzulassung zur Behandlung des multiplen Myeloms und der Lepra (Okafor, 2003; Breikreutz and Anderson, 2008) erhalten hat. Zudem wird es in vielen klinischen Studien auf seine Tumor inhibierende Wirkung untersucht (Teo, 2005; Aragon-Ching *et al.*, 2007; Efstathiou and Logothetis, 2009).

Der Mechanismus, welcher der inhibierenden Wirkung des Thalidomids auf die Vaskularisierung zugrunde liegt, ist noch nicht ausreichend erforscht. Einige Sachverhalte konnten jedoch geklärt werden. So wurde gezeigt, dass Thalidomid die Expression und Sekretion sowohl von VEGF als auch von bFGF in Tumor- (Li *et al.*, 2003; Trussardi-Regnier *et al.*, 2009) und Stromazellen des Knochenmarks (Gupta *et al.*, 2001) herabsetzt. Es verhindert zudem die VEGF-Sekretion, Zellmigration, Adhäsion sowie Kapillarbildung humaner Endothelzellen (Komorowski *et al.*, 2006). Im *In vivo* Versuch (rabbit cornea micropocket Assay) wurde gezeigt, dass die bFGF-induzierte Angiogenese durch Thalidomidbehandlung reduziert werden kann (Kenyon *et al.*, 1997).

Thalidomid und seine Analoga zeigten in unterschiedlichen Studien eine positive Beeinflussung der ROS-Generierung (Thadani *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2006; Aerbajinai *et al.*, 2007), was zu DNA-Strangbrüchen in Embryos führen könnte (Parman *et al.*, 1999). Es steigt vor allem die intrazelluläre Konzentration der hoch reaktiven Hydroxylradikale (Sauer *et al.*, 2000).

Einige Forscher sehen einen Zusammenhang zwischen der Teratogenität des Thalidomids bei einigen Spezies und unterschiedlich hohen intrazellulären Gluthationspiegeln. Es konnte beobachtet werden, dass Fibroblasten der Maus (thalidomidresistente Spezies) höhere Glutathiongehalte aufwiesen als Zellen thalidomidsensitiver Spezies (Knobloch *et al.*, 2008). Sechsmal höhere ROS Anstiege, gemessen in Kaninchenzellkulturen im Vergleich zum ROS Gehalt in Rattenzellkulturen, entstehen vermutlich durch unterschiedliche Glutathiondepletion in Kern und Zytoplasma der beiden Spezies (Hansen *et al.*, 2002).

Parallel zur Inhibition der Vaskulogenese, konnte ein Anstieg der Kardiomyogenese beobachtet werden. Dies wurde durch Auswertung sich kontrahierender Areale, nach Markierung mit dem kardialen Protein α -Aktinin, belegt. Zudem konnte auf mRNA Ebene gezeigt werden, dass Genexpressionen kardialer Marker durch Thalidomidbehandlung signifikant erhöht werden. Eine erfolgreiche Translation wurde mit der Western Blot Analyse dieser kardialen Marker nachgewiesen.

Dies ist insofern von Bedeutung, da bereits gezeigt wurde, dass vaskuläre Zellen und Kardiomyozyten aus einer gemeinsamen Flk1⁺ Präkursorzelle differenzieren (Kattman *et al.*, 2006). Die teratogenen Effekte von Thalidomid an Mensch und Tier schliessen auch Missbildungen des Herzens, wie Kammerseptum-Defekte, Dehnung des rechten Vorhofs unter Einbeziehung des Koronarsinus, Fehlpositionierung der großen Gefäße und

Hypertrophie der linken Herzkammer mit ein (Smithells, 1973; Khera, 1984; Smithells and Newman, 1992).

Die beobachtete gesteigerte Kardiomyogenese bei der Differenzierung von Stammzellen könnte auf die gesteigerte ROS-Produktion nach Thalidomidbehandlung zurückzuführen sein. Dies liegt nahe, da gezeigt wurde, dass exogene ROS Zufuhr (Buggisch *et al.*, 2007) sowie durch physische Manipulationen generiertes ROS (Schmelter *et al.*, 2006) oder elektromagnetische Felder (Sauer *et al.*, 2005) die kardiale Differenzierung aus embryonalen Stammzellen stimulieren.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Thalidomid zu einer dosisabhängigen Steigerung der ROS Produktion führt. Um die Rolle der ROS auf die Störungen der kardiovaskulären Differenzierung genauer zu untersuchen, wurden daher die Quellen der ROS ermittelt.

Hierfür wurden der pharmakologische Inhibitor der NADPH-Oxidase VAS2870 und der Inhibitor des Komplex I der mitochondrialen Atemkette Rotenon verwendet. Der Thalidomid-induzierte ROS-Anstieg konnte nach Inhibition der NADPH-Oxidase vollständig aufgehoben werden. Bei Proben, die nur mit VAS2870 behandelt wurden, fiel zudem der ROS Gehalt unter das Niveau der unbehandelten Kontrolle. Es konnte keine gesteigerte Expression der NOX-Isoformen beobachtet werden, was im Zusammenhang mit dem deutlich erhöhten ROS auf eine gesteigerte Aktivität des Enzymkomplexes hinweist.

In Gegensatz dazu verhinderte eine Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atemkette nur die Thalidomid-induzierte Entstehung der ROS, wohingegen Rotenon allein zu keiner Veränderung des ROS-Gehalts unter Kontrollbedingungen führte.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die NADPH-Oxidase die Hauptquelle der endogenen ROS Produktion unter physiologischen Bedingungen darstellt, und durch Thalidomid überaktiviert wird. Zusätzlich beeinflusst Thalidomid auch die oxidative Phosphorylierung und die Mitochondrienfunktion. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass das Thalidomidanalogon CPS49 die mitochondriale Integrität unterbricht und den ROS-Gehalt in humanen leukämischen Zellen erhöht (Ge *et al.*, 2008). Da Rotenon allein keine signifikanten Veränderungen der ROS herbeiführte, kann geschlossen werden, dass Mitochondrien nicht an der endogenen ROS Produktion beteiligt sind.

Eine Hemmung der NADPH-Oxidase durch VAS2870 zeigte eine Reduktion der kardialen und vaskulären Differenzierung, wie auch der Thalidomid-induzierten Stimulation der Kardiomyogenese. Die Thalidomid-bedingte Reduktion der Vaskulogenese blieb unverändert nach VAS2870 Behandlung.

Der Einsatz des Radikalfängers NMPG in dieser Studie reduzierte die Thalidomid-induzierte Stimulation der Kardiomyogenese, wogegen die Inhibition der Vaskularisierung durch Inkubation mit Radikalfängern wieder aufgehoben werden kann (Sauer *et al.*, 2000). Dies unterstreicht nochmal die Bedeutung von Hydroxylradikalen für die kardiale Entwicklung sowie die Abhängigkeit der Differenzierung von der Menge der generierten ROS. So scheinen sich hohe und sehr niedrige ROS Spiegel hemmend auf die Vaskulogenese auszuwirken, wogegen hohe ROS die kardiale Differenzierung stimulieren.

Ein weiteres bedeutendes Signalmolekül, das neben Sauerstoffintermediaten den Prozess der kardiovaskulären Differenzierung in embryonalen Stammzellen beeinflusst, ist NO. Die größte NO-Abhängigkeit zeigen hierbei Endothelzellen (Huang *et al.*, 2010). An Endothelzellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass Thalidomid die NO-abhängige Angiogenese hemmt, sei es durch Inhibition der Zellmigration (Tamilarasan *et al.*, 2006) und / oder Interaktion mit der löslichen Guanylyl-Cyclase (Majumder *et al.*, 2009).

Es wurde deshalb die Hypothese formuliert, Thalidomid könne durch Herabsetzen des intrazellulären NO, die Vaskulogenese aus embryonalen Stammzellen verhindern. In der Tat zeigen auch die Daten dieser Arbeit, dass eine Thalidomidbehandlung der EBs die NO-Generierung innerhalb von 4 h herabsetzt und zwar durch Dephosphorylierung der eNOS, die bereits nach wenigen Minuten eintritt.

Der genaue Mechanismus der Inaktivierung der eNOS ist noch nicht bekannt. Immerhin zeigten kürzlich veröffentlichte Daten aus Studien an Endothelzellen, dass kurzzeitige ROS-Applikationen die Aktivität der eNOS stimulieren. In Gegensatz dazu senken länger andauernde, repetitive ROS-Applikationen die eNOS-Aktivität und den NO Gehalt der Zellen (Boulden *et al.*, 2006). Des Weiteren zeigte die Behandlung von Endothelzellen aus Pulmonalarterien von Schafen mit Wasserstoffperoxid eine Verringerung der Aktivität des eNOS Promoters durch Inhibition der SP-1 Aktivität (Kumar *et al.*, 2009).

Ein anderer Erklärungsansatz für eine thalidomidbedingte Reduktion der eNOS-Aktivität und des NO-Gehalts könnte in Verbindung mit einer verminderten VEGF-Expression und -Sekretion durch die Behandlung stehen (Komorowski *et al.*, 2006). VEGF ist bekannt dafür, eNOS zu aktivieren und die Produktion von NO und Peroxynitrit zu stimulieren, wodurch die Migration der Endothelzellen und die Kapillarbildung initiiert wird (Dimmeler *et al.*, 2000; El Remessy *et al.*, 2007).

Sollte wirklich ein Abfall im NO-Gehalt für den antiangiogenen Effekt verantwortlich sein, so sollte dieser Effekt durch exogene NO-Zufuhr aufgehoben sein sollte. Diese Annahme wurde in Versuchen geprüft, in denen der NO-Gehalt durch den NO-Donor SNAP erhöht wurde. Die Behandlung mit SNAP hob den Effekt von Thalidomid in Gänze auf. SNAP allein stimulierte die Vaskulogenese über das Niveau der Kontrolle hinaus und verdeutlichte so die Bedeutung von NO für die vaskuläre Differenzierung von Stammzellen.

Eine Inhibition der NO Synthasen mit dem unspezifischen Inhibitor L-NAME sowie eine Behandlung mit dem NO-Fänger Carboxy-PTIO, führen zu einer Hemmung der Angiogenese, wie auch der Kardiomyogenese. Eine Erklärung, weshalb auch die kardiale Differenzierung betroffen ist, liegt wahrscheinlich in der Generierung von Peroxynitrit, das den Radikalpool der Zellen erhöht.

Thalidomid und seine Analoga werden z.Zt. bei einigen lebensbedrohlichen Krankheiten als vielversprechende Heilmittel evaluiert. Um die teratogenen Nebenwirkungen dieser Substanz zu vermeiden und seine positiven Eigenschaften in der antiangiogenen Therapie zu nutzen, ist es nötig, den Wirkmechanismus zu entschlüsseln. Die vorliegenden Daten zeigen, dass nach der Behandlung der embryonalen Stammzellen die Balance zwischen Vaskulo- und Kardiomyogenese zugunsten der kardialen Differenzierung verschoben wurde.

Die prokardiomyogenen Effekte von Thalidomid sind wahrscheinlich auf eine Stimulation der ROS-Produktion zurückzuführen. Die inhibitorischen Effekte auf das Endothel (reduzierte Sprossung und vaskuläre Lumenbildung sowie reduzierte Tumervaskularisierung) sind vermutlich der Absenkung der NO-Gehalte der Zellen zuzuschreiben.

NO-generierende Substanzen werden als potentielle Krebstherapeutika diskutiert, auch beim multiplen Myelom (Kiziltepe *et al.*, 2007), für dessen Behandlung auch Thalidomid zugelassen ist. Sie werden ebenfalls bei Behandlung von Herzerkrankungen verwendet

(Strijdom *et al.*, 2009). Ein gleichzeitiges Verabreichen mit Thalidomid muß daher mit Vorsicht gehandhabt werden, da ein systemischer Anstieg von NO der antiangiogenen Wirkung von Thalidomid entgegenwirken und so die therapeutischen Wirkungen beider Medikamente schmälern würde.

Die pharmakologische Wirkung von Substanzen kann Unterschiede zwischen Tier und Mensch aufweisen. Daher wurde in dieser Arbeit die humane embryonale Stammzellkultur etabliert. Im Jahre 1998 wurde erstmals eine humane Stammzelllinie aus einer humanen Blastozyste isoliert (Thomson *et al.*, 1998). Diese Stammzellen haben, ebenso wie embryonale Stammzellen der Maus, die Fähigkeit der Selbsterneuerung und Differenzierung. Allerdings unterscheiden sich humane und mausembryonale Stammzellen in vielerlei Aspekten.

Zunächst ist die Morphologie der Stammzellkolonien unterschiedlich (feste, runde, erhabene Kolonien bei der Maus, im Gegensatz zu flachen und lockeren Kolonien des Menschen). Das Wachstum der humanen Stammzellen ist deutlich langsamer und das Passagieren schwerer verglichen mit der embryonalen Stammzellkultur der Maus.

Beide Spezies exprimieren eine Reihe gemeinsamer Pluripotenzmarker inkl. der Transkriptionsfaktoren (u.A. Oct4, FoxD3, Nanog und alkalische Phosphatase). Es zeigen sich jedoch wesentliche Unterschiede im Expressionsmuster der entwicklungspezifischen Antigene (stage-specific embrionic antigens; SSEA), die ursprünglich zur Charakterisierung mausembryonaler Stammzellen verwendet wurden. So exprimieren humane Stammzellen im Gegensatz zu Maus ES-Zellen, SSEA-3 und -4 im undifferenzierten Zustand und SSEA-1 während der Differenzierung (Ginis *et al.*, 2004).

Der vielleicht größte Unterschied ist die Tatsache, dass LIF allein für die Selbsterneuerung nicht ausreichend ist. Dies erklärt die Notwendigkeit, humane Stammzellen auf Fibroblasten mit Zusatz von bFGF zu kultivieren (Thomson *et al.*, 1998), alternativ auf Matrigel oder Laminin in Medium, das vorher durch mausembryonale Fibroblasten konditioniert wurde (Xu *et al.*, 2001). Um eine xenogene Kontamination zu vermeiden, werden teilweise auch Fibroblasten menschlichen Ursprungs verwendet (Richards *et al.*, 2002). Welche Faktoren die Fibroblasten letztendlich ins Medium abgeben, ist bis heute nicht geklärt. Es ist zurzeit noch unklar, ob die Informationen, die bisher über den Selbsterneuerungsprozess der

mausembryonalen Stammzellen gesammelt wurden, auf die humane Stammzellkultur direkt übertragbar sind.

Da im Zusammenhang mit humanen embryonalen Stammzellen immer wieder ethische Bedenken geäußert werden, zeigt sich ein neuer Weg der Herstellung von Stammzellen als sehr vielversprechend. Es handelt sich um die 2007 erstmals gelungene Reprogrammierung adulter Zelltypen zu Stammzellen durch retrovirale Transfektion (Yamanaka and Takahashi, 2006; Takahashi *et al.*, 2007).

Im Laufe dieser Arbeit konnte die humane embryonale Zellkultur etabliert und erste Einsichten gewonnen werden. Durch das Testen zweier Zelllinien konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Stammzellkultur der Maus, die Differenzierungseigenschaften humaner Stammzellen stark Zelllinienabhängig sind. Es konnte eine erfolgreiche Herstellung von EBs aus humanen Stammzellen und von Kokulturen durchgeführt werden. Die endotheliale Differenzierung konnte mit Immunfärbungen für CD31 nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ein großer zeitlicher Unterschied der Differenzierung verglichen mit der mausembryonalen Zellkultur sowie ein Unterschied im Differenzierungspotential für Endothel zwischen den beiden getesteten humanen Zelllinien. Im Falle der Kokultur zeigte sich ebenfalls dieser Unterschied.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Kokulturmodell ein sehr gutes *in vitro* Modell für Studien der tumorinduzierten Angiogenese darstellt. Das EB-Modell kann dabei für Toxizitätstests und initiale Screenings potentiell antiangiogenwirkender Substanzen genutzt werden. Im Falle der Herstellung und der Nutzung humaner embryonaler Zellkulturen empfiehlt es sich, eine Datenbank anzulegen, in der die unterschiedlichen Differenzierungseigenschaften der verschiedenen Zelllinien festgehalten sind.

Um zudem die ethische Komponente solcher Testsysteme zu entschärfen, ist gegebenenfalls die Verwendung von iPS Zellen angebracht, die eine neue Richtung in der Stammzellforschung eröffnet haben.

7. Zusammenfassung

Das Wachstum und Metastasierungspotential eines Tumors steigt mit seiner vaskulären Versorgung. In dieser Arbeit wurde die Tumorinduzierte Angiogenese in einem *in vitro* System untersucht, das gewährleistet, diesen Prozess unter beinahe physiologischen Bedingungen (Zell-Zell und Zell-extrazelluläre Matrixinteraktionen) zu beobachten. Das aus embryonalen Stammzellen hergestellte EB ist in der Lage, die vom Tumorsphäroid ausgehenden Signale zu empfangen und mit gezielter Differenzierung auf die selbigen zu reagieren.

Es konnte gezeigt werden, dass Wechselwirkungen zwischen Tumorsphäroiden und EBs zu einer zeitnahen Vaskularisation des Tumorgewebes und gesteigerter Angiogenese beteiligter EBs führen. Die neu entstandenen Gefäße wachsen bevorzugt auf den Tumor zu. Zugabe von VEGF hebt jedoch das gerichtete Wachstum auf, was auf eine Beteiligung von VEGF in diesem Prozess hindeutet. Folglich führte die Zugabe von Tyrosinkinase-Rezeptor hemmenden Substanzen SU5614 und ZM323881 zu einer reduzierten Vaskularisierung in EBs und in Tumorsphäroiden in Kokultur. Das u.a. für seine VEGF senkenden Eigenschaften bekannte Thalidomid zeigte ebenfalls einen konzentrationsabhängigen reduzierenden Effekt auf die Vaskularisation der EBs und der in Kokultur befindlichen Tumorsphäroide. Allerdings führten alle eingesetzten Inhibitoren zu keiner signifikanten Veränderung der endothelialen Zellzahl.

Es wurde zusätzlich ein positiver konzentrationsabhängiger Effekt der Thalidomidbehandlung auf die kardiale Differenzierung beobachtet, was sich in einer gesteigerten Anzahl kontrahierender Bereiche, eine Vergrößerung der Fläche von kardialen α -Aktinin positiven Arealen und der mRNA und Proteinexpression kardialer Marker zeigte.

Der schon publizierte Effekt des Thalidomid-Racemates auf die Erhöhung der intrazellulären ROS Produktion konnte auch mit der für ihre antiangiogene Wirkung verantwortlichen (-)-Isoform gezeigt werden. Zudem konnten die NADPH-Oxidase und die Mitochondrien als Quelle der ROS durch Koinkubation mit dem NADPH-Oxidase Inhibitor VAS2870 und dem Inhibitor des Komplex I der Mitochondrien Rotenon ausgemacht werden. Die durch NADPH

generierten ROS haben einen negativen Effekt auf die endotheliale, jedoch einen positiven auf die kardiale Differenzierung.

Es konnte gezeigt werden, dass Thalidomid einen senkenden Effekt auf die intrazelluläre NO Produktion der EBs hat, was durch Koinkubation von Thalidomid mit dem NO-Donor SNAP bestätigt wurde. Als eine der Quellen des NO konnte die eNOS identifiziert werden, da es bereits 5 min nach Zugabe von Thalidomid zu einer signifikanten Abnahme der eNOS Phosphorylierung kam. Eine Steigerung der NO-Generierung zeigte im EB-Modell einen deutlichen proangiogenen Effekt, während eine Inhibition sowohl die vaskuläre, als auch die kardiale Differenzierung reduzierte.

Zusätzlich sollte in diesem Projekt die Etablierung der humanen Stammzellkultur durchgeführt werden, um die Möglichkeit der Herstellung von humanen Konfrontationskulturen zu testen. Hierfür wurden die Stammzelllinien H1 und H9 miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass der Einsatz von humanen Kokulturen grundsätzlich möglich ist, jedoch bestehen wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Linien bezüglich ihrer Differenzierungsmöglichkeiten. Ein sorgfältiges Screening der Zelllinien ist daher notwendig, um die am besten geeignete Zelllinie für den jeweiligen Differenzierungsansatz zu ermitteln.

8. Summary

Vascularization is the prerequisite for tumour growth and metastasis. In this study tumour-induced angiogenesis was analysed using an *in vitro* co-culture model which mimics physiological conditions through cell to cell and cell to extracellular matrix interactions. The embryonic stem cell-derived embryoid body (EB) is capable to receive signals released by the tumour, transduce them and answer through differentiation processes.

In the present study it is shown that interactions between tumour spheroids and EBs led to vascularization of the tumour tissue as well as to increased angiogenesis in co-cultured EBs. The newly developed vessels showed tumour-directed growth, which was lost when medium was supplemented with VEGF, suggesting a major role of this growth factor in tumour angiogenesis. Consequently, treatment with tyrosine-kinase inhibitors resulted in decreased vascularization of EBs as well as vascularised tumours in co-culture. Comparable effects occurred by treatment with thalidomide, a substance known to reduce serum levels of VEGF.

It was observed that none of the inhibitors significantly changed the number of endothelial cells, suggesting that the compound acted on vascular sprouting rather than on differentiation of endothelial cells.

Furthermore it was observed that treatment with thalidomide positively influenced cardiac development, as shown by higher numbers of beating foci, increased α -actinin positive areas, as well as expression of mRNA and protein of cardiac markers.

It was shown, that treatment with (-)-thalidomide led to increased intracellular ROS levels. Treatment with the NADPH-Oxidase specific inhibitor VAS2870 and the inhibitor of mitochondrial complex I – rotenone, pointed towards NOX enzymes and mitochondria as sources of ROS production. By incubating the samples for longer time with VAS2870, a inhibitory effect was observed regarding vasculature, whereas it seems that higher ROS levels generated by the NADPH-Oxidase are necessary for cardiac development.

Further experiments were undertaken to analyse the effect of thalidomide treatment on intracellular NO-levels, since NO is known to be a pro-angiogenic stimulus. Indeed it was observed that thalidomide dose dependent decreased NO generation, which was verified by co-incubation of the samples with the NO donor SNAP as a positive control.

The source of NO was supposed to be phosphorylated eNOS, since treatment with thalidomide led to a 30% decrease in phosphorylation within 5 min. By investigating the importance of NO, treatments with thalidomide, SNAP and combination of both were performed. SNAP exerted a highly positive effect on the vascular differentiation. The inhibition of NO generation with L-NAME, as well as NO scavenging with carboxy-PTIO led to significantly reduced vasculogenesis and cardiomyogenesis.

To verify whether confrontation cultures could be established from human ES cells vasculogenesis was studied in the H1 and H9 human ES cell lines. It was found that the H9 cell line displayed superior vascular differentiation potential as compared to H1 cells. H9 EBs successfully formed confrontation cultures when colocalised with prostate cancer spheroids. Confrontation culture of human ES cells with tumour tissues will allow screenings of anti-angiogenic agents in a human tissue environment.

9. Literaturübersicht

Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., Stacker, S.A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 548-553.

Aerbajinai, W., Zhu, J., Gao, Z., Chin, K., Rodgers, G.P. (2007). Thalidomide induces gamma-globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. *Blood* 110, 2864-2871.

Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y.H., Takada, J., Wakisaka, M., Ibayashi, S., Utsumi, H., Iida, M. (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 109, 227-233.

Akaike, T., Yoshida, M., Miyamoto, Y., Sato, K., Kohno, M., Sasamoto, K., Miyazaki, K., Ueda, S., Maeda, H. (1993). Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.NO through a radical reaction. *Biochemistry* 32, 827-832.

Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.* 357, 593-615.

Alig, J., Marger, L., Mesirca, P., Ehmke, H., Mangoni, M.E., Isbrandt, D. (2009). Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 12189-12194.

Aquart, D.V., Dasgupta, T.P. (2005). The reaction of S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) with the angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril--mechanism of transnitrosation. *Org.Biomol.Chem.* 3, 1640-1646.

Aragon-Ching, J.B., Li, H., Gardner, E.R., Figg, W.D. (2007). Thalidomide analogues as anticancer drugs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2, 167-174.

Babior, B.M. (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB.Life* 50, 267-269.

Barash, U., Cohen-Kaplan, V., Arvatz, G., Gingis-Velitski, S., Levy-Adam, F., Nativ, O., Shemesh, R., Ayalon-Sofer, M., Ilan, N., Vlodaysky, I. (2009). A novel human heparanase splice variant, T5, endowed with protumorigenic characteristics. *FASEB J.*

Baruscotti, M., Barbuti, A., Bucchi, A. (2010). The cardiac pacemaker current. *J.Mol.Cell Cardiol.* 48, 55-64.

Beaupain, R. (1999). A method for three-dimensional coculture of cancer cells combined to any other type of cells maintained organotypically. *Methods Cell Sci.* 21, 25-30.

Bellamy, W.T. (2002). Vascular endothelial growth factor as a target opportunity in hematological malignancies. *Curr.Opin.Oncol.* 14, 649-656.

Beltrami, A.P., Cesselli, D., Bergamin, N., Marcon, P., Rigo, S., Puppato, E., D'Aurizio, F., Verardo, R., Piazza, S., Pignatelli, A., Poz, A., Baccarani, U., Damiani, D., Fanin, R., Mariuzzi, L., Finato, N., Masolini, P., Burelli, S., Belluzzi, O., Schneider, C., Beltrami, C.A. (2007).

Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110, 3438-3446.

Benjamin,L.E., Golijanin,D., Itin,A., Pode,D., Keshet,E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J.Clin.Invest* 103, 159-165.

Boheler,K.R., Czyz,J., Tweedie,D., Yang,H.T., Anisimov,S.V., Wobus,A.M. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ.Res.* 91, 189-201.

Boosani,C.S., Nalabothula,N., Sheibani,N., Sudhakar,A. (2010). Inhibitory effects of arretsen on bFGF-induced proliferation, migration, and matrix metalloproteinase-2 activation in mouse retinal endothelial cells. *Curr.Eye Res.* 35, 45-55.

Borgstrom,P., Bourdon,M.A., Hillan,K.J., Sriramarao,P., Ferrara,N. (1998). Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* 35, 1-10.

Borgstrom,P., Gold,D.P., Hillan,K.J., Ferrara,N. (1999). Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res.* 19, 4203-4214.

Borgstrom,P., Hillan,K.J., Sriramarao,P., Ferrara,N. (1996). Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res.* 56, 4032-4039.

Boulden,B.M., Widder,J.D., Allen,J.C., Smith,D.A., Al Baldawi,R.N., Harrison,D.G., Dikalov,S.I., Jo,H., Dudley,S.C., Jr. (2006). Early determinants of H2O2-induced endothelial dysfunction. *Free Radic.Biol.Med.* 41, 810-817.

Breitkreutz,I., Anderson,K.C. (2008). Thalidomide in multiple myeloma--clinical trials and aspects of drug metabolism and toxicity. *Expert.Opin.Drug Metab Toxicol.* 4, 973-985.

Brogi,E., Schatteman,G., Wu,T., Kim,E.A., Varticovski,L., Keyt,B., Isner,J.M. (1996). Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J.Clin.Invest* 97, 469-476.

Buggisch,M., Ateghang,B., Ruhe,C., Strobel,C., Lange,S., Wartenberg,M., Sauer,H. (2007). Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J.Cell Sci.* 120, 885-894.

Carmeliet,P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat.Med.* 6, 389-395.

Carmeliet,P., Jain,R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Carmeliet,P., Mackman,N., Moons,L., Luther,T., Gressens,P., Van,V., I, Demunck,H., Kasper,M., Breier,G., Evrard,P., Muller,M., Risau,W., Edgington,T., Collen,D. (1996). Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 383, 73-75.

- Chang, Y.S., di Tomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K., Munn, L.L. (2000). Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 14608-14613.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J.Biol.Chem.* 278, 36027-36031.
- Chetty, C., Lakka, S.S., Bhoopathi, P., Rao, J.S. (2009). MMP-2 alters VEGF expression via alphaVbeta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *Int.J.Cancer.*
- Chua, C.C., Hamdy, R.C., Chua, B.H. (1998). Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 25, 891-897.
- Chung, A.W., Yang, H.H., Sigrist, M.K., Brin, G., Chum, E., Gourlay, W.A., Levin, A. (2009). Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease. *Cardiovasc.Res.* 84, 494-504.
- Cleaver, O., Krieg, P.A. (1998). VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in *Xenopus*. *Development* 125, 3905-3914.
- Cohen-Haguener, O., Barton, P.J., Van Cong, N., Cohen, A., Masset, M., Buckingham, M., Frezal, J. (1989). Chromosomal assignment of two myosin alkali light-chain genes encoding the ventricular/slow skeletal muscle isoform and the atrial/fetal muscle isoform (MYL3, MYL4). *Hum.Genet.* 81, 278-282.
- Cohen-Kaplan, V., Naroditsky, I., Zetser, A., Ilan, N., Vlodaysky, I., Doweck, I. (2008). Heparanase induces VEGF C and facilitates tumor lymphangiogenesis. *Int.J.Cancer* 123, 2566-2573.
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., Colgan, S.P. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 62, 3387-3394.
- Compagni, A., Wilgenbus, P., Impagnatiello, M.A., Cotten, M., Christofori, G. (2000). Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 60, 7163-7169.
- Cosentino, F., Katusic, Z.S. (1995). Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 91, 139-144.
- Crane, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., Tainer, J.A. (1998). Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279, 2121-2126.
- D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 4082-4085.
- da Silva, C.G., Specht, A., Wegiel, B., Ferran, C., Kaczmarek, E. (2009). Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation* 119, 871-879.

- Dasgupta,T.P., Aquart,D.V. (2005). Transfer of nitric oxide from nitrovasodilators to free thiols--evidence of two distinct stages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 335, 730-733.
- Davis,S., Aldrich,T.H., Jones,P.F., Acheson,A., Compton,D.L., Jain,V., Ryan,T.E., Bruno,J., Radziejewski,C., Maisonpierre,P.C., Yancopoulos,G.D. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-1169.
- De Flora,S., Izzotti,A., D'Agostini,F., Cesarone,C.F. (1991). Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am.J.Med.* 91, 122S-130S.
- de,M.J., Jr., Nicolau,S.M., Stavale,J.N., Silva Pinhal,M.A., de Matos,L.L., Baracat,E.C., de Lima,G.R. (2009). Heparanase-2 expression in normal ovarian epithelium and in benign and malignant ovarian tumors. *Int.J.Gynecol.Cancer* 19, 1494-1500.
- DeBerardinis,R.J. (2008). Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet.Med.* 10, 767-777.
- Deroanne,C.F., Hajitou,A., Calberg-Bacq,C.M., Nusgens,B.V., Lapiere,C.M. (1997). Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 57, 5590-5597.
- Difrancesco,D. (2010). The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ.Res.* 106, 434-446.
- Dimmeler,S., Dernbach,E., Zeiher,A.M. (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 477, 258-262.
- Doetschman,T., Williams,P., Maeda,N. (1988). Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev.Biol.* 127, 224-227.
- Doetschman,T.C., Eistetter,H., Katz,M., Schmidt,W., Kemler,R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 87, 27-45.
- Doevendans,P.A., Bronsaer,R., Lozano,P.R., Kubalak,S., van Bilsen,M. (2000). The murine atrial myosin light chain-2 gene: a member of an evolutionarily conserved family of contractile proteins. *Cytogenet.Cell Genet.* 90, 248-252.
- Drake,C.J. (2003). Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res.C.Embryo.Today* 69, 73-82.
- Dvorak,H.F., Gresser,I. (1989). Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumors in mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 81, 497-502.
- Dzeja,P.P., Bortolon,R., Perez-Terzic,C., Holmuhamedov,E.L., Terzic,A. (2002). Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 10156-10161.
- Efstathiou,E., Logothetis,C.J. (2009). Prostate cancer: thalidomide for prostate cancer: is there progress? *Nat.Rev.Urol.* 6, 248-250.

- El Remessy,A.B., Al Shabrawey,M., Platt,D.H., Bartoli,M., Behzadian,M.A., Ghaly,N., Tsai,N., Motamed,K., Caldwell,R.B. (2007). Peroxynitrite mediates VEGF's angiogenic signal and function via a nitration-independent mechanism in endothelial cells. *FASEB J.* *21*, 2528-2539.
- Errico,M., Riccioni,T., Iyer,S., Pisano,C., Acharya,K.R., Persico,M.G., De Falco,S. (2004). Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *J.Biol.Chem.* *279*, 43929-43939.
- Evans,M.J., Kaufman,M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154-156.
- Ferguson,J.E., III, Kelley,R.W., Patterson,C. (2005). Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* *25*, 2246-2254.
- Ferrara,N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr.Rev.* *25*, 581-611.
- Ferrara,N., Alitalo,K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat.Med.* *5*, 1359-1364.
- Ferrara,N., Henzel,W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* *161*, 851-858.
- Figuroa,S., Canadas,S., Arce,C., Oset-Gasque,M.J., Gonzalez,M.P. (2005). SNAP, a NO donor, induces cortical neuron death by a mechanism in which the caspase pathway is implicated. *Brain Res.* *1047*, 168-176.
- Folkman,J., Hochberg,M. (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *J.Exp.Med.* *138*, 745-753.
- Forsythe,J.A., Jiang,B.H., Iyer,N.V., Agani,F., Leung,S.W., Koos,R.D., Semenza,G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol.Cell Biol.* *16*, 4604-4613.
- Franco,D., Markman,M.M., Wagenaar,G.T., Ya,J., Lamers,W.H., Moorman,A.F. (1999). Myosin light chain 2a and 2v identifies the embryonic outflow tract myocardium in the developing rodent heart. *Anat.Rec.* *254*, 135-146.
- Fury,M.G., Zahalsky,A., Wong,R., Venkatraman,E., Lis,E., Hann,L., Aliff,T., Gerald,W., Fleisher,M., Pfister,D.G. (2007). A Phase II study of SU5416 in patients with advanced or recurrent head and neck cancers. *Invest New Drugs* *25*, 165-172.
- Gage,F.H., Ray,J., Fisher,L.J. (1995). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu.Rev.Neurosci.* *18*, 159-192.
- Gao,N., Lu,M., Echeverri,F., Laita,B., Kalabat,D., Williams,M.E., Hevezi,P., Zlotnik,A., Moyer,B.D. (2009). Voltage-gated sodium channels in taste bud cells. *BMC.Neurosci.* *10*, 20.
- Ge,Y., Byun,J.S., De Luca,P., Gueron,G., Yabe,I.M., Sadiq-Ali,S.G., Figg,W.D., Quintero,J., Haggerty,C.M., Li,Q.Q., De Siervi,A., Gardner,K. (2008). Combinatorial antileukemic disruption of oxidative homeostasis and mitochondrial stability by the redox reactive

thalidomide 2-(2,4-difluoro-phenyl)-4,5,6,7-tetrafluoro-1H-isoindole-1,3(2H)-dione (CPS49) and flavopiridol. *Mol.Pharmacol.* 74, 872-883.

Ge,Y., Montano,I., Rustici,G., Freebern,W.J., Haggerty,C.M., Cui,W., Ponciano-Jackson,D., Chandramouli,G.V., Gardner,E.R., Figg,W.D., Abu-Asab,M., Tsokos,M., Jackson,S.H., Gardner,K. (2006). Selective leukemic-cell killing by a novel functional class of thalidomide analogs. *Blood* 108, 4126-4135.

Geiszt,M., Lekstrom,K., Witta,J., Leto,T.L. (2003). Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 278, 20006-20012.

Geyer,J., Gavrilova,O., Petzinger,E. (2009a). Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein- and *bcrp*- deficient knockout mice. *J.Vet.Pharmacol.Ther.* 32, 87-96.

Geyer,J., Gavrilova,O., Petzinger,E. (2009b). The role of p-glycoprotein in limiting brain penetration of the peripherally acting anticholinergic overactive bladder drug trospium chloride. *Drug Metab Dispos.* 37, 1371-1374.

Ginis,I., Luo,Y., Miura,T., Thies,S., Brandenberger,R., Gerecht-Nir,S., Amit,M., Hoke,A., Carpenter,M.K., Itskovitz-Eldor,J., Rao,M.S. (2004). Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev.Biol.* 269, 360-380.

Good,D.J., Polverini,P.J., Rastinejad,F., Le Beau,M.M., Lemons,R.S., Frazier,W.A., Bouck,N.P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 6624-6628.

Goodell,M.A., Brose,K., Paradis,G., Conner,A.S., Mulligan,R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J.Exp.Med.* 183, 1797-1806.

Gospodarowicz,D., Abraham,J.A., Schilling,J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 7311-7315.

Griendling,K.K., Sorescu,D., Ushio-Fukai,M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* 86, 494-501.

Grunewald,F.S., Prota,A.E., Giese,A., Ballmer-Hofer,K. (2009). Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim.Biophys.Acta.*

Gupta,D., Treon,S.P., Shima,Y., Hideshima,T., Podar,K., Tai,Y.T., Lin,B., Lentzsch,S., Davies,F.E., Chauhan,D., Schlossman,R.L., Richardson,P., Ralph,P., Wu,L., Payvandi,F., Muller,G., Stirling,D.I., Anderson,K.C. (2001). Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 15, 1950-1961.

Hajitou,A., Sounni,N.E., Devy,L., Grignet-Debrus,C., Lewalle,J.M., Li,H., Deroanne,C.F., Lu,H., Colige,A., Nusgens,B.V., Frankenne,F., Maron,A., Yeh,P., Perricaudet,M., Chang,Y., Soria,C., Calberg-Bacq,C.M., Foidart,J.M., Noel,A. (2001). Down-regulation of vascular

endothelial growth factor by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: effect on in vivo mammary tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* *61*, 3450-3457.

Hansen,J.M., Harris,K.K., Philbert,M.A., Harris,C. (2002). Thalidomide modulates nuclear redox status and preferentially depletes glutathione in rabbit limb versus rat limb. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* *300*, 768-776.

Harfouche,R., Malak,N.A., Brandes,R.P., Karsan,A., Irani,K., Hussain,S.N. (2005). Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J.* *19*, 1728-1730.

Hescheler,J., Fleischmann,B.K., Lentini,S., Maltsev,V.A., Rohwedel,J., Wobus,A.M., Addicks,K. (1997). Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc.Res.* *36*, 149-162.

Hoff,P.M., Wolff,R.A., Bogaard,K., Waldrum,S., Abbruzzese,J.L. (2006). A Phase I study of escalating doses of the tyrosine kinase inhibitor semaxanib (SU5416) in combination with irinotecan in patients with advanced colorectal carcinoma. *Jpn.J.Clin.Oncol.* *36*, 100-103.

Holash,J., Maisonpierre,P.C., Compton,D., Boland,P., Alexander,C.R., Zagzag,D., Yancopoulos,G.D., Wiegand,S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* *284*, 1994-1998.

Hong,X., Nelson,K.K., Decarvalho,A.C., Kalkanis,S.N. (2009). Heparanase expression of glioma in human and animal models. *J.Neurosurg.*

Huang,N., Fleissner,F., Sun,J., Cooke,J. (2010). Role of Nitric Oxide Signaling in Endothelial Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.*

Hughes,S., Yang,H., Chan-Ling,T. (2000). Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* *41*, 1217-1228.

Hwang,J., Saha,A., Boo,Y.C., Sorescu,G.P., McNally,J.S., Holland,S.M., Dikalov,S., Giddens,D.P., Griendling,K.K., Harrison,D.G., Jo,H. (2003). Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O₂⁻ from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J.Biol.Chem.* *278*, 47291-47298.

Isenberg,J.S., Ridnour,L.A., Perruccio,E.M., Espey,M.G., Wink,D.A., Roberts,D.D. (2005). Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *102*, 13141-13146.

Ishida,A., Murray,J., Saito,Y., Kanthou,C., Benzakour,O., Shibuya,M., Wijelath,E.S. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J.Cell Physiol* *188*, 359-368.

Jankowski,M. (2008). Purinergic regulation of glomerular microvasculature and tubular function. *J.Physiol Pharmacol.* *59 Suppl 9*, 121-135.

Joukov,V., Pajusola,K., Kaipainen,A., Chilov,D., Lahtinen,I., Kukk,E., Saksela,O., Kalkkinen,N., Alitalo,K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* *15*, 290-298.

- Kabrun,N., Buhring,H.J., Choi,K., Ullrich,A., Risau,W., Keller,G. (1997). Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124, 2039-2048.
- Kaipainen,A., Korhonen,J., Pajusola,K., Aprelikova,O., Persico,M.G., Terman,B.I., Alitalo,K. (1993). The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J.Exp.Med.* 178, 2077-2088.
- Kanyshkova,T., Pawlowski,M., Meuth,P., Dube,C., Bender,R.A., Brewster,A.L., Baumann,A., Baram,T.Z., Pape,H.C., Budde,T. (2009). Postnatal expression pattern of HCN channel isoforms in thalamic neurons: relationship to maturation of thalamocortical oscillations. *J.Neurosci.* 29, 8847-8857.
- Kattman,S.J., Huber,T.L., Keller,G.M. (2006). Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev.Cell* 11, 723-732.
- Keck,P.J., Hauser,S.D., Krivi,G., Sanzo,K., Warren,T., Feder,J., Connolly,D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.
- Kehat,I., Gepstein,A., Spira,A., Itskovitz-Eldor,J., Gepstein,L. (2002). High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ.Res.* 91, 659-661.
- Keller,G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7, 862-869.
- Kenyon,B.M., Browne,F., D'Amato,R.J. (1997). Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp.Eye Res.* 64, 971-978.
- Ketzer,L.A., de Meis,L. (2008). Heat production by skeletal muscles of rats and rabbits and utilization of glucose 6-phosphate as ATP regenerative system by rats and rabbits heart Ca²⁺-ATPase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 369, 265-269.
- Khera,K.S. (1984). Ethylenethiourea-induced hindpaw deformities in mice and effects of metabolic modifiers on their occurrence. *J.Toxicol.Enviroin.Health* 13, 747-756.
- Kieran,M.W., Supko,J.G., Wallace,D., Fruscio,R., Poussaint,T.Y., Phillips,P., Pollack,I., Packer,R., Boyett,J.M., Blaney,S., Banerjee,A., Geyer,R., Friedman,H., Goldman,S., Kun,L.E., Macdonald,T. (2009). Phase I study of SU5416, a small molecule inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) in refractory pediatric central nervous system tumors. *Pediatr.Blood Cancer* 52, 169-176.
- Kim,G.D., Kim,G.J., Seok,J.H., Chung,H.M., Chee,K.M., Rhee,G.S. (2008). Differentiation of endothelial cells derived from mouse embryoid bodies: a possible in vitro vasculogenesis model. *Toxicol.Lett.* 180, 166-173.
- Kim,K.J., Li,B., Winer,J., Armanini,M., Gillett,N., Phillips,H.S., Ferrara,N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844.

- Kitadai,Y., Takahashi,Y., Haruma,K., Naka,K., Sumii,K., Yokozaki,H., Yasui,W., Mukaida,N., Ohmoto,Y., Kajiyama,G., Fidler,I.J., Tahara,E. (1999). Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br.J.Cancer* 81, 647-653.
- Kiziltepe,T., Hideshima,T., Ishitsuka,K., Ocio,E.M., Raje,N., Catley,L., Li,C.Q., Trudel,L.J., Yasui,H., Vallet,S., Kutok,J.L., Chauhan,D., Mitsiades,C.S., Saavedra,J.E., Wogan,G.N., Keefer,L.K., Shami,P.J., Anderson,K.C. (2007). JS-K, a GST-activated nitric oxide generator, induces DNA double-strand breaks, activates DNA damage response pathways, and induces apoptosis in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells. *Blood* 110, 709-718.
- Klagsbrun,M., D'Amore,P.A. (1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 259-270.
- Knobloch,J., Reimann,K., Klotz,L.O., Ruther,U. (2008). Thalidomide Resistance Is Based on the Capacity of the Glutathione-Dependent Antioxidant Defense. *Mol.Pharm.*
- Kobayashi,S., Nojima,Y., Shibuya,M., Maru,Y. (2004). Nox1 regulates apoptosis and potentially stimulates branching morphogenesis in sinusoidal endothelial cells. *Exp.Cell Res.* 300, 455-462.
- Komorowski,J., Jerczynska,H., Siejka,A., Baranska,P., Lawnicka,H., Pawlowska,Z., Stepien,H. (2006). Effect of thalidomide affecting VEGF secretion, cell migration, adhesion and capillary tube formation of human endothelial EA.hy 926 cells. *Life Sci.* 78, 2558-2563.
- Kumar,S., Sun,X., Wiseman,D.A., Tian,J., Umaphathy,N.S., Verin,A.D., Black,S.M. (2009). Hydrogen Peroxide Decreases Endothelial Nitric Oxide Synthase Promoter Activity through the Inhibition of Sp1 Activity. *DNA Cell Biol.* 28, 119-129.
- Kumar,S., Witzig,T.E., Rajkumar,S.V. (2004). Thalidomid: current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. *J.Clin.Oncol.* 22, 2477-2488.
- Kuwabara,S., Misawa,S., Kanai,K., Sawai,S., Hattori,T., Nishimura,M., Nakaseko,C. (2008). Thalidomide reduces serum VEGF levels and improves peripheral neuropathy in POEMS syndrome. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 79, 1255-1257.
- Lambeth,J.D., Cheng,G., Arnold,R.S., Edens,W.A. (2000). Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem.Sci.* 25, 459-461.
- Lassegue,B., Clempus,R.E. (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 285, R277-R297.
- Ledingham,J.M., Lavery,R. (1997). Nitric oxide synthase inhibition with N omega-nitro-L-arginine methyl ester affects blood pressure and cardiovascular structure in the genetically hypertensive rat strain. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 24, 433-435.
- Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V., Ferrara,N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
- Li,J.M., Mullen,A.M., Yun,S., Wientjes,F., Brouns,G.Y., Thrasher,A.J., Shah,A.M. (2002). Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Circ.Res.* 90, 143-150.

- Li,J.M., Shah,A.M. (2003). Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J.Biol.Chem.* 278, 12094-12100.
- Li,J.M., Shah,A.M. (2004). Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 287, R1014-R1030.
- Li,X., Liu,X., Wang,J., Wang,Z., Jiang,W., Reed,E., Zhang,Y., Liu,Y., Li,Q.Q. (2003). Thalidomide down-regulates the expression of VEGF and bFGF in cisplatin-resistant human lung carcinoma cells. *Anticancer Res.* 23, 2481-2487.
- Lopez-Talavera,J.C., Cadelina,G., Olchowski,J., Merrill,W., Groszmann,R.J. (1996). Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 23, 1616-1621.
- Lowry,O.H., Rosenborough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
- Lu,L., Payvandi,F., Wu,L., Zhang,L.H., Hariri,R.J., Man,H.W., Chen,R.S., Muller,G.W., Hughes,C.C., Stirling,D.I., Schafer,P.H., Bartlett,J.B. (2009). The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. *Microvasc.Res.* 77, 78-86.
- Luca,M., Huang,S., Gershenwald,J.E., Singh,R.K., Reich,R., Bar-Eli,M. (1997). Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am.J.Pathol.* 151, 1105-1113.
- Luczak,K., Balcerczyk,A., Soszynski,M., Bartosz,G. (2004). Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. *Cell Biol.Int.* 28, 483-486.
- Lyons,J.M., III, Schwimer,J.E., Anthony,C.T., Thomson,J.L., Cundiff,J.D., Casey,D.T., Maccini,C., Kucera,P., Wang,Y.Z., Boudreaux,J.P., Woltering,E.A. (2009). The Role of VEGF Pathways in Human Physiologic and Pathologic Angiogenesis. *J.Surg.Res.*
- Maisonpierre,P.C., Suri,C., Jones,P.F., Bartunkova,S., Wiegand,S.J., Radziejewski,C., Compton,D., McClain,J., Aldrich,T.H., Papadopoulos,N., Daly,T.J., Davis,S., Sato,T.N., Yancopoulos,G.D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60.
- Majumder,S., Rajaram,M., Muley,A., Reddy,H.S., Tamilarasan,K.P., Kolluru,G.K., Sinha,S., Siamwala,J.H., Gupta,R., Ilavarasan,R., Venkataraman,S., Sivakumar,K.C., Anishetty,S., Kumar,P.G., Chatterjee,S. (2009). Thalidomide attenuates nitric oxide-driven angiogenesis by interacting with soluble guanylyl cyclase. *Br.J.Pharmacol.* 158, 1720-1734.
- Marques-da-Silva,C., Burnstock,G., Ojcius,D.M., Coutinho-Silva,R. (2010). Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology.*
- Martin,G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 7634-7638.

- Masola,V., Maran,C., Tassone,E., Zin,A., Rosolen,A., Onisto,M. (2009). Heparanase activity in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma: implications for tumor invasion. *BMC.Cancer* 9, 304.
- Meyer,M., Clauss,M., Lepple-Wienhues,A., Waltenberger,J., Augustin,H.G., Ziche,M., Lanz,C., Buttner,M., Rziha,H.J., Dehio,C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 18, 363-374.
- Millauer,B., Longhi,M.P., Plate,K.H., Shawver,L.K., Risau,W., Ullrich,A., Strawn,L.M. (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res.* 56, 1615-1620.
- Millauer,B., Shawver,L.K., Plate,K.H., Risau,W., Ullrich,A. (1994). Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367, 576-579.
- Moldovan,L., Irani,K., Moldovan,N.I., Finkel,T., Goldschmidt-Clermont,P.J. (1999). The actin cytoskeleton reorganization induced by Rac1 requires the production of superoxide. *Antioxid.Redox.Signal.* 1, 29-43.
- Moncada,S., Palmer,R.M., Higgs,E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43, 109-142.
- Nabah,Y.N., Mateo,T., Cerda-Nicolas,M., Alvarez,A., Martinez,M., Issekutz,A.C., Sanz,M.J. (2005). L-NAME induces direct arteriolar leukocyte adhesion, which is mainly mediated by angiotensin-II. *Microcirculation.* 12, 443-453.
- Nadir,Y., Vlodaysky,I., Brenner,B. (2008). Heparanase, tissue factor, and cancer. *Semin.Thromb.Hemost.* 34, 187-194.
- Nakano,T., Kodama,H., Honjo,T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101.
- Namiki,A., Brogi,E., Kearney,M., Kim,E.A., Wu,T., Couffinhal,T., Varticovski,L., Isner,J.M. (1995). Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 270, 31189-31195.
- Nishikawa,S.I., Nishikawa,S., Hirashima,M., Matsuyoshi,N., Kodama,H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 1747-1757.
- No,J.H., Jo,H., Kim,S.H., Park,I.A., Kang,D., Lee,C.H., Han,S.S., Kim,J.W., Park,N.H., Kang,S.B., Song,Y.S. (2009). Expression of MMP-2, MMP-9, and urokinase-type plasminogen activator in cervical intraepithelial neoplasia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1171, 100-104.
- O'Donnell,A., Padhani,A., Hayes,C., Kakkar,A.J., Leach,M., Trigo,J.M., Scurr,M., Raynaud,F., Phillips,S., Aherne,W., Hardcastle,A., Workman,P., Hannah,A., Judson,I. (2005). A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points. *Br.J.Cancer* 93, 876-883.
- O'Reilly,M.S., Boehm,T., Shing,Y., Fukai,N., Vasios,G., Lane,W.S., Flynn,E., Birkhead,J.R., Olsen,B.R., Folkman,J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.

O'Reilly,M.S., Holmgren,L., Shing,Y., Chen,C., Rosenthal,R.A., Moses,M., Lane,W.S., Cao,Y., Sage,E.H., Folkman,J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328.

Ogawa,S., Oku,A., Sawano,A., Yamaguchi,S., Yazaki,Y., Shibuya,M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J.Biol.Chem.* 273, 31273-31282.

Oh,J., Seo,D.W., Diaz,T., Wei,B., Ward,Y., Ray,J.M., Morioka,Y., Shi,S., Kitayama,H., Takahashi,C., Noda,M., Stetler-Stevenson,W.G. (2004). Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res.* 64, 9062-9069.

Okafor,M.C. (2003). Thalidomide for erythema nodosum leprosum and other applications. *Pharmacotherapy* 23, 481-493.

Olofsson,B., Korpelainen,E., Pepper,M.S., Mandriota,S.J., Aase,K., Kumar,V., Gunji,Y., Jeltsch,M.M., Shibuya,M., Alitalo,K., Eriksson,U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 11709-11714.

Olofsson,B., Pajusola,K., Kaipainen,A., von Euler,G., Joukov,V., Saksela,O., Orpana,A., Pettersson,R.F., Alitalo,K., Eriksson,U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 2576-2581.

Pajusola,K., Aprelikova,O., Korhonen,J., Kaipainen,A., Pertovaara,L., Alitalo,R., Alitalo,K. (1992). FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res.* 52, 5738-5743.

Parman,T., Wiley,M.J., Wells,P.G. (1999). Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat.Med.* 5, 582-585.

Pechanova,O., Bernatova,I., Babal,P., Martinez,M.C., Kysela,S., Stvrtina,S., Andriantsitohaina,R. (2004). Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J.Hypertens.* 22, 1551-1559.

Petritz,J., Gottesman,M.M., Aran,J.M. (2004). An MDR-EGFP gene fusion allows for direct cellular localization, function and stability assessment of P-glycoprotein. *Curr.Drug Deliv.* 1, 43-56.

Pfeiffer,S., Leopold,E., Schmidt,K., Brunner,F., Mayer,B. (1996). Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br.J.Pharmacol.* 118, 1433-1440.

Pou,S., Pou,W.S., Brecht,D.S., Snyder,S.H., Rosen,G.M. (1992). Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 267, 24173-24176.

Purushothaman,A., Chen,L., Yang,Y., Sanderson,R.D. (2008). Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma. *J.Biol.Chem.* 283, 32628-32636.

- Qian,Y., Luo,J., Leonard,S.S., Harris,G.K., Millecchia,L., Flynn,D.C., Shi,X. (2003). Hydrogen peroxide formation and actin filament reorganization by Cdc42 are essential for ethanol-induced in vitro angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 278, 16189-16197.
- Quirici,N., Soligo,D., Bossolasco,P., Servida,F., Lumini,C., Delilieri,G.L. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp.Hematol.* 30, 783-791.
- Ray,J.M., Stetler-Stevenson,W.G. (1994). The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur.Respir.J.* 7, 2062-2072.
- Ribatti,D., Vacca,A., Nico,B., Roncali,L., Dammacco,F. (2001). Postnatal vasculogenesis. *Mech.Dev.* 100, 157-163.
- Richards,M., Fong,C.Y., Chan,W.K., Wong,P.C., Bongso,A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat.Biotechnol.* 20, 933-936.
- Ridnour,L.A., Isenberg,J.S., Espey,M.G., Thomas,D.D., Roberts,D.D., Wink,D.A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 13147-13152.
- Risau,W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Risau,W., Sariola,H., Zerwes,H.G., Sasse,J., Ekblom,P., Kemler,R., Doetschman,T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102, 471-478.
- Robertson,E., Bradley,A., Kuehn,M., Evans,M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
- Ruef,J., Hu,Z.Y., Yin,L.Y., Wu,Y., Hanson,S.R., Kelly,A.B., Harker,L.A., Rao,G.N., Runge,M.S., Patterson,C. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ.Res.* 81, 24-33.
- Santini,M.T., Rainaldi,G., Indovina,P.L. (2000). Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 36, 75-87.
- Sauer,H., Bekhite,M.M., Hescheler,J., Wartenberg,M. (2005). Redox control of angiogenic factors and CD31-positive vessel-like structures in mouse embryonic stem cells after direct current electrical field stimulation. *Exp.Cell Res.* 304, 380-390.
- Sauer,H., Gunther,J., Hescheler,J., Wartenberg,M. (2000). Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals. *Am.J.Pathol.* 156, 151-158.
- Sauer,H., Ritgen,J., Hescheler,J., Wartenberg,M. (1998). Hypotonic Ca²⁺ signaling and volume regulation in proliferating and quiescent cells from multicellular spheroids. *J.Cell Physiol* 175, 129-140.

- Sawada,T., Kato,Y., Sakayori,N., Takekawa,Y., Kobayashi,M. (1999). Expression of the multidrug-resistance P-glycoprotein (Pgp, MDR-1) by endothelial cells of the neovasculature in central nervous system tumors. *Brain Tumor Pathol.* *16*, 23-27.
- Schmelter,M., Ateghang,B., Helmig,S., Wartenberg,M., Sauer,H. (2006). Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J.* *20*, 1182-1184.
- Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., Dvorak,H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* *219*, 983-985.
- Senger,D.R., Perruzzi,C.A., Feder,J., Dvorak,H.F. (1986). A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* *46*, 5629-5632.
- Sessa,W.C. (2009a). Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide. *J.Thromb.Haemost.* *7 Suppl 1*, 35-37.
- Sessa,W.C. (2009b). Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide. *J.Thromb.Haemost.* *7 Suppl 1*, 35-37.
- Shamblott,M.J., Axelman,J., Wang,S., Bugg,E.M., Littlefield,J.W., Donovan,P.J., Blumenthal,P.D., Huggins,G.R., Gearhart,J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *95*, 13726-13731.
- Sharom,F.J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* *9*, 105-127.
- Shibuya,M., Yamaguchi,S., Yamane,A., Ikeda,T., Tojo,A., Matsushime,H., Sato,M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* *5*, 519-524.
- Shimazawa,R., Sano,H., Tanatani,A., Miyachi,H., Hashimoto,Y. (2004). Thalidomide as a nitric oxide synthase inhibitor and its structural development. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* *52*, 498-499.
- Shing,Y., Folkman,J., Sullivan,R., Butterfield,C., Murray,J., Klagsbrun,M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* *223*, 1296-1299.
- Shweiki,D., Itin,A., Soffer,D., Keshet,E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* *359*, 843-845.
- Slivka,S.R., Landeen,L.K., Zeigler,F., Zimmer,M.P., Bartel,R.L. (1993). Characterization, barrier function, and drug metabolism of an in vitro skin model. *J.Invest Dermatol.* *100*, 40-46.
- Smith,A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* *17*, 435-462.
- Smithells,R.W. (1973). Defects and disabilities of thalidomide children. *Br.Med.J.* *1*, 269-272.

Smithells,R.W., Newman,C.G. (1992). Recognition of thalidomide defects. *J.Med.Genet.* 29, 716-723.

Sorescu,G.P., Song,H., Tressel,S.L., Hwang,J., Dikalov,S., Smith,D.A., Boyd,N.L., Platt,M.O., Lassegue,B., Griendling,K.K., Jo,H. (2004). Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ.Res.* 95, 773-779.

Spiekermann,K., Dirschinger,R.J., Schwab,R., Bagrintseva,K., Faber,F., Buske,C., Schnittger,S., Kelly,L.M., Gilliland,D.G., Hiddemann,W. (2003a). The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* 101, 1494-1504.

Spiekermann,K., Faber,F., Voswinckel,R., Hiddemann,W. (2002). The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells. *Exp.Hematol.* 30, 767-773.

Stemple,D.L., Anderson,D.J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973-985.

Stevens,D.R., Seifert,R., Bufe,B., Muller,F., Kremmer,E., Gauss,R., Meyerhof,W., Kaupp,U.B., Lindemann,B. (2001). Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413, 631-635.

Stone,J.R., Collins,T. (2002). The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 9, 231-238.

Strijdom,H., Chamane,N., Lochner,A. (2009). Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc.J.Afr.* 20, 303-310.

Surges,R., Brewster,A.L., Bender,R.A., Beck,H., Feuerstein,T.J., Baram,T.Z. (2006). Regulated expression of HCN channels and cAMP levels shape the properties of the h current in developing rat hippocampus. *Eur.J.Neurosci.* 24, 94-104.

Sutherland,R.M. (1986). Importance of critical metabolites and cellular interactions in the biology of microregions of tumors. *Cancer* 58, 1668-1680.

Sutherland,R.M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177-184.

Takahashi,H., Shibuya,M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin.Sci.(Lond)* 109, 227-241.

Takahashi,K., Okita,K., Nakagawa,M., Yamanaka,S. (2007a). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat.Protoc.* 2, 3081-3089.

Takahashi,K., Tanabe,K., Ohnuki,M., Narita,M., Ichisaka,T., Tomoda,K., Yamanaka,S. (2007b). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Takahashi,Y., Tucker,S.L., Kitadai,Y., Koura,A.N., Bucana,C.D., Cleary,K.R., Ellis,L.M. (1997). Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch.Surg.* 132, 541-546.

Tamilarasan,K.P., Kolluru,G.K., Rajaram,M., Indhumathy,M., Saranya,R., Chatterjee,S. (2006). Thalidomide attenuates nitric oxide mediated angiogenesis by blocking migration of endothelial cells. *BMC.Cell Biol.* 7, 17.

ten Freyhaus,H., Huntgeburth,M., Wingler,K., Schnitker,J., Baumer,A.T., Vantler,M., Bekhite,M.M., Wartenberg,M., Sauer,H., Rosenkranz,S. (2006). Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovasc.Res.* 71, 331-341.

Teo,S.K. (2005). Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS.J.* 7, E14-E19.

Teoh,M.L., Fitzgerald,M.P., Oberley,L.W., Domann,F.E. (2009). Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. *Cancer Res.* 69, 6355-6363.

Terman,B.I., Carrion,M.E., Kovacs,E., Rasmussen,B.A., Eddy,R.L., Shows,T.B. (1991). Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 1677-1683.

Thadani,N.A., McNamee,J.P., Winn,L.M. (2006). Thalidomide alters c-MYB and PIM-1 signaling in K-562 cells. *Pharmacol.Res.* 54, 91-96.

Therapontos,C., Erskine,L., Gardner,E.R., Figg,W.D., Vargesson,N. (2009a). Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 8573-8578.

Therapontos,C., Erskine,L., Gardner,E.R., Figg,W.D., Vargesson,N. (2009b). Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 8573-8578.

Thomson,J.A., Itskovitz-Eldor,J., Shapiro,S.S., Waknitz,M.A., Swiergiel,J.J., Marshall,V.S., Jones,J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Tischer,E., Gospodarowicz,D., Mitchell,R., Silva,M., Schilling,J., Lau,K., Crisp,T., Fiddes,J.C., Abraham,J.A. (1989). Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 165, 1198-1206.

Trussardi-Regnier,A., Lavenus,S., Gorisse,M.C., Dufer,J. (2009). Thalidomide alters nuclear architecture without ABCB1 gene modulation in drug-resistant myeloma cells. *Int.J.Oncol.* 35, 641-647.

Ushio-Fukai,M. (2007). VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid.Redox.Signal.* 9, 731-739.

Ushio-Fukai,M., Tang,Y., Fukai,T., Dikalov,S.I., Ma,Y., Fujimoto,M., Quinn,M.T., Pagano,P.J., Johnson,C., Alexander,R.W. (2002). Novel role of gp91(phox)-containing

NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ.Res.* 91, 1160-1167.

Vailhe,B., Vittet,D., Feige,J.J. (2001). In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 81, 439-452.

van Wetering,S., van Buul,J.D., Quik,S., Mul,F.P., Anthony,E.C., ten Klooster,J.P., Collard,J.G., Hordijk,P.L. (2002). Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J.Cell Sci.* 115, 1837-1846.

Vepa,S., Scribner,W.M., Parinandi,N.L., English,D., Garcia,J.G., Natarajan,V. (1999). Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am.J.Physiol* 277, L150-L158.

Vignais,P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol.Life Sci.* 59, 1428-1459.

Vilaboa,N.E., Galan,A., Troyano,A., de Blas,E., Aller,P. (2000). Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J.Biol.Chem.* 275, 24970-24976.

Vlodavsky,I., Elkin,M., Abboud-Jarrous,G., Levi-Adam,F., Fuks,L., Shafat,I., Ilan,N. (2008). Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression. *Connect.Tissue Res.* 49, 207-210.

Wartenberg,M., Diedershagen,H., Hescheler,J., Sauer,H. (1999). Growth stimulation versus induction of cell quiescence by hydrogen peroxide in prostate tumor spheroids is encoded by the duration of the Ca(2+) response. *J.Biol.Chem.* 274, 27759-27767.

Wartenberg,M., Donmez,F., Ling,F.C., Acker,H., Hescheler,J., Sauer,H. (2001). Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB J.* 15, 995-1005.

Wartenberg,M., Frey,C., Diedershagen,H., Ritgen,J., Hescheler,J., Sauer,H. (1998). Development of an intrinsic P-glycoprotein-mediated doxorubicin resistance in quiescent cell layers of large, multicellular prostate tumor spheroids. *Int.J.Cancer* 75, 855-863.

Wartenberg,M., Ling,F.C., Muschen,M., Klein,F., Acker,H., Gassmann,M., Petrat,K., Putz,V., Hescheler,J., Sauer,H. (2003). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J.* 17, 503-505.

Wartenberg,M., Richter,M., Datchev,A., Gunther,S., Milosevic,N., Bekhite,M.M., Figulla,H.R., Aran,J.M., Petriz,J., Sauer,H. (2009). Glycolytic pyruvate regulates P-Glycoprotein expression in multicellular tumor spheroids via modulation of the intracellular redox state. *J.Cell Biochem.* 109, 434-446.

Westfall,M.V., Pasyk,K.A., Yule,D.I., Samuelson,L.C., Metzger,J.M. (1997). Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures. *Cell Motil.Cytoskeleton* 36, 43-54.

Xia,Y., Tsai,A.L., Berka,V., Zweier,J.L. (1998). Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J.Biol.Chem.* 273, 25804-25808.

Xu,C., Inokuma,M.S., Denham,J., Golds,K., Kundu,P., Gold,J.D., Carpenter,M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat.Biotechnol.* 19, 971-974.

Yamanaka,S., Takahashi,K. (2006). [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 51, 2346-2351.

Yamaoka-Tojo,M., Ushio-Fukai,M., Hilenski,L., Dikalov,S.I., Chen,Y.E., Tojo,T., Fukai,T., Fujimoto,M., Patrushev,N.A., Wang,N., Kontos,C.D., Bloom,G.S., Alexander,R.W. (2004). IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ.Res.* 95, 276-283.

Yamazaki,Y., Takani,K., Atoda,H., Morita,T. (2003). Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J.Biol.Chem.* 278, 51985-51988.

Yoshida,M., Akaike,T., Wada,Y., Sato,K., Ikeda,K., Ueda,S., Maeda,H. (1994). Therapeutic effects of imidazolineoxyl N-oxide against endotoxin shock through its direct nitric oxide-scavenging activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 202, 923-930.

Zheng,L.D., Tong,Q.S., Tang,S.T., Du,Z.Y., Liu,Y., Jiang,G.S., Cai,J.B. (2009). Expression and clinical significance of heparanase in neuroblastoma. *World J.Pediatr.* 5, 206-210.

10. Anhang

10.1 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Bisherige Veröffentlichungen

Milosevic N, Bekhite MM, Sharifpanah F, Ruhe C, Wartenberg M, Sauer H. (2010). Stimulation of cardiomyogenesis versus inhibition of vasculogenesis upon treatment of mouse embryonic stem cells with thalidomide. **Antioxidans & Redox Signaling**, in Drucklegung

Wartenberg M, Richter M, Datchev A, Günther S, **Milosevic N**, Bekhite MM, Figulla H.-R, Aran J.M, Petriz J, Sauer H. (2009). Glycolytic pyruvate regulates P-glycoprotein expression in multicellular tumour spheroids via modulation of the intracellular redox state. **J. Cell. Biochem.**

Vorträge

Milosevic N, Lange S, Finkensieper A, Hannig M, Wartenberg M, Sauer H. (2008). Confrontation cultures of embryonic stem cell-derived embryoid bodies and multicellular tumour spheroids: a novel *in vitro* model for the study of tumour-induced angiogenesis. **eSI-Workshop “Reaching the Young Scientist”, Pueblo Alicante, Spain, ecopa Science Initiative conference-book.**

Poster Präsentationen

Milosevic N, Sharifpanah F, Wartenberg M, Sauer H. (2010). Thalidomide stimulates cardiomyogenesis and inhibits vasculogenesis of mouse embryonic stem cells by unbalancing ROS / NO generation. **ECCPS Retreat 2010, Max-Planck-Institute, Bad Nauheim, Germany.**

Milosevic N, Sharifpanah F, Wartenberg M, Sauer H (2010). Stimulation of cardiomyogenesis versus inhibition of vasculogenesis upon treatment of mouse embryonic stem cells with thalidomide. **Physiology Conference 2010. Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, Copenhagen, Denmark.**

Wartenberg M, Richter M, Datchev A, Günther S, **Milosevic N**, Bekhite MM, Figulla H.-R, Aran J, Petriz J, Sauer H. (2010). Glycolytic pyruvate regulates P-glycoprotein expression in multicellular tumour spheroids via modulation of the intracellular redox state. **Physiology Conference 2010. Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, Copenhagen, Denmark.**

Milosevic N, Finkensieper A, Hannig M, Wartenberg M, Sauer H. (2009). Tumour-induced angiogenesis analysed in confrontation cultures of multicellular tumour spheroids and embryonic stem cell-derived embryoid bodies. **88th Annual Meeting of the German Society of Physiology (DPG), Gießen, Germany, “Acta Physiologica” 2009, Vol. 195, Sopplement 669.**

Milosevic N, Lange S, Finkensieper A, Hannig M, Wartenberg M, Sauer H. (2008). Confrontation cultures of embryonic stem cell-derived embryoid bodies and multicellular tumour spheroids: a novel model for the study of tumour-induced angiogenesis. **15th Congress on “Alternatives to Animal Experimentation”, Linz, Austria. “ALTEX” 2008, Vol. 25, Supplement 1.**

10.2 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die während meiner Doktorarbeit für mich da waren, mich motivierten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. H. Sauer danke ich für die lehrreiche Zeit in seiner Arbeitsgruppe, die vielfältige Unterstützung bei der Beurteilung der Versuche und Kongressvorbereitungen sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. M. Bergmann danke ich für seine Betreuung meiner Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin.

Bei Frau Dr. F. Sharifpanah möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei den letzten Versuchen meiner Doktorarbeit bedanken. Danke!

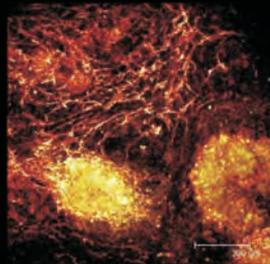
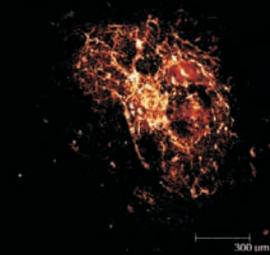
Meiner ehemaligen Kollegin, Dr. Sabine Lange danke ich ganz besonders herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und alle Diskussionen sowohl beim Kaffchen im Labor als auch bei (etwas mehr) Wein nach Feierabend. Vielen, vielen Dank!

Barbara Arnold danke ich für ihren Einsatz und Hilfe in der Zellkultur, sowie ihre „Beschwörung“ jeder einzelnen Spinnerflasche.

Auch möchte ich meinen (ehemaligen) Kollegen Martina Buggisch, Manju Padmasekar, Rajender Nandigama, Sascha Behr, Sepali Jayarathne, Steffie Engel, Paul Steffen, Carlo Thiel, Sonja Kessler und Rochelle D'Souza dafür danken das die vier Jahre meiner Doktorarbeit nur auf dem Papier lang vorkommen.

Der größte Dank geht an meine Familie und freunde die den ganzen Weg mit mir gegangen sind und an meinen Freund der in der Endphase der Arbeit mitgefiebert hat. Danke!

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes die mir die Arbeit durch ihre Hilfsbereitschaft und Anregungen erleichtert haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5792-3



9 783835 957923