

**Wirkung des Akut-Phase-Proteins  
alpha-2-Makroglobulin auf  
die Vaskulogenese  
embryonaler Stammzellen der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Matthias Peter Beldoch

aus Tichau

Gießen 2011

Aus dem Physiologischen Institut der Justus- Liebig-Universität in Gießen  
(geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Schulz).

Gutachter: Prof. Dr. H. Sauer

Gutachter: Prof. Dr. K. T. Preissner

Tag der Disputation: 19.12.2011

# Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 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.

Heidelberg, Februar 2012

---

Matthias P. Beldoch

# Inhaltsverzeichnis

Erklärung .....	- 3 -
Inhaltsverzeichnis .....	- 4 -
Abkürzungsverzeichnis.....	- 8 -
1. Einleitung.....	- 10 -
1.1 Stammzellen.....	- 11 -
1.1 Vaskulogenese / Angiogenese .....	- 13 -
1.2 Zellspezifische Proteine.....	- 13 -
1.2.1 Endothelzellen / Endothelzellmarker .....	- 13 -
1.2.2 Proliferationsmarker .....	- 14 -
1.3 Kardiomyozyten.....	- 14 -
1.4 HUVEC.....	- 15 -
1.5 alpha-2-Makroglobulin / LRP-1 .....	- 15 -
1.6 Wachstumsfaktoren.....	- 16 -
1.6.1 bFGF.....	- 16 -
1.6.2 VEGF .....	- 16 -
1.7 Intrazelluläre Signaltransduktion.....	- 17 -
1.7.1 ERK 1/2.....	- 17 -
1.7.2 MAPK p38.....	- 18 -
1.7.3 PI3-Kinase .....	- 18 -

1.7.4	HIF-1 .....	- 18 -
1.7.5	NO / eNOS / p-eNOS .....	- 19 -
1.8	Zielsetzung .....	- 20 -
2	Material.....	- 21 -
2.1	Herstellerverzeichnis der verwendeten Materialien .....	- 21 -
2.2	Geräte und Laborbedarf .....	- 22 -
2.3	Chemikalien und Substanzen .....	- 23 -
2.4	Antikörper .....	- 24 -
2.5	Inhibitoren.....	- 25 -
2.5.1	LY294002.....	- 25 -
2.5.2	UO126 .....	- 25 -
2.5.3	PD98059 .....	- 26 -
2.5.4	L-NAME .....	- 26 -
2.5.5	SU5402 .....	- 27 -
2.6	Puffer .....	- 27 -
2.7	Medien.....	- 28 -
2.8	Zellen.....	- 29 -
3	Methoden .....	- 30 -
3.1	Zellkultur.....	- 30 -
3.1.1	MEF, Feeder-Zellen .....	- 30 -
3.1.2	Stammzellen / Spinnerflaschen-System .....	- 30 -

3.1.3	HUVEC .....	- 32 -
3.2	Behandlung der Zellen mit a2M.....	- 32 -
3.3	Immunhistochemie .....	- 34 -
3.4	Konfokale Laserscanmikroskopie.....	- 35 -
3.5	Statistik.....	- 35 -
4	Ergebnisse .....	- 36 -
4.1	PECAM / CD31.....	- 36 -
4.2	Wachstum der EBs.....	- 40 -
4.3	Kontraktile Areale in EBs.....	- 41 -
4.4	bFGF .....	- 41 -
4.5	ERK 1/2.....	- 43 -
4.6	PI3-Kinase.....	- 43 -
4.7	MAP p38.....	- 44 -
4.8	Intrazelluläres Stickstoffmonoxid .....	- 44 -
4.9	eNOS.....	- 46 -
4.10	Phospho-eNOS .....	- 46 -
4.11	VEGF .....	- 47 -
4.12	HIF-1 $\alpha$ .....	- 47 -
4.13	HUVEC.....	- 48 -
5	Diskussion.....	- 49 -
6	Zusammenfassung.....	- 56 -

7	Summary .....	- 57 -
8	Literaturverzeichnis .....	- 58 -

# Abkürzungsverzeichnis

*Tabelle 1: verwendete Abkürzungen*

<b>Abkürzung</b>	<b>Auflösung</b>
a2M	alpha-2-Makroglobulin
AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD31 / PECAM	Blutplättchen Endothelzelladhäsionsmolekül (cluster of differentiation molecule 31 / platelet endothelial cell adhesion molecule)
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EB	Embryonalkörperchen (embryoid body)
eNOS	endotheliale Stickstoffsynthase (endothelial nitric oxide synthase)
ES	embryonale Stammzelle
ERK	extrazellulär signal-regulierte Kinase
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (fibroblast growth factor 2)
h	Stunden
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor (hypoxia-inducible factor)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HUVEC	Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells)
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
kDA	Kilodalton
LIF	Leukämieinhibierender Faktor (leukaemia inhibitory factor)
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester



<b>Abkürzung</b>	<b>Auflösung</b>
cLSM	konfokales Laser Raster Mikroskop (confocal laser scanning microscopy)
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase Kinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mmol	Millimol
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
p38	p38 mitogen-aktivierte MAP-Kinase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBST	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Triton (phosphate buffered saline with Triton)
PECAM / CD31	Blutplättchen Endothelzelladhäsionsmolekül (cluster of differentiation molecule 31 / platelet endothelial cell adhesion molecule)
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
Raf	Ras-aktivierter Faktor
Ras	Rattensarkomvirus (rat sarcoma virus)
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
SR	Serumersatz (serumreplacement)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich durch Zellteilung und Differenzierung zu verschiedenen Gewebearten zu entwickeln. Seit der Entdeckung der ersten Stammzellen 1961 [Till & McCulloch, 1961] hat die Stammzellforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Embryonale Stammzellen bedürfen dabei - durch ihr einmalig hohes Differenzierungspotential - besonderer Aufmerksamkeit. 1981 wurden zum ersten Mal embryonale Stammzellen der Maus isoliert und kultiviert [Evans & Kaufman, 1981]. 1998 ist es erstmals gelungen humane embryonale Stammzellen zu kultivieren [Thomson, 1998].

Mittlerweile ist es sogar gelungen adulte, ausdifferenzierte Zellen in einen pluripotenten, embryonalen Stammzellen ähnelnden, Zustand zu bringen [Takahashi & Yamanaka, 2006]. Diese Entwicklung macht die Stammzellforschung noch bedeutender, da ein zentrales Problem der regenerativen Medizin beseitigt wird: das Problem der Abstoßungsreaktionen. Bei der Implantation aus embryonalen Stammzellen entstandenen Gewebematerials kommt es zu keiner Abstoßungsreaktion mehr, da nun das Gewebe aus patienteneigenen Zellen stammt. Obwohl autologe Stammzelltransplantate bisher nur selten eingesetzt werden, gibt es einzelne klinische Fälle: so berichteten z.B. Lendeckel et al. von einer erfolgreichen Transplantation autologer Fettstammzellen zur Behandlung großer Schädeldefekte [Lendeckel et al., 2004].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Grundlagen der kardiovaskulären Differenzierung embryonaler Stammzellen. Damit soll ein Beitrag zur zukünftigen Entwicklung von Therapien für kardiovaskuläre und onkologische Erkrankungen geleistet werden. Diese Erkrankungen sind mit zusammen knapp 70% die häufigsten Todesursachen in Deutschland [Statistisches Bundesamt, 2007]. Dadurch wird die Bedeutung einer möglichen Kontrolle und gezielten Steuerung der Entwicklung von Herzmuskelzellen und Gefäßen besonders deutlich. Dies kann im Sinne der regenerativen Medizin, z.B. nach Myokardinfarkten, oder im Sinne der anti-angiogenen Behandlung bei Tumorerkrankungen erfolgen. Bei dieser Behandlungsmethode wird versucht, die Blutversorgung maligner Tumoren zu

vermindern und so deren Wachstum einzuschränken [Hagedorn & Bikfalvi, 2000; Murphy et al., 2006].

## 1.1 Stammzellen

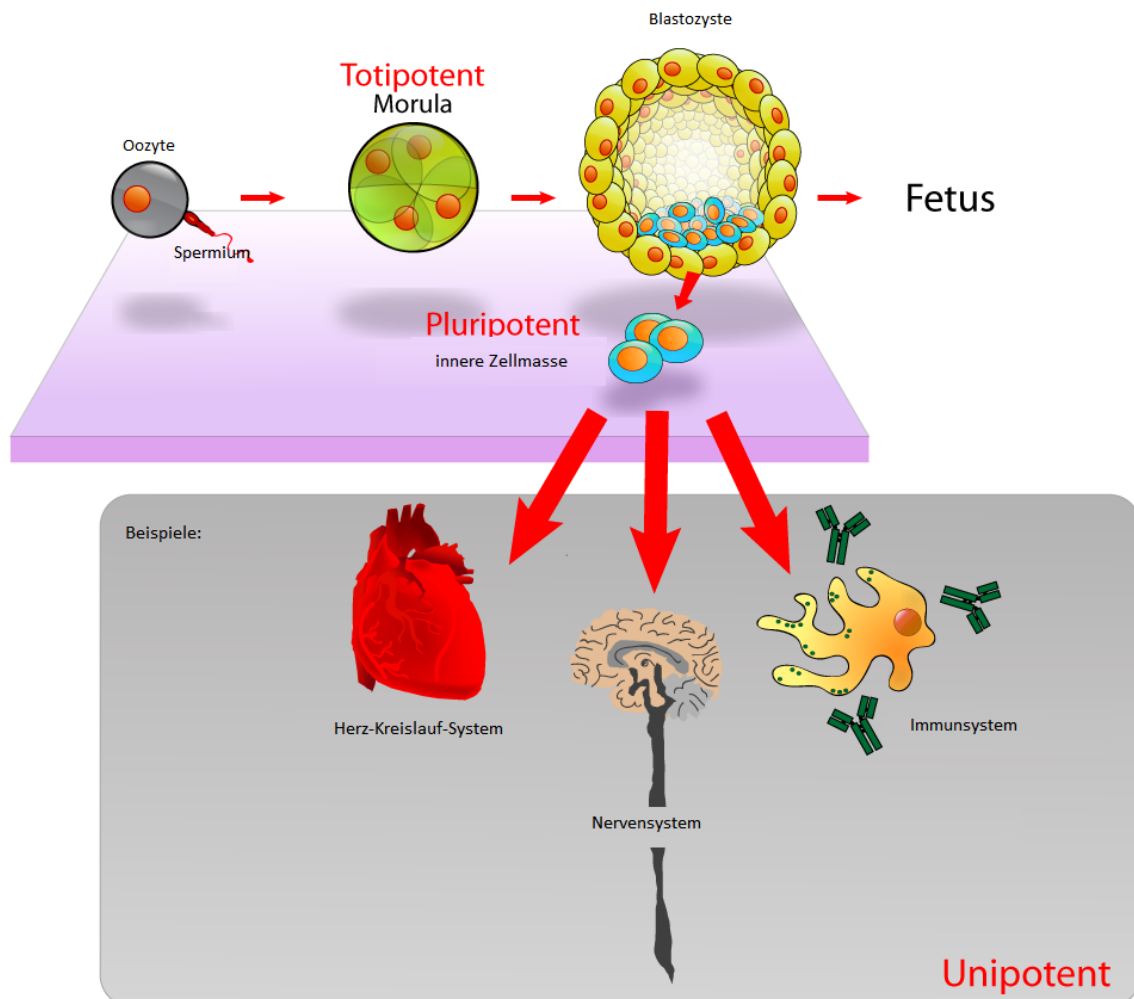
Stammzellen sind Körperzellen, welche die Fähigkeit besitzen sich unendlich oft teilen zu können und sich in verschiedene Gewebearten zu differenzieren. Dabei spielen die benachbarten Zellen eine entscheidende Rolle, indem sie verschiedene Botenstoffe, wie z.B. Wachstumsfaktoren, sezernieren und so das Verhalten der benachbarten Zellen – meist über rezeptorvermittelte intrazelluläre Signalkaskaden - beeinflussen.

Man unterscheidet grundsätzlich die embryonalen Stammzellen von den adulten. Die embryonalen Stammzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie zumindest pluri- oder sogar totipotent sind, sich also zu jedem Gewebe entwickeln können, bzw. sogar einen ganzen Organismus bilden können, während adulte Stammzellen schon spezialisiert sind und nur einige oder wenige Zellarten aus ihnen entstehen können.

Die ersten adulten Stammzellen, die beschrieben wurden, waren die in den 1960er Jahren entdeckten hämatopoetischen Stammzellen [Till & McCulloch, 1961]. Seither hat man verschiedene Stammzellen in den meisten Körpergeweben gefunden, darunter Fettstammzellen [Cherubino & Marra, 2009], neuronale Stammzellen [Lewis, 1968], endotheliale Stammzellen [Steinmetz et al., 2010], Keimzell-Stammzellen in Testis [Guan et al., 2006] und vor kurzem sogar in Ovarien [Tilly & Telfer, 2009]. Diese Zellen erfüllen vielfältige Funktionen im Körper und bilden meist Ersatzzellen für absterbende Körperzellen.

Pluripotente embryonale Stammzellen, wie sie in der medizinischen Forschung zur Verwendung kommen, werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen (Abbildung 1). Zu diesem Zeitpunkt können sich die Zellen in alle Gewebetypen differenzieren, die Fähigkeit, einen vollständigen und lebensfähigen Organismus zu bilden, haben sie jedoch nicht. Zellen aus denen ein

solcher Organismus hervorgehen kann sind totipotente Stammzellen. Dazu gehören die Zellen eines Embryos bis zum Achtzellstadium.



**Abbildung 1: Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste gewonnen und sind pluripotent [nach Jones, 2006].**

Die in dieser Arbeit verwendeten pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus wurden in Spinnerflaschen kultiviert und bildeten dreidimensionale Aggregate, sogenannte embryoid bodies (EBs). In diesen EBs laufen Differenzierungsvorgänge ab, die vergleichbar mit denen einer frühen Embryonalentwicklung sind [Keller, 1995]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass EBs embryonaler Stammzellen der Maus ein Maximum der Vaskularisation an Tag 8-10 der Differenzierung erreichen [Lange, 2008].

## **1.1 Vaskulogenese / Angiogenese**

Die Entwicklung des Blutgefäßsystems fängt bereits sehr früh während der Embryonalentwicklung an, um dem schnell wachsenden Embryo eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Der erste Schritt der Gefäßentwicklung ist die Vaskulogenese. Bei diesem Vorgang entstehen einzelne Gefäße de novo aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Dabei verdichtet sich das mesenchymale Gewebe im Bereich des extraembryonalen Mesenchyms [Noden, 1988 & 1991] und es entstehen Blutinseln. In einer zweiten Phase entwickelt sich dann das Blutgefäßsystem durch Sprossungen und Verzweigungen bestehender Gefäße, was man als Angiogenese bezeichnet. Während die Vaskulogenese physiologisch nur in der Embryonalentwicklung auftritt, ist die Angiogenese ein Prozess, der auch im adulten Organismus ständig vorzufinden ist. Die Angiogenese tritt während des Wachstums, nach Verletzungen aber auch bei Inflammationen und Neoplasien auf [Hunt et al., 1984; Ashraf et al., 2010]. Die vorliegende Arbeit hat eine Untersuchung der für die Prozesse der Vaskulogenese relevanten Faktoren zum Ziel.

## **1.2 Zellspezifische Proteine**

### **1.2.1 Endothelzellen / Endothelzellmarker**

Endothelzellen sind spezialisierte flache Epithelzellen, die den Innenraum von Gefäßen auskleiden. Sie bilden eine physiologische Grenze des Gewebes zum Blut und kontrollieren den Stoffaustausch in den verschiedenen Organen. Histologisch weisen Endothelzellen eine besonders hohe Anzahl von Tight-Junctions auf, die einen unkontrollierten, parazellulären Stoffaustausch weitgehend verhindern können. Je nach Lokalisation und damit einhergehender Funktion kann man Endothelien in kontinuierliche (z.B. Endothel der Blut-Hirn-Schranke), fenestrierte (z.B. Endothel der Glomeruli der Niere) und diskontinuierliche (z.B. Endothel der Leber) Typen einteilen.

Endothelzellen tragen ein Oberflächenantigen, das CD31 oder PECAM-1, welches es möglich macht mit Hilfe von spezifischen immunohistochemischen Färbungen Endothelzellen zu markieren. Somit können diese Färbungen in der kardiovaskulären embryonalen Stammzellforschung dazu verwendet werden, die Wirkung von z.B. angiogenen oder antiangiogenen Substanzen sichtbar und

messbar zu machen. CD31 gilt als ein Endothelzellmarker [Middleton et al., 2005]. Es handelt sich um ein 130-140 kDa großes, transmembranes Glykoprotein der Immunglobulin Superfamilie. Es ist an Zell-Zell-Verbindungen beteiligt [Teté et al., 2005]. CD31 wird in endothelialen Zellen stark exprimiert und eignet sich deshalb gut als Marker, obwohl es auch in Megakaryozyten, Thrombozyten, Plasmazellen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten schwach exprimiert wird [Teté et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit wird CD31 als Endothelzellmarker eingesetzt.

### **1.2.2 Proliferationsmarker**

Zur Markierung von sich teilenden HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) wird in der vorliegenden Arbeit das Protein Ki67 verwendet. Ki67 ist in allen Phasen des Zellzyklus humaner Zellen nachweisbar, nicht jedoch in der ruhenden Zelle [Scholzen & Gerdes, 2000]. Damit bietet sich dieses Protein hervorragend als Proliferationsmarker an.

### **1.3 Kardiomyozyten**

Kardiomyozyten sind längliche, teils verzweigte, einkernige Zellen aus denen der Herzmuskel, das Myokard, besteht. Ihre Kontraktion ist rhythmisch und unwillkürlich. Auch wenn das fertig ausgebildete Reizleitungssystem des Herzens sehr komplexer Natur ist, so hat auch jede einzelne Herzmuskelzelle die Fähigkeit zur spontanen Erregungsbildung und Kontraktion [Klinke & Silbernagel, 1996].

Die Differenzierung der Kardiomyozyten lässt sich einfach unter einem Lichtmikroskop kontrollieren: man kann bereits ab dem sechsten Entwicklungstag der EBs die Entwicklung kontraktile Areale in den EBs beobachten, eine funktionelle Einheit von Kardiomyozyten mit spontanen, rhythmischen Kontraktionen. Eine weitergehende Untersuchung der Differenzierung und der damit verbundenen Mechanismen wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

## 1.4 HUVEC

HUVEC sind aus einer Nabelschnurvene gewonnene Endothelzellen. Unter anderem durch ihre gute Verfügbarkeit, einfache Isolation und leichte Kultivierung sind sie in den letzten Jahrzehnten zu einem weitverbreiteten Modell für Untersuchungen an humanen Endothelien und der Angiogenese geworden [Maheshwari et al., 1991; Kleinman et al., 1986].

## 1.5 alpha-2-Makroglobulin / LRP-1

Alpha-2-Makroglobulin (a2M) ist ein Protease-Inhibitor aller Proteaseklassen. Es ist ein großes (720kDa) tetrameres Glykoprotein [Borth, 1994]. a2M gilt als Akut-Phase-Protein und spielt damit bei Entzündungsreaktionen eine Rolle. An der Signalkaskade der Blutgerinnung ist a2M als Co-Faktor ebenso beteiligt. Zudem kann es als Marker u.a. für das nephrotische Syndrom verwendet werden [Hallbach, 2006]. Außerdem werden a2M-Polymorphismen mit der Entstehung von Morbus Alzheimer in Zusammenhang gebracht [Blacker et al., 1998]. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte a2M als Stimulus für das hypertrophe Wachstum von Herzmuskelzellen [Padmasekar et al., 2007]. Ein Zusammenhang zwischen a2M und der Angiogenese wurde unter anderem von Asplin et al. (2001) beschrieben. Die Autoren haben in mehreren Studien eine Interaktion zwischen a2M und bFGF nachgewiesen [Asplin et al., 2001]. In Kombination mit den Erkenntnissen über eine positive Wirkung von bFGF auf die Angiogenese und die Fähigkeit / Möglichkeit der Differenzierung von Stammzellen zu endothelialen Zellen [Hagedorn & Bikfalvi, 2000] stellt sich die Frage nach der Wirkung von alpha-2-Makroglobulin auf die Entwicklung embryonaler Stammzellen zu Endothelzellen. Dies ist die Kernfrage, die mit der vorliegenden Arbeit geklärt werden soll.

LRP-1 (low density lipoprotein receptor – related protein 1) ist ein transmembraner Rezeptor, welcher in der Lage ist diverse Liganden zu binden. a2M gilt dabei als einer der wichtigsten Liganden [Strickland et al., 1990]. In dieser Arbeit soll eine Beteiligung des LRP-1 an einer möglichen a2M-induzierten Vaskulogenese überprüft werden.

## **1.6 Wachstumsfaktoren**

### **1.6.1 bFGF**

Basic fibroblast growth factor (bFGF), auch FGF-2 genannt, ist ein Wachstumsfaktor, der eine zentrale Rolle bei der embryonalen Entwicklung und insbesondere bei der Angiogenese einnimmt [Joseph-Silverstein & Rifkin, 1987; Schweigerer, 1989]. Er ist außerdem an der neuronalen Entwicklung und im adulten Organismus an gewebereparativen Vorgängen beteiligt [Haynes, 1988]. Eine Wechselwirkung zwischen bFGF und a2M wurde 2001 von Asplin und von Mathew beschrieben [Asplin et al., 2001; Mathew et al., 2003]. Diese Studienweisen ebenfalls auf die vermutete Bedeutsamkeit von a2M für die Vaskulogenese hin und eröffnen die Frage, inwiefern bFGF in eine möglicherweise a2M-induzierte Vaskulogenese involviert ist. Diese Frage soll anhand der vorliegenden Studie bearbeitet werden.

### **1.6.2 VEGF**

VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ein Wachstumsfaktor, der eine zentrale Rolle bei der Vaskulogenese einnimmt. Er fördert die Differenzierung zu Endothelzellen, indem er an eine Rezeptor-Tyrosinkinase, den VEGF-Rezeptor-2 (flk-1) bindet [Millauer et al., 1993] und eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden auslöst [Carmeliet & Collen, 2000; Yancopoulos et al., 2000; Cross et al., 2003]. Die Bedeutung von VEGF für die Vaskulogenese konnte unter anderem von Carmeliet et al. durch Versuche an Embryos mit hetero- und homozygot fehlerhaftem VEGF-Gen eindrucksvoll gezeigt werden, bei denen die Vaskularisierung abnormal oder gar nicht stattfand [Carmeliet et al., 1996].

Außerdem obliegt VEGF eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese und der Proliferation endothelialer Zellen [Ferrera & Henzel, 1989; Dvorak et al., 1995], sowie bei der Tumorangioenese [Kerbel, 2008]. Eine Zunahme der Vaskularisierung in EBs nach Stimulation mit VEGF konnte bereits in vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [Lange et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit soll der Zusammenhang zwischen der a2M-induzierten Vaskulogenese und VEGF untersucht werden.



## 1.7 Intrazelluläre Signaltransduktion

Die Kommunikation zwischen den Zellen ist für mehrzellige Organismen unentbehrlich. Dabei dienen extrazelluläre Signalmoleküle der Zellkommunikation. Die Fähigkeit diese Signalmoleküle zu erkennen und deren Signal zu verarbeiten ist also die Grundlage für die Existenz vielzelliger Organismen. Diese Signale beeinflussen oft sehr spezifisch über intrazelluläre Signalkaskaden die Genexpression der Zelle, somit ihre Entwicklung und Funktion.

Die Kommunikation der Zellen untereinander basiert auf folgendem Schema: Ein Signalmolekül bindet an ein Rezeptorprotein, das in der Zellmembran verankert sein kann oder als intrazellulärer Rezeptor für Stoffe, die ins Cytoplasma aufgenommen werden, existiert.

Grundsätzlich können verschiedene Klassen von Rezeptoren unterschieden werden, z.B. solche, die an Ionenkanäle, an G-Proteine oder Enzyme gekoppelt sind. Bei den beiden letzteren folgt meist die Aktivierung vieler kleiner intrazellulärer Signalmoleküle, der „Second Messenger“. Durch eine komplexe Signalkaskade werden so Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche die Proteinsynthese der Zelle beeinflussen und damit auch Differenzierung und Funktion.

### 1.7.1 ERK 1/2

Innerhalb der Zelle gibt es verschiedene bekannte Signalwege. Dazu gehört unter anderem der ERK 1/2 – Signalweg. ERK 1/2 (extrazellulär signal-regulierte Kinase 1/2, auch p44/p42 mitogen-aktivierte Proteinkinase genannt) ist eine MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase), die Hydroxylgruppen von Serin und Threonin phosphoryliert. ERK 1/2 wird ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Dies geschieht durch ein extrazelluläres Signal, das über einen sich autophosphorylierenden Tyrosin-Rezeptor eine komplexe Phosphorylierungskaskade auslöst, an deren Ende ERK 1/2 steht. Es ist bekannt, dass ERK 1/2 wiederum verschiedene Zielproteine, oft Transkriptionsfaktoren, phosphoryliert und damit aktiviert [Alberts et al., 2003]. Häufig führt diese Signalkaskade zu Zellwachstum, Zellteilung oder -Differenzierung [Alberts et al., 2003]. In früheren Untersuchungen

der Arbeitsgruppe konnten bestimmte Stimuli, z.B. mechanischer Stress, die Vaskulogenese unter Beteiligung von ERK 1/2 anregen [Schmelter et al., 2006]. In der vorliegenden Arbeit soll eine eventuelle Beteiligung von ERK 1/2 an der a2M-induzierten Vaskulogenese untersucht werden.

### **1.7.2 MAPK p38**

Die p38-mitogen aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) ist, wie ERK 1/2, eine weitere MAP-Kinase. Bei diesem intrazellulären Signalweg dienen diverse Stressfaktoren, Entzündungsfaktoren und Tumornekrosefaktoren als primäre Auslöser [Yong et al., 2009; Alberts et al. 2003]. Diese Signalkaskade wird häufig mit Apoptose, Entzündungsreaktionen, aber auch mit Zellwachstum und Differenzierung assoziiert [Yong et al., 2009]. Deshalb wird in dieser Arbeit die Mitwirkung der MAP p38 – Kinase an der a2M-induzierten Signalkaskade überprüft.

### **1.7.3 PI3-Kinase**

Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) ist eine Lipidkinase, die Inositolphospholipide phosphoryliert. Der PI3-Kinase-Signalweg beinhaltet die Beteiligung von AKT (Proteinkinase B), mTOR (mammalian target of rapamycin) und PIP3 (phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate) [Alberts et al. 2003]. Der Signalweg wird mit der Proteinsynthese, Angiogenese, Differenzierung, Apoptose und dem Zellzyklus in Verbindung gebracht [Altomare & Testa, 2007]. Deshalb soll in dieser Arbeit geprüft werden, inwieweit die PI3-Kinase auch in eine mögliche a2M-induzierte Vaskulogenese involviert ist.

### **1.7.4 HIF-1**

Hypoxia inducible factor - 1 (HIF-1) ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Er hemmt die Differenzierung und fördert über die Erhöhung der Genexpression von VEGF die Vaskulogenese unter

hypoxischen Bedingungen [Benizri et al., 2008; Alberts et al., 2003]. Beide HIF-1-Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert. Der regulierende Faktor HIF-1 $\alpha$  wird jedoch schnell über Prolyl-Hydroxylasen modifiziert, dann ubiquitiniert und über Proteasomen abgebaut, wobei dieser Prozess sauerstoffabhängig ist [Maxwell et al., 1999; Hsieh et al., 2007]. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es also nicht zur Hydroxylierung, sondern zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und vermehrter Dimerisierung mit HIF-1 $\beta$  und damit zur Aktivierung von HIF-1. In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern HIF-1 an einer möglichen a2M-induzierten Vaskulogenese beteiligt ist.

### **1.7.5 NO / eNOS / p-eNOS**

Für die Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO) als bedeutenden Botenstoff im kardiovaskulären System erhielten R. Furchgott, L. Ignarro und F. Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin [Nobel Foundation, 2010]. Es ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid eine vasodilatatorische Wirkung besitzt und u.a. von Endothelzellen freigesetzt werden kann [Griffith et al., 1984; Furchgott et al., 1984; Palmer et al., 1987]. Weiterhin ist NO auch als intrazellulärer Botenstoff bekannt [Alberts et al., 2003]. Das Enzym, welches den Stickstoff intrazellulär synthetisiert, wird als NO-Synthase (NOS) bezeichnet. Es sind drei Isoformen der NOS bekannt: die nNOS (neuronal NO-Synthase), die iNOS (induzierbare NO-Synthase) und die eNOS (endotheliale NO-Synthase). Die eNOS (auch NOS3) wird durch Phosphorylierung aktiviert [Dudzinski & Michel, 2007]. Die phosphorylierte und aktive Form wird auch als phospho-eNOS (p-eNOS) bezeichnet und synthetisiert intrazelluläres Stickstoffmonoxid.

Die Beteiligung von Stickstoffmonoxid an der Angiogenese wurde für HUVEC bereits beschrieben [Papapetropoulos et al., 1997]. Milosevic et al. zeigten eine angiogene Wirkung von NO bei embryonalen Stammzellen der Maus [Milosevic et al., 2010]. Nun soll auch eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid an der Signalkaskade einer möglichen a2M-induzierten Vaskulogenese in embryonalen Stammzellen der Maus in dieser Arbeit überprüft werden.

## 1.8 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss das Akut-Phase-Protein a2M auf die kardiovaskuläre Entwicklung in embryonalen Stammzellen der Maus hat und welche Mechanismen und Signalwege daran beteiligt sind. In diesem Sinne sollen in Bezug auf embryonale Stammzellen der Maus folgende Fragestellungen bearbeitet werden.

Es soll überprüft werden, ob a2M die Vaskulogenese stimuliert. Des Weiteren soll untersucht werden, ob a2M auch Auswirkungen auf das Größenwachstum von EBs hat und ob ein Einfluss auf die Differenzierung zu Kardiomyozyten vorliegt.

Der intrazelluläre Signalweg soll ebenfalls in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu soll überprüft werden, inwiefern a2M die Expression von bFGF, eNOS, VEGF und HIF-1 $\alpha$  stimuliert und ob ERK 1/2, PI3-Kinase und MAP p38 dabei aktiviert werden. Die Beteiligung von NO soll ebenfalls geklärt werden, wobei die intrazelluläre Konzentration von NO ebenso überprüft werden soll, wie auch die Expression und Aktivierung von eNOS.

Daraus ergeben sich folgende Hypothesen:

1. a2M stimuliert die Vaskulogenese.
2. a2M stimuliert das Größenwachstum von embryoid bodies.
3. a2M stimuliert die Differenzierung zu Kardiomyozyten.
4. a2M stimuliert die Expression von bFGF.
5. Die Stimulation mit a2M führt zur Aktivierung von ERK 1/2.
6. Die Stimulation mit a2M führt zur Aktivierung der PI3-Kinase.
7. Die Stimulation mit a2M führt zur Aktivierung von MAP p38.
8. Die Stimulation mit a2M erhöht das intrazelluläre NO.
9. a2M stimuliert die Expression von eNOS.
10. a2M führt zu einer Aktivierung von eNOS.
11. a2M stimuliert die Expression von VEGF.
12. a2M stimuliert die Expression von HIF-1 $\alpha$ .

## 2 Material

### 2.1 Herstellerverzeichnis der verwendeten Materialien

1. BD Biosciences GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
2. Biochrom, 12247 Berlin, Deutschland
3. BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH
4. Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65796 Bad Soden, Deutschland
5. Cell Signaling, 159 J Cummings Center Beverly, MA 01915, USA
6. Chemicon International, Hampshire SO53 4NF, UK
7. Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
8. Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
9. Heraeus Instruments, 63452 Hanau, Deutschland
10. Hirschmann Laborgeräte, 74246 Eberstadt, Deutschland
11. IKAWerke GmbH & Co.KG, 79219 Staufen, Deutschland
12. Integra Biosciences, 35463 Fernwald, Deutschland
13. Invitrogen, 76131 Karlsruhe, Deutschland
14. Kendro Laboratory Products, 63505 Langenselbold, Deutschland
15. Leica, 64625 Bensheim, Deutschland
16. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
17. Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Deutschland
18. Roth, 76231 Karlsruhe, Deutschland
19. PAA, 35091 Cölbe, Deutschland
20. Santa Cruz Biotechnologie Inc., Santa Cruz California, USA
21. Sartorius, 37075 Goettingen, Deutschland
22. Sigma (-Aldrich), 82024 Taufkirchen, Deutschland
23. VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland
24. Zeiss, 07745 Jena, Deutschland

## 2.2 Geräte und Laborbedarf

**Tabelle 2: eingesetzte Materialien mit Herstellerangabe**

<b>verwendete Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
bakteriologische Schalen	Greiner
Cellspin Rührsystem	Integra
Deckgläschen	Roth
Gewebekulturschalen	BD
Glasplättchen	Roth
Immersionsöl	Roth
Inkubatoren HERAcell® 240	Kendro
Inkubationsschalen	Roth
Konfokales Lasermikroskop	Leica
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	IKA
24-Multiwell Schalen	BD
Objektträger	Roth
Röhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner
Petriperm-Schalen	Greiner
pH-Meter digital	Sartorius
Pipetus®-standard	Hirschmann
Glaspipetten	Roth
Plastikpipetten	BD
Schüttler	VWR
Spinnerflaschen CELLspin 240	Integra
Sterilbank	Heraeus
Wasserbad	Hirschmann
Zentrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge Labofuge 300	Heraeus
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus

## 2.3 Chemikalien und Substanzen

*Tabelle 3: eingesetzte Substanzen mit Herstellerangabe*

<b>verwendete Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
a2M	Sigma
bFGF	Sigma
DAF-FM Diacetat	Molecular Probes
DMEM	Sigma
DMSO	Calbiochem
Dulbecco's PBS ohne Ca& Mg	PAA
Fetales bovines Serum (FBS)	Sigma
Fluoromount-GTM	Biozol
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA
LIF (ESGRO®)	Chemicon
L-NAME	Calbiochem
LY-294002 Hydrochlorid	Sigma
Kollagenase B	Roche
Mitomycin C	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom
NEA (100x)	Biochrom
PD98059	Sigma
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
Serum Replacement (SR)	Invitrogen
Sigmacote	Sigma
SU5402	Calbiochem
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA	Invitrogen
U0126	Calbiochem

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 4: primäre Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller und Katalognummer</b>
Monoklonal Ratte-anti-Maus-CD31 (clone 390)	Chemicon (CBL1337)
Monoklonal Maus-anti-FGF2 (clone bFM-2)	Upstate (05-118)
Polyklonal Kaninchen-anti-phospho- p44/42 MAP Kinase	Cell Signaling (9101)
Polyklonal Kaninchen-anti-phospho- PI3 Kinase (p85/p55)	Cell Signaling (4228)
Polyklonal Kaninchen-anti-phospho- p38 MAP Kinase	Cell Signaling (9211)
Monoklonal Kaninchen-anti-eNOS (49G3)	Cell Signaling (9586)
Monoklonal Maus-anti-HIF-1 alpha (clone H1alpha67)	Novus (NB100-105)
MonoklonalMaus-anti-VEGF Ab-7 (Clone VG1)	Lab Vision (MS1467-R7)
Polyklonal Ziege-anti-p-NOS3 (Ser 1177)	Santa Cruz (sc-12972)
Polyklonal Kaninchen-anti-Ki67	Abcam (ab66155)

**Tabelle 5: sekundäre Antikörper**

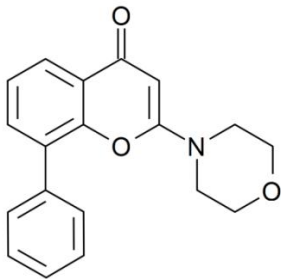
<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller und Katalognummer</b>
Cy 5-konjugiert Ziege-anti-Kaninchen IgG	Dianova (111-175-144)
Cy 5-konjugiert Schaf-anti-Maus IgG	Dianova (515-175-072)
FITZ-konjugiert Schaf-anti-Kaninchen IgG	Sigma (F7515)
FITZ-konjugiert Ziege-anti-Maus IgG	Sigma (F8771)
PE-Cy5-konjugiert Ziege-anti-Ratte IgG	Santa Cruz (sc-3830)



## 2.5 Inhibitoren

### 2.5.1 LY294002

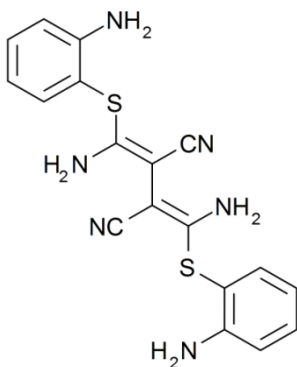
LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) ist ein spezifischer PI3-Kinase-Inhibitor. Es inhibiert die PI3-Kinase potent und reversibel ( $IC_{50}$  3,8 $\mu$ M), indem es kompetitiv die ATP-Bindungsstelle blockiert [Vlahos et al., 1994].



**Abbildung 2: 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, LY294002**

### 2.5.2 UO126

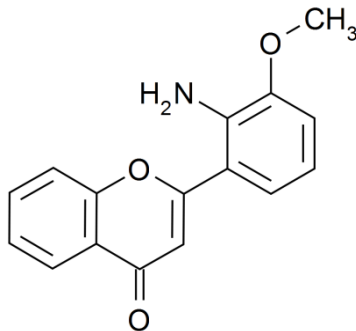
UO126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)-butadiene) ist ein spezifischer MEK 1/2-Inhibitor und somit ein Inhibitor des ERK 1/2-Signalweges. Es bewirkt eine potente Inhibition von MEK1 ( $IC_{50}$  72nM) und MEK2 ( $IC_{50}$  58nM). Dabei ist die Bindung nicht kompetitiv [Favata et al., 1998].



**Abbildung 3: 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)-butadiene, UO126**

### 2.5.3 PD98059

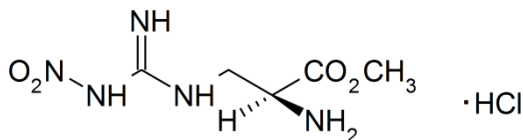
PD98059 (2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one) ist ebenfalls ein spezifischer MEK 1/2-Inhibitor und somit auch ein Inhibitor des ERK 1/2-Signalweges. PD98059 bewirkt eine potente, reversible, nicht kompetitive Inhibition von MEK 1/2 (IC<sub>50</sub> ~10µM) [Dudley et al., 1995].



**Abbildung 4: 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one, PD980589**

### 2.5.4 L-NAME

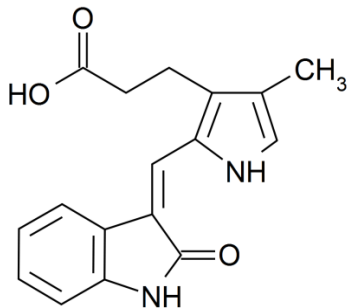
L-NAME (NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester) ist ein spezifischer Inhibitor der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Es bewirkt eine potente, langsam reversible, kompetitive Hemmung der eNOS (IC<sub>50</sub> 500nM) [Rees et al., 1990].



**Abbildung 5: NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester, L-NAME**

### 2.5.5 SU5402

SU5402 (3-[(3-(2-carboxyethyl)-4-methylpyrrol-2-yl)methylene]-2-indolinone) ist ein FGFR1 (FGF Rezeptor 1) Inhibitor und somit ein Inhibitor des bFGF-Signalweges. Es inhibiert kompetitiv und reversibel die ATP-Bindungsstelle (IC<sub>50</sub> 10-20µM) [Mohammadi et al., 1997].



**Abbildung 6: 3-[(3-(2-carboxyethyl)-4-methylpyrrol-2-yl)methylene]-2-indolinone, SU5402**

### 2.6 Puffer

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Pufferlösungen und deren Zusammensetzungen sind im Folgenden aufgeführt.

**Tabelle 6: verwendete Puffer und deren Zusammensetzung**

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	KCl 26,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14,7 mM NaCl 1,4 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 64,6 mM in H <sub>2</sub> O (bidest) gelöst
1x PBS	100 ml 10x PBS 900 ml H <sub>2</sub> O (bidest) HCl (pH Wert auf 7,4 eingestellt)

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS-T (0,1 %)	1x PBS, 1 Liter 1 ml Triton X-100
PBS-T (0,01 %)	1x PBS, 1 Liter 100 µl Triton X-100

## 2.7 Medien

*Tabelle 7: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung*

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
ES-Zellmedium	Iscove´s Medium (IMDM) L-Glutamin 2,0 mM NEA 0,1 mM Na-Pyruvat 2,0 mM β-Mercaptoethanol 0,1 mM FBS (aktiv) 7,5 %, FBS (hitzeinaktiviert) 7,5 % LIF 1000U/ml
Differenzierungsmedium	Iscove´s Medium (IMDM) L-Glutamin 2,0 mM NEA 0,1 mM Na-Pyruvat 2,0 mM β-Mercaptoethanol 0,1 mM FBS (aktiv) 7,5 % FBS (hitzeinaktiviert) 7,5 %
Serumfreies Medium	Iscove´s Medium (IMDM) L-Glutamin 2,0 mM NEA 0,1 mM Na-Pyruvat 2,0 mM β-Mercaptoethanol 0,1 mM

Medium	Zusammensetzung
Serumreplacementmedium	Iscove´s Medium (IMDM) L-Glutamin 2,0 mM NEA 0,1 mM Na-Pyruvat 2,0 mM β-Mercaptoethanol 0,1 mM Serumreplacement 15%
MEF-Medium	Dulbecco´s Medium (DMEM) L-Glutamin 2,0 mM NEA 0,1 mM FBS (hitzeinaktiviert) 10 %
HUVEC-Medium	PromoCell <sup>®</sup> endothelial cell basal medium 2% penicillin/streptomycin

## 2.8 Zellen

Für diese Arbeit wurden CCE S103-Zellen benutzt. CCE ist eine embryonale Stammzelllinie (ES-Zelllinie), die aus dem Mäusestamm 129/Sv gewonnen wurde [Robertson et al. 1986].

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten HUVEC wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus Preissner, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt.

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 MEF, Feeder-Zellen**

Für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen wurden in dieser Arbeit mousembryonale Fibroblasten (MEF) als Feeder-Zellen, das heißt inaktivierte embryonale Fibroblasten, verwendet. Diese sind bei der verwendeten Zelllinie CCE S103 nötig, um die ES-Zellen mit Nährstoffen zu versorgen und durch Sezernierung von LIF (leukaemia inhibiting factor) die Differenzierung der Stammzellen zu unterbinden. Auch wenn es bereits 1981 gelungen ist, embryonale Stammzellen zu kultivieren, so ist die für die Stammzellkultur essentielle Wirkung von LIF erst 1988 von Williams beschrieben worden [Williams et al., 1988]. Für die Kultivierung der ES-Zellen wurde dem ES-Zellmedium zusätzlich rekombinantes LIF hinzugefügt (1000U/ml).

Die Feeder-Zellen wurden bei Bedarf auf Gewebekulturschalen ausplattiert und so lange in MEF-Medium kultiviert, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten. Um weiteres Wachstum zu verhindern wurden die Fibroblasten mit Hilfe eines Zytostatikums, Mitomycin C, inaktiviert. Dazu wurde das MEF-Medium mit 10µg/ml Mitomycin C versetzt und die MEF darin ca. 3h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchte von 95% inkubiert. Die MEF wurden daraufhin 3x mit MEF-Medium gewaschen um eventuelle zytotoxische Wirkungen von Resten des Mitomycins zu verhindern. Die inaktivierten Feeder-Zellen wurden innerhalb einer Woche verwendet. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt um stabile Wachstumsbedingung mit ausreichender Nährstoffversorgung zu gewährleisten.

#### **3.1.2 Stammzellen / Spinnerflaschen-System**

Die ES-Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ES-Zellmedium 5 min bei 200g zentrifugiert. Nach Resuspension wurden die Zellen auf den oben beschriebenen inaktivierten MEF-Monolayern verteilt und mit ES-Zellmedium kultiviert. Das darin enthaltene LIF in einer Konzentration von 1000 U/ml verhinderte die spontane Differenzierung der Stammzellen. Die Kultivierung der

Stammzellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchte von 95%.

Bei einer Konfluenz von etwa 70% wurden die Stammzellen auf neue Feeder-Zellen umgesetzt, um etwaige Differenzierungsvorgänge durch pH-Änderungen, Nährstoffmangel und Zellstress zu vermeiden. Dabei wurden die Stammzellen proteolytisch mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (2ml, 0,2% Trypsin, 0,05% EDTA) gelöst (3-5 min bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte) und danach vorsichtig mit einer Pipette mechanisch vereinzelt. Die proteolytische Reaktion wurde mit 4ml ES-Zellmedium abgestoppt, und die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:30 erneut auf Feeder-Zellen verteilt.

Außerdem wurden Stammzellen in silikonisierte Spinnerflaschen überführt. Dabei wurden etwa  $3 \times 10^6$  Zellen pro Spinnerflasche eingesetzt. Die ES-Zellen wurden in der Spinnerflasche mit 125ml Differenzierungsmedium im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Das Medium wurde am nächsten Tag auf 250ml aufgefüllt. Danach wurden täglich 125ml Medium ausgetauscht.

Durch die Benutzung des Spinnersystems, bei dem durch einen magnetisch betriebenen Rührmechanismus mit Richtungswechsel (20 Umdrehungen pro min, Richtungswechsel alle vier Umdrehungen) die Stammzellen kontinuierlich in Bewegung gehalten wurden, konnte die Gleichmäßigkeit von Nährstoffversorgung, Temperatur und Gasaustausch sichergestellt werden. Ebenso wurde durch den Rührmechanismus und die zusätzliche Silikonisierung eine Zelladhäsion an der Flasche vermieden.

Die ES-Zellen bilden in den Spinnerflaschen spontan dreidimensionale Aggregate, sogenannte Embryonalkörperchen oder embryoid bodies (EBs), die nach acht Tagen Kultivierung einen Durchmesser von etwa 1000-1500µm erreichen [Wartenberg et al., 1998].

Die EBs wurden vier Tage in den Spinner-Flaschen belassen und dann entweder an Tag vier für diverse Experimente herangezogen oder für an späteren Entwicklungstagen durchzuführende Untersuchung in bakteriologischen Schalen weiter kultiviert.

### **3.1.3 HUVEC**

HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) werden aus der Nabelschnur von Neugeborenen gewonnen. Die isolierten HUVEC wurden nach Expansion auf Objektträgern gleichmäßig verteilt und im HUVEC-Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchte von 95% mit 4µg/ml a2M inkubiert. Das Medium wurde alle 24h gewechselt. Unbehandelte Kontrollen wurden jeweils zusammen mit den a2M-behandelten Proben nach 24, 48 und 72h entnommen und immunhistochemisch analysiert.

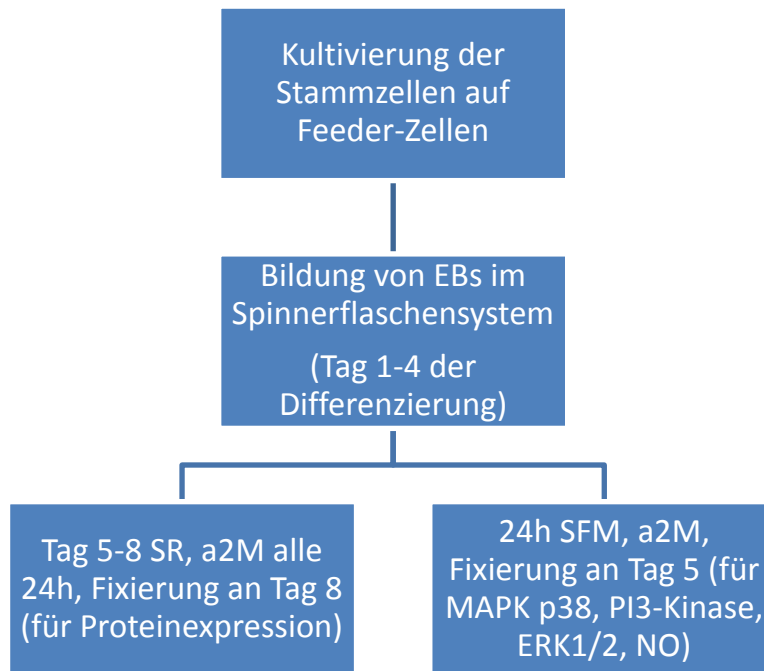
## **3.2 Behandlung der Zellen mit a2M**

Um den Einfluss von a2M auf die Differenzierung der Zellen der EBs zu untersuchen, wurden die EBs vom Differenzierungstag vier an in bakteriologischen Schalen mit je 5ml Serumreplacementmedium oder serumfreiem Medium kultiviert und mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert.

Serumreplacementmedium wird benutzt, um etwaige Beeinflussung durch Wachstumsfaktoren unbestimmter Konzentration im FBS (fetales bovines Serum) zu vermeiden.

Für die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte die Inkubation mit a2M von Tag vier bis Tag acht täglich beim Mediumwechsel (Serumreplacement). Für die Untersuchung der Aktivierung von Proteinen durch Phosphorylierung (MAP p38, PI3-Kinase, ERK 1/2) und die Messung des intrazellulären NO wurden die Zellen kurz vor der Fixierung bzw. Messung mit a2M inkubiert und vorher 24h (Tag vier bis fünf) im serumfreien Medium kultiviert (Abbildung 7).





**Abbildung 7: Schema der Versuchsabläufe**

Zur Untersuchung der Wirkung von a2M wurden die Zellen täglich nach dem Mediumwechsel mit 2µg a2M / ml Medium, 4µg/ml und 8µg/ml inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen entsprechen ca. 2,76 nMol, 5,52 nMol, bzw. 11,03 nMol. Bei Experimenten mit Inhibitoren (LY294002, UO126, PD98059, L-NAME, SU5402) wurden die ES-Zellen mit den entsprechenden Substanzen 1h vorinkubiert. Dabei wurden die in der folgenden Tabelle angegebenen Konzentrationen eingesetzt:

**Tabelle 8: Eingesetzte Inhibitoren**

Inhibitor	Angriffsort	Konzentration
LY294002	PI3-Kinase	20µM
UO126	ERK 1/2	20µM
PD98059	ERK 1/2	40µM
L-NAME	eNOS	100µM
SU5402	FGFR1	20µM

### 3.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Proteinnachweis mit Hilfe von Antikörpern. Die für diese Arbeit genutzte Methode der indirekten Antikörperfärbung basiert auf der Bindung zweier Antikörper, des primären und des sekundären. Dabei bindet der primäre Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Protein. Der sekundäre Antikörper richtet sich gegen den primären Antikörper. Dabei können mehrere sekundäre an einen primären Antikörper binden und so als Signalverstärker fungieren. Der sekundäre Antikörper ist dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, so dass auf diese Weise das eigentliche Zielprotein sichtbar gemacht werden kann.

In der praktischen Umsetzung wird das zu untersuchende Gewebe als erstes fixiert. Dabei wurden zur Untersuchung der Expression von Proteinen (CD31, bFGF, eNOS, HIF-1 $\alpha$ ) die EBs einmal mit 1x PBS gewaschen und dann für mindestens 2h mit Methanol bei -20°C fixiert. Zur Untersuchung der Aktivierung von Proteinen durch Phosphorylierung (MAP p38, ERK 1/2, PI3-Kinase, p-eNOS) wurden die Proben zu unterschiedlichen Zeiten nach der Stimulierung nach einmaligem Waschen mit 1x PBS 20 min mit 4%igem Formaldehyd auf Eis fixiert, erneut mit 1x PBS gewaschen und für mindestens weitere 20 min mit Methanol bei -20°C fixiert.

Des Weiteren wurden die Proben dreifach mit PBS-T 0,01% gewaschen und die unspezifischen Bindungen mit einem Blockreagenz (10% FBS in PBS-T 0,01%) 1h bei Raumtemperatur geblockt.

Die EBs wurden weiterhin auf einem Schüttler entweder 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert, danach dreifach mit PBS-T 0,01% gewaschen und weitere 2h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Abschließend wurden die Proben erneut dreifach mit PBS-T 0,01% gewaschen und in PBS 1x maximal drei Tage bis zur Messung am konfokalen Lasermikroskop aufbewahrt.

### **3.4 Konfokale Laserscanmikroskopie**

Die konfokale Laserscanmikroskopie (cLSM) ist eine Methode der Mikroskopie, die es ermöglicht nicht nur eine sehr hohe Auflösung im Vergleich zur normalen Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie zu erreichen, sondern auch optische Schnitte zu liefern. Der grundsätzliche Aufbau eines Laserscanmikroskops basiert auf der konfokalen, also brennpunktgleichen, Anordnung der Kondensorlinse und des Objektivs. In Kombination mit einem Raster-/Scanverfahren und einer Punktbeleuchtung mittels Laser (z.B. Argon- oder Helium-Neon-Laser) können Proben in einer Ebene mit einer hohen Auflösung und Tiefenschärfe abgerastert werden, d.h. es entstehen optische Schnitte. Durch digitale Nachbereitung ist es zudem möglich diese zweidimensionalen Schnitte zu einem 3D-Bild zusammenzusetzen.

Für diese Arbeit wurde das cLSM von Leica (TCS SP2) benutzt. Dabei wurden für die Messung der CD31 positiven Areale die EBs in der Fokusebene in einer Schicht von 100µm in fünf optische Schnitte geteilt und überlagert. Für sonstige Messungen wurden in der Fokusebene einzelne Scans durchgeführt. Je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff wurde ein Helium-Neon-Laser (630nm) oder ein Argon-Laser (488nm) benutzt. Die Messung der Intensität der Fluoreszenz wurde mit der Leica Confocal Software oder der Leica Confocal Software lite durchgeführt. Die Messung der fluoreszierenden Fläche erfolgte dagegen mit der Zeiss Software LSM Dummy.

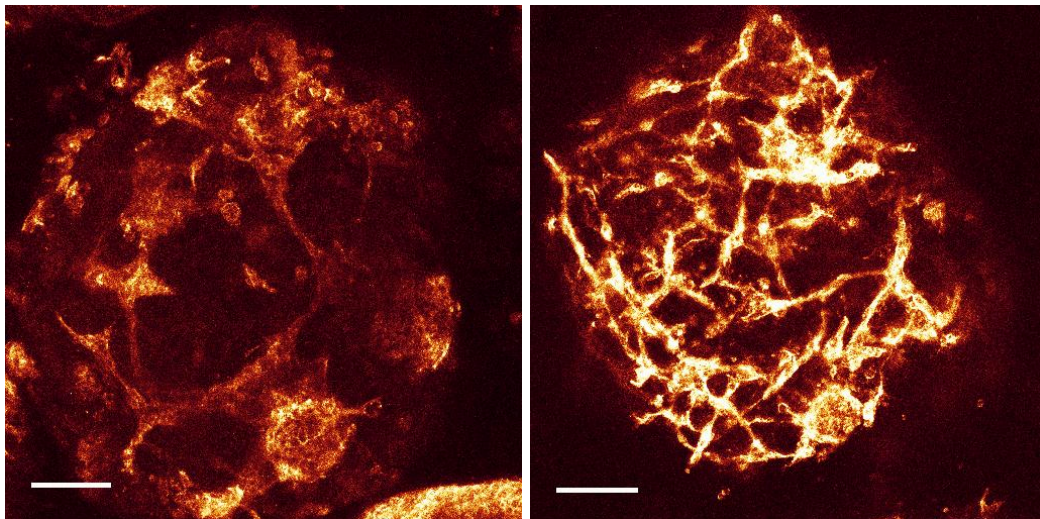
### **3.5 Statistik**

Alle Experimente wurden mindestens dreifach durchgeführt. Jedes Experiment beinhaltete mindestens 10 EBs pro Gruppe. Alle Mittelwerte wurden jeweils relativ zur unbehandelten Kontrollgruppe angegeben. Die angegebenen Werte wurden gerundet. Für den einfachen Mittelwertvergleich wurde ein zweiseitiger T-Test herangezogen. Für multiple Mittelwertvergleiche wurde eine ANOVA-Analyse durchgeführt, gefolgt vom Tukey-Test als Post-Hoc-Test. Alle Signifikanzen wurden auf dem 5% Niveau angegeben ( $p < 0,05$ ).

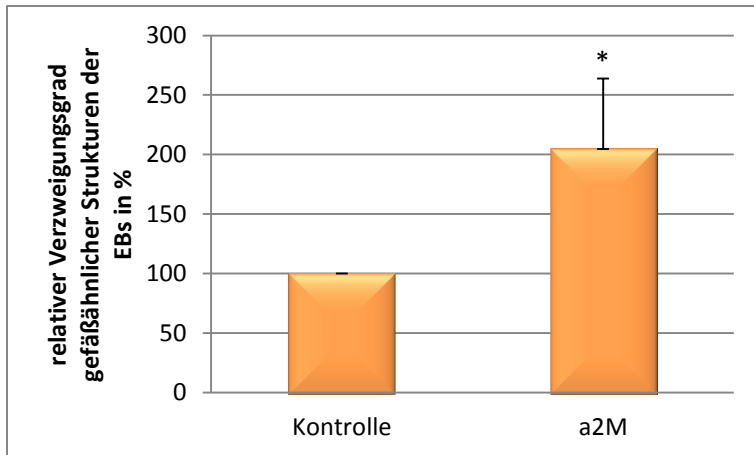
## 4 Ergebnisse

### 4.1 PECAM / CD31

Aufgrund vorliegender Studien [Asplin et al., 2001; Hagedorn & Bikfalvi, 2000; Pademasekar et al., 2007] stellte sich die Frage nach dem Einfluss von a2M auf die Vaskulogenese embryonaler Stammzellen (siehe Kapitel 1.5). Dazu wurden unbehandelte EBs (Kontrolle) sowie mit a2M stimulierte EBs immunhistochemisch gegen CD31, einen Endothelzellmarker, gefärbt. Die EBs wurden am vierten Tag aus den Spinner-Flaschen entnommen und in Petrischalen über weitere vier Tage mit 2,4 und 8µg a2M je ml Medium inkubiert (genauere Versuchsdurchführung siehe Kapitel 3.2). Die immunzytochemische Färbung gegen CD31 erfolgte am achten Tag. Die Auswertung mit dem cLSM ergab eine signifikante Zunahme der CD31-positiven Areale im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 15, Abbildung 8; +30% ± 11; n=12). Zudem konnte ein erhöhter Verzweigungsgrad der Gefäßstrukturen nachgewiesen werden (Abbildung 9, Abbildung 8; Kontrolle 100%; a2M (4µg/ml) 205% ± 59; n=3).

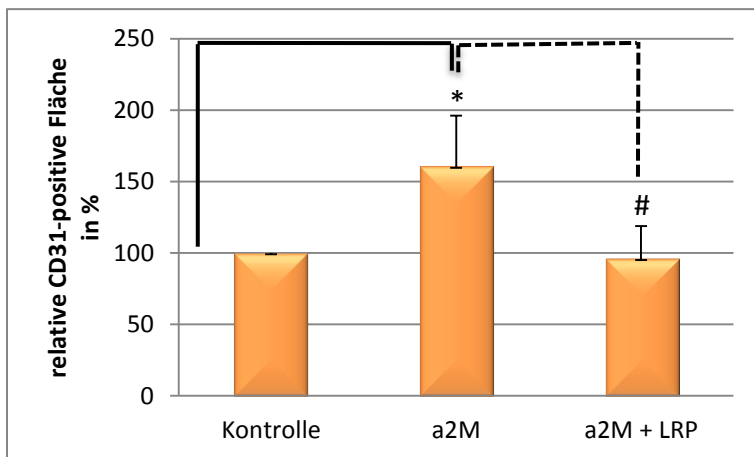


**Abbildung 8: Vaskularisierung eines unbehandelten EBs (links) und nach Stimulation mit 4µga2M / ml Medium (rechts).** Falschfarbendarstellung repräsentativer EBs nach Anti-CD31-Antikörperfärbung: man erkennt die deutliche Zunahme gefäßähnlicher Strukturen und ihrer Verzweigungen nach Stimulation mit a2M im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Größenbalken entspricht 100µm.



**Abbildung 9:**

**Verzweigungsgrad von Gefäßstrukturen nach immunhistochemischer Färbung gegen CD31.** Es konnte eine signifikante Zunahme des Verzweigungsgrades der gefäßähnlichen Strukturen in EBs nach Stimulation mit 4µg a2M / ml Medium nachgewiesen werden (n=3).

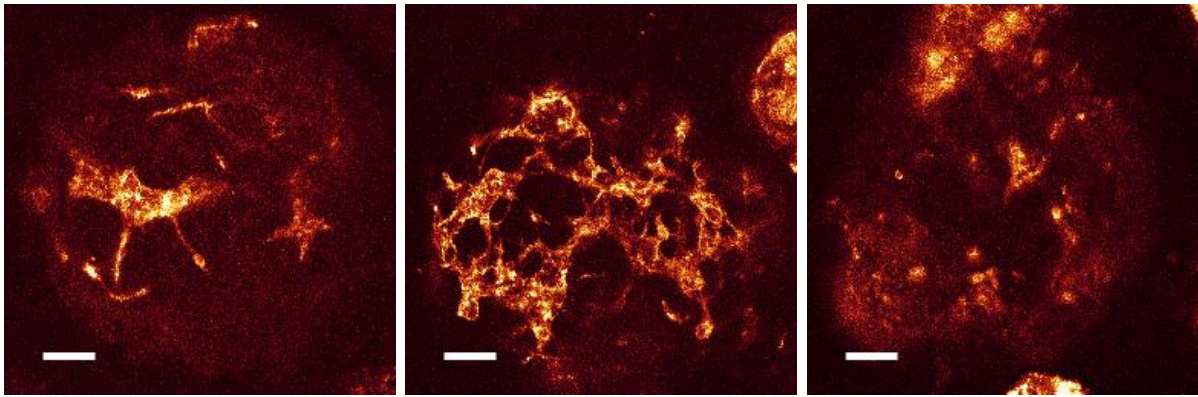


**Abbildung 10:**

**Größe der CD31-positiven Zellareale nach Behandlung mit a2M und LRP-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.** Die positive Wirkung von a2M (4µg/ml) auf die CD31-positive Fläche wird bei Zugabe von einem anti-LRP-1-Antikörper (a2M + LRP-1) vollständig aufgehoben (n=3).

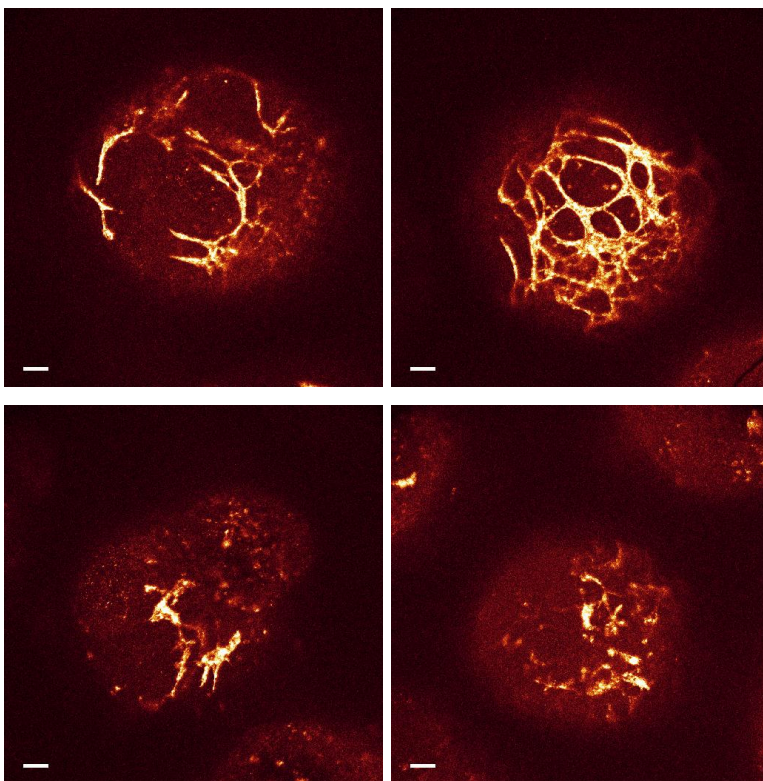
Um zu überprüfen, ob LRP-1 der signalvermittelnde Rezeptor ist, wurde dieser inhibiert. Die gleichzeitige Inkubation mit einem anti-LRP-1-Antikörper hob die Wirkung von a2M vollständig auf (Abbildung 10; Kontrolle 100%; a2M (4µg/ml) 161 % ± 35; a2M+LRP-1 96% ± 23; n=3).

Die Präinkubation mit einem spezifischen ERK 1/2-Inhibitor, PD98059, revertierte die Wirkung von a2M auf die Größe der CD31-positiven Areale. Bei Inkubation mit PD98059 alleine konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt werden (Abbildung 15, Abbildung 11; Kontrolle 100%; a2M (4µg/ml) 130% ± 11; a2M + PD98059 96% ± 11; PD98059 105% ± 4; n=3).



**Abbildung 11: Falschfarbendarstellung repräsentativer EBs nach Antikörperfärbung gegen CD31. Kontrolle (links), a2M stimulierter EB (Mitte) und a2M stimulierter EB nach Präinkubation mit PD98059 (rechts). Die Zunahme der CD31-positiven Fläche nach Stimulation mit a2M (4µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle wird durch eine Präinkubation mit PD98059 nahezu vollständig inhibiert. Der Größenbalken entspricht 100µm.**

Bei Präinkubation mit einem spezifischen bFGF-Inhibitor, SU5402, konnte gezeigt werden, dass die nach Antikörperfärbung gegen CD31 dargestellte Gefäßfläche deutlich reduziert ist (Abbildung 15, Abbildung 12; Kontrolle 100%; a2M (4µg/ml) 130% ± 11; a2M + SU5402 35% ± 18; SU5402 30% ± 16; n=3).

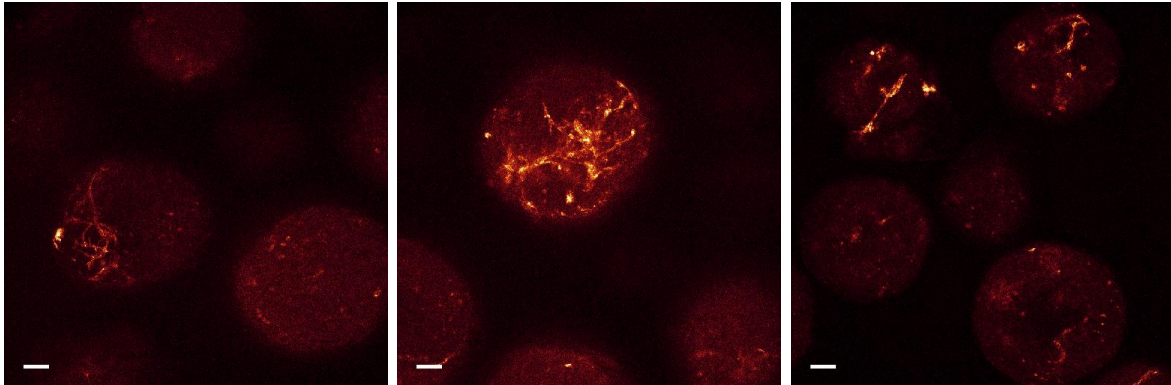


**Abbildung 12:**

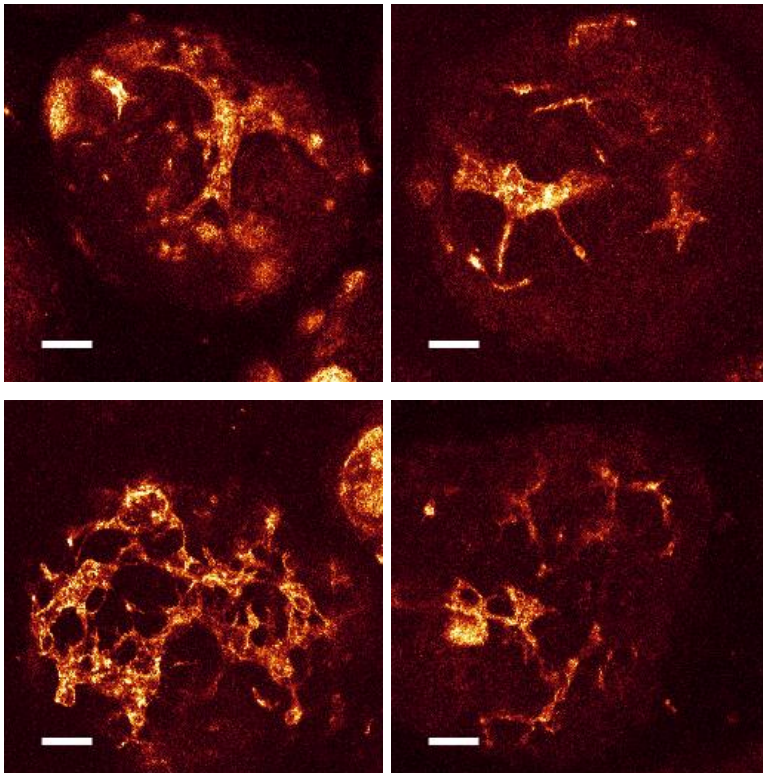
**Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach CD31-Antikörperfärbung. Kontrolle (links oben), 4µg/ml a2M (rechts oben), SU5402 (links unten), 4µg/ml a2M mit SU5402 (rechts unten).**

Die Gefäßfläche ist nach Gabe von SU5402 im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert, bei Stimulation mit a2M ist die bereits oben gezeigte Zunahme der CD-31-positiven Fläche zu sehen. Der Größenbalken entspricht 100µm.

Die Wirkung von a2M wurde durch Präinkubation mit einem spezifischen Inhibitor für die PI3-Kinase, LY294002, vollständig aufgehoben. Bei Inkubation mit nur LY294002 konnte kein signifikanter Effekt auf die gemessene relative CD31-positive Fläche gezeigt werden (Abbildung 15, Abbildung 13; Kontrolle 100%; a2M (4µg/ml) 130% ± 11; a2M + LY294002 84% ± 18; LY294002 94% ± 22; n=3).



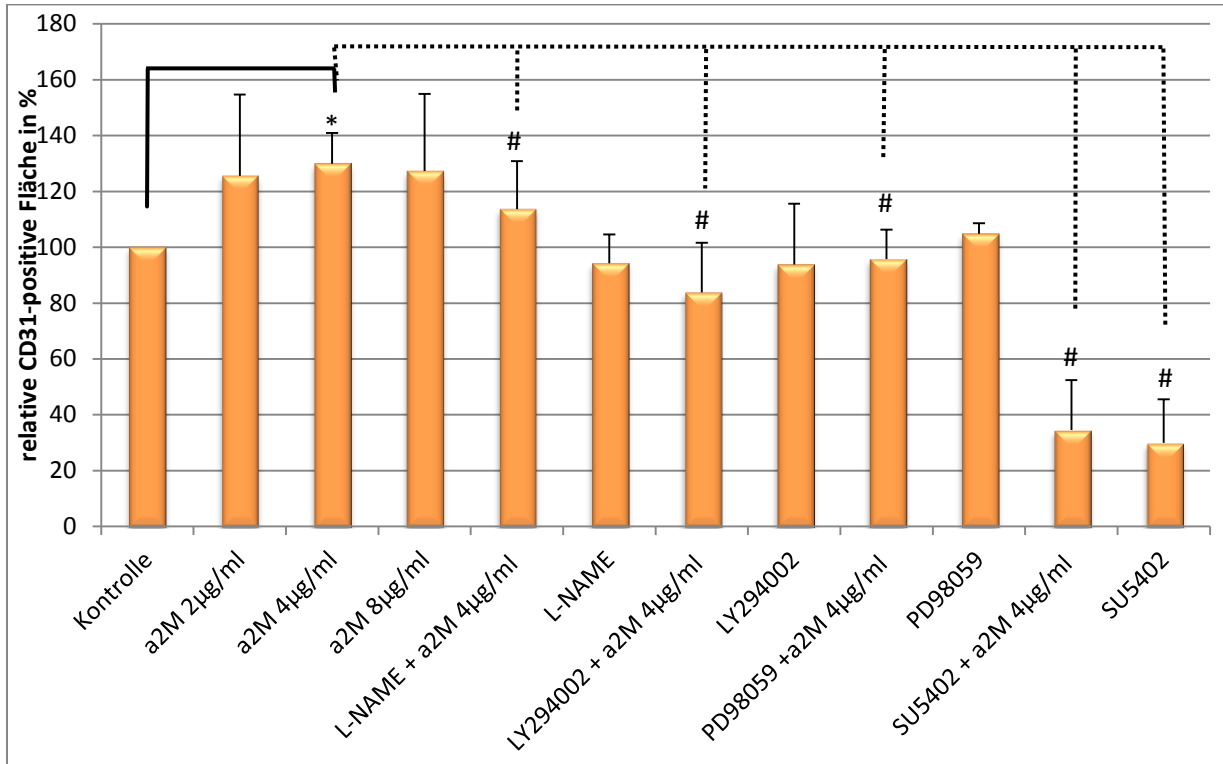
**Abbildung 13:** Fluoreszenzmikroskopische Falschfarbendarstellung repräsentativer EBs nach Antikörperfärbung gegen CD31. Kontrolle (links), a2M stimulierte EBs (Mitte) und a2M stimulierter EBs bei Präinkubation mit LY294002 (rechts). Zu sehen ist die Inhibition der a2M-Wirkung nach Präinkubation mit LY294002. Der Größenbalken entspricht 100µm.



**Abbildung 14:**

**Fluoreszenzmikroskopische Falschfarbendarstellung repräsentativer EBs nach Antikörperfärbung gegen CD31. Kontrolle (links oben), a2M (rechts oben), a2M und L-NAME (links unten), L-NAME (rechts unten).** Zu sehen ist die Zunahme der gefäßähnlichen Strukturen nach Stimulation mit a2M und die Inhibition der Wirkung nach Präinkubation mit L-NAME. Der Größenbalken entspricht 100µm.

Wurden die EBs zuvor mit dem spezifischen NO-Inhibitor L-NAME inkubiert, wurde die Wirkung von a2M ebenfalls aufgehoben. L-NAME alleine hatte keinen signifikanten Effekt auf die CD31-positiven Areale (Abbildung 15, Abbildung 14; Kontrolle 100%; a2M (4µg/ml) 130% ± 11; a2M + L-NAME 114% ± 17; L-NAME 94% ± 10; n=3).

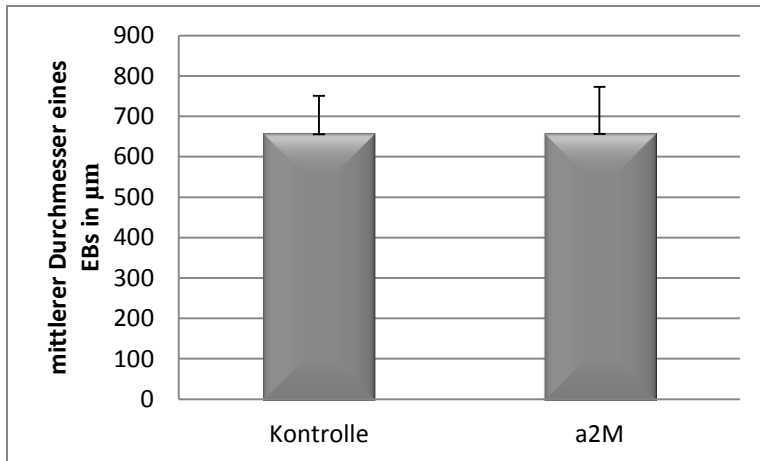


**Abbildung 15: CD31-positive Areale mit a2M, L-NAME, LY294002, PD98059 und SU5402 stimulierter EBs im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle wurde auf 100% gesetzt)**

## 4.2 Wachstum der EBs

Um die Hypothese zu überprüfen, dass durch die vermehrte Vaskularisierung eine bessere Versorgung aller Zellen eines EBs erreicht wird und damit die Proliferation erhöht wird, wurde unter dem Lichtmikroskop der durchschnittliche Durchmesser der EBs gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kontrolle 657µm ± 94; a2M 658µm ± 116; n=9) (Abbildung 16).



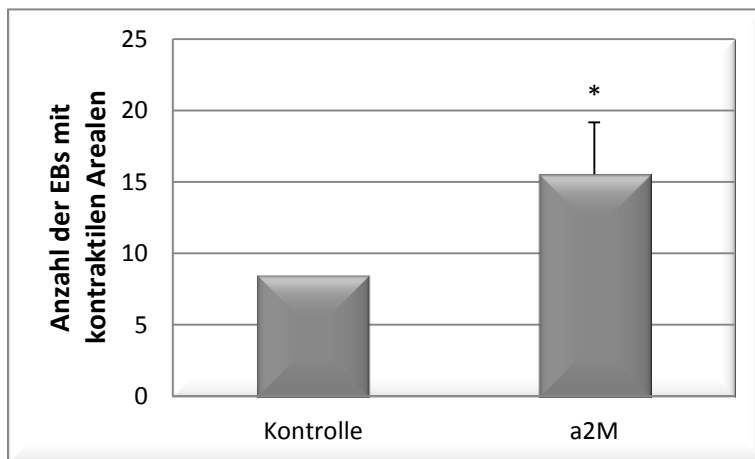


**Abbildung 16:**

**Durchschnittlicher Durchmesser eines EBs am achten Tag der Differenzierung.** Vergleich von a2M-stimulierten EBs zu unbehandelten EBs.

### 4.3 Kontraktile Areale in EBs

Zur Überprüfung der Hypothese, dass a2M die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten induziert, wurden die EBs unter dem Lichtmikroskop untersucht. Dabei konnten bei einem Teil der EBs am achten Tag kontraktile Areale beobachtet werden. Die mit a2M behandelte Probe wies signifikant mehr sich kontrahierende EBs im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf (Abbildung 17; Kontrolle  $9 \pm 2$ ; a2M ( $4\mu\text{g/ml}$ )  $16 \pm 4$ ;  $n=3$ ).

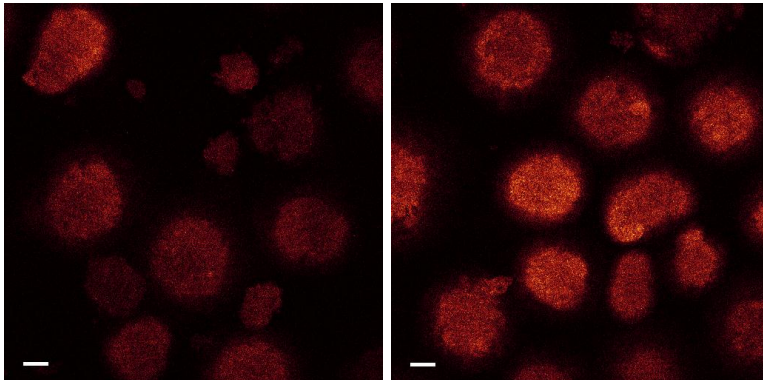


**Abbildung 17: EBs mit kontraktiven Arealen an Tag acht der Differenzierung.** Vergleich von a2m-stimulierten zu unbehandelten EBs äquivalenter Proben.

### 4.4 bFGF

Aufgrund der bekannten Wechselwirkungen zwischen a2M und bFGF [Asplin et al., 2001], der angiogenen Wirkung von a2M (siehe Kapitel 4.1) und bFGF [Joseph-Silverstein & Rifkin, 1987; Schweigerer, 1989] (siehe Kapitel 1.6.1) sollte die

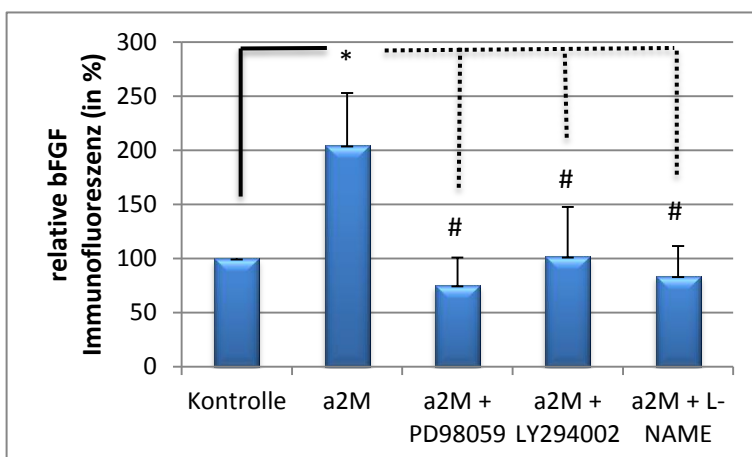
Wirkung von a2M auf die bFGF-Expression untersucht werden. Die Antikörperfärbung gegen bFGF und die Auswertung mit einem cLSM zeigte eine signifikante Zunahme der bFGF-Immunfluoreszenz in den EBs nach Stimulation mit a2M. Dabei war der stärkste Effekt an Tag 7 nach 48-stündiger Inkubation mit a2M zu beobachten (Abbildung 18, Abbildung 19; Kontrolle 100%; a2M (4µg/ml) 204% ± 48; n=3).



**Abbildung 18:**

**Falschfarbendarstellung repräsentativer EBs nach Antikörperfärbung gegen bFGF: Kontrollgruppe (links) und nach 24h Stimulation mit 4µg/ml a2M (rechts).** Nach a2M-Stimulation ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz erkennbar. Der Größenbalken entspricht 100µm.

Des Weiteren konnte dieser Effekt jeweils durch Zugabe von PD98059, LY294002 oder L-NAME inhibiert werden (Abbildung 19; Kontrolle 100%; a2M 204% ± 48; a2M + PD98059 75% ± 26; a2M + LY294002 102% ± 46; a2M + L-NAME 84% ± 28; n=3).

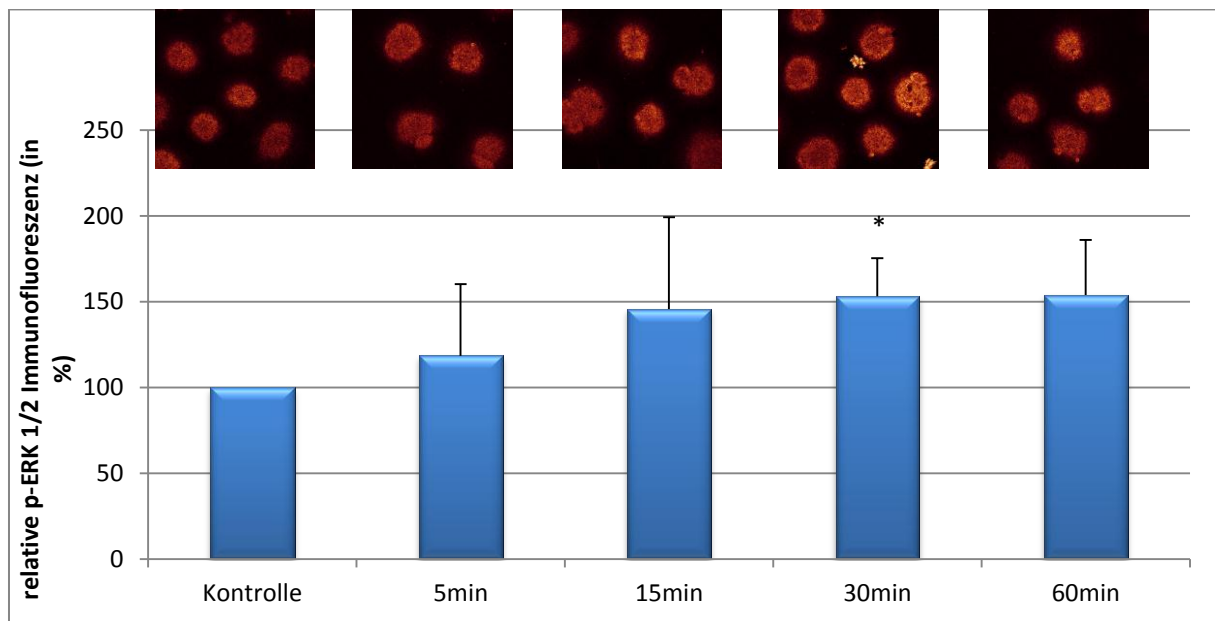


**Abbildung 19:**

**Relative Fluoreszenz (Antikörperfärbung gegen bFGF) nach Inkubation der EBs mit a2M und Inhibitoren.** Eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz konnte nach Stimulation mit a2M gezeigt werden. Die Inhibitoren PD98059, LY294002 und L-NAME revidierten alle diesen Effekt.

## 4.5 ERK 1/2

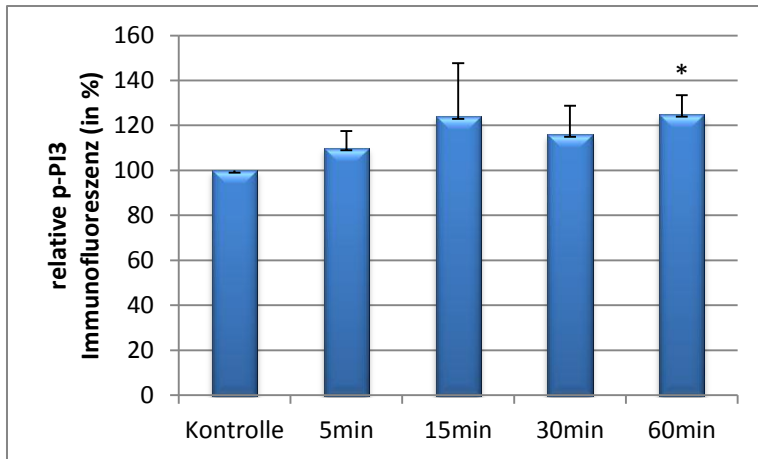
Die Beteiligung von ERK 1/2 an der a2M-induzierten Vaskulogenese sollte ebenfalls überprüft werden (siehe Kapitel 1.7.1). Über eine Antikörperfärbung gegen phospho-ERK 1/2 konnte eine signifikant erhöhte Fluoreszenz im cLSM nach Stimulation mit a2M (Maximum nach 30 min) nachgewiesen werden (Abbildung 20; Kontrolle 100%; 5min 119% ± 42; 15min 146% ± 54; 30min 153% ± 22; 60min 154 ± 32; n=4).



**Abbildung 20:** Gezeigt sind Falschfarbendarstellungen repräsentativer EBs nach Antikörperfärbung gegen p-ERK 1/2 und die gemessene relative Fluoreszenz nach Inkubation der EBs mit a2M für 5, 15, 30 bzw. 60 min. Gezeigt ist die signifikante Zunahme der Fluoreszenz 30 min nach Stimulation mit a2M.

## 4.6 PI3-Kinase

Analog zu ERK 1/2 sollte auch eine mögliche Beteiligung der PI3-Kinase an der a2M-induzierten Vaskulogenese untersucht werden (siehe Kapitel 1.7.3). Bei einer Antikörperfärbung gegen phospho-PI3-Kinase konnte nach Inkubation mit a2M ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenz gemessen werden (Abbildung 21; Kontrolle 100%; 5min 110% ± 8; 15min 124% ± 24; 30min 116% ± 13; 60min 125% ± 9; n=3).

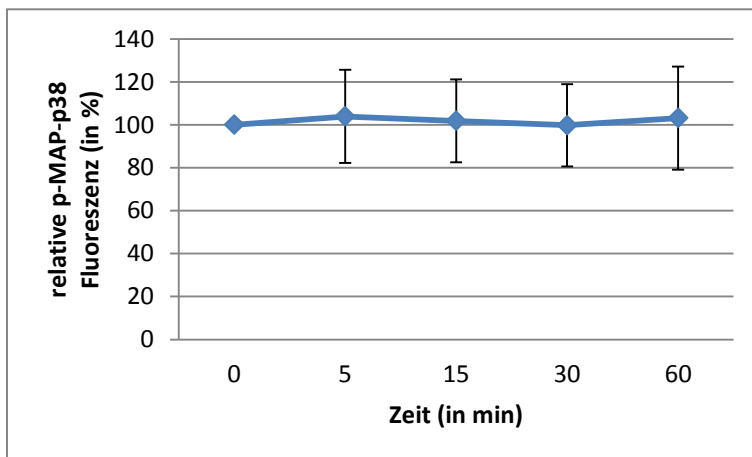


**Abbildung 21:**

**Relative Fluoreszenz (Antikörperfärbung gegen p-PI3-Kinase) nach Inkubation der EBs mit a2M für 5, 15, 30 bzw. 60 min. Eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz konnte 60 min. nach Inkubation mit a2M gezeigt werden.**

#### 4.7 MAP p38

Ebenfalls konnten keine Fluoreszenzunterschiede zwischen a2M behandelte und unbehandelte Gruppe nach Antikörperfärbung gegen phospho-MAP p38 nachgewiesen werden (Abbildung 22; Kontrolle 100%; 5min 104% ± 22; 15min 102% ± 19; 30min 100% ± 19; 60min 103% ± 24; n=3).



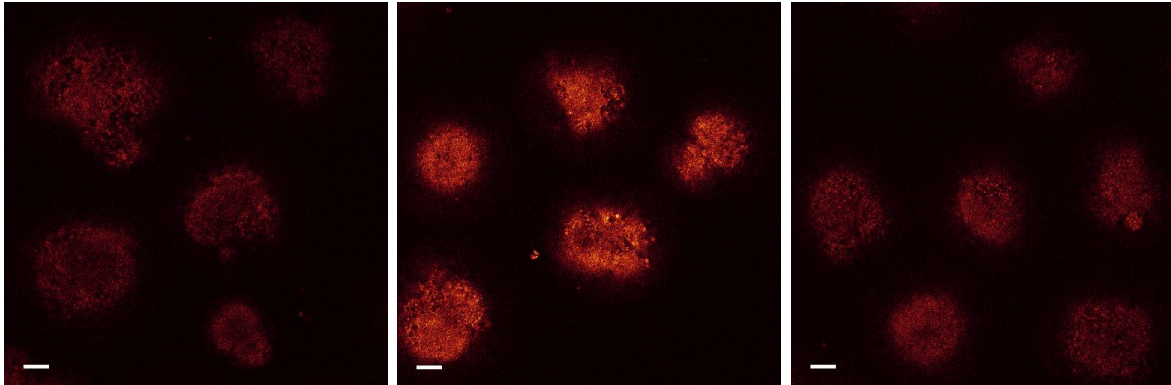
**Abbildung 22:**

**Relative Fluoreszenz (Antikörperfärbung gegen phospho-MAP p38) nach Inkubation mit a2m für 5, 15, 30, bzw. 60 min. Eine Wirkung von a2M auf die p-MAP-p38 Fluoreszenz konnte nicht gezeigt werden.**

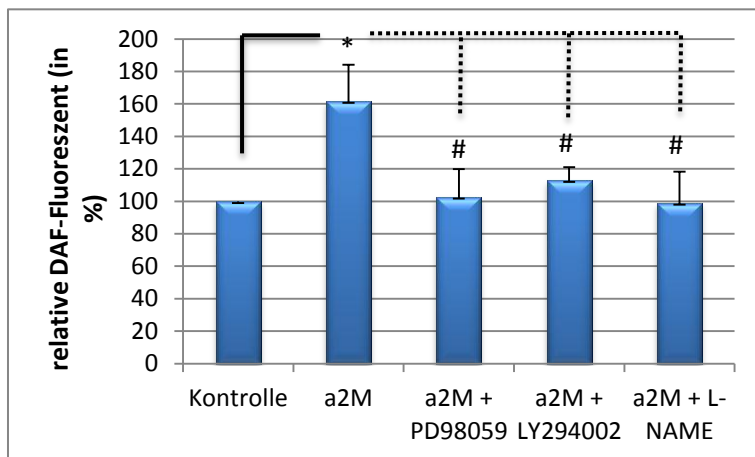
#### 4.8 Intrazelluläres Stickstoffmonoxid

Die Angiogenese-stimulierende Wirkung von NO bei HUVEC wurde bereits beschrieben [Papapetropoulos et al., 1997] (siehe Kapitel 1.7.5). In dieser Arbeit sollte die Beteiligung an der a2M-induzierten Vaskulogenese embryonaler Stammzellen untersucht werden. Die Fluoreszenz nach Färbung mit DAF stieg nach Stimulation mit a2M signifikant an. Dieser Effekt wurde jeweils durch Zugabe von

PD98059, LY294002 oder L-NAME inhibiert (Abbildung 23, Abbildung 24; Kontrolle 100%; a2M 162% ± 22; a2M + PD98059 103% ± 17; a2M + LY294002 113% ± 8, a2M + L-NAME 99% ± 19; n=3).

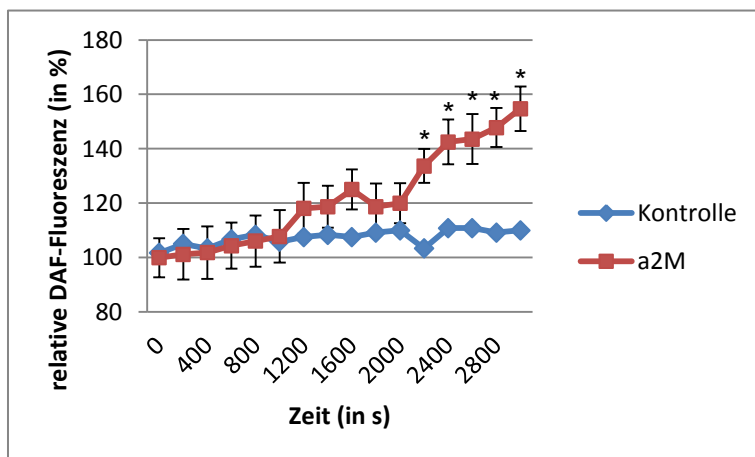


**Abbildung 23: Fluoreszenz nach DAF-Färbung.** Kontrolle (links), a2M (Mitte) und a2M mit L-NAME (rechts). Der Größenbalken entspricht 100µm.



**Abbildung 24:**

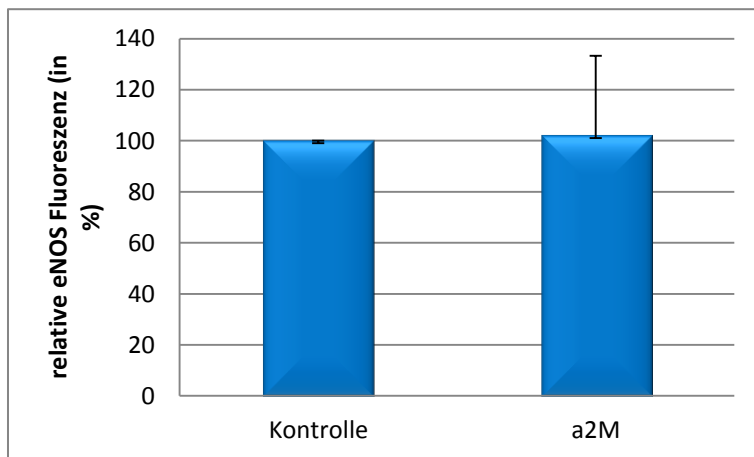
**Relative Fluoreszenz (Färbung mit DAF) nach 60 min Stimulation mit a2M und Präinkubation mit PD98059, LY294002 und L-NAME.** Man erkennt die Zunahme der Fluoreszenz nach Stimulation mit a2M und die Inhibition der Wirkung durch PD98059, LY294002 und L-NAME.



**Abbildung 25: relative DAF-Fluoreszenz im Zeitverlauf.** Dargestellt ist die Zunahme der Fluoreszenz nach Stimulation mit a2M im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in einer repräsentativen Messung.

## 4.9 eNOS

Um zu überprüfen, ob die erhöhte intrazelluläre NO-Konzentration (siehe Kapitel 4.8) auf eine vermehrte Expression von eNOS zurückzuführen ist, wurde eine Antikörperfärbung gegen eNOS durchgeführt. Die cLSM-Auswertung wies keine signifikanten Unterschiede zwischen der a2M-behandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe auf (Abbildung 26; Kontrolle 100%; a2M 102% ± 31; n=4).

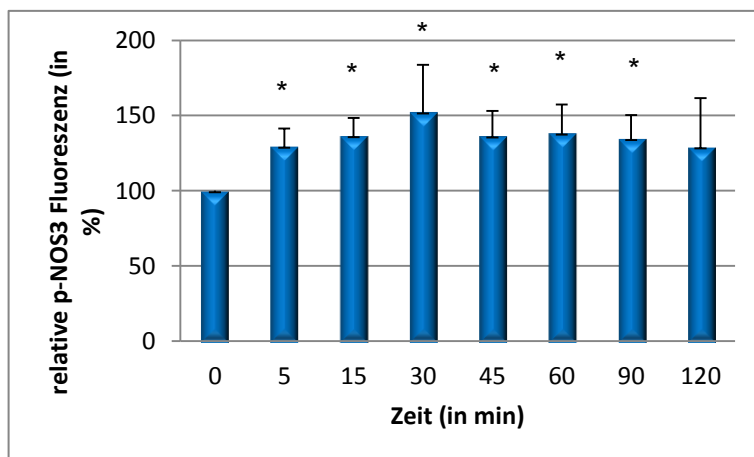


**Abbildung 26:**

*Relative Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen eNOS – Vergleich zwischen der unbehandelten Kontroll- und der a2M behandelten (48h Inkubation) Gruppe. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht gezeigt werden.*

## 4.10 Phospho-eNOS

Dagegen konnte eine erhöhte Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen phospho-eNOS nachgewiesen werden.



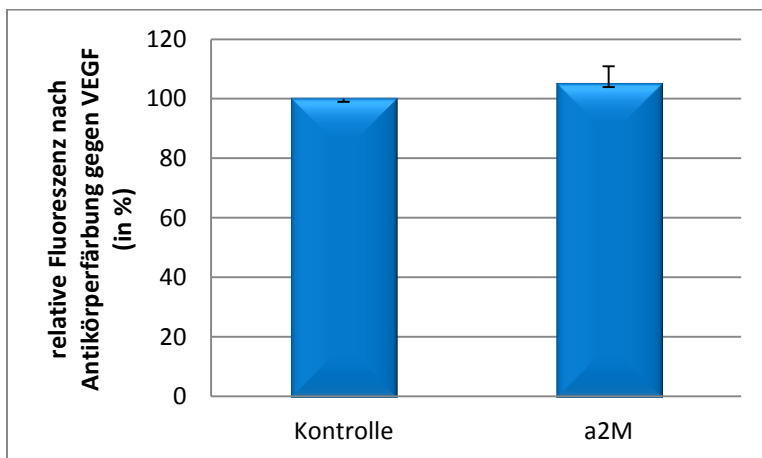
**Abbildung 27:**

*Relative Fluoreszenz (Antikörperfärbung gegen phospho-eNOS (p-NOS3)) nach Inkubation mit a2m für 5, 15, 30, 45, 60, 90 bzw. 120 min. Man erkennt eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz nach Inkubation mit a2M mit einem Maximum nach 30 min.*

5 min nach Inkubation mit a2M wurde bereits eine signifikant höhere Fluoreszenz in der a2M-behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gemessen. Das Fluoreszenzmaximum wurde nach 30 min gemessen (Abbildung 27; Kontrolle 100%; 5min 130% ± 12; 15min 137% ± 12; 30min 152% ± 32; 45min 136% ± 17; 60min 138% ± 19; 90min 135% ± 15; 120min 129% ± 32; n=5 (n=4 für 90min und 120min)).

#### 4.11 VEGF

Da VEGF ein zentraler Wachstumsfaktor der Vaskulogenese ist, sollte in dieser Arbeit die Mitwirkung an der a2M-induzierten Vaskulogenese überprüft werden (siehe Kapitel 1.6.2). Die Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen VEGF wies jedoch keine Unterschiede zwischen behandelter und Kontrollgruppe auf (Abbildung 28; Kontrolle 100%; a2M 105 ± 6; n=4).

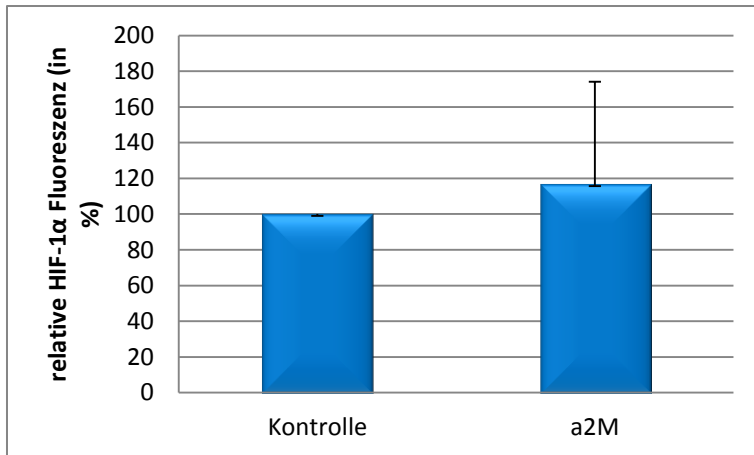


**Abbildung 28:**

*Relative Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen VEGF – Vergleich der unbehandelten Kontroll- und der mit a2M behandelten (Inkubation für 48h) Gruppe. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht gezeigt werden.*

#### 4.12 HIF-1 $\alpha$

Analog sollte die Beteiligung von HIF-1 $\alpha$  überprüft werden, da bekannt ist, dass HIF-1 $\alpha$  die Genexpression von VEGF und damit die Vaskulogenese fördert (siehe Kapitel 1.7.4). Die relative Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen HIF-1 $\alpha$  wies keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelter und Kontrollgruppe auf (Abbildung 29; Kontrolle 100%; a2M 117% ± 57; n=3).

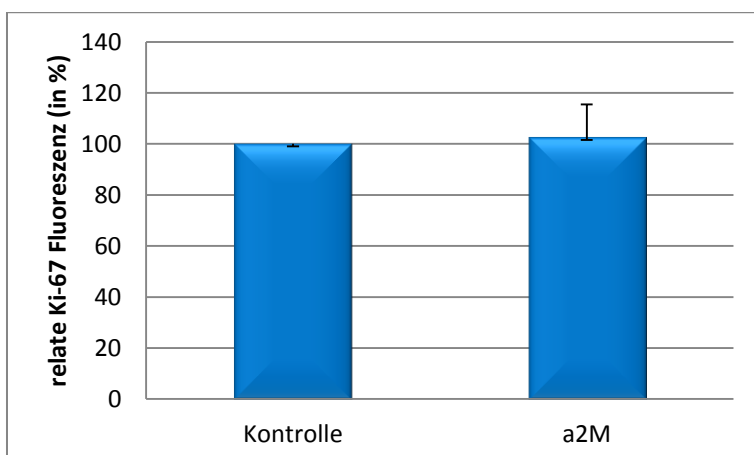


**Abbildung 29:**

**Relative Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen HIF-1α** – Vergleich der unbehandelten Kontroll- und der mit a2M behandelten (Inkubation für 48h) Gruppe. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht gezeigt werden.

### 4.13 HUVEC

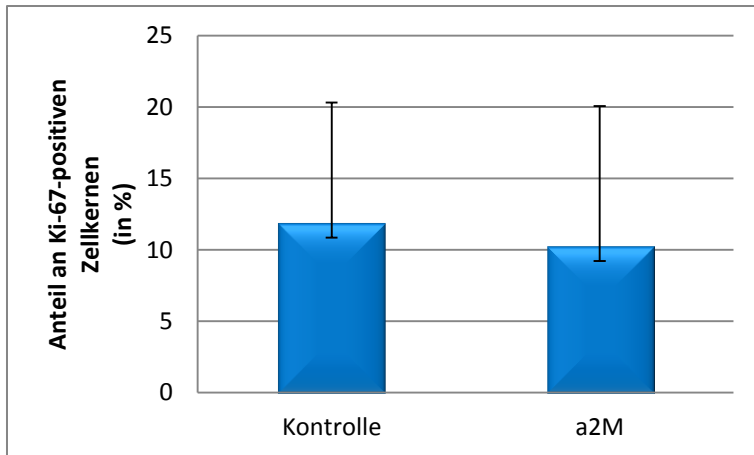
a2M könnte die Differenzierung von Stammzellen und / oder die Proliferation von Endothelzellen stimulieren. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden HUVECs herangezogen und deren Proliferation nach a2M-Behandlung mittels des Markers Ki-67 gemessen. Die relative Fluoreszenz nach Antikörperfärbung von a2M-stimulierten HUVEC-Zellen gegen den Proliferationsmarker Ki-67 wies keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe auf (Abbildung 30; Kontrolle 100%; a2M 103% ± 13; n=4). Ebenso wenig konnte eine Zunahme der Anzahl Ki-67 positiver Zellkerne nach a2M-Stimulation gezeigt werden (Abbildung 31; Kontrolle 12% ± 8; a2M 10% ± 10; n=4).



**Abbildung 30:**

**Relative Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen Ki-67.** Eine Wirkung von a2M auf die Ki-67-Fluoreszenz konnte nicht gezeigt werden.





**Abbildung 31:**

**Prozentualer Anteil der Ki-67-positiven Zellkerne.** Eine Aktivierung von Ki-67 bei HUVEC nach Stimulation mit a2M konnte nicht nachgewiesen werden.

## 5 Diskussion

Das Potential der embryonalen Stammzellforschung ist aufgrund der Fähigkeit pluripotenter Stammzellen, sich in alle Gewebearten zu differenzieren, sehr groß und vielversprechend. Das Ziel der embryonalen Stammzellforschung ist die kontrollierte Reparatur und Regeneration von Gewebe. Das in dieser Arbeit untersuchte akut-Phase-Protein a2M wird physiologisch z.B. nach einem Herzinfarkt, grundsätzlich aber bei allen inflammatorischen Prozessen im Körper vermehrt ausgeschüttet. a2M scheint aber auch an der Wundheilung inklusive Angiogenese und Stammzellaktivierung beteiligt zu sein, da es in Wunden und bei Verbrennungen vermehrt nachgewiesen werden konnte. Zudem ist bekannt, dass endotheliale Vorläuferzellen hohe a2M-Konzentrationen aufweisen, was auf eine Rolle von a2M bei der Zellreifung dieser Zellen hinweist [Oehmichen et al., 1989; Kataranovski et al., 1999; Grinnell et al., 1998; Ahrens et al., 2011]. Die vorliegende Studie soll bei der Klärung der Frage helfen, inwieweit und in welcher Art a2M an den darauf folgenden Reparatur- und Regenerationsvorgängen beteiligt ist.

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte a2M als Stimulus für das hypertrophe Wachstum von Herzmuskelzellen identifiziert werden [Padmasekar et al., 2007]. Ein Zusammenhang zwischen a2M und der Vaskulogenese wurde unter anderem von Asplin et al. (2001) beschrieben. Die Autoren stellten in mehreren Studien eine Interaktion zwischen a2M und bFGF fest [Asplin et al., 2001]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen eine vermehrte Vaskularisierung der EBs nach Inkubation mit a2M (Abbildung 8). Die Hypothese, dass a2M die

Vaskulogenese stimuliert, konnte also bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Vaskularisierung durch a2M konzentrationsabhängig ist, das Maximum lag bei einer Konzentration von 4 µg/ml. Eine positiv-Kontrolle wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte bei gleichem Versuchsaufbau aber gezeigt werden, dass VEGF die Vaskulogenese in EBs dosisabhängig stimuliert [Lange et al., 2010].

Die a2M-induzierte Vaskularisierung konnte durch einen spezifischen LRP-1-Antikörper vollständig aufgehoben werden. LRP-1 scheint also der wirkungsvermittelnde Rezeptor für die a2M-induzierte Vaskulogenese zu sein.

Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von a2M an LRP-1 über Phosphorylierung diverser Signalproteine eine Signalkaskade in Gang setzen kann [Misra et al., 1995; Misra & Pizzo, 2004; Lillis et al, 2005].

Ein Größenwachstum der EBs nach Stimulation mit a2M konnte in der vorliegenden Studie interessanterweise nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.2). Obwohl eine Hypertrophie von Kardiomyozyten nach Stimulation mit a2M nachgewiesen werden konnte [Padmasekar et al., 2007], sind weitere Effekte von a2M auf undifferenzierte und andere differenzierte Zelltypen nicht auszuschließen [Hong & Dawid, 2008]. Unter Umständen wird die Proliferation bestimmter Zellarten gehemmt und die Apoptose angeregt, so dass es deshalb in der Gesamtheit nicht zum Größenwachstum der EBs kommt.

Ebenfalls konnte mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die Differenzierung zu Kardiomyozyten durch a2M stimuliert wird (siehe Kapitel 4.3). Um den Einfluss von a2M auf das kardiovaskuläre System, die Differenzierung zu Kardiomyozyten und die damit verbundenen Mechanismen zu verstehen, bedarf es jedoch weiterer Forschung.

An der Vaskulogenese embryonaler Stammzellen sind verschiedene pro-angiogene Faktoren wie zum Beispiel VEGF [Feraud et al., 2001], PDGF-BB [Lange et al., 2009] und bFGF [Gendron et al., 1996] beteiligt. Die vorliegende Studie zeigt, dass a2M die Expression von bFGF stimuliert. Wie bereits in Kapitel 1.5 und 1.6.1 beschrieben, ist es bekannt, dass bFGF eine zentrale Rolle bei der Angiogenese spielt [Joseph-Silverstein & Rifkin, 1987; Schweigerer, 1989]. Die Inhibition von bFGF

mittels SU5402, das am FGF-Rezeptor 1 bindet und somit den bFGF-Signalweg hemmt, verhinderte die Ausbildung von Gefäßstrukturen fast gänzlich. Auch in Abwesenheit von a2M hat SU5402 die Vaskularisierung stark inhibiert, so dass man ebenfalls von einer entscheidenden Rolle von intrinsischem bFGF für die vaskuläre Differenzierung ausgehen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem, dass die Stimulation mit a2M zur Aktivierung von ERK 1/2 führt. Die intrazellulären Signalwege sind, wie bereits in der Einleitung beschrieben, vielfältig. Die Beteiligung von ERK 1/2 an der a2M vermittelten Vaskulogenese konnte hier nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5). Dabei führt die Stimulation mit a2M zu einer Aktivierung von phospho-ERK 1/2. Die Inhibition von ERK 1/2 durch PD98056 hebt die Wirkung von a2M auf die Vaskulogenese auf. Die Beteiligung von ERK 1/2 an der Angiogenese wurde bereits mehrfach beschrieben und bestätigt diese Ergebnisse: Giuliani et al. berichteten über eine verminderte Myelom-induzierte Angiogenese durch Inhibition von ERK 1/2 [Giuliani et al., 2004]. Jones et al. veröffentlichten Untersuchungen zur Angiogenese an mikrovaskulären Endothelzellen und schlugen ebenfalls eine Beteiligung von ERK 1/2 vor [Jones et al., 2004]. Murphy et al. stellten die Hypothese auf, dass die von ihnen beschriebene anti-angiogenetische Wirkung von Sorafenib auf die Inhibition vom ERK 1/2-Signalweg zurückzuführen sei [Murphy et al., 2006]. Über eine Beteiligung von ERK 1/2 an der Angiogenese bei HUVEC wurde ebenfalls berichtet [Mehta & Besner, 2007].

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation mit a2M zur Aktivierung der PI3-Kinase führt. Der Phosphorylierungsgrad der PI3-Kinase stieg nach Stimulation mit a2M an. Ebenfalls konnte die Wirkung von a2M auf die Vaskularisierung durch einen spezifischen Inhibitor (LY294002) aufgehoben werden. Somit konnte die Beteiligung der PI3-Kinase an der a2M-induzierten Vaskulogenese nachgewiesen werden. Die Mitwirkung der PI3-Kinase an angiogenetischen Vorgängen wurde bereits unter anderem bei Untersuchungen an Fettgewebe [Robertson et al., 2009] und HUVEC [Mehta & Besner, 2007] beschrieben.

Die Hypothese, dass a2M auch die MAP p38 – Kinase aktiviert, muss aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie (siehe Kapitel 4.7) verworfen werden. Eine Aktivierung der MAP p38 – Kinase durch a2M konnte nicht

nachgewiesen werden. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen deuten eine pro-, wie auch anti-angiogene Wirkung der MAP p38 – Kinase hin: in mit ROS (reaktive Sauerstoffspezies) oder TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ) stimulierten Endothelzellen wirkte die MAP p38 – Kinase angiogen; in unstimulierten Endothelzellen wurde dagegen von einer anti-angiogenen Wirkung berichtet [Rajashekhar et al., 2011]. Matsumoto et al. beschrieben hingegen eine rein inhibitorische Wirkung der MAP p38 – Kinase auf die bFGF-induzierte Angiogenese [Matsumoto et al., 2002]. Im embryoid body Modell spielt die MAP p38 – Kinase keine Rolle in der Vaskulogenese, wie in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte [Sauer et al., 2005; Schmelter et al., 2006].

Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre NO-Konzentration der EBs nach Stimulation mit a2M steigt (siehe Kapitel 4.8). Die Beteiligung von NO an der Angiogenese wurde für HUVEC bereits beschrieben [Papapetropoulos et al., 1997]. Auch für embryonale Stammzellen der Maus konnte in einer Arbeit der Arbeitsgruppe ein proangiogener Effekt von S-Nitrosopenicillamin, eines NO-Donors, beschrieben werden [Milosevic et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch bei embryonalen Stammzellen der Maus die Aktivierung über die PI3-Kinase erfolgt, jedoch zusätzlich die gleichzeitige Aktivierung von ERK 1/2 notwendig ist. Wird entweder die PI3-Kinase oder ERK 1/2 mit spezifischen Inhibitoren blockiert, so ist eine vermehrte NO-Ausschüttung nicht nachzuweisen. Analoge Ergebnisse an HUVEC wurden kürzlich veröffentlicht [Mehta & Besner, 2007]. Eine erhöhte Proteinexpression von eNOS konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.9). Die vermehrte NO-Ausschüttung wird in diesem Fall also nicht durch eine Steigerung der eNOS Expression reguliert. Mehta et al. berichten bei HUVEC von einer erhöhten eNOS-Expression im Rahmen einer HB-EGF (heparin binding endothelial growth factor) – induzierten Angiogenese [Mehta et al., 2008]. Stattdessen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine vermehrte Aktivierung durch Phosphorylierung von eNOS nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.10). Da die Erhöhung der intrazellulären NO-Konzentration nach a2M-Gabe durch Inhibitoren der PI3-Kinase und ERK 1/2 verhindert wird, scheint eNOS über die PI3-Kinase und ERK 1/2 phosphoryliert und damit aktiviert zu werden. Dies führt zu einer vermehrten NO-Ausschüttung.

Die Inhibition von eNOS, der PI3-Kinase und von ERK1/2 hat den Effekt von a2M auf die bFGF-Expression vollständig aufgehoben (siehe Kapitel 4.4, Abb. 19). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von bFGF über die Signalkette a2M→ERK1/2 / PI3-Kinase → eNOS → bFGF erfolgt.

HIF-1 $\alpha$  wird, wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.7.3), konstitutiv exprimiert und Sauerstoff-abhängig hydroxyliert, dann weiter ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Bei Abfall des Sauerstoff-Partialdrucks nimmt die Hydroxylierung proportional ab, so dass nicht-hydroxyliertes HIF-1 $\alpha$  stabil und aktiv bleibt [Maxwell et al., 1999; Hsieh et al., 2007]. Eine erhöhte Aktivierung würde somit mit einer vermehrten intrazellulären Konzentration von HIF-1 $\alpha$  einhergehen. Eine erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Konzentration nach Stimulation mit a2M konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.12), so dass davon ausgegangen werden kann, dass HIF-1 nicht an der a2M-induzierten Vaskulogenese beteiligt ist.

Die Messung der HIF-1 $\alpha$ -Expression mittels Immunhistochemie wurde in vorherigen Untersuchungen bereits durchgeführt [Ateghang et al., 2006].

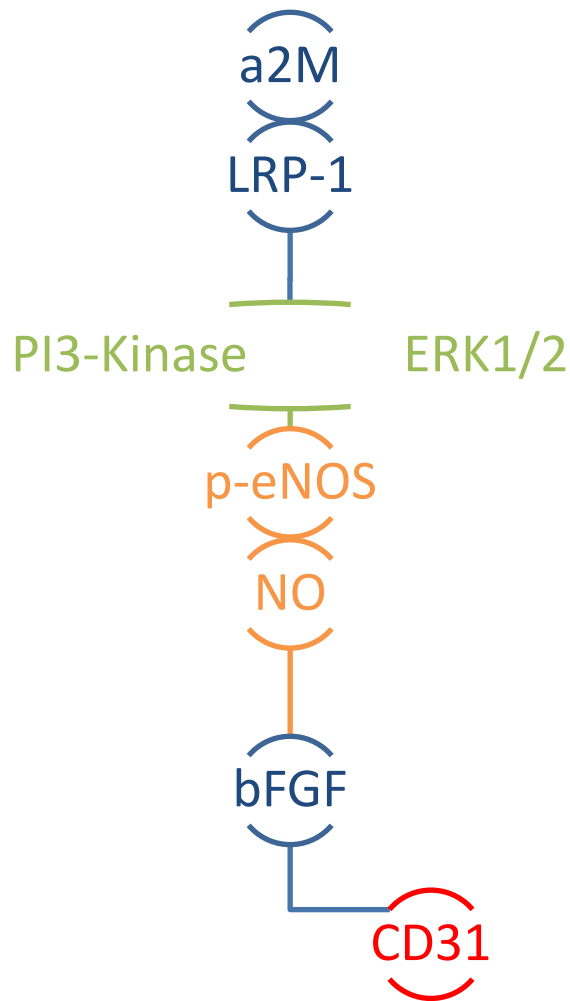
Da HIF-1 $\alpha$  das VEGF-Gen reguliert überrascht es nicht, dass a2M die Expression von VEGF ebenfalls nicht beeinflusst (siehe Kapitel 4.11). Auch wenn die Beteiligung von VEGF eine zentrale Bedeutung für die Angiogenese hat [Carmeliet & Collen, 2000; Yancopoulos et al., 2000], konnte für die a2M induzierte Vaskulogenese in embryonalen Stammzellen der Maus keine Mitbeteiligung nachgewiesen werden. Die Konzentration von VEGF blieb von der Stimulation mit a2M unberührt, was darauf hindeutet, dass es sich bei der a2M-induzierten Vaskulogenese um einen HIF-1 und VEGF unabhängigen Prozess handelt. Die VEGF-unabhängige Angiogenese, die über ERK 1/2, PI3-Kinase und eNOS vermittelt wird, konnte auch bei HUVEC nachgewiesen werden und unterstützt die vorliegenden Ergebnisse [Mehta & Besner, 2007]. VEGF scheint zentral für das Wachstum von Angioblasten und die Morphogenese initialer Gefäßstrukturen zu sein, während bFGF die Bildung von Angioblasten zu induzieren scheint [Poole et al., 2001]. Die Untersuchungen dieser Studie zeigen keine Veränderung der VEGF- und HIF-1 $\alpha$ -Expression nach Stimulation mit a2M. Dies lässt die Vermutung zu, dass a2M die endotheliale Zelldifferenzierung über bFGF induziert, während Gefäßsprössung

und Tubulomorphogenese durch endogenes VEGF, dessen Konzentration in avaskulären EBs (vor Vaskulogenese) erhöht ist, gesteuert werden [Wartenberg et al., 2001].

Letztlich konnte auch keine erhöhte Ki67-Expression nach a2M-Stimulation bei HUVEC nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.13). Dies weist darauf hin, dass a2M eher die Differenzierung kardiovaskulärer Vorläuferzellen induziert, als die Proliferation schon differenzierter Endothelzellen zu stimulieren. Zudem konnte neben der zunehmenden Vaskularisierung eine vermehrte Kardiomyogenese gezeigt werden. Der Zusammenhang zwischen Kardiomyogenese und Vaskulogenese wurde bereits von Kattman und Kollegen beschrieben; dabei wurde gezeigt, dass Kardiomyozyten und Endothelzellen sich aus den gleichen Vorläuferzellen differenzieren [Kattman et al., 2006]. Daraus lässt sich schließen, dass a2M die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Endothelzellen stimuliert, nicht aber deren Proliferation.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass a2M die Vaskulogenese in embryonalen Stammzellen der Maus über LRP-1, die Aktivierung von ERK 1/2, PI3-Kinase, eNOS, NO und schließlich über eine erhöhte Expression von bFGF induziert. Diese Signalkaskade ist in Abbildung 32 dargestellt.

Für die klinische Praxis stellt sich die Frage nach einer Umsetzung dieses Wissens in adjuvante pharmakologische Therapieansätze zur Geweberegeneration bei vaskulären Erkrankungen, insbesondere Herzinfarkten. Es ist aber weitere Grundlagenforschung notwendig, um zukünftig solche Behandlungsmöglichkeiten erschließen und etablieren zu können.



**Abbildung 32: Signalweg von a2M bei Stimulierung der Vaskulogenese.** Die Abbildung stellt den in dieser Arbeit beschriebenen Signalweg dar. Es konnte gezeigt werden, dass a2M über LRP-1 seine Wirkung vermittelt. Dabei werden die PI3-Kinase, ERK 1/2 aktiviert und führen zur Phosphorylierung von eNOS und einer damit verbundenen intrazellulären NO-Ausschüttung. Dadurch wird die Expression von bFGF stimuliert und steigert wiederum die CD31-Genexpression und damit die Vaskularisierung.

## 6 Zusammenfassung

alpha-2-Makroglobulin (a2M) ist ein Akut-Phase-Protein, welches bei Gewebsschädigung, z.B. bei Inflammation, Myokardinfarkt oder malignen Neoplasien, vermehrt im Blutplasma vorkommt. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von a2M auf die Vaskulogenese in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus untersucht.

Als Modell wurden embryoid bodies (EBs) verwendet, die aus ES-Zellen gezüchtet werden. Die Untersuchungen zur Proteinexpression und Proteinphosphorylierung wurden mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen und Laserrastermikroskopie durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass a2M die Vaskularisation der EBs stimuliert. Die Expression des Endothelzellmarkers CD31, wie auch die CD31-positiven Areale der EBs waren signifikant erhöht. In Folgeuntersuchungen wurde auch der Signaltransduktionsweg für diesen Effekt geklärt: eine Präinkubation mit einem Antikörper gegen den a2M-Rezeptor LRP-1 inhibierte die Wirkung von a2M, was auf eine Beteiligung dieses Rezeptors schließen lässt. Nach Inkubation von embryoid bodies mit a2M konnte die Aktivierung der ERK 1/2-Signalkaskade und der PI3-Kinase-Signalkaskade gezeigt werden. Weiterhin wurde die Aktivierung von eNOS und damit erhöhte p-eNOS Konzentration, wie auch eine erhöhte intrazelluläre NO-Generierung, nachgewiesen. Schließlich konnte auch eine vermehrte bFGF-Expression gezeigt werden.

Die a2M-induzierte Vaskulogenese wurde jeweils gehemmt durch die Präinkubation mit PD98059, einem ERK 1/2-Inhibitor, mit LY294002, einem PI3-Kinase-Inhibitor, mit L-NAME, einem eNOS-Inhibitor und mit SU5402, einem Inhibitor des bFGF-Signalweges. Eine Auswirkung von a2M auf VEGF, HIF-1 $\alpha$  und MAP p38 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Eine vermehrte Expression von Ki67 in HUVEC konnte nicht gezeigt werden, was darauf hinweist, dass es sich bei der a2M-induzierten Vaskularisierung um den Effekt der Vaskulogenese handeln könnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass a2M die Vaskulogenese in embryonalen Stammzellen der Maus über LRP-1, die Aktivierung von ERK 1/2, PI3-Kinase, eNOS, NO und schließlich über eine erhöhte Expression von bFGF induziert.



## 7 Summary

Alpha-2 macroglobulin (a2M) is an acute phase protein increasingly released in reaction to tissue damage, e.g. inflammation, myocardial infarction or malignant neoplasms. In this study we investigated the effect of a2M on vasculogenesis in murine embryonic stem (ES) cells.

We used Embryoid Bodies (EBs) as a model for vasculogenesis. EBs are grown from ES cells using a spinner flask system. We investigated protein expression and protein phosphorylation by using immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy. Nitric oxide (NO) generation was monitored by microfluorometry using the fluorescent NO indicator DAF-FM diacetate.

a2M stimulates the vascularization of EBs. The expression of endothelial CD31, as well as CD31-positive areas of the EBs was significantly elevated. In follow-up studies on the signaling pathway for this effect we found that pre-incubation with an antibody to the a2M receptor LRP-1 inhibited the effect of a2M, which suggests an involvement of this receptor. After incubation of EBs with a2M activation of ERK 1/2 pathway and PI3 kinase pathway was shown. Furthermore, the activation of eNOS and therefore increased p-eNOS concentration were detected, as well as an increased intracellular NO generation and increased expression of bFGF.

a2M induced vasculogenesis was inhibited after preincubation with different substances such as PD98059, an ERK 1/2-inhibitor, LY294002, a PI3-kinase inhibitor, L-NAME, an eNOS inhibitor or SU5402, an inhibitor of bFGF-signaling pathway. However, an effect of a2M on VEGF, HIF-1 $\alpha$  and p38 MAPK could not be detected. Increased expression of Ki67 in HUVEC could not be shown, suggesting that a2M induced vascularization effect of cell differentiation rather than proliferation.

These results show that a2M induces vasculogenesis in mouse embryonic stem cells via LRP-1, activation of ERK 1/2, PI3-kinase, eNOS, NO, and finally an increased expression of bFGF.

## 8 Literaturverzeichnis

Ahrens, I., Domeij, H., Topcic, D., Haviv, I., Merivirta, R.-M., Agrotis, A. et al. (2011). Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression. *PLoS ONE*, 6, e23210.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2003). *Molekularbiologie der Zelle: Wiley-VCH, Weinheim.*

Altomare, D. A. & Testa, J. R. (2007). AKT2 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. Online verfügbar unter <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/AKT2ID517ch19q13.html>.

Ashraf, S., Mapp, P. I. & Walsh, D. A. (2010). Angiogenesis and the persistence of inflammation in a rat model of proliferative synovitis. *Arthritis Rheum.*, 62, 1890–1898.

Asplin, I. R., Wu, S. M., Mathew, S., Bhattacharjee, G. & Pizzo, S. V. (2001). Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by alpha(2)-macroglobulin: evidence for selective modulation of FGF-2-induced angiogenesis. *Blood*, 97, 3450–3457.

Ateghang, B., Wartenberg, M., Gassmann, M. & Sauer, H. (2006). Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1alpha and intracellular reactive oxygen species. *J. Cell. Sci*, 119, 1043–1052.

Benizri, E., Ginouvès, A. & Berra, E. (2008). The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 1133–1149.

Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C. et al. (1998). Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.*, 19, 357–360.

Borth, W. (1994). *Biology of Alpha 2 -Macroglobulin, its receptor, and related proteins.* New York Academy of Sciences, New York.

Carmeliet, P. & Collen, D. (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 902, 249-62; discussion 262-4.

- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M. et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435–439.
- Cherubino, M. & Marra, K. G. (2009). Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. *Regenerative medicine*, 4, 109–117.
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem. Sci*, 28, 488–494.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. & Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 7686–7689.
- Dudzinski, D. M. & Michel, T. (2007). Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.*, 75, 247–260.
- Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. & Dvorak, A. M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol*, 146, 1029–1039.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154–156.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S. et al. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 18623–18632.
- Feraud, O., Cao, Y. & Vittet, D. (2001). Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab. Invest*, 81, 1669–1681.
- Ferrara, N. & Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 161, 851–858.
- Furchgott, R. F., Cherry, P. D., Zawadzki, J. V. & Jothianandan, D. (1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 6 Suppl 2, 336-343.
- Gendron, R. L., Tsai, F. Y., Paradis, H. & Arceci, R. J. (1996). Induction of embryonic vasculogenesis by bFGF and LIF in vitro and in vivo. *Dev. Biol*, 177, 332–346.

- Giuliani, N., Lunghi, P., Morandi, F., Colla, S., Bonomini, S., Hojden, M. et al. (2004). Downmodulation of ERK protein kinase activity inhibits VEGF secretion by human myeloma cells and myeloma-induced angiogenesis. *Leukemia*, 18, 628–635.
- Griffith, T. M., Edwards, D. H., Lewis, M. J., Newby, A. C. & Henderson, A. H. (1984). The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, 308, 645–647.
- Grinnell, F., Zhu, M. & Parks, W. C. (1998). Collagenase-1 complexes with alpha2-macroglobulin in the acute and chronic wound environments. *J. Invest. Dermatol.*, 110, 771–776.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H. et al. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440, 1199–1203.
- Hagedorn, M. & Bikfalvi, A. (2000). Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 34, 89–110.
- Hallbach, J. (2006). *Klinische Chemie für den Einstieg*. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Haynes, L. W. (1988). Fibroblast (heparin-binding) growing factors in neuronal development and repair. *Mol. Neurobiol.*, 2, 263–289.
- Hong, S.-K. & Dawid, I. B. (2008). Alpha2 macroglobulin-like is essential for liver development in zebrafish. *PLoS ONE*, 3, e3736.
- Hsieh, M. M., Linde, N. S., Wynter, A., Metzger, M., Wong, C., Langsetmo, I. et al. (2007). HIF prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood*, 110, 2140–2147.
- Hunt, T. K., Knighton, D. R., Thakral, K. K., Goodson, W. H. & Andrews, W. S. (1984). Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery*, 96, 48–54.
- Jones, M. (2006). Stem cells diagram. Online verfügbar unter [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Stem\\_cells\\_diagram.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Stem_cells_diagram.png), zuletzt geprüft am 30.05.2010.

- Jones, M. K., Tsugawa, K., Tarnawski, A. S. & Baatar, D. (2004). Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318, 520–528.
- Joseph-Silverstein, J. & Rifkin, D. B. (1987). Endothelial cell growth factors and the vessel wall. *Semin. Thromb. Hemost.*, 13, 504–513.
- Kataranovski, M., Magić, Z. & Pejnović, N. (1999). Early inflammatory cytokine and acute phase protein response under the stress of thermal injury in rats. *Physiol Res*, 48, 473–482.
- 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.
- Keller, G. M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 862–869.
- Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med*, 358, 2039–2049.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W. & Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, 25, 312–318.
- Klinke, R.; Silbernagl, S. (1996). Lehrbuch der Physiologie: Thieme, Stuttgart.
- Lange, S., Heger, J., Euler, G., Wartenberg, M., Piper, H. M. & Sauer, H. (2009). Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell-derived endothelial cells by calcium-mediated generation of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res*, 81, 159–168.
- Lange, S. (2008). Wachstumsfaktorvermittelte Signalprozesse bei der Vaskulogenese/Angiogenese embryonaler Stammzellen der Maus. Dissertation, Universität Gießen.
- Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J. K. et al. (2004). Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*, 32, 370–373.
- Lewis, P. D. (1968). Mitotic activity in the primate subependymal layer and the genesis of gliomas. *Nature*, 217, 974–975.

- Lillis, A. P., Mikhailenko, I. & Strickland, D. K. (2005). Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J. Thromb. Haemost.*, 3, 1884–1893.
- Maheshwari, R. K., Srikantan, V., Bhartiya, D., Kleinman, H. K. & Grant, D. S. (1991). Differential effects of interferon gamma and alpha on in vitro model of angiogenesis. *J. Cell. Physiol.*, 146, 164–169.
- Mathew, S., Arandjelovic, S., Beyer, W. F., Gonias, S. L. & Pizzo, S. V. (2003). Characterization of the interaction between alpha2-macroglobulin and fibroblast growth factor-2: the role of hydrophobic interactions. *Biochem. J.*, 374, 123–129.
- Matsumoto, T., Turesson, I., Book, M., Gerwins, P. & Claesson-Welsh, L. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J. Cell Biol.*, 156, 149–160.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E. et al. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399, 271–275.
- Mehta, V. B. & Besner, G. E. (2007). HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors*, 25, 253–263.
- Mehta, V. B., Zhou, Y., Radulescu, A. & Besner, G. E. (2008). HB-EGF stimulates eNOS expression and nitric oxide production and promotes eNOS dependent angiogenesis. *Growth Factors*, 26, 301–315.
- Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Mansat, M., Mansat, P. et al. (2005). A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J. Pathol.*, 206, 260–268.
- Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Møller, N. P., Risau, W. & Ullrich, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72, 835–846.
- Milosevic, N., Bekhite, M. M., Sharifpanah, F., Ruhe, C., Wartenberg, M. & Sauer, H. (2010). Redox stimulation of cardiomyogenesis versus inhibition of vasculogenesis

upon treatment of mouse embryonic stem cells with thalidomide. *Antioxid. Redox Signal.*, 13, 1813–1827.

Misra, U. K., Gawdi, G. & Pizzo, S. V. (1995). Ligation of the alpha 2-macroglobulin signalling receptor on macrophages induces protein phosphorylation and an increase in cytosolic pH. *Biochem. J.*, 309 (Pt 1), 151–158.

Misra, U. K. & Pizzo, S. V. (2004). Activation of Akt/PDK signaling in macrophages upon binding of receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin to its cellular receptor: effect of silencing the CREB gene. *J. Cell. Biochem.*, 93, 1020–1032.

Mohammadi, M., McMahon, G., Sun, L., Tang, C., Hirth, P., Yeh, B. K. et al. (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science*, 276, 955–960.

Murphy, D. A., Makonnen, S., Lassoued, W., Feldman, M. D., Carter, C. & Lee, W. M. F. (2006). Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006). *Am. J. Pathol.*, 169, 1875–1885.

Nobel Foundation. All Nobel Laureates in Medicine. Online verfügbar unter [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/index.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/index.html), zuletzt geprüft am 31.03.2010.

Noden, D. M. (1988). Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development*, 103 Suppl, 121–140.

Noden, D. M. (1991). Cell movements and control of patterned tissue assembly during craniofacial development. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 11, 192–213.

Oehmichen, M., Schmidt, V. & Stuka, K. (1989). Immunhistochemischer Vitalitätsnachweis von offenen Hautwunden am Paraffinschnitt. *Beitr. Gerichtl. Med.*, 47, 7–11.

Padmasekar, M., Nandigama, R., Wartenberg, M., Schlüter, K.-D. & Sauer, H. (2007). The acute phase protein alpha2-macroglobulin induces rat ventricular cardiomyocyte hypertrophy via ERK1,2 and PI3-kinase/Akt pathways. *Cardiovasc. Res.*, 75, 118–128.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524–526.

- Papapetropoulos, A., García-Cardena, G., Madri, J. A. & Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 100, 3131–3139.
- Poole, T. J., Finkelstein, E. B. & Cox, C. M. (2001). The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev. Dyn*, 220, 1–17.
- Rajashekhar, G., Kamocka, M., Marin, A., Suckow, M. A., Wolter, W. R., Badve, S. et al. (2011). Pro-inflammatory angiogenesis is mediated by p38 MAP kinase. *J. Cell. Physiol.*, 226, 800–808.
- Rees, D. D., Palmer, R. M., Schulz, R., Hodson, H. F. & Moncada, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 101, 746–752.
- 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.
- Robertson, S. A., Rae, C. J. & Graham, A. (2009). Induction of angiogenesis by murine resistin: putative role of PI3-kinase and NO-dependent pathways. *Regul. Pept.*, 152, 41–47.
- 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.
- 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.
- Scholzen, T. & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.*, 182, 311–322.
- Schweigerer, L. (1989). Fibroblast growth factor and angiogenesis. *Z Kardiol*, 78 Suppl 6, 12–15.
- Statistisches Bundesamt (2007). Todesursachen in Deutschland. *Fachserie 12 Reihe* 4.



- Steinmetz, M., Nickenig, G. & Werner, N. (2010). Endothelial-regenerating cells: an expanding universe. *Hypertension*, 55, 593–599.
- Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Burgess, W. H., Migliorini, M. & Argraves, W. S. (1990). Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J. Biol. Chem.*, 265, 17401–17404.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676.
- Tete', S., Mastrangelo, F., Grimaldi, S., Costanzo, G., Salini, L., Speranza, L. et al. (2005). Immunohistochemical evaluation of CD31 in human cystic radicular lesions and in keratocysts. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 18, 39–45.
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, No. 5391 (1998), 1145-1147.
- Till, J. E. & McCulloch, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, 14, 213–222.
- Tilly, J. L. & Telfer, E. E. (2009). Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Mol. Hum. Reprod.*, 15, 393–398.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. & Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, 269, 5241–5248.
- Wartenberg, M., Dönmez, 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., Günther, J., Hescheler, J. & Sauer, H. (1998). The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest.*, 1301–1314.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P. et al. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684–687.

Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242–248.

Yong, H.-Y., Koh, M.-S. & Moon, A. (2009). The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 18, 1893–1905.