

Die Bedeutung von mechanischem Stress für die Vaskulogenese embryonaler Stammzellen und die Expression von Axon-Guidance Molekülen

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sascha Behr

(Diplom Biologe)
aus Düsseldorf

Gießen 2013

Aus dem Physiologischen Institut
Des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. R. Schulz

Gutachter : Prof. Dr. H. Sauer

Gutachter: Prof. Dr. K. Giehl

Tag der Disputation: 24. Juni 2014

*In Dankbarer Erinnerung
an meine Großmutter
Margareta Vogt*

Was vor uns liegt und was hinter uns liegt,
ist unbedeutend verglichen mit dem,
was in uns steckt.

(Ralph Waldo Emerson 1803 – 1882)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1. Mechanischer Stress	2
1.2 Stammzellen	3
1.2.1 Embryonale Stammzellen	6
1.2.2 Adulte Stammzellen	7
1.3 Vaskulo- und Angiogenese	7
1.3.1 Vaskulogenese	8
1.3.2 Angiogenese	8
1.4 Axon Guidance Moleküle	8
1.4.1 Neuropiline, Semaphorine und Plexine	9
1.4.2 Ephrin und Eph	11
1.4.3 Slit und Robo	12
1.5 Tip-Zell Konzept	13
1.6 Wachstumsfaktoren	13
1.6.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	14
1.6.2 FGF (Fibroblast Growth Factor)	14
1.6.3 PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	15
1.7 Signaltransduktion	15
1.8 Kalzium	17
1.9 Stickstoffmonoxid (NO)	17
1.10 Reaktive Sauerstoffe Spezies (ROS)	18
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
3 MATERIAL	21
3.1 Firmen	21
3.2 Materialien	22
3.3 Chemikalien und Substanzen	23
3.4 Antikörper	24
3.4.1 primäre Antikörper	24
3.4.2 sekundäre Antikörper	25
3.5 Zellen	25
3.6 Medien	25

3.7	Puffer	26
3.8	Inhibitoren	27
3.8.1	LY294002 (MERCK 440202)	27
3.8.2	SU5614 (MERCK 573632)	27
3.8.3	L-NAME (Alexis ALX-105-003-G025)	28
3.8.4	VAS2870 (Vasopharm)	28
3.9	Substanzen	29
3.9.1	BAPTA-AM (Calbiochem 196419)	29
3.9.2	DAF-FM DA (Invitrogen C10444)	30
3.9.3	Fluo4-AM (Molecular Probes F-14201)	30
3.9.4	DCFH-DA (Invitrogen D-399)	31
4.	METHODEN	32
4.1	Embryonale Stammzellkultur	32
4.2	Kultivierung embryonaler Stammzellen in Spinnerflaschen	32
4.3	Differenzierung embryonaler Stammzellen	33
4.4	Mechanische Zugbelastung im Flexercell System	34
4.5	Immunhistochemie	34
4.6	CD31 (PECAM-1)	35
4.7	Western Blot	36
4.7.1	Proteinextraktion	36
4.7.2	Gelelektrophorese und Blotting	36
4.7.3	Ponceau Färbung	37
4.7.4	Nachweis spezifischer Proteine	37
4.7.5	Stripping	37
4.8	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	38
4.9	Kalzium Messungen	39
4.10	Qualitativer Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	40
4.11	Qualitativer Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO)	40
4.12	Statistik	41
5	ERGEBNISSE	42
5.1	Einfluss mechanischer Zugbelastung und die Bedeutung von intrazellulärem Kalzium für die endotheliale Differenzierung	42
5.2	Kalziumsignale in Zellen dissoziierter Embryoid Bodies nach mechanischer Zugbelastung und Behandlung mit BAPTA-AM	44
5.3	Einfluss der mechanischen Zugbelastung und BAPTA-AM auf die Expression von Axon-Guidance Proteinen	46
5.3.1	Proteinexpression von Neuropilin1, Semaphorin4D und PlexinB1	46
5.3.2	Proteinexpression von EphrinB2 und EphB4	49
5.3.3	Proteinexpression von Robo1, Robo4 und Slit2	52

5.4 Die Bedeutung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für die Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung.	55
5.4.1 Nachweis der ROS Bildung nach mechanischer Zugbelastung und Inkubation mit BAPTA-AM und VAS287055	
5.4.2 Einfluss der ROS auf die Vaskularisierung von EBs	58
5.5 Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) für die Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung.	59
5.6 Auswirkungen mechanischer Zugbelastung auf die Expression proangiogener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren.	67
5.7 Aktivierung von PI3-Kinase, ERK und JNK während der mechanischen Zugbelastung.	72
5.7.1 Bedeutung der PI3-Kinase für Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung.	73
5.7.2 Einfluss der mechanischen Zugbelastung auf die Aktivität der MAP-Kinasen ERK und JNK	77
6 DISKUSSION	80
6.1 Mechanische Zugbelastung und intrazelluläres Kalzium	80
6.2 Axon-Guidance Proteine und Wachstumsfaktoren in der stressinduzierten Vaskulogenese von ES-Zellen	81
6.3 Bedeutung des intrazellulären Kalziums für die stressinduzierte ROS-Generierung	85
6.4 Bedeutung von NO für die Vaskularisierung	86
6.5 Aktivität von MAP-Kinasen und der PI3-Kinase in Folge der Applikation mechanischer Zugbelastung	88
7 SUMMARY	89
8 ZUSAMMENFASSUNG	91
9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
11 LITERATUR	100
12 PUBLIKATIONEN	112
ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	113
DANKSAGUNG	114

1 EINLEITUNG

Die Differenzierung von Stammzellen kann durch eine Reihe von Signalen eingeleitet werden. Zu diesen Signalen gehören neben löslichen Faktoren (z.B. Wachstumsfaktore, Zytokine etc.) und membranständigen Molekülen (z.B. Integrine) auch mechanische Reize. Während darüber, wie lösliche Faktoren und membranständige Proteine die Differenzierungsprozesse regulieren und beeinflussen, viel bekannt ist, gilt dies nur begrenzt für die mechanischen Signale und ihren Einfluss auf die Differenzierung. Biomechanische Kräfte und die Art und Weise ihrer Beteiligung an den Differenzierungsprozessen rücken erst langsam in den Interessensfokus. Allgemein ist die Beteiligung mechanischer Kräfte an verschiedenen Prozessen der Embryonalentwicklung aber bereits bekannt, so etwa bei der Entwicklung des Myokards (Reckova et al 2003, Forouhar et al 2006), der fetalen Lunge (Sanches-Esteban et al 2001, Cohen u. Larson 2006), der Niere (Vasilyev et al 2009) und auch des vaskulären Epitheliums (Mammoto et al 2009).

Das Blutgefäßsystem gilt als das wichtigste Versorgungssystem des Organismus. Seine zentrale Funktion ist Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen an Zellen, Gewebe und Organe, sowie der Abtransport von Metaboliten. Neben den Aufgaben im Stoffwechsel ist das Blutgefäßsystem auch für den Transport und die Verteilung von Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Lymphozyten etc.) oder aber Hormonen von besonderer Bedeutung. Wie wichtig das Gefäßsystem für den Organismus ist, zeigt sich darin, dass es zu den ersten funktionsfähigen Systemen während der Embryogenese gehört. Die Ausbildung eines vollkommenen und funktionsfähigen Blutgefäßsystems ist für eine störungsfreie und vollständige Entwicklung des Embryos von hervorgehobener Bedeutung. Eines der Schlüsselmerkmale des Gefäßsystems ist dabei seine äußerst komplexe Verzweigung und Gliederung, die es ermöglicht, dass keine Zelle weiter als 200 µm von einem Blutgefäß oder einer Kapillare entfernt ist (Loffredo 2008).

An der Ausbildung des Blutgefäßsystems sind zwei unterschiedliche Prozesse beteiligt, die Vaskulogenese und die Angiogenese. Vaskulogenese bezeichnet die *de novo* Bildung von Blutgefäßen aus mesodermalen Vorläuferzellen während der Embryogenese; wohingegen Angiogenese das Auswachsen neuer Gefäße aus bereits vorhandenen durch Proliferation und Migration von Endothelzellen beschreibt. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesen beiden Prozessen um getrennte Vorgänge handelt. Dabei wurde die Vaskulogenese als ausschließlich im Zuge der Embryonalentwicklung stattfindend identifiziert, während die Angiogenese nur im adulten Organismus eine Rolle spielt. Neuere Erkenntnisse

zeigen jedoch, dass dies nicht der Fall ist, sondern dass es sowohl während der Embryogenese als auch bei Adulten zu beiden Prozessen kommt (Ribatti 2001, Drake 2003 Tengers et al, 2010).

Zu den physiologischen Funktionen der Angiogenese zählen neben der Gefäßbildung im Zuge der Embryogenese noch der Menstruationszyklus, die Plazentabildung während der Schwangerschaft und die Wundheilung. Abgesehen von diesen, für den Organismus wichtigen und notwendigen Formen der Gefäßbildung, gibt es noch eine Reihe pathologischer Formen der Angiogenese. Man kann in diesem Zusammenhang von Angiogenese-assoziierten Erkrankungen sprechen, wobei man zwischen einem starken Auswachsen von Gefäßen und einer unzureichenden Blutgefäßbildung unterscheiden kann. Das aggressive Auswachsen der Gefäße trifft man vor allem bei chronischen Entzündungserkrankungen (rheumatische Arthritis), Arteriosklerose, diabetischer Retinopathie (Neovaskularisierung der Retina, mit der Folge des Erblindens) und besonders bei Krebs an (Carmeliet 2000, Griffioen 2000, Nonaka et al 2002, Papetti 2002). Eine unzureichende Blutgefäßbildung tritt dagegen bei Vernarbungen nach einem Myokardinfarkt und chronischen Wundheilungsstörungen (Ferrara 1999, Lauer et al. 2000) auf.

Anfang der 1980er Jahre gelang es, pluripotente embryonale Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert wurden, in Kultur zu bringen (Evans u. Kaufmann 1981). Die Möglichkeiten der Stammzellkultur eröffnen einen neuen Blick auf die Embryonalentwicklung und so auch auf die Gefäßbildung.

1.1. Mechanischer Stress

Mechanische Reize sind Signale, die von Zellen als Folge der Applikation von Kraft wahrgenommen werden. Die Kräfte, die dabei auf und in Zellen wirken, sind als Stress zu bezeichnen und werden als Druck pro Flächeneinheit eines deformierbaren Körpers angegeben. Die Zelldeformationen als Reaktion auf Stress werden dabei durch die mechanischen und strukturellen Eigenschaften der Zelle beeinflusst. Die von den Zellen wahrgenommenen mechanischen Reize werden in biochemische Signale umgewandelt, so dass man von Mechanotransduktion spricht. Daher haben mechanische Signale das Potential, die klassischen biochemischen Signalwege zu beeinflussen oder aber mit ihnen zu interagieren.

Bei vielen Prozessen die in lebenden Zellen stattfinden, spielen mechanische Einflüsse eine bedeutende Rolle. So sind zum Beispiel Zellteilung, Wachstum, Migration und Veränderungen der Zellstruktur mechanisch aktive Vorgänge. Somit sind alle Zellen eines lebenden Organismus mechanischen Kräften ausgesetzt, die von diesen entweder selbst generiert sind

oder aber einen extrazellulären Ursprung haben.

Der Einfluss mechanischer Kräfte auf den Embryo findet bereits in der frühesten Phase der Embryogenese statt. Dabei wird angenommen, dass mechanische Kräfte, die auf die Blastozyste einwirken, trotz der räumlichen Abgrenzung durch die Zona Pellucida Einfluss auf die Zellanordnung und die Zellteilung während der Achsenbildung des frühen Embryos nehmen (Kurotaki et al 2007). Darüber hinaus sind mechanische Stimuli für verschiedene Gewebe und Zelltypen von besonderer Bedeutung und können Programme zur Differenzierung von Zellen auslösen. So ist bekannt, dass während der embryonalen Entwicklung Zellen sensitiv gegenüber mechanischen Signalen reagieren und in verschiedene physiologische Prozesse involviert sind. Dies gilt zum Beispiel für die Bildung von Blutgefäßen (Lucitti et al 2007), der Lunge (Moore et al 2005), Knochen (Stockes et al 2002) des hämatopoetischen Systems (Adamo et al., 2009), sowie des Herzens (Voronov et al 2004, Hove et al 2003).

1.2 Stammzellen

Als Stammzellen werden jene Zellen bezeichnet, die keine Differenzierung aufweisen und deren Funktionen im Organismus noch nicht determiniert sind. Sie zeichnen sich durch zwei Eigenschaften aus: zum einen durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zum anderen durch ihre Plastizität. Die Selbsterneuerung beschreibt dabei eine besondere Form der Proliferation in deren Verlauf es den Stammzellen möglich ist, eine Reihe von Zellteilungszyklen zu durchlaufen, ohne dabei ihren undifferenzierten Charakter zu verlieren. Der Selbsterneuerung liegen zwei Mechanismen zu Grunde: zum einen die symmetrische und zum anderen die asymmetrische Teilung. Während der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische Stammzellen, wohingegen die asymmetrische Teilung eine Stammzelle und eine differenzierte Zelle mit erhöhter Proliferationsrate hervorbringt.

Allgemein können sich Stammzellen in die Zellen aller drei Keimblätter und der Keimbahnen differenzieren. Die Plastizität oder das Differenzierungspotential können dabei aber stark variieren. So unterscheidet man Stammzellen basierend auf deren Plastizität in totipotente, pluripotente, multipotente und oligopotente Stammzellen (Schöler 2005).

Als totipotent werden die sich bildenden Stammzellen von der Syngamie bis hin zum 8-Zellstadium bezeichnet. Diese Zellen sind in der Lage sich in alle Körperzellen zu differenzieren. Zudem kann aus ihnen ein vollständiger Organismus gebildet werden.

Die sich aus den totipotenten Stammzellen bildenden pluripotenten Stammzellen sind im Stande, sich in jeden Zelltypen eines Organismus zu differenzieren und sind somit zur Bildung

von Geweben und Organen befähigt. Allerdings besitzen sie nicht mehr die Eigenschaft einen intakten Organismus zu bilden.

In ihrem Differenzierungspotential weiter eingeschränkt sind die multipotenten Stammzellen. Diese besitzen lediglich die Fähigkeit sich in eine Vielzahl von Zellen zu differenzieren, meistens aber nur noch in die Zelltypen eines Keimblattes.

Die Möglichkeit zur Differenzierung von oligipotenten Stammzellen beschränkt sich auf wenige Zelltypen innerhalb eines Gewebes.

Zusätzlich zum Differenzierungspotential lassen sich Stammzellen noch in embryonale und adulte Stammzellen einteilen. Wobei die Fähigkeit zur Differenzierung zwischen diesen beiden Gruppen sehr verschieden ist.

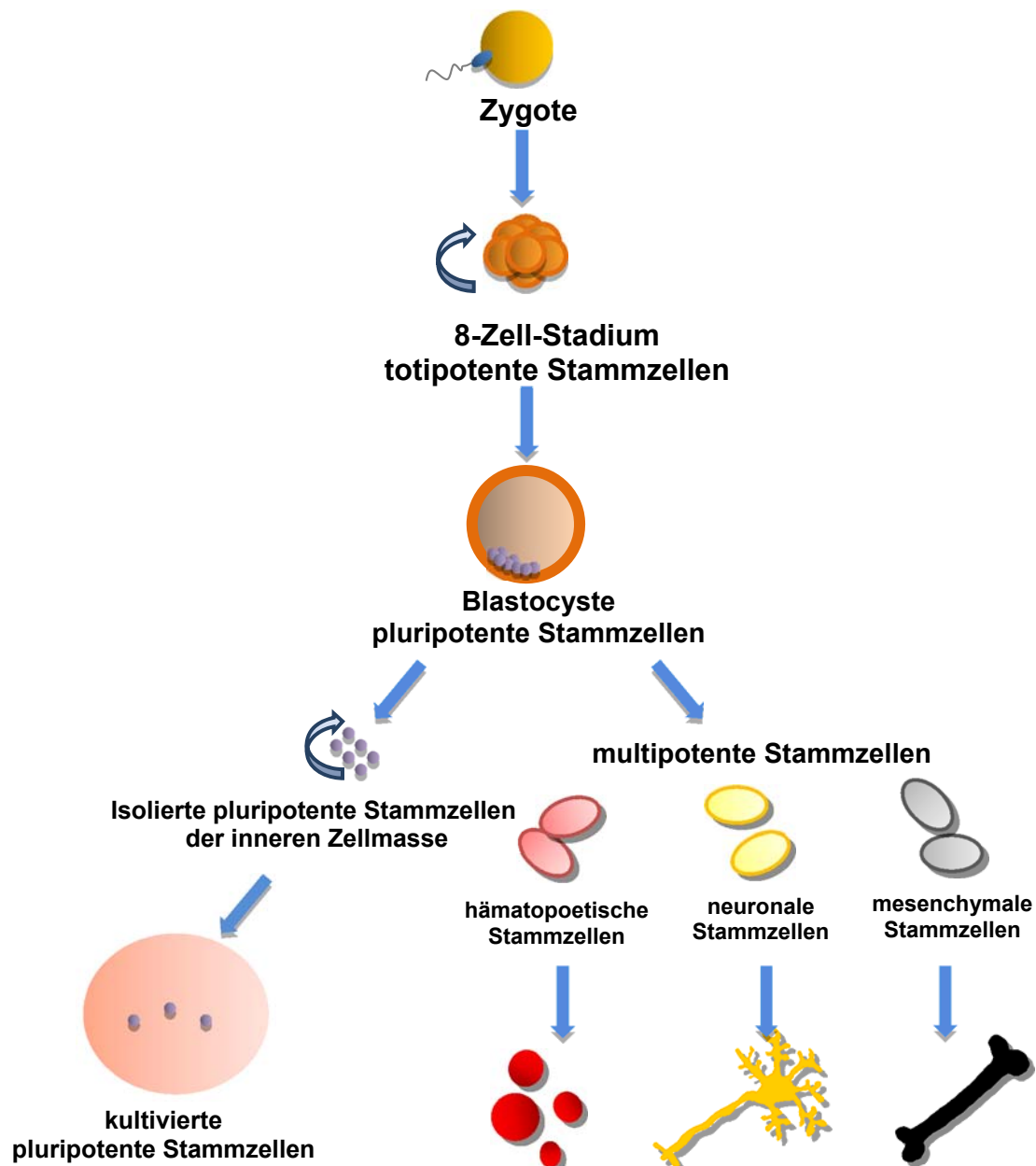


Abbildung 1.1: Übersichtsdiagramm der einzelnen Stammzellformen und ihr Differenzierungspotential. Die Abbildung wurde modifiziert nach <http://www.egbeck.de/skripten/bilder/stemcells.gif>

Zu Beginn der 1980er Jahre gelang es mehreren Gruppen unabhängig voneinander aus Maus Blastozysten die Zellen des Embryoblasten zu isolieren (Evans und Kaufman 1981; Thomson et al. 1995; Park et al. 2004). Durch die Zugabe des **L**eukämie **I**nhibierenden **F**aktors (LIF) ist es möglich, murine embryonale Stammzellen permanent und undifferenziert in Kultur zu halten. Dabei bindet LIF an einen heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus dem LIF-Rezeptor (LIFR) und dem Glycoprotein 130 (gp130). Dies führt zur Aktivierung des gp130 Signals über den JAK/STAT Signalweg, was für den Erhalt der Pluripotenz notwendig ist (Smith, 2001). Die Zellen behalten so ihren normalen euploiden Karyotypen sowie ihr Differenzierungspotenzial bei. Die erfolgreiche Kultivierung humaner embryonaler

Stammzellen gelang dagegen erst gegen Ende der 1990er Jahre (Thomson et al. 1998). Anders als bei murinen ES-Zellen wird die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters bei humanen Zellen durch den **b**asic **f**ibroblast **g**rowth **f**actor (bFGF/FGF2) erreicht

Zur *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen gibt es drei etablierte Methoden. Neben der Kultivierung auf Stromazellen und der Kultivierung auf extrazellulären Matrixproteinen gibt es noch das **E**mbroid **B**ody (EB)-Modell. Dabei ist es möglich, die EBs in Methylzellulose, in „hängenden Tropfen“ oder aber in einem Spinnerflaschensystem herzustellen (Keller et al 1995, Wartenberg et al, 1998). In dieser Arbeit wurde das EB-Modell verwendet, wobei die Herstellung der EBs unter Zuhilfenahme des Spinnerflaschensystems erfolgte.

Die Bildung von EBs in LIF-freiem Kulturmedium führt dazu, dass innerhalb der sich bildenden Zellaggregate Vorgänge der Differenzierung ablaufen, die viele Aspekte der frühen Embryogenese rekapitulieren (Doetschman et al. 1985). Im Unterschied zum eigentlichen Embryo ist in EBs das positionsbezogene Auswachsen der Zellen nicht möglich, so dass die Ausrichtung nach dorsal und ventral sowie anterior und posterior fehlt. Als wichtigste Eigenschaft dieses Modells sind die Zell-Zell Interaktionen und die Möglichkeit der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen zu nennen.

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden, sind bezogen auf ihr Differenzierungspotential pluripotent. Bei der Blastozyste handelt es sich um eine säugerspezifische Form der Blastula, die im Zuge der Embryonalentwicklung auf die Bildung der Morula folgt. Mit dem Ende des Furchungsprozesses am Tag 5 nach der Fertilisation, bildet sich während der Blastulation die Blastozyste aus. Strukturell lässt sich diese in die vier Segmente Zona Pellucida, Trophoblast, Blastozystenhöhle und den Embryoblasten unterteilen. Die Zona Pellucida oder Eihülle, grenzt die Blastozyste nach außen hin schützend ab. Der darauf folgende Trophoblast entwickelt sich im weiteren Verlauf teilweise zur Plazenta. Im inneren flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, dem Blastocoel, ist der Embryoblast lokalisiert. Aus ihm entwickelt sich später der Embryo.

Durch die Entnahme des zwischen 50 und 150 Zellen umfassenden Embryoblasten aus dem Blastocoel, lassen sich embryonale Stammzellen isolieren. Diese sind *in vivo* und *in vitro* im Stande, sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Kanatsu u. Nishikawa 1996).

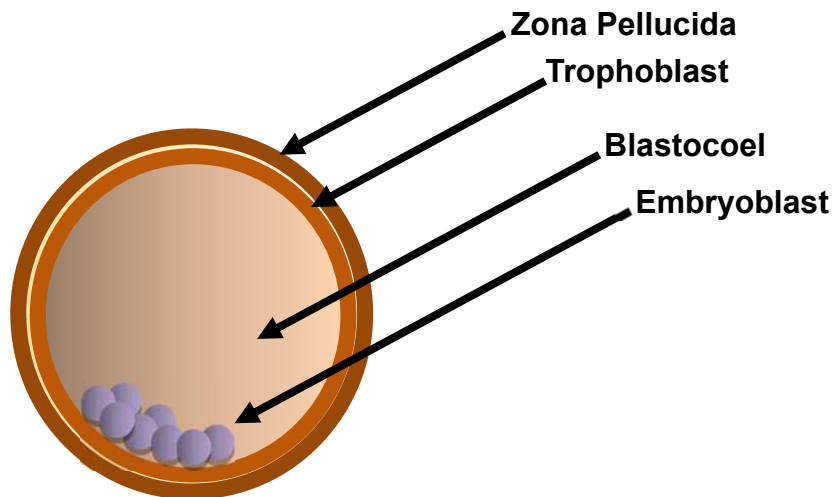


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Blastozyste im Querschnitt am 5. Tag. Hervorgehoben sind die vier Strukturen: Zona Pellucida, Trophoblast, Blastocoel und Embryoblast. (Modifiziert nach: <http://www.embryology.ch/allemand/evorimplantation/furchung02.html>)

1.2.2 Adulte Stammzellen

Bei adulten Stammzellen handelt es sich um multipotente, undifferenzierte Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Rossi u. Weissman 2006). Sie kommen in verschiedenen Geweben juveniler und adulter Organismen vor und haben dort die Aufgabe, die Gewebe instand zu halten und beschädigte Zellen auszutauschen. Bezogen auf die Gesamtzellzahl des Organismus ist der Anteil adulter Stammzellen jedoch äußerst gering. Es sind bisher 20 unterschiedliche Gewebe nachgewiesen, von denen bekannt ist, dass sie Quellen adulter Stammzellen sind. Darunter sind das Knochenmark, das Fettgewebe, das Herz, das Gehirn, die Blutgefäße, die Skelettmuskeln, die Haut und die Leber, sowie Knochen und Knorpel (Beltrami et al 2007). Das Knochenmark ist als Quelle adulter Stammzellen seit den 1960er Jahren bereits bekannt und kommt auch therapeutisch zum Einsatz (Thomas et al, 1957).

1.3 Vaskulo- und Angiogenese

Während der Embryonalentwicklung vertebrater Organismen ist das Blutgefäßsystem das erste funktionsfähige Organsystem, das gebildet wird. Da zu Beginn der Embryogenese die Entwicklung in einem avaskulären Umfeld stattfindet, ist die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff nur über die Diffusion möglich. Um den schnell wachsenden Embryo über die Möglichkeiten der Diffusion hinaus adäquat zu versorgen und den Abtransport von Metaboliten zu ermöglichen, ist ein vollständiges und gut ausgebildetes Gefäßsystem von großer Bedeutung. Die Bildung von Blutgefäßen erfolgt dabei in zwei Prozessen, zum einen durch die Vaskulogenese und zum anderen die Angiogenese. Die Bezeichnung Vaskulogenese ist mit der der Angiogenese etymologisch völlig gleich.

1.3.1 Vaskulogenese

Vaskulogenese beschreibt die *de novo* Bildung von Gefäßen durch Differenzierung und Zusammenlagerung von endothelialen Vorläuferzellen während der frühesten Phase der Embryogenese (Risau et al., 1988). Die Vaskulogenese nimmt ihren Ursprung sowohl im extrazellulären als auch im intrazellulären Gewebe des Embryos. Als Ursprungsorte der Vaskulogenese und Quelle des vaskulären Endothels, sowie der hämatopoetischen Progenitorzellen konnten dabei das embryonale Mesoderm, der extraembryonale Dottersack und die Plazenta ausgemacht werden (Caprioli et al. 2001). Bei den sich dort befindlichen Hämangioblasten handelt es sich um multipotente Stammzellen, die einen gemeinsamen Vorläufer für Blut- und Endothelzellen darstellen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt es durch Migration, Assoziierung und Differenzierung der Hämangioblasten zur Bildung sogenannter Blutinseln (*blood islands*). Diese setzen sich aus peripheren Angioblasten und zentral gelegen hämatopoetischen Zellen zusammen. Die Angioblasten formen im weiteren Verlauf durch anhaltende Proliferation und Migration tubuläre Strukturen, was zur Bildung des primitiven Plexus führt, der aus kleinen anastomotischen Gefäßen, besteht (Patel-Hett u D'Amore 2011).

1.3.2 Angiogenese

Angiogenese wird als das Auswachsen neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen definiert. Durch diesen, mehrere Schritte umfassenden Prozess, wird die Versorgung mit Blut in die bis dahin avaskulären Regionen etabliert. An der Angiogenese sind verschiedene Zelltypen (Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen) beteiligt, die durch die Bindung proangiogener Faktoren an die Rezeptoren der jeweiligen Zellen aktiviert werden und so die Angiogenese einleiten. Zu solchen proangiogenen Faktoren zählen unter anderem die Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und PDGF (D'Amore u. Smith 1993, Dimmeler et al 2000, Chappell et al, 2011 Herbert u. Strainer 2011).

Der Vorgang der Angiogenese wird durch das lokale Aufbrechen der Basalmembran eines Gefäßes eröffnet, woran sich das Ablösen der Perizyten anschließt. Die aktivierten Endothelzellen setzen Proteasen frei, die das Bindegewebe des Gefäßes lysieren und es so einer spezialisierten Form der Endothelzellen, der sogenannten Tip Zelle, ermöglichen aus dem parentalen Gefäß hin zum angiogenen Stimulus zu wandern (D'Amore et al. 2011).

1.4 Axon Guidance Moleküle

Das Blutgefäßsystem und das Nervensystem sind zwei anatomische Strukturen in Vertebraten, die zur Ausübung und Aufrechterhaltung komplexer Funktionen der Gewebe und

Organe von besonderer Bedeutung sind. Dabei obliegt diesen Systemen die Durchführung von zwei unterschiedlichen Aufgaben. So ist das Blutgefäßsystem für die Versorgung des Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Metaboliten verantwortlich. Das Nervensystem dagegen kontrolliert und koordiniert die Ausübung bestimmter Aufgaben durch die Umwandlung biochemischer und elektrischer Signale. Obwohl diese beiden Systeme somit zwei grundsätzlich unterschiedliche Funktionen ausüben, finden sich dennoch große Übereinstimmungen in ihrem Aufbau. Sowohl das Nervensystem als auch das Blutgefäßsystem sind streng hierarchisch organisierte, stark verzweigte Netzwerke; dabei findet man häufig dass Blutgefäße von Nervenfasern begleitet sind. Die Bildung dieser komplexen Netzwerke setzt die Koordinierung jener Vorgänge voraus, die an diesen Prozessen beteiligt sind. Dabei kommt es zu einer weiteren Gemeinsamkeit zwischen Nerven- und Blutgefäßsystem. Beide Systeme verwenden eine Reihe von Signalmolekülen, die am koordinierten Aufbau der Netzwerke maßgeblich beteiligt sind. In Anlehnung an die Entdeckung dieser Moleküle im Nervensystem und ihrer Funktion, werden diese als Axon-Guidance Moleküle bezeichnet. Man teilt diese Signalgeber in vier Molekül-Rezeptor Gruppen ein: Neuropiline, Semaphorine und Plexine; Ephrine und Ephs; Slits und Roundabouts sowie Netrine und UNC5B (Klagsbrun u. Eichmann 2005, Autiero et al 2005, Adams u. Eichmann 2010, Arese et al 2012).

1.4.1 Neuropiline, Semaphorine und Plexine

Neuropiline sind eine Familie einfach transmembraner Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 130-140 kDa. Zwei der wichtigsten Vertreter dieser Familie sind die zu 40% sequenzhomologen Proteine Neuropilin 1 (NRP1) und Neuropilin 2 (NRP2).

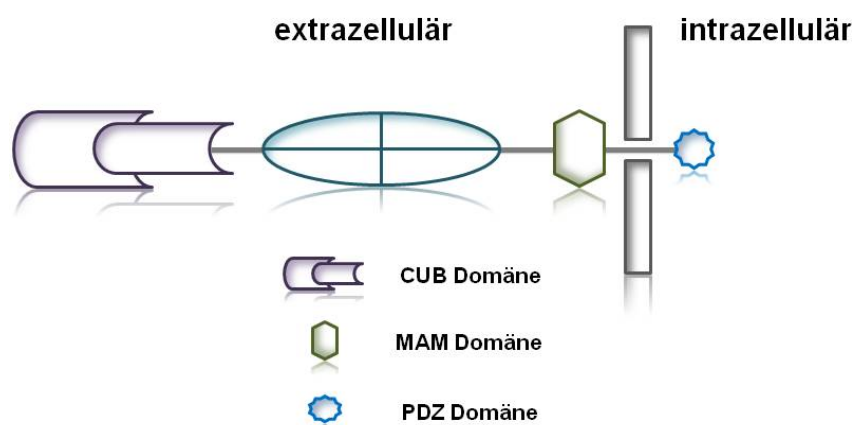


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau von Neuropilin.

Schematischer Aufbau des Proteins Neuropilin mit seinen unterschiedlichen funktionellen Domänen. Deutlich wird die große extrazelluläre und die sehr kurze zytosolische Domäne (Modifiziert nach Hinck, 2004).

Der Aufbau von Neuropilinen weist eine große extrazelluläre Domäne, eine sehr kurze transmembran Domäne und eine zytosolische Domäne auf. Es ist bekannt, dass diese Gruppe von Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung, aber auch der tumorinduzierten Angiogenese spielen (Kawasaki et al 1999, Geretti et al 2008, Ball et al 2010).

Als Liganden für Neuropiline gelten die Semaphorine sowie die Mitglieder der VEGF-Familie. Die Bindung von VEGF-A₁₆₅, einem Spliceprodukt von VEGF-A, an NRP1 vermittelt eine verstärkte Interaktion von VEGF-A₁₆₅ mit dem VEGF-Rezeptor 2 (FLK-1) (Kawasaki et al, 1999; Geretti et al, 2008). Die Glykoprotein-Familie der Semaphorine setzt sich aus sekretierten und membranständigen Proteinen zusammen. Es sind bisher mehr als 20 verschiedene Semaphorine bekannt, die in 8 Klassen eingeteilt werden. Dabei umfassen die Klassen 3-7 die Semaphorine vertebrater Organismen (Aurandt et al, 2006). Als Merkmal dieser großen Proteinfamilie ist allen Mitgliedern eine phylogenetisch konservierte N-terminale Sema-Domäne gemein (Seng Ch'ing u. Kumanogoh 2010). Neben ihrer Funktion im Nervensystem sind Interaktionen mit dem Immunsystem und eine Verbindung zur Tumorangiogenese bekannt. Des Weiteren spielen Semaphorine eine Rolle während der kardiovaskulären Entwicklung und wirken dort insbesondere auf die Zellmotilität. Als Hauptrezeptor der Semaphorine gelten Plexine (Bagri et al, 2009).

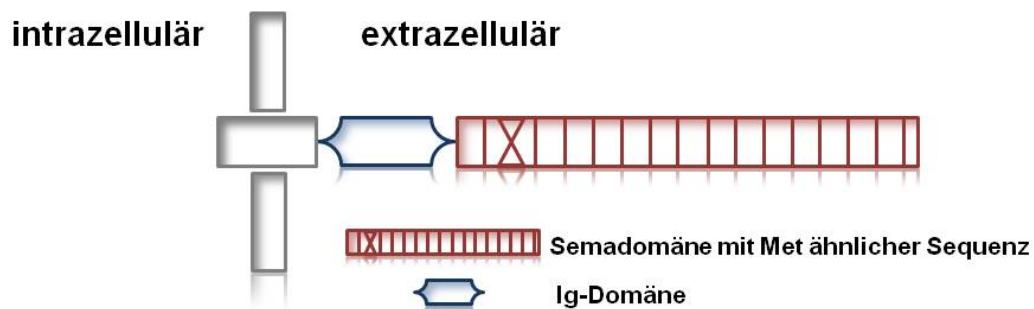


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau von Semaphorinen.

Schematische Darstellung des Aufbaus der Axon Guidance-Proteine aus der Familie der Semaphorine. Zu erkennen sind die für die Funktion des Proteins wichtigen Domänen und die Verankerung in der Membran. (Modifiziert nach Hinck, 2004).

Plexine sind einfach transmembrane Rezeptorproteine, die in Säugetieren in neun genetischen Variationen auftreten und aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier Subfamilien (A bis D) gruppiert werden. (Fazzari et al. 2007). Phylogenetisch sind die Plexine mit den Semaphorinen verwandt. So tragen die Plexine ebenfalls eine Sema-Domäne, die eine Protein-Protein Interaktion zwischen den Plexinen und den Semaphorinen vermittelt. Alle Plexine tragen eine konservierte intrazelluläre Sex und Plex-Domäne (Neufeld et al, 2012).

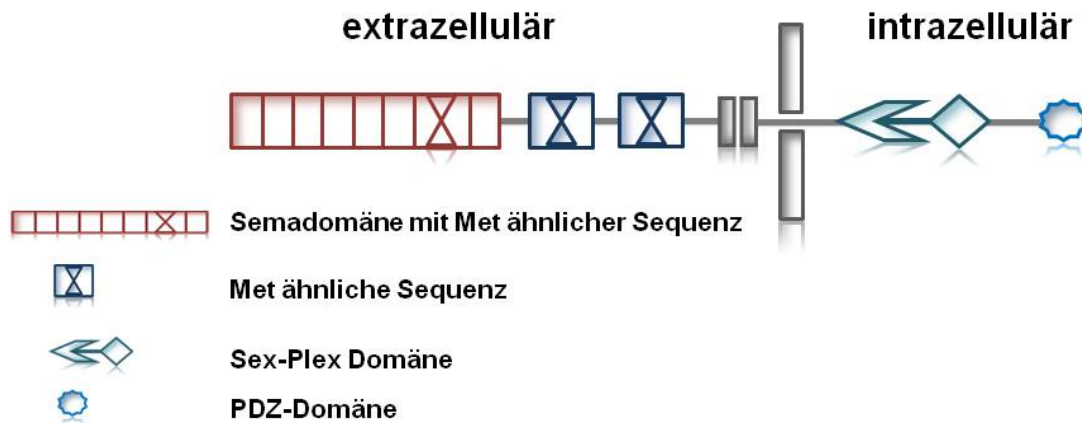


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau von Plexinen.

Schematischer Aufbau von Plexinen mit den unterschiedlichen funktionellen Domänen. Dargestellt sind die große extrazelluläre Semadomäne und die kürzere Sex-Plex Domäne (Modifiziert nach Hinck, 2004).

1.4.2 Ephrin und Eph

Sowohl Ephrin als auch Eph sind membranständige Oberflächenproteine. So gehören die Ephs zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, während es sich bei den Ephrinen um Oberflächenproteine handelt, die durch einen Glykosylphosphatidylinositol Anker oder eine transmembrane Region mit der Zelle verhaftet sind (Adams u. Eichmann 2010). Ephrine und Ephs werden im Verlauf der Embryogenese stark exprimiert und regulieren eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen - so etwa die Bildung des neuronalen Systems und des Blutgefäßsystems (Klagsbrun et al. 2005; Frisén et al. 2010; Genander et al. 2010).

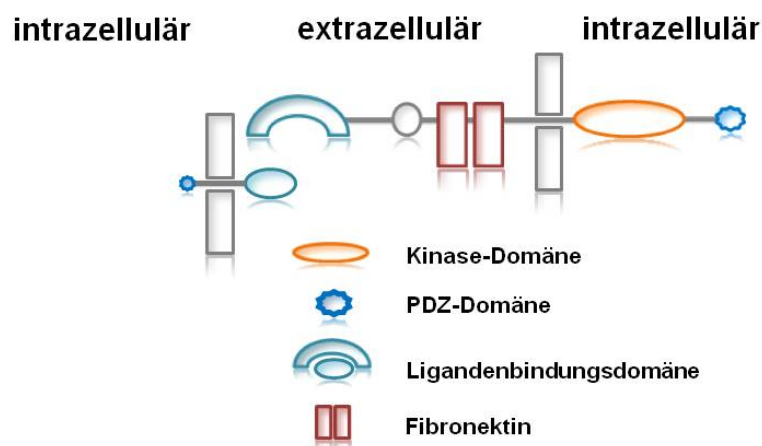


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau von Ephrin und Eph.

Schematische Darstellung der Proteine Ephrin (li.) und Eph (re.). Die Abbildung illustriert die Membranständigkeit beider Proteine sowie Möglichkeit der bidirektionalen Signalweiterleitung. (Modifiziert nach Hinck, 2004).

Eine Interaktion zwischen Rezeptor und Liganden ist auf Grund ihrer Membranständigkeit nur an Stellen möglich, an denen es zu einem direkten Zell-Zell Kontakt kommt. Die

Wechselwirkung zwischen Eph und Ephrin kann dabei bidirektional verlaufen, da die Signale nicht nur an die den Rezeptor präsentierende Zelle versandt werden können, sondern auch in die den Liganden präsentierende Zelle (Pasquale et al. 2005). Die acht Ephrine werden, basierend auf der Art ihrer Oberflächenbindung, in die Gruppen der Ephrine A und B unterteilt. Die Ephs werden beruhend auf Sequenzhomologie und Bindungspräferenz ebenfalls in die Klassen A und B eingeteilt (Kullander u. Klein 2002, Pasquale 2005).

1.4.3 Slit und Robo

Roundabouts (Robo) sind einfach transmembrane Proteine, die als Rezeptoren für die Familie der sekretierten Slit Signalmoleküle dienen (Brose et al. 1999; Kidd et al. 1999). In vertebraten Organismen sind vier Robo Isoformen (Robo 1-4) bekannt, von denen die Robos 1-3 überwiegend in neuronalem Gewebe exprimiert werden. Robo4 dagegen ist überwiegend in der embryonalen Vaskulogenese anzutreffen. Dieser Subtyp wird auch als „*magic roundabout*“ bezeichnet und ausschließlich von Endothelzellen exprimiert (Huminieck et al. 2002). Daneben konnte nur noch für Robo1 eine Exprimierung durch Endothelzellen nachgewiesen werden (Kaur et al. 2006; Sheldon et al. 2009). Bei den Slit Signalmolekülen handelt es sich um eine Gruppe stark konservierter Glykoproteine, die alle eine Bindungsregion für Robo-Rezeptoren tragen (Hohenester et al 2006).

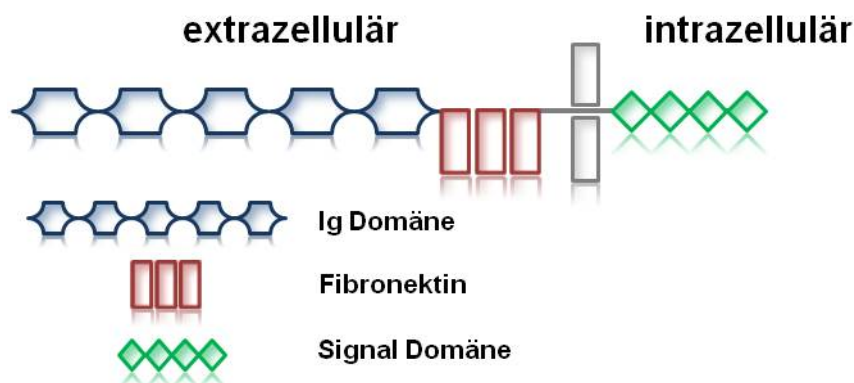


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Roundabouts (Robo).

Schematischer Aufbau der Proteine der Robo-Familie mit ihren unterschiedlichen funktionellen Domänen. (Modifiziert nach Hinck, 2004).

In Säugetieren sind drei Formen von Slit (Slit 1-3) bekannt (Grieshammer et al. 2004, Legg et al. 2008). Sie werden alle sekretiert und sind an verschiedenen Prozessen, darunter der neuronalen Entwicklung, der Nierenbildung und der Angiogenese beteiligt. Für den Verlauf der Gefäßbildung konnte eine Slit-Robo Interaktion nachgewiesen werden. Dabei bindet Slit2 an die endothelial exprimierten Rezeptoren Robo1 und Robo4 und beeinflusst so die Migration der Endothelzellen (Carmeliet u. Tessier-Lavigne 2005).

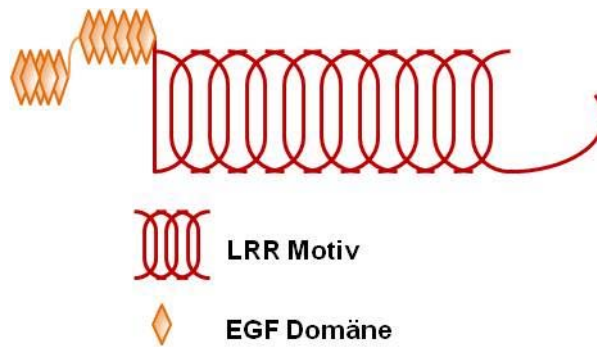


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung von Slit.

Schematischer Aufbau des Slit Proteins mit seinen unterschiedlichen funktionellen Domänen. Deutlich zu erkennen ist das große LRR Motiv des Proteins. (Modifiziert nach Hinck, 2004).

1.5 Tip-Zell Konzept

Das gerichtete Wachstum hoch komplexer und hierarchischer streng geordneter Netzwerke wie sie im Nerven- und Blutgefäßsystem anzutreffen sind, setzt einen Mechanismus voraus, durch den Signale wahr genommen und in zellspezifische Antworten umgewandelt werden. Während diese Aufgaben im Verlauf der neuronalen Entwicklung dem Wachstumshügel der Axone obliegt, ist die treibende Kraft der auswachsenden Blutgefäße eine spezialisierte Endothelzelle, die am distalen Ende einer jeden Gefäßausknosung lokalisiert ist (Gerhardt et al 2003, Autiero et al 2005). Diese Zelle wird als Tip-Zelle bezeichnet und nimmt eine Schlüsselrolle beim Gefäßwachstum ein. Sie trägt lange Filopodien, ist beweglich und invasiv. Die Tip-Zellen reagieren auf Richtungssignale, wie Wachstumsfaktoren und Axon-Guidance Moleküle, die beispielsweise von anderen Zellen sezerniert oder präsentiert werden und Informationen über deren Position vermitteln. Diese Signale können dabei anziehender oder abweisender Natur sein und so das Auswachsen und die Verzweigung dirigieren. Den Filopodien kommt dabei die Aufgabe zu, diese Signale wahrzunehmen und weiterzuleiten. Im Gegensatz zum Wachstum neuronaler Strukturen basiert das Auswachsen der Gefäßknospen nicht auf einer Verlängerung der Tip-Zellen, sondern vielmehr auf einer Anlagerung weiterer Endothelzellen, sogenannter Folgezellen (*stalk-cells*) an die Basis der Tip-Zelle (Gerhardt et al. 2003). Daher erreichen die Ausknospen meist nicht mehr als wenige Mikrometer bevor sie neue Verknüpfungen bilden. Um Gefäße über größere Distanzen auszubilden, ist daher eine Wiederholung dieser Schritte erforderlich (Phng u Gerhardt 2009).

1.6 Wachstumsfaktoren

Als Wachstumsfaktoren werden Signalmoleküle, zumeist Polypeptide bezeichnet, die eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflussen können. Dabei dienen sie der Zell-Zell Kommunikation und leiten auf diese Weise Informationen weiter. Wachstumsfaktoren sind insbesondere während verschiedener Entwicklungsprozesse, so etwa im Verlauf der

Embryogenese, aber auch der Wundheilung und den Angiogenese-assoziierten Erkrankungen (Krebs, Rheuma, etc.) aktiv. Sie nehmen dann Einfluss auf Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung (Jakobsson et al 2007, Herbert u. Strainer 2011, Kajdaniuk et al 2011).

1.6.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Das Glykoprotein VEGF gilt als eines der wichtigsten Signalmoleküle für die Proliferation von Endothelzellen, sowie der Vaskulo- und Angiogenese und der Gefäßpermeabilität. Die Familie der VEGF Proteine besteht aus den fünf Mitgliedern: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF. Daneben tritt VEGF-A in sechs Isoformen (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₃₈, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆) auf, die das Resultat alternativen Splicings sind (Ylä-Herttuala et al 2007). Dabei unterscheiden sich die Splicing Produkte des VEGF-A lediglich in der Anzahl der Aminosäuren am C-terminalen Ende. Dies hat allerdings einen großen Einfluss auf deren biologische Eigenschaften, sowie die Interaktion mit Kofaktoren. Beispielsweise bildet die Heparin Sulfat bindende, matrixassoziierte Isoform VEGF-A₁₆₅ Gradienten aus, welche die Ausbildung von Filopodien der Tip-Zellen, die gerichtete Migration von Endothelzellen und die Verknüpfung von Gefäßen fördert (Gerhardt et al 2003). Große Bedeutung kommt VEGF auch in der Gefäßpermeabilität zu, wo es eine 50.000-fach stärkere Wirkung hat als Histamin (Senger et al 1983). Vor allem die Isoformen VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ haben neben ihrer mitogenen Eigenschaft erheblichen Einfluss auf die Gefäßpermeabilität (Plate u. Warnke 1997).

Die biologische Funktion von VEGF wird durch die Bindung an seine spezifischen Rezeptoren (VEGFR), vermittelt. Es gibt 3 Rezeptoren für VEGF, nämlich VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1) und VEGFR3 (Flt4) (Kajdaniuk et al 2011, Banumathi et al 2011). Es handelt sich bei allen um Typ III Rezeptor Tyrosin-Kinasen mit unterschiedlicher Affinität gegenüber den einzelnen Formen von VEGF. Die Rezeptoren sind an der Oberfläche verschiedener Zelltypen lokalisiert, so etwa auf hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen. Während der Bildung von Gefäßen verläuft die Signalvermittlung von VEGF nur über die Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2, wohingegen der VEGFR3 an der Lymphangiogenese beteiligt ist. Durch die Bindung von VEGF und die damit einhergehende Autophosphorylierung des Rezeptors werden intrazellulär verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt.

1.6.2 FGF (Fibroblast Growth Factor)

Bisher sind mehr als 20 verschiedene Isoformen von FGF bei Säugetieren bekannt (Ornitz u Itoh 2001). Dabei ist allen gemein, dass sie eine Heparin und Heparan Bindungsdomäne tragen. Ihnen kommt eine wichtige Rolle für den Verlauf der Proliferation und Differenzierung

von Zellen zu. Für die Bildung von Blutgefäßen sind die Isoformen FGF1 (acidic FGF) FGF2 (basic FGF) von besonderer Bedeutung. Ähnlich wie VEGF wirken sie auf die Proliferationseigenschaften von Zellen, wobei dies bei FGF nicht spezifisch auf Endothelzellen beschränkt ist. Vielmehr wirken sie auf alle Zellen, die sich aus dem embryonalen Mesoderm und Neuroektoderm ableiten, darunter Fibroblasten, Perizyten und Endothelzellen (Thomas 1987).

Die zelluläre Wirkung von FGF wird durch die Bindung an Rezeptoren mit besonders hoher Affinität vermittelt. Die Rezeptoren des FGF, von denen vier bekannt sind, gehören ebenfalls zur Familie der Rezeptor Tyrosin-Kinasen, wobei die Dimerisierung durch Heparin vermittelt wird (Johnson u. Williams 1993, Klein et al 1997).

1.6.3 PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

Die vier bekannten Isoformen von PDGF (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D) sind alle mitogen aktiv und nehmen Einfluss auf Zellen mesenchymalen Ursprungs. So ist PDGF im Verlauf der Embryogenese an der Entwicklung von Blutgefäßen, dem zentralen Nervensystem, der Lunge und der Niere beteiligt. Im Aufbau zeigen sich alle PDGF Isoformen als Homodimere, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Einzig PDGF-A und – B sind zusätzlich in der Lage Heterodimere (PDGF-AB) zu bilden.

Die zelluläre Wirkung von PDGF wird durch zwei Rezeptoren (PDGFR) vermittelt. Es handelt sich dabei um membranständige Rezeptor Tyrosin-Kinasen, wobei zwei Subtypen, PDGF- α und PDGF- β , unterschieden werden. Der α -Rezeptor bindet die Isoformen PDGF-AA, -BB und –AB, während der β -Rezeptor mit höherer Affinität die Isoformen –BB und –AB bindet. Durch die Bindung der Liganden an den jeweiligen Rezeptor erfolgt an diesem eine Dimerisierung was zu einer Autophosphorylierung führt. So aktiviert wird eine Transduktion des Signals nach intrazellulär eingeleitet (Rolny et al 2006).

1.7 Signaltransduktion

Die Fähigkeit von Zellen zur Anpassung an ihre Umwelt ist für diese von besonderer Bedeutung. Dabei ist die Umwandlung und Weiterleitung der wahrgenommenen extrazellulären Signale von entscheidender Wichtigkeit. Man spricht in diesem Zusammenhang von der Signaltransduktion. Die auf die Zelle von außen einwirkenden Stimuli haben ein weites Spektrum und umfassen u.a. Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Zytokine, UV-Strahlen oder zellulären Stress (Zarubin u. Han 2005, Torii et al 2006, Binétruy et al 2007). Intrazellulär können so eine Reihe von Signalwegen aktiviert und eingeleitet

werden, die sowohl eine kurzfristige, als auch eine langfristige zelluläre Antwort ermöglichen. Die Wahrnehmung und Übermittlung des jeweiligen Stimulus erfolgt durch Rezeptoren, welche die Signale von extrazellulär nach intrazellulär weiterleiten. Die Weiterleitung der Signale nach intrazellulär ereignet sich dabei zumeist über eine Konformationsänderung des zytosolischen Teils des Rezeptors. Zu den bekanntesten Rezeptoren dieser Art gehören die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Diese sind in 20 Klassen unterteilt und dienen einer Vielzahl von Molekülen (u.a. Wachstumsfaktoren und Hormonen) als Rezeptor. Dies gilt z.B. für die Wachstumsfaktoren FGF (RTK Klasse IV), PDGF (RTK Klasse II), VEGF (RTK Klasse V) und die Axon Guidance Moleküle der Ephs (RTK Klasse VIII).

Ausgehend von den durch die Rezeptoren aufgenommenen Stimuli, können verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Dies geschieht durch eine koordinierte Interaktion und Regulation der daran beteiligten Proteine. Als die wichtigsten Formen der Regulation gelten die Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Dabei übernehmen Kinasen und Proteasen eine entscheidende Funktion. Zu den wichtigsten von Rezeptor Tyrosinkinasen eingeleiteten Signalwegen gehören der MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase) und der PI3-Kinase (**P**hospho**I**nositid-**3**-Kinase) Signalweg.

Die ubiquitären MAP-Kinasen sind in viele Signaltransduktionen eukaryotischer Zellen involviert. Die Aktivierung von MAP-Kinasen ereignet sich ausgehend vom Rezeptor über eine Phosphorylierungskaskade nacheinander geschalteter Kinasen. Die Familie der MAP-Kinasen setzt sich aus drei Gruppen zusammen: der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK) mit ihren Isoformen, der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der Proteinkinase p38 (Binétry et al 2007).

Die durch unterschiedliche extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, aktivierte ERK ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. So etwa an der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation. Die MAP-Kinasen p38 und JNK werden als stressaktivierte Kinasen bezeichnet, da sie durch verschiedene Stressestimuli aktiviert werden. Zu diesen Stimuli gehören neben UV-Strahlung, inflammatorischen Zytokinen, osmotischem Stress und Einwirkung auf das Zytoskelett, in manchen Fällen auch Wachstumsfaktoren.

Der PI3-Kinase Signalweg spielt in verschiedenen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle. So kommt ihm beispielsweise eine große Bedeutung während der Proliferation, Adhäsion und Migration zu (Cantley 2002). Aber auch für die Bildung von Blutgefäßen während der Entwicklung ist der PI3-Kinase Weg von Wichtigkeit (Malek et al 1999).

1.8 Kalzium

Kalzium ist mengenmäßig der am häufigsten im Körper anzutreffende Mineralstoff. Dabei kann dieser gebunden oder in freier Form vorliegen. Mehr als 90 % des Kalziums liegen in einem Organismus gebunden in Form von Hydroxylapatit in den Knochen und Zähnen vor. In seiner elementaren, ungebundenen Form (Ca^{2+}) nimmt es als Signalmolekül eine besondere Stellung innerhalb der Zellphysiologie ein.

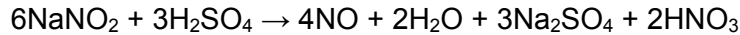
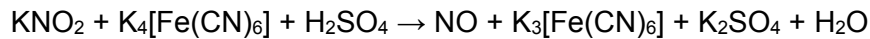
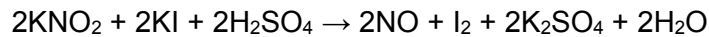
Kalziumionen sind an einer Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt und stellen dort ein zentrales Signalmolekül dar. Sie stehen dabei allerdings nicht immer am Beginn der Signalkette, wirken aber bei wichtigen Prozessen an entscheidender Stelle. Kalzium kann auf zwei unterschiedliche Weisen seine Wirkung auf andere Moleküle vermitteln. Zum einen kann es an spezifischen Bindungsstellen von Signalmolekülen direkt Einfluss nehmen oder aber durch die Bindung an Proteine zu einer Änderung deren Aktivität beitragen.

Durch verschiedene Faktoren die auf und in der Zelle wirken, (Interaktion von Proteinen, Stimulation durch elektrische oder mechanische Reize), ist ein induzierter Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration möglich. Dies kann durch den Einstrom von extrazellulärem Kalzium ins Zytosol, oder durch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (z.B. dem Endoplasmatisches Retikulum (ER)) erfolgen. Die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium ist auf verschiedene Weisen möglich. Einer der am besten beschriebenen Mechanismen ist der Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) abhängige Weg. Der sekundäre Botenstoff IP_3 wird zusammen mit Diacylglycerol als Spaltungsprodukt von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP_2) durch die membranständige Phospholipase C freigesetzt. Zur Freisetzung des Kalziums bindet das IP_3 an seinen, an Kalziumkanäle gekoppelten, in der ER-Membran verankerten Rezeptor (Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor ($\text{IP}_3\text{-R}$)). So gebunden kommt es zur Aktivierung der Kanäle und in Folge dessen zur Freisetzung des gespeicherten Kalziums.

1.9 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein gasförmiges, biologisch aktives Molekül, das in eine Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert ist. Als freies Radikal trägt es ein unpaariges Elektron auf seiner äußersten Schale und besitzt zudem in sauerstoffhaltigen, wässrigen Milieus eine sehr kurze Halbwertszeit von 4-8s.

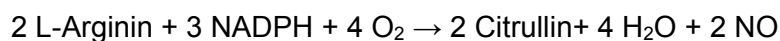
Die Herstellung von reinem NO ist mit verschiedenen chemischen Reaktionen möglich, wird in der industriellen Herstellung jedoch durch das Ostwald-Verfahren gewonnen.



Auf zellulärer Ebene erfolgt die Bildung von NO durch eine Familie von NO-Synthasen (NOS). Dabei sind drei verschiedene Isoformen zu unterscheiden. Diese Isoformen besitzen unterschiedliche Charakteristika, welche ihre jeweilige Funktion *in vivo* widerspiegeln. Zwei dieser Isoformen sind konstitutiv aktiv. Dabei handelt es sich zum einen um die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS III) und zum anderen um die neuronale NO-Synthase (nNOS oder NOS I). Dagegen wird die dritte Isoform nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert und daher als induzierte NO-Synthase (iNOS oder NOS II) bezeichnet.

Die NOS sind Proteine mit zwei Domänen. Die am C-terminalen Ende lokalisierte Reduktase-Domäne weist Bindungstellen für die Kofaktoren NADPH, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) auf; die am N-terminalen Ende lokalisierte Oxygenase-Domäne eine Hämgruppe und zudem Bindungstellen für Sauerstoff und Tetrahydrobiopterin (BH_4). Die Domänen werden von einem zentralen Calmodulin Bindungsmotiv getrennt.

Katalytische Aktivität erreicht das Enzym durch die Aneinanderlagerung zweier NOS Monomere. Diese bilden ein Homodimer, in dem die Oxygenase-Domäne des einen Monomers mit der Reduktase-Domäne des anderen eine funktionelle Einheit bildet. In dieser Form katalysiert die NOS die Reduktion der Aminosäure L-Arginin in der Gegenwart von Sauerstoff, wodurch die Produkte L-Citrullin und NO entstehen.



Die Katalyse verläuft in zwei Schritten. Während der ersten Teilreaktion wird ein Elektron von NADPH an der Reduktase-Domäne des Enzyms abgespalten und mit Hilfe der Kofaktoren (und Calmodulin) an die Oxygenase-Domäne weitergeleitet. Sauerstoff im katalytischen Zentrum des Enzyms wird darauf reduziert und reagiert mit der Guanidin-Gruppe in L-Arginin. Dabei entsteht das Zwischenprodukt *N^ω-hydroxy-L-Arginin* (NOHLA), das im zweiten Teilschritt der Reaktion in L-Citrullin umgewandelt wird. Hierbei wird ein Stickstoffatom der Guanidin-Gruppe abgespalten und in Form von NO freigesetzt.

1.10 Reaktive Sauerstoffe Spezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (reaktive oxygen species) spielen als Signalmoleküle für die

Kommunikation und die Funktion von vaskulären Zellen eine wichtige Rolle. Die auch als Sauerstoffradikale bezeichneten ROS kann man in freie Radikale wie Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$) und Hydroxyl Radikale ($OH^{\bullet}$), molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Ozon (O_3), sowie angeregte Singulett-Sauerstoffe (1O_2) einteilen. Der Definition nach handelt es sich bei einem Radikal um ein selbstständig existierendes Atom oder Molekül, das ein unpaares Valenzelektron trägt. Dieser Definition nach kann Sauerstoff im Grunde selbst als ein Radikal bezeichnet werden, da es zwei unpaare Elektronen auf seinem antibindenden π -Orbital trägt. Da aber die unpaaren Elektronen den gleichen Spin haben, ist Sauerstoff relativ stabil und hat somit den Charakter eines Diradikals. Durch eine Ein-Elektronenübertragung kommt es zu einer Reduzierung des Sauerstoffs und somit zur Bildung von Hydroxyl-Anionen, die verglichen mit dem Ausgangsatom deutlich instabiler und reaktionsfreudiger sind. Basierend auf ihrer Reaktionsfreudigkeit besitzen Hydroxy-Anionen einen stark zellschädigenden Charakter. Allerdings sind sie in wässrigem Milieu äußerst instabil, was auf einer schnellen Dismutation der Hydroxyl-Anionen zu Wasserstoffperoxid beruht. Diese Reaktion wird durch eine höhere Konzentration der protonierten $O_2^{\bullet-}$ Form ($HO_2^{\bullet}$) ermöglicht.

2 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der mechanischen Zugbelastung auf die Gefäßbildung im EB-Modell näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte vor allem auf die Bedeutung der intrazellulären Kalziumsignale für die Vaskularisierung näher eingegangen werden.

Während der Bildung von Gefäßen spielen verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle. Daher sollte die Verknüpfung zwischen der Zugbelastung und dem intrazellulären Kalzium mit weiteren dieser Faktoren untersucht werden. Dabei wurden neben den Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF und FGF auch die für die Ausbildung und das Richtungswachstum wichtigen Axon-Guidance Proteine Neuropilin, Plexin, Semaphorin, Ephrin, Eph, Robo und Slit analysiert.

Zudem sollte auch die Beteiligung von ROS und NO an der durch die Zugbelastung induzierten Vaskularisierung untersucht werden und in wie weit hier eine Interaktion mit Kalziumsignalen auftritt.

Im Einzelnen wurden die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

1. Bedeutung der durch mechanische Zugbelastung induzierten Kalziumsignale für die Vaskularisierung von EBs.
2. Einfluss der mechanischen Zugbelastung und der Kalziumsignale für die Expression von Axon-Guidance Proteinen.
3. Bedeutung von ROS und NO für die durch mechanische Zugbelastung induzierte Vaskulogenese
4. Untersuchung der Interaktion von Kalziumsignalen mit ROS und NO
5. Nachweis der Beteiligung von Signaltransduktionswegen der PI3-Kinase und der MAP Kinasen (JNK ERK).

3 MATERIAL

3.1 Firmen

Abcam Limited	Cambridge CB4 OTP, Cambridgeshire, UK
Alexis	35305 Grünberg, Deutschland
AppliChem GmbH	64291 Darmstadt, Deutschland
BD Biosciences GmbH	69126 Heidelberg, Deutschland
BD Biosciences-Pharmingen	69126 Heidelberg, Deutschland
BIOCAT GmbH	69120 Heidelberg, Deutschland
Biochrom	12247 Berlin, Deutschland
BioVision	95035 Milpitas, California, USA
BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH	85386 Eching, Deutschland
Calbiochem-Novabiochem GmbH	31833 Oldendorf, Deutschland
Cell Signaling	159 J Cummings Center Beverly, MA 01915 USA
Chemicon International	Hampshire SO53 4NF, UK
Dianova	20345 Hamburg, Deutschland
Dunn Labortechnik	53567 Asbach, Deutschland
Eppendorf	22339 Hamburg, Deutschland
Gilson International B.V.	65520 Bad Camberg, Deutschland
Greiner Bio-One GmbH	72636 Eberstadt, Deutschland
Hanna Instruments	77694 Kehl am Rhein, Deutschland
Heidolph Elektro GmbH	93309 Kehlheim, Deutschland
Heraeus Instruments	63452 Hanau, Deutschland
Hirschmann® Laborgeräte	74246 Eberstadt Deutschland
IKA® Werke GmbH & Co.KG	79216 Staufen, Deutschland
Integra Biosciences	35463 Fernwald, Deutschland
Kendro Laboratory Products	63505 Langenselbold, Deutschland
Leica	64625 Bensheim, Deutschland
Merck	64293 Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	65824 Schwalbach / Ts., Deutschland
Mettler-Toledo	35393 Gießen, Deutschland
Molecular Probes	Eugene, Oregon, USA
Oelikon	50968 Köln, Deutschland
PAA	35091 Cölbe, Deutschland

PerkinElmer Inc.	02451 Waltham, Massachusetts, USA
Roche Diagnostics GmbH	68305 Mannheim, Deutschland
Roth	76231 Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Santa Cruz California, USA
Sarstedt Inc.	P.O. Box 468, Newton, NC 28658
Sigma-Aldrich	82024 Taufkirchen, Deutschland
Vasopharm	97076 Würzburg, Deutschland
VWR International GmbH	64295 Darmstadt, Deutschland
Zeiss	7745. Jena, Deutschland

3.2 Materialien

bakteriologische Schalen	Greiner
BioFlex Culture Plates	Dunn Labortechnik
Cellspin Rührsystem	Integra
Deckgläschen	Roth
Feinwaage	Mettler Toledo
Filtrationsgewebe (Ø 70µm)	BD
Flexcell System®	Dunn Labortechnik
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen
Gewebekulturschalen	BD
Homogenisator	Sigma
iBlot® Gel Transfer Stacks PVDF, Mini	Invitrogen
iBlot® System	Invitrogen
Inkubatoren HERAccl®240	Kendro
Konfokales Lasermikroskop LeicaSP2A013S	Leica
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	IKA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen
Objektträger	Roth
pH-Meter	HANNA Instruments
Pipetten	Pipetus®-standard von Hirschmann®, Glaspipetten von Roth, Plastikpipetten BD
Röhrchen 15 und 50 ml	Greiner
Schüttler	VWR
Spinnerflaschen	CELLspin 240, Integra
Stage Flexer (SF-3000)	Dunn Labortechnik
Stage Flexer Membranen	Dunn Labortechnik

Sterilbank	Heraeus
Vakuumpumpe	Oelikon
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	Hirschmann
Zentrifuge	5417C Eppendorf Laborfuge 300 Heraeus Biofuge 15R Heraeus

3.3 Chemikalien und Substanzen

BAPTA-AM	Calbiochem
Bovines Serumalbumin	Sigma
Collagen Typ I	BD
DAF-FM DA	Invitrogen
DCFH-DA	Invitrogen
DMEM	Calbiochem
DMSO	Calbiochem
Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	PAA
ESGRO [®] (LIF)	Millipore
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma
Fluo-4-AM	Molecular Probes
Fluoromount-G [™]	Biozol
IMDM	Biochrom
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
Kollagenase B	Roche
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA
L-NAME	Alexis
LY-294002	Merck
Magermilchpulver	AppliChem
MEM (50x)	Biochrom
Mitomycin C	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom
NEA (100x)	Biochrom
Nonidet P-40	AppliChem
Novex [®] Sharp Pre-Stained Proteinstandard	Invitrogen

NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
Penicillin / Streptomycin	PAA
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma
Ponceau S	AppliChem
Probenpuffer 4x	Invitrogen
Protease Inhibitor Cocktail	Biovision
Sigmacote	Sigma
SU5614	Calbiochem
Tris	Roth
Tris-HCl Solution	BioVision
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Tween-20	Sigma
VAS2870	Vasopharm
Western Lightning	PerkinElmer

3.4 Antikörper

3.4.1 primäre Antikörper

Monoklonal Ratte anti-Maus-CD31 (clone 390)	Chemicon (CBL1337)
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus Ephrin B2	Santa Cruz (sc-1010)
Polyklonal Ziege-anti-Maus Eph B4	Santa Cruz (sc-365510)
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus Neuropilin 1	Abcam (ab60606)
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus Plexin B1 (H-300)	Santa Cruz (sc-25642)
Monoklonal Maus-anti-Robo1	Abcam (ab58297)
Polyklonal Ziege-anti-Maus Robo4 (D-19)	Santa Cruz (sc-46498)
Polyklonal Ziege-anti-Maus Sema 4D	Santa Cruz (sc-16632)
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus Slit2	Abcam (ab7665)
Monoklonal Maus-anti-FGF2 (clone bFM-2)	Millipore (05-118)
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus PDGF-BB	Biovision (5488-200)
Polyklonal Kaninchen-anti-VEGF ₁₆₅	Millipore (07-1420)
Monoklonal Kaninchen-anti-Maus Flk1	Cell Signaling (2479S)
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus GAPDH	Abcam (ab22555)
Monoklonal Maus-anti-Vinculin (clone hVIN-1)	Sigma (V9131)
Monoklonal Kaninchen-anti-Maus Phospho-eNOS (Ser1177)	Cell Signaling (9570S)
Polyklonal Kaninchen-anti-Maus Phospho-ERK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling (4377S)

Polyklonal Kaninchen-anti-Maus Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)

Cell Signaling (9251S)

Polyklonal Kaninchen-anti-Maus Phospho-PI3K (Thr458/Tyr199)

Cell Signaling (4428S)

3.4.2 sekundäre Antikörper

Cy 5-konjugiert Ziege-anti-Ratte IgG

Chemicon (AP124S)

Cy 2 konjugiert Ziege-anti-Maus IgG

Dianova (111-175-144)

Meerrettichperoxidase-konjugierter Pferd anti-Maus IgG

Cell Signaling (7076S)

Meerrettichperoxidase-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG

Cell Signaling (7074S)

Meerrettichperoxidase-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG

Cell Signaling (7077S)

Meerrettichperoxidase-konjugierter Kaninchen anti-Ziege IgG

Millipore (AP106P)

3.5 Zellen

CCE S103 Mausembryonale Stammzellen, isoliert aus Embryonen des Mäusestammes 129/sv (Robertson et al. 1986)

MEF Zellen Mausembryonale Fibroblasten, gewonnen aus 13 Tage alten Embryonen des Mäusestammes C57BL/6

3.6 Medien

MEF-Medium

Dulbecco's Medium (DMEM)

FKS (hitzeinaktiviert)	10	%
L-Glutamin	2	mM
NEA	0,1	mM
Penicillin /Streptomycin	1	%

Differenzierungsmedium

Basales ISCOVE Medium

FKS	10	%
FKS (hitzeinaktiviert)	9,5	%
β-Mercaptoethanol	0,1	mM
L-Glutamin	2	mM
Natriumpyruvat	1	mM
NEA	0,1	mM

Penicillin / Streptomycin	1	%
---------------------------	---	---

Einfriermedium

FKS	50%
jeweiliges Nährmedium	40%
DMSO	10%

3.7 Puffer**10x PBS**

NaCl	1,4	M
Na ₂ KPO ₄ x 2H ₂ O	64,6	mM
KCl	26,8	mM
KH ₂ PO ₄	14,7	mM

→ in 1 L H₂O (bidest) lösen

1x PBS

100 ml 10x PBS mit 900 ml H₂O (bidest) 1:10 Verdünnung

→ pH Wert auf 7,4 eingestellt.

PBS-T (0,1 %) bzw. PBS-T (0,01 %)

1 L 1x PBS mit 1 ml bzw. 100 µl des Detergenz Triton X-100 versetzen

10x TBS

Tris	60,5	g
NaCl	37,6	g

→ in 1 L H₂O (bidest) lösen und pH Wert mit HCl auf 7,54 einstellen

0,1 % TBS-T

10x TBS	100	ml
---------	-----	----

→ mit 900 ml H₂O (bidest) auffüllen und 1 ml Tween 20 zugeben

RIPA-Lysis Puffer

NaCl	150	mM
Natriumdesoxycholat	0,5	%
Nonidet P-40	1	%

SDS	0,5	%
Tris	50	mM

→ in H₂O (bidest) gelöst und pH Wert mit HCl auf 7,4 einstellen

Stripping Puffer

SDS	2	%
β-Mercaptoethanol	100	mM
Tris (50 mM)	5 ml (Tris-HCL Solution 1 M) / 605,7	mg

→ mit H₂O (bidest) auf 100 ml unter stetem Rühren auffüllen; rühren bis das gesamte SDS gelöst ist

3.8 Inhibitoren

3.8.1 LY294002 (MERCK 440202)

(2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)

Das Morpholin Derivat von Quercetin, LY294002 wirkt *in vivo* als ein hoch selektiver und reversibler Inhibitor der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase, PI3K). Dabei funktioniert es als ein kompetitiver Inhibitor an der ATP-Bindungsstelle des Enzyms. Lösungsmittel: DMSO

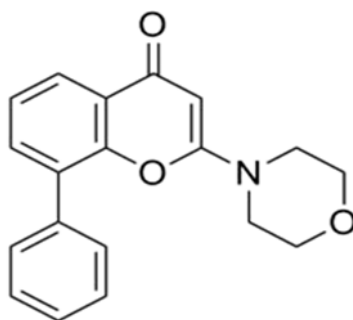


Abbildung 3.1: Strukturformel des PI3-Kinase Inhibitors LY294002.

3.8.2 SU5614 (MERCK 573632)

(5-Chloro-3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylene]-2-indolinone)

SU5614 ist ein Inhibitor der Rezeptoren für VEGF und PDGF, wobei die Inhibierung *in vitro* die VEGF vermittelte Sprossung von Endothelzellen blockiert.

Lösungsmittel: DMSO

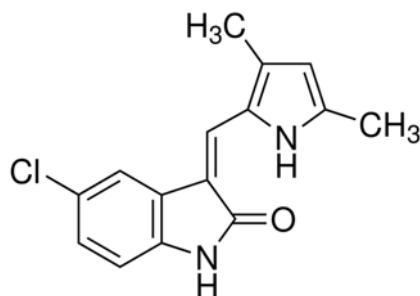


Abbildung 3.2: Strukturformel des Inhibitors SU5614.

3.8.3 L-NAME (Alexis ALX-105-003-G025)

(*N^G*-Nitro-L-arginine-methylester.HCl)

Das Analogon der nicht essentiellen Aminosäure L-Arginin, L-NAME ist ein reversibler und kompetitiver Inhibitor der NO-Synthasen. Er erhält seine inhibitorische Wirkung nach der Hydrolyse zu L-NG-nitro-argin (L-NNA) durch zelluläre Esterasen. Lösungsmittel: H₂O

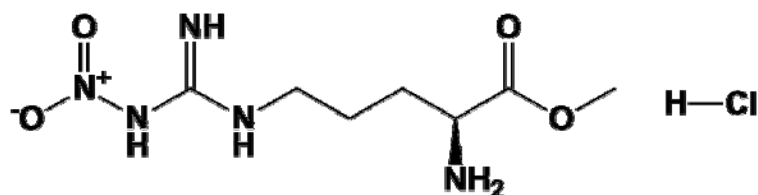


Abbildung 3.3: Strukturformel des NOS-Inhibitors L-NAME.

3.8.4 VAS2870 (Vasopharm)

(3-benzyl-7-(benzoxazolyl)thio-1,2,3-triazolo[4,5]pyrimidin)

VAS2870 ist eine zellpermeable Thiotriazolopyrimidin Verbindung, die als Inhibitor der NADPH-Oxidase (NOX-Inhibitor) fungiert. In glatten Muskelzellen wird die PDGF vermittelte Aktivierung der NADPH-Oxidase und die ROS Produktion völlig aufgehoben (ten Freyhaus et al 2006). Die Verbindung wird zur Therapie von peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten getestet. Lösungsmittel: DMSO

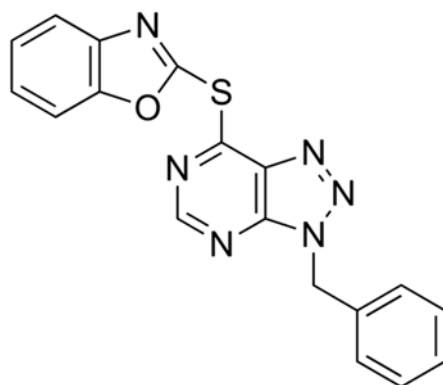


Abbildung 3.4: Strukturformel des NADPH-Oxidase Inhibitors VAS2870.

3.9 Substanzen

3.9.1 BAPTA-AM (Calbiochem 196419)

(1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure)

BAPTA ist ein nicht fluoreszierender, spezifischer Kalzium Chelator und besitzt eine 105-fach höhere Affinität gegenüber Ca^{2+} als gegenüber Mg^{2+} . Seine Eigenschaften als Chelator beruhen auf den vier funktionellen Carboxylsäuregruppen, die je zwei Kalziumionen binden können. BAPTA-AM ist das zellpermeable Derivat von BAPTA, wobei die Zelldurchlässigkeit durch die Kopplung des lipophilen Moleküls **Acetoxymethyl** (AM) erreicht wird. Nach der Aufnahme in die Zellen werden dort die lipophilen Gruppen durch zytosolische Esterasen hydrolysiert und so die funktionellen Carboxylsäuregruppe freigelegt. In dieser hydrolysierten Form kann BAPTA die Zellen nicht mehr verlassen.

Lösungsmittel: DMSO

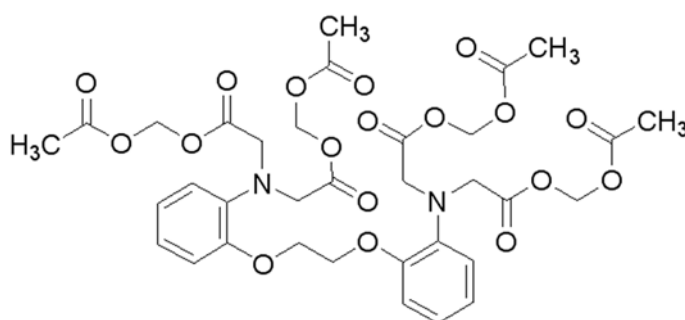


Abbildung 3.5: Strukturformel des Kalzium Chelator BAPTA-AM.

3.9.2 DAF-FM DA (Invitrogen C10444)

(4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein-Diacetat)

Der Fluoreszenzmarker DAF-FM DA wurde zum qualitativen Nachweis von intrazellulärem NO verwendet. Es handelt sich bei DAF-FM DA um einen zellpermeablen, nicht fluoreszierenden Indikator, dessen Aufnahme in die Zelle passiv über die Zellmembran erfolgt. Intrazellulär erfolgt eine Deacetylierung durch zytosolische Esterasen. In Folge der Reaktion mit NO• kommt es zur Bildung des fluoreszierenden Benzotriazolderivats. Das Anregungsmaximum dieses Produkts liegt bei 495nm und die Emission bei 515nm.

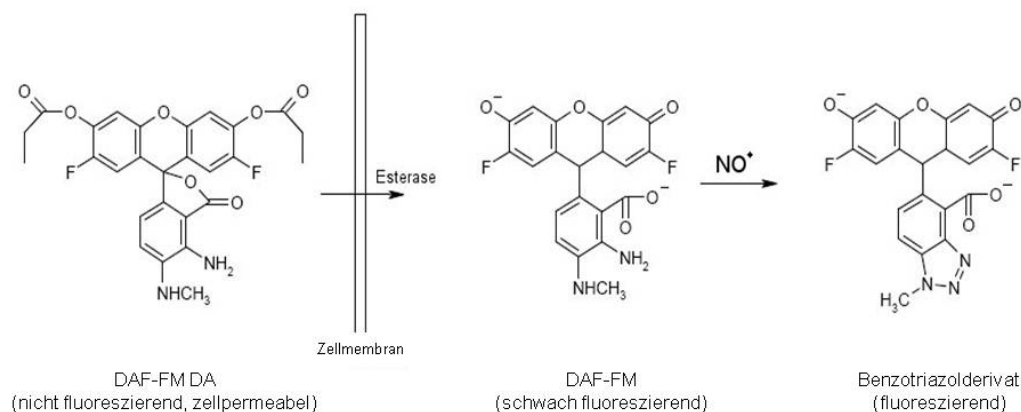


Abbildung 3.6: Strukturformeln und Reaktionsweg des NO-Indikators DAF-FM-DA.

3.9.3 Fluo4-AM (Molecular Probes F-14201)

(1-[2-Amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl) phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, pentaacetoxymethyl ester)

Der Nachweis von intrazellulärem Kalzium erfolgte durch den Indikator Fluo4-AM. Es handelt sich dabei um das zellpermeable, nicht fluoreszierende und Kalzium unempfindliche Derivat von Fluo4, dessen passive Zellgängigkeit durch eine Estergruppe ermöglicht wird. Die intrazelluläre Hydrolyse dieser Gruppe erlaubt die Bindung von Kalzium an das Fluo4. Eine Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, die Emission erfolgte bei 515 nm. Die Fluoreszenzintensität steigt dabei mit der Bindung des Kalziums an. Lösungsmittel: DMSO

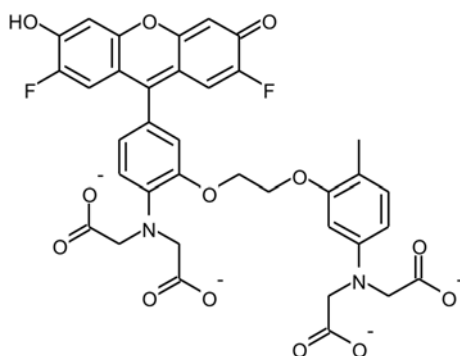


Abbildung 3.7: Strukturformel von Fluo4-AM.

3.9.4 DCFH-DA (Invitrogen D-399) (2',7'-Dichlorofluoreszein-Diazetat)

Der Nachweis von ROS erfolgte durch DCFH-DA, das in mehreren Schritten zum Fluochrom DCF umgewandelt wird. DCFH-DA ist eine nicht fluoreszierende, zellpermeable Substanz. Nach der Aufnahme in die Zelle kommt es durch eine Deacetylierung zur Bildung von 2,7-dichlorfluorescein (DCFH). So in der Zelle eingeschlossen erfolgt durch Interaktion mit ROS eine Oxidation des DCFH zum Fluochrom DCF. Eine Anregung des Fluochroms erfolgte bei 488nm, die Emission bei 525nm. Da die Fluoreszenz proportional zur ROS Menge innerhalb der Zelle ist, ist so eine quantitative Bestimmung der intrazellulären ROS möglich.

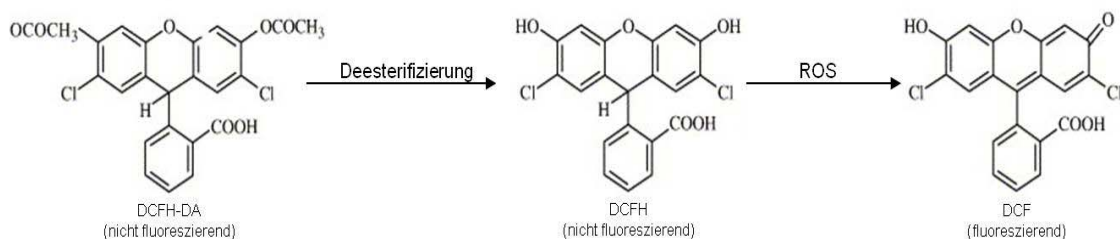


Abbildung 3.8: Strukturformeln und Reaktionsweg des ROS-Indikators DCFH-DA

4. METHODEN

4.1 Embryonale Stammzellkultur

Die MEF-Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in MEF-Medium überführt und abzentrifugiert (200 g / 5 min). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml MEF-Medium resuspendiert und aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden 200 µl auf eine Ø 60 mm Gewebskulturschale mit 5 ml MEF-Medium gegeben. Die Kultivierung im Brutschank bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte bis sich ein durchgehender Zellrasen ausgebildet hatte. Ein weiteres Wachstum der Zellen wurde durch eine Inaktivierung der Zellteilung mit dem Zytostatikum Mitomycin C verhindert. Dazu wurden die Zellen für einen Zeitraum von 3h. mit Mitomycin C versetztem MEF-Medium (10 µg/ml) bei 37°C und 5 % CO₂ im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Mitomycin C / MEF-Medium entfernt und die Zellen 3x mit MEF-Medium gewaschen. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag und die Zellen wurden maximal eine Woche aufbewahrt.

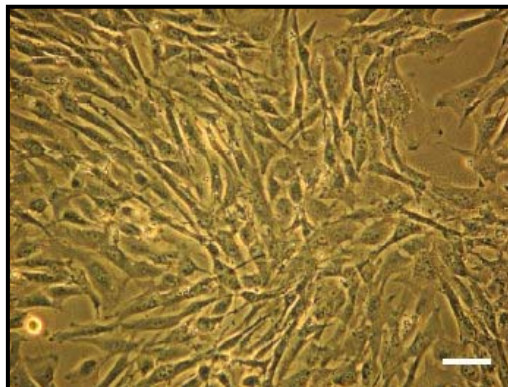


Abbildung 4.1: Konfluente embryonale Fibroblasten der Maus (Feeder-Zellen). Embryonale Fibroblasten isoliert aus 14 Tage alten Embryonen (Balken entspricht 100 µM)

4.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen in Spinnerflaschen

Das Passagieren der Stammzellen wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Passagierens wurde darauf geachtet, dass die ES-Zellkolonien zu etwa 70 % konfluent waren. Die Stammzellkolonien wurden dann mit 2 ml Trypsin/EDTA kurz gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einer Pipette vorsichtig vereinzelt und in einem Verhältnis von 1:30 auf eine neue Schale mit Feeder Zellen umgesetzt. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion in der Einzelzellsuspension mit 6 ml ES Zellkulturmedium abgestoppt. Von den in der Schale verbliebenen Zellen wurden ca. 3×10^6 Zellen in eine silikonisierte Spinnerflasche mit 125 ml

Differenzierungsmedium überführt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium auf 250 ml aufgefüllt. Für den Zeitraum, in dem die Zellen in den Spinnerflaschen verblieben, wurden jeden Tag 125 ml des Differenzierungsmediums abgenommen und durch 125 ml frisches Medium ersetzt.



Abbildung 4.2: CELLSPIN System zur Bildung von sphäroidalen Zellaggregaten (li.) und Embryoid Bodies (EBs) an Tag 4 (re.) Balken entspricht 200 µm.

Das CELLSPIN System verfügt über einen Rührmechanismus, der die in der Spinnerflasche aufgehängenen Pendel antreibt. Dabei rotieren die Pendel mit 20 Umdrehungen/min und vollziehen regelmäßige Richtungswechsel. Zusätzlich zur Rotation wird durch die Silikonisierung der Flasche eine Adhäsion der Zellen verhindert. Der stete Rührvorgang hat zur Folge, dass sich in den Flaschen eine homogene Verteilung von Nährstoffen und Temperatur einstellt. Zudem wird auf diesem Wege eine gleichmäßige CO₂-Sättigung erreicht. Die vereinzelt ES-Zellen lagern sich zu Zellverbänden zusammen, so dass sich in den Flaschen auf Grund der Rotation und der nicht gegebenen Möglichkeit zur Adhäsion, dreidimensionale Zellaggregate bilden, die als Embryonalkörperchen oder Embryoid Bodies (EBs) bezeichnet werden (Keller et al 1995, Wartenberg et al, 1998).

4.3 Differenzierung embryonaler Stammzellen

Die in die Spinnerflaschen überführten ES-Zellen wurden mit einem Nährmedium versorgt, das eine spontane Differenzierung der Stammzellen ermöglicht. Diesem Differenzierungsmedium ist kein LIF zugegeben worden, so dass sich mit der Zeit in den entstehenden EBs verschieden Zelltypen aller drei Keimblätter bilden können. Die EBs wurden bis Tag 3 der Differenzierung in den Spinnerflaschen kultiviert, anschließend aus der Flasche entnommen und zur weiteren Analyse verwendet.

4.4 Mechanische Zugbelastung im Flexercell System

Die am dritten Differenzierungstag aus den Spinnerflaschen entnommenen EBs wurden auf 6-well Kulturschalen mit einem elastischen, Kollagen beschichteten Silikonboden überführt. 24 h nach der Überführung auf die Multiwellkulturschale (Bioflexplatte) kommt es zur vollständigen Adhäsion der EBs an der elastischen Membran. Der elastische Boden der Bioflexplatte wird im Flexercell System[®] über eine festsitzende Erhöhung gezogen, um so die Zugbelastung zu erzeugen. Dies geschieht durch computergesteuerte Ventile die mit Vakuum und Druckluft arbeiten. Mit dem Computerprogramm FX-3000 des Flexercell System[®] besteht die Möglichkeit, die Zugbelastung, welche auf die elastischen Membranen ausgeübt wird, genau zu definieren. Dabei wurde eine statische Zugbelastung von 10 % Elongation in der zentralen Region der Membran ausgeübt, was einem radialen Zug von 14 % und einem zirkumferenziellen Zug von 5 % in der Peripherie entspricht.

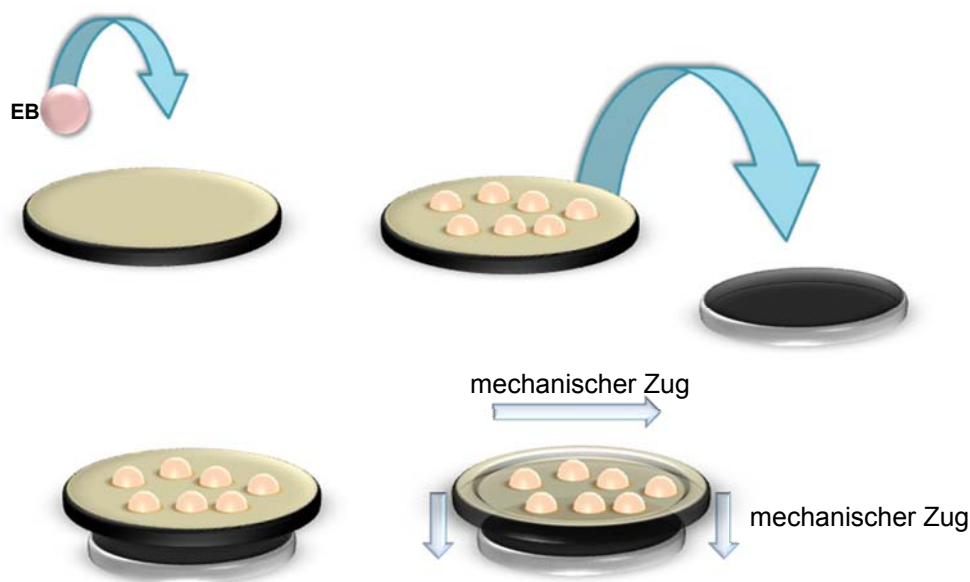


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Applikation von mechanischer Zugbelastung auf EBs an Tag 4.

4.5 Immunhistochemie

Grundlage der Immunhistochemie ist die Affinität eines Antikörpers zu einem bestimmten Epitop. Die Epitope dienen dabei als Marker für zum Beispiel Endothelzellen, die durch eine indirekte Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Bei diesem indirekten Nachweisverfahren wird ein Epitop-gekoppelter primärer Antikörper von einem sekundären Antikörper erkannt und gebunden. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluochrom konjugiert, das durch das Licht

einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Das Energieniveau des Moleküls wird durch die Anregung auf einen höheren Zustand angehoben. Durch die Rückkehr auf das ursprüngliche Energieniveau wird Energie freigesetzt; dies geschieht in Form von Wärme oder aber längerwelligem Licht. Die Fluoreszenz wird über ein Fluoreszenzmikroskop detektiert und ermöglicht so eine Visualisierung der Antikörperfärbung.

Die für eine solche Färbung verwendeten Immunglobuline (IgG) können in zwei Gruppen unterteilt werden: monoklonale und polyklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper richten sich nur gegen ein Epitop des Antigens und sind somit äußerst spezifisch, während sich polyklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope eines Antigens richten.

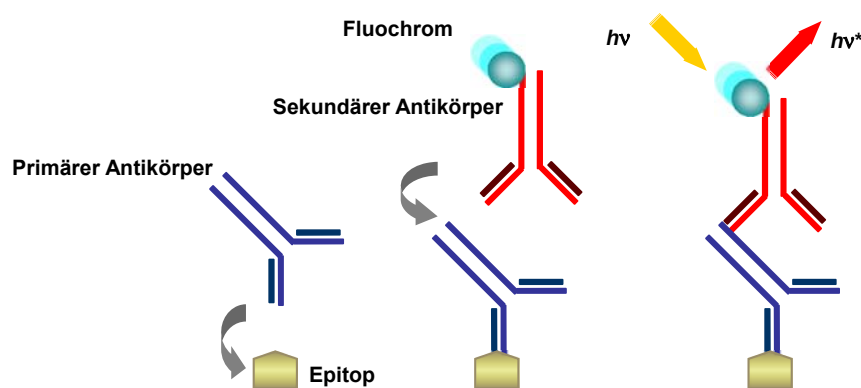


Abbildung 4.4: Graphische Darstellung zum Prinzip der indirekten immunhistochemischen Färbung.

(Modifiziert nach: <http://images-mediawiki-sites.thefullwiki.org/10/2/9/4/2794486828342055.png>)

4.6 CD31 (PECAM-1)

Für den Nachweis des Endothelmarkers CD31 wurden EBs an Tag 8 der Differenzierung fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, die elastischen Membranböden der Bioflex Kulturplatten mit den adhären verbundenen EBs ausgeschnitten und mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte über Nacht bei -20°C mit Methanol. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Proben 3x mit PBS-T 0,01 % gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer Blocklösung (10 % FKS in PBS-T 0,01 %) 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach einem weiteren dreifachen Waschschrift mit PBS-T 0,01 % folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (im Verhältnis 1:100 gelöst in 10 % FKS in PBS-T 0,01 %), über Nacht bei 4°C . Hiernach wurden die Proben erneut dreimal mit PBS-T 0,01 % gewaschen, mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (im Verhältnis 1:100 gelöst in 10 % FKS in PBS-T 0,01 %), für 1,5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Die gefärbten Proben wurden auf Objektträgern mit Fluoromount-G™ eingedeckelt. Zur Quantifizierung der

Vaskularisierung, wurden die vaskulären Strukturen nach der Immunfärbung im konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht. Dabei wurden in z-Richtung 8 Bilder in räumlichem Abstand von 10 µm aufgenommen und im Anschluss daran zu einer dreidimensionalen Projektion fusioniert. Anhand dieses Bildes wurde eine computergestützte Auszählung der Verzweigungspunkte der vaskulären Strukturen durchgeführt.

4.7 Western Blot

Als Western Blot wird das Verfahren zum Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran und deren anschließende Detektierung mittels Antikörperfärbung bezeichnet. Bevor der eigentliche Western Blot durchgeführt werden kann, muss ein Proteingemisch, das durch eine Zellyse gewonnen wurde, elektrophoretisch in einem Gel aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine ihrer Größe nach in Proteinbanden aufgetrennt. Beim Vorgang des Blottings selbst wird eine senkrecht zum Gel gerichtete Spannung angelegt, so dass ein Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine hydrophobe Membran erfolgt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran geschieht dabei ohne Verlust des Verlaufsmusters. Die in dieser Arbeit verwendeten Membranen bestanden aus Polyvinylidenfluorid (PVDF). Im Anschluss an den Proteintransfer können die Membranen mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau rot gefärbt werden, um so das erfolgreiche Blotting zu überprüfen. Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgt anschließend durch eine indirekte Antikörperfärbung.

4.7.1 Proteinextraktion

Für die Extraktion der Proteine wurde das Medium der Zellen entfernt und diese zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 100-200 µl RIPA-Lysis Puffer zugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von den Membranen der Bioflex Kulturschalen abgelöst. Das Zellgemisch wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und dort unter Zuhilfenahme eines Homogenisators grob lysiert. Das Zelllysate wurde dann für 20 min auf Eis inkubiert und darauf folgend mit einer, auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge, abzentrifugiert (12000 g, 10 min). Der Überstand wurde bei -80°C gelagert, eine Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Lowry-Methode (Lowry et al. 1951).

4.7.2 Gelelektrophorese und Blotting

Zur Aufbereitung der Proben für einen Gellauf wurden 50 µg Protein verwendet. Die Proteinproben wurden zusammen mit dem Probenpuffer und dem Reduktionsmittel vorbereitet. Danach wurden die Proben für 10 min bei 70°C erhitzt und im Anschluss daran auf ein NuPAGE[®] 4-12 % Bis-Tris Gradientengel aufgetragen und in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt.

4.7.3 Ponceau Färbung

Zur Kontrolle des Proteintransfers aus dem Gel auf die PVDF-Membranen, wurden diese reversibel mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Membranen direkt nach dem Blotting für etwa 2 min in der Lösung geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Membranen mit 0,1 % TBS-T entfärbt. Die Banden des Proteinstandards wurden markiert, und die Membranen zur Detektierung der Proteine geschnitten. Hiernach erfolgte eine vollständige Entfärbung durch mehrmaliges Waschen mit 0,1 % TBS-T.

4.7.4 Nachweis spezifischer Proteine

Der Nachweis von Proteinen erfolgte über eine indirekte Antikörperfärbung. Zur Visualisierung wird hierbei ein enzymgekoppelter, sekundärer Antikörper verwendet. In diesem Zwei-Schritt Verfahren bindet ein spezifischer primärer Antikörper an das entsprechende Protein. Anschließend wird die Membran mit einem enzymgekoppelten sekundären Antikörper behandelt. Zur Visualisierung des Proteins wird eine Lösung zugegeben, die das dem Enzym entsprechende Substrat enthält. So kommt es zu einer Enzym-Substrat-Reaktion, die eine optische Detektierung ermöglicht. Zumeist werden die alkalische Phosphatase (AP) oder die Meerrettichperoxidase (MPO, oder HRP vom engl. *horseradish peroxidase*) als gekoppelte Enzyme der sekundären Antikörper verwendet.

Zunächst mussten unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Dazu wurden diese mit einer Blocklösung, bestehend aus 5 % Magermilchpulver gelöst in 0,1 % TBS-T, für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden anschließend 3x je 10 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen und dann mit einem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper entfernt, die Membranen erneut 3x je 10 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach folgte ein weiterer 3 facher Waschschrift für je 10 min mit 0,1 % TBST-T. In dieser Arbeit wurde das ECL (**E**nhanced **C**hemi**L**uminescence) System zur Visualisierung der Proteinbanden verwendet. Dabei katalysiert die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Die in dieser Katalyse freigesetzte Lumineszenz wird vom Detektionssystem erfasst und bildgebend dargestellt. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte densitometrisch unter Verwendung des Programms Image J

4.7.5 Stripping

Membranen, die zum Nachweis von Proteinen mit einer Antikörperfärbung behandelt wurden, können zum Nachweis eines anderen Proteins aufbereitet werden. Um dies zu ermöglichen, müssen die gebundenen Antikörper der vorherigen Färbung von der Membran gelöst werden.

Dieses Verfahren wird als „Stripping“ bezeichnet. Dazu werden die Membranen mit ca. 20 ml Stripping-Puffer bei 50°C im Wasserbad in Röhrchen inkubiert. Im Abstand von 5 min wurden die Membranen vorsichtig geschwenkt. Dieser Vorgang wurde 6-mal wiederholt und die Membranen anschließend mit 0,1 % TBS-T äquillibriert. Für eine erneute Antikörperfärbung musste mit dem Blocken der Membran begonnen werden. Das Strippen hat zur Folge, dass es stets zu einem gewissen Verlust von Proteinen kommt. Dies gilt besonders für phosphorylierte Proteine, so dass die Anzahl der Verfahren begrenzt ist.

4.8 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

In der konventionellen Lichtmikroskopie wird das in der Fokusebene befindliche Bild durch Streulicht aus nicht fokussierten Ebenen überlagert, was zu einer nicht optimalen Auflösung führt. Dagegen wird bei der Konfokalmikroskopie nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern jeweils nur ein bestimmter Teil zu einem bestimmten Zeitpunkt. Dabei wird das Licht eines Lasers direkt auf die Fokusebene projiziert. Ein dem Laser nachgeschalteter dichroitischer Teilerspiegel lenkt diesen durch das Objektiv direkt auf das Präparat. Die Wellenlänge des Lasers regt so nur den fokussierten Probenanteil maximal an, den außerhalb der Fokusebene befindlichen Teil jedoch nur schwach. Das emittierte Licht wird dann über den dichroitischen Spiegel auf eine konfokale Lochblende (engl. *Pinhole*) abgebildet und von dort auf einen Detektor (engl. *Photomultiplier*) geleitet. Der dichroitische Spiegel funktioniert so, dass er Licht bis zu einer bestimmten Wellenlänge reflektiert, langwelligeres Licht jedoch passieren lässt. Dies bedeutet, dass das Licht des Lasers vollständig an der Probe ankommt und das längerwellige Licht, welches von den so angeregten Fluoreszenzfarbstoffen der markierten Probe emittiert wird, ins Detektionssystem eintreten kann. Die dem Detektor vorgeschaltete Lochblende ist so angeordnet, dass nur das Licht passiert, welches aus der Fokalebene eintrifft. Weitere optische Informationen aus den nicht fokussierten Ebenen werden ausgeblendet. Die Anregung des Präparates erfolgt punktförmig; daher ist ein weiteres Abtasten in X- und Y-Richtung nötig. Diese Ablenkung wird durch einen XY-Scanner ermöglicht, der den Laser auf einen neuen Punkt des Präparates lenkt. Hierbei ergeben viele Punkte in X-Richtung eine Zeile und Zeilen in der Y-Richtung erstellen ein Bild der optischen Schnittebene.

Die vom Detektor aufgenommenen Informationen werden von einer speziellen Software gesammelt und verarbeitet.

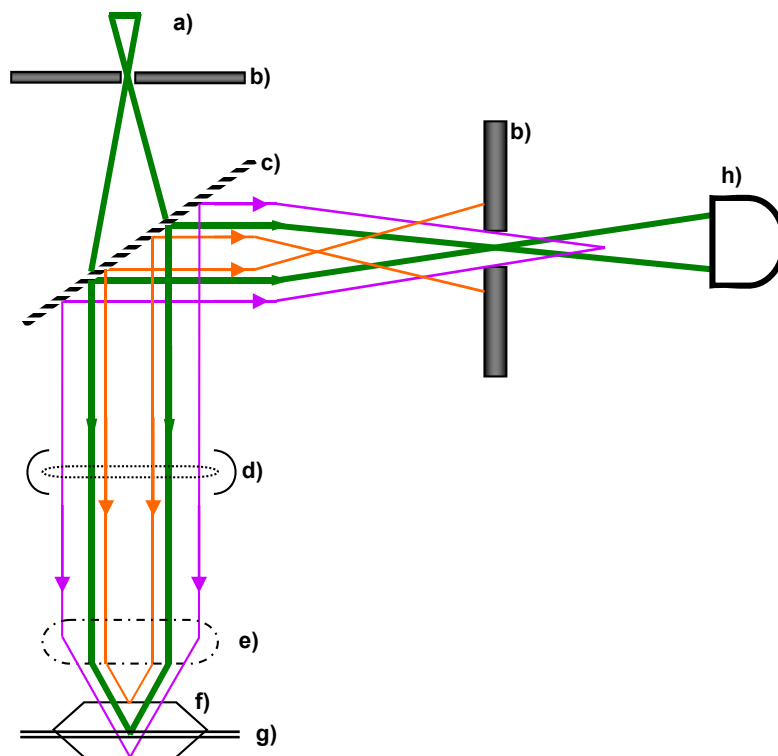


Abbildung 4.5: Schemazeichnung zum Aufbau des Strahlengangs eines konfokalen Mikroskops. a) Laser, b) Lochblende (engl. *Pinhole*), c) dichroitischer Spiegel, d) XY-Scanner, e) Objektiv, f) Präparat, g) Fokusebene, h) Detektor (Modifiziert nach: http://www.zfp.uni-stuttgart.de/bilder/lsm_prinzip.jpg).

4.9 Kalzium Messungen

Zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen wurden EBs am dritten Tag der Differenzierung zur Vereinzelung der Zellen für 30 min in einer Kollagenase B Lösung (2 mg/ml) in 1x PBS bei 37 °C verdaut. Die Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (180 g / 4 min) und das Pellet in 1 ml Differenzierungsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf Gewebekulturschalen verteilt, in denen sich einzelne elastische Silikonmembranen befanden, die mit Collagen beschichtet waren. Nachdem die Zellen 24 h später adhärent waren, wurden sie für 30 min in serumfreiem Medium mit Fluo4-AM (10 µM) bei 37 °C beladen. Bei Versuchen mit BAPTA-AM wurden die Zellen 1 h vor dem Beladen mit Fluo4-AM vorinkubiert. Anschließend wurden die Membranen aus der Gewebekulturschale mit einer Pinzette entnommen und in eine StageFlexer® Vorrichtung der Firma Flexcell® International eingebaut. Die Zellen wurden mit frischem, serumfreiem Medium versorgt und die StageFlexer® Vorrichtung am konfokalen Lasermikroskop angebracht. Mit Hilfe der Funktion des Live DATA Mode wurde dann in einer Frequenz von 1 s die Fluoreszenz der Zellen gemessen. Die Applikation von mechanischer Zugbelastung geschah dabei für

einen Zeitraum von 15 s. Die Anregung des Fluo4-AM erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, die Emission wurde zwischen 500-550 nm detektiert. Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität konnte die Konzentration des freien zytosolischen Kalziums bestimmt werden. Dazu wurde die folgende Gleichung verwendet.

$$\text{nM } [\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

F = Fluoreszenzintensität; **F_{min}** = Minimum der Fluoreszenzintensität; **F_{max}** = Maximum der Fluoreszenzintensität; **K_d** = Fluo4-AM Dissoziationskonstante 345 nM

4.10 Qualitativer Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Für den Nachweis der ROS wurden EBs verwendet, die an Tag 3 der Differenzierung auf die elastischen Membranböden von Bioflex Multiwellschalen ausgesät wurden und nach 24 h auf dieser vollständig adhären sind. Das Differenzierungsmedium der Zellen wurde entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt, in dem die Zellen für 2 h inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen im Flexcell System® mechanischer Zugbelastung ausgesetzt. Bei zusätzlicher Verwendung von Inhibitoren, wurden diese dem Medium 1 h vor der Applikation der mechanischen Zugbelastung zugesetzt. Danach wurden die Zellen mit dem Indikator DCFH-DA (20 µM) für 30 min im Dunkeln beladen. Nach der Beladung wurden die EBs gewaschen und in frisches serumfreies Medium überführt. Die Fluoreszenzintensität wurde am konfokalen Mikroskop durch die Anregung des oxidierten DCF mit dem Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm ermittelt.

4.11 Qualitativer Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO)

Wie für den Nachweis der ROS, wurden auch für den qualitativen Nachweis von NO, EBs am 4. Differenzierungstag nach Adhäsion an die elastische Membranböden von Bioflex Multiwellschalen verwendet. Auch hier wurden die Zellen in serumfreiem Medium vorinkubiert und anschließend der mechanischen Zugbelastung ausgesetzt. Bei einem Einsatz von Inhibitoren wurde wie bei der ROS Detektierung verfahren. Für den Nachweis von NO wurde der Fluoreszenzmarker DAF-FM DA verwendet. Die EBs wurden nach der jeweiligen Behandlung mit DAF-FM DA versetztem, serumfreiem Medium für 45 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach einem Mediumwechsel für weitere 30 min im Dunkeln zur Deesterifizierung von DAF-FM DA inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen und die Intensität der Fluoreszenz am konfokalen Mikroskop bestimmt.

4.12 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei n für die Anzahl der jeweilig durchgeführten Versuche steht. Die Resultate sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über Student-t-Test bzw. über ANOVA ermittelt. Dabei wurde * $p < 0,05$ als signifikant, ** $p < 0,01$ als sehr signifikant und *** $p < 0,001$ als hochsignifikant angesehen.

5 Ergebnisse

Physikalische Kräfte spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung zellulärer Prozesse. Dies gilt allgemein mit Blick auf die Vorgänge im adulten Organismus, aber auch für den sich entwickelnden Organismus. So haben mechanische Kräfte in nachgewiesener Weise Anteil und Einfluss auf die Entwicklung von Organen während der Embryogenese, wie es bereits eingangs in Kapitel 1.1 beschrieben wurde.

Auch die Bildung des Gefäßsystems ist neben anderen Faktoren durch mechanische Kräfte beeinflusst. Dabei ist über den biochemischen Aspekt der Gefäßbildung viel bekannt, was jedoch nicht im gleichen Maße für die mechanischen Faktoren gilt, die auf diesen Prozess einwirken. Durch ein steigendes Interesse an der Bedeutung physikalischer Kräfte für physiologische und pathologische Vorgänge der Gefäßbildung, stehen diese bei Untersuchungen zur Vaskulogenese inzwischen häufiger im Interessensfokus. So konnte etwa auch ein positiver Effekt der mechanischer Zugbelastung auf die kardiovaskuläre Differenzierung embryonaler Stammzellen festgestellt werden (Schmelter et al. 2006).

Zudem stellt sich die Frage, welche Signalkaskaden durch die auf eine Zelle wirkenden mechanischen Kräfte aktiviert werden. Hierbei richtet sich das Augenmerk auf sekundäre Botenstoffe wie Kalzium, Kinasen oder aber andere Moleküle, die bekannter Weise eine Rolle während der Vaskulogenese spielen. Hier sind vor allem ROS und NO zu nennen, aber auch das breite Spektrum an Wachstumsfaktoren und Axon-Guidance Molekülen.

In den im Folgenden zusammengestellten Untersuchungen und Analysen wurde auf die Fragestellung der Bedeutung einer mechanischen Zugbelastung für die Vaskulogenese in embryonalen Stammzellen genauer eingegangen. Dabei sollte vor allem der Einfluss der Zugbelastung und des intrazellulären Kalziums auf die für die Gefäßbildung wichtigen Axon-Guidance Proteine und Wachstumsfaktoren, sowie ROS und NO untersucht werden. Im weiteren Verlauf wurde unter diesen Gesichtspunkten auch die Beteiligung der PI3-Kinase sowie der ERK und JNK analysiert.

5.1 Einfluss mechanischer Zugbelastung und die Bedeutung von intrazellulärem Kalzium für die endotheliale Differenzierung

Zu Beginn sollte neben dem Einfluss der mechanischen Zugbelastung auch die Bedeutung von intrazellulärem Kalzium für die Vaskularisierung von EBs untersucht werden. Mit dieser

Zielsetzung ergab sich ein zweifaktorielles Versuchsdesign, also eine Analyse der Auswirkung zweier Faktoren auf eine abhängige Variable, in diesem Fall der Grad der Vaskularisierung der zu untersuchenden EBs. Dieses Versuchsdesign wurde im Verlauf der Untersuchungen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, zur Analyse der Prozesse und Ereignisse in den EBs häufiger verwendet.

Tabelle 5.1: Zweifaktorielles Versuchsdesign zur Untersuchung des Einflusses von mechanischer Zugbelastung und eines zusätzlichen Faktors auf zelluläre Prozesse im EB-Modell. Zur Analyse der unterschiedlichen zellulären Prozesse und der Auswirkung der verschiedenen Faktoren auf die EBs wurde das abgebildete Versuchsdesign durchgeführt, welches die zu behandelnden EBs in zwei Hauptgruppen (nicht gedehnt und gedehnt) unterteilt. Innerhalb dieser Gruppen wurde je eine Untergruppe mit einem 2. Faktor behandelt wobei eine andere Untergruppe als Kontrolle diente.

	Gruppe 1		Gruppe 2	
1. Faktor (Zugbelastung)	-	-	+	+
2. Faktor (Chelator, Inhibitor)	-	+	-	+

Für die Untersuchung der Auswirkung von mechanischem Stress und der Rolle des intrazellulären Kalziums ergaben sich demnach vier Versuchsansätze mit unterschiedlicher Behandlung. Die vier Ansätze waren zum einen eine gänzlich unbehandelte, sowie eine mit dem intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA-AM behandelte Probe. Die zwei weiteren Ansätze wurden für zwei Stunden einer mechanischen Zugbelastung von 10% Dehnung ausgesetzt. Wobei eine dieser Gruppen zwei Stunden vor der Stressapplikation mit BAPTA-AM behandelt wurde.

Die EBs wurden am dritten Tag der Differenzierung auf die elastischen Silikonmembranböden von Bioflexplatten ausgebracht. Nach 24 h waren die EBs adhärent verwachsen und wurden den jeweiligen Versuchsansätzen entsprechend behandelt. Die Zellen wurden für weitere vier Tage in Kultur gehalten, am achten Tag der Differenzierung wurden sie dann zur Analyse der endothelialen Differenzierung und der Vaskularisierung fixiert und immunhistochemisch (IHC) gefärbt. Dazu wurde der endotheliale Marker CD31 / PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule -1) verwendet.

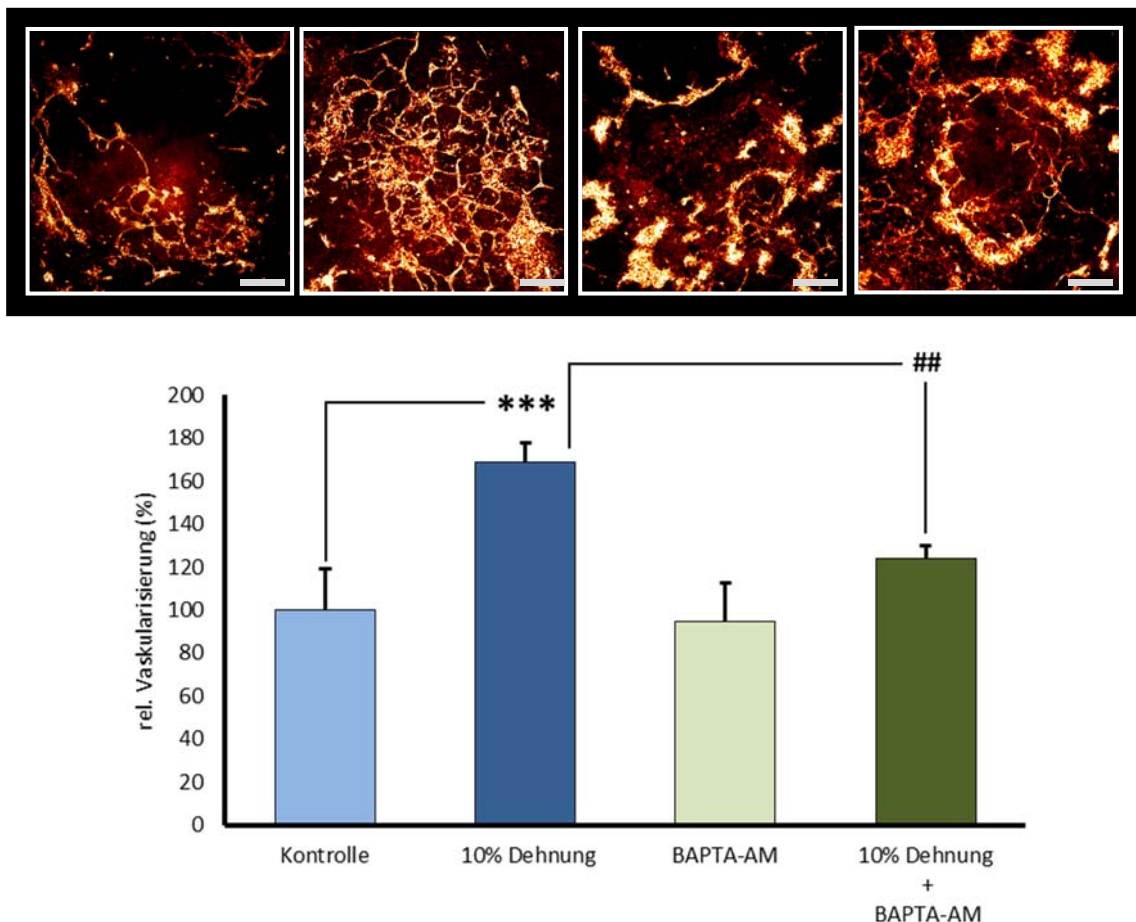


Abbildung 5.1: Vaskularisierung in EBs an Tag 8 der Differenzierung nach 2 h mechanischer Zugbelastung unter dem Einfluss des intrazellulären Kalzium Chelators BAPTA-AM (10 μ M). EBs wurden am 4. Tag der Differenzierung 2 h einer 10%igen mechanischen Zugbelastung ausgesetzt. Der Chelator wurde 2 h vor der Stressapplikation dem Differenzierungsmedium zugegeben. ($n=4$; *** $p<0.001$; ## $p<0.01$) (Balken entspricht 300 μ m).

Die Auswertung der Vaskularisierung der EBs nach der mechanischen Zugbelastung und der Behandlung mit BAPTA-AM zeigte, dass beide Faktoren einen Einfluss auf den Grad der Verzweigung haben. EBs, die am vierten Tag der Differenzierung für zwei Stunden einer 10%igen mechanischen Zugbelastung ausgesetzt wurden, zeigten an Tag acht eine signifikant erhöhte Vaskularisierung ($169 \pm 9\%$) verglichen mit der normierten Kontrolle ($100 \pm 19\%$). Eine Behandlung mit BAPTA-AM alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Vaskularisierung der EBs ($95 \pm 18\%$), wohingegen bei so vorbehandelten Zellen der zuvor beobachtete Effekt der mechanischen Zugbelastung weitgehend inhibiert war ($124 \pm 6\%$).

5.2 Kalziumsignale in Zellen dissoziierter Embryoid Bodies nach mechanischer Zugbelastung und Behandlung mit BAPTA-AM

Unsere Versuche zeigten, dass der intrazelluläre Kalziumchelator BAPTA-AM die

Vaskularisierung durch mechanischen Stress inhibiert. Daher wurde in einem nächsten Versuch der intrazelluläre Kalziumgehalt während der Stressapplikation gemessen. Dazu wurden EBs am dritten Tag vereinzelt und auf Silikonmembranen ausgebracht. Die Membranen wurden 24 h später in die Stage Flexer Vorrichtung transferiert. Die auf den Membranen adhären Zellen wurden mit dem Kalziumfarbstoff Fluo4-AM beladen und unter dem CLSM der mechanischen Zugbelastung von 10% Membrandehnung ausgesetzt. Um den Einfluss von BAPTA-AM auf das freie intrazelluläre Kalzium zu überprüfen, wurde eine Gruppe von Zellen 2 h vor Beladung mit Fluo4-AM und Stressapplikation mit BAPTA-AM (10 μ M) behandelt.

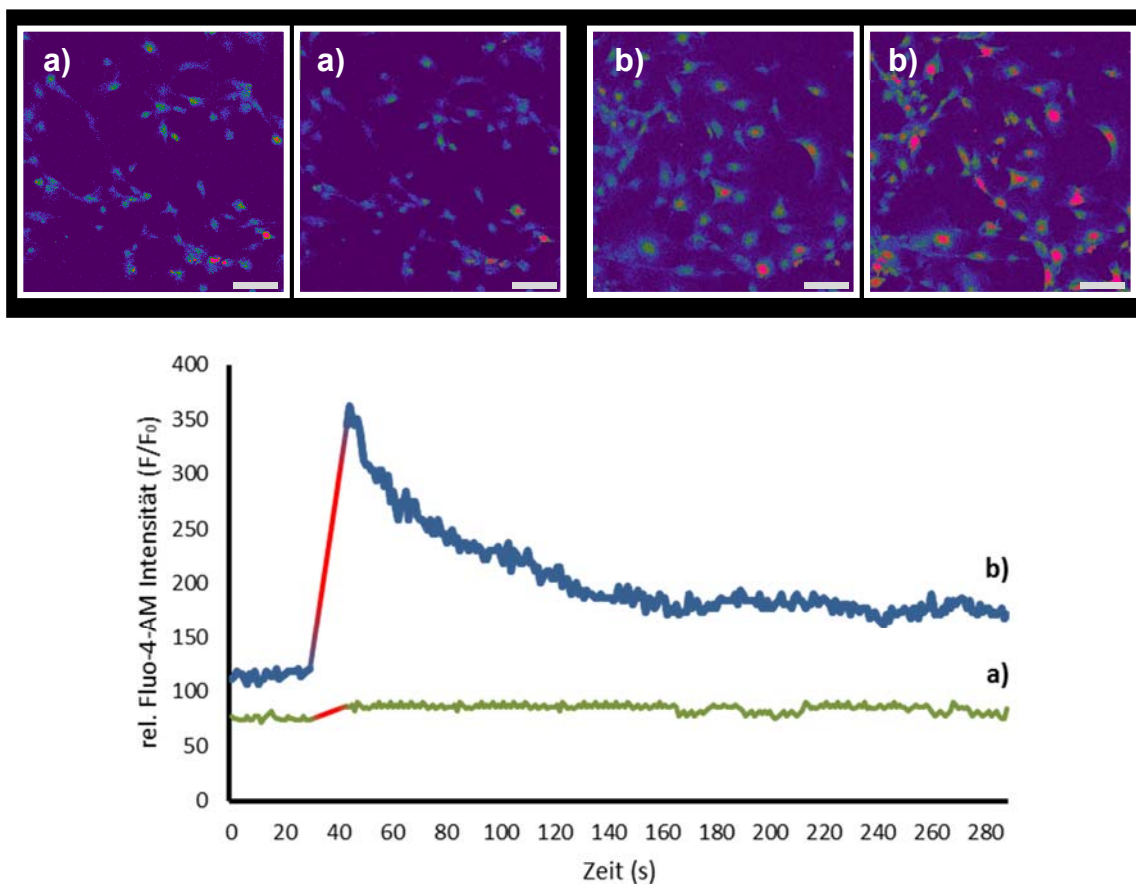


Abbildung 5.2: Vergleich der Kalziumsignale von Zellen während der mechanischen Zugbelastung in a) Anwesenheit und b) Abwesenheit von BAPTA-AM (10 μ M). Die durch Kollagenase B Verdau aus den EBs gelösten Zellen wurden auf Membranen ausgebracht, nach Adhäsion mit Fluo4-AM beladen und für 15 s einer 10%igen mechanischen Zugbelastung ausgesetzt (roter Strich). Repräsentative Bilder Fluo4-AM beladener Zellen (Balken entspricht 100 μ m).

Vor der mechanischen Zugbelastung konnte in den beiden Gruppen ein basaler Spiegel an freiem zytosolischen Kalzium gemessen werden. Hierbei gab es messbare Unterschiede zwischen den mit BAPTA-AM behandelten Proben und den unbehandelten Kontrollen. So lag die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den unbehandelten Kontrollen bei 119 nM $[Ca^{2+}]_i$, während diese in den zuvor mit BAPTA-AM beladenen Proben bei 75 nM $[Ca^{2+}]_i$ lag.

Als Folge der Applikation des mechanischen Reizes über einen Zeitraum von 15 s kam es in den unbehandelten Zellen zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären Kalziums. Die Konzentration des Kalziums im Zytosol erreichte einen Peak von 362 nM $[Ca^{2+}]_i$, fiel dann aber im weiteren Verlauf ab. In den mit BAPTA-AM behandelten Proben lag dagegen kaum eine Veränderung des intrazellulären Kalziums nach der mechanischen Zugbelastung vor. Hier konnten Werte von 88 nM $[Ca^{2+}]_i$ gemessen werden.

5.3 Einfluss der mechanischen Zugbelastung und BAPTA-AM auf die Expression von Axon-Guidance Proteinen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine verstärkte Vaskularisierung der EBs unter mechanischer Zugbelastung und legen zudem eine Beteiligung des intrazellulären Kalziums nahe. Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, sind neben anderen Faktoren, Axon-Guidance Proteine an der Entwicklung eines vollständigen und funktionsfähigen vaskulären Systems beteiligt. Daher sollte im weiteren Verlauf der Einfluss der Faktoren Zugbelastung und intrazelluläres Kalzium, auf die Axon-Guidance Proteine untersucht werden. So wurde im Folgenden die Expression von Axon-Guidance Proteinen der unterschiedlichen zusammengehörigen Molekül-Rezeptor Gruppen analysiert (siehe Kapitel 1.4).

5.3.1 Proteinexpression von Neuropilin1, Semaphorin4D und PlexinB1

Als funktional zusammengehörige Gruppe spielen Neuropiline, Semaphorine und Plexine eine wichtige Rolle während der Vaskulogenese und tumorinduzierten Angiogenese (Klagsbrun u. Eichmann 2005). Diese, aus zellulär gebundenen und sekretierten Proteinen bestehenden Familien haben maßgeblichen Anteil an der Etablierung und der Bildung eines funktionsfähigen und vollständigen Gefäßsystems. So geht das Ausschalten von Genen, die solche Proteine kodieren, mit zum Teil erheblichen Fehlbildungen oder dem Tod des sich entwickelnden Organismus einher (Adams u. Eichmann 2010).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse zur Proteinexpression der Axon-Guidance Moleküle Neuropilin1, Semaphorin4D und PlexinB1 dargestellt. Dazu wurden EBs 24 h nach dem Ausbringen auf elastische Membranböden im Rahmen des bereits zuvor angewendeten zweifaktoriellen Versuchsdesigns (Tabelle 5.1) behandelt. Für die weitere Analyse im Western Bot wurden 24 h nach der Behandlung, also am fünften Tag der Differenzierung, Proteinproben genommen und entsprechend der Angaben in Kapitel 4.7 aufbereitet.

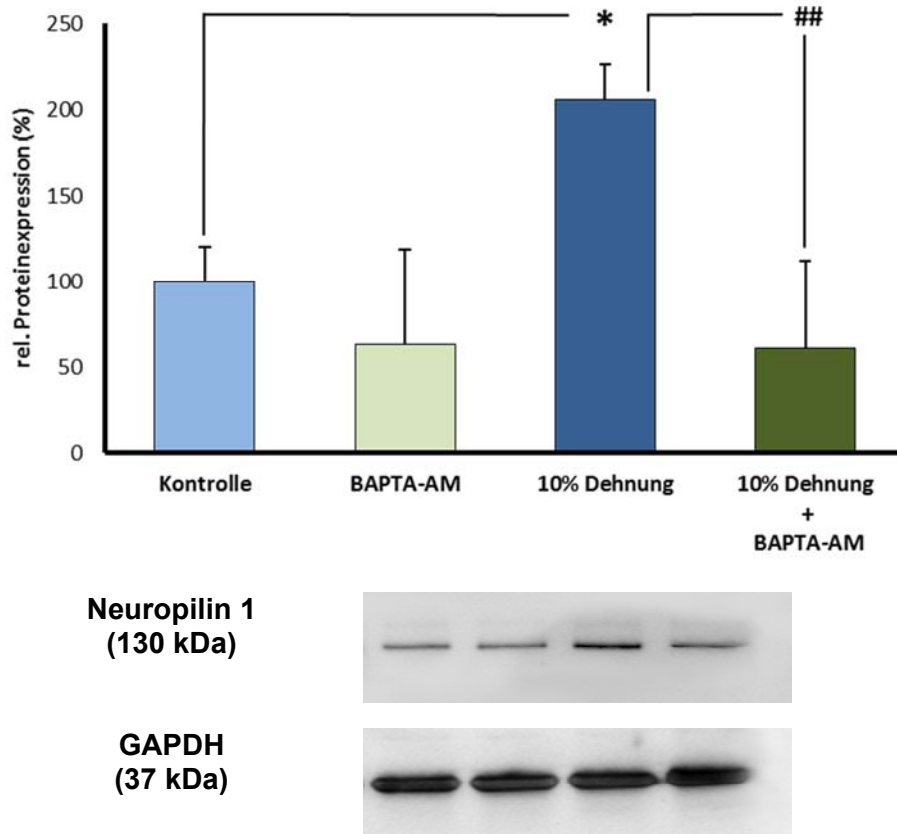


Abbildung 5.3: Proteinexpression von Neuropilin1, 24 h nach Applikation von mechanischem Stress und Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). EBs wurden am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt 24 h später wurden Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=3$; * $p<0.05$; ## $p<0.01$)

Die Expression von Neuropilin1 zeigt 24 h nach der mechanischen Zugbelastung einen signifikanten Anstieg ($206 \pm 20\%$) im Vergleich zur unbehandelten und normierten Kontrolle ($100 \pm 21\%$). Eine Behandlung nur mit BAPTA-AM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression ($63 \pm 55\%$). Die so behandelten Proben zeigten in etwa das Expressionsmuster der unbehandelten Kontrolle. Jedoch war das Niveau der Expression in mit BAPTA-AM behandelten und zusätzlich mechanisch gedehnten Zellen signifikant geringer ($61 \pm 51\%$) als das der Proben, die nur der mechanischen Zugbelastung ausgesetzt waren.

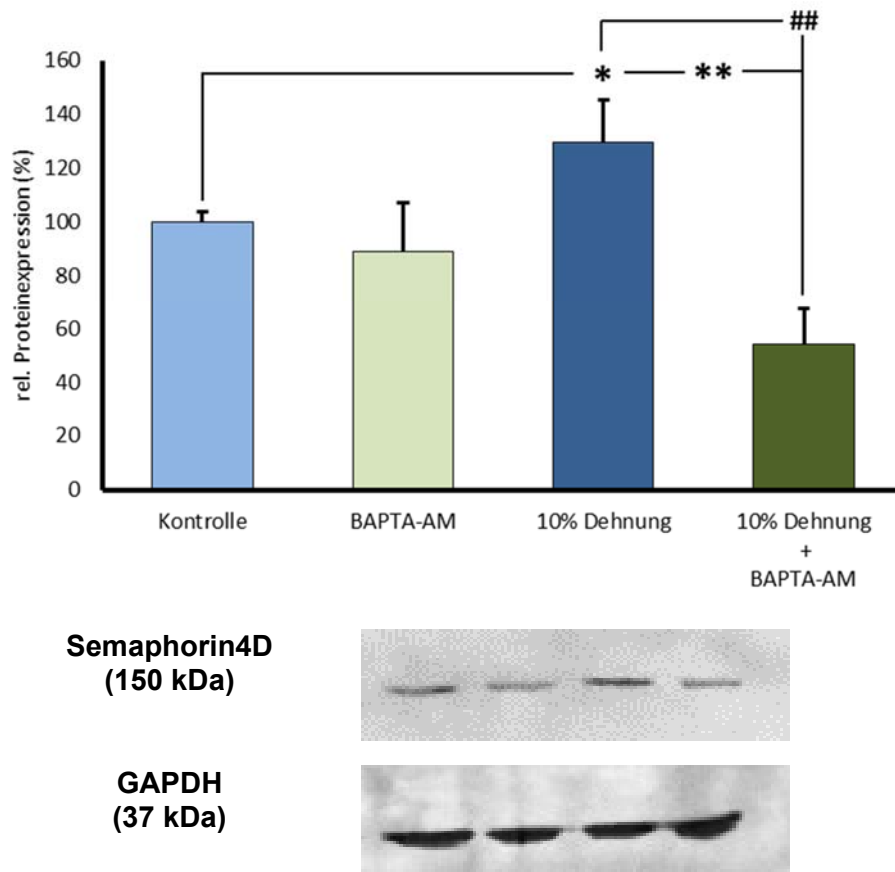


Abbildung 5.4: Proteinexpression von Semaphorin4D, 24 h nach Applikation von mechanischem Stress und Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). EBs wurden am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt. 24 h später wurden Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$)

Auch auf die Proteinexpression von Semaphorin4D hatte die Zugbelastung einen stimulierenden Einfluss. Verglichen mit der unbehandelten und normierten Kontrolle ($100 \pm 4\%$) stieg die Expression in diesen Proben signifikant auf $130 \pm 16\%$ an. Die Behandlung mit BAPTA-AM alleine hatte keinen Effekt auf die Proteinexpression ($89 \pm 18\%$). Hingegen wiesen die Zellen, die neben der Zugbelastung auch mit BAPTA-AM behandelt worden waren, im Vergleich zu den nur gedehnten Zellen einen signifikant geringeren Anstieg der Proteinexpression ($54 \pm 13\%$) auf.

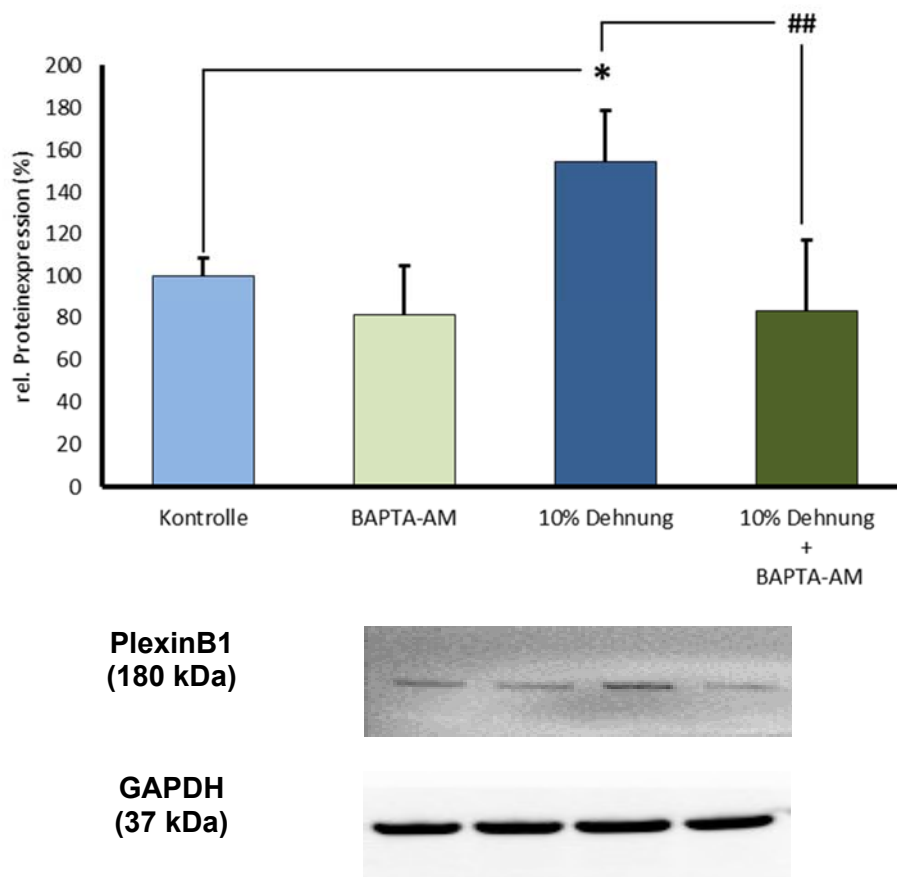


Abbildung 5.5: Proteinexpression von PlexinB1 24 h nach Applikation von mechanischem Stress und Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). EBs wurden am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt. 24 h später wurden Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; * $p<0.05$; ## $p<0.01$)

Das Expressionsmuster von PlexinB1 verhält sich ähnlich zu den bisher beschriebenen Mustern von Neuropilin1 und Semaphorin4D. So kommt es durch die mechanische Zugbelastung zu einem signifikanten Anstieg der Expression von PlexinB1 ($154 \pm 24\%$) im Vergleich zur unbehandelten und normierten Kontrolle ($100 \pm 8\%$). Auch hier hat die Behandlung mit BAPTA-AM allein keinen signifikanten Einfluss ($82 \pm 23\%$) auf das Protein. Allerdings verharrt die Proteinexpression nach der Behandlung mit BAPTA-AM und der mechanischen Zugbelastung in etwa auf Kontrollniveau ($83 \pm 34\%$) und ist somit im Vergleich zur gedehnten Probe signifikant niedriger.

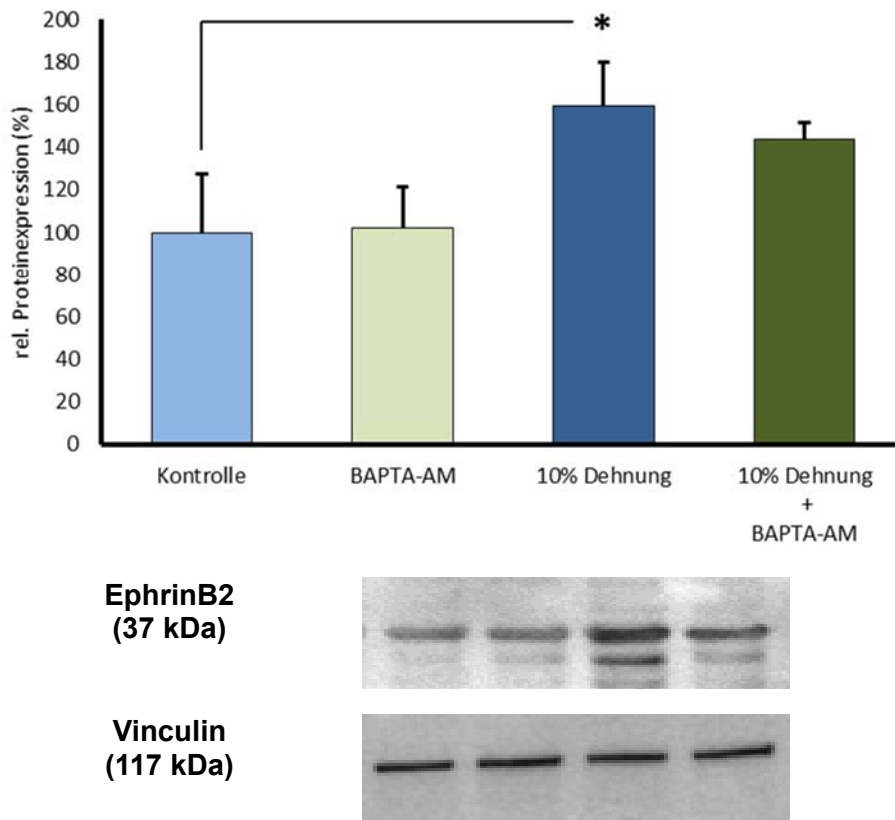
5.3.2 Proteinexpression von EphrinB2 und EphB4

Die Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung, aber auch die durch Tumore induzierte Angiogenese, finden unter Beteiligung der Proteine der Eph und Ephrin Familien statt. So ist auch bekannt, dass diese bidirektional signalgebenden Liganden und Rezeptoren sowohl an venösem wie auch an arteriellem Endothel exprimiert werden (Bochenek et al 2010,

Genander u Friséen 2010).

Im Weiteren wurde das Expressionsverhalten des Molekül-Rezeptor Paares EphrinB2 und EphB4 nach mechanischer Zugbelastung und der Chelatierung des intrazellulären Kalziums untersucht. Die Ergebnisse dieser Expressionsanalysen sind im Folgenden zusammen dargestellt.

a)



b)

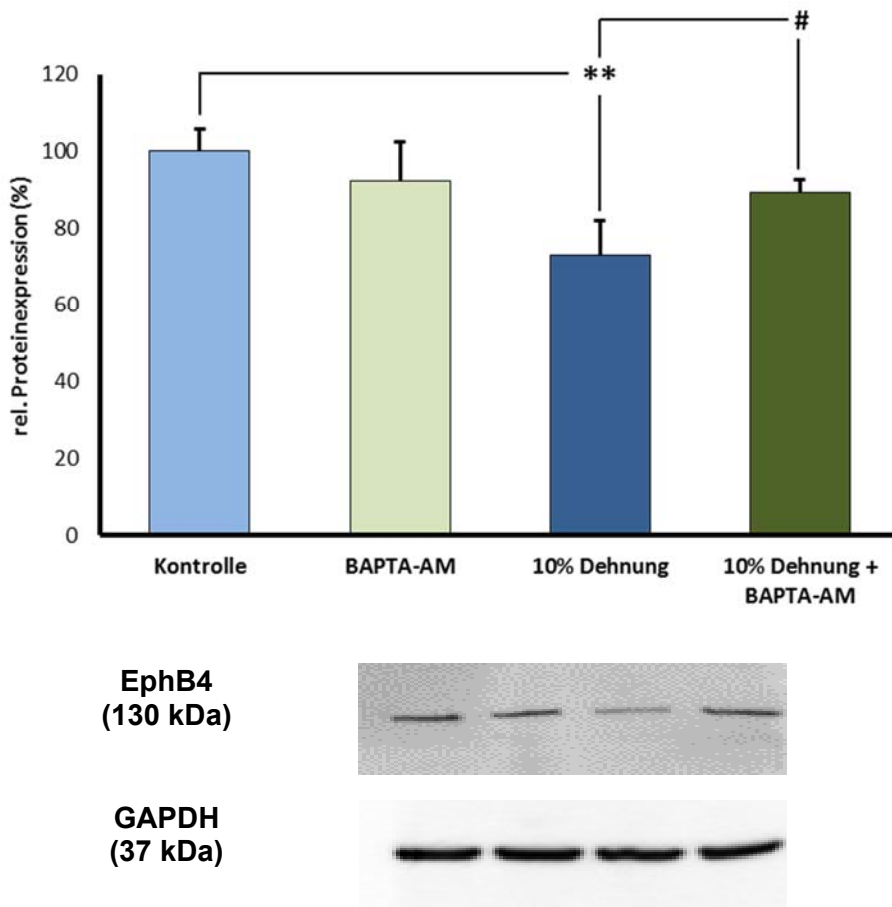


Abbildung 5.6: Proteinexpression von a) EphrinB2 und b) EphB4 24 h nach Applikation von mechanischem Stress und Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). EBs wurden am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt. 24 h später wurden Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; ** $p<0.01$; # $p<0.05$)

Die Zugbelastung, der die EBs ausgesetzt wurden, hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression von EphrinB2 und EphB4. So konnte für das Protein EphrinB2 ein signifikanter Anstieg ($160 \pm 20\%$) nach der Stressapplikation festgestellt werden, wenn man diesen mit dem der gänzlich unbehandelten und normierten Kontrolle ($100 \pm 27\%$) vergleicht. Die Behandlung der EBs mit BAPTA-AM hatte dagegen keine Auswirkungen auf das Expressionsverhalten. Die Proben der Gruppe der BAPTA-AM behandelten EBs wiesen mit $102 \pm 19\%$ in etwa Kontrollniveau auf. In der Gruppe der gedehnten EBs stieg die EphrinB2 Expression bei zusätzlicher Inkubierung mit BAPTA-AM auf $144 \pm 8\%$. Damit lag ein erhöhter, aber gegenüber der Kontrolle nicht signifikanter veränderter Wert vor.

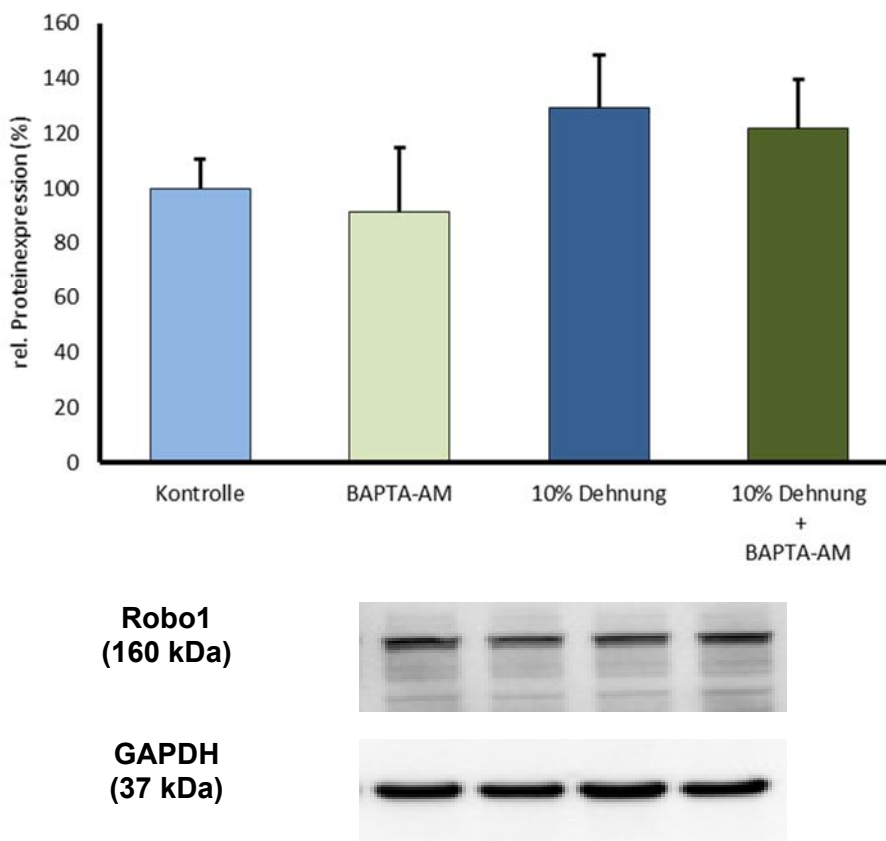
Auch die Expression von EphB4 wurde durch die mechanische Dehnung beeinflusst. Hier hatte die Applikation der Zugbelastung einen signifikanten Rückgang ($72 \pm 9\%$) der Proteinexpression zur Folge, wenn man dies mit der normierten Kontrolle ($100 \pm 7\%$)

vergleicht. Dagegen zeigte sich durch die Behandlung der EBs mit BAPTA-AM allein kein Einfluss auf das Expressionsverhalten. Hier lag in der nicht gedehnten Gruppe der Wert der EphB4 Expression bei $95 \pm 11\%$ und somit in etwa auf Höhe des Kontrollwertes. Dies galt auch für die EBs, die zusätzlich zur Dehnung mit BAPTA-AM behandelt wurden ($91 \pm 3\%$).

5.3.3 Proteinexpression von Robo1, Robo4 und Slit2

Die Eingangs in Abschnitt 1.4.3 beschriebenen Moleküle der Robo und Slit Familie bilden wie die zuvor untersuchten Proteine ebenfalls ein Molekül-Rezeptor Paar. Hier werden jedoch die Funktionen der Mitglieder dieser Gruppen kontrovers diskutiert und die Interaktionen zwischen Robo4 und Slit2 sind nicht ganz eindeutig (Park et al 2003, Wang et al, 2003, Legg et al 2008, Sheldon et al 2009). Dies gilt im Weiteren auch für eine Interaktion zwischen Robo1 und Robo4. Dennoch ist die Bedeutung dieser beiden Familien für die Bildung von Gefäßsystemen in der Literatur gut beschrieben (Legg et al 2008, Dickinson et al 2010, Marlow et al 2010).

a)



b)

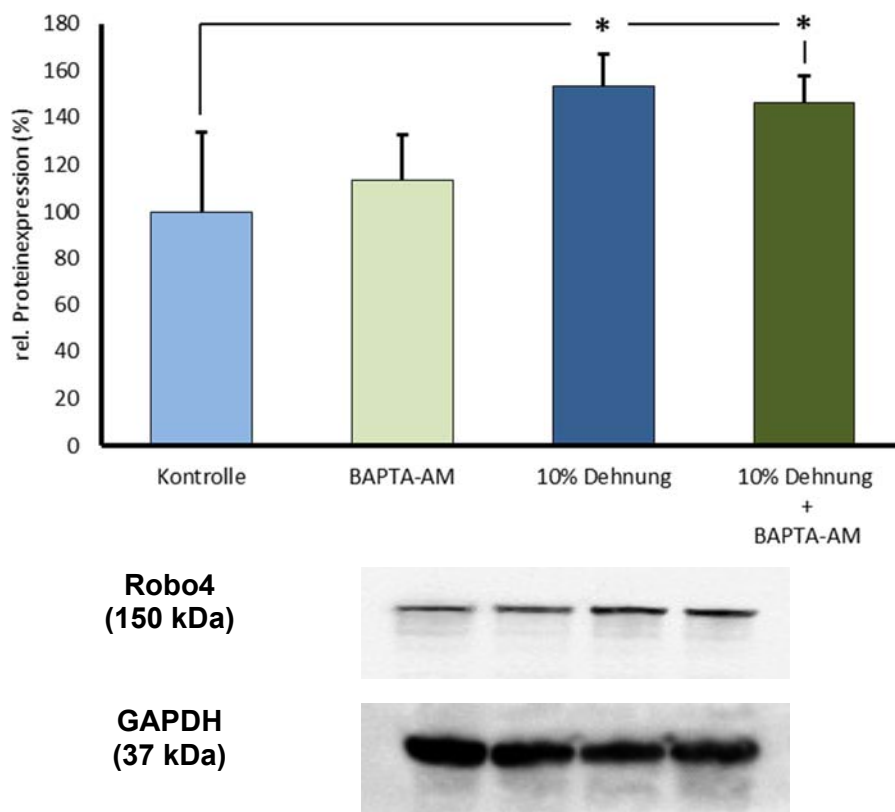


Abbildung 5.7: Proteinexpression von a) Robo1 und b) Robo4 24 h nach mechanischer Zugbelastung und Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). EBs wurden am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt. 24 h später wurden Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; * $p<0.05$)

24 h nach Zugbelastung, konnte kein signifikanter Einfluss auf die Proteinexpression von Robo1 beobachtet werden. Auch die Behandlung mit BAPTA-AM zeigte hier keinen Effekt. Die nicht gedehnten Proben wiesen annähernd die gleichen Werte auf. So lag hier die Expression in den mit BAPTA-AM behandelten EBs mit $91 \pm 23\%$ in etwa auf dem Niveau der Kontrolle ($100 \pm 11\%$). Die Dehnung der EBs hatte zwar eine Zunahme der Robo1 Bildung zur Folge ($129 \pm 19\%$), jedoch fiel diese Veränderung im Vergleich zur Gruppe der nicht gedehnten Proben nicht signifikant aus. Auch hatte die BAPTA-AM Behandlung keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten des Proteins in den gedehnten EBs ($122 \pm 18\%$).

Für die Expression von Robo4 konnte dagegen gezeigt werden, dass diese durch die mechanische Zugbelastung induziert wird. Dagegen blieb eine Inkubierung mit dem intrazellulären Kalzium Chelator ohne Einfluss. In der Gruppe der EBs, die nicht der Zugbelastung ausgesetzt waren, konnte in Anwesenheit von BAPTA-AM keine Veränderung in der Robo4 Expression ausgemacht werden (Kontrolle $100 \pm 34\%$; BAPTA-AM $113 \pm 19\%$).

Dagegen stieg in Folge der mechanischen Dehnung die Expression signifikant auf $153 \pm 14\%$ an. In den EBs, die während der Zugbelastung mit BAPTA-AM behandelt worden waren, stieg die Expression im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant an ($146 \pm 12\%$).

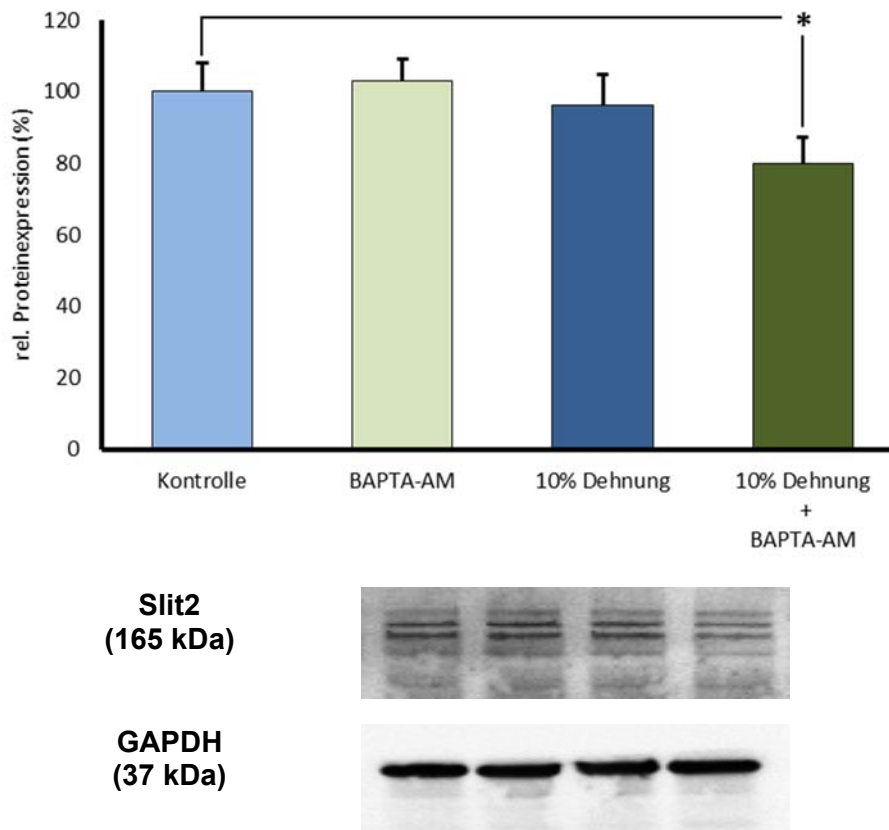


Abbildung 5.8: Proteinexpression von Slit2 24 h nach der Applikation von mechanischem Stress und der Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). EBs wurden am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt. 24 h später wurden Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=3$; * $p<0.05$)

Bei der Analyse des Expressionsverhaltens von Slit2 in den mit Zugbelastung und BAPTA-AM behandelten EBs zeigte sich, dass eine Chelatierung des Kalziums in den gedehnten Proben keinen Einfluss auf das Muster der Proteinexpression hatte. In den Gruppen, die nicht gedehnt wurden, wies Slit2 in etwa die gleiche Proteinexpression auf (Kontrolle $100 \pm 8\%$; BAPTA-AM $103 \pm 6\%$). Auch die Dehnung der EBs hatte keine Veränderung von Slit2 zur Folge. So lag der hier ermittelte Wert bei $96 \pm 9\%$. Eine Behandlung mit BAPTA-AM zeigte jedoch, dass nach anschließender Dehnung die Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert war ($80 \pm 7\%$).

5.4 Die Bedeutung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für die Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung.

ROS gehören im zellulären System zu den wichtigsten Signalmolekülen und sind in eine Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen involviert. So konnte bereits von Schmelter et al (2006) gezeigt werden, dass es nach dem Einwirken von mechanischem Stress innerhalb der Zelle in nur wenigen min zu einem Anstieg der ROS Produktion kommt. Zudem sind ROS und Ca^{2+} Signale offenbar eng mit einander verbunden, so dass durch Ca^{2+} -abhängige Komponenten die Balance der ROS Generierung reguliert wird. Da in den bisherigen Resultaten ein Einfluss des mechanischen Stresses auf den intrazellulären Kalziumgehalt nachgewiesen werden konnte und bekannt ist, dass es durch den mechanischen Stress zu einem Anstieg der ROS Produktion kommt (Schmelter et al, 2006), sollte im weiteren Verlauf die Verknüpfung dieser beiden Signalsysteme während der Stressapplikation untersucht werden.

5.4.1 Nachweis der ROS Bildung nach mechanischer Zugbelastung und Inkubation mit BAPTA-AM und VAS2870

Da Zeitnah nach der mechanischen Dehnung der EBs ein Anstieg der intrazellulären ROS zu verzeichnen ist (Schmelter et al, 2006), wurde dies während der hier durchgeführten ROS Analyse berücksichtigt. Daher wurden die EBs an Tag 5 der Differenzierung für 5 min dem mechanischen Stress von 10% Dehnung ausgesetzt und anschließend die ROS Produktion unter dem CLSM gemessen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit dem intrazellulären ROS Indikator H_2DCF beladen. Für die Analyse des Einflusses von Kalzium wurde eine Gruppe mit dem Chelator BAPTA-AM zwei Stunden vor dem mechanischen Stress inkubiert.

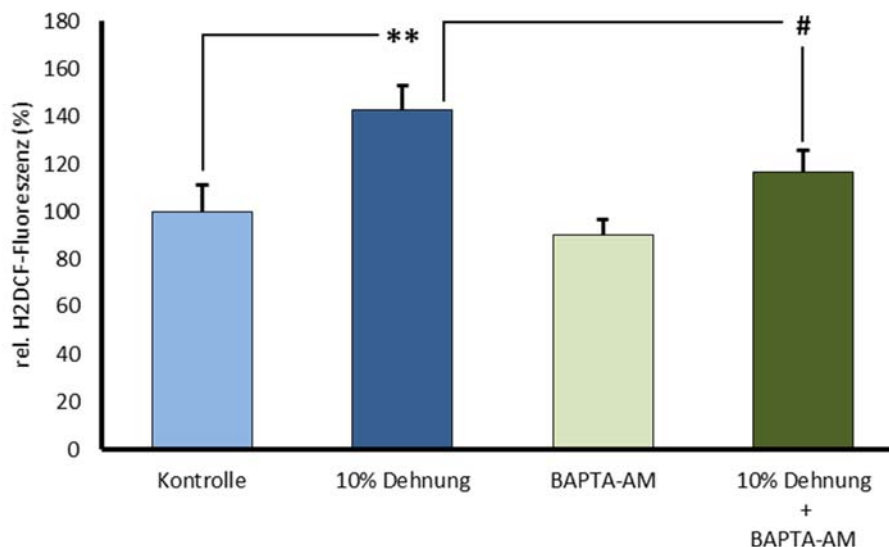
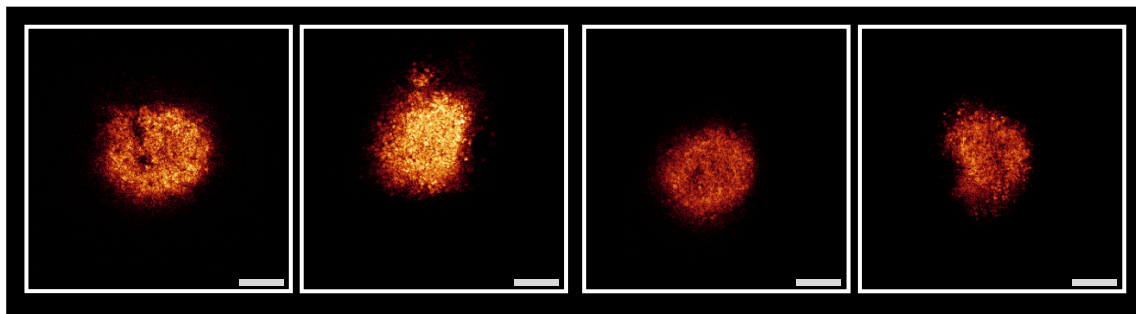


Abbildung 5.9: Durch mechanische Zugbelastung induzierte ROS Bildung und der Effekt des intrazellulären Kalzium Chelators BAPTA-AM (10 μ M) in 4 Tage alten EBs. Drei Tage alte EBs wurden 24 h vor der Stressapplikation auf elastische Silikonmembranen ausplattiert und nach dem Anwachsen für 5 min einer 10%igen mechanischen Zugbelastung ausgesetzt. Die Bildung der ROS wurde durch die DCF Fluoreszenz bestimmt. Der intrazelluläre Kalzium Chelator BAPTA-AM (10 μ M) wurde 2 h vor der Dehnung zugegeben. ($n=3$; ** $p<0.01$; # $p<0.5$) (Balken entspricht 300 μ m).

Anhand der H₂DCF Fluoreszenz konnte nach fünf min mechanischer Zugbelastung ein Anstieg der ROS Bildung nachgewiesen werden. So erhöhte sich die ROS-vermittelte DCF Fluoreszenz ($142 \pm 10\%$) verglichen mit der nicht gedehnten und normierten Kontrolle ($100 \pm 10\%$). Durch die Inkubation der EBs mit dem Kalzium Chelator BAPTA-AM zwei Stunden vor der Stressapplikation konnte der zuvor beobachtete Effekt signifikant reduziert werden. In so behandelten und gedehnten EBs stieg die ROS Bildung auf $117 \pm 7\%$ im Vergleich zur Kontrolle.

Als eine der Hauptquellen der ROS gilt die NADPH-Oxidase. Daher sollte im weiteren Verlauf die Beteiligung der NADPH-Oxidase an der stressinduzierten Freisetzung der ROS im hier untersuchten EB-Model untersucht werden. Um dies zu erreichen wurde der NADPH-Oxidase spezifische pharmakologische Inhibitor VAS2870 verwendet. Dazu wurden die EBs wie in

Tabelle 5.1 beschrieben behandelt. Die Dehnung der EBs erfolgte über einen Zeitraum von 5 min; darauf folgend wurde die ROS Bildung am CLSM untersucht. Die Gabe des Inhibitors in das Medium erfolgte 2 h vor der Untersuchung.

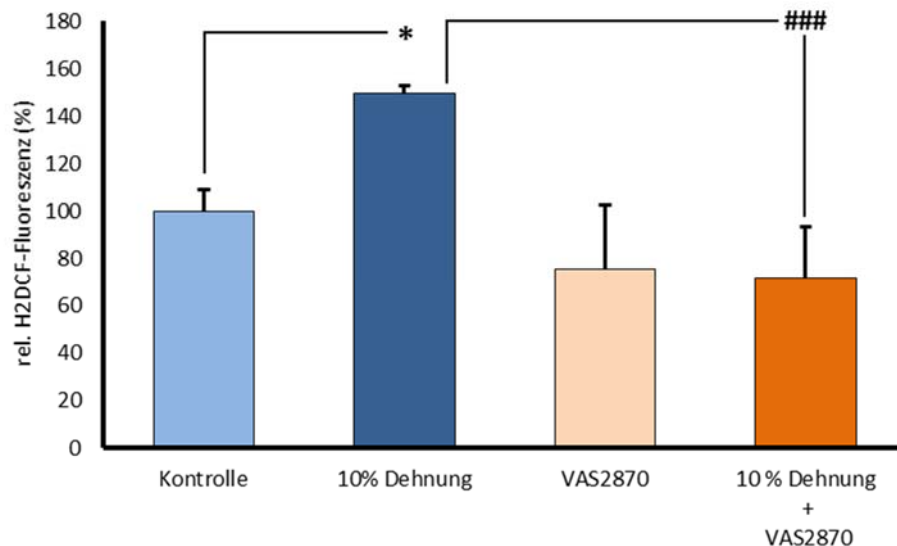
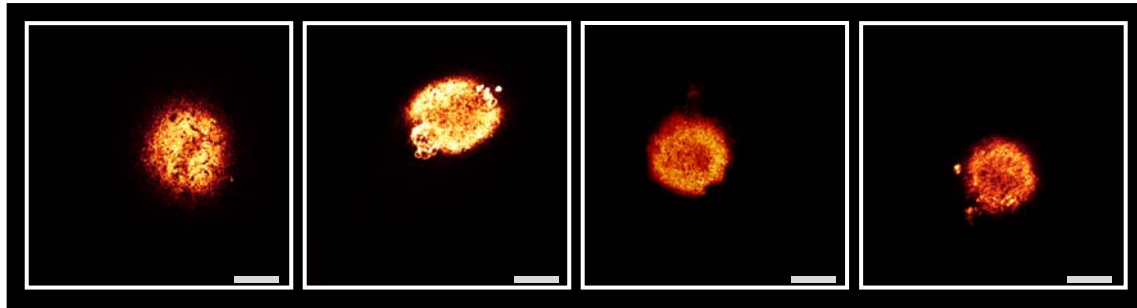


Abbildung 5.10: Induzierte ROS Bildung durch Dehnung und der Effekt des NADPH-Oxidase Inhibitors VAS2870 (50µM) in 4 Tage alten EBs. Die Stressapplikation erfolgte 24 h nach dem Ausbringen auf die elastischen Silikonmembranböden von Bioflex Platten. Die Dehnung betrug 10% für 5 min. Die Bildung der ROS wurde anhand der DCF Fluoreszenz bestimmt. Der NADPH-Oxidase Inhibitor VAS2870 (50 µM) wurde 2 h vor der Zugbelastung zugegeben. ($n=4$; * $p<0.05$; ### $p<0.001$) (Balken entspricht 100 µm).

Durch die pharmakologische Inhibierung der NADPH-Oxidase konnte der Anstieg von ROS nach mechanischer Zugbelastung aufgehoben werden. Die Dehnung der EBs hatte den bereits in Abbildung 5.9 beschriebenen signifikanten Anstieg ($149 \pm 3\%$) im Vergleich zur Kontrolle ($100 \pm 9\%$) zur Folge. Die vor der Stressapplikation mit VAS2870 inkubierten EBs zeigten dagegen mit $72 \pm 22\%$ eine signifikant geringere ROS-Bildung als durch die Dehnung alleine. Eine Behandlung mit dem Inhibitor zeigte eine Reduktion der ROS auf $76 \pm 27\%$, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies.

5.4.2 Einfluss der ROS auf die Vaskularisierung von EBs

Durch die Behandlung der EBs mit dem NADPH Oxidase Inhibitor VAS2870 konnte, wie beschrieben, eine signifikante Reduktion der ROS Bildung im Zuge der Stressapplikation beobachtet werden. Daher sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, wie sich die Reduktion der ROS Bildung auf den Grad der Vaskularisierung der EBs auswirkt. Zu diesem Zweck wurden EBs am dritten Tag der Differenzierung auf elastische Membranen ausgebracht und 24 h später der Zugbelastung zugeführt. Dabei wurden die entsprechend zu behandelnden Zellen 2 h vor der mechanischen Zugbelastung mit VAS2870 inkubiert.

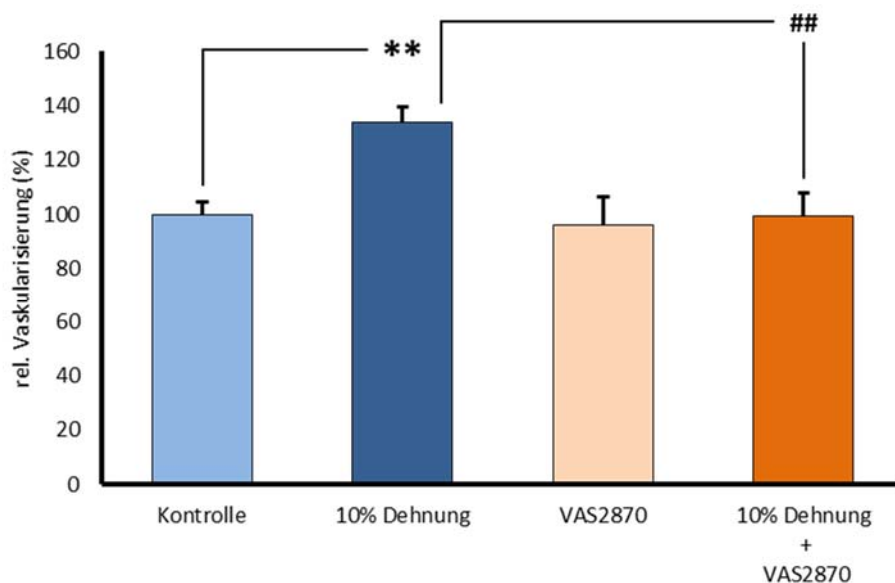
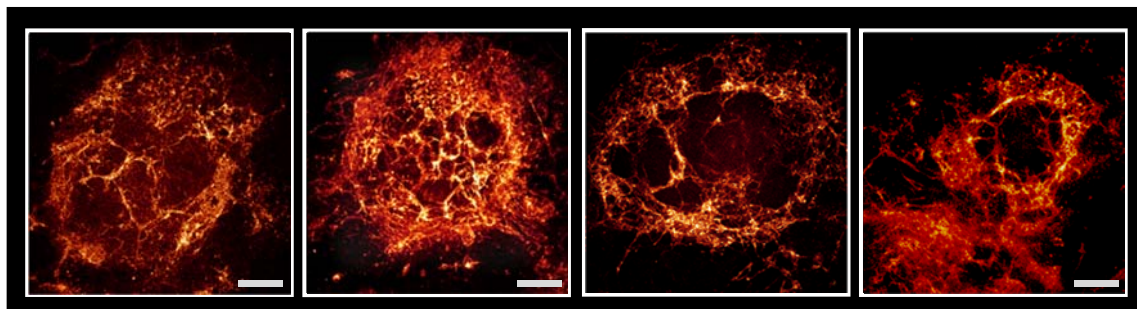


Abbildung 5.11: Einfluss des NADPH-Oxidase Inhibitors VAS2870 (50 μ M) auf die Vaskularisierung unter mechanischer Zugbelastung. EBs wurden am 4. Tag der Differenzierung einer 2 stündigen 10%igen mechanischen Zugbelastung ausgesetzt. Der Inhibitor wurde 2 h vor der Stressapplikation dem Differenzierungsmedium zugegeben ($n=3$; ** $p<0.001$; ## $p<0.01$) (Balken entspricht 300 μ m).

Die pharmakologische Inhibierung der NADPH-Oxidase hemmte die Vaskularisierung nach der mechanischen Zugbelastung. In den Gruppen, die nicht der Dehnung ausgesetzt waren, konnte kein Einfluss durch die Behandlung mit VAS2870 beobachtet werden. Der

Verzweigungsgrad lag bei den EBs nach einer Inkubation mit VAS2870 mit $96 \pm 10\%$ auf dem Niveau der Kontrolle ($100 \pm 4\%$). In den EBs, die der mechanischen Zugbelastung ausgesetzt waren, konnte dagegen eine signifikant erhöhte Verzweigung ($134 \pm 6\%$) im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. In der Gruppe von EBs, die zusätzlich zur Stressapplikation mit VAS2870 behandelt wurden, war der zuvor beobachtete Effekt aufgehoben. Dabei ergab sich mit $100 \pm 8\%$ ein Vaskularisierungsgrad, der in etwa dem der nicht gedehnten Gruppen entspricht.

5.5 Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) für die Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung.

Das Radikal NO spielt in vielen physiologischen Prozessen eine Rolle und gilt als ein wichtiges pro-angiogenes Molekül (Barbieri et al, 2012). Zudem wurde in einigen Studien darauf hingewiesen, dass äußerer zellulärer Stress den intrazellulären NO-Spiegel beeinflusst (Boo u. Jo 2003, Balligand et al 2009, Kolluru et al 2010). Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine verstärkte Vaskularisierung der EBs, hervorgerufen durch mechanische Zugbelastung, auch mit der Bildung von intrazellulärem NO in Zusammenhang steht. Auf Grund dessen sollte in einem ersten Schritt die Bildung von NO im Verlauf der mechanischen Zugbelastung innerhalb des EB Systems untersucht werden. Hierzu wurden die EBs am dritten Tag der Differenzierung auf elastischen Silikonmembranen ausgebracht und 24 h später 10% mechanischem Stress ausgesetzt. Die NO Bildung wurde dann, unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-FM DA, an den Zeitpunkten 10, 30 und 60 min analysiert.

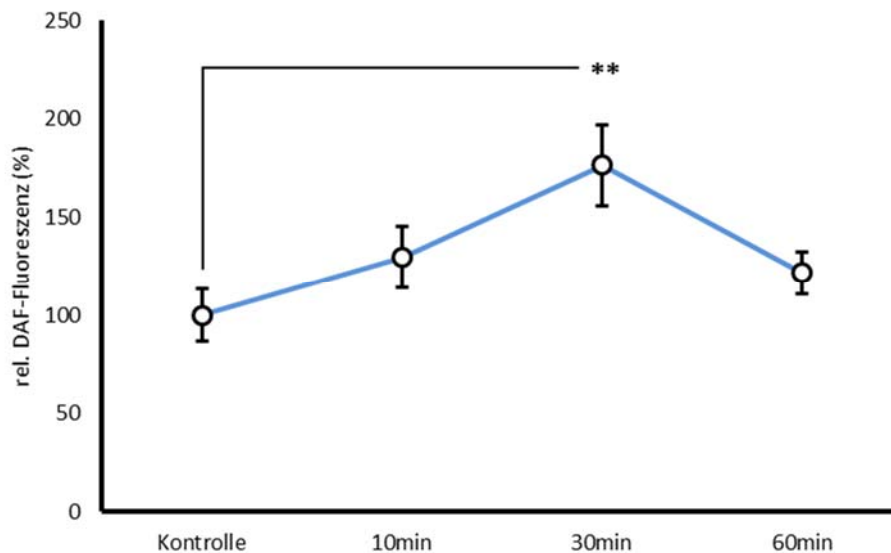
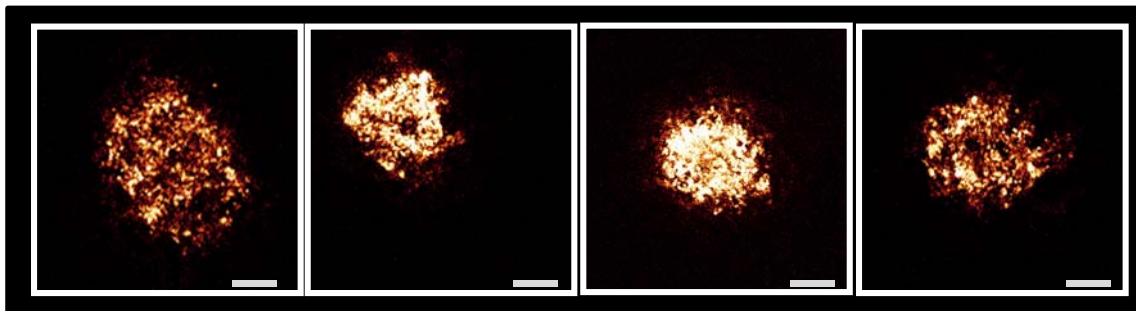


Abbildung 5.12: Verlauf der NO-Produktion unter mechanischer Zugbelastung über den Zeitraum von 1 h. Die Produktion von NO wurde in vier Tage alten EBs an verschiedenen Zeitpunkten während der Applikation von 10% mechanischem Stress analysiert. Die EBs wurden 24 h vor der Zugbelastung auf Silikonmembranen ausgebracht und die NO Bildung über den Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM DA bestimmt. ($n=3$; $**p<0.01$) (Balken entspricht $300\ \mu\text{M}$).

Wie in Abbildung 5.12 zu erkennen ist, kommt es im Verlauf der Stressapplikation innerhalb der EBs zu einem Anstieg der NO Bildung im Vergleich zur normierten Kontrolle ($100 \pm 13\%$). Dabei erreicht die Bildung des gemessenen NO nach 30 min ein Maximum, welches verglichen mit dem Ausgangswert ($100 \pm 13\%$), signifikant erhöht ist ($176 \pm 21\%$). Im weiteren Verlauf sinkt der gemessene NO Spiegel zum Zeitpunkt 60 min wieder ab ($122 \pm 11\%$).

Da, wie in Kapitel 1.7 beschrieben, die Bildung von NO durch die NO-Synthasen (NOS) erfolgt, stellte sich die Frage nach der Aktivität der NOS im Verlauf der Stressapplikation. Die für das vaskuläre System wichtigste NOS Isoform ist die endotheliale NOS (eNOS / NOS III). Daher wurde hier der Grad der Aktivität der eNOS im zeitlichen Verlauf der mechanischen Zugbelastung untersucht. Dafür sollte die Phosphorylierung der eNOS im Western Blot mit einem für die phosphorylierte eNOS spezifischen Antikörper analysiert werden. Die EBs wurden hierzu am vierten Tag der Differenzierung für 2 h einer Zugbelastung ausgesetzt, wobei

an den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min. Proteinproben genommen wurden.

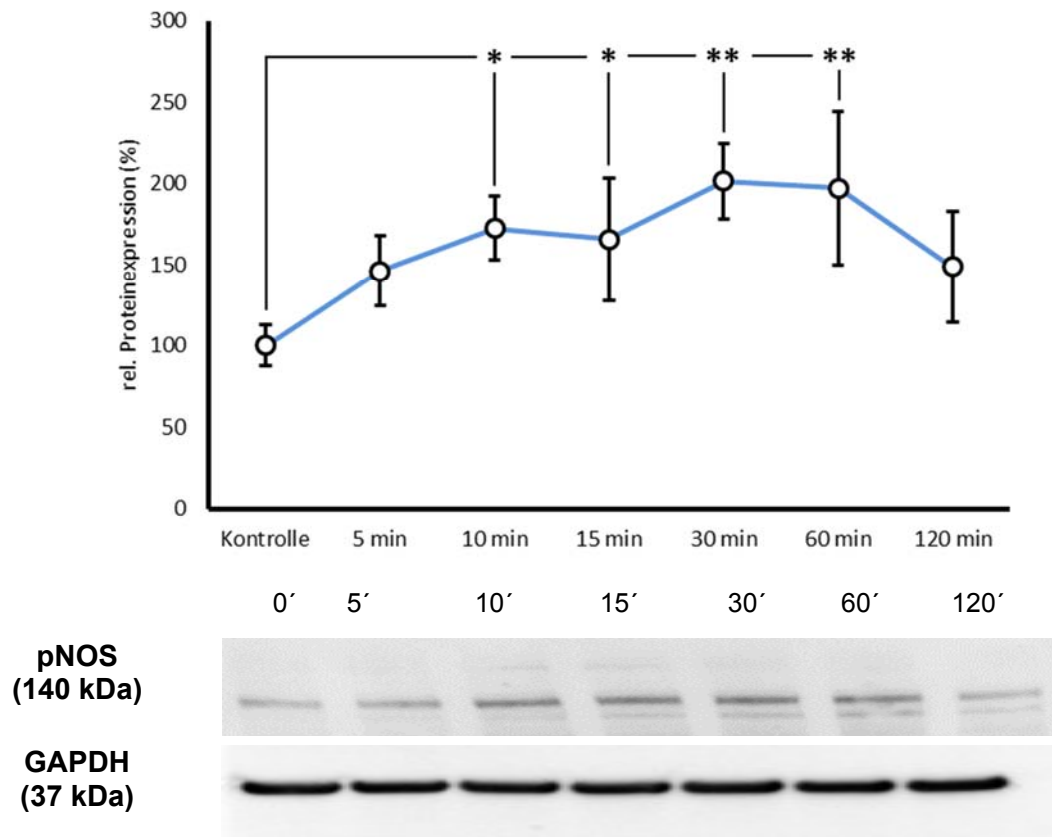


Abbildung 5.13: Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der endothelialen NO Synthase (eNOS / NOS III) während mechanischer Zugbelastung. Von vier Tage alten EBs wurden an den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min. der mechanischen Zugbelastung Proben genommen und im Western Blot der Grad der Phosphorylierung der eNOS analysiert. ($n=4$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$)

Die Western Blot Analyse ergab, dass die auf die EBs ausgeübte mechanische Zugbelastung einen Anstieg der eNOS Aktivität zur Folge hatte. So konnte ermittelt werden, dass es zu einem kontinuierlichen Anstieg des Phosphorylierungsgrades im Vergleich zur Kontrolle kam. Dabei lag dieser an den Zeitpunkten 10 min ($173 \pm 20\%$) und 15 min ($166 \pm 38\%$) signifikant über dem normierten Ausgangswert der Kontrolle ($100 \pm 13\%$). Die gemessene Phosphorylierung erreichte dann an den Messpunkten 30 min ($202 \pm 23\%$) und 60 min ($197 \pm 47\%$) bezogen auf die Kontrolle ein ebenfalls signifikantes Maximum.

Da bisher gezeigt werden konnte, dass es durch die Zugbelastung in den EBs zu einem Anstieg der NO-Bildung und eine Zunahme der NOS III Aktivität kommt, sollte dies eingehender untersucht werden. Dazu wurden die Zellen an Tag vier zwei Stunden vor der Stressapplikation mit dem NOS Inhibitor L-NAME ($100 \mu\text{M}$) inkubiert und anschließend für 30 min der mechanischer Zugbelastung ausgesetzt.

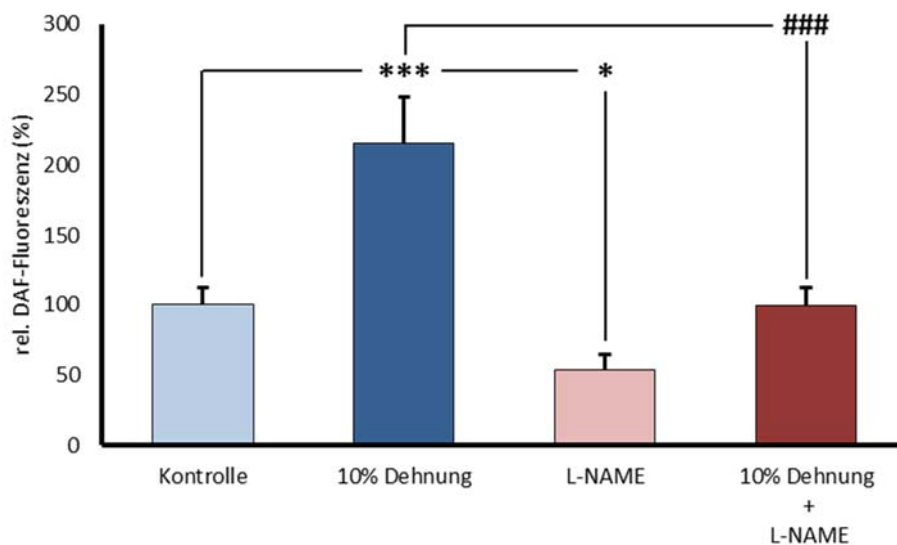
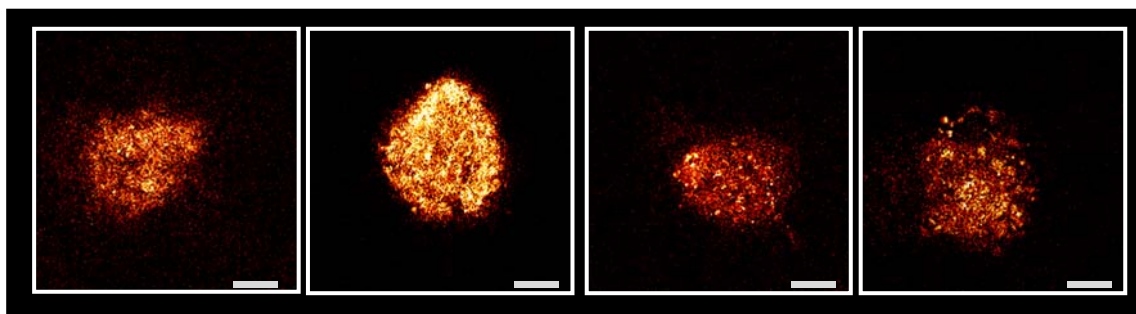


Abbildung 5.14: Bildung von NO in mit L-NAME (100 μ M) behandelten und gedehnten EBs und den respektiven Kontrollen. Die am dritten Tag auf Membranböden der Bioflex Platten ausgebrachten EBs wurden 24 h später für 30 min einer 10%igen Dehnung ausgesetzt. Die Bildung des NO wurde mit dem Fluoreszenzindikator DAF-FM DA bestimmt. Der NOS-Inhibitor L-NAME (100 μ M) wurde 2 h vor der Zugbelastung zugegeben. ($n=4$; *** $p<0.001$; ### $p<0.001$; * $p<0.05$) (Balken entspricht 300 μ M)

Die Behandlung der EBs mit L-NAME hatte eine Reduktion des gebildeten NO zur Folge. Die so behandelten EBs zeigten eine signifikant geringere NO-Bildung ($53 \pm 11\%$) als die normierte und unbehandelte Kontrolle ($100 \pm 12\%$) auf. Dagegen kam es durch die mechanische Zugbelastung über einen Zeitraum von 30 min zu einem deutlich signifikanten Anstieg des gemessenen NO ($215 \pm 33\%$) im Vergleich zur Kontrolle. Eine Behandlung der EBs mit dem NOS Inhibitor konnte diesen Effekt aufheben. Diese EBs wiesen nach der Dehnung mit $99 \pm 12\%$ eine NO-Bildung auf, die dem Kontrollniveau entsprach und somit signifikant unter dem der unbehandelten aber gedehnten Proben lag.

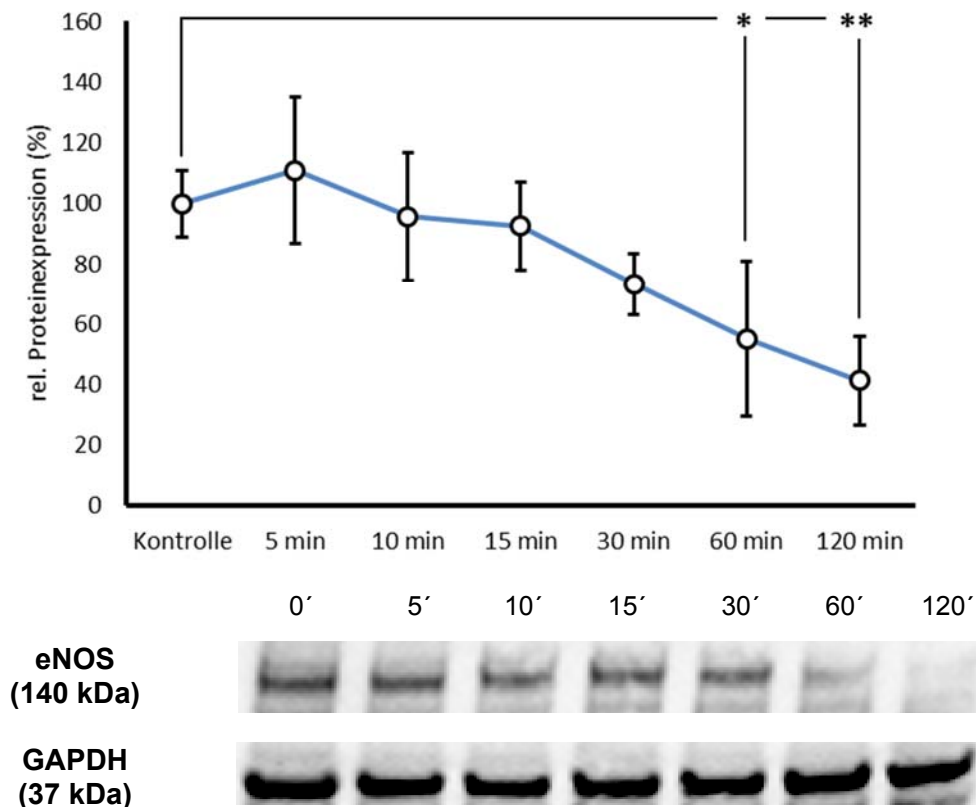


Abbildung 5.15: Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der endothelialen NO Synthase (eNOS / NOS III) während mechanischer Zugbelastung und Vorbehandlung mit L-NAME. Von vier Tage alten EBs wurden an den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min der mechanischen Zugbelastung Proben genommen und im Western Blot der Grad der Phosphorylierung der eNOS analysiert. ($n=3$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$)

Durch die Inkubation von EBs mit dem NOS Inhibitor L-NAME konnte der zuvor beobachtete Effekt der ansteigenden Phosphorylierung der eNOS während der 10% Dehnung aufgehoben werden. Wie in Abbildung 5.15 zu erkennen ist, steigt der Phosphorylierungsgrad der NOS III kaum über das Ausgangsniveau der normierten Kontrolle an. Im Verlauf der Stressapplikation sinkt die Phosphorylierung deutlich unter den Wert der Kontrolle. Diese erreicht bei 60 und 120 min Zugbelastung mit $55 \pm 26\%$ bzw. $41 \pm 14\%$ einen signifikant geringeren Wert im Vergleich zur normierten Kontrolle ($100 \pm 11\%$).

Das Radikal NO hat, wie in Kapitel 1.9 beschrieben, pro-angiogene Wirkung. Aus den vorliegenden Daten ist ersichtlich, dass die in Folge der Zugbelastung ansteigende NO-Bildung durch eine Inkubation der EBs mit L-NAME gehemmt werden kann. Daher sollte ein möglicher Einfluss einer solchen Behandlung auf die Vaskularisierung von EBs untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden EBs, die am dritten Kulturtag auf elastische Membranen ausgebracht und 24 h später der Zugbelastung zugeführt wurden, zuvor entsprechend mit L-NAME behandelt. Im Anschluss wurden die EBs für weitere vier Tage in Kultur belassen und

dann auf den endothelialen Marker CD31 immunhistochemisch gefärbt.

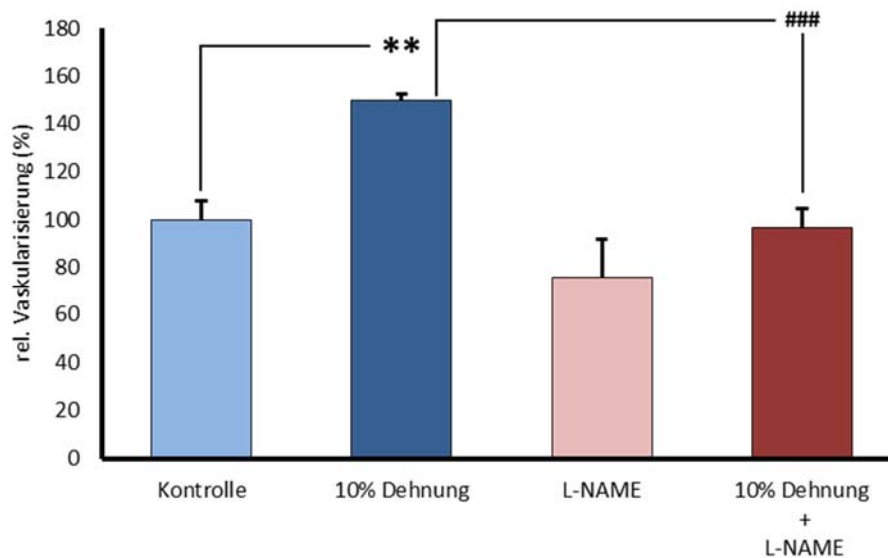
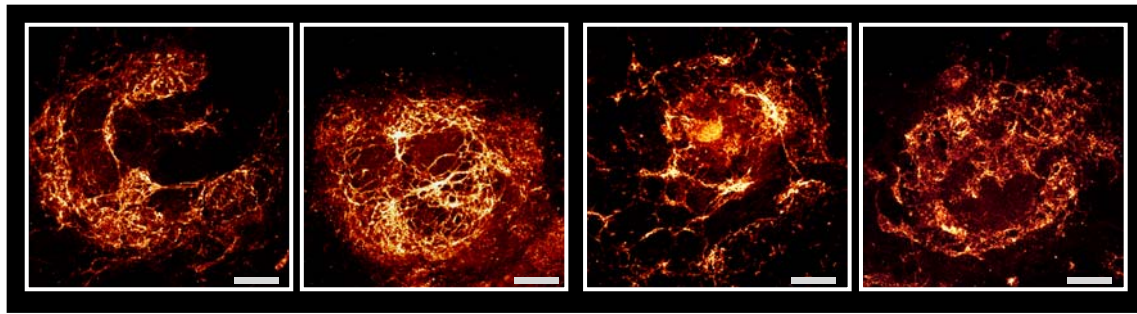


Abbildung 5.16: Vaskularisierung in EBs an Tag 8 der Differenzierung nach 2 h mechanischer Zugbelastung unter dem Einfluss des NOS Inhibitors L-NAME (100 μ M). EBs wurden am 4. Tag der Differenzierung 2 h einer 10% mechanischen Zugbelastung ausgesetzt. 2 h vor der Stressapplikation wurde dem Differenzierungsmedium der NOS Inhibitor L-NAME (100 μ M) zugegeben. ($n=3$; ### $p<0.001$; ** $p<0.01$) (Balken entspricht 300 μ m).

Der in den vorausgegangenen Versuchen aufgezeigte Einfluss des NOS Inhibitors zeigte sich in ähnlicher Form auch mit Blick auf die Vaskularisierung. Dabei lag der Vaskularisierungsgrad der mit L-NAME behandelten EBs mit $76 \pm 16\%$ unter dem der normierten Kontrolle ($100 \pm 8\%$). In der Gruppe von EBs, die vor der Stressapplikation mit L-NAME inkubiert wurden zeigte die Vaskularisierung mit $97 \pm 8\%$ in etwa Kontrollniveau. Damit lag die Gefäßbildung signifikant unter dem der ausschließlich gedehnten Gruppe ($149 \pm 3\%$).

Die Synthese von NO durch die NOS III ist ein Prozess, der durch intrazelluläres Kalzium befördert werden kann. So hat der Anstieg des intrazellulären Kalziums zur Folge, dass die Bindung von Calmodulin aufgehoben und die NOS III Aktivität erhöht wird (Balligand et al 2009). Dies im Zusammenhang mit den bisherigen Ergebnissen zur Bedeutung des Kalziums

während der Zugbelastung betrachtet, wirft die Frage auf, inwiefern das durch die Dehnung ansteigende intrazelluläre Kalzium für die Bildung von NO im hier verwendeten EB-Modell von Bedeutung ist.

Daher wurde in mit BAPTA-AM behandelten EBs die NO-Bildung unter dem Einfluss der mechanischen Zugbelastung gemessen. Dafür wurde der Zeitpunkt 30 min zur Messung des NO gewählt da es, wie in Abbildung 5.12 dargestellt, hier zum Maximum der NO-Bildung während der Zugbelastung kommt.

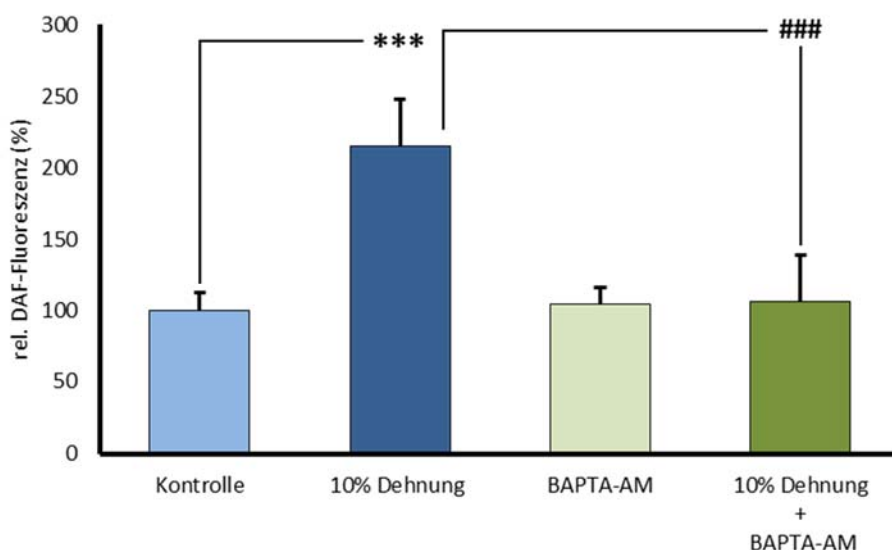
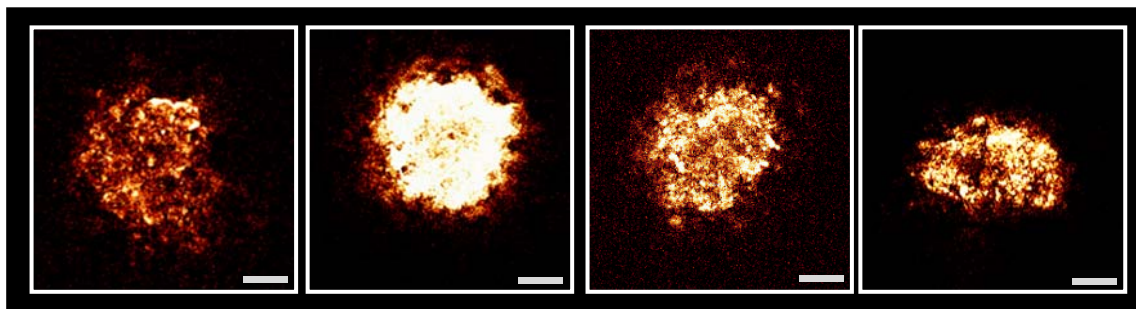


Abbildung 5.17: Bildung von NO in mit BAPTA-AM (10 μ M) behandelten EBs und den respektiven Kontrollen. Die Stressapplikation erfolgte 24 h nach dem Ausbringen auf die elastischen Silikonmembranböden von Bioflex Platten. Die Dehnung betrug 10 % für 30 min. Die Bildung des NO wurde durch den Fluoreszenzindikator DAF-FM DA bestimmt. Der NOS-Inhibitor L-NAME (100 μ M) wurde 2 h vor der Zugbelastung zugegeben. ($n=4$; *** $p<0.001$; ### $p<0.001$) (Balken entspricht 300 μ M)

Die Dehnung der EBs hatte den bereits in Abbildung 5.12 dargestellten Effekt auf die NO Bildung zur Folge. So stieg der NO Gehalt in den EBs, die für 30 min der Zugbelastung ausgesetzt waren, deutlich an und war mit $215 \pm 33\%$ signifikant höher als in der normierten Kontrolle ($100 \pm 12\%$). Dieser Effekt konnte durch die vorherige Behandlung der EBs mit dem Kalziumchelator BAPTA-AM vollständig aufgehoben werden. So behandelt lag das

gemessene NO mit $106 \pm 34\%$ signifikant unter dem gemessenen Wert der ausschließlich gedehnten EBs. In den Proben, die nicht der Stressapplikation zugeführt, aber mit BAPTA-AM behandelt wurden, konnte kein Effekt auf die NO-Bildung festgestellt werden.

Wie oben dargestellt, hat BAPTA-AM in EBs eine hemmende Wirkung auf die durch die Zugbelastung induzierte NO-Bildung. Da in den vorhergegangenen Untersuchungen ein Einfluss der Dehnung der EBs auf die Aktivität der eNOS aufgezeigt werden konnte, sollte dies in mit dem Kalziumchelator behandelten Proben analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden Proteinproben von mit BAPTA-AM behandelten und gedehnten EBs an unterschiedlichen Zeitpunkten der Stressapplikation genommen.

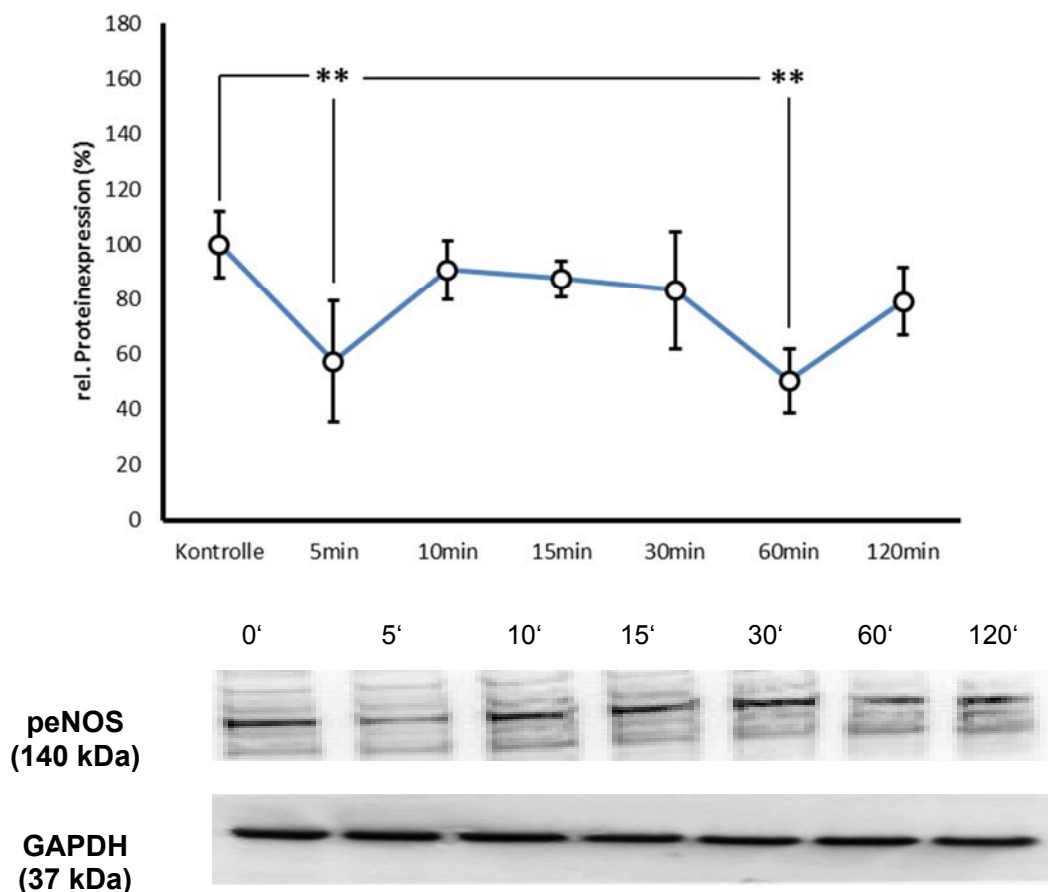


Abbildung 5.18: Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der endothelialen NO Synthase (eNOS / NOS III) während mechanischer Zugbelastung in Anwesenheit von BAPTA-AM (10 μ M). Von vier Tage alten EBs wurden an den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min der mechanischen Zugbelastung Proben genommen und im Western Blot der Grad der Phosphorylierung der eNOS analysiert. ($n=3$; ** $p<0.01$)

Die Analyse der durchgeführten Western Blots zum Phosphorylierungsgrad der NOS III zeigte, dass dieser nach einer Behandlung mit BAPTA-AM während der Zugbelastung stets in etwa auf der Höhe des normierten Kontrollniveaus befindet. Dabei konnte an den Zeitpunkten 5 min

und 60 min der Dehnung eine signifikant reduzierte Phosphorylierung der NOS III im Vergleich zum Ausgangspunkt bei 0 min festgestellt werden.

5.6 Auswirkungen mechanischer Zugbelastung auf die Expression proangiogener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren.

Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, zählen Wachstumsfaktoren zu den für die Vaskulogenese wichtigsten Molekülen. Mit Blick auf die bis hierher erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die Differenzierung embryonaler Stammzellen und die Bildung von Gefäßstrukturen in Folge der Auswirkung mechanischen Stresses, sollte ein möglicher Effekt auf die Expression proangiogener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren untersucht werden. Dabei wurde vor allem die Bedeutung des durch die Dehnung ansteigenden intrazellulären Kalziums untersucht. Im Einzelnen wurde die Proteinexpression der Wachstumsfaktoren PDGF-BB, bFGF/FGF2 und VEGF₁₆₅, sowie die des VEGF-Rezeptors 1 (Flk-1) analysiert.

Die im Western Blot gewonnen Ergebnisse zeigten, dass die Expression der hier untersuchten Wachstumsfaktoren durch die Zugbelastung gesteigert wird, und dass dabei der Grad der Beeinflussung zwischen den verschiedenen Faktoren unterschiedlich ist. Die Behandlung der EBs mit BAPTA-AM hatte ebenfalls differentielle Auswirkungen auf die Proteinexpression.

Zur Analyse der Proteine wurden die EBs 24 h nach dem Ausbringen auf die elastischen Membranböden von Bioflexplatten, entsprechend des in Tabelle 5.1 beschriebenen Versuchsdesigns, behandelt.

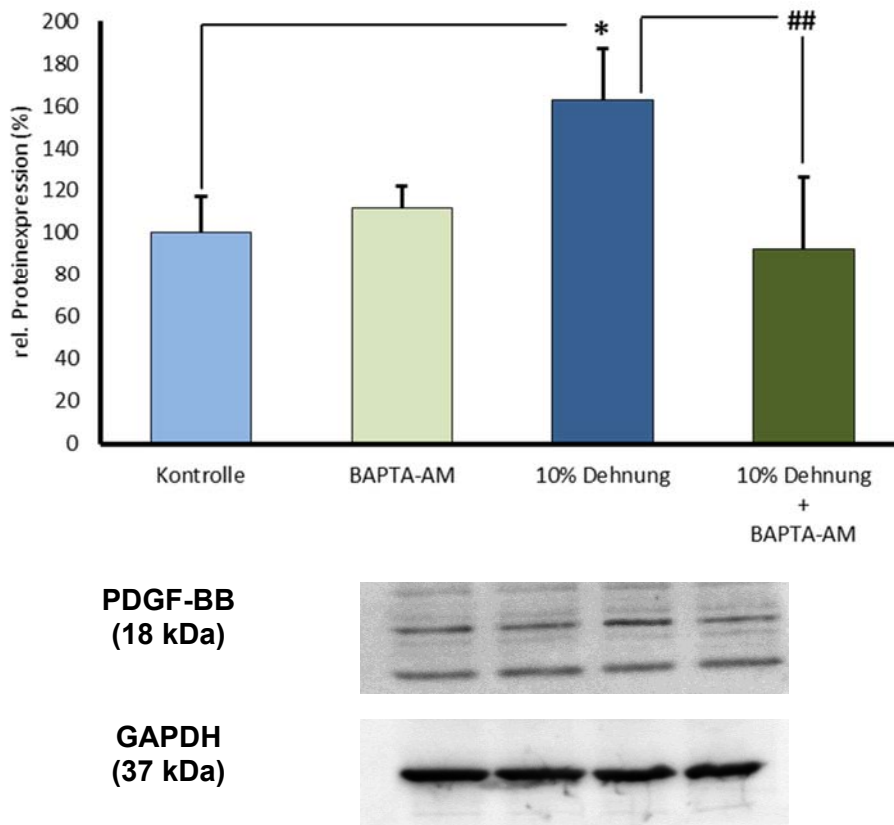


Abbildung 5.19: Expression von PDGF-BB, 24 h nach der Applikation von mechanischem Stress und der Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). Von EBs, die am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt worden waren, wurden 24 h später Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; * $p<0.05$; ## $p<0.01$)

Wie in Abbildung 5.19 dargestellt, wurde die Expression von PDGF-BB in EBs durch das Einwirken der mechanischen Zugbelastung gesteigert. Die Dehnung der EBs führte dazu, dass die Proteinexpression von PDGF-BB, verglichen mit der normierten Kontrolle ($100 \pm 17\%$), signifikant auf $162 \pm 24\%$ anstieg. Wurden EBs vor der Stressapplikation mit BAPTA-AM behandelt, konnte der zuvor beobachtete Effekt gehemmt werden. Die Analyse der PDGF-BB Expression in dieser Gruppe zeigt, mit $93 \pm 34\%$ ein signifikant geringeres Niveau als durch die Dehnung allein. Eine Chelatierung des intrazellulären Kalziums mit BAPTA-AM ohne zusätzliche Dehnung hatte dagegen keine signifikante Auswirkung ($112 \pm 10\%$) auf die PDGF-BB Expression in den EBs.

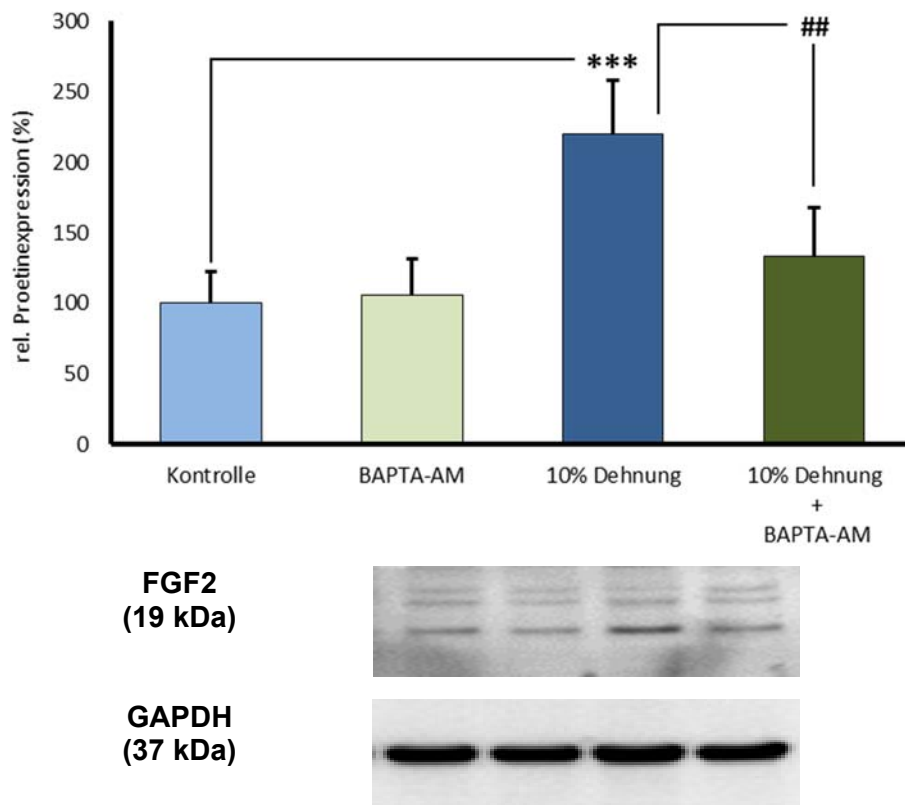


Abbildung 5.20: Expression von FGF2, 24 h nach Applikation von mechanischem Stress und der Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). Von EBs, die am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt worden waren, wurden 24 h später Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; *** $p<0.01$; ## $p<0.01$)

Die Applikation von 10% mechanischer Zugbelastung hat zur Folge, dass 24 h nach der Dehnung die Expression von FGF2 im Vergleich zur normierten Kontrolle signifikant erhöht ist. So stieg die Expressionsrate in der gedehnten Probe auf $220 \pm 38\%$ gegenüber der Kontrolle ($100 \pm 22\%$). Die Behandlung der EBs mit BAPTA-AM hatte keinen Einfluss auf die Expression ($105 \pm 26\%$). In BAPTA-AM behandelten EBs, die zusätzlich der mechanischen Zugbelastung ausgesetzt waren, stieg die FGF2 Expression auf $133 \pm 35\%$. Dies ist verglichen mit der unbehandelten aber gedehnten Probe ein signifikant geringerer Anstieg der Expression. Gegenüber der gänzlich unbehandelten Kontrolle wurden keine signifikant Veränderungen der FGF2 Expression beobachtet.

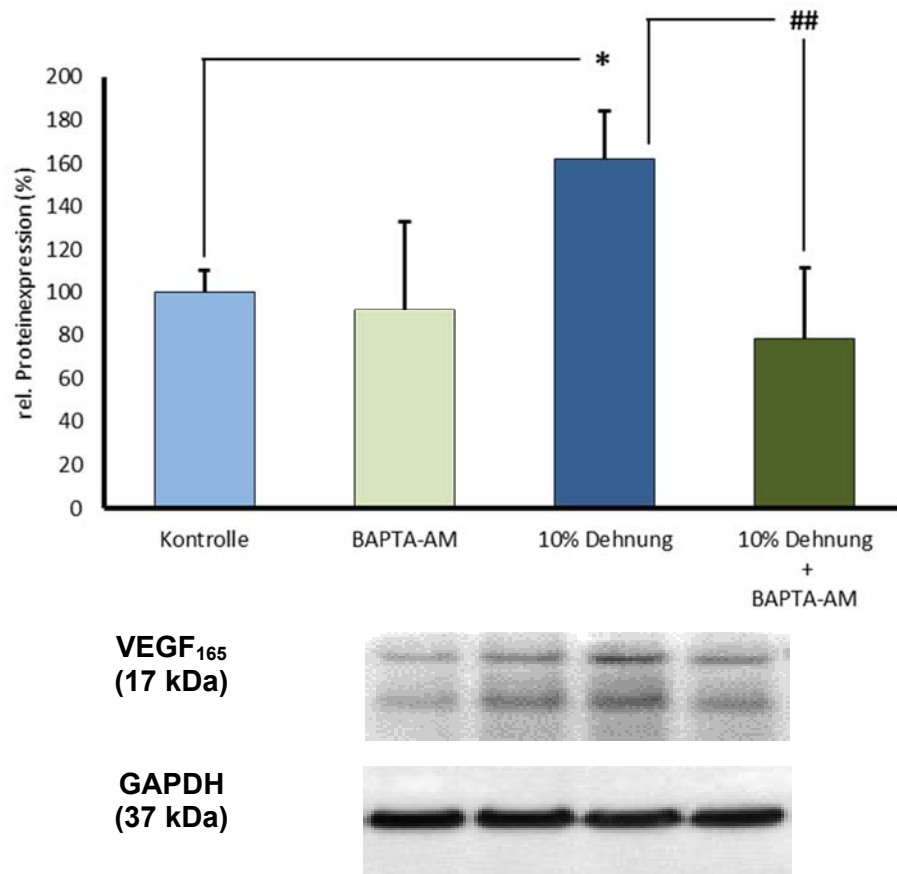


Abbildung 5.21: Expression von VEGF₁₆₅, 24 h nach der Applikation von mechanischem Stress und der Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). Von EBs, die am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt worden waren, wurden 24 h später Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; * $p<0.05$; ## $p<0.01$)

Durch die Dehnung der EBs kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression des VEGF₁₆₅ ($162 \pm 22\%$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($100 \pm 10\%$). Dieser Effekt konnte durch den intrazellulären Kalzium Chelator BAPTA-AM aufgehoben werden ($78 \pm 33\%$). In der Gruppe der nicht gedehnten EBs hatte eine Inkubation mit BAPTA-AM dagegen keinen Einfluss auf die Proteinexpression ($92 \pm 42\%$).

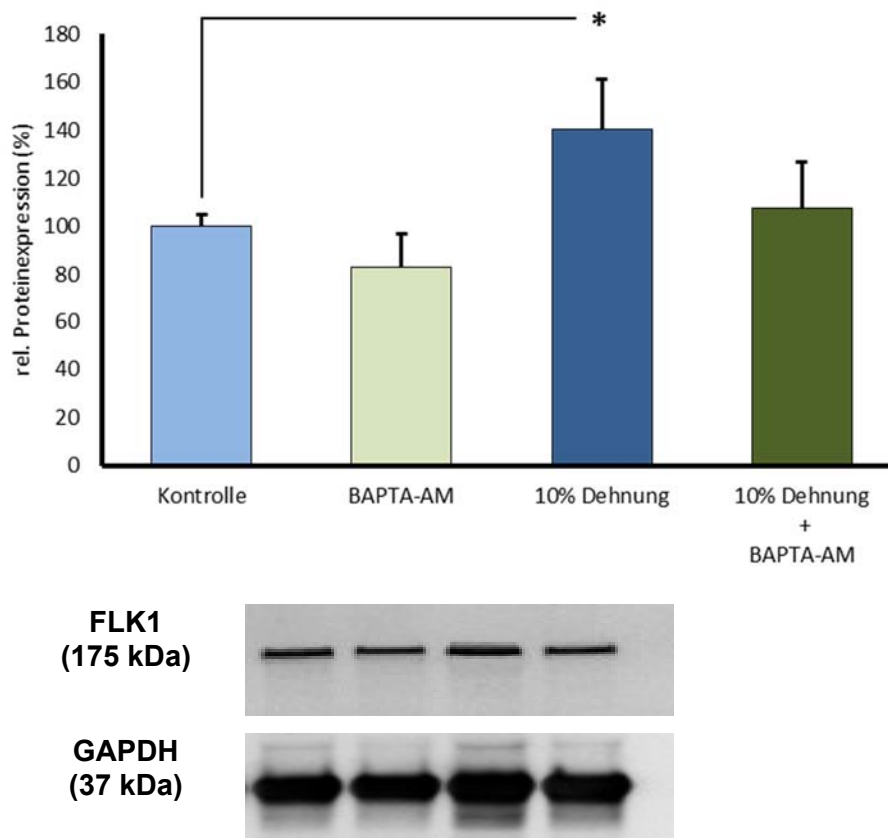


Abbildung 5.22: Expression von Flk1, 24 h nach der Applikation von mechanischem Stress und der Behandlung mit BAPTA-AM (10 μ M). Von EBs, die am dritten Differenzierungstag auf Silikonmembranen ausgebracht und am darauf folgenden Tag mit BAPTA-AM, mechanischem Stress bzw. einer Kombination aus beidem behandelt worden waren, wurden 24 h später Proteinproben genommen und im Western Blot analysiert. ($n=4$; * $p<0.05$)

Die Expression des VEGF-Rezeptors Flk-1 wurde durch die Stressapplikation gesteigert, wohingegen die Inkubation mit BAPTA-AM keinen signifikanten Einfluss zeigte. So lag die gemessene Flk-1 Expression in den Proben die der Dehnung ausgesetzt waren, mit $140 \pm 21\%$ signifikant über dem Wert der normierten Kontrolle ($100 \pm 5\%$). Die Chelatierung des intrazellulären Kalziums hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Flk-1 Expression (BAPTA-AM $83 \pm 14\%$; 10% Dehnung + BAPTA-AM $108 \pm 19\%$)

Die aus der Western Blot Analyse gewonnenen Resultate über die Expression der Wachstumsfaktoren und des VEGF-Rezeptors Flk-1 mit mechanischer Zugbelastung sollten in Bezug auf die Differenzierung und Vaskularisierung der EBs weiter untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden EBs 2 h vor der Stressapplikation mit dem Rezeptor Tyrosin-Kinase Inhibitor SU5614 behandelt. Nach der mechanischen Zugbelastung wurden die Zellen für weitere vier Tage in Kultur gehalten, am achten Tag der Differenzierung für die immunhistochemische Untersuchung der endothelialen Differenzierung und Vaskularisierung fixiert und auf den endothelialen Marker CD31 hin untersucht.

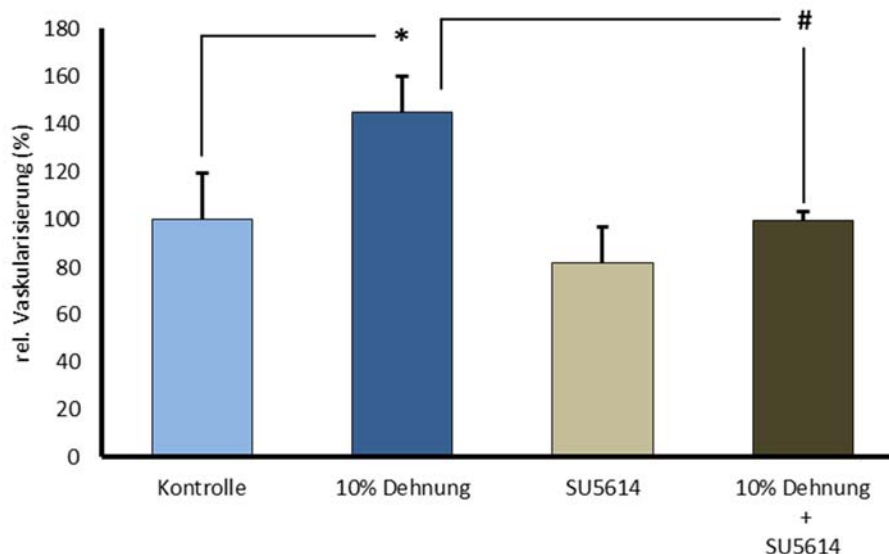
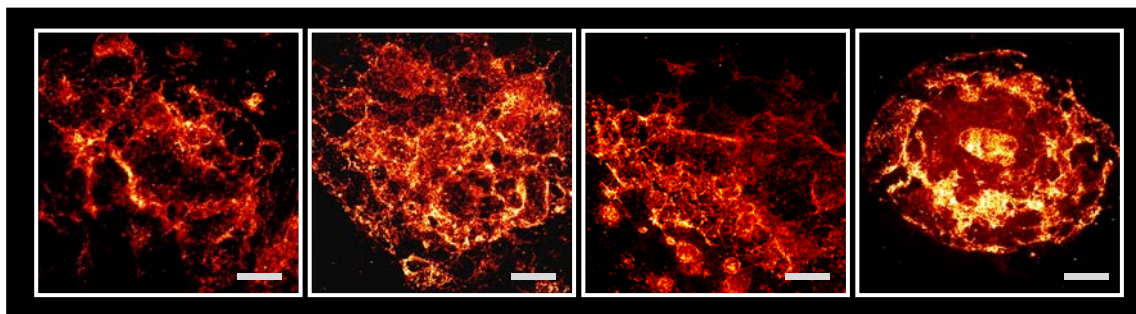


Abbildung 5.23: Vaskularisierung von EBs am achten Tag der Differenzierung nach Behandlung mit dem selektiven Flk-1 Inhibitor SU5614 (1 μ M) und mechanischer Zugbelastung. EBs wurden am 4. Tag der Differenzierung 2 h 10% mechanischer Zugbelastung ausgesetzt. 2 h vor der Stressapplikation wurde dem Differenzierungsmedium der Flk-1 Inhibitor SU5614 (1 μ M) zugegeben. ($n=4$; *** $p<0.001$; ## $p<0.01$) (Balken entspricht 300 μ m).

Die Inhibierung des Flk-1 Rezeptors hatte zur Folge, dass der durch die Dehnung beobachtete Effekt auf die Vaskularisierung aufgehoben wurde. Dabei lag der Grad der Vaskularisierung in der Gruppe der nicht gedehnten EBs unterhalb der Kontrolle (Kontrolle $100 \pm 19\%$; SU5614 $82 \pm 15\%$). Durch die Stressapplikation stieg die Vaskularisierung signifikant auf $145 \pm 15\%$ an. Dieser Effekt konnte durch den Inhibitor SU5614 aufgehoben werden. In den so behandelten und gedehnten EBs kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einem Vaskularisierungsgrad von $100 \pm 3\%$ was in etwa dem Niveau der Kontrolle entspricht und somit signifikant unter dem Wert der ausschließlich gedehnten Probe lag.

5.7 Aktivierung von PI3-Kinase, ERK und JNK während der mechanischen Zugbelastung.

Im Allgemeinen werden die auf Zellen von außen einwirkenden Signale nach ihrer Rezeption

umgewandelt und nach intrazellulär weitergeleitet. Dort erfolgt dann eine Antwort auf das jeweils eingegangene Signal, wobei es hier auch zu einer Verknüpfung mehrerer Signale oder aber die Verstärkung des Ursprungssignals kommen kann. Dabei sind am Prozess der Umwandlung und Weiterleitung des Eingangssignals eine Vielzahl von nachgeschalteten Molekülen und Enzymen beteiligt.

Durch die mechanische Zugbelastung werden die Zellen der EBs einem Reiz ausgesetzt, der nachfolgende Signalkaskaden aktiviert. Es wurde daher im Weiteren untersucht wie sich dieser Reiz auf die Signalwege der PI3-Kinase und MAP-Kinasen (ERK und JNK) auswirkt.

5.7.1 Bedeutung der PI3-Kinase für Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung.

Der PI3-Kinase Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege zur Modulierung des Zellwachstums, der Proliferation und der Migration. So konnte eine Beteiligung dieses Signalweges an der tumorinduzierten Angiogenese durch eine erhöhte Aktivität der PI3-Kinase und der weiteren Komponenten bereits dargelegt werden (Knowles et al 2009). Daher sollte in dem hier verwendeten EB-Modell untersucht werden, inwieweit es zu einer Beteiligung dieses Signalweges bei der Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung induzierten kommt.

Die Aktivität der PI3-Kinase wurde anhand ihres Phosphorylierungszustandes im Verlauf der Dehnung der EBs untersucht. Dazu wurde im Western Blot Verfahren die Phosphorylierung an unterschiedlichen Zeitpunkten der zweistündigen Stressapplikation analysiert.

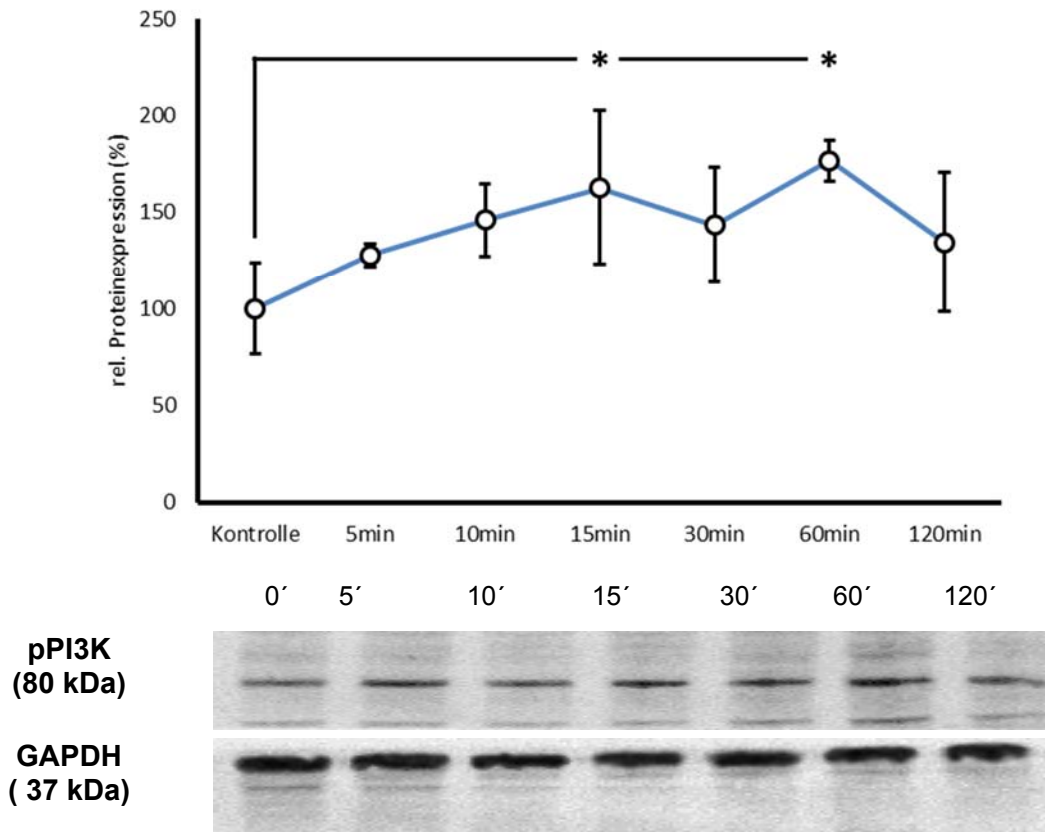


Abbildung 5.24: Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der PI3-Kinase während mechanischer Zugbelastung. Von vier Tage alten EBs wurden an den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min der mechanischen Zugbelastung Proben genommen und im Western Blot der Grad der Phosphorylierung der PI3-Kinase analysiert. ($n=3$; * $p<0.05$)

Wie in Abbildung 5.24 zu erkennen ist, hatte die Zugbelastung der EBs einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität der PI3-Kinase. So kommt es im Verlauf der Stressapplikation zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung. Dieser Anstieg erreicht an den Zeitpunkten 15 min mit $163 \pm 40\%$ und 30 min mit $177 \pm 11\%$ im Vergleich zur Kontrolle ($100 \pm 24\%$) signifikant erhöhte Werte.

Die Applikation der mechanischen Zugbelastung hatte, wie in den Ergebnissen in Abbildung 5.24 dargestellt und beschrieben, einen positiven Effekt auf die Aktivität der PI3-Kinase. Im weiteren Verlauf sollte daher analysiert werden, ob dieser Effekt unter Verwendung des Inhibitors LY249002 beeinflusst werden kann. Dazu wurden die EBs zwei Stunden vor der Dehnung mit $20 \mu\text{M}$ des Inhibitors inkubiert.

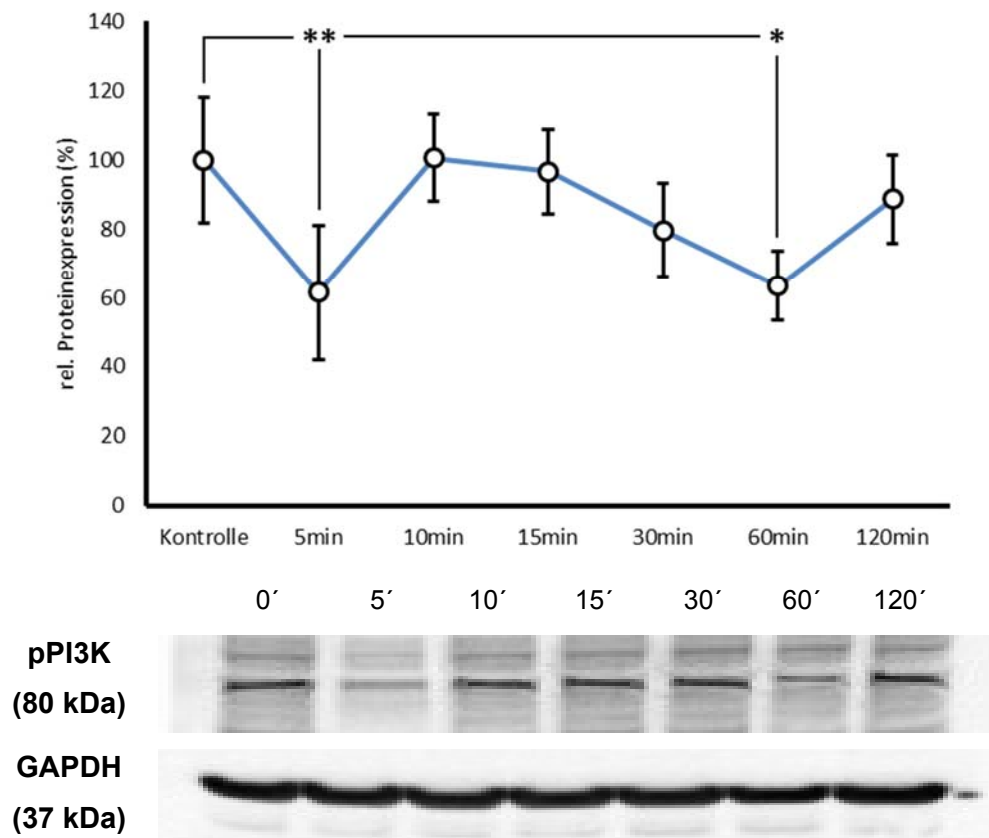


Abbildung 5.25: Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) während der mechanischer Zugbelastung unter Einfluss der Inhibitors LY249002 (20 μ M). Von vier Tage alten EBs wurden an den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min der mechanischen Zugbelastung Proben genommen und im Western Blot der Grad der Phosphorylierung der PI3-Kinase analysiert. ($n=4$; ** $p<0.01$ * $p<0.05$)

Eine Behandlung der EBs mit LY249002 (20 μ M) hatte im Verlauf der Zugbelastung einen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung der PI3-Kinase. So war in den so behandelte EBs die Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle ($100 \pm 18\%$) mit $62 \pm 20\%$ signifikant verringert. Im weiteren Verlauf erreichte der Phosphorylierungsgrad den Ausgangswert der Kontrolle, sank dann aber wieder ab. Am Zeitpunkt 60 min kam es erneut zu einem signifikant geringeren Phosphorylierungsgrad ($64 \pm 10\%$) der PI3-Kinase.

Die Zugbelastung, der die EBs ausgesetzt waren, wirkte sich wie im Western Blot dargestellt, positiv auf die PI3-Kinase Aktivität aus. Wohingegen durch die chemische Inhibierung der Kinase dieser Effekt aufgehoben werden konnte. Da bekannt ist, dass dieser Signalweg auch an der Bildung von Gefäßen beteiligt ist, ergab sich die Frage nach dessen Bedeutung für die durch die Zugbelastung induzierte Vaskulogenese. Daher wurden die EBs entsprechend dem zweifaktoriellen Versuchsdesign (Tabelle 5.1) mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 (20 μ M) behandelt und anschließend die Gefäßbildung an Tag 8 durch immunhistochemische Färbung

gegen den Endothelmarker CD31 analysiert.

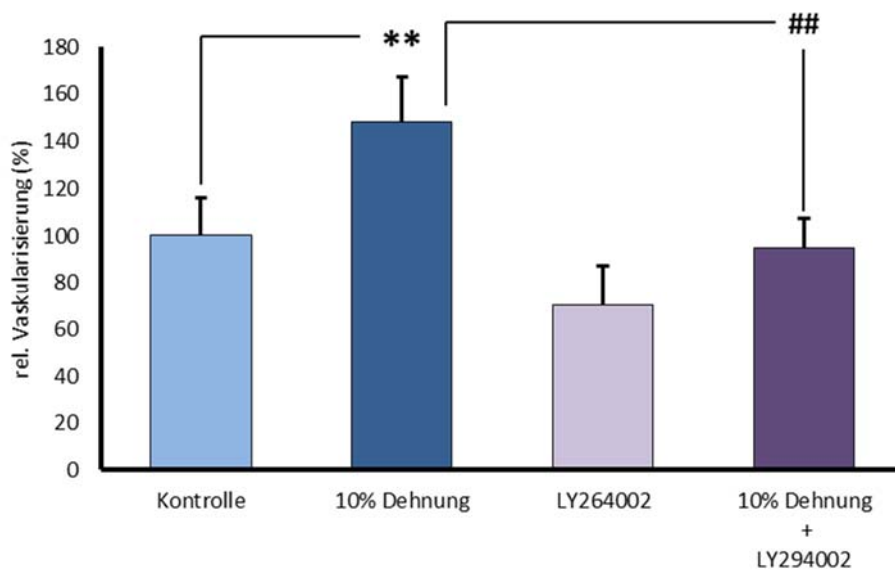
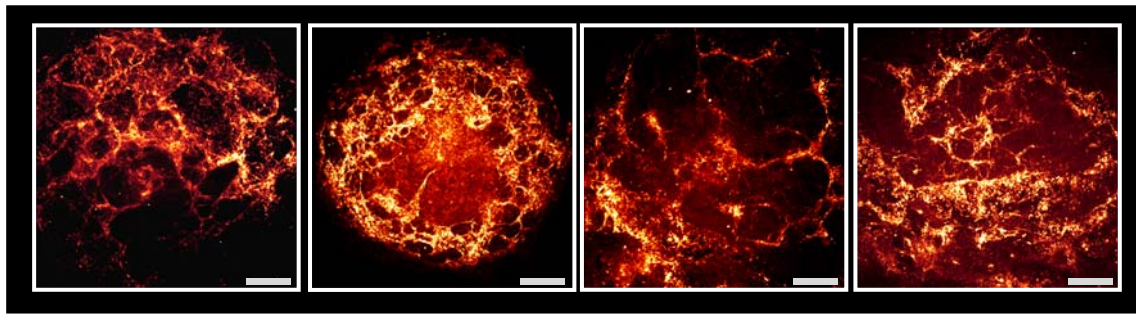


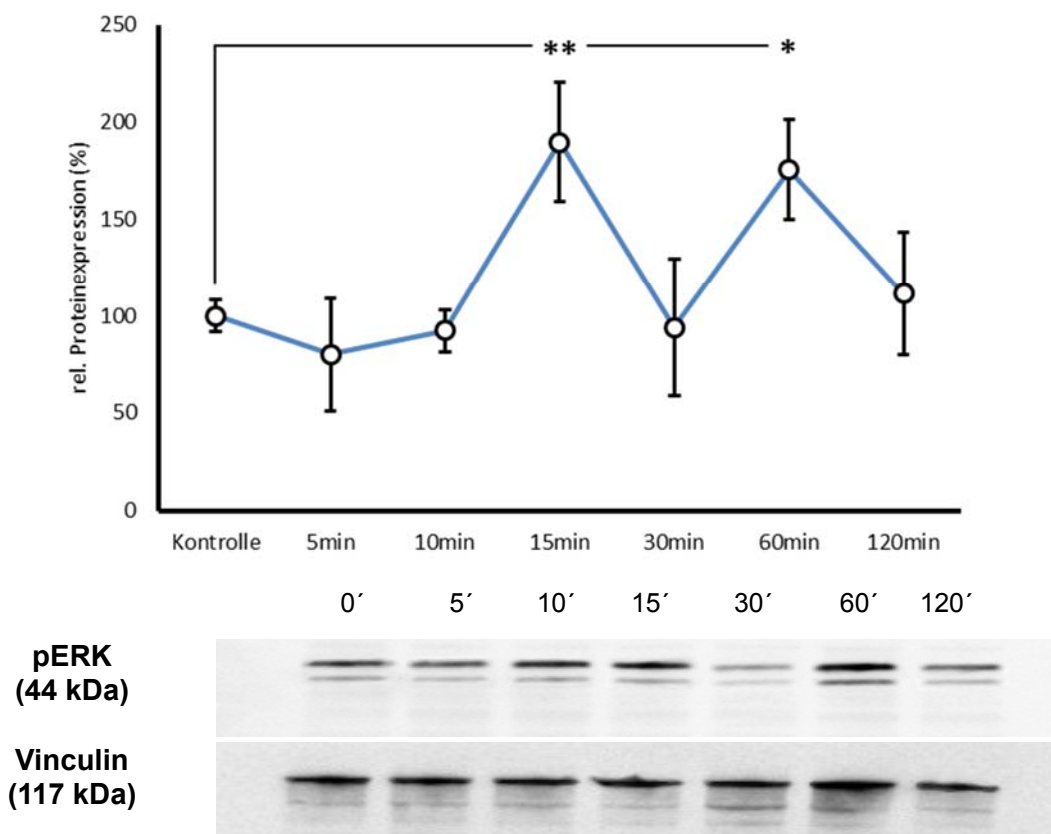
Abbildung 5.26: Vaskularisierung in EBs an Tag 8 der Differenzierung nach 2 h mechanischer Zugbelastung unter dem Einfluss des PI3-Kinase Inhibitors LY249002 (20 μ M). EBs wurden am 4. Tag der Differenzierung 2 h 10% mechanischer Zugbelastung ausgesetzt. 2 h vor der Stressapplikation wurde dem Differenzierungsmedium der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 (20 μ M) zugegeben. ($n=4$; ** $p<0.01$; ## $p<0.01$) (Balken entspricht 300 μ m).

Wie in Abbildung 5.27 zu erkennen ist, hatte die chemische Inhibierung der PI3-Kinase Einfluss auf die Bildung der Gefäßstrukturen in den EBs und konnte den durch die mechanische Zugbelastung induzierten Anstieg der Vaskularisierung aufheben. So wurde in den Gruppen, die nicht der Dehnung ausgesetzt waren, eine geringere Gefäßbildung nach der Behandlung mit LY294002 beobachtet ($70 \pm 17\%$) als in der Kontrolle ($100 \pm 16\%$). Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. Die Zugbelastung dagegen hatte einen signifikanten Anstieg der Vaskularisierung zur Folge ($148 \pm 19\%$), dieser Effekt konnte durch eine Behandlung der EBs mit dem PI3-Kinase Inhibitor aufgehoben werden. So behandelt und gedehnt lag die Gefäßbildung mit $95 \pm 12\%$ in etwa auf Kontrollniveau und somit signifikant unter dem Wert der ausschließlich gedehnten Gruppe.

5.7.2 Einfluss der mechanischen Zugbelastung auf die Aktivität der MAP-Kinasen ERK und JNK

Die Kinasen ERK und JNK werden durch ein breites Spektrum von Signalen aktiviert. Dabei erfolgt die Phosphorylierung durch Kinasen, die innerhalb des Signalweges stromaufwärts liegen. Durch die Phosphorylierung von ERK und JNK akkumulieren diese im Zellkern, wo es in der Folge zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommt. Dies erbringt dann die zelluläre Antwort auf den aufgenommenen und durch die Signalkaskade weitergeleiteten Stimulus. Beide Kinasen sind dabei an zellulären Prozessen wie etwa der Proliferation und der Differenzierung beteiligt (Binétruy et al 2006).

a)



b)

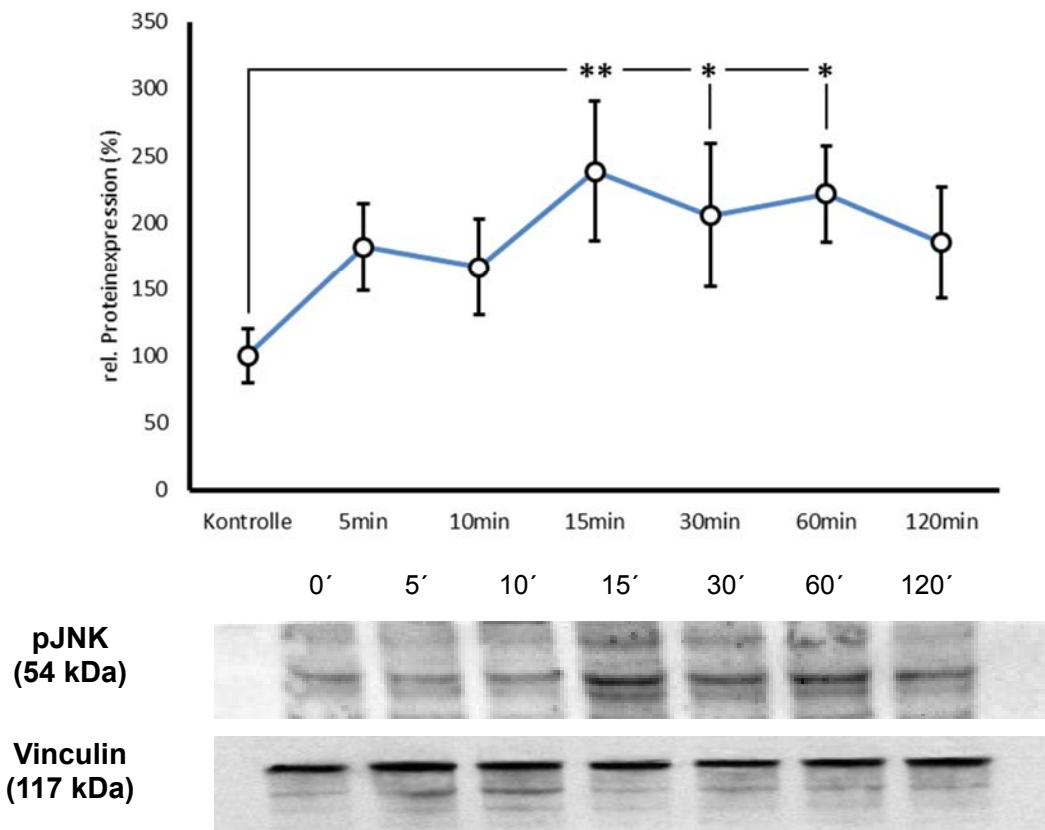


Abbildung 5.27: Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der a) extrazellulären Signal regulierten Kinase (ERK) und b) c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) während mechanischer Zugbelastung. Von vier Tage alten EBs wurden an den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min der mechanischen Zugbelastung Proben genommen und im Western Blot der Grad der Phosphorylierung der Kinasen ERK und JNK analysiert. ($n=3$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$)

Die Phosphorylierung der beiden hier untersuchten Kinasen stieg im Verlauf der Dehnung wie in den Abbildung 5.27 a) und b) dargestellt, signifikant an. So kam es durch die Applikation der mechanischen Zugbelastung an zwei Zeitpunkten zu einem Anstieg in der Phosphorylierung der ERK. Die Analyse im Western Blot ergab, dass zum einem nach 15 min Dehnung der Phosphorylierungsgrad mit $190 \pm 31\%$ im Vergleich zur Kontrolle ($100 \pm 8\%$) signifikant erhöht vorlag. Des Weiteren gab es auch am Zeitpunkt 60 min einen gemessenen Anstieg, der mit $175 \pm 26\%$ ebenfalls signifikant über der Kontrolle lag.

Zudem hatte die mechanische Zugbelastung auch auf die Phosphorylierung der JNK eine positive Wirkung. So stieg im Verlauf der Dehnung der Phosphorylierungsgrad der JNK an und erreichte am Zeitpunkt 15 min mit $238 \pm 52\%$ einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zur Kontrolle ($100 \pm 20\%$). Im weiteren Verlauf der Stressapplikation verblieb die Phosphorylierung auf signifikant erhöhtem Niveau. So lag diese am Zeitpunkt 30 min bei $205 \pm 53\%$ und bei 60

min bei $222 \pm 36\%$.

6 Diskussion

Vaskulo- und Angiogenese stellen in vielen entwicklungsbiologischen Prozessen, aber auch im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen, zentrale und wichtige Ereignisse dar. So ist die Gefäßbildung im Zuge der frühen Embryogenese von essentieller Bedeutung, während sie bei Vaskulogeneseassoziierten Erkrankungen zur Ausprägung oder Intensivierung einer Krankheit führt. Dabei muss zwischen einem aggressiven Wachstum von Gefäßen (Krebs, diabetische Retinopathie) (Carmeliet 2000, Griffioen 2000, Nonaka et al 2002, Papetti 2002) und einer unzureichenden Gefäßbildung (chronische Wundheilstörung, Vernarbung nach Herzinfarkt) (Ferrara 1999, Lauer et al. 2000) unterschieden werden. Zusätzlich spielt die Angiogenese in der Biomedizin eine wichtige Rolle, z.B. bei der Versorgung von transplantierten Geweben (Shiu et al 2005). Es ergibt sich somit vor allem für die Entwicklung von Strategien zur Behandlung, Kontrolle oder Förderung der Vaskulogenese im Rahmen pathologischer Prozesse ein besonderes Interesse am Verständnis der Gefäßbildung.

Die Zellen eines Organismus sind häufig physikalischen Kräften ausgesetzt (Shiu et al 2005, Yang et al 2008). Somit zählen mechanische Kräfte neben anderen Faktoren zu den wichtigen Signalgebern in entwicklungsbiologischen Prozessen (Ingber 2006, Mammoto u. Ingber 2010). Die Rolle, die physikalische Kräfte im Rahmen dieser Prozesse einnehmen, ist nicht abschließend geklärt und Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, wie sich die mechanische Dehnung von ES-Zellen auf die Vaskulogenese auswirkt. Zu diesem Zweck wurde das EB-Modell verwendet, da sich dieses durch eine Vielzahl von Eigenschaften als dafür besonders geeignet auszeichnet. Durch die dreidimensionale Struktur der EBs und ihrer, sich im Verlauf der Differenzierung ausbildenden, heterogenen Zellzusammensetzung werden Prozesse der frühen Embryogenese rekapituliert (Doetschman et al 1985). Zusätzlich ermöglicht die Interaktion der verschiedenen Zelltypen innerhalb des Aggregates, aber auch mit der extrazellulären Matrix, die Simulierung physiologischer Prozesse in frühen Embryonen nach der Implantation.

6.1 Mechanische Zugbelastung und intrazelluläres Kalzium

Die hier erhobenen Daten geben einen Einblick in die Prozesse, die durch die Applikation von mechanischer Zugbelastung zur Vaskularisierung von EBs führen. Von Interesse waren dabei zum einen die Expression von Proteinen, die für die Gefäßentwicklung von besonderem Interesse sind und zum anderen die Rolle des intrazellulären Kalziums in Rahmen der zellulären Antwort auf die einwirkenden physikalischen Kräfte.

Extern auf die Zelle einwirkende mechanische Kräfte werden von dieser wahrgenommen und in chemische bzw. biologische Reaktionen umgewandelt (Li et al 2005, Lu u. Kassab 2011). Diese Mechanotransduktion kann in schnelle und langsamere zelluläre Reaktionen unterteilt werden (Shiu et al 2005, Birukov 2009). Die schnelleren Ereignisse, wie etwa die Veränderungen der Zellhomöostase, ereignen sich unmittelbar nach oder während der Reizeinwirkung. Wohingegen die späteren Ereignisse, wie etwa Phosphorylierungen oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, erst Stunden später auftreten.

So konnte als eine der ersten messbaren Reaktionen auf die mechanische Zugbelastung ein deutlicher Anstieg des freien zytosolischen Kalziums in den EBs beobachtet werden. Dass es in Zellen als Folge der Einwirkung von physikalischen Kräften zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums kommen kann, ist weitläufig bekannt (Smith et al 2000, Wall u. Banes 2005, Fanchaouy et al 2007). Die Kalziumsignalgebung in ES-Zellen ist allerdings bisher nicht abschließend charakterisiert. Jedoch sind einige Details zum Eintritt des Kalziums von extrazellulär, sowie die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern in ES-Zellen bekannt. So konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium aus dem ER über InsP3R vermittelt wird, während der Eintritt von Kalzium in die ES-Zellen hauptsächlich über store-operated Ca^{2+} Channels (SOCs), nicht jedoch durch voltage-operated Ca^{2+} Channels (VOCCs), erfolgt (Yanagida et al 2004, Grivennikov 2008).

Der hier ermittelte unmittelbare Anstieg des Kalziums zeigt, dass das von außen auf die Zellen einwirkende Dehnungssignal über das Kalzium nach intrazellulär getragen wird. Als sekundärer Botenstoff wird es in der Zelle nicht verstoffwechselt und nimmt so als Effektormolekül Einfluss auf Prozesse wie Transkription, Wachstum und Proliferation (Chen et al 2011, Berridge et al 2003). Auch für die Differenzierung der ES-Zellen ist die Bedeutung des Kalziums beschrieben. Dies konnte beispielsweise für die Differenzierung von Schrittmacher- und Herzmuskelzellen (Kleger et al 2008, Linask u. Linask 2010), sowie von Neuronen (Leclerc et al 2012) gezeigt werden.

Da es durch die Zugbelastung neben dem Anstieg des intrazellulären Kalziums auch zu einer verstärkten Vaskularisierung in den EBs kam und dieser Effekt durch die Chelatierung des Kalzium mit BAPTA-AM aufgehoben werden konnte, wurde neben der Analyse der Bedeutung der Zugbelastung für die Vaskulogenese auch die Beteiligung des Kalziums näher untersucht.

6.2 Axon-Guidance Proteine und Wachstumsfaktoren in der stressinduzierten Vaskulogenese von ES-Zellen

Der Prozess der Vaskulogenese wird über verschiedene Mediatoren wie etwa

Wachstumsfaktoren und Axon-Guidance Proteine reguliert (Adams u. Eichmann 2010). Letztere können in ihrer Bedeutung für die Gefäßbildung in Gruppen mit einem, attrahierenden, pro-angiogenen und solchen mit einem repulsiven, anti-angiogenen Charakter eingeteilt werden (Herbert u. Stainier 2011). Durch den Anstieg der Vaskularisierung in Folge der Zugbelastung wurde das Expressionsverhalten dieser Proteine auf mögliche Veränderungen hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die mechanische Dehnung einen überwiegend förderlichen Einfluss auf die Expression von pro-angiogenen Faktoren hatte, was mit der verstärkten Vaskularisierung in Zusammenhang gebracht werden kann.

Durch die Zunahme der Expression von Proteinen, die zur charakteristischen molekularen Signatur von Tip-Zellen gehören, zeigte sich, dass die Zugbelastung einen förderlichen Einfluss auf diese für die Vaskularisierung notwendigen Zellen hat. Zu diesen charakteristischen Tip-Zell Proteinen zählen die hier untersuchten Neuropilin1, VEGF-R2 und PDGF-BB (le Noble et al 2008, De Smet 2009, Adams u. Eichmann 2010, Ribatti u. Crivellato 2012). In vorherigen Arbeiten konnte die Bedeutung von Neuropilin1 für die Vaskulogenese bereits dargestellt und in Mutagenese-Versuchen verdeutlicht werden (Cimato et al 2009, Adams u. Eichmann 2010). Diese Versuche zeigten, dass ein Fehlen von Neuropilin1 in Mäusen ein Ausbleiben der Vaskularisierung im Dottersack, sowie der Bildung des primären Plexus zur Folge hatte (Geretti et al 2008). Allerdings war eine endgültige Klärung des genauen Mechanismus zur Signalweiterleitung des Neuropilin1 bisher nicht möglich. Dennoch konnte die Aktivität von Neuropilin1 mit dem VEGF-R2 in Zusammenhang gebracht werden (Herbert u. Strainer 2011). So gilt Neuropilin1 als Co-Rezeptor für VEGF und bildet zusammen mit dem VEGF-R2 einen Komplex aus, der dieses Signal verstärkt (Prud'homme u. Glinka 2012, Geretti et al 2008). Die Bindung von VEGF an Neuropilin1 ist dabei isoformspezifisch. Von den bekannten VEGF-Isoformen ist es vor allem VEGF₁₆₅, das hier bindet. Da es durch die mechanische Zugbelastung zu einer verstärkten Expression des VEGF-R2 und des VEGF₁₆₅ kommen, deutet dies auf die Aktivität des bisher skizzierten Signalwegs des Neuropilin1 hin.

Zusätzlich wurde die Bedeutung des VEGF-R2 für die Vaskularisierung im Rahmen der Dehnung durch die Inhibierung mit SU5614 untersucht. Die Inhibierung des Rezeptors hatte zur Folge, dass die Bindung des VEGF nicht möglich war und keine Anbindung des Co-Rezeptors Neuropilin1 erfolgen konnte. Diese Ergebnisse weisen zusätzlich auf eine Bedeutung der Neuropilin1/VEGF-R2 Interaktion im Rahmen der stressinduzierten Vaskularisierung hin. In Folge der Behandlung konnte der Effekt, den die Zugbelastung auf die Vaskularisierung der EBs hatte, aufgehoben werden.

Mit Blick auf die sich bildenden Verzweigungen war zudem von Bedeutung, dass es durch die Dehnung der EBs zu einem Anstieg der Robo4 Expression kam. Die Rolle und Funktion der Robo-Proteinfamilie ist nicht abschließend geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Kaur et al 2005, Park et al 2003, Dickinson u. Duncan 2010, Marlow et al 2010). Einige Mitglieder dieser Proteinfamilie konnten jedoch genauer charakterisiert und ihren Funktionen in Bezug auf die Angiogenese zugeordnet werden (Zhou et al 2011). So wird Robo4 ausschließlich in Endothelzellen exprimiert (Huminiecki et al 2002, Herbert et al 2008, Legg et al 2008, Zhuang et al 2011) und konnte in den auf die Tip-Zellen folgenden Stalk-Zellen nachgewiesen werden (De Smet et al 2009). Stalk-Zellen verlängern die Sprossung des sich bildenden Gefäßes, stabilisieren dieses und formen schließlich das Lumen. Auf Grund dieser Eigenschaften weisen Stalk-Zellen einen stark proliferativen Charakter auf (Thurston u. Kitajewski 2008). Die verstärkte Expressierung von Robo4 weist daher auf einen Zunahme der Stalk-Zell-Aktivität und so auch auf ein verstärktes Auswachsen der sich bildenden Gefäße hin. Als weiteren Hinweis auf diesen Vorgang kann die Expression von FGF2 angesehen werden, die sich nach mechanischer Dehnung erhöhte. Für die Vaskulogenese im Allgemeinen scheint FGF2 nicht von entscheidender Bedeutung zu sein. So wurde gezeigt, dass das Gefäßsystem in FGF2 defizienten Mäusen normal ausgeprägt war (Quinn et al 2002). Neueren Erkenntnissen nach kommt dem FGF2 jedoch eine Bedeutung in Bezug auf die Stalk-Zellen zu. Hier ist es für die Verknüpfung der Kontaktstellen der sich bildenden Stalk-Zellen verantwortlich (Murakami et al 2008).

Die Zugbelastung, der die EBs ausgesetzt waren, hatte neben der Zunahme der Tip-Zell Aktivität auch zur Folge, dass die Ausbildung von arteriellem Endothel begünstigt wurde. Dies zeigte sich vor allem anhand des Expressionsverhalten der hierfür untersuchten Marker. Einer dieser Marker für arterielles Endothel, nämlich Neuropilin1, wurde bereits besprochen. Daneben war auch das veränderte Expressionsverhalten des Molekül-Rezeptor Paares EphrinB2/EphB4 von Bedeutung. Von den Familien beider Proteine ist bekannt, dass sie an verschiedenen Prozessen der Embryogenese, wie etwa der Bildung des Nervensystems, der Angiogenese und der Kompartimentierung (Pasquale 2008) beteiligt sind. Die Signale der Ephrin-Eph Interaktion regulieren in den genannten Prozessen die Morphologie und die Bewegung von Zellen, sowie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung (Saha et al 2007, Bochenek et al 2010). Zusätzlich konnte eine Beteiligung an pathologischen Ereignissen, wie der tumorinduzierten Angiogenese und der Wundheilung nachgewiesen werden (Genander u. Frisén 2010). Die hier untersuchten Proteine gelten als venöse bzw. arterielle Endothelialmarker, wobei EphB4 für venöses Gewebe und EphrinB2 für arterielles Gewebe markiert (Klagsbrun u. Eichmann 2005, Obi et al 2009, Bochenek et al 2010). Die Analysen von EphrinB2 und EphB4 nach der Zugbelastung zeigen, dass diese einen förderlichen

Einfluss auf die Expression von EphrinB2 aber einen hemmenden Einfluss auf EphB4 hatte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie mit HUVECs, die Scherkräften ausgesetzt wurden. Hier kam es durch die Scherkräfte zu einem Anstieg der EphrinB2 mRNA, während der Gehalt der EphB4 mRNA durch die Behandlung zurückging (Obi et al 2009). Da es sich bei EphrinB2 um einen Marker für arterielles Endothel handelt, deutet dies zusammen mit den Ergebnissen zur Neuropilin1 Expression darauf hin, dass es durch die Dehnung der Zellen verstärkt zur Ausbildung von arteriellen Gefäßen kommt. Die Bildung venöser Gefäße nach mechanischer Zugbelastung ist weniger stark ausgeprägt.

Die Ausbildung von Gefäßen umfasst Teilprozesse wie invasives Wachstum und Migration (De Smet 2009). Dabei handelt es sich um komplexe Abläufe, die unter physiologischen Bedingungen während der Embryogenese oder der Wundheilung anzutreffen sind. Bei der Entwicklung von Krebs und der Metastasierung von Tumoren tragen diese Vorgänge zur Ausprägung des Krankheitsbildes bei. In Endothelzellen kann ein solches invasives Wachstum durch die Proteine Semaphorin4D und PlexinB1 gesteuert werden (Trusolino u. Comoglio 2002, Giordano et al 2002, Ch'ng u. Kumanogoh 2010). In diesem Paar stellt PlexinB1 den Rezeptor für Semaphorin4D dar (Regev et al 2007). In bisherigen Studien konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* der pro-angiogene Charakter des Semaphorin4D aufgezeigt werden (Sierra et al 2008, Conrotto et al 2005, Ch'ng u Kumanogoh 2010). Dabei werden die Eigenschaften von Semaphorin4D über die Bindung an PlexinB1 vermittelt (Basile et al 2004, Regev et al 2007). Da es in den EBs zu einem Anstieg der Expression beider Partner dieses Molekül-Rezeptor Paares kam, deutet dies auf eine Beteiligung an der beobachteten Vaskularisierung hin.

Die Frage, wie Zellen im Stande sind biomechanische Signale wahrzunehmen und ob es dafür einen speziellen Mechanosensor gibt, ist nicht abschließend geklärt. Es scheinen aber eine Reihe von Elementen an der Erfassung mechanischer Stimuli und deren Transduktion beteiligt zu sein. Wie beschrieben, konnte in dem hier verwendeten EB-Modell durch die Chelatierung des intrazellulären Kalziums die Stimulation der Vaskularisierung durch die mechanische Zugbelastung aufgehoben werden. Dabei zeigte die Analyse der am Prozess der Gefäßbildung beteiligten Proteine, dass die Chelatierung von Kalzium zum Teil großen Einfluss auf die Protein Expression hatte. Dies weist darauf hin, dass die Expression dieser Proteine, als Reaktion auf die Dehnung der Zellen, kalziumsensitiv ist. Ein Effekt der sich vor allem an den Markern für das Tip-/Stalk-Zell System zeigte. So ging die Expression in Folge des ausbleibenden Kalziumsignals bei den Proteinen Neuropilin1, PDGF-BB, VEGF₁₆₅ und FGF2 zurück. Mit Blick auf die Veränderung der Proteinexpression durch physikalische Kräfte wird postuliert, dass es durch mechanischen Stress zu einer direkten Veränderung der

Proteinkonformation kommen kann (le Noble 2008). Zudem geben Microarray Analysen einen Hinweis darauf, dass in etwa 600 Gene von menschlichen Endothelzellen auf Scherstress reagieren (Ohura et al 2003). So konnte etwa für PDGF-BB und andere Proteine ein Scherstress reguliertes Element (SSRE) in der Promotorregion des Gens nachgewiesen werden (Chien et al 1998, Davie et al 2004). Dieses Element ist Ziel stressinduzierter Transkriptionsfaktoren, die in Folge von biomechanischen Ereignissen verstärkt aktiv sind. Zu dieser Art von Transkriptionsfaktoren zählen unter anderem NF- κ B, GATA 6 und Kruppel-like factor 2 (KLF2) (Ando u. Yamamoto 2009). Für PDGF-BB konnte nicht nur dieses SSRE nachgewiesen werden, auch steht die Expression in Verbindung mit durch physikalische Kräfte ansteigenden intrazellulären Kalziumkonzentrationen, die Einfluss auf Transkriptionsfaktoren haben (Resnick et al 1993, le Noble et al 2008). Dies gibt eine Erklärung für die hier beobachtete kalziumabhängige und stressinduzierte Expression der genannten Proteine.

6.3 Bedeutung des intrazellulären Kalziums für die stressinduzierte ROS-Generierung

Im Zusammenhang mit den auf Zellen einwirkenden physikalischen Kräften ist bekannt, dass es zur Generierung von ROS kommt. In ES-Zellen, die einer mechanischen Belastung ausgesetzt wurden, konnte die ROS Freisetzung bereits nach kurzer Zeit festgestellt werden (Schmelter et al 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Generierung von ROS in embryonalen Stammzellen bereits in den frühen Stadien der Differenzierung auftritt (Sauer et al 2000).

ROS nehmen im Rahmen pathologischer und physiologischer Ereignisse eine wichtige Rolle ein. Dabei wird eine zu hohe ROS-Konzentration als oxidativer Stress bezeichnet. Dieser entsteht wenn der normale physiologische Gehalt an freien Sauerstoffradikalen in der Zelle überschritten wird. Ein Zustand dem ein Ungleichgewicht zwischen reduzierenden und oxidierenden Molekülen zu Grunde liegt. Als Folge einer zu hohen ROS Konzentration kann es zu Zellschäden, Apoptose und Zelltod kommen. Zudem stehen hohe ROS-Konzentrationen in Zusammenhang mit Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose und Diabetes (Griendling et al 2000, Birukov 2009). Allerdings sind niedrige ROS-Konzentrationen bis zu einem gewissen Maße für die Zelle überlebensnotwendig und für Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Zellmigration (Ushio-Fukai 2006, Lyle u. Griendling 2005, Stone u Collins, 2002) förderlich.

Die am vierten Tag der Kultur auf die Zellen ausgeübte mechanische Zugbelastung hatte einen Anstieg der ROS zur Folge. Die Generierung der ROS erfolgte somit zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellen sich noch in einem undifferenzierten Stadium befinden. Die Zunahme der ROS im Zuge der Dehnung konnte durch die Chelatierung des freien intrazellulären Kalziums

aufgehoben werden. Dies deutet auf eine Beteiligung des zytosolischen Kalziums an der ROS Bildung im Rahmen der mechanischen Reizung der ES-Zellen hin.

Ein Zusammenhang zwischen Kalzium und ROS ist in der Literatur durchaus bekannt (Yan et al 2006, Feissner et al 2009). So wurde unter anderem ein Anstieg der ROS Synthese in humanen Keratinozyten nach der Behandlung mit dem Kalzium Ionophor A23187 beschrieben. Dabei war es möglich diesen Effekt durch die Behandlung mit dem Chelator BAPTA-AM aufzuheben (Goldman et al 1998).

In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Applikation von mechanischem Stress zu einer verstärkten Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten in ES-Zellen führt (Schmelter et al 2006). Daher wurde im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen auf die NADPH-Oxidase als Quelle der ROS eingegangen. So konnte unter Verwendung des NADPH-Oxidase-spezifischen Inhibitors VAS2870 eine Hemmung der ROS Bildung nach der mechanischen Zugbelastung beobachtet werden. Dies weist die NADPH-Oxidase als Quelle der durch die Dehnung hervorgerufenen, kalziumabhängigen ROS Bildung aus. Die membrangebundenen NADPH-Oxidasen zählen wegen ihrer Kinetik zu den wichtigsten Multienzym-Komplexen, die bei der Generierung von ROS involviert sind (Sauer et al, 2001, Yan et al 2006). Zudem erfolgt die Bildung von ROS in ES Zellen der Maus ebenfalls überwiegend durch die NADPH-Oxidase (Sauer et al, 2000). Dass die Aktivität der NADPH-Oxidase durch externe Faktoren beeinflusst werden kann, ist in der Literatur bekannt (Grote et al 2003, Birukov et al 2009). Zudem konnte das intrazelluläre Kalzium bereits mit der Aktivität der NADPH-Oxidase in Verbindung gebracht werden (Banfi et al 2004). In humanen neutrophilen Granulozyten konnte eine kalziumabhängige Aktivierung der NADPH-Oxidase nachgewiesen werden (Kim-Park et al 1997), während der mechanische Einfluss auf die NADPH-Oxidase in Endothelzellen (Matsushita et al 2001, Ali et al 2004), glatten Muskelzellen (Grote et al 2003), Fibroblasten (Ammar et al 2005, Birukov 2009) sowie ES Zellen (Schmelter et al 2006) beschrieben wurde.

Die Verbindung zwischen der kalziumaktivierten ROS Bildung durch die NADPH-Oxidase in Folge mechanischer Zugbelastung in ES-Zellen wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit dargestellt.

6.4 Bedeutung von NO für die Vaskularisierung

Neben ROS ist NO eines der wichtigsten Signalmoleküle der Zelle (Kolluru et al 2010). Seit seiner Entdeckung als Signalmolekül konnte diesem gasförmigen, sekundären Botenstoff die Beteiligung an einer Reihe von physiologischen Prozessen nachgewiesen werden (Mujoo et

al 2008, Durán et al 2010). Dabei reguliert NO in einer Vielzahl von Zelltypen unterschiedliche Vorgänge, darunter das Wachstum, die Proliferation, sowie auf genetischer Ebene die Transkription und Translation verschiedener Proteine (Nath et al, 2004, Contestabile 2008). Vor allem Endothelzellen stehen im engen Zusammenhang mit NO und dessen Wirkung (Flemming 2010). In Bezug auf die Stammzellbiologie ist die Rolle, die NO einnimmt, noch nicht genau charakterisiert.

Seit den 1990er Jahren ist bekannt, dass auf die Zellen einwirkende Scherkräfte einen Einfluss auf die Regulierung der Expression der eNOS mRNA und die posttranslationale Modifikation des Holo Proteins haben. Außerdem ist in der Literatur in Verbindung mit Scherstress ein Anstieg der NO Bildung in Endothelzellen beschrieben (Boo u. Jo 2003, Kolluru et al 2010, Song u. Munn 2011). In den hier vorliegenden Ergebnissen zur Bildung des NO im EB Modell konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von Dauer der Dehnung zu einem Anstieg des NO kommt. Gleichzeitig war ein Anstieg der eNOS Aktivität, gemessen an der Phosphorylierung, zu beobachten. In der Literatur gibt es Hinweise auf eine Kalziumsensitivität der eNOS (Lin et al 2000, Boeldt et al 2011). Daher wurde in der vorliegenden Studie die Hypothese untersucht, dass es durch den Anstieg des intrazellulären Kalziums zu einer gesteigerten Aktivität der eNOS kommt.

Zwischen dem durch die mechanische Zugbelastung beobachteten Anstieg des intrazellulären Kalziums nach ca. 15 s und dem Anstieg der NO-Bildung bzw. der eNOS Phosphorylierung liegt ein Zeitraum von mehreren Minuten. Diese zeitliche Diskrepanz wirft die Frage nach dem Einfluss, den das Kalzium auf die eNOS hat auf und ob möglicherweise andere Faktoren hierfür verantwortlich sind. Daher wurde in der vorliegenden Studie intrazelluläres Kalzium durch BAPTA-AM chelatiert und die NO-Generierung bzw. NOS Phosphorylierung nach Zugebelastung untersucht. Die Chelatierung des intrazellulären Kalziums inhibierte NO Bildung und eNOS Phosphorylierung nach mechanischem Stress. Dabei ist davon auszugehen, dass es nicht das Kalzium direkt ist, das die Phosphorylierung bewirkt. Vielmehr erfolgt die Wirkung des Kalziums auf die eNOS Phosphorylierung möglicherweise vermittelt über dessen Bindung an das regulatorische Protein Calmodulin (CaM) (Cai et al 2008, Tran et al 2009). In den Endothelzellen von Schweine-Aorten (PAECs) konnte dies durch das Kalzium Ionophor A23187 und den Calmodulin Kinase II (CaMK II) Inhibitor KN-93 gezeigt werden (Schneider et al 2003, Chai et al 2008). Durch die Bindung an die CaMK II wird diese aktiviert, und es erfolgt die Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁷ (Schneider et al 2003, Flemming 2010), der wichtigsten der bisher bekannten eNOS Phosphorylierungsstellen.

6.5 Aktivität von MAP-Kinasen und der PI3-Kinase in Folge der Applikation mechanischer Zugbelastung

Die auf die mechanische Dehnung folgenden zellulären Antworten, wie etwa Differenzierung und Proliferation, werden von verschiedenen Signalwegen kontrolliert. Zu diesen Signalwegen gehören die der MAP-Kinasen (ERK/JNK) und der PI3-Kinase. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die mechanische Dehnung der EBs eine Aktivierung der ERK und JNK Signalwege zur Folge hat. Dass diese Kinasen durch physikalische Kräfte aktiviert werden können, ist in der Literatur beschrieben (Lacolley 2004).

Die Phosphorylierung der Kinasen im Zuge der hier applizierten Dehnung erfolgte bereits nach wenigen Minuten. Dabei konnte in ES-Zellen der Maus nachgewiesen werden, dass diese Phosphorylierung auf den ebenfalls durch die Zugbelastung generierten ROS beruht (Schmelter et al 2006). In der vorliegenden Arbeit kam es durch die Chelatierung des intrazellulären Kalziums zu einer Abnahme der generierten ROS; dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivität der ERK und JNK ebenfalls Kalzium-reguliert ist. Eine Abhängigkeit der ERK Aktivität von intrazellulärem Kalzium konnte in Osteoblasten Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Hier hatte die Chelatierung des intrazellulären Kalziums während der Applikation von Scherstress ein Ausbleiben der ERK Phosphorylierung zur Folge (Liu et al 2008, Rangaswami et al 2009). Mit Blick auf die JNK konnte Ähnliches festgestellt werden. Auch hier hatte die Zunahme der Generierung von ROS durch physikalische Kräfte einen Anstieg der JNK Aktivität zur Folge (Nagai et al 2007).

Neben den genannten Signalwegen spielt der PI3K Signalweg eine wichtige Rolle für Zellwachstum und Proliferation (Gayer et al 2009). Dies gilt auch für die durch Zugbelastung induzierte Proliferation von vaskulären Endothelzellen (Li et al 2005). So konnte auch im EB-Modell ein Anstieg der PI3K Phosphorylierung durch die Zugbelastung festgestellt werden. Dieser Effekt konnte durch die Inhibierung der PI3K mittels LY-294002 aufgehoben werden. Weiterhin inhibierte LY-294002 die Vaskularisierung nach mechanischer Zugbelastung. In diesem Zusammenhang weist die PI3K auch auf die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle für die Wahrnehmung und Transduktion der mechanischen Reize hin. So konnte ein mechanosensorischer Komplex, bestehend aus den Adhäsionsmolekülen PECAM-1 und VE-Cadherin sowie dem VEGF-R2 ermittelt werden, der das Signal der Dehnung an die PI3K weiterleitet (Tzima et al 2005, Lu u. Kassab 2011, Bekhite et al 2011). Dabei wird angenommen, dass es der VEGF-R2 ist, der die PI3K im Zuge der Stressapplikation aktiviert (le Noble et al 2008). Der Anstieg in der PI3K Aktivität beruht somit auf von der Zelle erfassten mechanosensorischen Reizen.

7 Summary

Physical forces are able to influence physiological processes within in the earliest stages of embryogenesis. Thus the aim of this work was to analyse the meaning of mechanical forces for the vasculogenesis of embryonic stem cells. Therefore we used the *in vitro* EB-Model, because based on its properties (cell-cell and cell-matrix interaction) this model offers the opportunity to investigate angiogenic processes.

In the present study it is shown that the application of mechanical forces leads to an increased vascularisation of EBs. Of special significance in this process is the instantaneous increase of the intracellular calcium concentration following the stretching of EBs. By treating the cells with the calcium Chelator BAPTA-AM this increase was stunted causing the abolishment of the observed effect of strain towards vascularisation.

It was observed that the application of mechanical strain had a positive impact on elements (axon-guidance proteins, growth factors, ROS, NO, MAPKs, PI3K) causative for the vessel formation in EBs. Furthermore we were able to show that this positive impact was in part related to the increase of intracellular calcium concentration.

As a result of the application of mechanical forces the expression of proteins belonging to the characteristic molecular signature of Tip and Stalk cells were increased. Gain in expression was observed for Neuropilin1, PDGF-BB and VEGF-R2 as well as Robo4 and FGF2. Chelating the intracellular calcium during stretch abolished this gain in expression for Neuropilin1, PDGF-BB and FGF2. The meaning of VEGF-R2 for the strain-induced vasculogenesis was illustrated by its inhibition with SU5614, which caused an anti-angiogenic effect. Because of the expression pattern of some of the analysed proteins it is reasonable that stretch has a beneficial influence of the formation of arterial endothelium. Mechanical strain caused a significant increase of the expression of the arterial marker EphrinB2 while there was a significant decrease of the venous marker EphB4.

Following of strain application we were able to observe an increase of ROS production. The ROS generation was abolished upon treatment with the NADPH-oxidase-specific inhibitor VAS2870. Presumably the NADPH-oxidase was the source of the strain-induced ROS production in EBs. Moreover we were able to show a connection between -induced ROS production and intracellular calcium. Pre-incubation of EBs with the Chelator BAPTA-AM caused a suppression of the ROS formation evoked by mechanical forces.

Furthermore the strain application caused an increase of the NO production in EBs. The source of the NO formation was supposed to be the eNOS, since we observed a significant increase in phosphorylation 30 min after the strain. The eNOS phosphorylation and the NO generation were significantly decreased when EBs were pre-incubated with BAPTA-AM. This suggests an involvement of CaMK II in the phosphorylation of eNOS.

Mechanical strain application also leads to an increased activity of MAPKs (ERK/JNK) and PI3K. The gain in activity of the PI3K due to the mechanical strain was abolished after the treatment with the inhibitor LY-294002. Therefore it is reasonable that the activity of the PI3K, which is part of a mechanosensing complex, is important for transduction of mechanical signals imposed on EBs during strain application.

8 Zusammenfassung

Bereits in der frühesten Phase der Embryogenese nehmen physikalische Kräfte Einfluss auf die unterschiedlichsten physiologischen Prozesse. Daher sollte in dieser Arbeit die Bedeutung von mechanischen Kräften für die Vaskulogenese eingehender untersucht werden. Dazu wurde hier das EB-Modell verwendet. Dieses *in vitro* Modell eignet sich auf Grund seiner Eigenschaften (Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion) besonders für die Untersuchung angiogener Prozesse.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass die Applikation von mechanischen Zugkräften zu einem Anstieg der Vaskularisierung der EBs führt. Von besonderer Bedeutung ist dabei der unmittelbar auf die Dehnung folgende Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Durch die Zugabe des Chelators BAPTA-AM konnte dieser Anstieg gehemmt und der Effekt der Dehnung auf die Vaskularisierung aufgehoben werden.

In den weiteren Untersuchungen konnte zudem ein positiver Einfluss der mechanischen Zugbelastung auf die für die Gefäßbildung förderlichen Faktoren (Axon-Guidance Proteine, Wachstumsfaktoren, ROS, NO, MAPKs und PI3K) nachgewiesen und zum Teil ein Zusammenhang mit dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aufgezeigt werden.

Die Stressapplikation hatte einen Anstieg der Expression von Proteinen zur Folge, die zur charakteristischen Signatur von Tip- und Stalk-Zellen zählen. So konnte ein Anstieg der Expression von Neuropilin1, PDGF-BB und VEGF-R2 sowie Robo4 und FGF2 gezeigt werden. Die Chelatierung des intrazellulären Kalziums während der Dehnung hatte zur Folge, dass die Zunahme der Expression von Neuropilin1, PDGF-BB und FGF2 ausblieb. Die Bedeutung des VEGF-R2 für die Vaskularisierung in Folge der Zugbelastung konnte zusätzlich durch dessen Inhibierung mit SU5614 dargestellt werden. Zudem legt das Expressionsverhalten einiger Proteine einen förderlichen Einfluss der Dehnung auf die Bildung von arteriellem Endothel nahe. So stieg durch die mechanische Zugbelastung die Expression des arteriellen Marker EphrinB2 an, während die des venösen Markers EphB4 signifikant zurückging.

Im Zuge der Dehnung der EBs war ein zeitnaher Anstieg der ROS Bildung festzustellen. Die Generierung der ROS konnte durch eine Behandlung der EBs mit dem NADPH-Oxidase spezifischen Inhibitor VAS2870 aufgehoben werden. Dies ermöglichte es, die NADPH-Oxidase als Quelle der stressinduzierten ROS zu identifizieren. Zudem ergab sich ein Zusammenhang zwischen den durch die Dehnung gebildeten ROS und dem intrazellulären

Kalzium, da eine Vorinkubation der EBs mit BAPTA-AM die durch die Zugbelastung induzierte ROS Synthese unterdrückte.

Die Stressapplikation führte außerdem zu einem Anstieg der NO Bildung in den EBs. Als Quelle konnte hier die eNOS ausgemacht werden, da diese nach 30 min Zugbelastung signifikant phosphoryliert vorlag. Durch die Chelatierung des intrazellulären Kalziums kam es zu einem Rückgang der Phosphorylierung der eNOS und der NO Generierung, was die Beteiligung der CaMK II an der eNOS Phosphorylierung nahelegt.

Die Zugbelastung hatte zudem eine Zunahme der Aktivität der MAPK (ERK und JNK) sowie der PI3K zur Folge. Der Anstieg der PI3K Aktivität im Zuge der mechanischen Dehnung konnte durch die Behandlung der EBs mit dem Inhibitor LY-294002 aufgehoben werden. Dies zeigt, dass die als Teil eines mechanosensorischen Komplexes wirkende PI3K für die Transduktion der mechanischen Reize die auf die EBs ausgeübt wurden von Bedeutung ist.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AP	alkalische Phosphatase
BAPTA-AM	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
bFGF	basic fibroblast growth factor (basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor)
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	bivalentes Kalziumion
CD31	PECAM = platelet endothelial cell adhesion molecule (Blutplättchen Endothelzelladhäsionsmolekül)
CO ₂	Kohlendioxid
CLSM	confocal laser scanning microscope (konfokales Laser Raster Mikroskop)
Cy5	Indocarbocyanin
Cy2	Indodicarbocyanin
DCF	fluoreszierendes 2',7'-Dichlorofluoreszein
DCFH	nicht fluoreszierendes 2',7'-Dichlorofluoreszein
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluoreszein-Diazetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	embryoid body (Embryonalkörperchen)
ECL	Enhanced Chemi-Luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al	et alia (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid

FKS	fötales Kälberserum
Fluo-4-AM	1-[2-Amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methyl-phenoxy) ethane-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, pentaacetoxymethyl ester
<i>g</i>	Beschleunigung; $1\text{ g} = 9,81\text{m/s}^2$
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HRP	horseradish peroxidase (MPO = Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin Klasse G
IMDM	Basal Iscoves Modified Dulbecco's Medium
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
li.	links
LIF (ESGRO ®)	Leukemia inhibitory factor (Leukämie Inhibierender Faktor)
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginine-methylester
M	molar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MAP Kinase	mitogen-activated protein kinase (mitogen aktivierte Proteinkinase)
MEF	mausembryonale Fibroblasten
MEM	Minimal Essential Aminoacids (essentielle Aminosäuren)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Mg ²⁺	bivalentes Magnesiumion
mg	Milligramm

min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Hyperoxyd-Anion
¹ O ₂	Singulett-sauerstoff
O ₃	Ozon
OH•	Hydroxyl Radikal
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung (mit Triton)
PDGF	platelet-derived growth factor (Blutplättchen Wachstumsfaktor)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PI3-Kinase	Phosphoinositid-Kinase
PIGF	Placental growth factor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PVDF	Polyvenyldifluorid
re.	rechts
Robo	Roundabout
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)

TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung (mit Triton-X oder Tween-20)
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
z.B.	zum Beispiel

10Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: ÜBERSICHTSDIAGRAMM DER EINZELNEN STAMMZELLFORMEN UND IHR DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL.	5
ABBILDUNG 1.2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER BLASTOZYTE IM QUERSCHNITT AM 5. TAG.	7
ABBILDUNG 1.3: SCHEMATISCHER AUFBAU VON NEUROPILIN.	9
ABBILDUNG 1.4: SCHEMATISCHER AUFBAU VON SEMAPHORINEN.	10
ABBILDUNG 1.5: SCHEMATISCHER AUFBAU VON PLEXINEN.	11
ABBILDUNG 1.6: SCHEMATISCHER AUFBAU VON EPHRIN UND EPH.	11
ABBILDUNG 1.7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ROUNDABOUTS (ROBO).	12
ABBILDUNG 1.8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON SLIT.	13
ABBILDUNG 3.1: STRUKTURFORMEL DES PI3-KINASE INHIBITORS LY294002.	27
ABBILDUNG 3.2: STRUKTURFORMEL DES INHIBITORS SU5614.	28
ABBILDUNG 3.3: STRUKTURFORMEL DES NOS-INHIBITORS L-NAME.	28
ABBILDUNG 3.4: STRUKTURFORMEL DES NADPH-OXIDASE INHIBITORS VAS2870.	29
ABBILDUNG 3.5: STRUKTURFORMEL DES KALZIUM CHELATOR BAPTA-AM.	29
ABBILDUNG 3.6: STRUKTURFORMELN UND REAKTIONSWEG DES NO-INDIKATORS DAF-FM-DA.	30
ABBILDUNG 3.7: STRUKTURFORMEL VON FLUO4-AM.	31
ABBILDUNG 3.8: STRUKTURFORMELN UND REAKTIONSWEG DES ROS-INDIKATORS DCFH-DA	31
ABBILDUNG 4.1: KONFLUENTE EMBRYONALE FIBROBLASTEN DER MAUS (FEEDER-ZELLEN). EMBRYONALE FIBROBLASTEN ISOLIERT AUS 14 TAGE ALTEN EMBRYONEN (BALKEN ENTSPRICHT 100 μ M)	32
ABBILDUNG 4.2: CELLSPIN SYSTEM ZUR BILDUNG VON SPHÄROIDALEN ZELLAGGREGATEN (LI.) UND EMBRYOID BODIES (EBS) AN TAG 4 (RE.) BALKEN ENTSPRICHT 200 μ M.	33
ABBILDUNG 4.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER APPLIKATION VON MECHANISCHER ZUGBELASTUNG AUF EBS AN TAG 4.	34
ABBILDUNG 4.4: GRAPHISCHE DARSTELLUNG ZUM PRINZIP DER INDIREKTEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG.	35
ABBILDUNG 4.5: SCHEMAZEICHNUNG ZUM AUFBAU DES STRAHLENGANGS EINES KONFOKALEN MIKROSKOPS.	39

- ABBILDUNG 5.1:** VASKULARISIERUNG IN EBS AN TAG 8 DER DIFFERENZIERUNG NACH 2 H MECHANISCHER ZUGBELASTUNG UNTER DEM EINFLUSS DES INTRAZELLULÄREN KALZIUM CHELATORS BAPTA-AM (10 μ M). 44
- ABBILDUNG 5.2:** VERGLEICH DER KALZIUMSIGNALS VON ZELLEN WÄHREND DER MECHANISCHEN ZUGBELASTUNG IN A) ANWESENHEIT UND B) ABWESENHEIT VON BAPTA-AM (10 μ M).. 45
- ABBILDUNG 5.3:** PROTEINEXPRESSION VON NEUROPILIN1, 24 H NACH APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M). 47
- ABBILDUNG 5.4:** PROTEINEXPRESSION VON SEMAPHORIN4D, 24 H NACH APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M). 48
- ABBILDUNG 5.5:** PROTEINEXPRESSION VON PLEXINB1 24 H NACH APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M). 49
- ABBILDUNG 5.6:** PROTEINEXPRESSION VON A) EPHRINB2 UND B) EPHB4 24 H NACH APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M). 51
- ABBILDUNG 5.7:** PROTEINEXPRESSION VON A) ROBO1 UND B) ROBO4 24 H NACH MECHANISCHER ZUGBELASTUNG UND BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M). 53
- ABBILDUNG 5.8:** PROTEINEXPRESSION VON SLIT2 24 H NACH DER APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND DER BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M). A 54
- ABBILDUNG 5.9:** DURCH MECHANISCHE ZUGBELASTUNG INDUZIERTES ROS BILDUNG UND DER EFFEKT DES INTRAZELLULÄREN KALZIUM CHELATORS BAPTA-AM (10 μ M) 56
- ABBILDUNG 5.10:** INDUZIERTES ROS BILDUNG DURCH DEHNUNG UND DER EFFEKT DES NADPH-OXIDASE INHIBITORS VAS2870 (50 μ M). 57
- ABBILDUNG 5.11:** EINFLUSS DES NADPH-OXIDASE INHIBITORS VAS2870 (50 μ M) AUF DIE VASKULARISIERUNG UNTER MECHANISCHER ZUGBELASTUNG. 58
- ABBILDUNG 5.12:** VERLAUF DER NO-PRODUKTION UNTER MECHANISCHER ZUGBELASTUNG ÜBER DEN ZEITRAUM VON 1 H. 60
- ABBILDUNG 5.13:** ZEITLICHER VERLAUF DER PHOSPHORYLIERUNG DER ENDOTHELIALEN NO SYNTHASE (ENOS / NOS III) WÄHREND MECHANISCHER ZUGBELASTUNG. 61
- ABBILDUNG 5.14:** BILDUNG VON NO IN MIT L-NAME (100 μ M) BEHANDELTEN UND GEDEHNTEN EBS UND DEN RESPEKTIVEN KONTROLLEN. 62
- ABBILDUNG 5.15:** ZEITLICHER VERLAUF DER PHOSPHORYLIERUNG DER ENDOTHELIALEN NO SYNTHASE (ENOS / NOS III) WÄHREND MECHANISCHER ZUGBELASTUNG UND VORBEHANDLUNG MIT L-NAME. 63
- ABBILDUNG 5.16:** VASKULARISIERUNG IN EBS AN TAG 8 DER DIFFERENZIERUNG NACH 2 H MECHANISCHER ZUGBELASTUNG UNTER DEM EINFLUSS DES NOS INHIBITORS L-NAME (100 μ M). 64
- ABBILDUNG 5.17:** BILDUNG VON NO IN MIT BAPTA-AM (10 μ M) BEHANDELTEN EBS UND DEN RESPEKTIVEN KONTROLLEN. 65
- ABBILDUNG 5.18:** ZEITLICHER VERLAUF DER PHOSPHORYLIERUNG DER ENDOTHELIALEN

NO SYNTHASE (ENOS / NOS III) WÄHREND MECHANISCHER ZUGBELASTUNG IN ANWESENHEIT VON BAPTA-AM (10 μ M).	66
ABBILDUNG 5.19: EXPRESSION VON PDGF-BB, 24 H NACH DER APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND DER BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M).	68
ABBILDUNG 5.20: EXPRESSION VON FGF2, 24 H NACH APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND DER BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M).	69
ABBILDUNG 5.21: EXPRESSION VON VEGF165, 24 H NACH DER APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND DER BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M).	70
ABBILDUNG 5.22: EXPRESSION VON FLK1, 24 H NACH DER APPLIKATION VON MECHANISCHEM STRESS UND DER BEHANDLUNG MIT BAPTA-AM (10 μ M).	71
ABBILDUNG 5.23: VASKULARISIERUNG VON EBS AM ACHTEN TAG DER DIFFERENZIERUNG NACH BEHANDLUNG MIT DEM SELEKTIVEN FLK-1 INHIBITOR SU5614 (1 μ M) UND MECHANISCHER ZUGBELASTUNG.	72
ABBILDUNG 5.24: ZEITLICHER VERLAUF DER PHOSPHORYLIERUNG DER PI3-KINASE WÄHREND MECHANISCHER ZUGBELASTUNG.	74
ABBILDUNG 5.25: ZEITLICHER VERLAUF DER PHOSPHORYLIERUNG DER PHOSPHOINOSITID-3-KINASE (PI3-KINASE) WÄHREND DER MECHANISCHER ZUGBELASTUNG UNTER EINFLUSS DER INHIBITORS LY249002 (20 μ M).	75
ABBILDUNG 5.26: VASKULARISIERUNG IN EBS AN TAG 8 DER DIFFERENZIERUNG NACH 2 H MECHANISCHER ZUGBELASTUNG UNTER DEM EINFLUSS DES PI3-KINASE INHIBITORS LY249002 (20 μ M).	76
ABBILDUNG 5.27: ZEITLICHER VERLAUF DER PHOSPHORYLIERUNG DER A) EXTRAZELLULÄREN SIGNAL REGULIERTEN KINASE (ERK) UND B) C-JUN N-TERMINALEN KINASE (JNK) WÄHREND MECHANISCHER ZUGBELASTUNG.	78

11Literatur

- Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P.L., McKinney-Freeman, S., Mack, P.J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dicey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M.W., Yoder, M.C., García-Cardena, G., Daley, G.Q.** (2009) Biochemical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature* 459(7250):1131-5
- Adams, R.H. und Eichmann, A.** (2010) Axon Guidance Molecules in Vascular Patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001875
- Ali, M.H., Perlstein, D.P., Mathieu, C.E., Schumacker, P.T.** (2004) Mitochondrial Requirement for Endothelial Responses to Cyclic Strain: Implications for Mechanotransduction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287(3):L486-96
- Amma, H., Naruse, K., Ishiguro, N., Sokabe, M.** (2005) Involvement of reactive oxygen species in cyclic stretch-induced NF-kappaB activation in human fibroblast cells. *Br J Pharmacol* 145(3):364-73
- Ando, J. und Yamamoto, K.** (2009) Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress. *Circ J* 2009;73:1983-1992
- Arese, M., Serini, G., Bussolino, F.** (2012) Nervous vascular parallels: axon guidance and beyond. *Int. J. Dev. Biol.* 55:439-445
- Aurandt, J., Li, W., Guan, K.L.** (2006) Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of plexin-B1. *Biochem J* 1;394(Pt2):459-64
- Autiero, M., De Smet, F., Claes, F., Carmeliet, P.** (2005) Role of neural guidance signals in blood vessel navigation. *Cardiovascular Research* 65 (2005) 629-638
- Ball, S.G., Bayley, C., Shuttleworth, A., Kielty, C.M.** (2010) Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signaling in mesenchymal stem cells. *Biochem J* (2010) 427,29-40
- Balligand, J.L., Feron, O., Dessy, C.** (2009) eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiol Rev* 89: 481-534
- Bánfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnár, G.Z., Krause, K.H., Cox, J.A.** (2004) Mechanism of Ca²⁺ activation of NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279(18):18583-91
- Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Watts, R.J.** (2009): Neuropilins in tumor biology. *Clin Cancer Res* 15:1860-1864
- Banumathi, E., O'Conner, A., Gurunathan, S., Simpson, D.A., McGeown, J.G., Curtis, T.M.** (2011) VEGF-Induced Retinal Signaling Is Critically Dependent on Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011,52:3103-3111
- Brbieri, A., Palma, G., Rosati, A., Giudice, A., Falco, A., Petrillo, A., Petrillo, M., Bimonte, S., Di Benedetto, M., Esposito, G., Stiuso, P., Abbruzzese, A., Caraglia, M., Arra, C.** (2012) Role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in chronic stress-promoted tumor growth. *J Cell Mol Med* Vol.16, No.4, 2012 pp. 920-926

- Basile, J.R., Barac, A., Zhu, T., Guan, K.-L., Gutkind, J.S.** (2004) Class IV Semaphorins Promote Angiogenesis by Stimulating Rho-Initiated Pathways through Plexin-B. *Cancer Research* 64, 5212-5224
- Bedell, V.M., Yeo, S.Y., Park, K.W., Chung, J., Seth, P., Shivalingappa, V., Zaho, J., Obara, T., Sukhatme, V.P., Drummond, I.A., Li, D.Y., Ramchandran, R.** (2005) Roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6373-6378
- Bekhite, M.M., Finkensieper, A., Binas, S., Müller, J., Wetzker, R., Figulla, H.R., Sauer, h., Wartenberg, M.** (2011) VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 1;124(Pt 11):1819-30
- Beltrami, A.P., Cesselli, D., Bergamin, N., Marcon, P., Rigo, S., Puppato, E., D'Aurizio, F., Verardo, R., Piazza, S., Pignatelli, A., Poz, A., Baccarani, U., Damiani, D., Fanin, R., Mariuzzi, L., Finato, N., Masolini, P., Burelli, S., Belluzzi, O., Schneider, C., Beltrami, C.A.** (2007). Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110, 3438-3446.
- Berridge M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L.** (2003) Calcium signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529
- Binétruy, B., Heasley, L., Bost, F., Caron L., Aouadi, M.** (2007) Concise Review: Regulation of Embryonic Stem Cell Lineage Commitment by Mitogen-Activated Protein Kinases. *Stem Cells* 2007;25;1090-1095
- Birukov, K.G.** (2009) Cyclic Stretch, Reaktiv Oxygen Species, and Vascular Remodeling. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1651-1667
- Bochenek, M.L., Dickison, S., Astin, J.W., Adams, R.H., Nobes, C.D.** (2010) Ephrin-B2 regulates endothelial cell morphology and motility independently of Eph-receptor binding. *Journal of Cell Science* 123, 1235-1246
- Boeldt, D.S., Yi, F.X., Bird, I.M.** (2011) Pregnancy adaptive programming of capacitative entry responses alters nitric oxide (NO) output in vascular endothelium: new insights into eNOS regulation through adaptive cell signaling. *Journal of Endocrinology* 210
- Boo, Y.C. und Jo, H.** (2003) Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:499-508
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Kidd, T.** (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96:795-806
- Cai, H., Liu, D., Garcia, J.G.N** (2008) CaM Kinase II-dependent pathological signaling in endothelial cells. *Cardiovascular Research* Vol. 77, Issue 1, Pp. 30-34
- Cantley, LC.** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573):1655-1657.
- Caprioli, A., Minko, K., Drevon, C., Eichmann, A., Dieterlen-Lièvre, F., Jaffredo, T.** (2001) *Dev Biol* 1;238(1):64-78

- Carmeliet, P., Jain, R.K.** (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carmeliet, P. und Tessier-Lavigne M.** (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436 (7048): 193–200
- Chappell, J.C., Wiley, D.M., Bautch, V.L.** (2011) How Blood Vessel Networks Are Made and Measured. *Cell Tissues Organs* 195(1-2):94-107
- Chen, Y.-F., Chiu, W.-T., Chen, Y.-T., Lin, P.-Y., Huang, H.-J., Chou, C.-Y., Chang, H.-C., Tang, M.-J., Shen, M.-R.** (2011) Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *PNAS* Vol.108 No.37 15225-15230
- Chien, S., Li, S., Shyy, J. Y.-J.** (1998) Effects of Mechanical Forces on Signal Transduction and Gene Expression in Endothelial Cells. *Hypertension* 1998;31:162-169
- Ch'ng, E.S. und Kumanogoh, A.** (2010) Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression. *Molecular Cancer* 2010, 9:251
- Cimato, T., Beers, J., Ding, S., Ma, M., McCoy, P., Boehm, M., Nabel, E.G.** (2009) Neuropilin-1 Identifies Endothelial Precursors in Human and Murine Embryonic Stem Cells Before CD34 Expression. *Circ* 2009;119:2170-2178
- Cohen, J.C. und Larson, J.E.** (2006) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dependent cytoskeletal tension during lung organogenesis. *Dev. Dyn.* 235,2736-2748
- Conrotto, P., Valdembrì, D., Corso, S., Tamagnone, L., Comoglio, P.M., Bussolino, F., Giordano, S.** (2005) Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* Vol. 105, No. 11, 4321-4329
- Contestabile, A.** (2008) Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and neural derived tumor cells. *Prog Neurobiol* 84(4):317-328
- D'Amore, P.A. und Smith, S.R.** (1993) Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. *Growth Factors* 145:1023-9
- Davis, M.E., Grumbach, I.M., Fukui, T., Cutchins, A., Harrison, D.G.** (2004) Shear stress regulates endothelial nitric-oxide Synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J. Biol. Chem.* 2004;279:163-168
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P.J., Carmeliet, P.** (2009) Mechanisms of Vessel Branching: Filopodia on Endothelial Tip Cells Lead the Way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:639-649
- Dickinson, R.E. und Duncan, W.C.** (2010) The SLIT/ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system. *Reproduktion* 2010 April;139(4):697-704
- Dimmeler, S., Dernbach, E., Zeiher, A.M.** (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 477, 258-262.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R.** (1985). The in vitro

development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 87, 27-45.

Drake, C.J. (2003). Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res.C.Embryo.Today* 69, 73-82.

Durán, W.N., **Breslin**, J.W., **Sánchez**, F.A. (2010) The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovascular Research* 87, 254-261

Evans M.J., **Kaufman** M.H.(1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819):154-156.

Fanchaoury, M., **Bychkov**, R., **Meister**, J.J., **Beny**, J.L. (2007) Stretch-elicited calcium responses in the intact mouse thoracic aorta. *Cell Calcium* (2007) 41-50

Fazzari, P., **Penachioni**, J., **Gianola**, S., **Rossi**, F., **Eickholt**, B., **Maina**, F., **Alexopoulou**, L., **Sottile**, A., **Comoglio**, P., **Flavell**, R., **Tamagnone**, L. (2007) Plexin-B1 plays a redundant role during mouse development and in tumor angiogenesis. *BMC Dev Biol* 7:55

Feissner, R.F., **Skalska**, J., **Gaum**, W.E., **Sheu**, S.-S. (2009) Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Front Biosci.* 14: 1197-1218

Ferrara, N und **Alitalo**, K (1999). Clinical Applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5:1359–1364

Fleming, I. (2010) Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pfulergs Arch* 459(6):793-806

Forouhar, A.S., **Liebling**, M., **Hickerson**, A., **Nasiraei-Moghaddam**, A., **Tsai**, H.J., **Hover**, J.R., **Fraser**, S.E., **Dickinson**, M.E., **Gharib**, M. (2006) The embryonic vertebrate hearth tube is a dynamic suction pump. *Science* 312, 751-753

Gayer, C.P., **Chaturvedi**, L.S., **Wang**, S., **Craig**, D.H., **Flanigan**, T., **Basson**, M.D. (2009) Strain-induced Proliferation Requires the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/Glycogen Synthase Kinase Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.284,No.4,pp.2001-2011

Genander, M. u. **Frisén**, J. (2010) Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 2010,22:611-616

Geretti, E., **Schimizu**, A., **Klagsbrun**, M. (2008) Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* 11:31-39

Gerhardt, H., **Golding**, M., **Fruttiger**, M., **Ruhrberg**, C., **Lundkvist**, A., **Abramsson**, A., **Jeltsch**, M., **Mitchell**, C., **Alitalo**, K., **Shima**, D., **Betsholtz**, C. (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology* Vol. 161, No. 6 (2003) 1163-1177

Giordano, S., **Corso**, S., **Conrotto**, P., **Artigiani**, S., **Gilestro**, G., **Barberis**, D., **Tamagnone**, L., **Comoglio**, P.M. (2002) The Semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 2002, 4:720-724

Goldman, R., **Moshonov**, S., **Zor**, U. (1998) Generation of reactive oxygen species in a human keratinocyte cell line: role of calcium. *Arch Biochem Biophys* 1998;350(1):10-18.

Griffioen, A. W. und Molema, G. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation (2000) *Pharmacol Rev* 52(2):237-68

Grieshammer, U., Le, M., Plumps, A.S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., Martin, G.R. (2004) SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6:709-717

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

Grivennikov, I.A. (2008) Embryonic Stem Cells and the Problem of Directed Differentiation. *Biochemistry* Vol.73, No.13, pp. 1438-1452

Grote, K., Flach, I., Luchtefeld, M., Akin, E., Holland, S.M., Drexler, H., Schieffer, B. (2003) Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 92: e80-86

Herbert, S.P. und Strainier, D.Y.R. (2011) Molecular control of endothelial cell behavior during blood vessel morphogenesis. *Molecular Cell Biology* Vol.12 551-564

Herbert, J.M., Stekel, D., Sanderson, S., Heath, V.L., Bicknell, R. (2008) A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumor endothelial genes. *BMC Genomics* 7, 153-174

Hinck, L. (2004) The Versatile Role of "Axon Guidance" Cues in Tissue Morphogenesis. *Developmental Cell* Vol.7, 783-793

Hohenester, E., Hussain, S., Howitt, J.A. (2006) Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans* 34(Pt3):418-21

Hove, J.R., koster, R.W., Forouhar, A.S., Acevedo-Bolton, G., Fraser, S.E., Gharid, M. (2003) Intercardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature* 421, 172-177

Huminiecki, L., Gorn, M., Suchtig, S., Poulson, R., Bicknell, R. (2002) Magic Roundabout is a new member of the Roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 79, 547-552

Ingber, D.E. (2006) Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 255-266

Jakobsson, L., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L. (2007) Building blood vessels-stem cells models in vascular biology. *J. Cell Biol* Vol.177, No.5, 751-755

Johnson, D.E., Williams, L.T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigen family. *Adv Cancer Res* 1993;60:1-41

Kajdaniuk, D., Marek, B., Borgiel-Marek, H., Kos-Kudła, B. (2011) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-part1: in physiology and pathophysiology. *Pol J Endocrinol* 2011; 62 (5): 444 - 455

Kanatsu M, Nishikawa S.I. (1996) *In vitro* analysis of epiblast tissue potency for

hematopoietic cell differentiation. *Development* 223:193-202

Kaur, S., Castellone, M.D., Bedell, V.M., Konar, M., Gutkind, J.S., Ramchandran, R. (2006) Robo4 Signaling in Endothelial Cells Implies Attraction Guidance Mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.281,No.19,pp.11347-11356

Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Fujisawa, H. (1999) A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895-4902

Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(6):862-869.

Kidd, T, Bland, K.S., Goodman, C.S. (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785-794

Kim-Park, W.K., Moore, M.A., Hakki, Z.W., Kowolik, M.J. (1997) Activation of neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium. *Ann N Y Acad Sci* 832:394-404

Klagsbrun, M. und Eichmann, A. (2005) A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 (2005) 535-548

Kleger, A., Seufferlein, T., Malan, D., Tischendorf, M., Storch, A., Wolheim, A., Latz, S., Protze, S., Porzner, M., Proepper, C., Brunner, C., Katz, S.-F., Pusapati, G.V., Bulliger, L., Franz, W.-M., Koehntop, R., Giehl, K., Spyranis, A., Fleischmann, B.K., Wartenberg, M., Wobus, A.M., Boecker, T.M., Liebau, S. (2010) Modulation of Calcium-Activated Potassium Channels Induces Cardiogenesis of Pluripotent Stem Cells and Enrichment of Pacemaker-Like Cells. *Mol Cardiol* 2010;122:1823-1836

Klein, S., Roghani, M., Rifkin, D.B. (1997) Fibroblast growth factors as angiogenesis factors: new insights into mechanism of action. *EXS* 1997;79:159-92

Knowles, M.A., Platt, F.M., Ross, R.L., Hurst, C.D. (2009) Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* (2009) 28:305-316

Kolluru, G.K., Shina, S., Majumder, S., Muley, A., Siamwala, J.H., Gupta, R., Chatterjee, S. (2010) Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis. *Nitric Oxide* 22 (2010) 304-315

Kullander, K. und Klein, R. (2002) Mechanisms and functions of Eph and Ephrin signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:475-486.

Kurotaki, Y., Hatta, K., Nakao, K., Nabeshima, Y., Fujimori, T. (2007) Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* 316, 719-723

Lacolley, P. (2004) Mechanical influences of cyclic stretch on vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research* 63 (2004) 577-579

Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Stürzebecher J, Mann K, Krieg T und Eming S.A.: Expression and Proteolysis of Vascular Endothelial Growth Factor is Increased in

Chronic Wounds *Journal of Investigative Dermatology* (2000) **115**, 12–18

le Noble, F., **Klein**, C., **Tintu**, A., **Pries**, A., **Buschmann**, I. (2008) Neural guidance molecules, tip cells, and mechanical factors in vascular development. *Cardiovascular Research* (2008) 11:31-39

Leclerc, C., **Néant**, I., **Moreau**, M. (2012) The calcium: an early signal that initiates the formation of the nervous system during embryogenesis. *Front Mol Neurosci* 2012,5:3

Legg, J.A., **Herbert**, J.M.J., **Clissold**, P., **Bicknell**, R. (2008) Slit and Roundabouts in cancer, tumor angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis* (2008) 11:13-21

Li, S., **Huang**, N.F., **Hsu**, S. (2005) Mechanotransduction in Endothelial Cell Migration. *J. Cell Biol.* 96:1110-1126

Lin, S., **Fagan**, K.A., **Li**, K.X., **Shaul**, P.W., **Cooper**, D.M., **Rodman**, D.M. (2000) Sustained endothelial nitric-oxide Synthase activation requires capacitative Ca^{2+} entry. *J. Biol. Chem.* 275 17979-17985

Linask, K.L. und **Linask**, K.K. (2010) Calcim Channel Blockade in Embryonic Cardiac Progenitor Cells Disrupts Normal Cardiac Cell Differentiation. *Stem Cells Dev* 19(12): 1959-1965

Liu, D., **Genetos**, D.C., **Shao**, Y., **Geist**, D.J., **Li**, J., **Ke**, H.Z., **Turner**, C.H., **Duncan**, R.L. (2008) Activation of Extracellular-Signal Regulated Kinases (ERK1/2) by Fluid Shear is Ca^{2+} - and ATP-Dependent in MC3T3-E1 Osteoblasten. *Bone* 2008; 42(4): 644-652

Loffredo, F und **Lee**, R. T.: Therapeutic Vasculogenesis : It Takes Two. *Circ Res.* 2008; 103:128-130

Lowry, O.H., **Rosenborough**, N.J., **Farr**, A.L., **Randall**, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.

Lu, D. und **Kassab**, G.S. (2011) Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J. R. Soc. Interface* 8(63):1379-85

Lyle, A.N. und **Griendling**, K.K. (2005) Modulation of Vascular Smooth Muscle Signaling by Reactive Oxygen Species. *Physiology* 21:269-280

Lucitti, J.L., **Visconti**, R., **Novak**, J., **Keller**, B.B. (2006) Increased arterial load alters aortic structural and functional properties during embryogenesis. *Am J Physiol Hearth Circ Physiol* 291, H1919-H1926

Malek, A.M., **Jiang**, L., **Lee**, I., **Sessa**, W.C., **Izumo**, S., **Alper**, S.L. (1999) Induction of Nitric Oxide Synthase mRNA by Shear Stress Requires Intracellular Calcium and G-protein Signals and Is Modulated by PI 3 Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254, 231-242

Mammoto, A., **Connor**, K.M., **Mammoto**, T., **Yung**, C.W., **Huh**, D., **Aderman**, C.M., **Mostoslavsky**, G., **Smith**, L.E., **Ingber**, D.E. (2009) A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature* 457, 1103-1108

Mammoto, T. und **Ingber**, D.E. (2010) Mechanical control of tissue and organ

development. *Development* 137,1407-1420

Marlow, R., Binnewies, M., Sorensen, L.K., Monica S.D., Stickland, P., Forsberg, E.C., Li, D.Y., Hinck, L. (2010) *PNAS* Vol. 107; No. 23; 10520-10525

Moore, K.A., Polte, T., Shi, B., Alsberg, E., Sunday, M.E., Ingber, D.E. (2005) Control of Basement Membrane Remodeling and Endothelial Branching Morphogenesis in Embryonic Lung by Rho and Cytoskeletal Tension. *Developmental Dynamics* 232:268-281

Mujoo, K., Sharin, V.G., Bryan, N.S., Krumenacker, J.S., Sloan, C., Parveen, S., Nikonoff, L.E., Kots, A.Y., Murad, F. (2008) Role of nitric oxide signaling components in differentiation of embryonic stem cells into myocardial cells. *PNAS* Vol.105, No.48, 18924-18929

Murakami, M., Nguyen, L.T., Zhang, Z.W., Moodie, K.L., Carmeliet, P., Stan, R.V., Simons, M. (2008) The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* 2008;118:3355-3366

Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H. (2006) Pathophysiological Roles of ASK1-MAP Kinase Signaling Pathways *J Biochem Mol Biol* 2007 Jan 31;40(1):1-6

Nath, A.K., Enciso, J., Kuniyasu, M., Hao, X.-Y., Madri, J.A., Pinter, E. (2004) Nitric oxide modulates murine yolk sac vasculogenesis and rescues glucose induced vasculopathy. *Development* 131,2485-2496

Neufeld, G., Sabag, A.D., Rabinovicz, N., Kessler, O. (2012) Semaphorins in Angiogenesis and Tumor Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1): a006718

Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418:96-99 (2002)

Obi, S., Yamamoto, K., Shimizu, N., Kumagaya, S., Masumura, T., Sokabe, T., Asahara, T., Ando, J. (2009) *J Appl Physiol* 106:203-211

Ohura, N., Yamamoto, K., Ichioka, S., Sokabe, T., Nakatsuka, H., Baba, A., Shibata, M., Nakatsuka, T., Harii, K., Wada, Y., Kohro, T., Kondama, T., Ando, J. (2003) Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 10(5):304-13

Ornitz, D.M. und Itoh N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2 (3):reviews 3005.1-3005.12

Pasquale, E.B. (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 2008, 133:38-52

Papetti, M und Herman, I.M.: Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis (2002). *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-C970

Park, C., Afrikanova, I., Chung, Y.S., Zhang, W.J., Arentson, E., Fong, G., Rosendahl, A., Choi, K. (2004) A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development* 2004;131:2749-2756

Park, K.W., Morrison, C.M., Sorenson, L.K., Jones, C.A., Rao, Y., Chien, C.B., Wu, J.Y., Urness, L.D., Li, D.Y. (2003) Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial

cell migration. *Dev. Biol.* 261, 251-267

Pasquale, E.B. (2005) Eph receptor signaling casts a wide net on cell behavior. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:462-475.

Patel-Hett, S und **D'Amore**, P.A. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int. J. Dev. Bio.* 55:353-363

Phng, L.K. und **Gerhardt**, H. (2009) Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 16: 196-208

Plate, K.H. und **Warnke**, P.C. (1997) Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 35(3):365-72

Prud'homme, G.J. und **Glinka**, Y. (2012) Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* Vol. 3, No. 9

Quinn, T.P., **Schlueter**, M., **Soifer**, S.J., **Gutierrez**, J.A. (2002) Mechanotransduction in the Lung Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L897-L903

Rangaswami, H., **Marathe**, N., **Shunhui**, Z., **Chen**, Y., **Yeh**, J.-C., **Frangos**, J.A., **Boss**, G.R., **Pilz**, R.B. (2009) Type II cGMP-dependent Protein Kinase Mediates Osteoblast Mechanotransduction. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.284, No.22pp. 1476-14808

Reckova M, **Rosengarten** C, **deAlmeida** A, **Stanley** CP, **Wessels** A, **Gourdie** RG, **Thompson** RP, **Sedmera** D. Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circ Res.* 2003 Jul 11;93(1):77-85.

Regev, A., **Goldman**, S., **Shalev**, E. (2007) Semaphorin-4D (Sema4D), Plexin-B1 ligand, is involved in mouse ovary follicular development. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007, 5:12

Resnick, N., **Collins**, T., **Atkinson**, W., **Bonthron**, D.T., **Dewey**, C.F.jr., **Gimbrone**, M.A.jr. (1993) Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4591-4595

Ribatti, D. und **Crivellato**, E. (2012) "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental Biology* Vol.372, Issue 2, 157-165

Ribatti,D., **Vacca**,A., **Nico**,B., **Roncali**,L., **Dammacco**,F. (2001). Postnatal vasculogenesis. *Mech.Dev.* 100, 157-163.

Risau, W., **Sariola**, H., **Zerwes**, H.G., **Sasse**, J., **Ekblom**, P., **Kemler**, R., **Doetschman**, T. (1988) Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102:471-478

Rolny C, **Nilsson** I, **Magnusson** P, **Armulik** A, **Jakobsson** L, **Wentzel** P et al. Platelet-derived growth factor receptor-beta promotes early endothelial cell differentiation. *Blood* 2006; 108(6):1877-1886.

Rossi, D.J. und **Weissman**, I.L. (2006) *Pten*, Tumorigenesis, and Stem Cell Self-Renewal. *Cell* Vol.125, Issue 2, 229-231

Saha, N., **Himanen**, J.-P., **Dimitar**, N.B. (2007). Cell-Cell Signaling via Eph Receptors and

Ephrins. *Curr Opin Cell Biol* 2007, 19:534-542

Sanchez-Esteban J, Cicchiello LA, Wang Y, Tsai SW, Williams LK, Torday JS und Rubin LP (2001). Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. *J Appl Physiol* 91, 589–595.

Sauer, H., Rahimi, G., Hescheler, J., Wartenberg, M. (2000) Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 476, 218-223

Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186

Schmelter, M., Athegang, B., Helmig, S., Wartenberg, M., Sauer, H. (2006) Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducer of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J* 20,E294-E306

Schneider, J.C., El Kebir, D., Chereau, C., Lanone, S., Huang, X.L., Buys Roessingh, A.S., Mercier, J.C., Dall'Ava-Santucci, J., Dinh-Xuan, A.T. (2003) Involvement of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol* 248:H2311-H2319

Schöler H.R. Das Potential von Stammzellen in: P. Dabrock u. J. Ried (Hrsg.); Therapeutisches Klonen als Herausforderung für die Statusbestimmung des menschlichen Embryos. Verlag mentis, Paderborn 1. Auflage S.31-35 (2005)

Seng Ch'ng, E. und Kumanogoh, A. (2010) Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression. *Molecular Cancer* 2010,9:251

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.

Sheldon, H., Andre, M., Legg, J.A., Heal, P., Herbert, J.M., Sainson, R., Sharma, A.S., Kitajewski, J.K., Heath, V.L., Bicknell, R. (2009) Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated *via* WASP and other actin nucleation-promoting factors. *FASEB J.* 23, 513-522

Shiu, Y.-T., Weiss, J.A., Hoying, J.B., Iwamoto, M.N., Joung, I.S., Quam, C.T. (2005) The Role of Mechanical Stresses in Angiogenesis (2005) *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 33(5):431-510

Sierra, J.R., Corso, S., Caione, L., Cepero, V., Conrotto, P., Cignetti, A., Piacibello, W., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Comoglio, P.M., Tamagnone, L., Giordano, S. (2008) Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.* Vol. 205 No. 7, 1673-1685

Smith, P.G., Roy, C., Fisher, S., Huang, Q.-Q., Brozovich, F. (2000) Cellular Responses to Mechanical Stress Selected Contribution: Mechanical strain increases force production and calcium sensitivity in cultured airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 89:2092-2098

Smith, A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 17, 435-462.

- Song, J.W. und Munn, L.L.** (2011) Fluid forces control endothelial sprouting. *PNAS* Vol. 108, No. 37, 15342-15347
- Stone, J.R., Collins, T.** (2002). The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 9, 231-238.
- Stokes, I.A., Mente, P.L., Iatridis, J.C., Farnum, C.E., Aronsson, D.D.** (2002) Growth plate chondrocyte enlargement modulated by mechanical loading. *Stud Health Technol Inform* 88, 378-381
- ten Freyhaus, H., Huntgeburth, M., Wingler, K., Schnitker, J., Baumer, A.T., Vantler, M., Bekhite, M.M., Wartenberg, M., Sauer, H., Rosenkranz, S.** (2006). Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. *Cardiovasc Res* 71, 331-341.
- Thomas, K.A.** (1987) Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1987;1:434-40
- Thomas E.D., Lochte H.L., Lu W.C.** (1957). "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy". *New England Journal of Medicine* 157 (11): 491-496.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M.** (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147
- Thurston, G und Kitajewski, J.** (2008) VEGF and Delta-Notch: interacting signaling pathways in tumor angiogenesis. *Br J Cancer* 99(8):1204-9
- Tongers, J., Roncalli, J.G., Losordo, D.W.** (2010). Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res* 79:200-206
- Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y.** (2006) ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Science* 2006;97:697-702
- Tran, Q.K., Leonard, F., Black, D.J., Nadeau, O.W., Boulatnikov, I.G., Persechini, A.** (2009) Effects of combined phosphorylation at ser-617 and ser-1179 in endothelial nitric-oxide synthase on EC50 (Ca²⁺) values for calmodulin binding and enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 284 11892-11899
- Trusolino, L. und Comoglio, P.M.** (2002) Scatter-factor and semaphoring receptors: cell signaling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:289-300
- Tzima, E., Irani-Therani, M., Kiosses, W.B., Dejana, E., Schultz, D.A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., Schwartz, M.A.** (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 15;437(7057):426-431
- Ushio-Fukai, M.** (2006) Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardiovascular Research* 71 (2006) 226-235
- Vasilyev, A., Liu, Y., Mudumana, S., Mangos, S., Lam, P.Y., Majumdar, A., Zhao, J., Poon, K.L., Kondrychyn, I., Korzh, V.** (2009) Collective cell migration drives morphogenesis of kidney nephron. *PLoS Biol* 7 e9

Voronov, D.A., Alford, P.W., Xu, G., Taber, L.A. (2004) The role of mechanical forces in dextral rotation during cardiac looping in the chick embryo. *Dev Biol* 272:339-350

Wall, M.E. und Banes, A.J. (2005) Early responses to mechanical load in tendon: Role of calcium signaling, gap junctions and intercellular communication. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005; 5(1):70-84

Wang, B., Xiao, Y., Ding, B.B., Zhang, N., Yuan, X., Gui, L., Qian, K.X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., Geng, J.G. (2003) Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4, 19-29

Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H. The embryoid body as a novel *in vitro* assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest* 78:1301-1314 (1998)

Yan, Y., Wei, C.-L., Zhang, W.-R., Cheng, H.-P., Liu, J. (2006) Cross-Talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacologica sinica* 2006 Jul; 27 (7): 821-826

Yanagida, E., Shoji, S., Hirayama, Y., Yoshikawa, F., Otsu, K., Uematsu, H., Hiraoka, F., Furuichi, T., Kawano, S. (2004) *Cell Calcium* 36 (2004) 135-146

Yang, R., Amir, J., Liu, H., Chaqour, B. (2008) Mechanical strain activates a program of genes functionally involved in paracrine signaling of angiogenesis. *Physiol Genomics* 36(1):1-14

Ylä-Herttuala, S., Rissanen, T.T., Vajanto, I., Hartikainen, J. (2007) Vascular Endothelial Growth Factors Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine. *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 49, No. 10, 2007

Zarubin, T und Han, J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;15:11-18

Zhuang, X., Cross, D., Heath, V.L., Bicknell, R. (2011) Shear stress, tip cells and regulators of endothelial migration. *Biochem. Soc. Trans.* (2011) 39, 1571-1575

Zhou, W., Yu, W., Xie, W., Huang, L., Xu, Y., Li, X. (2011) The role of SLIT-ROBO signaling in proliferative diabetic retinopathy and retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision* 2011;17:1526-1536

12Publikationen

Tagungsbeiträge

Posterpräsentationen:

Behr S., Sauer H. (2009) **Involvement of Calcium in mechanical strain-induced vascularisation of mouse embryonic stem cells.** *2nd GGL Conference on Life Sciences*

Behr S., Sauer H. (2010) **The meaning of mechanical strain for vasculogenesis of embryonic stem cells.** *3rd GGL Conference on Life Sciences*

Behr S., Sauer H. (2010) **The meaning of mechanical strain for vasculogenesis of embryonic stem cells.** *4th GGL Conference on Life Sciences*

Behr S., Sauer H. (2011) **The meaning of mechanical strain for vasculogenesis of embryonic stem cells.** *90th Annual Meeting of the German Physiological Society. Regensburg, Germany*

Jayarathne S., Sharifpanah F., Behr S., Preissner K., Wartenberg M., Sauer H. (2011) **Stimulation of Vasculogenesis of Embryonic Stem Cells by extracellular t-RNA.** *90th Annual Meeting of the German Physiological Society. Regensburg, Germany.*

Findeisen K., Sharifpanah F., Behr S., Salin F., Milosevic N., Wartenberg M., Sauer H. (2011) **Inhibition of Vasculogenesis of Embryonic Stem Cells by β -Adrenoreceptor Antagonists.** *90th Annual Meeting of the German Physiological Society. Regensburg, Germany.*

Vorträge:

Behr S., Wartenberg M., Sauer H. (2012) **Regulation of angiogenic factors by mechanical strain in mouse embryonic stem cells.** *91th Annual Meeting of the German Physiological Society. Dresden, Germany.*

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Sauer dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit am Physiologischen Institut der Universität Gießen anzufertigen. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. H. Sauer für die interessante Aufgabenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie die vielfältige Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Großer Dank gilt meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe, den aktuellen wie den ehemaligen, die mit einem gekämpft, gelitten und gejubelt haben. Danke Elham, Yu-Han, Febina, Lena, Vicky, Fatjon, Steffi, Sepali, Nada und Sabine. Auch und ins besondere für die Aktivitäten abseits von Pipetten, Zellen und Mikroskop. Ein besonderer Dank gebührt Barbara, der Frau hinter den Kulissen, die durch ihre Arbeit in der Zellkultur den Grundstein für die tägliche Arbeit legt und dabei immer wieder den ein oder anderen Wunsch berücksichtigt.

Bedanken möchte ich mich zudem bei den Kollegen im Haus für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre.

Ein gesonderter Dank richtet sich an Eva und Caroline. Dafür das wir seit der Zeit des Studiums das Ding zusammen durchziehen und selbst während der Erstellung unserer jeweiligen Doktorarbeiten noch Leidensgenossen geblieben sind, die sich gegenseitig immer wieder den Tritt in eine gewisse Region gegeben haben.

Mein größter Dank richtet sich jedoch an meine gesamte Familie und all meine Freunde. Ihr habt immer an mich geglaubt und mir so die Unterstützung gegeben die mich immer getragen hat. Ihr alle wart in der Zeit der Doktorarbeit immer da wo ich euch brauchte, neben mir als Weggefährten oder hinter mir als Stütze.