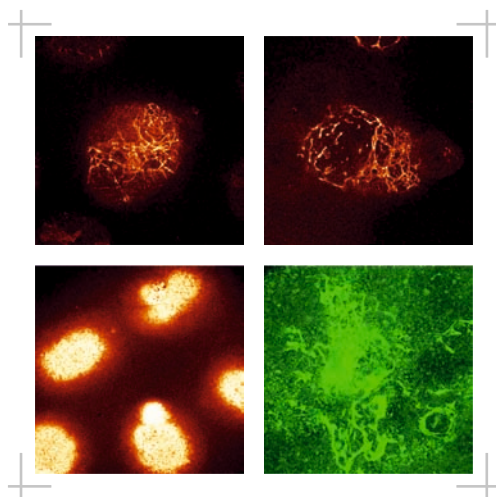


Die anti-angiogene Wirkung von β -Blockern auf die Vaskulogenese embryonaler Stammzellen der Maus

Fatjon Saliu



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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

1. Auflage 2014

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

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Die anti-angiogene Wirkung von β -Blockern
auf die Vaskulogenese embryonaler
Stammzellen der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Fatjon Saliu

aus Durres / Albanien

Gießen 2014

**Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sauer

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Alzen

Tag der Disputation: 13. November. 2014

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.“

Gießen, den 19.05.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
1. Einleitung	1
1.1 Stammzellen	1
1.1.1 Embryonale Stammzellen	2
1.1.2 Embryonale Keimzellen	3
1.1.3 Adulte Stammzellen	4
1.2 Vaskulogenese und Angiogenese	4
1.3 Endothelzellen	6
1.4 Hämangiom	7
1.5 β -Rezeptoren und β -Rezeptor-Blocker	10
1.6 Reaktive Sauerstoffspezies	13
1.6 Stickstoffmonoxid	14
1.7 Wachstumsfaktoren	15
1.7.1 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	16
1.7.2 Fibroblasten Wachstumsfaktor	16
1.7.3 Blutplättchen Wachstumsfaktor	17
1.7.4 Axon Guidance Proteine	17
1.8 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Firmen	21
2.1.2 Geräte und Laborbedarf	22
2.1.3 Chemikalien und Substanzen	23
2.1.4 Antikörper	24
Primäre Antikörper	24
Sekundäre Antikörper	25
2.1.5 Zellen	26
2.1.6 Medien	26

2.1.7	Puffer	27
2.1.8	β -Rezeptor-Blocker	28
	Propranolol.....	28
	Atenolol.....	29
	ICI 118,551	29
2.1.9	Substanzen.....	30
	DCFH-DA	30
	DAF-FM Diacetat	31
	SNAP.....	31
	NMPG	32
	SYTOX Green.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Embryonale Stammzellkultur	33
2.2.2	Feeder-Zellen.....	33
2.2.3	Kultivierung der ES-Zellen	34
2.2.4	Passagieren der ES-Zellen.....	34
2.2.5	Differenzierung der ES-Zellen	35
2.2.6	Behandlung der EBs mit β -Rezeptor-Blockern.....	36
2.2.7	Immunhistochemie	36
2.2.8	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	38
2.2.9	Quantifizierung der Vaskularisierung in EBs.....	39
2.2.10	Toxizitätsprüfung mittels SYTOX Green.....	40
2.2.11	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	40
2.2.12	Nachweis reaktiver Stickstoffmonoxide.....	40
2.2.13	Nachweis von GFP-VEGF-R2 in ES-Zellen.....	41
2.2.14	Western Blot.....	41
2.2.15	Proteinextraktion	42
2.2.16	Gelelektrophorese und Blotten	42

2.2.17	Spezifischer Proteinnachweis	42
2.2.18	Statistik	43
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von ICI 118,551 auf die Vaskularisierung in EBs.....	44
3.2	Untersuchung der Toxizität nach ICI 118,551 Behandlung	46
3.3	Expression von CD 31 und VE Cadherin nach Behandlung mit β -Blockern.....	47
3.3	Bedeutung von ICI 118,551 auf die endogene Generierung von ROS	49
3.4	Expression der NOX 4 nach Behandlung mit β -Blockern	51
3.5	Bedeutung von ICI 118,551 auf die endogene Generierung von NO	51
3.6	Effekt des NO-Donors SNAP auf die Vaskularisierung nach β -Blocker Behandlung.....	53
3.7	p-eNOS Expression nach Behandlung mit β -Blockern	55
3.7.1	Propranolol	55
3.7.2	Atenolol	57
3.7.3	ICI 118,551	59
3.8	Bedeutung von β -Blockern auf die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren	60
3.9	Analyse VEGF-R2 positiver Zellen nach Behandlung mit β -Blockern	64
3.10	Bedeutung von β -Blockern auf die Expression von NRP1, Plexin B1 und HiF-1 α	66
3.11	Bedeutung von β -Blockern auf die Expression von FGF 2 und PDGF-BB	69
4.	Diskussion.....	72
4.1	Untersuchung der Vaskulogenese nach β -Blocker-Applikation	73
4.2	Einfluss von ROS und NO auf die Vaskulogenese	74
4.3	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Vaskulogenese.....	76
4.3.1	Einfluss von VEGF	76
4.3.2	Einfluss von FGF	78
4.3.3	Einfluss von PDGF	78
4.4	Ausblick auf die Forschung mit β -Blockern	79
5.	Zusammenfassung	81
6.	Summary	82
7.	Literaturverzeichnis	83
8.	Danksagung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>(Bedeutung)</i>
°C	- Grad Celsius
Akt	- Proteinkinase B
ADH	- antidiuretisches Hormon
ATP	- Adenosintriphosphat
AP	- alkalische Phosphatase
AS-Zellen	- adulte Stammzellen
BH ₄	- Tetrahydrobiopterin
Bidest	- zweifach destilliertes Wasser
BSA	- bovines Serumalbumin
bspw.	- beispielsweise
ca.	- circa
Ca ²⁺	- bivalentes Kalziumion
CaM-Kinase II	- bivalente Kalziumion-Calmodulin abhängige Proteinkinase II
cAMP	- zyklisches Adenosinmonophosphat
CD31	- Syn. PECAM = Blutplättchen Endothelzell Adhäsionsmolekül
cGMP	- zyklisches Guonodinmonophosphat
CO ₂	- Kohlendioxid
c-Src	- zelluläre Sarkomer Kinase
Cy5	- Indocarbocyanin
DAG	- Diacylglycerol
DCF	- fluoreszierendes 2', 7' -Dichlorfluoreszin
DCFH-DA	- 2', 7' -Dichlorfluoreszin-Diazetat
d.h.	- das heißt
DNS	- Desoxyribonukleotidsäure

DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
EB	-	Embryonalkörper
ECL	-	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	-	Etylendiamintetraacetat
EGF	-	epidermaler Wachstumsfaktor
EMFI	-	embryonale Fibroblasten (Feederzellen)
eNOS	-	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EG-Zellen	-	embryonale Keimzellen
ERK	-	extrazellulär signalregulierte Kinase
ES-Zellen	-	embryonale Stammzellen
et al	-	und andere
etc.	-	et cetera
FAD	-	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FGF	-	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FMN	-	Flavinmononukleotid
FITC	-	Fluoroceinisoithiocyanat
FKS	-	fetales Kälberserum
g	-	Gramm
GDP	-	Guanosindiphosphat
GFP	-	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	-	Guanosintriphosphat
h	-	Stunde
HCl	-	Chlorwasserstoff
HiF-1 α	-	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
H ₂ O	-	Wasser
H ₂ O ₂	-	Wasserstoffperoxid

HOCl	-	hypochlorische Säure
HRP	-	Meerrettichperoxidase
ICI 118,551	-	3-(isopropylamino)-1-[(7-methyl-4-indanyl)oxy]butan-2-ol
IgG	-	Immunglobulin Klasse G
IMDM	-	Basal Iscoves Modified Dulbecco's Medium
iNOS	-	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IL 1 / 6	-	Interleukin 1 / 6
IFN- γ	-	Interferon γ
IP ₃	-	Inositol-1,4,5-triphosphat
JAK	-	Januskinase
JNK	-	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
KCl	-	Kaliumchlorid
kDA	-	kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	-	Kaliumdihydrogenphosphat
LiF	-	Leukämie inhibierender Faktor
M	-	molar
M.	-	Morbus (Krankheit benannt nach Erstbeschreiber)
μ g	-	Mikrogramm
μ l	-	Mikroliter
μ M	-	mikromolar
MAP Kinase	-	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEF	-	mausembryonale Fibroblasten
Mg ²⁺	-	bivalentes Magnesiumion
mg	-	Milligramm
min	-	Minuten
min.	-	mindestens
mM	-	millimolar

mmol	-	Millimol
NaCl	-	Natriumchlorid
NADPH	-	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	-	Dinatriumhydrogenphosphat
NEA	-	nicht essentielle Aminosäuren
nM	-	nanomolar
NO	-	Stickstoffmonoxid
nNOS	-	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS	-	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX 4	-	NADPH-Oxidase 4
NRP 1 / 2	-	Neuropilin 1 / 2
O ₂	-	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	-	Superoxid-Anion
OH [•]	-	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	-	Peroxynitrit
PBS-T	-	Phosphat gepufferte Lösung mit Triton
PDGF-BB	-	Blutplättchenwachstumsfaktor BB
PECAM	-	Blutplättchen Endothel Adhäsionsmolekül
pH	-	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PIGF	-	plazentaler Wachstumsfaktor
PI3-Kinase	-	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	-	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKG	-	Proteinkinase G
PKC	-	Proteinkinase C
PLC	-	Phospholipase C
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	-	Pyrophosphat

RNS	-	Ribonukleinsäure
ROS	-	reaktive Sauerstoffspezies
RT	-	Raumtemperatur
RTK	-	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	-	Sekunde
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
shc	-	Adaptorprotein für MAP-Kinasen
SNAP	-	(±)-S-Nitroso-N-acetylpenicillamine
sog.	-	sogenannte(e)
STAT 3	-	Signaltransduktion und Aktivierung von Transkription 3
Syn.	-	Synonym
TBS-T	-	Tris gepufferte Salzlösung mit Triton-100 oder Tween-20
TGF- α / β	-	transformierender Wachstumsfaktor α / β
TNF- α	-	Tumornekrosefaktor α
UV-Strahlung	-	ultraviolette Strahlung
ua.	-	unter anderem
usw.	-	und so weiter
VE-Cadherin	-	vaskuläres endotheliales Cadherin
VEGF	-	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGF-R1 / 2	-	VEGF-Rezeptor 1 / 2
vWF	-	von Willebrand Faktor
z.B.	-	zum Beispiel
ZNS	-	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Die Isolation embryonaler Stammzellen	2
Abb.1.2: Stadien der Gefäßneubildung	5
Abb.1.3: Bilder eines Hämangiompatienten unter Propranolol-Behandlung.....	9
Abb.1.4: Mechanismen der Signaltransduktion nach β -Rezeptor-Stimulation	12
Abb.1.5: Grundstruktur von β – Blockern.....	13
Abb.1.6: Darstellung von Axon Guidance Proteinen	19
Abb.2.1: Strukturformel von Propranolol.....	28
Abb.2.2: Strukturformel von Atenolol	29
Abb.2.3: Strukturformel von ICI 118,551	29
Abb.2.4: Strukturformeln der verschiedenen Übergangsformen des ROS-Indikators.....	30
Abb.2.5: Strukturformeln der verschiedenen Übergangsformen.....	31
Abb.2.6: Strukturformel von SNAP	32
Abb.2.7: Strukturformel von NMPG.....	32
Abb.2.8: Strukturformel von Sytox Green	33
Abb.2.9: CELLSPIN System Einheit zur Bildung von 3-dimensionalen Zellaggregaten (EBs) mit magnetischem Rührstab zu Vermeidung von Verklumpung.	35
Abb.2.10: EBs zusammengesetzt aus ES-Zellen der Maus:.....	35
Abb.2.11: Prinzip der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie	39
Abb.3.1 Vaskularisierung eines 10 Tage alten EBs	44
Abb.3.2: Konzentrationsabhängiger Effekt von ICI 118,551.....	45
Abb.3.3: Nachweis möglicher toxischer Effekte von ICI 118,551	47
Abb.3.4: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von CD 31	48
Abb.3.5: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von VE-Cadherin	49
Abb.3.6: Nachweis der ROS-Generierung nach einer 24 h ICI 118,551 Behandlung der EBs.	50
Abb.3.7: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von NOX 4.....	51
Abb.3.8: Nachweis der NO-Generierung nach einer 24 h ICI 118,551 Behandlung der EBs.	52
Abb.3.9: Aufhebung des antiangiogenen Effekts von β -Blockern durch den NO-Donor SNAP.	54

Abb.3.10 a: Der zeitabhängigige Einfluss von Propranolol (10 μ M).....	55
Abb.3.10 b: Der zeitabhängigige Einfluss von Propranolol (10 μ M)	56
Abb.3.11 a: Der zeitabhängigige Einfluss von Atenolol 10 μ M auf die eNOS Phosphorylierung.....	57
Abb.3.11b: Der zeitabhängigige Einfluss von Atenolol (10 μ M) auf die eNOS Phosphorylierung.....	58
Abb. 3.12 a: Der zeitabhängigige Einfluss von ICI 118,551 (1 μ M) auf die eNOS- Phosphorylierung.....	59
Abb. 3.12b: Der zeitabhängigige Einfluss von ICI 118,551 (1 μ M) auf die eNOS Phosphorylierung.....	60
Abb. 3.13: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von VEGF165.	61
Abb. 3.14: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Phosphorylierung von VEGF-R2.	62
Abb. 3.15: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Phosphorylierung von VEGF-R2.	63
Abb. 3.16: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von VEGF-R1.	64
Abb. 3.17: Zeitabhängiger Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die VEGF-R2 Expression in differenzierten Stammzellen.....	65
Abb. 3.18: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von NRP 1.....	67
Abb. 3.19: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von Plexin B1.....	68
Abb. 3.20: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von HIF-1 α	69
Abb. 3.21: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von FGF 2.	70
Abb. 3.22: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von PDGF-BB.....	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.: Fluorochrome der konjugierten sekundären Antikörper und ihre Absorptions – und Emissionsmaxima.....	37
Tab. 2.2.: Übersichtsprotokoll der Immunfärbungen.....	37
Tab. 2.3.: Übersichtsprotokoll der Immunfärbungen mittels Western-Blot-Verfahren.....	43

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

Die Stammzellforschung hat besonders im letzten Jahrzehnt große Fortschritte in ihrer Entwicklung gemacht. In sie setzt man große Hoffnung um bisher unheilbare Krankheiten therapierbar zu machen. Weiterhin soll sie der Arzneimittelerprobung zu Gute kommen, sowie das Verständnis über physiologische und biochemische Abläufe im Organismus verbessern. Trotz dieser guten Perspektiven wird das Thema ethisch und politisch kontrovers diskutiert. Die Isolation von Mäusestammzellen gelang vor mehr als 30 Jahren, 1998 gelang erstmalig die Isolation von humanen Stammzellen (Thomson et al., 1998). In Deutschland ist die Isolation von humanen Stammzellen derzeit untersagt.

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die über die Fähigkeit verfügen sich je nach Stimulation in verschiedene organspezifische Zelltypen zu differenzieren. Man unterscheidet totipotente, pluripotente sowie multipotente Stammzellen. Totipotente Stammzellen kommen in der Zygote vor und verfügen über die Fähigkeit sich in jede beliebige Körperzelle zu differenzieren. Pluripotente Stammzellen werden während des Blastozystenstadiums aus dem Embryoblasten gewonnen und stehen anschließend zur *in vitro* Kultivierung zur Verfügung (Rasmussen T.P., 2003). Theoretisch sind sie ähnlich der totipotenten Stammzellen in der Lage, sich in Zellen aller 3 Keimblätter zu differenzieren, jedoch ohne die Fähigkeit funktionierende Organismen zu formen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass keine Trophoblasthülle vorhanden ist (Wobus et al., 2002). Multipotente Zellen können sich nur in eine bestimmte Anzahl von Zelltypen differenzieren. Zudem stellt die Isolierung und Kultivierung eine große Herausforderung dar. Folgende Stammzellen kommen in der Forschung zum Einsatz:

- **ES - embryonale Stammzellen**
- **EG - embryonale Keimzellen**
- **AS - adulte Stammzellen**

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Bei embryonalen Stammzellen handelt es sich um undifferenzierte pluripotente Zellen, die über die Fähigkeit verfügen sich durch nahezu unbegrenzte Zellteilung zu erneuern. Dieses Verhalten wird in der Literatur auch als Proliferation beschrieben.

Embryonale Stammzellen werden aus einer 4 bis 5 Tage alten Blastozyste gewonnen. Die Blastozyste besteht aus Trophoblast, Blastozystenhöhle (Blastocoel) sowie dem Embryoblast (innere Zellmasse). Der Trophoblast stellt eine die Blastozyste umhüllende Zellschicht dar. Im weiteren Verlauf der Entwicklung entsteht aus dem Trophoblast die später den Fötus ernährende Plazenta. In der Blastozystenhöhle, einem mit einer serösen Flüssigkeit gefüllten Hohlraum, befindet sich der Embryoblast (innere Zellmasse). Die Isolation von embryonalen Stammzellen erfolgt aus der inneren Zellmasse und gelang erstmalig im Jahre 1981 aus Mäusestammzellen (Evans et al., 1981; Martin GR 1981)

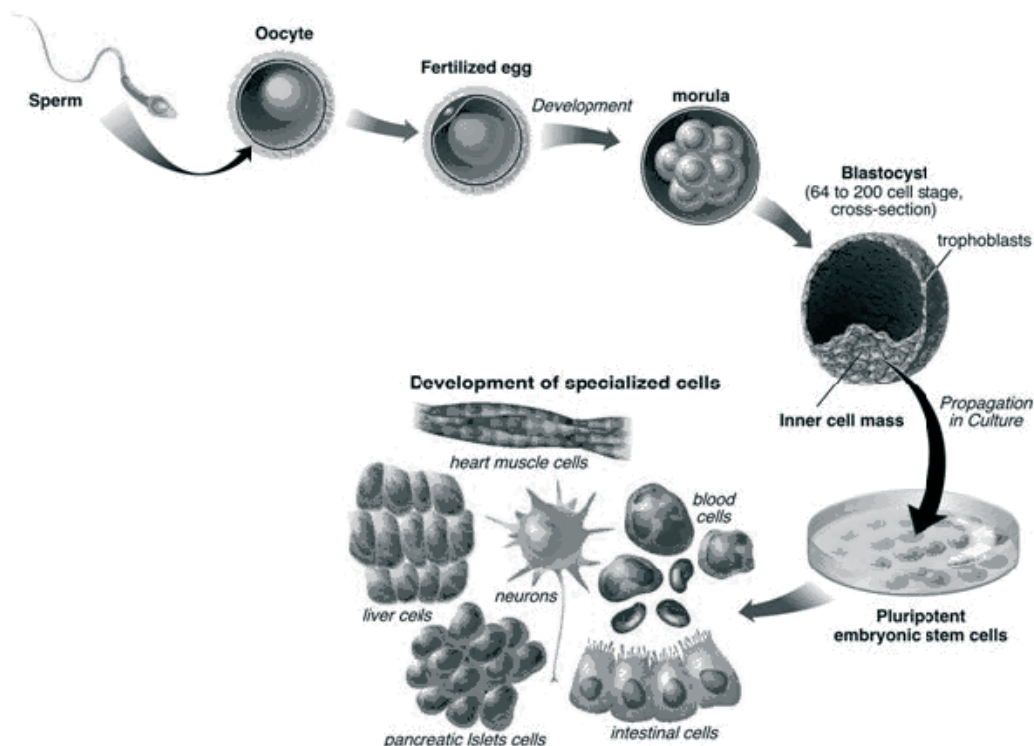


Abb.1.1: Die Isolation embryonaler Stammzellen (Quelle: entnommen aus <http://www.stemcellsforhope.com/Stem%20Cell%20Therapy.htm>)

Nach erfolgreicher Isolation erfolgt die Aussaat auf gelatinisierten Kulturschalen. Für die Zellkultur von embryonalen Stammzellen ist das Vorhandensein von sog. Feedern obligat. Feeder sind embryonale Fibroblasten, deren Zellteilung durch Mitomycin gehemmt wird um ein überschießendes Wachstum zu verhindern. Die Feederzellen erfüllen zahlreiche Aufgaben: Sie dienen als Adhäsionsfläche, versorgen embryonale Stammzellen mit Nährstoffen und verhindern ihre Differenzierung. Würde man ES-Zellen zurück in den Embryoblast injizieren, käme es zu einer Differenzierung. *In vitro* wird dies durch die Anwesenheit von Feederzellen und Lif vermieden (Martin, 1981). Bei Lif handelt es sich um ein Zytokin, welches die Differenzierung von ES hemmt.

Nach der Entfernung von Feedern und Lif lagern sich die ES-Zellen zu 3-dimensionalen Strukturen, sog. EBs zusammen (Doetsmann et al., 1993; Wartenberg et al., 1998). Nun sind die ES-Zellen in der Lage sich in Zellen der 3 Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm oder Entoderm) zu differenzieren (Amit et al., 2000).

Über die Differenzierung von ES-Zellen entscheiden zahlreiche Faktoren. Von entscheidender Bedeutung ist dabei: Die Zusammensetzung des Mediums sowie die Qualität des FKS oder die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren. Zudem wurden zahlreiche Signalwege identifiziert, die Auswirkung auf die Differenzierung von ES haben. Wichtige Signalwege sind z.B. der TGF β , Notch und der JAK/STAT3 Signalweg (Raz et al., 1999; Bader et al., 2000/2001).

1.1.2 Embryonale Keimzellen

Der 5 bis 10 Wochen alte Embryo verfügt über Gonadenanlagen, die sich im weiteren Verlauf zu Hoden oder Ovarien entwickeln. Die Isolation der EG-Zellen (Primordialzellen) erfolgt aus der Gonadenanlage und gelang im Jahre 1994 erstmalig aus Keimanlagen von Mäusen (Stewart et al., 1994). Weitere vier Jahre später gelang die Isolation und Kultivierung von humanen EGs. Als Quelle dienten damals 5 bis 10 Wochen alte Feten aus Schwangerschaftsabbrüchen (Shamblott et al., 1998).

EG-Zellen sind pluripotente Zellen, die sich abgesehen vom Ursprungsgewebe kaum von ES-Zellen unterscheiden. Sie haben ebenfalls die Eigenschaft sich in ekto-, meso- oder

entodermale Zellen zu differenzieren und 3-dimensionale Strukturen, ähnlich der EBs zu bilden.

1.1.3 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind multipotente Stammzellen, die ein geringeres Differenzierungspotential als ES-Zellen oder EG-Zellen aufweisen, d.h. sie können sich nur in Zellen des Keimblattes aus dem sie entstammen, differenzieren. Bereits in den 1960er Jahren entdeckten Forscher im Knochenmark multipotente hämatopoetische Zellen, die über die Fähigkeit verfügten, sich in verschiedene Blutzellen zu differenzieren. In den 1990er Jahren folgte die Entdeckung von multipotenten Stammzellen im ZNS, die befähigt waren, sich in Nervengewebe (z.B. Astrozyten, Oligodendrozyten) zu differenzieren (Iscoe, 1990). Nach derzeitigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass adulte Stammzellen in zahlreichen Organen existieren, z.B. in der Haut, im Darm, in der Leber, im olfaktorischen System, im hämatopoetischen System, in neuronalem Gewebe uvm. (Hochedlinger K. et al., 2009). In den letzten Jahren wurde verstärkt versucht adulte Stammzellen spezifisch zu kultivieren um sie für therapeutische Zwecke zu verwenden, so z.B. für die:

- Regenerierung von Myozyten zur Behandlung des Myokardinfarktes (Vaan Laake et al., 2006)
- Regenerierung dopaminerger Neuronen zur Therapie des Morbus Parkinson (Takagi et al., 2005)
- Regenerierung von insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas zur Therapie des Diabetes Typ I (Roche et al., 2007)

1.2 Vaskulogenese und Angiogenese

Die Gefäßentwicklung ist mesodermalen Ursprungs und stellt einen fundamentalen Bestandteil der Embryogenese dar. Wachstum und Differenzierung erfordern eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen sowie Sauerstoff. Daher ist ein optimal

funktionierendes Gefäßsystem unerlässlich. Nicht nur während der Embryogenese sondern auch im adulten Organismus, spielen Gefäße eine bedeutsame Rolle, sei es bei der Wundheilung, der Regeneration, der Immunabwehr oder auch der Tumorgenese.

Als Vaskulogenese bezeichnet man die primäre Gefäßbildung durch sog. Angioblasten. Der Angioblast ist die mesodermale Vorläuferzelle der Endothelzelle. Nach abgeschlossener Entwicklung kleiden Endothelzellen das Gefäß an der dem Gefäßlumen zugewandten Seite aus und erfüllen dort zahlreiche Funktionen (Risau und Flamme, 1995; Drake, 2003; Joussen A.M. et al., 2003). Im adulten Organismus findet die Neubildung von Gefäßen durch im Blut zirkulierende Angioblasten statt (Ribatti D. et al., 2005).

Als Angiogenese bezeichnet man die Kapillaraussprossung sowie Verzweigung von Gefäßen aus einem bereits existierenden Gefäßsystem. Dazu migrieren Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix. Am Zielort angekommen kommt es zur Proliferation und somit zur Ausbildung neuer Gefäßstrukturen. Wichtig ist zu sagen, dass Vaskulogenese und Angiogenese sowohl im embryonalen als auch im adulten Gewebe stattfinden und sich daher gegenseitig nicht ausschließen, sondern vielmehr ergänzen (Risau, 1997; Joussen A.M. 2003).

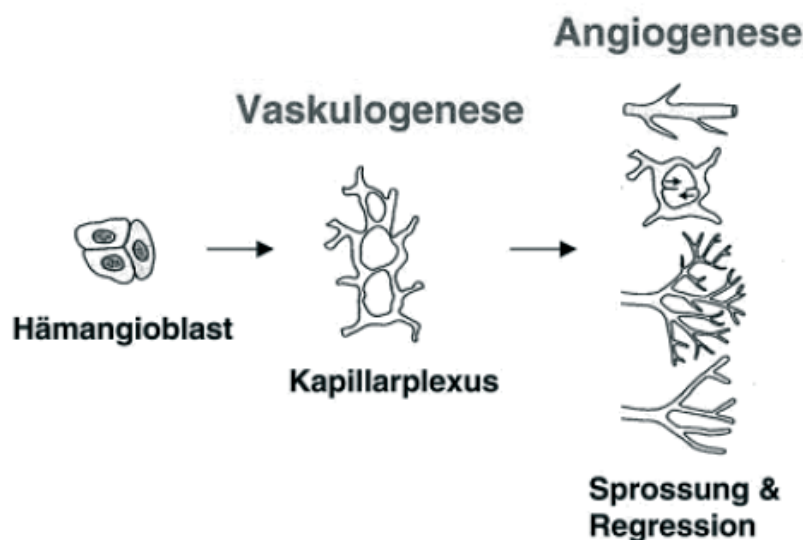


Abb.1.2: Stadien der Gefäßneubildung (entnommen aus Kopp et al., Journal für Kardiologie, 2004)

Die Differenzierung endothelialer Prognitorzellen über den Angioblasten bis hin zu einem reifen Gefäßsystem erfordert das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF,

FGF, VEGF-R2 sowie CD 31 sowie zahlreiche andere pro-angiogene Faktoren (Conway EM. Et al., 2001; Yancopoulos et al., 2000; Schmidt A. et al., 2007). Nach abgeschlossener Vakulo- und Angiogenese kommt es PDGB-BB-abhängig zur Rekrutierung von muralen Zellen, zu denen z.B. sog. Perizyten gehören. Die Perizyten lagern sich auf die Kapillarstrukturen und erhöhen ihre Stabilität im Gewebe (Conway et al., 2001). Reife Endothelzellen sowie ihre Vorläuferzellen verfügen über zahlreiche Oberflächenmarker. Diese stellen funktionell wichtige Proteine dar und sind u.a. für die Identifizierung dieser Zellen anhand einer Immunfärbung unverzichtbar. Typische Oberflächenmarker von Endothelzellen sind z.B. VEGF-R2, CD 31 und VE-Cadherin. VE-Cadherin kommt in der Zonula adherens, einem Adhäsionsgürtel unterhalb der Tight Junctions vor und bewirkt zusammen mit CD 31 die Stabilisierung des Zell-Zell-Kontaktes zwischen Endothelzellen (Schmidt A. et al., 2007).

1.3 Endothelzellen

Gefäße weisen einen dreischichtigen Aufbau auf, man unterscheidet von Innen nach Außen: Intima, Media und Adventitia.

- Die Intima wird von einer einschichtigen, auf einer Basallamina liegenden Endothelzellschicht gebildet. Die Endothelzellen liegen dicht zusammen und sind über Tight Junctions miteinander verbunden.
- Die Media ist die breiteste Schicht und wird aus zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen, sowie elastischen und kollagenen Fasern gebildet. Die glatten Muskelzellen stehen über Gap Junctions miteinander in Verbindung.
- Bei der Adventitia handelt es sich um eine dünne Gewebsschicht, bestehend aus kollagenen und elastischen Fasern, Fibroblasten und sympathischen Nervenfasern. Ihre Funktion besteht in der Einbettung des Gefäßes in das umliegende Gewebe.

(Ulfig, Kurzlehrbuch der Histologie, 2005)

Endothelzellen spielen bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle, indem sie beispielsweise eine Barriere zwischen Blut und Gewebe darstellen und somit den Stoffaustausch regulieren. Über die Aktivierung oder Hemmung von

Gerinnungsprozessen, nehmen Endothelzellen Einfluss auf die Viskosität des Blutes. Beispielsweise synthetisieren Endothelzellen das Glykoprotein vWF, welches in der Gerinnungskaskade einen Komplex mit Gerinnungsfaktor VIII bildet und auf der Endotheloberfläche den Thrombozyten als Adhäsionsort dient (Sadler, 1998). Bei Entzündungsreaktionen wird das Endothel durch Zytokine aktiviert. Daraufhin werden Selektine und Integrine exprimiert, an denen Leukozyten binden um anschließend durch die gelösten Tight Junctions ins Gewebe überzutreten (Diapedese). Bei der Angiogenese migrieren Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix und führen so zu einer Aussprossung von Gefäßen (Risau, 1997). Hervorzuheben ist die Bedeutung der Blutgefäße bei der Regulation des Blutdrucks. Auf der lumengerichteten Seite befinden sich zahlreiche Rezeptoren, z.B. für Acetylcholin, ATP und Histamin, welche PLC vermittelt die eNOS aktivieren. Die eNOS stellt aus der Aminosäure Arginin NO her. Das entstandene NO diffundiert in die glatte Muskelzelle und aktiviert dort eine Guanylylzyklase, die aus GTP das cGMP herstellt und somit im weiteren Verlauf zur Vasodilatation führt. Werden auf der Endothelzelle Rezeptoren für Angiotensin II, ADH oder TGF stimuliert, so führt dies zu einer Ausschüttung von Endothelin aus Endothelzellen. Bindet das Endothelin im weiteren Verlauf an den Endothelin-Rezeptor der glatten Muskelzelle, so erfolgt PLC-vermittelt eine Ausschüttung von Kalzium und somit eine Vasokonstriktion (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005)

1.4 Hämangiom

Das infantile Hämangiom ist ein häufiger, meist gutartiger Tumor aus Blutgefäßen und damit endothelialen Ursprungs (Barnés C.M. et al., 2005). In den meisten Fällen ist das Hämangiom schon bei der Geburt oder wenige Tage danach erkennbar. Die häufigste Hämangiomform stellt das infantile Hämangiom dar, das sich durch ein überschießendes Wachstum von Blutgefäßen, besonders im Bereich der Kapillaren auszeichnet. Die Erkrankung weist eine hohe Inzidenz auf und betrifft ca. 5-10% aller Kleinkinder in Europa (Boscolo E. et al., 2009). Die Lokalisation des infantilen Tumors befindet sich in den überwiegenden Fällen im Kopf- Halsbereich. Das Tumorwachstum, welches charakteristischerweise sehr schnell erfolgt, findet in den meisten Fällen triphasisch statt. Nach dem raschen Wachstum während der ersten Lebensmonate, wird eine stationäre

Phase beobachtet, in der der Tumor sich weder vergrößert noch verkleinert. Um das fünfte Lebensjahr herum, besteht die Möglichkeit der Regression des infantilen Hämangioms oder des Übergangs in ein kavernöses Hämangiom, einen Tumor mit dilatierten Bluträumen (Riede, Werner, Freudenberg, Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie, 2009). Hämangiome führen zu funktionellen und ästhetischen Problemen und trotz der erwähnten Regressionsphase besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Teil der Hämangiome nicht zurückbildet (Cremer H., 2009; Weibel L., 2009). Es gibt zahlreiche Therapieansätze um Hämangiome zu behandeln, doch oft bleibt der Erfolg hinter den Erwartungen zurück.

Bei der Therapie von Hämangiomen haben sich therapeutische Ansätze, wie Lasertherapie, Kryotherapie, chirurgische Entfernung und medikamentös die Gabe von Glukokortikoiden, Vincristin oder Interferon- α -2a bewährt (Grimal I. et al., 2000). Das Jahr 2008 setzte für die Behandlung von Hämangiomen neue Maßstäbe. Damals stellte die französische Arbeitsgruppe um Léauté-Labrèze C. ihre Erfahrungen mit dem unselektiven β -Blocker Propranolol vor (Léauté-Labrèze C. et al., 2008). Wie so oft in der Medizin, war die Entdeckung des β -Blockers als Therapieoption eine Zufallsbeobachtung. Im Kinderkrankenhaus der französischen Stadt Bordeaux wurde damals ein 4 Monate alter Säugling mit einem behandlungsbedürftigen, an der Nase lokalisierten Hämangiom aufgenommen. Die Behandlung erfolgte systemisch mit einem Glukokortikoid, unter dem sich das Größenwachstum des Hämangioms stabilisieren lies, jedoch als Komplikation eine obstruktive hypertrophe Kardiomyopathie auftrat. Die Ärzte waren gezwungen aufgrund der nun im Vordergrund stehenden Herzerkrankung den Säugling mit dem β -Blocker Propranolol zu behandeln. Unter der Propranolol-Therapie konnte innerhalb kurzer Zeit ein Ablassen sowie eine Größenreduktion des Tumors festgestellt werden. Im Alter von 14 Monaten konnte eine fast vollständige Remission erreicht werden, das Hämangiom war beinahe verschwunden (Léauté-Labrèze C. et al., 2008). In weiteren klinischen Studien konnte die Wirksamkeit des Propranolols bei der Behandlung von Hämangiomen bestätigt werden. Trotz alledem handelt es sich hierbei um eine Off-Label-Therapie. Aufgrund der Tatsache, dass der Wirkmechanismus in weiten Teilen noch unbekannt ist, ist die Therapie von Hämangiomen mit Propranolol noch nicht offiziell zugelassen (Cremer H. 2009).



Abb.1.3: Bilder eines Hämangiompatienten unter Propranolol-Behandlung (entnommen aus Léauté - Labrèze C. et al., 2008). A) Ein neun Wochen altes Kind vor der Propranololbehandlung. B) Nach 7 Tagen Behandlung mit Propranolol (Dosis 2 mg/kg pro Tag). C) Das Kind ist mittlerweile 6 Monate alt und bekam täglich 2 mg/kg Propranolol. D) Das Kind ist nun 9 Monate alt, das Hämangiom ist weiter zurückgegangen, die Propranololbehandlung wurde eingestellt.

Histologisch beobachtet man während der Proliferationsphase eine aktive Zellteilung der Endothelzellen. In der Involution hingegen ist eine Apoptose dieser Zellen zu erkennen (Frieden et al., 2005). Mögliche Erklärungen für den Effekt von Propranolol auf infantile Hämangiome könnten die Folgenden sein:

- Da es durch die Anwendung von Propranolol zur Volumenreduktion des Hämangioms kommt, könnte eine verminderte Expression der pro-angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und PDGF den beschriebenen Effekt erklären.
- Das Verschwinden bzw. die Abnahme der Kapillarstrukturen könnte auf die Apoptose von Endothelzellen zurückgeführt werden (Dadras S.S. et al. 2004).

- Nach Propranolol-Applikation ist ein Abblassen der Hämangiome festzustellen, sodass für dieses Phänomen eine Vasokonstriktion der Gefäße diskutiert wird (Léauté-Labrèze C. et al., 2008).
- Der Wachstumsfaktor VEGF verringert die Aktivität des VEGF-R2 und reguliert somit auch die Proliferation der Endothelzellen herunter. Bei infantilen Hämangiomen herrscht jedoch ein umgekehrtes Bindeaffinitätsverhältnis, d.h. VEGF bindet mit einer höheren Affinität an den VEGF-R2 als an den VEGF-R1 und begünstigt somit die unkontrollierte Proliferation von Endothelzellen (Claesson-Welsh L., 2008). Propranolol könnte einen positiven Einfluss auf das Ungleichgewicht zwischen VEGF-R1 und VEGF-R2 haben.

1.5 β -Rezeptoren und β -Rezeptor-Blocker

Dem sympathischen Nervensystem (Sympathikus) werden ergotrope, d.h. leistungssteigernde Effekte zugesprochen. Postsynaptisch verwendet der Sympathikus Adrenalin und Noradrenalin als Transmitter. Die Effekte an den Erfolgsorganen erfolgen über α - und β -adrenerge Rezeptoren. Da in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die β -Rezeptoren geworfen werden soll, werden die α -Rezeptoren nicht näher besprochen. In der Familie der β -adrenergen Rezeptoren unterscheidet man 3 Subtypen. Der β_1 -Subtyp ist überwiegend am Herzen lokalisiert. Bei entsprechender Stimulation des Rezeptors durch Katecholamine, kommt es zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft (positive Inotropie), der Herzfrequenz (positive Chronotropie) sowie der Reizleitungsgeschwindigkeit (positive Dromotropie) und somit zur Steigerung des Herzzeitvolumens. Der β_2 -Subtyp ist auf der glatten Muskulatur exprimiert und führt bei einer Stimulation des Rezeptors zu Effekten auf Blutgefäße, Lunge und Gastrointestinaltrakt. Desweiteren hat eine β_2 -Stimulierung Auswirkungen auf den Stoffwechsel; hier kommt es zu einer verstärkten Glykogenolyse (Leber und Skelettmuskel) sowie Lipolyse (weißes Fettgewebe) und damit einer Bereitstellung von Energiereserven für den Organismus. Den β_3 -Subtyp findet man im braunen Fettgewebe von Säuglingen. Eine Stimulation induziert die Bildung von Thermogenin, eines Entkopplers der Atmungskette, sodass anstelle von ATP die Produktion von Wärme stattfindet (Klinke, Pape, Silbernagl, 2005).

Beim β -Rezeptor handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptortyp, der für die Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere verantwortlich ist. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen aus sieben transmembranären Proteinhelices. Intrazellulär befinden sich 3 Untereinheiten (α -, β - und γ -Untereinheit), weshalb man auch oft von heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren spricht. Für die Funktion ist in erster Linie die α -Untereinheit verantwortlich. Als Besonderheit weist sie eine Bindung mit GDP auf. Bindet der Ligand an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, kommt es zu einer Konformationsänderung der sieben transmembranären Proteinhelices. Nun können die 3 Untereinheiten an den Ligand-Rezeptor-Komplex binden. Die α -Untereinheit hat in Ruhe ein GDP gebunden, das während der Interaktion mit dem Ligand-Rezeptor-Komplex durch GTP ersetzt wird. Daraufhin kommt es zur Dissoziation der GTP-bindenden α -Untereinheit, die im weiteren Verlauf in der Lage ist das Effektorenzym Adenylatzyklase zu aktivieren. Dieses Enzym wandelt ATP in Anwesenheit von Mg^{2+} und unter Abspaltung von PP in cAMP um. Dazu bindet cAMP als sekundärer Botenstoff an die Proteinkinase A, welche nun in der Lage ist Zielproteine zu phosphorylieren und somit aktivierend oder inhibierend auf Signalkaskaden innerhalb der Zelle zu wirken (z.B. Phosphorylierung von Calciumkanälen etc.) (Balligand J. 1999; Penzlin H. et al. 2005; Klinke, Pape, Silbernagl, 2005).

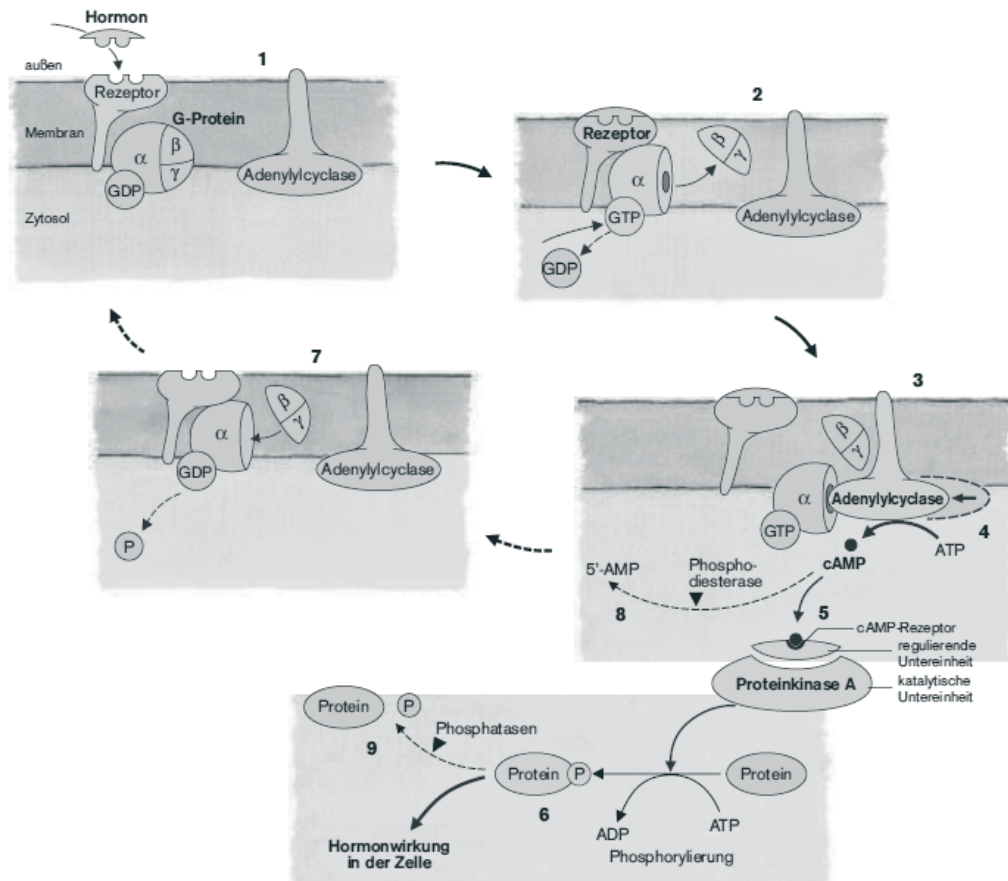


Abb.1.4: Mechanismen der Signaltransduktion nach β -Rezeptor-Stimulation
(entnommen aus Pape, Klinke, Silbernagl, 2005)

Ein zu hoher Sympathikotonus stellt einen pathologischen Zustand dar und kann zu kardiovaskulären Krankheiten führen. Daher wurden zahlreiche Substanzen entwickelt, die Abhilfe leisten sollen: sog. β -Blocker. Bei β -Blockern handelt es sich um Antagonisten des oben beschriebenen Signalwegs, die bspw. in der Kardiologie zur Rhythmusregulierung zum Einsatz kommen. Man unterscheidet 3 verschiedene Subtypen von β -Blockern: die β_1 -Rezeptor-Blocker, die selektiv an den β_1 -Rezeptor binden, z.B. Atenolol, Metoprolol, Bisoprolol. Die β_2 -Rezeptor-Blocker, die spezifisch an den β_2 -Rezeptor binden, z.B. ICI 188,551 sowie die unselektiven β -Blocker, die mit gleicher Affinität sowohl an den β_1 - als auch an den β_2 -Rezeptor binden, z.B. Propranolol. Fast alle β -Blocker besitzen eine einheitliche Grundstruktur aus einem substituierten Phenoxy-Rest, Isopropanol und einem Isopropylamin-Rest:

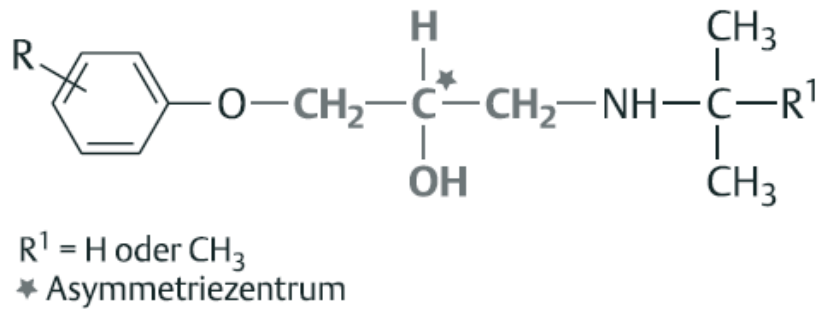


Abb.1.5: Grundstruktur von β – Blockern (entnommen aus Lüllmann, 2006)

In der Kardiologie ist der Einsatz von β -Blockern weit verbreitet. Verwendung finden die Medikamente bei folgenden Krankheitsbildern: Bluthochdruck, chronische Herzinsuffizienz, tachykarde Herzrhythmusstörungen und ischämische Herzerkrankungen (Mehvar R. et al., 2001; Broeders M.A.W. et al., 2000).

1.6 Reaktive Sauerstoffspezies

Im Rahmen des oxidativen Metabolismus entstehen als Nebenprodukt ROS. Bei ROS handelt es sich um freie Radikale oder Moleküle, die zu oxidativem Stress führen können. Zu den Radikalen gehören ua. $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^{\bullet}$ und $\text{NO}^{\bullet}$. Radikale sind durch eine hohe Reaktionsfähigkeit gekennzeichnet und sind in der Lage anderen Molekülen ein Elektron zu entreißen. Dieses Verhalten beruht auf einem ungepaarten Elektron, das sich auf der äußeren Schale von Radikalen befindet und für eine instabile Elektronenkonfiguration sorgt. Die ROS-Radikale benötigen ein weiteres Elektron um vom ungesättigten in den gesättigten Zustand überzugehen (Armitage M.E. et al., 2009; Nagano T., 2009). Entreißt ein Radikal einem anderen Molekül ein Elektron, so fehlt diesem Molekül ein Elektron an seiner äußersten Schale. Es kommt somit ähnlich einer Kettenreaktion immer wieder zu Bildung von neuen Radikalen (Cai und Harrison, 2000). Zudem gibt es weitere ROS die keine Radikale im eigentlichen Sinne sind, aber durch Oxidation von anderen Molekülen zum oxidativen Stress beitragen können. Zu diesen ROS zählt man H_2O_2 , ONOO^- und HOCl . Die ROS-Entstehung findet in Peroxisomen durch viele zytosolische Enzyme wie Cyclooxygenasen, NO-Synthasen, Xanthinoxidasen (Ekelund et al., 1999), NADPH-

Oxidasen (Sorescu et al., 2002) und in der Atmungskette der Mitochondrien statt (Thannickal et al., 2000).

In physiologischen Konzentrationen erfüllen ROS viele wichtige Aufgaben im Organismus. ROS sind Teil der Immunabwehr und finden sich verstärkt in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die beim sog. "oxidative burst" bei der Zerstörung von pathogenen Mikroorganismen und somit Verhütung von Infektionskrankheiten eine herausragende Rolle spielen (Babior; 2000). Da ROS eine gute Löslichkeit und kurze Halbwertszeit aufweisen sowie in den meisten Körperzellen vorhanden sind, eignen sie sich gut als sekundärer Botenstoff (Gabbita et al., 2000). Zahlreiche Publikationen unterstreichen die Rolle von ROS bei der Vaskulogenese. Eine NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Produktion (Ushio-Fukai, 2007) sowie eine ROS-vermittelte erhöhte VEGF-Konzentration in Endothelzellen (Chua et al., 1998), wirken bspw. ausgesprochen pro-angiogen. In zu hoher Konzentration weisen ROS jedoch eine höchst schädigende Wirkung auf. Sie sind in der Lage DNS, Proteine und Lipide zu beschädigen und bspw. Tumorsuppressorgene zu inhibieren oder Onkogene zu aktivieren (Freeman et al., 1982).

Zu den Faktoren, welche die ROS-Produktion erhöhen, zählt man zahlreiche Zytokine, wie IL-1, IL-6, TNF- α sowie IFN- γ (Lassegue et al., 2001). Weitere Stimuli können u.a. Hypoxie (Sauer et al., 2004) und Wachstumsfaktoren sein (Chandel et al., 2001).

Als Schutz vor einer zu hohen ROS-Konzentration stehen dem Körper die Vitamine A, E und C sowie Enzyme wie z.B. die Superoxiddismutase zur Verfügung. Diese wirken als Antioxidantien.

1.6 Stickstoffmonoxid

Das Molekül NO ist ein farbloses, hydrophobes, gelöstes Gas, mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von einigen Sekunden. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften vermag es ungehindert die Plasmamembran zu passieren. Es handelt sich um einen sehr reaktiven Stoff, der in Anwesenheit von Sauerstoff oder Wasser leicht zu Nitrat bzw. Nitrit reagiert (Alberts B. et al. 2005). Durch die angesprochenen Charakteristika eignet sich NO als sekundärer Botenstoff. Bspw. kommt es NO-vermittelt zur Aktivierung der Guanylatzyklase. Dies führt zu einem verminderten Kalziumspiegel und somit zu einer Vasodilatation der glatten Muskulatur in Gefäßen (Daiber und Ullrich, 2002). Weiterhin kann eine NO-Produktion in Myozyten erfolgen, um so bei der Kontraktion des

Herzmuskels modulierend zu wirken (Liu V.W.T. et al. 2008). NO entfaltet seine Wirkung nicht nur im kardiovaskulären System; es nimmt im Nerven- und Immunsystem ebenfalls eine Schlüsselrolle als sekundärer Botenstoff ein (Nagano T. 2009).

Die NO-Produktion erfolgt durch die NOS, von der 3 Isoformen bekannt sind. Es gibt eine eNOS im Gefäßendothel, eine iNOS Form, die in Immunzellen lokalisiert ist und zuletzt eine nNOS, die im Nervensystem zu finden ist. Alle Isoformen katalysieren die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff. Im sauren Milieu kann NO aus Nitrit synthetisiert werden. Diese Reaktion kann durch Desoxyhämoglobin verstärkt werden (Kanno et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression der eNOS nach Behandlung von ES-Zellen mit β -Blockern untersucht werden. Wie bereits erwähnt kommt sie überwiegend in Endothelzellen vor und ist im phosphorylierten Zustand aktiv. Die Bildung der eNOS kann durch Faktoren wie Acetylcholin und Bradykinin induziert werden. Binden diese Faktoren an ihren zugehörigen membranständigen Rezeptor, so wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die eine Ausschüttung von Kalzium begünstigt. Das entstandene Kalzium bindet an die CaM-Kinase II, welche wiederum die eNOS-Produktion induziert. Im nächsten Schritt lagern sich die Kofaktoren FAD und FMN an das entstandene eNOS-Enzym, das nach weiteren Reaktionen mit NADPH, L-Arginin, Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Häm dimerisiert und anschließend NO bildet (Liu V.W.T. et al. 2008; Hirata Y. et al. 2010; Cosentino F. et al. 1999). NO kann nun aus der Endothel- in die glatte Muskelzelle diffundieren und die Guanylatzyklase aktivieren. Die Guanylatzyklase katalysiert die Reaktion von GTP in cGMP. cGMP kann die PKG (cGMP-abhängige Proteinkinase G) aktivieren und somit den Kalziumeinstrom in der glatten Muskelzelle inhibieren. Es kommt zu einer Relaxation der Muskelzelle (Balligand J. 1999).

1.7 Wachstumsfaktoren

Bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um kleine Proteine, die als Signalmoleküle genutzt werden, um Informationen von einer Zelle zur anderen zu befördern. Wachstumsfaktoren haben entscheidenden Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse. Dies ist, wie es der Name schon vermuten lässt, verstärkt in Phasen von Wachstum/Entwicklung von essentieller Bedeutung. Somit spielen diese Faktoren besonders bei der Embryogenese und der damit verbundenen Vaskulo-/Angiogenese eine große Rolle. Es gibt zahlreiche Faktoren, welche

in Vaskulogenese Prozessen involviert sind: z.B. FGF, PDGF, Angiopoietine, TGF- β , TGF- α , VEGF uvm. (Ferrara N. 1999). Die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und PDGF wird in der vorliegenden Arbeit thematisiert. Daher werden diese 3 Faktoren im unten stehenden Abschnitt etwas genauer besprochen.

1.7.1 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

Unter den Wachstumsfaktoren spielt VEGF wohl die wichtigste Rolle in der Signalübertragung von Vaskulogenese Prozessen. VEGF ist ein ca. 45 kDa schweres, pro-angiogenes Protein, das spezifisch in Zellen endothelialen Ursprungs vorkommt. Es handelt sich um einen homodimerisierten, heparinbindenden Wachstumsfaktor (Leung D.W. et al. 1989; Shinkaruk S. et al. 2003). Die Familie der VEGF-Proteine weist zahlreiche Vertreter auf, die allesamt aus einem VEGF-Gen durch alternatives Splicing hervorgehen. Zu nennen wären VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und PlGF (Paz K. et al. 2005; Shibuya M. 2008; Shinkaruk S. et al. 2003). Eine weitere Besonderheit stellt VEGF-A dar, das in 6 Isoformen (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₃₈, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆) vorliegt. Diese Isoformen unterscheiden sich anhand der unterschiedlichen Anzahl von Aminosäuren am C-terminalen Ende und daraus resultierenden zum Teil anderen biologischen Eigenschaften. Alle VEGF-Typen binden an sog. Tyrosinkinase Rezeptoren (VEGF-R), die sich auf der Plasmamembran befinden. Derzeit sind 3 VEGF-Rezeptoren bekannt: VEGF-R1, VEGF-R2 sowie VEGF-R3 (Hiratsuka S et al. 2005; Shibuya M. 2006). In dieser Arbeit wird die Expression von VEGF₁₆₅ untersucht. VEGF₁₆₅ ist ein potenter pro-angiogener Faktor, der z.B. das Zusammenwachsen von Gefäßstrukturen fördert, indem er eine hohe Bindungsaffinität zu VEGF-R1 und VEGF-R2 aufweist (Shibuya M. 2008). Man weiß, dass VEGF-R1 und VEGF-R2 die Proliferation von Endothelzellen stimulieren.

1.7.2 Fibroblasten Wachstumsfaktor

Bei FGF handelt es sich um ein ca. 20 kDa großes Protein, das ähnlich dem VEGF eine große Rolle bei der Signalübertragung von Zellen spielt. Derzeit sind 23 verschiedene Isoformen von FGF sowie 4 Rezeptoren FGF-R 1-4 bekannt, aus denen durch alternatives Spleißen auch andere Formen entstehen können. Die Isoformen FGF1 und FGF2 sind von

besonders großer Bedeutung für vaskuläre Prozesse. Sie stimulieren die Proliferation und Migration von Zellen endothelialen Ursprungs und tragen damit maßgeblich zur Vaskulo-/Angiogenese bei (T.J. Stegman 1998; Ornitz et al., 1996/2001).

1.7.3 Blutplättchen Wachstumsfaktor

Bei PDGF handelt es sich um einen ca. 20 kDa schweren Wachstumsfaktor, der besonders bei der Embryogenese in hoher Konzentration ausgeschüttet wird. Er ist bei der Proliferation und Migration von Endothelzellen beteiligt. Zudem fördert PDGF die Genese zahlreicher Organsysteme wie z.B. des ZNS, der Niere oder Lunge etc. Im adulten Organismus spielt er eine Rolle bei der Wundheilung. Eine Untersuchung ergab, dass PDGF von zahlreichen Zellpopulationen exprimiert wird, bspw. von Fibroblasten, glatten Muskelzellen im Gefäßsystem, Endothelzellen, Thrombozyten sowie Neuronen (Heldin und Westermarck 1999). Zur PDGF-Familie gehören die Isoformen PDGF-A, -B, -C und -D (Heldin et al. 1985, Gilbertson et al. 2001, Bergsten et al. 2001). Die PDGF Isoformen lagern sich als Homodimere zusammen und sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Als Besonderheit können PDGF-A und PDGF-B Heterodimere bilden. Die Signalleitung von PDGF wird durch zwei Tyrosin-Kinase Rezeptoren (PDGF-R) vermittelt. Es sind die 2 Isoformen PDGF- α und PDGF- β bekannt. Der PDGF- α -Rezeptor kann die Isoformen PDGF-AA, -BB und -AB binden; der PDGF- β -Rezeptor weist im Unterschied dazu eine höhere Affinität für die Isoformen -BB und -AB auf. Bindet der Ligand an seinen zugehörigen PDGF-Rezeptor, dimerisiert dieser und es kommt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors. Nun erfolgt eine Signalkaskade die das Signal ins Zellinnere leitet. Das in dieser Arbeit untersuchte PDGF-BB nimmt großen Einfluss auf die Vaskulogenese und wirkt dabei bspw. mitogen sowie chemotaktisch auf Perizyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Die essentielle Rolle des PDGF-BBs für das Gefäßwachstum während der Embryogenese wurde in zahlreichen Arbeiten beschrieben (Leveen et al. 1994, Soriano 1994, Lindahl et al. 1997).

1.7.4 Axon Guidance Proteine

Axon Guidance Proteine wurden Anfang der 90er Jahre in neuronalem Gewebe entdeckt (Tessier-Lavingne, 1992). Man fand heraus, dass diese Proteine von Neuronen produziert

werden um das Wachstum des Axons zu modifizieren. Sie dienen als Leitstruktur für das Axon und signalisieren somit bspw. bis zu welchem Zielort das Wachstum des Axons erfolgen soll. Nach und nach fand man heraus, dass die Expression von Axon Guidance Proteinen nicht auf das neuronale Gewebe beschränkt ist, sondern auch im vaskulären Gewebe gegeben ist. Mittlerweile ist bekannt, dass Axon Guidance Proteine eine nicht ganz unerhebliche Rolle bei Vaskulogeneseprozessen spielen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt die Einteilung der Axon Guidance Moleküle in folgende Rezeptorgruppen: Neuropiline, Semaphorine und Plexine, Ephrine und EphRs, Slits und Roundabouts, sowie Netrine und UNC5B. Da sich diese Arbeit mit der Gruppe der Neuropiline, Plexine und Semaphorine beschäftigt, wird an dieser Stelle nicht näher auf die anderen Axon Guidance Proteine eingegangen. Trotz alledem ist jedoch festzuhalten, dass ihre Rolle bei der Vaskulogenese nicht vernachlässigt werden kann.

Neuropiline sind transmembrane Glykoproteine (130-140 kDa), die in erster Linie als Co-Rezeptoren für andere Proteine dienen. Die 2 wichtigsten Vertreter sind die Proteine NRP1 und NRP2. Bindungspartner für Neuropiline sind in erster Linie Semaphorine (Kolodkin et al., 1997) sowie Vertreter der VEGF-Familie (Soker et al., 1998). Die Bindung von VEGF-A₁₆₅ an NRP1 führt bspw. zu einer verstärkten Interaktion von VEGF-A₁₆₅ mit dem VEGF-R2 und somit zu einer stärker pro-angiogenen Wirkung. Es gibt zahlreiche Semaphorine, von denen jedoch die Gruppe 3 verstärkt mit NRPs interagiert. Der Hauptrezeptor von Semaphorinen sind Plexine, die in 4 Subgruppen (A bis D) unterteilt werden (Fazzari et al. 2007). Plexine können entweder Semaphorine alleine binden, oder auch in Verbindung mit NRP1 oder NRP2 (Nakamura et al., 2000). Die Interaktion von Plexin B1 mit seinem Liganden Semaphorin 4D induziert die Vaskulogenese (Hua Zhou et al., 2012). Allgemein ist zu sagen, dass die Bindungsinteraktionen zwischen Rezeptoren und Liganden zur Regulation verschiedenster Prozesse wie z.B. Migration, Proliferation, Immunfunktion oder auch Tumorgenese führen können (Liang et al., 2013).

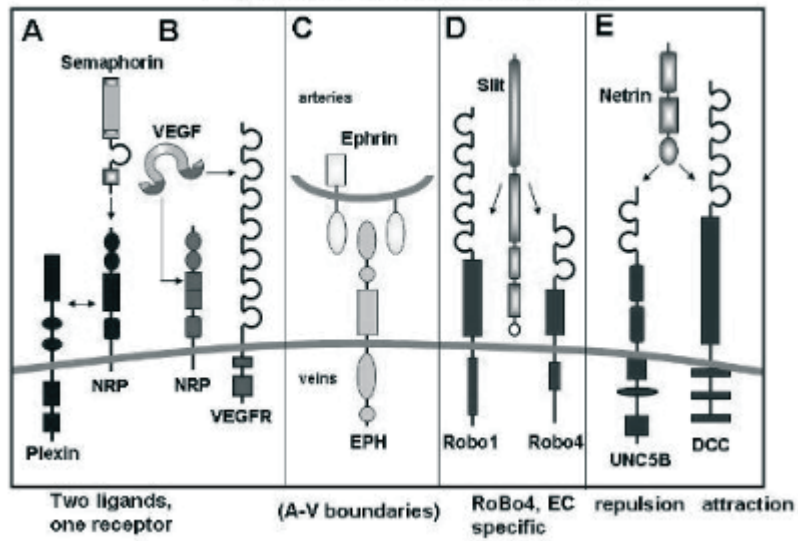


Abb.1.6: Darstellung von Axon Guidance Proteinen der verschiedenen Klassen und ihre Interaktion untereinander. (entnommen aus Klagsbrun und Eichmann 2005)

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Seit mehreren Jahren wird Propranolol erfolgreich bei der Therapie des infantilen Hämangioms eingesetzt. Der Wirkungsmechanismus von Propranolol bei diesem Krankheitsbild ist jedoch bisher nicht ausreichend geklärt. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Propranolol dosis-abhängig die Vaskulogenese embryonaler Stammzellen inhibiert. Da es sich beim infantilen Hämangiom um embryonales Gewebe handelt, kann davon ausgegangen werden, dass vergleichbare Signalwege der Vaskulogenese/Angiogenese auch in ES-Zellen ablaufen. Dabei wird die Wirkung des unselektiven $\beta_{1/2}$ -Rezeptoren-Blockers Propranolol, des selektiven β_1 -Rezeptoren-Blockers Atenolol sowie des selektiven β_2 -Rezeptoren-Blockers ICI-118,551 auf die Vaskulogenese untersucht.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hypothesen untersucht:

- 1) β -Blocker sind in der Lage den Vaskularisierungsgrad von EBs und das Expressionsniveau von Endothelmarkern wie z.B. CD 31 und VE-Cadherin zu vermindern.
- 2) ROS und NOX 4 als pro-angiogene Faktoren werden von β -Blockern beeinflusst.
- 3) NO und eNOS als pro-angiogene Faktoren werden von β -Blockern beeinflusst.
- 4) Pro-angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF₁₆₅, FGF 2 und PDGF-BB werden durch β -Blocker herunter reguliert, es resultiert eine verminderte Vaskulogenese. Weiterhin haben β -Blocker nicht nur einen Einfluss auf das Expressionsniveau von VEGF₁₆₅, sondern auch dessen Rezeptor VEGF-R2 bzw. deren aktiven Form p-VEGF-R2.
- 5) Weitere pro-angiogene Faktoren wie NRP1, Plexin B2 und HIF-1 α werden durch β -Blocker beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Firmen

1. Abcam Limited, Cambridge CB4 OTP, Cambridgeshire, UK
2. Alexis, 35305 Grünberg, Deutschland
3. Ambion Europe Ltd, Huntingdon Cambridgeshire, Großbritannien
4. Amersham Biosciences Europe GmbH, 79111 Freiburg, Deutschland
5. Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
6. Biochrom, 12247 Berlin, Deutschland
7. Biorad GmbH, 80901 München, Deutschland
8. Biozym Scientific GmbH, 31833 Oldendorf, Deutschland
9. Bühler, 72379 Hechingen, Deutschland
10. Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65796 Bad Soden, Deutschland
11. Cell Signaling, 159 J Cummings Center Beverly, MA 01915
12. Chemicon International, Hampshire SO53 4NF, UK
13. Dianova, 20354 Hamburg, Deutschland
14. Dunn Labortechnik, 53567 Asbach, Deutschland
15. Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
16. Gilson International B.V., 65520 Bad Camberg, Deutschland
17. Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
18. Heidolph Elektro GmbH, 93309 Kelheim, Deutschland
19. Heraeus Instruments, 63452 Hanau, Deutschland
20. Hirschmann® Laborgeräte, 74246 Eberstadt, Deutschland
21. Integra Biosciences, 35463 Fernwald, Deutschland
22. Invitrogen, 76131 Karlsruhe, Deutschland
23. Kendro Laboratory Products, 63505 Langenselbold, Deutschland
24. Labnet International Inc., Windsor, Berkshire, United Kingdom
25. Langenbrick, 79312 Emmendingen, Deutschland
26. Leica, 64625 Bensheim, Deutschland
27. Menzel-Gläser, 38116 Braunschweig, Deutschland
28. Merck, 64293 Darmstadt, Deutschland

29. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
30. New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599, USA
31. Paesel- Lorei Vertriebs- und Marketing GmbH, 63452 Hanau, Deutschland
32. Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Deutschland
33. Roth, 76231 Karlsruhe, Deutschland
34. PAA, 35091 Cölbe, Deutschland
35. Promega, 68199 Mannheim, Deutschland
36. Santa Cruz Biotechnologie Inc., Santa Cruz California, USA
37. Sartorius, 37075 Goettingen, Deutschland
38. Schülke-Mayr-GmbH, 22851 Norderstedt
39. Serva, 69115 Heidelberg, Deutschland
40. Sigma (-Aldrich), 82024 Taufkirchen, Deutschland
41. Techne Progene, 97877 Wertheim-Bestenheid, Deutschland
42. Zeiss, 07745 Jena, Deutschland

2.1.2 Geräte und Laborbedarf

Bakteriologische Schalen:	Greiner
Cellspin Rührsystem:	Integra
Gewebekulturschalen:	Falcon, Greiner
Inkubatoren:	HERAcell® 240, Kendro
Konfokales Lasermikroskop:	Leica TCS SP2
Lichtmikroskop:	Zeiss
Objektträger:	Roth
Röhrchen 15ml und 50ml:	Greiner
Petriperm- Schalen:	Greiner
pH- Meter digital:	Sartorius
Pipetten: von	Pipetus®-Standard von Hirschmann® , Glaspipette
	Roth, Plastikpipetten von Becton Dickinson
Schüttler (ProBlot 25XLD Rocker)	Labnet International

Spinnerflaschen:	CELLspin 240, Integra
Sterilbank:	Heraeus
ThermoCycler:	Techne
Wasserbad:	Hirschmann
Zellkulturplatten:	BD Biosciences
Zentrifugen :	Centrifuge 5417C Eppendorf, Heraeus Labofuge 300, Heraeus Biofuge 15R

2.1.3 Chemikalien und Substanzen

Atenolol:	Sigma
Mercaptoethanol:	Sigma
DAF-FM Diacetat:	Invitrogen
DMEM (Iscoves Medium):	Biochrom
DMSO:	Calbiochem
ECL Detektionssystem:	Perbio Science
ESGRO® (LIF):	Chemicon
Fetales Kälberserum (FKS):	Sigma
Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz:	Merck
H ₂ DCF-DA:	Invitrogen
ICI 118,551:	Sigma
Kaliumchlorid:	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat:	Merck
Kupfersulfat:	Merck
L-Glutamin 200 mM (100x):	PAA
Magermilchpulver:	AppliChem
MES Laufpuffer:	Invitrogen
Mitomycin C:	Sigma
Natriumcarbonat:	Roth
Natriumchlorid:	Roth
Natriumhydroxid:	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Serva

Natriumpyruvat (100 mM):	Biochrom
Natrium-Kalium-Tartrat:	Merck
NEA (100x):	Biochrom
NMPG:	Calbiochem
Nonidet P-40:	AppliChem
Penicillin/Streptomycin (100x):	PAA
Ponceau S:	AppliChem
Probenpuffer 4x:	Invitrogen
Protease Inhibitor Cocktail:	BIOCAT
Plasmocin:	Invitrogen
Propranolol:	Sigma
Serumalbumin (BSA):	Sigma
SNAP:	Calbiochem
SYTOX® (Green nucleic acid stain):	Molecular Probes
Triton X-100:	Sigma
Tween-20:	Sigma
Trypsin EDTA:	Invitrogen

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Immunzytochemie

Monoklonaler Ratte-anti -Maus CD31	Chemicon
Monoklonaler Maus-anti-Ziege p-eNOS	Santa Cruz

Western Blot

Monoklonaler Ratte anti-Maus-CD31 (clone 390)	Chemicon
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus Neuropilin 1	Abcam
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus Plexin B1 (H-300)	Santa Cruz

Monoklonaler Maus-anti-FGF2 (clone bFM-2)	Millipore
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus PDGF-BB	Biovision
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus VEGF ₁₆₅	Millipore
Monoklonaler Kaninchen-anti-Maus VEGF-R2	Cell Signaling
Monoklonaler Kaninchen-anti-Maus β -Actin	Cell Signalling
Monoklonaler Maus-anti-Vinculin (clone hVIN-1)	Sigma
Monoklonaler Kaninchen-anti-Maus Phospho-eNOS (Ser1177)	Cell Signaling
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus Phospho-PI3K (Thr458/Tyr199)	Cell Signaling
Polyklonaler Maus-anti-Hif-1 α	Novus
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus VE-Cadherin	BD Pharmingen
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus p-VEGF-R2	Cell Signaling

Sekundäre Antikörper

Immunzytochemie

Cy 5– konjugiert Esel-anti-Ratte IgG	Dianova
Alexa Fluor® 488 – konjugiert Esel-anti-Ratte IgG	Invitrogen
Cy 5-konjugiert Ziege-anti-Ratte IgG	Chemicon
Cy 2 konjugiert Ziege-anti-Maus IgG	Dianova
Cy 5-konjugiert Mouse-anti-Ziege IgG	Dianova

Western Blot

Meerrettichperoxidase-konjugierter Pferd anti-Maus IgG	Cell Signaling
Meerrettichperoxidase-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG	Cell Signaling
Meerrettichperoxidase-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG	Cell Signaling
Meerrettichperoxidase-konjugierter Kaninchen anti-Ziege IgG	Millipore

2.1.5 Zellen

CCE: Bei CCE handelt es sich um eine embryonale Stammzelllinie (ES-Zelllinie), welche aus dem Mäusestamm 129/Sv gewonnen wurde.

Feeder-Zellen: MEF-Zellen (mausembryonale Fibroblasten), auch Feederzellen genannt, wurden aus Feten des Mäusestammes C57BL/6 isoliert.

2.1.6 Medien

EMFI-Medium (Feeder-Medium):

- Dulbecco's Medium (DMEM)
- L-Glutamin 2,0 mM
- NEA 0,1 mM
- FKS (hitzeinaktiviert) 10 %
- Penicillin /Streptomycin 1 %

ES-Zellmedium (LIF-Medium):

- Iscove's Medium (IMDM)
- L-Glutamin 2,0 mM
- NEA 0,1 mM
- Na-Pyruvat 2,0 mM
- β -Mercaptoethanol 0,1 mM
- FKS (aktiv) 7,5 %
- FKS (hitzeinaktiviert) 7,5 %
- ESGRO® (LIF 1000 U/ml) (Maus-Leukämie-inhibierender Faktor (LIF))
- Plasmocin (12,5 μ g/ml)

Differenzierungsmedium (CCE-Medium):

- Iscove's Medium (IMDM)
- L-Glutamin 2,0 mM
- NEA 0,1 mM

- Na-Pyruvat 2,0 mM
- β -Mercaptoethanol 0,1 mM
- FKS (aktiv) 7,5 % (Inaktivierung für 35 min im 56 °C warmen Wasserbad)
- Penicillin / Streptomycin 1 %

Serumfreies Medium (SF-Medium):

Entspricht dem CCE-Medium, jedoch ohne Zusatz von FKS.

2.1.7 Puffer

10x PBS (in H₂O bidest gelöst):

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

1x PBS:

10x PBS wird mit H₂O (bidest) 1:10 verdünnt und mit HCl auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt.

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

Zugabe von 1 ml bzw. 100 μ l des Detergenz Triton X-100 zu 1x PBS.

1x TBS (gelöst in H₂O bidest, pH 7,4):

- | | |
|--------|--------|
| - Tris | 50 mM |
| - NaCl | 150 mM |

0,1 % TBS-T:

Zugabe von 1 ml der Detergenz Tween zu 999 ml 1x TBS.

RIPA-Puffer:

- RIPA-Stammlösung:
- Tris/HCl pH 7,5 50 mM

- NaCl 150 mM
- Nonidet P – 40 1 %
- SDS 0,1 %
- Vor Gebrauch werden zu 1 ml RIPA-Puffer 2µl Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugefügt.

- Protease-Inhibitor-Cocktail: 1 %

- PMSF 1 mM
- EDTH pH 0,8 1mM
- Leupeptin 1 µg/ml
- Pepstatin 1 µg/ml
- Aprotinin 1µg/ml

2.1.8 β -Rezeptor-Blocker

Propranolol

Propranolol (($\pm$)-1-Isopropylamino-3-(1-naphthyloxy)-2-propanol hydrochlorid) ist ein unselektiver β -Rezeptor-Blocker, welcher an β_1 - als auch an β_2 - Rezeptoren binden kann. Es wird vor allem zur Behandlung arterieller Hypertonie und anderen Herzkrankheiten verwendet. Seit mehreren Jahren kommt es als "Off-Label Therapie" infantiler Hämangiome zum Einsatz (Léauté-Labrèze C. et al. 2008).

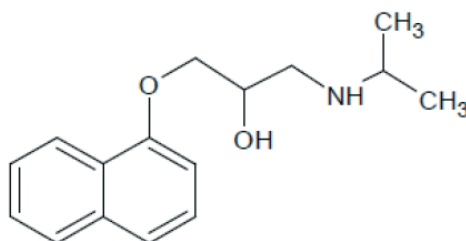


Abb.2.1: Strukturformel von Propranolol

Atenolol

Atenolol ((±)-4-[2-Hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]benzeneacetamid) ist ein selektiver β -Rezeptor-Blocker, der spezifisch an den β_1 -Rezeptor bindet. Es wird ebenfalls zur Behandlung arterieller Hypertonie eingesetzt. Da am Herzen eine besonders hohe Dichte an β_1 -Rezeptoren vorliegt, entfaltet Atenolol eine sehr spezifische und damit nebenwirkungsarme Wirkung. Im Gegensatz zu Propranolol, erfolgt dabei eine sehr geringe Wirkung auf die glatte Bronchialmuskulatur. (Penzlin H. et al. 2005).

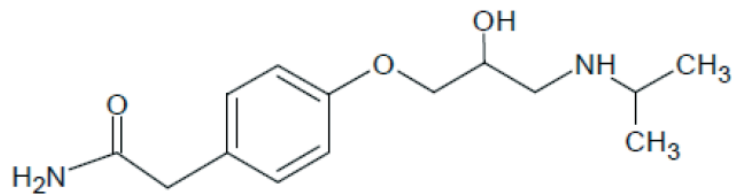


Abb.2.2: Strukturformel von Atenolol

ICI 118,551

ICI 118,551 (3-(isopropylamino)-1-[(7-methyl-4-indanyl)oxy]butan-2-ol) ist ein selektiver β -Rezeptorblocker, der spezifisch an den β_2 -Rezeptor bindet. Es ist derzeit kein therapeutisches Einsatzfeld dieser Substanz bekannt, jedoch kam ICI 118,551 in der Forschung zur Analyse des β_2 -Rezeptors zum Einsatz. (Bilski A.J. et al., 1983).

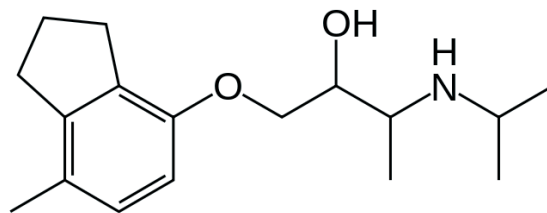


Abb.2.3: Strukturformel von ICI 118,551

2.1.9 Substanzen

DCFH-DA

Bei DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat) handelt es sich um eine zellpermeable, lipophile Substanz mit deren Hilfe Aussagen zur Quantität von intrazellulär produzierten ROS gemacht werden können. Auf dem Wege der Diffusion gelangt das nichtfluoreszierende DCFH-DA in die Zelle und wird durch eine intrazelluläre Esterase im Zytoplasma deacetyliert. Als Resultat entsteht eine weitere nichtfluoreszierende, hydrophile Form, das DCFH. Diese entstandene Substanz ist nicht mehr in der Lage aus der Zelle zu diffundieren. Kommt es zum Kontakt von ROS und DCFH, führt dies zu einer Oxidation des DCFH zu dem Fluorochrom DCF (Hipler U-C. et al. 2002). Im nächsten Schritt kann das entstandene DCF mit Hilfe eines Argon Lasers bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm gemessen werden. Aus der Fluoreszenzintensität kann man ableiten, wie hoch der Gehalt intrazellulärer ROS ist.

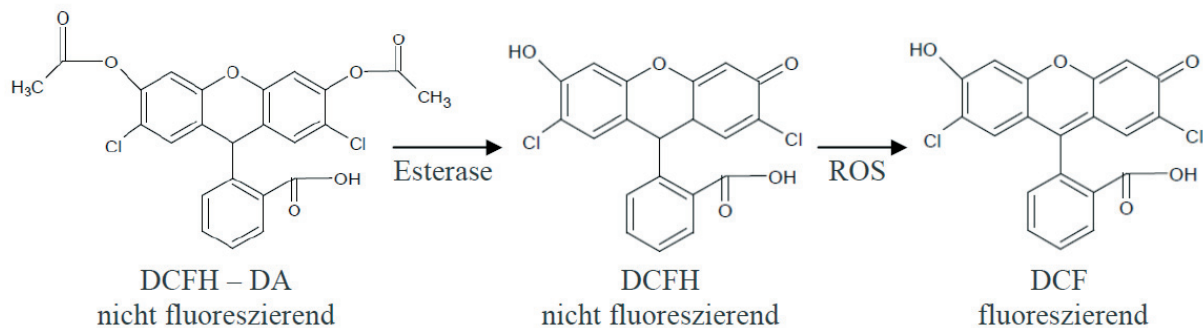


Abb.2.4: Strukturformeln der verschiedenen Übergangsformen des ROS-Indikators DCF: DCFH-DA ist membranpermeabel und zeigt keine Fluoreszenz. Bei DCFH handelt es sich um die reduzierte Form des DCFH-DA, die nicht membranpermeabel ist und ebenfalls keine Fluoreszenz aufweist. DCF entsteht nach Oxidation des DCFH-DA und zeigt Fluoreszenz nach Laserbestrahlung. Es ist nicht membranpermeabel.

DAF-FM Diacetat

Bei DAF-FM Diacetat (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat) handelt es sich um eine zellpermeable Substanz mit deren Hilfe Aussagen zur Quantität von intrazellulär produziertem NO gemacht werden können. Auf dem Wege der Diffusion gelangt das DAF-FM Diacetat ins Zytoplasma und wird von intrazellulären Esterasen hydrolysiert. Produkt der Hydrolyse ist das leicht fluoreszierende DAF-FM, welches nicht mehr in der Lage ist die Zelle zu verlassen. Kontakt von NO mit DAF-FM führt zur Bildung eines Fluorochroms, genauer eines Benzotriazol Derivats. Die Anregung des Benzotriazol-Derivats mittels Argon Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm ruft eine Fluoreszenz hervor, die bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm detektiert werden kann. Rückschlüsse auf die Menge der intrazellulären NO-Menge lassen sich nun anhand der Fluoreszenzintensität ziehen.

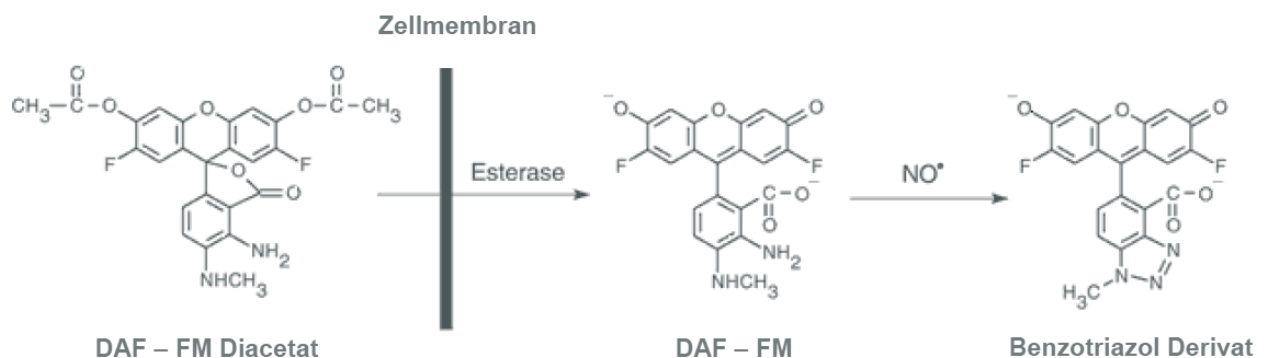


Abb.2.4: Strukturformeln der verschiedenen Übergangsformen des NO-Indikators: DAF-FM Diacetat ist membranpermeabel und zeigt keine Fluoreszenz, DAF-FM ist nicht membranpermeabel und zeigt eine geringe Fluoreszenz. Das Benzotriazol-Derivat ist ebenfalls nicht membranpermeabel und fluoresziert bei 488nm.

SNAP

SNAP ((±)-S-Nitroso-N-acetylpenicillamin) ist ein Nitrosothiol-Derivat und besitzt die Fähigkeit unter physiologischen Bedingungen als NO-Donor zu wirken. Es wirkt *in vitro* als auch *in vivo* vasodilatierend und dient als Aktivator für Lymphozyten sowie der löslichen Guanylatzyklase. Im Vergleich zu anderen NO-Donatoren ist eine geringere NO-

Toleranz beschrieben. SNAP ist ein geeignetes Hilfsmittel um Signalwege mit NO-Beteiligung identifizieren zu können. (Jansen S. et al., 1992, Lander H.M. et al., 1993)

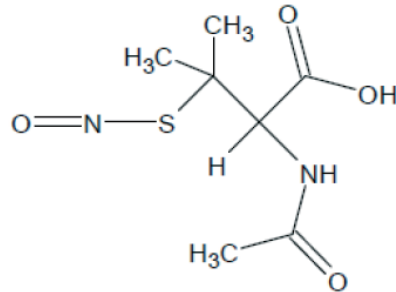


Abb.2.5: Strukturformel von SNAP

NMPG

NMPG (N-(2-Mercapto-propionyl)glycin) ist ein Thiolgemisch, welches mit der Aminosäure Cystein ein Disulfid formt. NMPG ist ein effektiver Radikalfänger, der den ROS-Gehalt innerhalb der Zelle herabsetzen kann. Es wirkt antiperoxidierend, mukolytisch sowie zytoprotektiv. Zudem ist bekannt, dass die Substanz als Substrat für die Glutathion-Transferase dient. (De Flora et al., 1991).

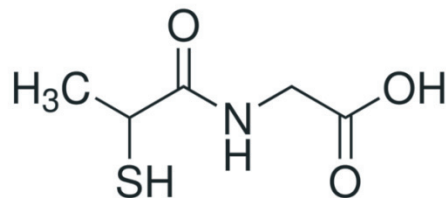


Abb.2.6: Strukturformel von NMPG

SYTOX Green

Bei SYTOX Green handelt es sich um einen hochaffinen DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, der nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringt. Daher lassen sich mit SYTOX Green toxische Effekte von Substanzen auf Zellen nachweisen. Bindet die Substanz an die DNA der beschädigten/toten Zelle, so kommt es bei der

Bestrahlung mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm zu einer Fluoreszenz, mit der man die Anzahl der toten Zellen quantifizieren kann.

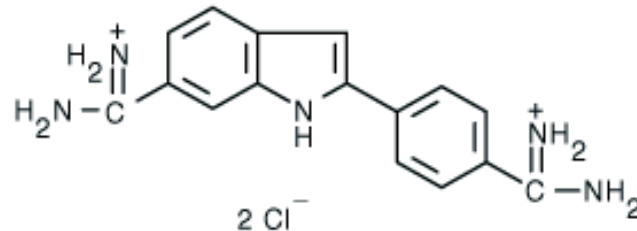


Abb.2.7: Strukturformel von Sytox Green

2.2 Methoden

2.2.1 Embryonale Stammzellkultur

ES-Zellen der Maus werden auf embryonalen Fibroblasten (Feederzellen) kultiviert. Bei Feederzellen handelt es sich um Nährzellen, die als Adhäsionsgrundlage für die Stammzellen dienen. Desweiteren sind Feederzellen in der Lage ES-Zellen zu ernähren sowie ihre spontane Differenzierung zu inhibieren. Letzteres wird mittels Sekretion von Lif gewährleistet. Durch zusätzliche Gabe von Lif wird eine ausreichende Menge im Medium und damit das Verbleiben der ES-Zellen im undifferenzierten Zustand sichergestellt.

2.2.2 Feeder-Zellen

Zellkulturschalen werden mit je 5 ml EMFI-Medium (37 °C) versehen. Die in -196 °C kaltem Stickstoff gelagerten Feederzellen werden im Wasserbad aufgetaut und anschließend in EMFI-Medium überführt, im weiteren Verlauf für 5 min bei 200 g abzentrifugiert, resuspendiert und auf Zellkulturschalen verteilt. Anschließend werden die Zellkulturschalen bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag kommt es zu einer 3-stündigen Inkubation mit einer Mitomycin C haltigen Lösung (10 mg/20 ml). Mitomycin C wirkt antineoplastisch und verhindert ein überschießendes Wachstum der Feederzellen. Diese sog. Inaktivierung der Feederzellen mit Mitomycin C erfolgt im Dunkeln bei einer Temperatur von 37 °C und 6 % CO₂. Anschließend werden die Feeder 3 mal mit je 3 ml

EMFI-Medium gewaschen. Zuletzt erfolgt eine Gabe von 5 ml EMFI-Medium zu den Zellkulturschalen, die bis zur Verwendung am nächsten Tag im Inkubator aufbewahrt werden.

2.2.3 Kultivierung der ES-Zellen

Die ES-Zellen werden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und bei einer Temperatur von 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Nach der Überführung in CCE-Medium werden die ES-Zellen für 5 min bei 200 g abzentrifugiert, in CCE-Medium resuspendiert und anschließend auf Feeder-haltigen Zellkulturschalen verteilt. Es erfolgt die Lagerung im Inkubator unter folgenden Bedingungen: 37 °C, 6 % CO₂ sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %.

2.2.4 Passagieren der ES-Zellen

Erreichen die ES-Zellen eine Konfluenz von ca. 60-70%, kann dies zu Stress, Minderversorgung oder spontaner Differenzierung führen. Daher ist es von großer Bedeutung die ES-Zellen alle 2-3 Tage auf neue Feeder umzusetzen, man spricht von "Passagieren". Um die konfluenten ES-Zellen zu lösen, werden die Zellen mit 2 ml Trypsin (2%) gewaschen und anschließend in 2 ml Trypsin (2%) bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellen resuspendiert und vereinzelt. Um die Reaktion von Trypsin zu stoppen, werden die Zellen mit 5 ml FKS-haltigem CCE-Medium versehen. Nun kann ein Teil der ES-Zellen auf neue Feeder umgesetzt und der andere Teil in eine mit CCE-Medium gefüllte Spinnerflasche überführt werden. Am Folgetag wird die Spinnerflasche mit weiteren 125 ml CCE-Medium befüllt. Täglich wird ca. 200 ml des Mediums gewechselt.

Die Kultivierung der ES-Zellen in den Spinnerflaschen erfolgt bei 37 °C, 6 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Spinnerflaschen gewährleisten eine gleichbleibende Temperatur- und Nährstoffverteilung und verhindern das Verklumpen der Zellen. Im Cell-Spin-System, einem magnetischen Rührantrieb mit 20 Umdrehungen/min und regelmäßigem Richtungswechsel von zwei Glaspendeln, wird das Kulturmedium in ständiger Bewegung gehalten.



Abb.2.8: CELLSPIN System Einheit zur Bildung von 3-dimensionalen Zellaggregaten (EBs) mit magnetischem Rührstab zu Vermeidung von Verklumpung.

2.2.5 Differenzierung der ES-Zellen

In der Spinnerflasche zeigen die ES-Zellen in Abwesenheit von Lif eine spontane Differenzierung in Zellen aller 3 Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm). Desweiteren ist zu beobachten, dass sich die Zellen in kurzer Zeit zu 3-dimensionalen Aggregaten, sog. EBs zusammenlagern. Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, dass Zellen im Allgemeinen die Bestrebung haben, sich in Zellverbänden zusammen zu finden. Nach 3- bzw. 4 tägiger Kultivierung in der Spinnerflasche können die EBs nun entnommen und zur Untersuchung von verschiedenen Fragestellungen verwendet werden.

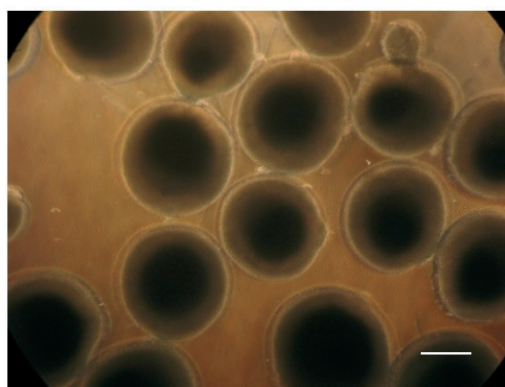


Abb.2.9: EBs zusammengesetzt aus ES-Zellen der Maus: Zu sehen sind dreidimensionale Zellaggregate nach 3-tägiger Kultivierung im Spinner-Flaschen-System (Balken entspricht 300 μm).

2.2.6 Behandlung der EBs mit β -Rezeptor-Blockern

Um den Einfluss von β -Rezeptor Blockern auf die Vaskulogenese zu untersuchen, werden die in CCE-haltigen Zellkulturschalen befindlichen EBs von Tag 3 bis Tag 9 mit Substanzen folgender Konzentrationen behandelt: Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M). Es erfolgt eine tägliche Behandlung parallel zum Mediumwechsel. Ab Tag 10 stehen die EBs für experimentelle Untersuchungen bereit.

2.2.7 Immunhistochemie

In der vorliegenden Arbeit erfolgt der immunhistochemische Nachweis von Endothelzellmarkern sowie phosphorylierten Proteinen (z.B. p-eNOS). Zum Nachweis dienen dabei Antikörper, bei denen es sich um Immunglobuline (IgGs) handelt. Antikörper verfügen über eine hochspezifische Bindungsstelle für das nachzuweisende Antigen. Generell unterscheidet man zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper sind höchst spezifisch, da sie nur ein einziges Epitop auf dem Antigen erkennen und dort binden. Im Vergleich dazu bestehen polyklonale Antikörper aus zahlreichen IgGs, welche auch das gleiche Antigen erkennen, jedoch unterschiedliche Epitope binden. Zudem gibt es 2 Nachweismethoden für den immunhistochemischen Nachweis, den direkten sowie indirekten Nachweis von z. B. Proteinen. Beim direkten Nachweis bindet ein Antikörper an ein Epitop des zu detektierenden Antigens. Der Antikörper verfügt über eine Konjugation mit einer Peroxidase bzw. einem Fluorochrom. Nach erfolgreicher Bindung des Antikörpers ist eine geeignete Substanz in der Lage mit der Peroxidase zu reagieren. Aus dem resultierenden Signal ist nun eine Quantifizierung des Antigens möglich. Bei der von uns verwendeten indirekten Nachweisform ist das Vorhandensein von 2 Antikörpern notwendig. Der primäre Antikörper stellt den spezifischen Teil des Nachweises dar, er bindet an das Antigen. Der sekundäre Antikörper bindet an den primären. In den meisten Fällen ist ein Fluorochrom an den sekundären Antikörper konjugiert. Fluorochrome lassen sich mittels Licht einer spezifischen Wellenlänge anregen, dieses Licht wird dabei absorbiert. Elektronen des Fluorochroms werden angeregt und dabei kurzfristig in ein energiereicheres Orbital angehoben. Die zugeführte Energie wird in Form längerwelliger Photonen freigesetzt. Dieses auch als Emissionslicht bezeichnete Licht kann mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Tab. 2.1.: Fluorochrome der konjugierten sekundären Antikörper und ihre Absorptions – und Emissionsmaxima.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Cy5	650	670
Alexa Fluor® 488	492	520

Immunfärbung:

Für den Nachweis des Vaskularisierungsgrades nach Behandlung mit β -Rezeptor-Blockern werden 10 Tage alte EBs einmal mit 1 x PBS gewaschen sowie anschließend mit eiskaltem 100%igem Methanol bei -20 °C für mindestens 30 min fixiert. Nach erfolgter Fixierung werden die Proben 4-5 mal mit PBS-T 0,01 % gewaschen. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen werden die Proben bei Raumtemperatur mit 10 % FKS in PBS-T 0,01 % inkubiert. In einem weiteren Schritt kommt es zur Inkubation mit dem primären Antikörper für 24 h bei 4 °C. Die Proben werden dann erneut 4-5 mal mit PBS-T 0,01 % gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Zum Abschluss erfolgt erneut eine 4-5 malige Waschung mit PBS-T 0,01 %. Die EBs können nun in 1 x PBS oder PFA 4% bei 4 °C aufbewahrt werden. Nun kann eine Analyse mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie erfolgen.

Tab. 2.2.: Übersichtsprotokoll der Immunfärbungen

1. Fixierung	Für min. 30 min mit eiskaltem 100%igem Methanol
2. Waschen	4-5 mal mit PBS-T 0,01%
3. Blocken	Für 1 h in 10% FKS in PBS-T 0,01%
4. Primärer Antikörper	Ratte-anti-Maus-CD31; 24 h bei 4 °C Kaninchen-anti-Maus p-eNOS (Ser1177); 24 h bei 4 °C
5. Waschen	4-5 mal mit PBS-T 0,01%

6. Sek. Antikörper	Cy5-Esel-anti-Ratte; 1 h bei RT Alexa Fluor® 488-Esel-anti-Ratte; 1 h bei RT Cy5-Ziege-anti-Kaninchen; 1 h bei RT
7. Waschen	4-5 mal mit PBS-T 0,01%
8. Aufbewahrung	In 1 x PBS oder PFA 4%

2.2.8 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie bietet im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie eine erheblich höhere optische Auflösung sowie einen besseren Kontrast. Diese Art der Mikroskopie wird genutzt um Schnitte von dreidimensionalen Strukturen, in unserem Falle von EBs, zu erhalten. Dabei macht man sich die durch Bestrahlung von Fluorochromen entstandene Fluoreszenz zu nutze. Diese kann detektiert und anschließend mittels eines Computerprogrammes quantifiziert werden. Die Bestrahlung der Probe durch einen Laser liegt im Bereich von Millisekunden und ist mit Hilfe einer Lochblende sehr präzise auf einen Punkt fokussiert, sodass die auf diesem Punkt befindlichen Strukturen ungemein scharf dargestellt werden können. Punkte außerhalb des Fokus werden dagegen nur schwach beleuchtet. Das aus der Probe emittierte Licht wird über das Objektiv in umgekehrter Richtung mit Hilfe eines dichroischen Spiegels auf eine Lochblende abgebildet und schließlich an einen Detektor weitergeleitet. Der Einsatz von dichroischen Spiegeln führt zur Trennung von Anregungs- und Emissionslicht, sodass eine bestimmte Wellenlänge des Laserlichts nahezu vollständig auf die Probe und das langwellige Emissionslicht auf das Okular treffen kann. Wie angedeutet, handelt es sich um eine punktförmige Bestrahlung. Um die zweidimensionale Ebene vollständig abbilden zu können, erfolgt die Abtastung der Probe mit einem Raster in x-y-Richtung. Das System verfügt zudem über ein Raster in z-Richtung, sodass die Erfassung dreidimensionaler Strukturen ermöglicht wird. Die erhobenen Daten können digital über eine Software zu einem zwei- bzw. dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden. In unserem Falle kommt das konfokale Laser-Raster-Mikroskop Leica TCS SP2 zum Einsatz. Mit dessen Hilfe sind wir in der Lage folgende Fragestellungen bearbeiten zu können: Antikörperfärbung zur dreidimensionalen Darstellung von Gefäßstrukturen in EBs (CD31),

Detektion von Proteinen wie p-eNOS und VEGF-R2 sowie Live-Messung der Metaboliten NO und ROS.

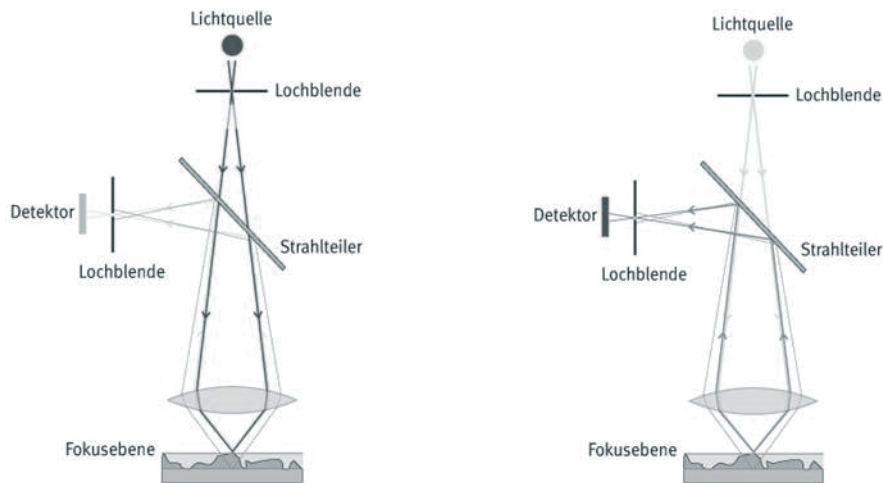


Abb.2.10: Prinzip der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie. Von der Lichtquelle aus gelangt Licht durch den dichroischen Spiegel (hier: Strahlteiler) um auf die Fokusebene zu treffen. Auf dem Rückweg kann das Licht nicht erneut durch den dichroischen Spiegel gelangen, sondern wird von dort aus durch eine Lochblende zum Detektor geleitet. Dies ermöglicht eine hohe Auflösung und damit punktscharfe Abbildung von Objektdetails auf der Fokusebene. (Quelle: Bild entnommen aus Herstellerseite FRT GMBH 2009).

2.2.9 Quantifizierung der Vaskularisierung in EBs

Für die Quantifizierung der Vaskularisierung, wurden die EBs zunächst einer CD 31 Immunfärbung unterzogen und anschließend im konfokalen Mikroskop die vaskulären Strukturen sichtbar gemacht. Dazu wurden 8 Bilder mit einer Schichtdicke von 100µm (Bild zu Bild Abstand von 20µm) in z-Richtung gemacht. Anschließend erfolgte die Überlagerung der Bilder zu einer 3-dimensionalen Projektion der vaskulären Strukturen. Nach Auszählung der mikropillären Verzweigungspunkte in einem EB, erfolgte die Berechnung von Verzweigungspunkten pro mm². In einer Probe wurden ca. 30 EBs ausgezählt, dabei wurden die Werte der Kontrolle als 100% angesehen und mit den Werten der anderen Proben in Relation gesetzt.

2.2.10 Toxizitätsprüfung mittels SYTOX Green

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden die Substanzen Propranolol und Atenolol auf ihre Toxizität untersucht. Dabei konnte eine Toxizität bis zu einer Konzentration von 10 μM nicht nachgewiesen werden. Um die Toxizitätsprüfung der β -Rezeptor-Blocker zu vervollständigen, wird in der vorliegenden Arbeit die Substanz ICI 118,551 auf ihre Toxizität überprüft. Dabei werden EBs von Tag 3 bis Tag 9 mit ICI 118,551 in Zellkulturschalen mit CCE-Medium in den Konzentrationen 500 nM, 1 μM , 5 μM sowie 10 μM inkubiert. An Tag 10 werden die EBs mit 1 nM SYTOX Green in 1x PBS für 10 min bei 37 °C, 6 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert. Eine Positiv-Kontrolle wird mit -20 °C kaltem Methanol fixiert und nach dem vorherigen Muster weiterbehandelt. Nach Abschluss der Inkubation werden alle Proben mit 1x PBS gewaschen. Zuletzt werden alle Proben im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm analysiert.

2.2.11 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

4 Tage alte EBs werden für 24 h mit CCE-Medium und ICI 118,551 der Konzentration 1 μM bzw. eine Probe mit NMPG sowie eine weitere mit ICI+NMPG inkubiert. An Tag 5 erfolgt eine 30 minütige Inkubation mit dem Indikator DCFH-DA. Es wird im Dunkeln gearbeitet, da der Indikator lichtreaktiv ist. Nach 30 minütiger Inkubation mit DCFH-DA werden die EBs mit SF-Medium gewaschen und es erfolgt die Messung der maximalen Fluoreszenzintensität mittels konfokalem Lasermikroskop. Mit dem Argon Laser wird bei einer Wellenlänge von 488 nm die oxidierte DCF Form angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 500-535 nm aufgezeichnet. Die Messung einer Probe wird auf 10 min begrenzt, da übermäßige Laserexposition eine artifizielle ROS Bildung hervorruft.

2.2.12 Nachweis reaktiver Stickstoffmonoxide

4 Tage alte EBs werden für 24 h mit CCE-Medium und ICI 118,551 der Konzentration 1 μM inkubiert. An Tag 5 erfolgt eine 45 minütige Inkubation mit dem Indikator DAF-FM Diacetat bei 37 °C. Bei 2 Proben erfolgt eine SNAP-Gabe 24 bzw. 1 h vor der Inkubation mit DAF-FM. Nach 45 minütiger Inkubation der Proben mit DAF-FM werden die EBs mit

SF-Medium gewaschen und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Dies soll eine vollständige Deesterifizierung des Farbstoffes bewirken. Mit dem Argon Laser wird bei einer Wellenlänge von 488 nm das entstandene Benzotriazol angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 500-535 nm aufgezeichnet.

2.2.13 Nachweis von GFP-VEGF-R2 in ES-Zellen

In diesen ES-Zellen ist der VEGF-R2 an ein GFP Reporterprotein gekoppelt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD. Dr. Voswinckel). GFP kann mittels Argon Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 500-535 nm aufgezeichnet werden. Da GFP am VEGF-R2 gekoppelt ist, dient es als Hilfsmittel um die Expression des VEGF-R2 nach Behandlung mit β -Rezeptor-Blockern zu bestimmen. Dabei erfolgt von Tag 2 bis Tag 9 eine tägliche Behandlung mit folgenden Substanzen: Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M). An Tag 2, 4, 6, 8 und 10 erfolgt die Analyse der Proben mittels konfokalem Lasermikroskop.

2.2.14 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine Nachweismethode für Proteine. Beim sog. Blotting erfolgt zunächst die Trennung einer Proteinprobe mittels Gelelektrophorese. Dabei werden die im Proteingemisch enthaltenen Proteine in verschiedene Banden nach ihrer Größe aufgetrennt. Im nächsten Schritt werden die Proteine mittels Anlegen einer Spannung vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers werden die Proteine kurzfristig durch eine reversible Ponceau Färbung zur Darstellung gebracht. Nach dem Abwaschen der Ponceau Färbung kann eine spezifische Proteindetektion über die indirekte Antikörperfärbung durchgeführt werden. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper kommt ein sekundärer Antikörper zum Einsatz. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, welches mit einer geeigneten Substanz in der Lage ist eine Chemolumineszenz zu erzeugen.

2.2.15 Proteinextraktion

Nach Behandlung mit β -Rezeptor-Blockern werden jeweils ca. 20-30 EBs aus den Zellkulturschalen entnommen und auf Reaktionsgefäße verteilt. Nun erfolgt eine Waschung mit 4 °C kaltem 1x PBS. Im weiteren Verlauf wird 200 μ l RIPA-Puffer, der Protease-Inhibitoren enthält, zu den Proben gegeben, resuspendiert und mittels Pistil homogenisiert. Anschließend werden die Zellen für ca. 30 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wird das Homogenat in einer auf 4 °C heruntergekühlten Zentrifuge für 30 min bei 12000 g zentrifugiert. Abschließend wird der Überstand in neue Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die anschließende Proteinbestimmung erfolgt mittels der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951).

2.2.16 Gelelektrophorese und Blotten

Um die Proteine aufzutrennen, werden die Proben (enthalten jeweils 50 μ g Protein) mit einem Reduktionsmittel der Firma Invitrogen aufbereitet, anschließend für 10 min bei 70 °C denaturiert und schließlich über ein NUPAGE® 4-12 % Gel in einer Gelelektrophoresekommer nach Angaben des Herstellers aufgetrennt. Danach erfolgt der Transfer des Gels mittels XCell II™ Blot Module CE der Firma Invitrogen innerhalb von ca. 90 min. Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers wird die Nitrozellulose-Membran mit einer Ponceau Lösung angefärbt und anschließend mit entsalztem Wasser entfärbt und der Waschvorgang mit TBS-T 0,1 % weitergeführt.

2.2.17 Spezifischer Proteinnachweis

Nach der Waschung mit TBS-T 0,1 %, wird die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulver in TBS-T 0,1 % inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Im Anschluss erfolgt eine erneute mehrmalige Waschung mit TBS-T 0,1 % sowie die Inkubation mit dem primären Antikörper für 24 h bei 4 °C. Am nächsten Tag wird die Membran mit TBS-T 0,1 % wiederholt mehrmals gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper, an den eine Meerrettichperoxidase (MPO) gekoppelt ist, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines selbst hergestellten ECL Systems, bestehend aus RIPA-Puffer, Wasserstoffperoxid, Cumarsäure sowie Luminol. Hierdurch kann die Aktivität der Peroxidase durch eine chemische Reaktion in ein

Lichtsignal umgesetzt werden. Die resultierende Lumineszenz wird mit Hilfe des ChemiDocXRS der Firma Biorad detektiert.

Tab. 2.3.: Übersichtsprotokoll der Immunfärbungen mittels Western-Blot-Verfahren.

1. Blocken	Für 1 h in 5 % Magermilchpulver in TBS-T 0,1 %
2. Waschen	Mehrmalige Waschung mit TBS-T 0,1 %
3. Primärer Antikörper	Siehe Kapitel 3.4.1.
4. Waschen	Mehrmalige Waschung mit TBS-T 0,1 %
5. Sekundärer Antikörper	Siehe Kapitel 3.4.2.
6. Waschen	Mehrmalige Waschung mit TBS-T 0,1 %

2.2.18 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, n steht dabei für die Anzahl der durchgeführten Versuche. Die Darstellung der Resultate erfolgt als Mittelwert in % $\pm$ Standardabweichung in %. Die statistische Signifikanz wurde über das Statistikprogramm ANOVA ermittelt. Dabei wurde $*p < 0,05$ als signifikant, $**p < 0,01$ als sehr signifikant und $***p < 0,001$ als hochsignifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von ICI 118,551 auf die Vaskularisierung in EBs

ES-Zellen lagern sich ab Tag 1 zu EBs zusammen. Die Versorgung dieses Gewebeverbandes wird bis zu Tag 4 über Diffusion sichergestellt. Durch starke mitotische Zellteilung haben die EBs ab Tag 4 eine Größe von ca. 100 bis 300 μm erreicht, bei der eine Versorgung mittels Diffusion nicht mehr ausreicht. Aus diesem Grunde werden Faktoren sezerniert, die die Entstehung eines endothelialen Gefäßsystems begünstigen und somit die Vaskulogenese vorantreiben.

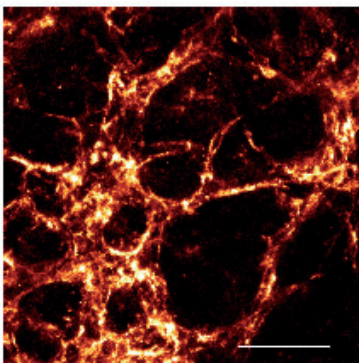


Abb.3.1 Vaskularisierung eines 10 Tage alten EBs. Die Strukturen wurden durch Immunfärbung mittels des Endothelmakers CD 31 zur Darstellung gebracht (Balken 50 μm).

Es ist bekannt, dass es bei zunehmender Differenzierung der ES-Zellen zur vermehrten Ausbildung von vaskulären Strukturen kommt. Dabei wird der Höhepunkt zwischen Tag 8 und Tag 10 erreicht (Lange S. 2008; Sauer H. et al. 2000). Da es sich bei ES-Zellen und dem infantilen Hämangiom um embryonales Gewebe handelt, wurde von der Hypothese ausgegangen, dass Signalkaskaden innerhalb der Vaskulogenese ähnlich ablaufen. Daher wurde untersucht ob die klinisch erzielten Ergebnisse auch *in vitro* reproduzierbar sind.

Dazu wurden EBs von Tag 3 bis Tag 9 mit ICI 118,551 inkubiert. Es wurde eine Konzentrationsreihe (500 nM, 1 μM , 5 μM , 10 μM) durchgeführt. An Tag 10 wurde der Vaskularisierungsgrad der EBs mittels CD31 Färbung sichtbar gemacht. In der Analyse erfolgte die Auszählung der Verzweigungspunkte innerhalb einer Fläche. Weiterhin wurden die Verzweigungspunkte pro mm^2 berechnet und in Bezug zur Kontrolle in Prozent angegeben.

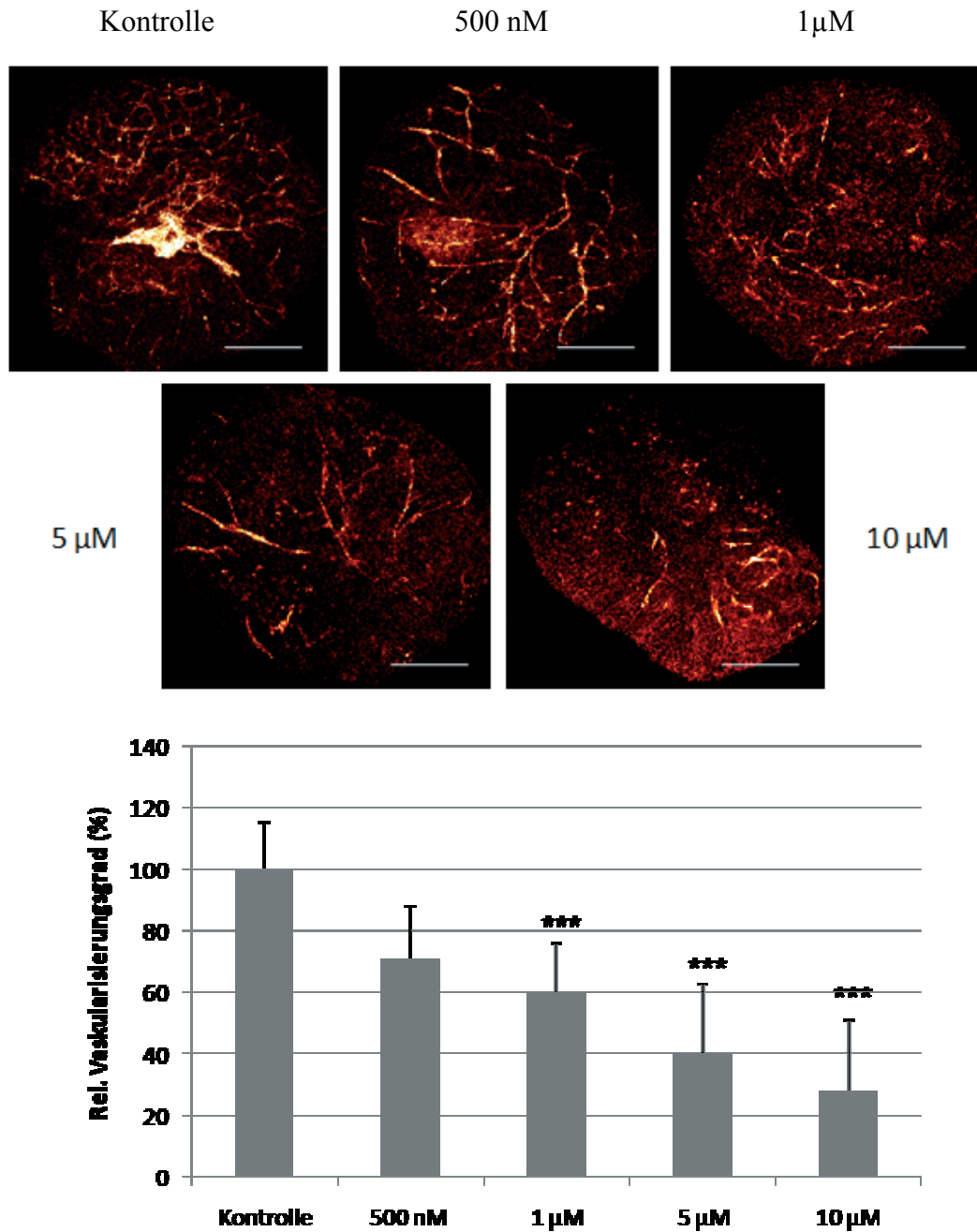


Abb.3.2: Konzentrationsabhängiger Effekt von ICI 118,551 auf die Vaskularisierung in 10 Tage alten EBs. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit ICI 118,551 (500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM) in CCE-Medium inkubiert. Nach der CD 31 Immunfärbung an Tag 10 wurde die Vaskularisierung anhand der Anzahl der Verzweigungspunkte in den EBs bestimmt ($n=3$; *** $p < 0,001$). Repräsentative Fluoreszenzbilder der Färbung mit CD31 (Der Balken entspricht 300 µm).

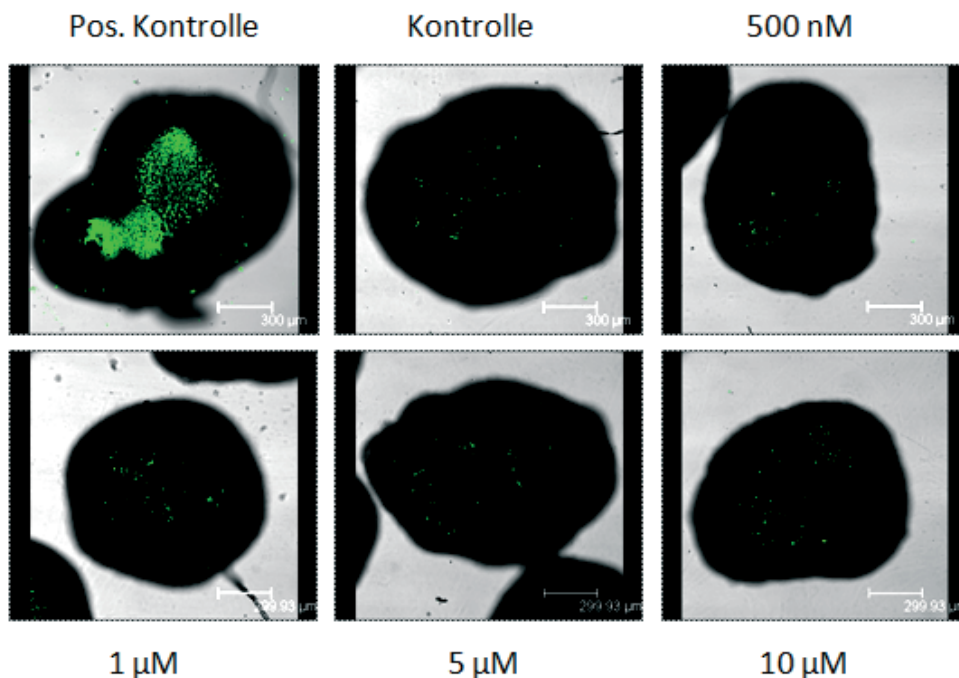
Wie man anhand der Abb. 3.2. erkennen kann, reduzierte ICI 118,551 den Vaskularisierungsgrad in EBs Dosis-abhängig. Bei den Konzentrationen 1 µM (60 +/-

16%), 5 μM (40 $\pm$ 23 %) sowie 10 μM (28 $\pm$ 23 %) war ein hochsignifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle (100%) erkennbar. Daher wurde in nachfolgenden Experimenten die Konzentration 1 μM verwendet.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits festgestellt, dass Propranolol bzw. Atenolol ebenfalls in der Lage sind den Vaskularisierungsgrad von EBs herabzusetzen. Hierbei erwies sich eine Konzentration von 10 μM am effektivsten. In weiteren Experimenten wurden daher für die drei β -Rezeptoren-Blocker folgende Konzentrationen gewählt: Propranolol (10 μM), Atenolol (10 μM) sowie ICI 118,551 (1 μM).

3.2 Untersuchung der Toxizität nach ICI 118,551 Behandlung

Bisher war nicht bekannt, ob β -Rezeptor-Blocker eine Toxizität auf endotheliale Zellen ausüben. Daher sollte in diesem Versuchsteil festgestellt werden, ob und inwiefern ICI 118,551 toxisch auf EBs wirkt. Dies wurde mittels SYTOX-Green DNA-Farbstoff realisiert.



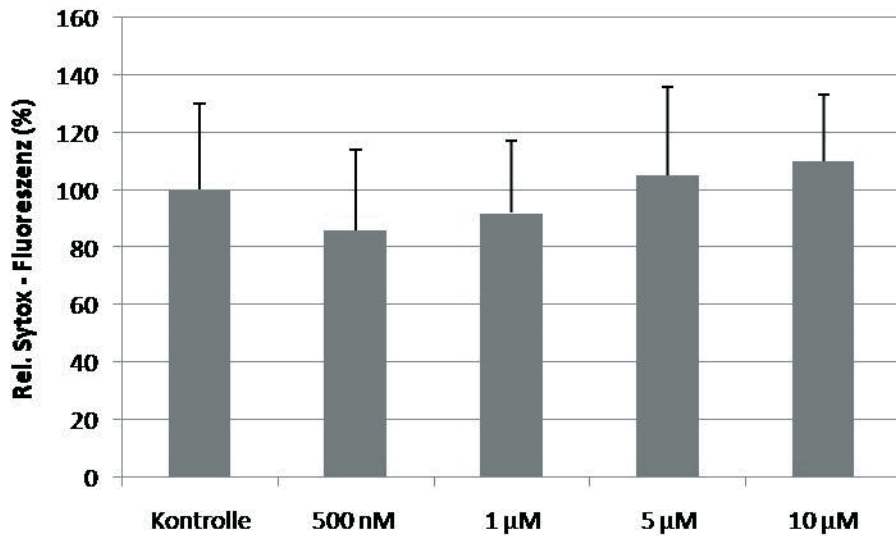


Abb.3.1: Nachweis möglicher toxischer Effekte von ICI 118,551 auf die Zellen der EBs. Die EBs wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit ICI 118,551 inkubiert. Die positiv Kontrolle wurde in Methanol inkubiert, d.h. die Zellen wurden wissentlich abgetötet. Die rel. Fluoreszenz der toten Zellen wurde mittels SYTOX-Green-Färbung dargestellt. Es handelt es sich um repräsentative Überlagerungsbilder eines Transmissionsbildes (schwarz) und eines Fluoreszenzbildes (grün) ($n=3$, Balken entspricht $300\mu\text{m}$).

Anhand der repräsentativen Fluoreszenzbilder sowie nach Analyse durch die Software ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festmachen, sodass ein toxischer Effekt von ICI 118,551 bei den verwendeten Konzentrationen ausgeschlossen werden kann.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits festgestellt, dass Propranolol bzw. Atenolol bis zu einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ keinen toxischen Effekt auf EBs aufweisen.

3.3 Expression von CD 31 und VE Cadherin nach Behandlung mit β -Blockern

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Versuches 3.1, sollte in diesem Versuchsteil die Expression des bereits immunhistochemisch detektierten Endothelzellmarkers CD 31 sowie von VE-Cadherin nach Behandlung mit β -Rezeptor-Blockern mittels Western-Blot-Verfahren untersucht werden. Dazu wurden EBs von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10

μM), Atenolol (10 μM) und ICI 118,551 (1 μM) inkubiert. An Tag 10 erfolgte die Analyse mittels Western-Blot-Verfahren.



CD 31:

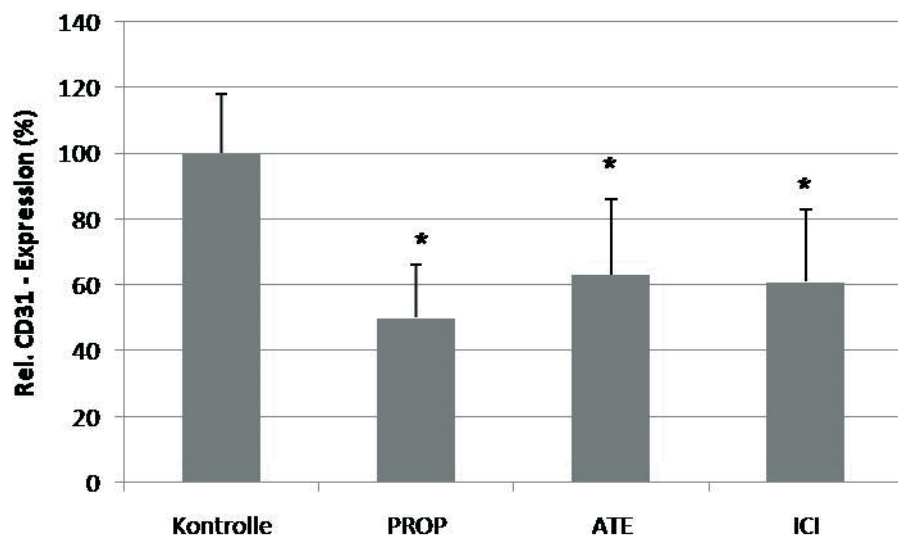


Abb.3.2: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von CD 31. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μM), Atenolol (10 μM) sowie ICI 118,551 (1 μM) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von CD 31 bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=3$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.4. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des Proteins CD 31 signifikant reduzierten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μM) bei 50 $\pm$ 16 %, mit Atenolol (10 μM) bei 63 $\pm$ 23 % und mit ICI 118,551 (1 μM) 61 $\pm$ 22 %. Alle Ergebnisse waren mit $p < 0,05$ im signifikanten Bereich.

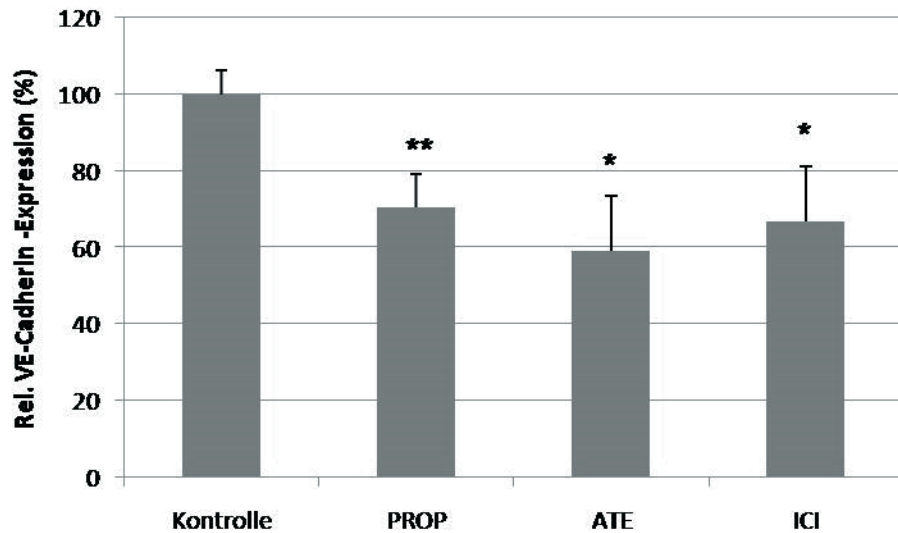
VE-Cadherin:

Abb.3.3: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von VE-Cadherin.

Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von VE-Cadherin bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=3$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.5. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des Proteins VE-Cadherin herabsetzten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μ M) bei 70 $\pm$ 9 % und ist mit $p < 0,01$ sehr signifikant. Das Expressionsniveau nach Behandlung mit Atenolol (10 μ M) lag bei 59 $\pm$ 15 % und mit ICI 118,551 (1 μ M) bei 67 $\pm$ 14 %. Die Ergebnisse von Atenolol und ICI 118,551 lagen mit $p < 0,05$ im signifikanten Bereich.

3.3 Bedeutung von ICI 118,551 auf die endogene Generierung von ROS

ROS spielen in Prozessen der Vaskulogenese eine wichtige Rolle, indem sie bspw. als sekundärer Botenstoff fungieren (Chua et al., 1998). In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, inwieweit die ROS Generierung von ICI 118,551 beeinflusst wird. Dazu wurden EBs an Tag 4 für 24 h mit ICI 118,551 (1 μ M) sowie eine Probe mit dem Radikalfänger NMPG in CCE-Medium inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzfarbstoff DCFH-DA die endogene ROS Generierung detektiert.

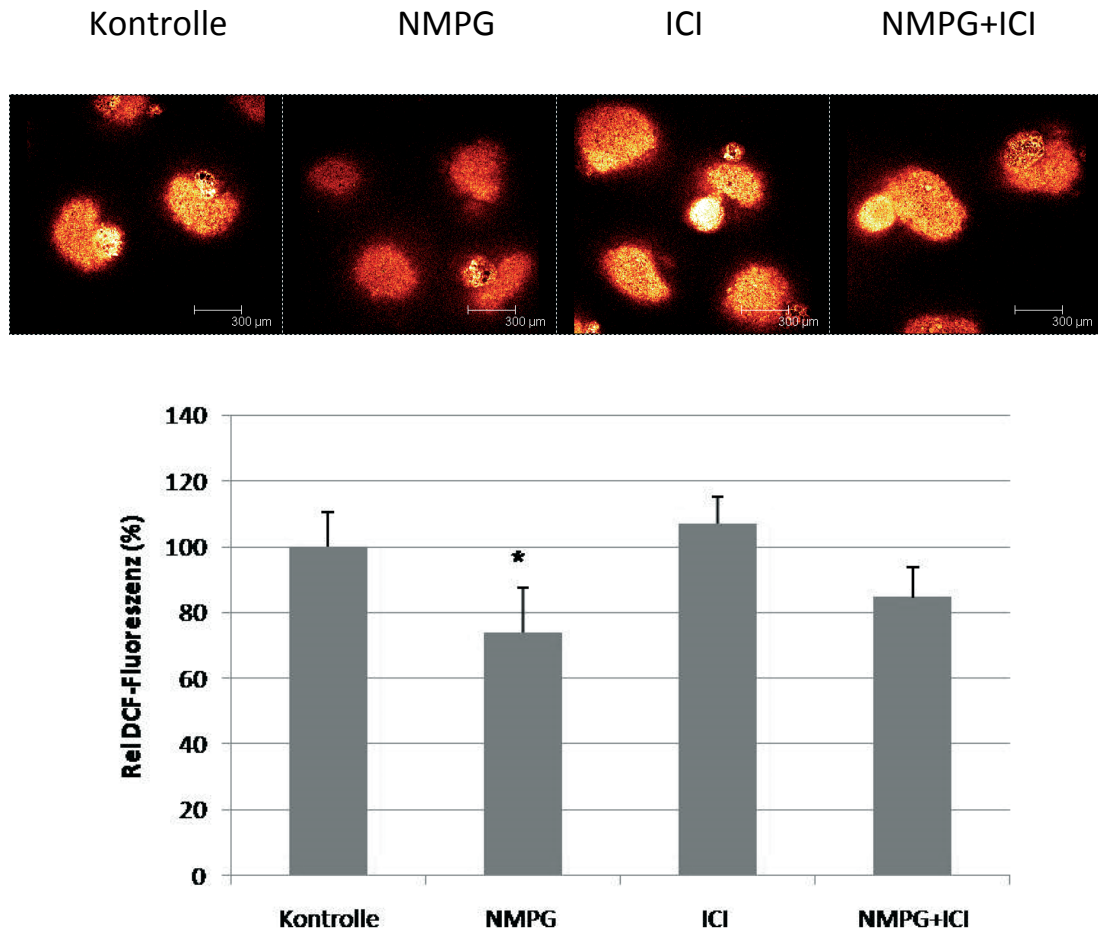


Abb.3.4: Nachweis der ROS-Generierung nach einer 24 h ICI 118,551 Behandlung der EBs. 4 Tage alte EBs wurden 24 h mit ICI 118,551 der Konzentration 1 µM sowie eine Probe mit NMPG bzw. NMPG+ICI 118,551 in CCE-Medium inkubiert. Die ROS-Bildung wurde mittels DCF-Fluoreszenz bestimmt ($n = 3$; * $p > 0,05$). Bei den Bildern handelt es sich um repräsentative Bilder der DCF-Fluoreszenz (Der Balken entspricht 300 µm).

Anhand der repräsentativen Fluoreszenzbilder sowie nach Analyse durch die Software ließ sich nach ICI 118,551 Behandlung (107 +/- 8 %) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (100%) festmachen. Der Radikalfänger NMPG (71 +/- 13 %) setzte die ROS Generierung signifikant herab. In der Kombination NMPG+ICI 118,551 (84 +/- 9 %), kam es ebenfalls zu einer geringeren ROS Bildung, das Ergebnis zeigte jedoch keine Signifikanz.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits festgestellt, dass Propranolol bzw. Atenolol bei einer Konzentration von 10 µM keinen Effekt auf die ROS Generierung aufweist.

3.4 Expression der NOX 4 nach Behandlung mit β -Blockern

Die NOX 4, eine Isoform der NADPH-Oxidase ist ein wichtigster Produzent von ROS (Ushio-Fukai, 2007). Daher wurde zur Bestätigung der Ergebnisse des Versuches 3.3 in diesem Versuchsteil die Expression der NOX 4 nach Behandlung mit β -Rezeptor-Blockern mittels Western-Blot-Verfahren untersucht. Dazu wurden EBs von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) und ICI 118,551 (1 μ M) inkubiert. An Tag 10 erfolgte eine Analyse mittels Western-Blot-Verfahren.

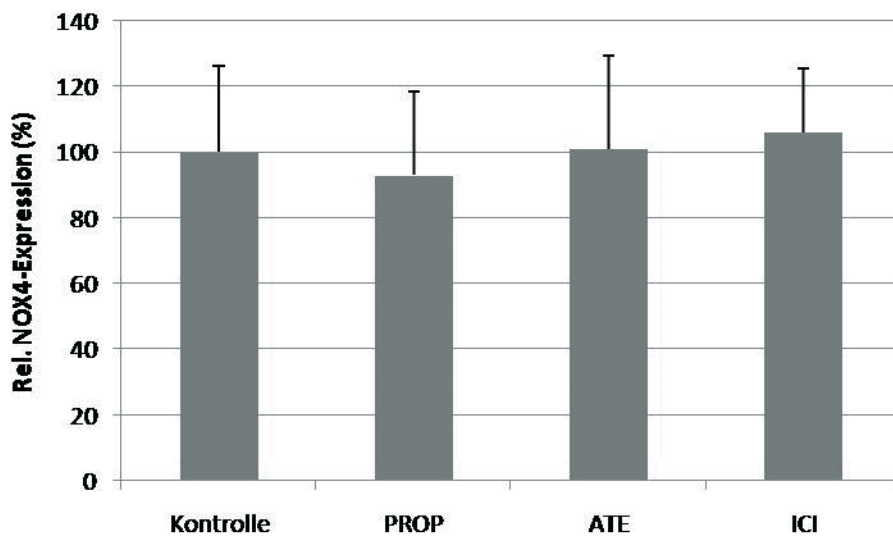


Abb.3.5: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von NOX 4. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von NOX 4 bestimmt ($n=3$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Wie man aus der Abb. 3.7. entnehmen kann, ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festmachen, sodass ein Effekt von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von NOX 4 ausgeschlossen werden kann.

3.5 Bedeutung von ICI 118,551 auf die endogene Generierung von NO

Es ist bekannt, dass NO ein Stimulator der Vaskulogenese ist (Frérart F. et al. 2009). In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, inwieweit die NO Generierung von ICI 118,551 beeinflusst wird. Dazu wurden EBs an Tag 4 für 24 h mit ICI 118,551 (1 μ M)

sowie eine Probe mit dem NO-Donor SNAP in CCE-Medium inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM die endogene NO Generierung detektiert.

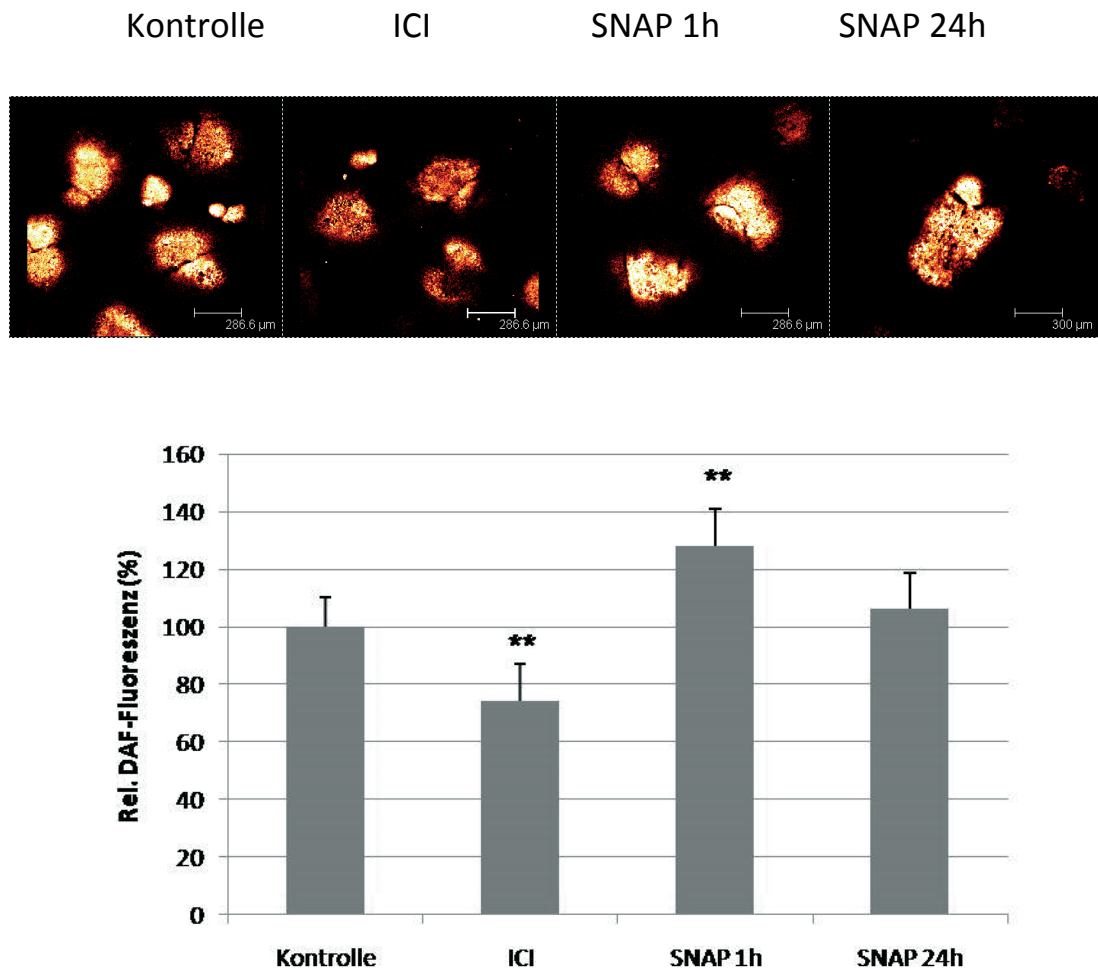


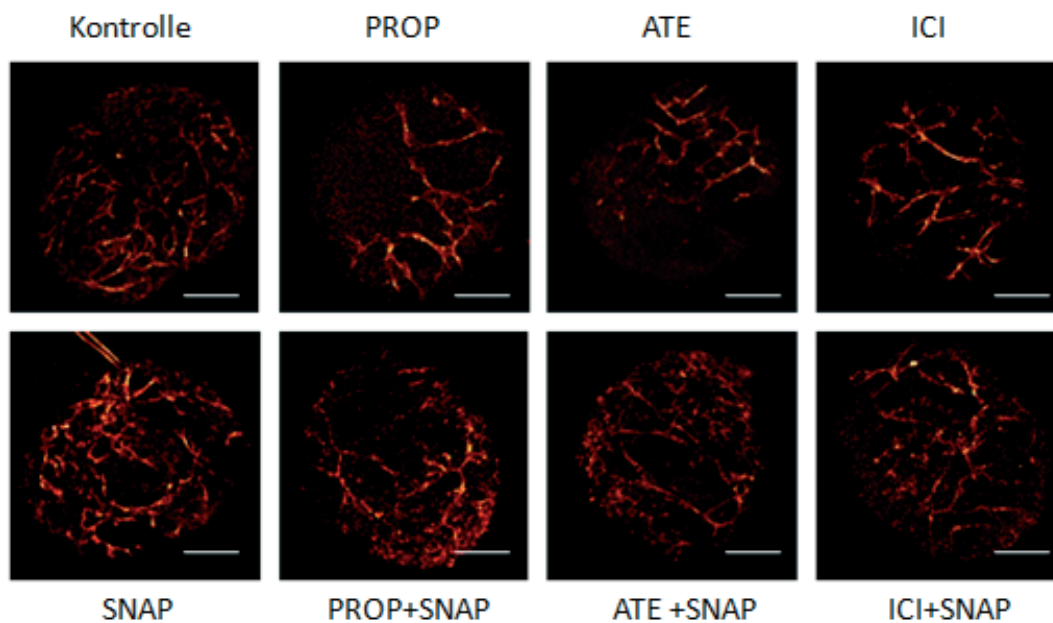
Abb.3.6: Nachweis der NO-Generierung nach einer 24 h ICI 118,551 Behandlung der EBs. 4 Tage alte EBs wurden 24 h mit ICI 118,551 der Konzentration 1 μ M sowie zwei Proben mit SNAP inkubiert. Dabei hatte die erste SNAP-Probe eine Inkubationszeit von 1 h, die Zweite dagegen 24h. Die NO-Bildung wurde mittels DAF-Fluoreszenz bestimmt ($n = 3$; ** $p > 0,01$). Bei den Bildern handelt es sich um repräsentative Bilder der DAF-Fluoreszenz (Der Balken entspricht 300 μ m).

Wie man anhand der Abb. 3.8. erkennen kann, wurde die NO-Generierung in den EBs im Vergleich zur Kontrolle (100 %) bei ICI 118,551 (1 μ M) auf (74 $\pm$ 13 %) signifikant verringert. Durch eine SNAP-Zugabe 1 h vor Detektion konnte man eine signifikante NO-Erhöhung detektieren (128 $\pm$ 13 %). Eine SNAP-Zugabe 24 h vor Detektion erbrachte kein signifikantes Ergebnis (106 $\pm$ 13 %).

3.6 Effekt des NO-Donors SNAP auf die Vaskularisierung nach β -Blocker

Behandlung

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass der β -Rezeptor-Blocker ICI 118,551 in der Lage ist, die endogene Generierung von NO zu inhibieren. Jedoch ist immer noch unklar, ob dies eine direkte Auswirkungen auf die Vaskulogenese hat. Aus diesem Grunde wurde versucht inwieweit die in Versuch 3.1 durch β -Rezeptor-Blocker gezeigte anti-angiogene Wirkung durch externe Zugabe des NO-Donors SNAP wieder rückgängig zu machen ist.



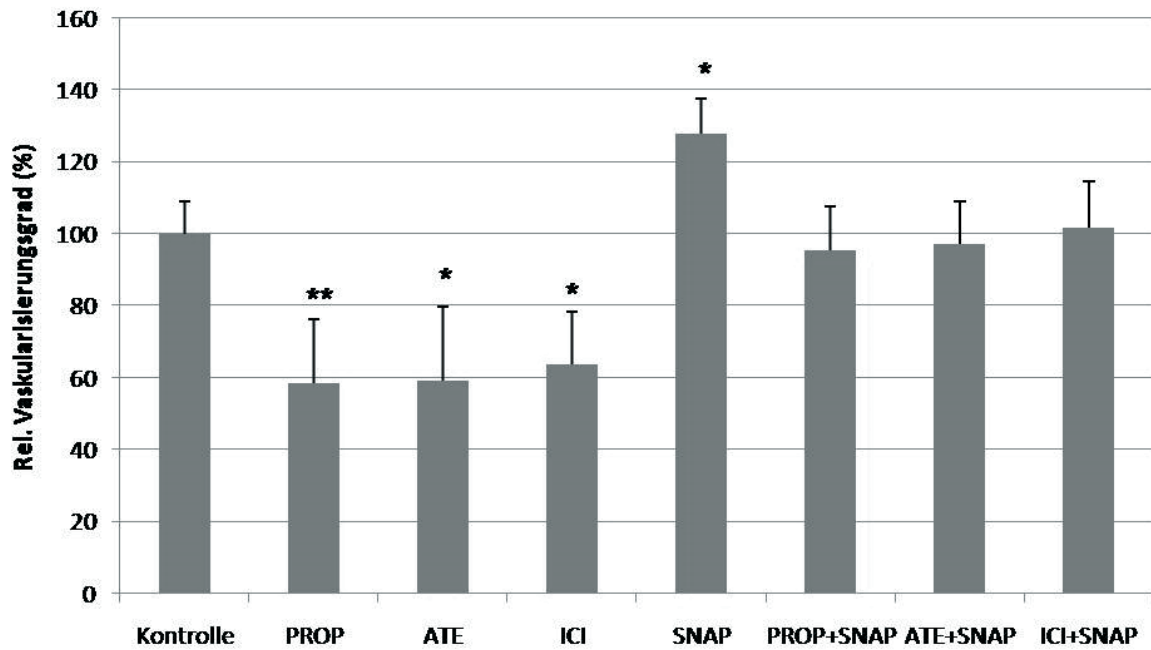


Abb.3.7: Aufhebung des antiangiogenen Effekts von β -Blockern durch den NO-Donor SNAP. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit den β -Blockern Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) und ICI 118,551 (1 μ M), mit SNAP (100 μ M) sowie β -Blocker + SNAP in CCE-Medium inkubiert. Nach der CD 31 Immunfärbung an Tag 10 wurde die Vaskularisierung anhand der Anzahl der Verzweigungspunkte in den EBs bestimmt ($n=3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Repräsentative Fluoreszenzbilder der Färbung mit CD31 (Der Balken entspricht 300 μ m).

Wie man anhand der Abb. 3.9. erkennen kann, wurde der Vaskularisierungsgrad in den EBs bei allen β -Blockern reduziert. Dabei erfolgte durch Propranolol eine Reduktion des Vaskularisierungsgrades auf (59 $\pm$ 19%), bei Atenolol auf (59 $\pm$ 20 %) sowie bei ICI 118,551 auf (64 $\pm$ 15 %). Hierbei war ein hochsignifikanter Effekt bei Propranolol (10 μ M) bzw. signifikanter Effekt bei Atenolol (10 μ M) und ICI 118,551 (1 μ M) im Vergleich zur Kontrolle (100%) erkennbar. Der Vaskularisierungsgrad konnte mit dem NO-Donor SNAP (100 μ M) signifikant auf (128 % $\pm$ 10 %) erhöht werden. Weiterhin war zu beobachten, dass SNAP in der Lage ist, den anti-angiogenen Effekt von β -Blockern rückgängig zu machen. Die Kombination β -Blocker + SNAP zeigte einen ähnlichen Vaskularisierungsgrad wie die Kontrolle.

3.7 p-eNOS Expression nach Behandlung mit β -Blockern

Die NO Synthese in Endothelzellen, erfolgt durch die endotheliale NO-Synthase. Im unphosphorylierten Zustand ist das Enzym inaktiv, im phosphorylierten Zustand dagegen katalysiert es die Bildung des Metaboliten NO aus der Aminosäure Arginin (Fulton et al., 2002). In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, inwieweit β -Rezeptor-Blocker in der Lage sind den Phosphorylierungszustand der eNOS zu beeinflussen. Dazu wurden EBs an Tag 4 für verschiedene Zeiträume mit den drei β -Rezeptor-Blockern Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) inkubiert und anschließend die Expression von p-eNOS sowohl mittels Western-Blot-Verfahren als auch immunhistochemisch detektiert.

3.7.1 Propranolol

a) e-NOS-Phosphorylierung im immunhistochemischen Nachweis

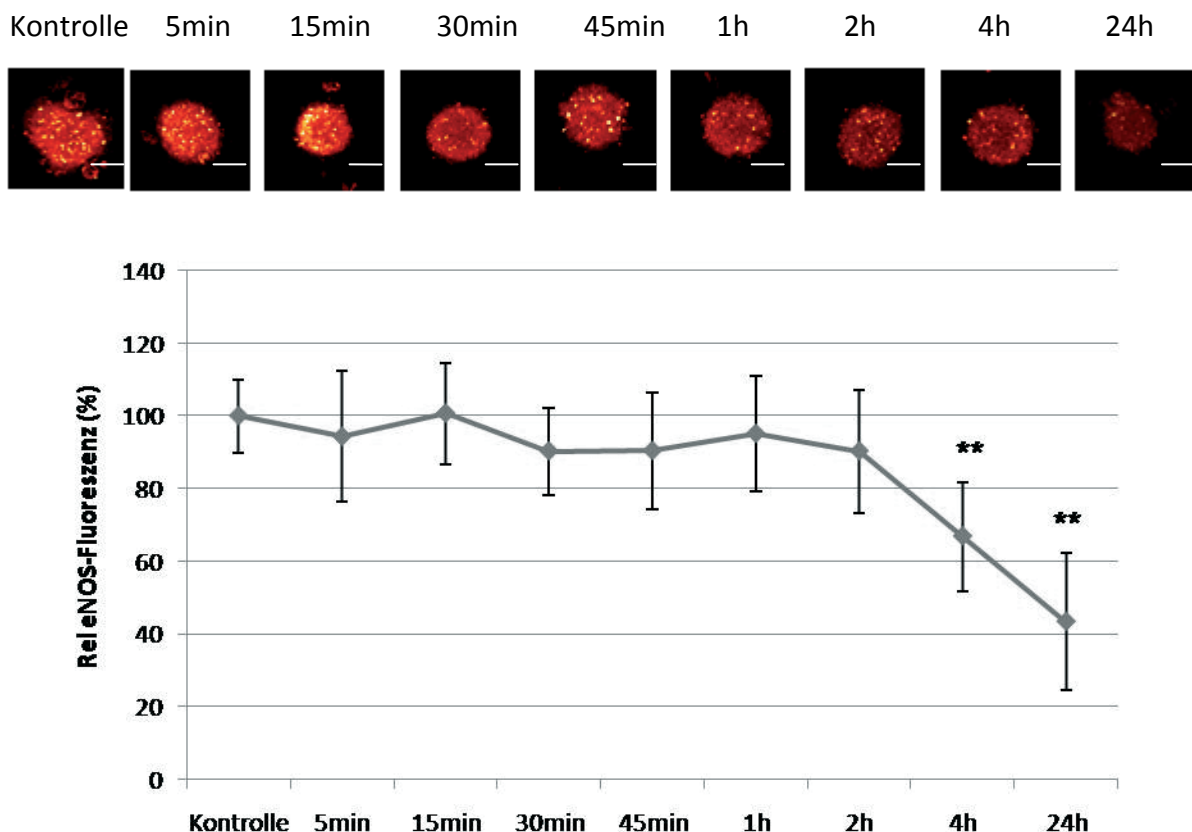


Abb.3.8 a: Der zeitabhängige Einfluss von Propranolol (10 μ M) auf die eNOS Phosphorylierung. Dazu wurden EBs an Tag 4 mit Propranolol (10 μ M) für 5min, 15min,

30min, 45min, 1h, 2h, 4h, 24h inkubiert und anschließend nach Immunfärbung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Repräsentative Fluoreszenzbilder der Immunmarkierung mit p-eNOS ($n=3$; ** $p < 0,01$) (Der Balken entspricht 300 μm).

b) e-NOS-Phosphorylierung im Western-Blot-Verfahren

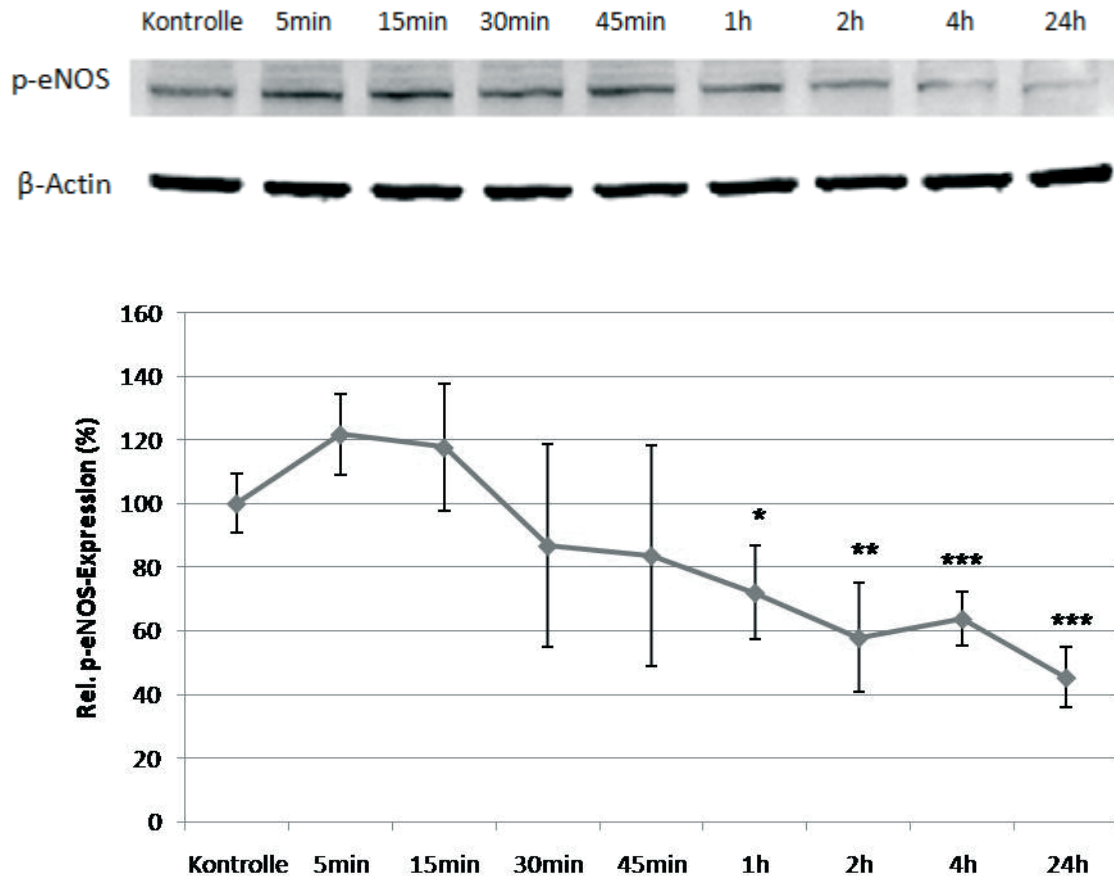


Abb.3.10 b: Der zeitabhängige Einfluss von Propranolol (10 μM) auf die eNOS Phosphorylierung. Dazu wurden EBs an Tag 4 mit Propranolol (10 μM) für 5min, 15min, 30min, 45min, 1h, 2h, 4h, 24h inkubiert und anschließend nach Immunfärbung mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Repräsentative Banden der Färbung mit p-eNOS ($n=5$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Mittels immunhistochemischem Nachweis konnte eine signifikante Verringerung der e-NOS-Phosphorylierung ab 4 h nach Inhibition mit Propranolol nachgewiesen werden (4 h: 70 $\pm$ 11 %, 24 h: 54 $\pm$ 16 %). Die Analyse über das Western-Blot-Verfahren zeigt einen ähnlichen Verlauf. Hierbei konnte ein signifikanter Abfall der eNOS-Phosphorylierung

bereits ab 1 h detektiert werden (1 h: 72 $\pm$ 20 %, 2 h: 58 $\pm$ 30 %, 4 h: 64 $\pm$ 13 %, 24 h: 45 $\pm$ 21 %).

3.7.2 Atenolol

a) e-NOS-Phosphorylierung im immunhistochemischen Nachweis

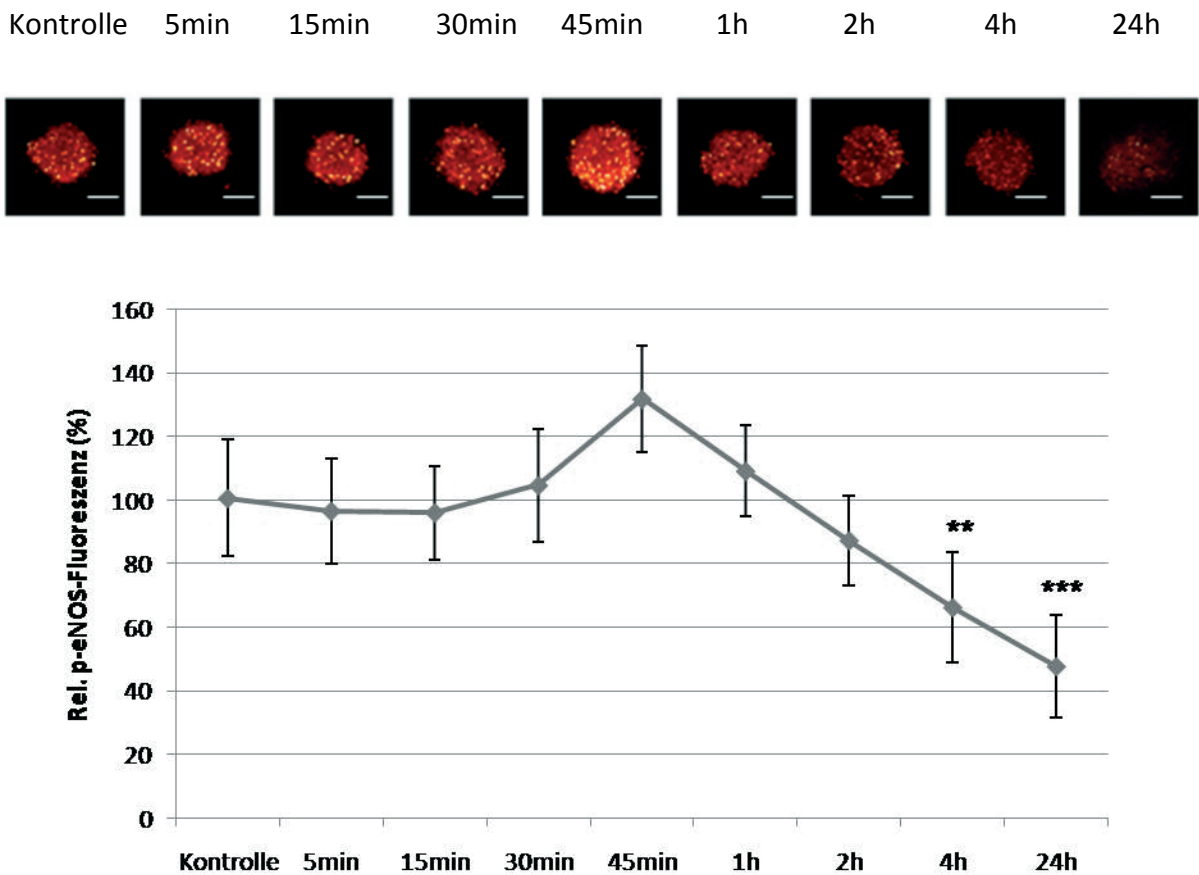


Abb.3.11 a: Der zeitabhängigige Einfluss von Atenolol 10 μ M auf die eNOS Phosphorylierung. Dazu wurden EBs an Tag 4 mit Atenolol (10 μ M) für 5min, 15min, 30min, 45min, 1h, 2h, 4h, 24h inkubiert und anschließend nach Immunfärbung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Repräsentative Fluoreszenzbilder der Färbung mit p-eNOS ($n=3$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (Der Balken entspricht 300 μ m).

b) e-NOS-Phosphorylierung im Western-Blot-Verfahren

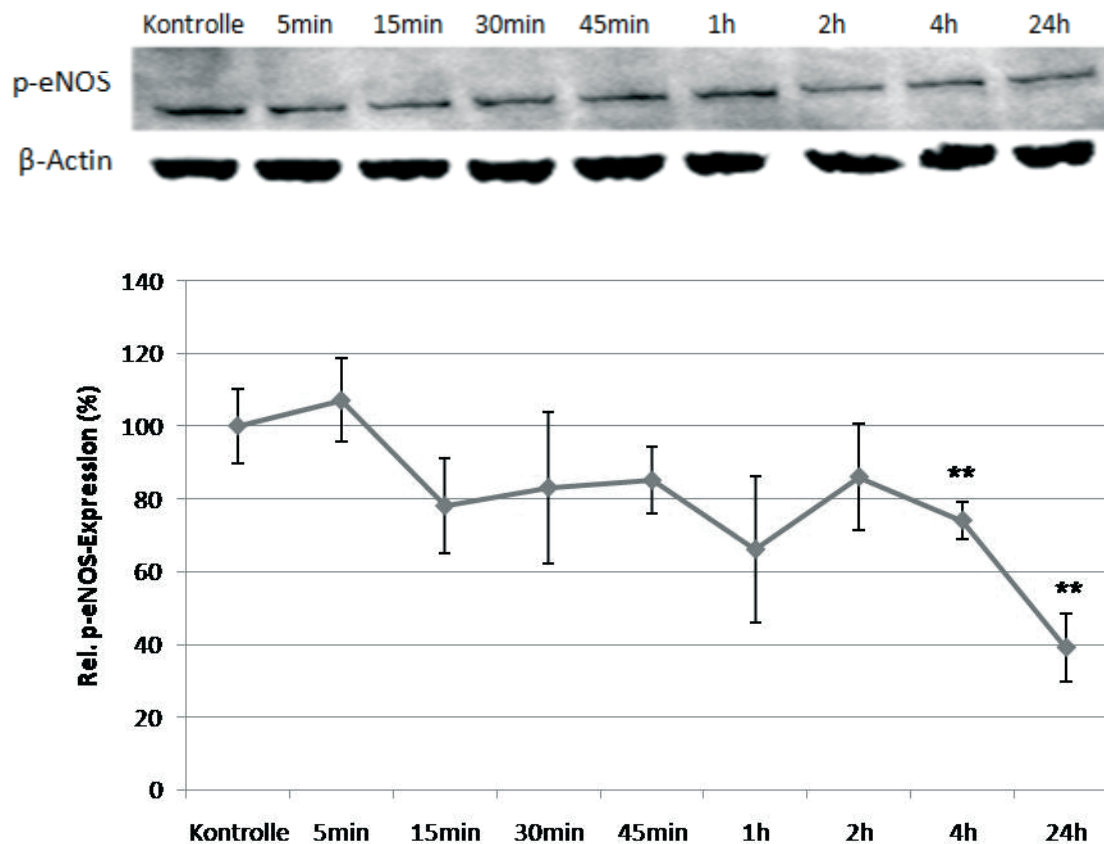


Abb.3.11b: Der zeitabhängige Einfluss von Atenolol (10 μ M) auf die eNOS Phosphorylierung. Dazu wurden EBs an Tag 4 mit Atenolol (10 μ M) für 5min, 15min, 30min, 45min, 1h, 2h, 4h, 24h inkubiert und anschließend nach Immunmarkierung mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Repräsentative Banden der Markierung mit p-eNOS ($n=3$, ** $p < 0,01$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Mittels immunhistochemischem Nachweis konnte eine signifikante Verringerung der e-NOS-Phosphorylierung ab 2 h nachgewiesen werden. Die Werte nach 4 bzw. 24 h wiesen eine hohe Signifikanz auf (4 h: 66 $\pm$ 17 %, 24 h: 48 $\pm$ 16 %). Die Analyse über das Western-Blot-Verfahren zeigte einen ähnlichen Verlauf. Hierbei konnte ein signifikanter Abfall der eNOS-Phosphorylierung ab 4 h detektiert werden (4 h: 74 $\pm$ 5 %, 24 h: 39 $\pm$ 9 %).

3.7.3 ICI 118,551

a) e-NOS Phosphorylierung im immunhistochemischen Nachweis

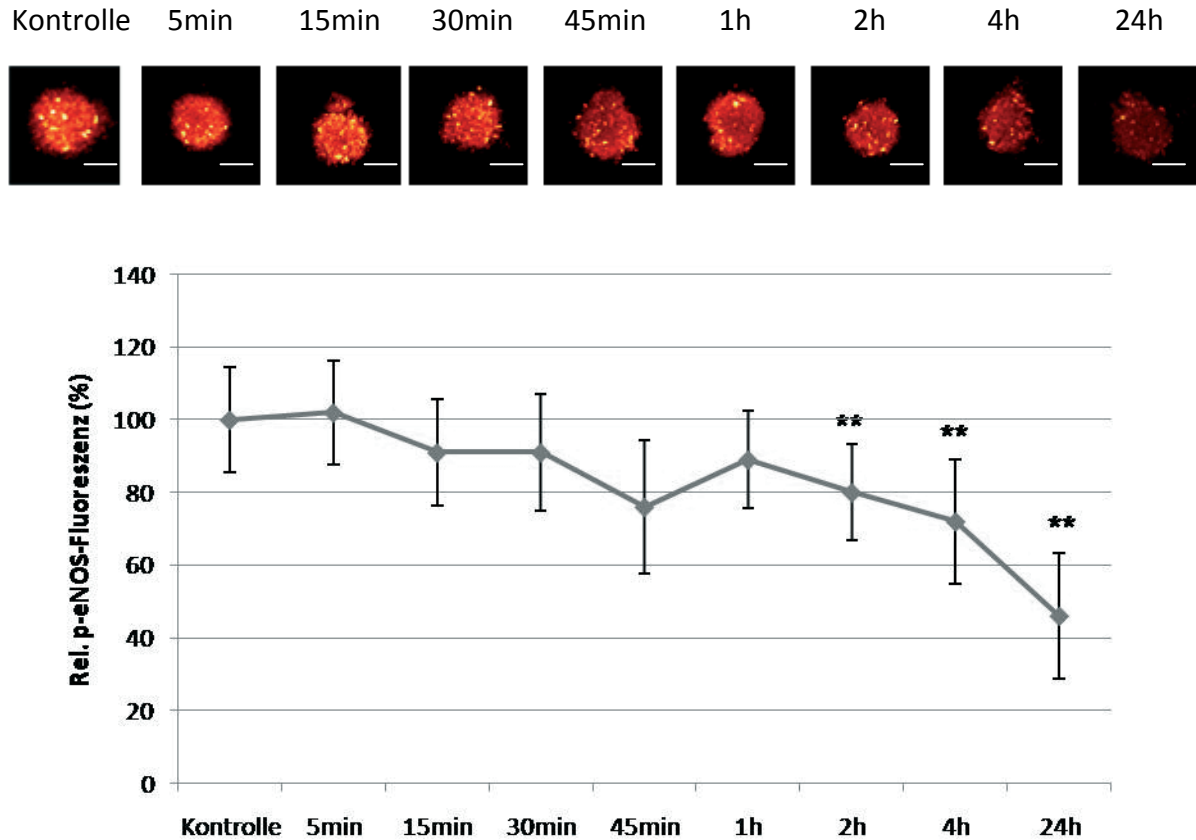
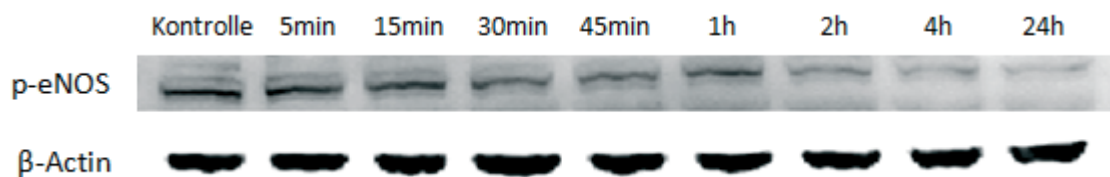


Abb. 3.12 a: Der zeitabhängige Einfluss von ICI 118,551 (1 μ M) auf die eNOS-Phosphorylierung. Dazu wurden EBs an Tag 4 mit ICI 118,551 (1 μ M) für 5min, 15min, 30min, 45min, 1h, 2h, 4h, 24h inkubiert und anschließend nach Immunfärbung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Repräsentative Fluoreszenzbilder der Färbung mit p-eNOS ($n=3$, ** $p < 0,01$) (Balken entspricht 300 μ m).

b) e-NOS Phosphorylierung im Western-Blot-Verfahren



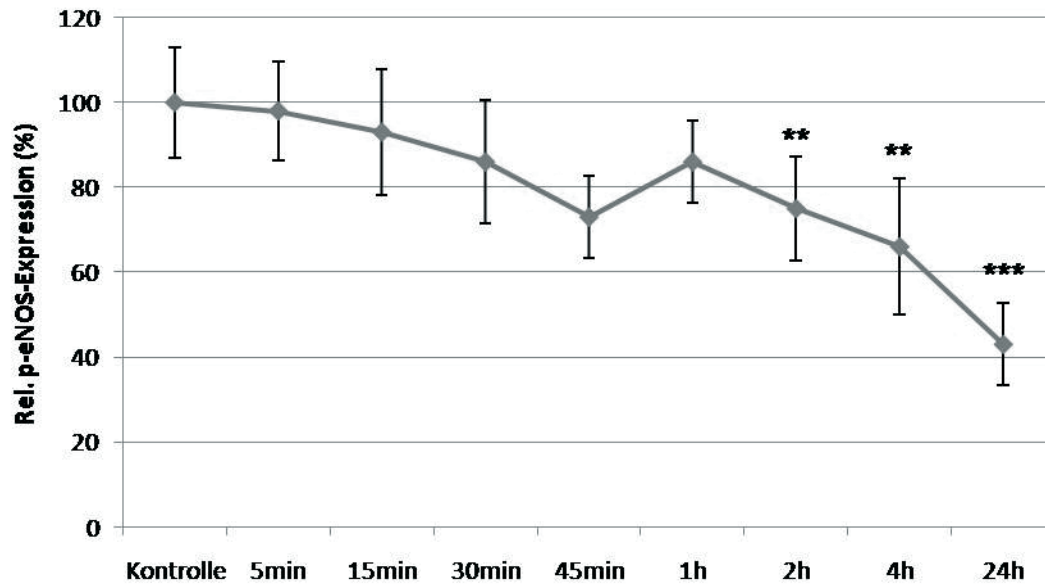
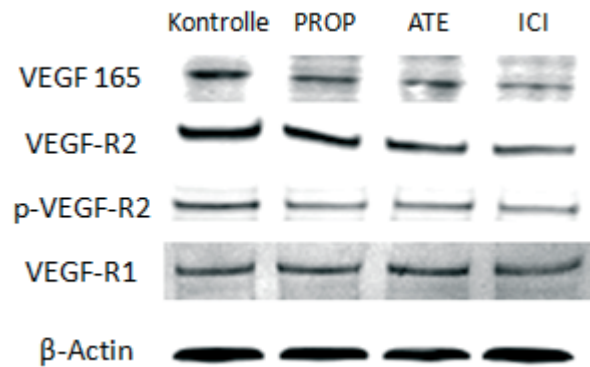


Abb. 3.12b: Der zeitabhängige Einfluss von ICI 118,551 (1 μ M) auf die eNOS-Phosphorylierung. Dazu wurden EBs an Tag 4 mit ICI 118,551 (1 μ M) für 5min, 15min, 30min, 45min, 1h, 2h, 4h, 24h inkubiert und anschließend nach Immunmarkierung mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Repräsentative Banden der Markierung mit p-eNOS ($n=4$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Mittels immunhistochemischem Nachweis konnte eine signifikante Verringerung der eNOS-Phosphorylierung ab 2 h nachgewiesen werden (2 h: 80 $\pm$ 13 %, 4 h: 72 $\pm$ 17 %, 24 h: 46 $\pm$ 16 %). Die Analyse über das Western-Blot-Verfahren zeigte einen ähnlichen Verlauf. Hierbei konnte ebenfalls ein signifikanter Abfall der eNOS Phosphorylierung ab 2 h detektiert werden (2 h: 75 $\pm$ 12 %, 4 h: 66 $\pm$ 16 %, 24 h: 43 $\pm$ 10 %).

3.8 Bedeutung von β -Blockern auf die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren

Der Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Vaskulogenese. Physiologisch bindet VEGF₁₆₅ vor allem an den VEGF-R1 und zu einem kleineren Teil an den VEGF-R2 (Claesson-Welsh L., 2008). Daher stellte sich die Frage inwieweit die Expression des VEGF₁₆₅ bzw. seiner Rezeptoren durch β -Blocker beeinflusst wird. Dazu wurden EBs von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) und ICI 118,551 (1 μ M) inkubiert und an Tag 10 die erwähnten Faktoren mittels Western-Blot-Verfahren analysiert.



VEGF 165:

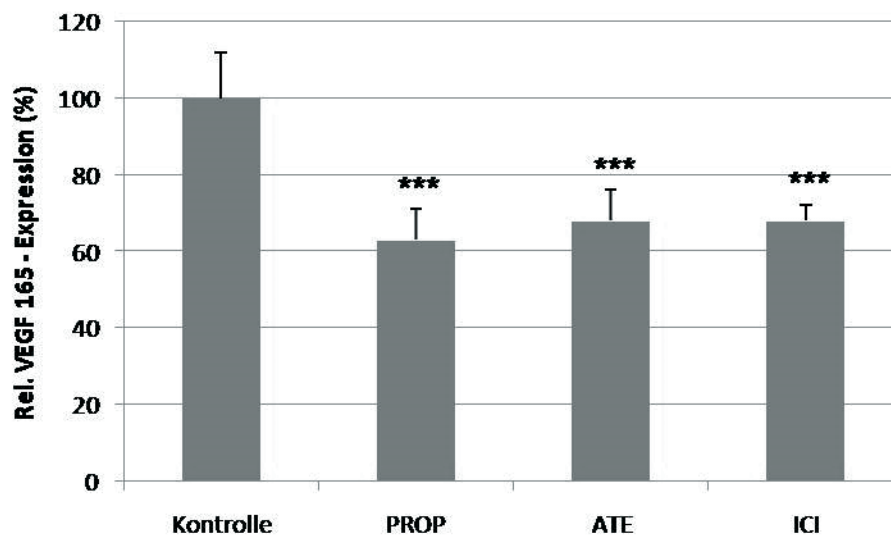


Abb. 3.13: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von VEGF₁₆₅. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von VEGF₁₆₅ mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=3$). (** $p < 0,01$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.13 ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des Proteins VEGF₁₆₅ herabsetzten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μ M) bei 63 $\pm$ 8 %, mit Atenolol (10 μ M) bei 68 $\pm$ 8 % und mit ICI 118,551 (1 μ M) bei 68 $\pm$ 4 %. Alle Ergebnisse lagen mit $p < 0,001$ im signifikanten Bereich.

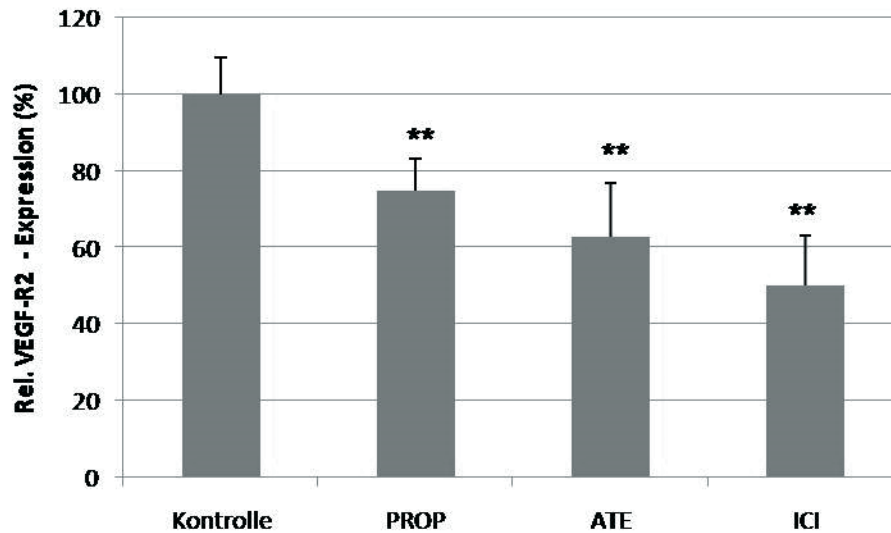
VEGF-R2:

Abb. 3.14: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von VEGF-R2. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von VEGF-R2 mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=4$) (** $p < 0,01$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.14. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des VEGF-R2 herabsetzten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μ M) bei 75 $\pm$ 8 %, mit Atenolol (10 μ M) bei 63 $\pm$ 14 % und mit ICI 118,551 (1 μ M) bei 50 $\pm$ 13 %. Alle Ergebnisse lagen mit $p < 0,01$ im signifikanten Bereich.

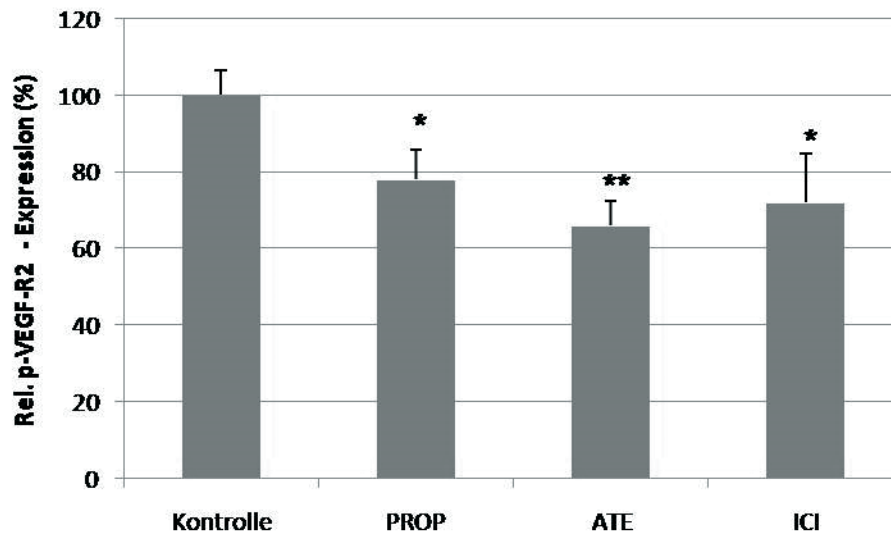
p-VEGF-R2:

Abb. 3.15: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Phosphorylierung von VEGF-R2. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Phosphorylierung von VEGF-R₂ mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=4$) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.15. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker den Grad der Phosphorylierung des VEGF-R2 herabsetzten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μ M) bei 75 $\pm$ 8 %, mit Atenolol (10 μ M) bei 63 $\pm$ 14 % und mit ICI 118,551 (1 μ M) bei 72 $\pm$ 13 %. Alle Ergebnisse lagen mit mindestens $p < 0,05$ im signifikanten Bereich.

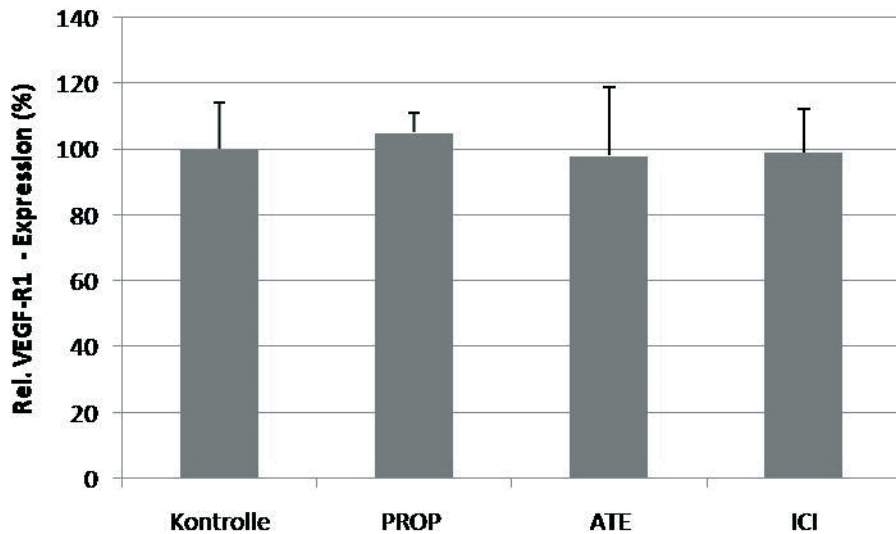
VEGF-R1:

Abb. 3.16: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von VEGF-R1. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von VEGF-R1 mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=4$).

Wie man aus der Abb. 3.16. entnehmen kann, ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (100 %) festmachen, sodass ein Effekt von β -Rezeptor-Blockern auf das Expressionsniveau von VEGF-R1 ausgeschlossen werden kann.

3.9 Analyse VEGF-R2 positiver Zellen nach Behandlung mit β -Blockern

In diesem Versuchsteil sollte mit Hilfe einer GFP-VEGF-R2 Reporterzelllinie die Differenzierung VEGF-R2-positiver kardiovaskulärer Prognitorzellen anhand GFP-positiver Zellen mittels Laser-Rastermikroskopie analysiert werden. Dazu wurden EBs von Tag 2 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) und ICI 118,551 (1 μ M) inkubiert. An Tag 4, 6, 8 sowie 10 wurden die Zellen mittels konfokaler Mikroskopie auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht. Da die Expression von VEGF-R2 an GFP gekoppelt ist, konnten über die Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf das Vorhandensein sowie die Quantität des VEGF-R2 gezogen werden.

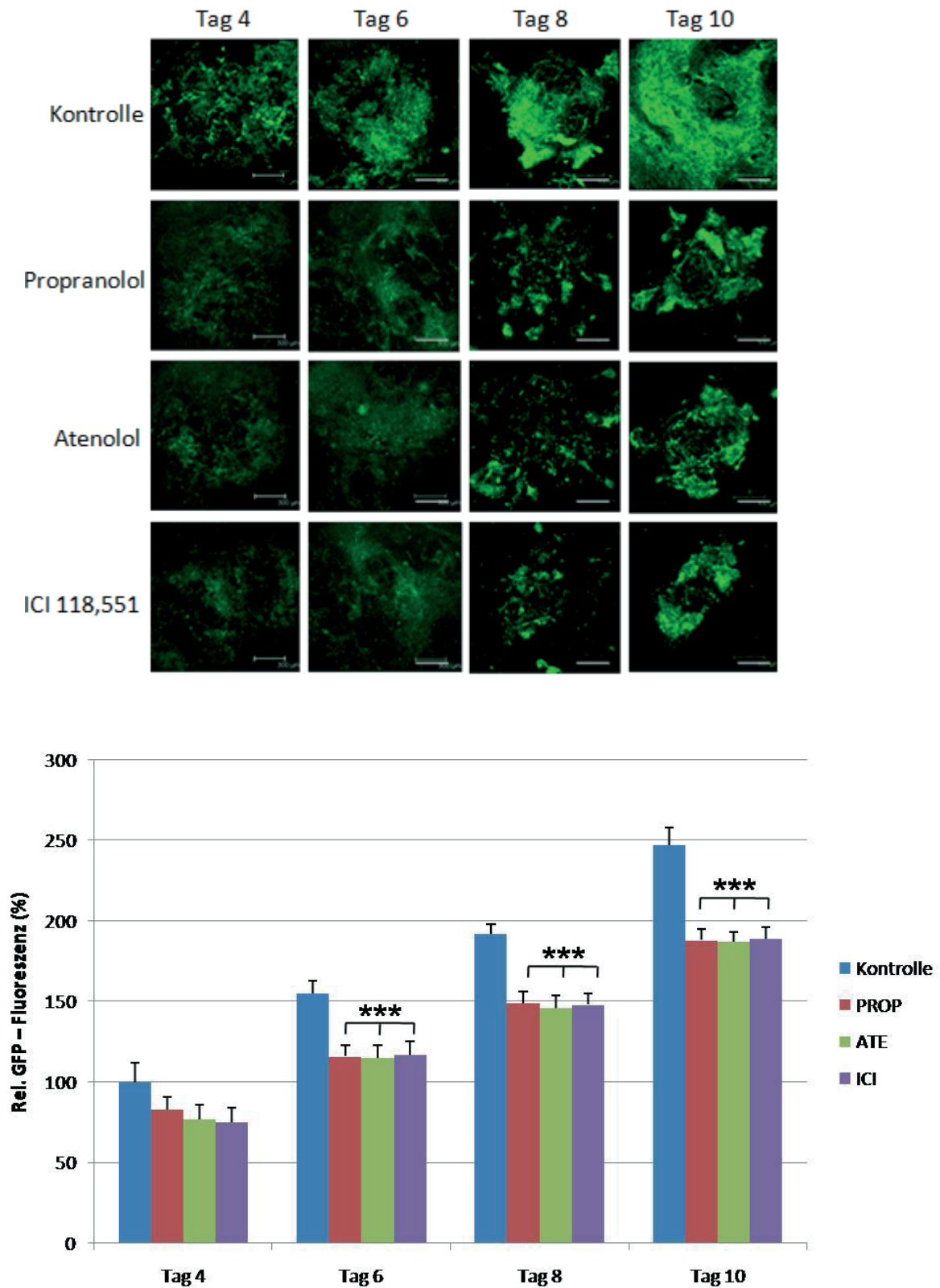


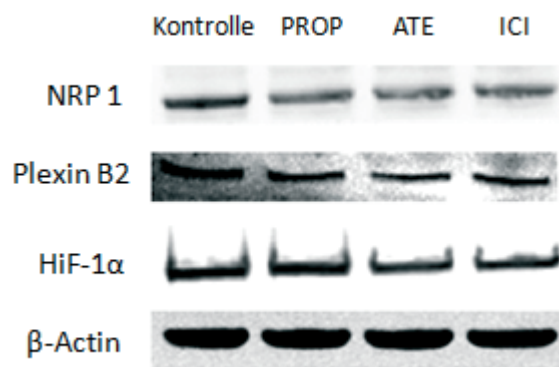
Abb. 3.17: Zeitabhängiger Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die VEGF-R2 Expression in differenzierten Stammzellen. Die Proben wurden von Tag 2 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 4, 6, 8 und 10 wurde die Fluoreszenzintensität mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt. Es

handelt sich um repräsentative Fluoreszenzbilder ($n=4$, *** $p < 0,001$) (Balken entspricht $300\mu\text{m}$).

Anhand der Abb. 3.17 ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität der Kontrolle einer ständigen Zunahme unterlag, an Tag 4 betrug sie $100 \pm 12\%$ und stieg bis zu Tag 10 auf $247 \pm 11\%$. Die Fluoreszenzintensität der mit β -Rezeptor-Blockern behandelten Proben stieg ebenfalls von Tag 4 bis Tag 10 kontinuierlich an, lag jedoch an jedem Untersuchungstag hochsignifikant unter der Fluoreszenzintensität der Kontrolle [Propranolol: Tag 4 ($83 \pm 8\%$), Tag 10 ($188 \pm 7\%$); Atenolol: Tag 4 ($77 \pm 9\%$), Tag 10 ($187 \pm 6\%$); ICI 118,551 Tag 4 ($75 \pm 9\%$), Tag 10 ($189 \pm 7\%$)].

3.10 Bedeutung von β -Blockern auf die Expression von NRP1, Plexin B1 und HiF-1 α

Die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren kann durch zahlreiche Einflüsse modifiziert werden. Bspw. wirken NRP 1 und Plexin B1 als sog. Co-Rezeptoren, d.h. sie sind in der Lage die Wirkung des VEGF-R2 zu verstärken und begünstigen damit vaskuläre Prozesse (Beck et al., 2011; Hua Zhou et al., 2012). Das Protein HiF-1 α wird bei hypoxischen Zuständen sezerniert und vermag die VEGF-Expression zu erhöhen (Mohamed et al., 2004). Daher sollte in dem folgenden Versuchsteil der Einfluss von β -Blockern auf die Expression der angesprochenen Proteine untersucht werden. Dazu wurden EBs von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol ($10\text{ }\mu\text{M}$), Atenolol ($10\text{ }\mu\text{M}$) und ICI 118,551 ($1\text{ }\mu\text{M}$) inkubiert und an Tag 10 die erwähnten Faktoren mittels Western-Blot-Verfahren analysiert.



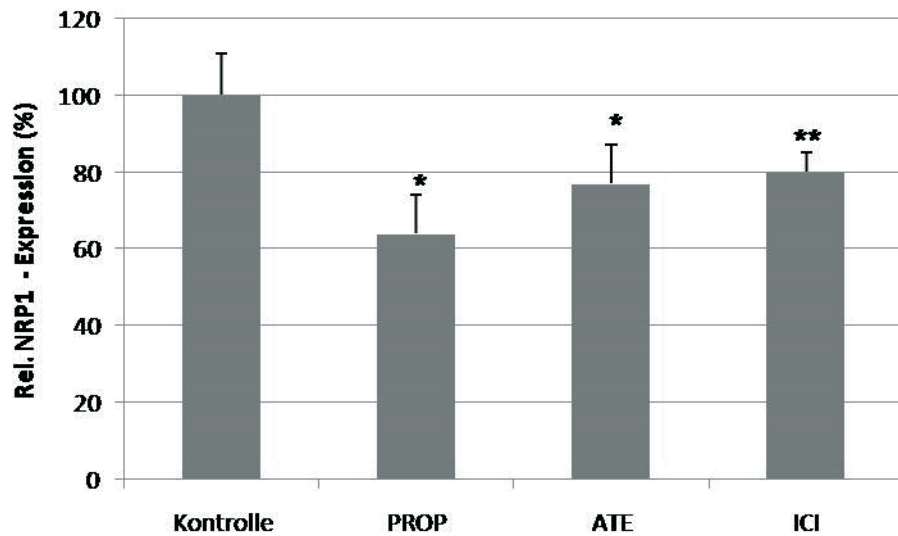
NRP1:

Abb. 3.18: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von NRP 1. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von NRP 1 mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=3$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.18. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des Proteins NRP 1 herabsetzten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μ M) bei 64 $\pm$ 10 %, mit Atenolol (10 μ M) bei 77 $\pm$ 10 % und mit ICI 118,551 (1 μ M) bei 80 $\pm$ 5 %. Alle Ergebnisse lagen mit mindestens $p < 0,05$ im signifikanten Bereich.

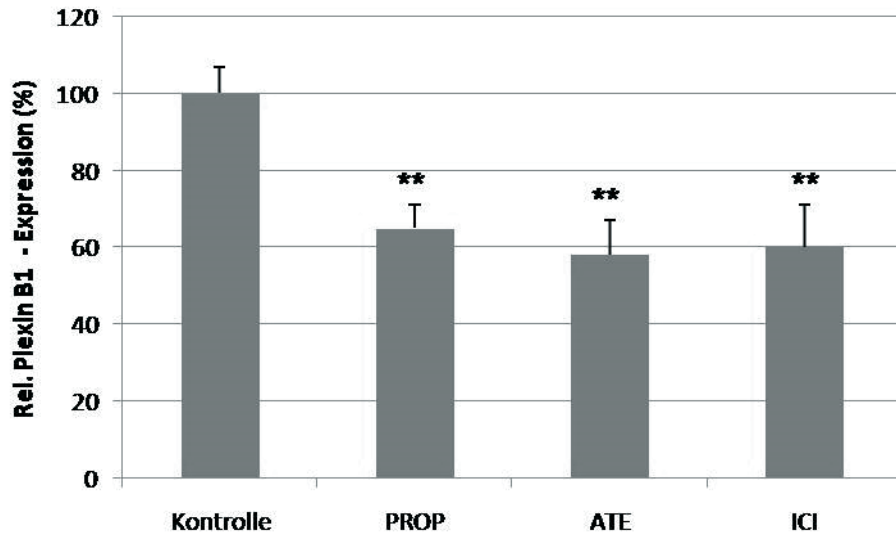
Plexin B1:

Abb. 3.19: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von Plexin B1. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von Plexin B1 mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=3$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.19. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des Proteins Plexin B1 herabsetzen. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μ M) bei 65 $\pm$ 6 %, mit Atenolol (10 μ M) bei 58 $\pm$ 9 % und mit ICI 118,551 (1 μ M) bei 60 $\pm$ 11 %. Alle Ergebnisse lagen mit mindestens $p < 0,01$ im signifikanten Bereich.

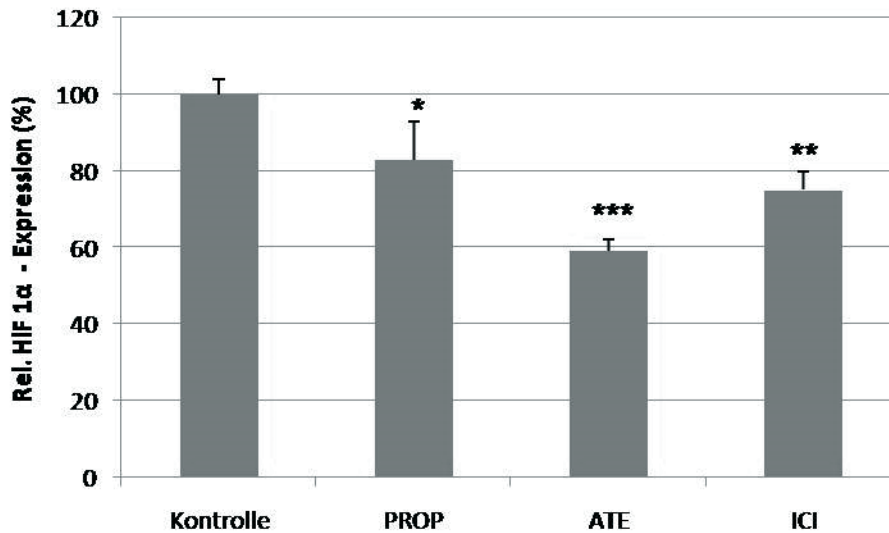
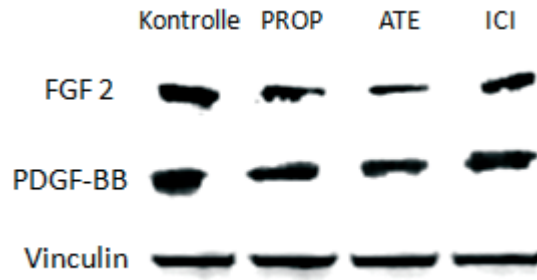
HiF-1 α :

Abb. 3.20: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von HiF-1 α . Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von HiF-1 α mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=3$). Als housekeeping Protein wurde β -Actin verwendet.

Anhand der Abb. 3.20. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des Proteins HiF-1 α herabsetzten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol 10 μ M bei 83 $\pm$ 10 %, mit Atenolol 10 μ M bei 59 $\pm$ 3 % und mit ICI 118,551 1 μ M bei 75 $\pm$ 5 %. Alle Ergebnisse lagen mit mindestens $p < 0,05$ im signifikanten Bereich.

3.11 Bedeutung von β -Blockern auf die Expression von FGF 2 und PDGF-BB

In diesem Versuchsteil sollte die Expression der Wachstumsfaktoren FGF 2 und PDGF-BB nach Behandlung mit β -Rezeptor-Blockern untersucht werden. FGF 2 fördert bspw. die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Ornitz et al., 2001). PDGF-BB dient ua. als Wachstumsfaktor für mesenchymale murale Zellen, welche den Verband von Endothelzellen stabilisieren (Lindahl et al. 1997). Bei beiden Proteinen handelt es sich um essentielle Faktoren, ohne die eine ordnungsgemäße Vaskulogenese nicht stattfinden kann.



FGF 2:

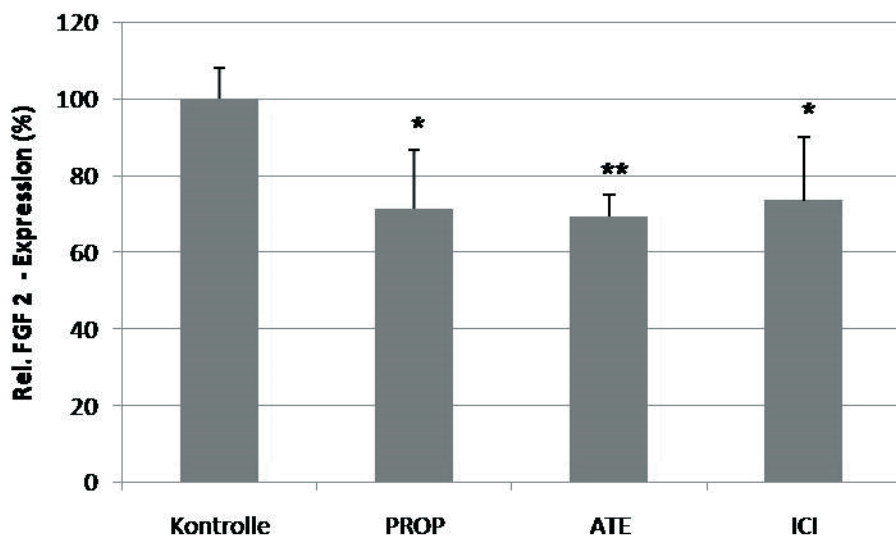


Abb. 3.21: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von FGF 2. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von FGF 2 mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=3$). Als housekeeping Protein wurde Vinculin verwendet.

Anhand der Abb. 3.21. ist zu erkennen, dass alle drei β -Rezeptor-Blocker das Expressionsniveau des Proteins FGF 2 herabsetzten. Dabei lag das Expressionsniveau nach der Behandlung mit Propranolol (10 μ M) bei 71 $\pm$ 15 %, mit Atenolol (10 μ M) bei 69 $\pm$ 6 % und mit ICI 118,551 (1 μ M) bei 73 $\pm$ 16 %. Alle Ergebnisse lagen mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ im signifikanten Bereich.

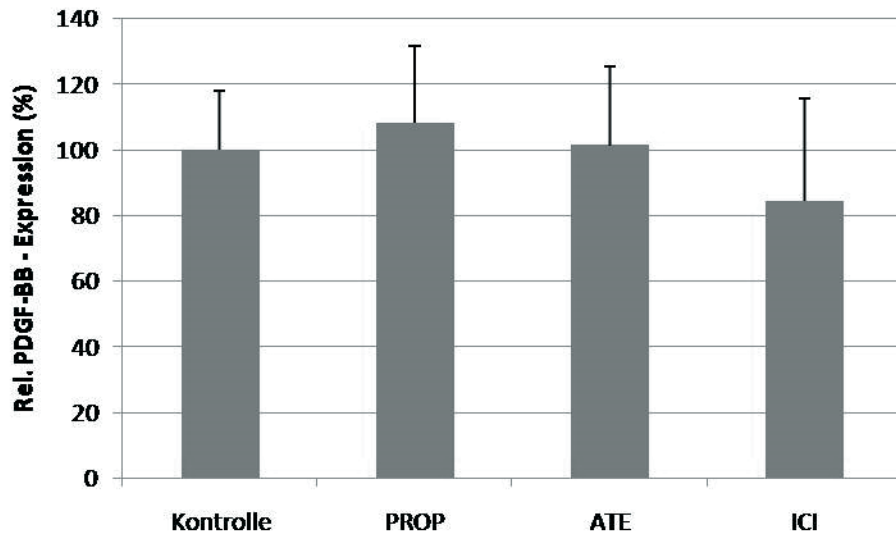
PDGF-BB:

Abb. 3.22.: Der Einfluss von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von PDGF-BB. Die Proben wurden von Tag 3 bis Tag 9 mit Propranolol (10 μ M), Atenolol (10 μ M) sowie ICI 118,551 (1 μ M) in CCE-Medium inkubiert. An Tag 10 wurde die Expression von PDGF-BB mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Darstellung repräsentativer Western Blots ($n=4$). Als housekeeping Protein wurde Vinculin verwendet.

Wie man aus der Abb. 3.22. entnehmen kann, ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festmachen, sodass ein Effekt von β -Rezeptor-Blockern auf die Expression von PDGF-BB ausgeschlossen werden kann.

4. Diskussion

Vaskulo- und Angiogeneseprozesse sind für das Wachstum während der Embryonalentwicklung von großer Bedeutung. Da embryonale Gewebe rasch wachsen und sich differenzieren, ist ein gutes vaskuläres System zur Versorgung mit Sauerstoff, Wachstumsfaktoren und Nährstoffen etc. vonnöten. Die Vaskulogenese unterliegt dabei einer komplexen Regulierung verschiedener Signalkaskaden und der Expression pro-angiogener Wachstumsfaktoren. Eine Aufhebung dieser Regulation kann u.a. eine pathologische Endothel-Proliferation zur Folge haben und z.B. zu einem tumorösen infantilen Hämangioms führen. Dies ist auch Ansatzpunkt für die vorliegende Arbeit. Die französische Arbeitsgruppe um Léauté-Labrèze C. et al. machte im Jahre 2008 die Beobachtung, dass sich unter der Therapie mit dem β -Rezeptor-Blocker Propranolol infantile Hämangiome zurückbilden (Léauté-Labrèze C. et al., 2008). Bei infantilen Hämangiomen handelt es sich um Tumore endothelialen Ursprungs, die bei Neugeborenen und Kleinkindern zu ästhetischen Problemen im Gesicht und falls Augenlid oder Mundbereich betroffen zu funktionellen Einschränkungen führen können. Neuere retrospektive Studien bestätigen den Erfolg von Propranolol bei der Behandlung von infantilen Hämangiomen. Eine Studie an 109 chinesischen Kleinkindern mit Hämangiomen verdeutlicht die guten Behandlungsergebnisse von Propranolol; Bei 17,4% der Patienten kam es nach Behandlung mit dem β -Blocker zu einer vollständigen Remission, bei 81,7% zu einer deutlichen Verbesserung des Leidens, und lediglich ein einziger Patient zeigte keine klinische Verbesserung des Krankheitsbildes (Wang et. al., 2012). Propranolol kommt ebenfalls in einigen deutschen hochspezialisierten Kinderkliniken wie etwa Heidelberg zum Einsatz (Schupp et. al., 2011). Das Medikament ist jedoch noch nicht offiziell als Therapeutikum gegen das infantile Hämangiom zugelassen, da die genauen Wirkmechanismen noch nicht ausreichend geklärt sind. Forscher aus aller Welt haben erkannt, dass β -Blocker nicht nur bei infantilen Hämangiomen sondern auch bei anderen soliden Tumoren therapeutisch nutzbar sind und bspw. die Ausbreitung von Metastasen verhindern (Li et al., 2012).

Diese Arbeit wurde durch die oben aufgeführten Entdeckungen inspiriert und soll einen Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Propranolol, aber auch von anderen β -Blockern wie Atenolol und ICI 118,551 leisten.

In der vorliegenden Arbeit kommen ES-Zellen der Maus zum Einsatz, welche makroskopisch sichtbare dreidimensionale Zellaggregate (EBs) bilden. In den EBs bildet sich ein vaskuläres System, welches zur Versorgung der Zellen dient. Da es sich beim infantilen Hämangiom um einen embryonalen Tumor handelt, eignet sich dieses Modell besonders zur Identifikation der Wirkweise von β -Blockern bei Hämangiomen und an Vaskulo- und Angiogenese Prozessen im Allgemeinen.

4.1 Untersuchung der Vaskulogenese nach β -Blocker-Applikation

Die in den Experimenten verwendete ES-Zelllinie CCE, hat sich schon in zahlreichen Untersuchungen bezüglich vaskulärer Prozesse als ausgesprochen geeignet erwiesen (Vittet D. et al. 1996, Lange S. et al. 2009). Wie bereits erwähnt, bilden die EBs im Rahmen ihrer Entwicklung vaskuläre Strukturen aus, die mittels CD31-Immunfärbung dargestellt werden können. Anhand der Expression endothelialer Marker sowie Verzweigungen der vaskulären Strukturen lassen sich Rückschlüsse auf die Vaskulogenese ziehen.

Zu Beginn wurde mit verschiedenen Konzentrationen des β -Blockers ICI 118,551 gearbeitet um festzustellen ob die Substanz Auswirkungen auf die Vaskulogenese hat. Zudem sollte die bestmögliche Dosis-Wirkungsbeziehung als auch die Arbeitskonzentration für die weiteren Experimente gefunden werden.

Dieser Versuch konnte aufzeigen, dass ICI 118,551 konzentrationsabhängig einen signifikanten Einfluss auf die Vaskulogenese von EBs hat. Mit steigender Konzentration des β -Blockers ist eine stetige Abnahme des Vaskularisierungsgrades zu beobachten. Die Konzentration ICI 118,551 von $1\mu\text{M}$ konnte gemäß Dosis-Wirkungskurve als geeignete Arbeitskonzentration ausgewählt werden. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde dasselbe Experiment bereits mit Propranolol und Atenolol durchgeführt. Beide β -Blocker zeigten einen signifikanten antiangiogenen Effekt in den Arbeitskonzentrationen von jeweils $10\mu\text{M}$. Als weitere Beobachtung ging hervor, dass Atenolol einen etwas geringeren Einfluss auf den Vaskularisierungsgrad als Propranolol aufweist (Findeisen, 2010). Nachdem die Ergebnisse für ICI 118,551 vorliegen, ist festzuhalten, dass ICI 118,551 der potenteste unter den von uns getesteten β -Blockern ist. ICI 118,551 vermag den Vaskularisierungsgrad von EBs auf das Niveau von Propranolol und Atenolol

herabzusetzen, jedoch in einer 10fach erniedrigten Dosis im Vergleich zu den anderen β -Blockern.

Durch diese Ergebnisse wurde die Frage aufgeworfen, wie es zu diesem Unterschied zwischen den einzelnen β -Blockern kommen kann. Die Antwort dürfte bei der Wahl der unterschiedlichen Bindungspartnern der Substanzen zu suchen sein. Atenolol ist ein selektiver β_1 -Blocker, ICI 118,551 ein selektiver β_2 -Blocker und Propranolol ein unselektiver $\beta_{1/2}$ -Blocker, der an beiden Rezeptoren binden kann. Da die Expression von β_2 -Rezeptoren in EBs höher als die von β_1 -Rezeptoren ist (Findeisen, 2010), kann davon ausgegangen werden, dass β_2 -Inhibitoren eine stärker inhibierende Wirkung auf die Vaskulogenese embryonaler Stammzellen ausüben.

Um auszuschließen, dass die beobachteten antiangiogenen Effekte der β -Blocker nicht auf eine toxische Wirkung dieser Substanzen auf EBs zurückzuführen sind, wurde eine Überprüfung mittels dem DNA-Farbstoff Sytox Green durchgeführt. Die Sytox Green Färbung zeigte bei allen getesteten Konzentration und Substanzen keinen Nachweis von toxischen Effekten auf die Zellen.

4.2 Einfluss von ROS und NO auf die Vaskulogenese

ROS sind in der Lage als sekundäre Botenstoffe zu fungieren und dienen somit der Regulation von zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung (Thannickal und Fanburg 2000). Die Bedeutung von ROS in Vaskulogeneseprozessen wurde in zahlreichen Publikationen aufgezeigt. VEGF kann durch Stimulation bzw. Einflussnahme auf die NADPH-Oxidase-Expression die ROS-Generierung und die damit verbundene Migration sowie Proliferation von Endothelzellen steigern (Ushio-Fukai et al. 2002, Harfouche et al. 2005). Umgekehrt lässt sich durch eine höhere ROS-Konzentration die Expression von VEGF in Endothelzellen hochregulieren (Chua et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, inwieweit der anti-angiogene Effekt von β -Blockern auf eine Veränderung im ROS-Gleichgewicht zurückzuführen ist. In unseren Versuchen konnte weder ein inhibierender noch aktivierender signifikanter Effekt auf die ROS-Generierung in EBs zu Beginn der Vaskulogenese (Tag 4) (Wartenberg et al., 1998) nachgewiesen werden. Die ROS-Produktion in Endothelzellen erfolgt überwiegend durch die NADPH-Oxidase (NOX). Dabei finden sich in Endothelzellen die Isoformen NOX 1, NOX 2 und NOX 4, wobei NOX 4 am stärksten exprimiert wird (Li et al., 2004). Eine

Behandlung der EBs mit β -Blockern zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung des Expressionsniveaus der NOX 4. Zusammenfassend ist also davon auszugehen, dass ROS bei der Verringerung des Vaskularisierungsgrades unter β -Blocker-Behandlung keine Rolle spielen.

In einem weiteren Versuch wurde die NO-Generierung nach Behandlung mit den β -Blockern ICI 118,551, Propranolol und Atenolol überprüft. Dabei war ein signifikanter inhibierender Effekt aller β -Blocker bezüglich der NO-Generierung in EBs zu erkennen. NO ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff in kardiovaskulären Prozessen und vermag die Vaskulogenese zu stimulieren (Frérart F. et al. 2009; Ergenekon E. et al. 2010). Frühere Publikationen verdeutlichen die pro-angiogene Wirkung von NO bei HUVEC (Papapetropoulos et al., 1997) sowie bei embryonalen Stammzellen der Maus (Milosevic et al., 2010). Dies war für uns Ansatzpunkt die Rolle von NO auf den Vaskularisierungsgrad von EBs zu bestätigen und herauszufinden, inwieweit eine Aufhebung des pro-angiogenen Effekts von NO durch β -Blocker möglich ist. Dies wurde mit dem NO-Donor SNAP realisiert. Nach Inkubation mit SNAP zeigten die EBs erwartungsgemäß eine deutlich verstärkte Vaskularisierung im Vergleich zur Kontrolle. Wurden die EBs hingegen mit der Kombination SNAP + β -Blocker behandelt, so führte dies zu keiner signifikanten Veränderung der Vaskularisierung. Die Ergebnisse der Vaskularisierung von ES-Zellen verdeutlichen, dass β -Blocker maßgeblich am NO-Signalweg beteiligt sind.

NO in Endothelzellen wird von der eNOS produziert. Damit die eNOS NO produzieren kann, muss eine Phosphorylierung zur Aktivierung des Enzyms erfolgen (p-eNOS) (Dudzinski und Michel 2007). In einem Folgeversuch sollte die Wirkung der β -Blocker auf den Phosphorylierungsgrad von eNOS ermittelt werden. Dazu wurden EBs in einer Zeitreihe von 5 min bis 24 h mit β -Blockern behandelt und anschließend immunhistochemisch bzw. im Western-Blot-Verfahren untersucht. Die Untersuchung zeigte jeweils eine signifikante Reduzierung des Phosphorylierungsgrades der eNOS ab einer Inkubationszeit von ca. 2 h. Nun stand fest, dass der reduzierte NO-Gehalt in EBs auf eine verminderte Phosphorylierung der eNOS zurückgeht. Eine Phosphorylierung der eNOS wird u.a. durch den Wachstumsfaktor VEGF initiiert (Gentile et al., 2012). Weiterhin kann eine Phosphorylierung der eNOS durch Kinasen wie PKB und PI3K erfolgen (Qiuju Yu et al., 2010).

4.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Vaskulogenese

4.3.1 Einfluss von VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF und seine Rezeptoren (VEGF-R1 und VEGF-R2) sowie VEGF-induzierte Signalwege nehmen eine Schlüsselrolle bei der Vaskulogenese ein. VEGF ist ein potenter pro-angiogener Faktor, der z.B. das Zusammenwachsen, die Proliferation sowie Migration Endothelzellen fördert. Tumorinduzierte Angiogenese wird nicht selten durch angiogene Wachstumsfaktoren wie z.B. der FGF- oder VEGF-Familie initiiert (Wartenberg M. et al. 2001). Da VEGF die eNOS-Phosphorylierung stimulieren kann (Gentile et al., 2013), sollte in diesem Versuchsteil festgestellt werden, inwieweit die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren durch β -Blocker beeinflusst wird. Im Vorfeld soll erwähnt werden, dass alle verwendeten β -Blocker ähnliche Einflüsse zeigten und daher nicht einzeln besprochen werden.

In den Versuchen zeigte sich nach β -Blocker Applikation ein signifikant vermindertes Expressionsniveau des VEGF₁₆₅. VEGF₁₆₅ kann entweder an den VEGF-R1 (bei dem nach β -Blocker-Behandlung kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression vorlag) oder an den VEGF-R2 binden. Das Expressionsniveau des VEGF-R2, und seiner im phosphorylierten Zustand aktiven Form (p-VEGF-R2) zeigte eine signifikante Abnahme nach Exposition gegenüber β -Blockern. Mittels GFP-VEGF-R2-Reporterzelllinie konnte ebenfalls aufgezeigt werden, dass unter β -Blocker-Behandlung das Expressionsniveau des VEGF-R2 vom Beginn der Vaskulogenese an Tag 4 bis Tag 10 immer signifikant unter dem Expressionsniveau der Kontrolle lag.

Im Unterschied zum VEGF-R1, kann beim VEGF-R2 eine Autophosphorylierung nach Bindung des Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ erreicht werden. Eine Stimulation des VEGF-R2 durch VEGF₁₆₅ kann zur Aktivierung des MAP-Kinase-Weges und der ERK 1/2 Kaskade führen (Takahashi et al., 2001, 2005). Weiterhin besteht die Möglichkeit einer VEGF₁₆₅/VEGF-R2-vermittelten Erhöhung der NO-Generierung: Die PKB kann die PI3K aktivieren, die wiederum in der Lage ist die eNOS zu phosphorylieren (Dayanir et al., 2001). Eine weitere Arbeit hat gezeigt, dass extrazelluläre RNS in der Lage ist, die Permeabilität in Gefäßen zu erhöhen und somit pro-angiogen zu wirken. Dazu bindet RNS an einen VEGF/NRP1 Komplex und führt dabei zu einer verstärkten VEGF-R2 Autophosphorylierung (Fischer et al., 2009).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass β -Blocker mit hoher Wahrscheinlichkeit Einfluss auf die oben genannten Signalwege haben.

Im regelrecht funktionierenden endothelialen System besteht eine höhere Bindungsaffinität von VEGF zum VEGF-R1, sodass eine verminderte Stimulation des VEGF-R2 stattfindet um eine überschießende Proliferation zu vermeiden. Im Tumorgewebe ist dieses Bindungsverhältnis jedoch zu Gunsten des VEGF-R2 verschoben. Die physiologische Regulation ist aufgehoben, es kommt zu einem patho-physiologisch unkontrollierbarem Wachstum (Claesson-Welsh L. 2008). Der beschriebene Sachverhalt kann ohne Weiteres auf das Hämangiom übertragen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen dafür, dass der verminderte VEGF-Gehalt in EBs nach β -Blocker-Gabe eine geringere Autophosphorylierung bzw. Aktivierung des VEGF-R2 nach sich zieht, dessen Expression ohnehin β -Blocker-abhängig vermindert zu sein scheint.

Die VEGF-Expression kann auch durch äußere Einflüsse wie Hypoxie reguliert werden. Befinden sich Zellen im hypoxischen Zustand, so wird der Transkriptionsfaktor Hif-1 α produziert, der die Expression von VEGF hochregulieren kann (Mohamed et al., 2004). Da Hämangiome schnell wachsen, tritt nach kurzer Zeit Sauerstoffmangel auf. Es folgt eine vermehrte Hif-1 α -Produktion, die eine höhere VEGF-Expression nach sich zieht. β -Blocker scheinen in der Lage zu sein, den dargestellten Teufelskreis zu durchbrechen. Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Verminderung der Hif-1 α -Expression nach Behandlung mit β -Blockern.

Neben den angesprochenen VEGF-Rezeptoren existieren auch sog. Co-Rezeptoren; sie können die Wirkung von VEGF entweder verstärken oder mindern. Zu diesen Co-Rezeptoren zählt man bspw. Axon Guidance Proteine. Die Bindung von VEGF-A₁₆₅ an NRP1 führt zu einer verstärkten Interaktion von VEGF-A₁₆₅ mit dem VEGF-R₂ und somit zu einer stärker angiogenen Wirkung (Beck et al., 2011). Semaphorin 4D ist ebenfalls in der Lage über eine Interaktion mit seinem Rezeptor Plexin B1 die Wirkung von VEGF-A₁₆₅ auf die Vaskulogenese und Tumorprogression zu verstärken (Hua Zhou et al., 2012). β -Blocker zeigten eine inhibierende Wirkung auf die Expression der Axon Guidance Proteine NRP1 und Plexin B1 in EBs. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine Wirkungsverstärkung dieser Axon Guidance Proteine durch β -Blocker gedämpft wird.

4.3.2 Einfluss von FGF

Ähnlich wie bei VEGF, handelt es sich bei FGF um einen potenten Aktivator der Vaskulogenese. Besonders FGF 2 und seine Interaktion mit dem Rezeptor FGF-R1 spielen eine herausragende Rolle bei Vaskulogenese Prozessen. Die Bindungsaffinität von FGF 2 wird von Heparin und Heparansulfaten um ein vielfaches erhöht; es bildet sich ein Komplex von zwei FGF 2 Molekülen sowie zwei Heparansulfaten (Plotnikov, A.N. et al., 1999). Über eine Autophosphorylierung kann der Komplex Bindungsstellen freigeben und so mit anderen Molekülen wie Crk und PLC γ in Kontakt treten (Klint, P. and Claesson-Welsh, L., 1999; Mohammadi, M. et al., 1991). Zudem sind zahlreiche intrazelluläre Signalwege bekannt, die durch FGF-R1 aktiviert werden können. Zu ihnen gehört der Ras-Signalweg, die Src Tyrosinkinasen sowie der PI3K- und PLC-Signalweg. Nach Stimulation des FGF-R1 wird der MAP-Kinaseweg bspw. durch Signalmoleküle wie Crk (Larsson, H. et al., 1999) und Shc (Klint, P. et al., 1999) aktiviert, es kommt zur Proliferation.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass β -Blocker einen signifikant inhibierenden Einfluss auf die Expression von FGF 2 haben. Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass β -Blocker unter Umständen den VEGF-abhängigen PI3-Kinaseweg beeinflussen und so über eine verminderte eNOS Aktivierung bzw. NO-Produktion anti-angiogen wirken. Da bekannt ist, dass FGF 2 ebenfalls Einfluss auf den PI3-Kinaseweg nimmt und so die Migration von vaskulären Zellen steuert (Cross, M.J. et al., 2000), kann bei diesem Signalweg von einem synergistischen Effekt von FGF mit VEGF ausgegangen werden.

4.3.3 Einfluss von PDGF

Der Wachstumsfaktor PDGF-BB führt über die Stimulation seines Rezeptors PDGF-R β zur Proliferation und Migration von Endothelzellen. Vor allem durch die Rekrutierung von Perizyten, die die Stabilität von Gefäßen fördern kommt es zu einer stark pro-angiogenen Wirkung. PDGF-BB führt zu einer ROS-vermittelten Steigerung der Vaskulogenese (Lange 2009) und nimmt über zahlreiche Signalkaskaden wie den PI3-Kinaseweg (Coughlin et al., 1989), die MAP Kinasen p38 (Matsumoto et al. 1999) und ERK1/2 (Chang et al. 2006) Einfluss auf die Vaskulogenese.

Eine Behandlung der EBs mit β -Blockern zeigte keine signifikante Veränderung der PDGF-BB Proteinexpression. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass PDGF im Gegensatz zu VEGF und FGF weniger stark auf die Proliferation von vaskulären Strukturen einwirkt. Die Hauptaufgabe des PDGF-BB ist in der Stabilisierung von Gefäßstrukturen zu sehen. So könnte durch β -Blocker und der daraus resultierenden VEGF/FGF Verminderung eine überschießenden Endothelzell-Proliferation eingedämmt werden, jedoch ohne Destabilisierung der Gefäßstrukturen.

4.4 Ausblick auf die Forschung mit β -Blockern

Die vorliegende Arbeit hat die Rolle der sekundäre Botenstoffe ROS und NO in Bezug auf die inhibierende Wirkung von β -Blockern auf Vaskulogeneseprozesse untersucht. In zukünftigen Untersuchungen sollte der Einfluss von weiteren sekundären Botenstoffen wie z.B. Kalzium erfolgen. Durch die PLC wird aus PIP_2 , IP_3 und DAG gebildet. Die Bindung von IP_3 an seinen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum führt zu einer schnellen Kalzium-Ausschüttung, die eine Kontraktion von glatten Muskelzellen herbeiführt. Das DAG kann zur Aktivierung der PKC führen, welche über Phosphorylierung von weiteren Proteinen Einfluss auf die Vaskulogenese nehmen kann. Generell ist zu sagen, dass Kalzium zahlreiche Proteinkinasen aktivieren bzw. inhibieren kann.

Dem PI3-Kinaseweg kommt bei der Proliferation von vaskulären Zellen sowie Bildung von Blutgefäßen eine große Bedeutung zu. Andere Rezeptor-Tyrosinkinasen scheinen ebenfalls in Signalwegen der Vaskulogenese involviert zu sein. So sollte in zukünftigen Experimenten die Rolle von MAP-Kinasen bei der anti-angiogenen Wirkung von β -Blockern untersucht werden.

β -Blocker scheinen über Einflussnahme auf die Expression pro-angiogener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren ihre Wirkung zu entfalten. Neben der hier untersuchten Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und PDGF, sollte in weiteren Versuchen die Wirkung von β -Blockern auf andere Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF, EGF, Angiopoietin und Interleukine etc. erfolgen.

Weiterhin konnte eine β -Blocker-bedingte Wirkung auf die Expression von einigen Axon Guidance Proteinen aufgezeigt werden. Es gibt noch weitere Gruppen von Axon Guidance,

die die Vaskulogenese modulieren. So sollte in weiterführenden Studien die Rolle von β -Blockern auf Axon Guidance Proteine wie Ephrine, Ephs; Slits, Roundabouts; Netrine und UNC5B untersucht werden.

Eine Inhibierung der Vaskulogenese konnte durch alle getesteten β -Blocker nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich ICI 118,551 in seiner Wirkung potenter als Propranolol und Atenolol, indem es in einer deutlich erniedrigten Konzentration ähnliche Ergebnisse produzierte. Dies könnte man sich bei der Therapie von Hämangiomen zunutze machen. In weiteren Tierexperimenten könnte getestet werden, inwieweit dieser *in vitro* beobachtete Effekt auch *in vivo* reproduzierbar ist. Vorteil der Behandlung mit selektiven β_2 -Blockern könnte eine Reduktion von Nebenwirkungen bei der Hämangiomtherapie sein.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass die Vaskularisierung in EBs nach Inkubation mit β -Blockern herabgesetzt wird. Eine daraufhin abgeleitete Hypothese besteht darin, dass β -Blocker nicht nur anti-angiogen wirken, sondern zusätzlich zur Stabilisierung von Blutgefäßen führen. Eine solche Eigenschaft könnte man sich z.B. bei atrio-venösen Malformationen oder dem M. Osler-Weber-Rendu zunutze machen. Beim M. Osler-Weber-Rendu handelt es sich um eine angeborene hämorrhagische Teleangiektasie. Diese Krankheit ist durch labile Blutgefäße gekennzeichnet, die spontan rupturieren und bei Lokalisation bspw. in Lunge oder Darm lebensbedrohlich sein kann (Duale Reihe Innere Medizin, 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den anti-angiogenen Effekt von β -Blockern können dabei helfen, das Verständnis der molekularen Mechanismen und somit die Wirkungsweise von β -Blockern bei der Vaskulogenese sowie der Therapie des infantilen Hämangioms besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine anti-angiogene Wirkung von β -Blockern an ES-Zellen in EBs (Tag 10) nachgewiesen werden. Dabei kam es sowohl zur signifikanten Abnahme des Vaskularisierungsgrades, als auch einer signifikanten Abnahme der Proteinexpression von CD 31 und VE-Cadherin.

Untersuchungen der Wirkung von β -Blockern auf die ROS-Generierung sowie Expression der NOX 4 zeigten keine Signifikanz. Somit ist davon auszugehen, dass β -Blocker keinen Einfluss auf die Generierung von ROS haben.

In weiteren Versuchen konnte eine signifikante Wirkung der β -Blocker auf die NO-Generierung ermittelt werden. Die NO-Generierung war nach β -Blocker-Gabe zu Beginn der Vaskulogenese signifikant vermindert. Desweiteren konnte eine signifikant verminderte Phosphorylierung der eNOS unter β -Blockern beobachtet werden.

Das Expressionsniveau von VEGF und seinem Rezeptor VEGF-R2 konnte durch β -Blocker ebenfalls signifikant vermindert werden. Neben der Abnahme des VEGF-R2, zeigte sich auch eine zusätzliche Abnahme seiner aktiven Form (p-VEGF-R2). Die FGF 2 Expression wurde ebenfalls herunter reguliert, eine Mitwirkung von FGF 2 in diesem Signalweg ähnlich dem von VEGF ist daher anzunehmen. Bei PDGF-BB hingegen, kam es hingegen nach β -Blocker-Applikation zu keiner signifikanten Veränderung des Expressionsniveaus.

Zudem waren β -Blocker in der Lage das Expressionsniveau der Axon Guidance Proteinen NRP 1 und Plexin B1 signifikant herabzusetzen. Die Expression von HIF-1 α , einem Stimulator der VEGF-Expression zeigte an Tag 10 ebenfalls eine signifikante Verminderung.

6. Summary

In the present study, the anti-angiogenic effect of β -blockers in 10 days old embryonic bodies derived from mouse embryonic stem cells was investigated. In this context, a strong decrease in vasculature development was observed; as well other vascular protein markers e.g. CD-31 and VE-cadherin were also significantly down regulated. It was also seen that β -Blockers have no influence on ROS generation and expression of NOX4. This rules out any role of β -Blockers induced ROS on embryonic vasculature development.

Further experiments showed a significant decrease role of β -blockers induced NO production. NO generation was blocked or reduced after addition of β -blockers. It was also observed that β -Blockers treatment influences the phosphorylation of eNOS, which is necessary for NO production.

The expression level of VEGF and its receptor VEGF-R2 was also significantly down regulated after treatment with β -Blockers. Furthermore the phosphorylation of VEGF-R2 was also reduced after treatment, which is necessary for active functioning of the receptor. Interestingly, FGF-2 expression was also down regulated after treatment with β -blockers, which suggests that FGF-2 has similar role like VEGF, while PDGF-BB expression remained unchanged after treatment.

Axon guidance proteins such as NRP-1 and Plexin B1 were also significantly down regulated after treatment of EBs with β -Blockers. Expression levels of HIF-1 α , a VEGF expression stimulator were also down regulated after treatment.

7. Literaturverzeichnis

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology*, Volume 227, Issue 2, 15 November 2000, Pages 271–278.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis L., Raff M., Roberts K., Walter P. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. *Wiley – VCH*, 2005, 3. Auflage.

Armitage M.E., Wingler K., Schmidt H.H.H.W., La M. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med* 2009; 87:1071-1076.

Babior B.M.: Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109(1):33-44, 2000

Bader A, Al-Dubai H and Weitzer G. Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions, *Circ Res*. 2000; 86:787-794.

Bader A, Gruss A, Höllrigl A, Al-Dubai H, Capetanaki Y and Weitzer G. Paracrine promotion of cardiomyogenesis in embryoid bodies by LIF modulated endoderm. Differentiation. 2001; 68:31-43.

Balligand J. Regulation of cardiac β -adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1999; 43:607-620.

Barnés C.M., Huang S., Kaipainen A., Sanoudou D., Chen E.J., Eichler G.S., Guo Y., Yu Y., Ingber D.E., Mulliken J.B., Beggs A.H., Folkman J., Fishman S.J. Evidence by molecular profiling for a placental origin of infantile hemangioma. *PNAS* 2005; 102:19097 – 19102.

Basiswissen Pathologie, Lehrburch der Medizin 2009

Beck et al.: A vascular niche and a VEGF–Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 478, 399–403 (20 October 2011)

Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH et al. PDGF-D is a specific, protease activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(5):512-516.

Bilski AJ, Halliday SE, Fitzgerald JD, Wale JL. The pharmacology of a beta 2 selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). *J Cardiovasc Pharmacol.* 1983 May-Jun;5(3):430-7.

Boscolo E., Bischoff J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Springer Science Business Media B.V.* 2009.

Broeders M.A., Doevendans P.A., Bekkers B.C., Bronsaer R., van Gorsel E., Heemskerk J.W., Egbrink M.G, van Breda E., Reneman R.S., van Der Zee R. Nebivolol: a third – generation beta – blocker that aguments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation* 2000; 102:677-684.

Cai H., Harrison D.G.: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10):840-844, 2000.

Chandel N.S., Schumacker P. T., Arch R.H.: Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 276(46):42728-42736, 2001

Chang HJ, Park JS, Kim MH, Hong MH, Kim KM, Kim SM et al. Extracellular signal regulated kinases and AP-1 mediate the up-regulation of vascular endothelial growth factor by PDGF in humanvascular smooth muscle cells. *Int J Oncol* 2006; 28(1):135-141.

Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H2O2 in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(8):891-897.

Claesson-Welsh L. Healing hemangiomas. *Nat Med* 2008; 14:1147 – 1148.

Coughlin SR, Escobedo JA, Williams LT. Role of phosphatidylinositol kinase in PDGF receptor signaltransduction. *Science* 1989; 243(4895):1191-1194.

Conway E.M., Collen D., Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49:507-521.

Cosentino F., Lüscher T.F. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 1999; 43:274-278.

Cremer H. Klassifizierung und Therapie – Empfehlungen. *Pädiatrie hautnah* 2009; 2:133-146.

Cross, M.J. et al. (2000) Tyrosine 766 in the fibroblast growth factor receptor-1 is required for FGF-stimulation of phospholipase C, phospholipase D, phospholipase A2, phosphoinositide 3-kinase and cytoskeletal reorganisation in porcine aortic endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113, 643–651

Dadras S.S., North P.E., Bertoncini J., Mihm M.C., Detmar M. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. *Mod Pathol* 2004; 17:1068 – 1079.

Daiber A., Ullrich V.: Radikalchemie im Organismus: Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit. *Chem u Zeit* 6:366-375, 2002.

Dayanir, V., Meyer, R. D., Lashkari, K. & Rahimi, N. Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 276, 17686–17692 (2001).

De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Cesarone C.F.: Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Amer J Med* 91:122S-130S, 1991.

Doetschman T, Shull M, Kier A and Coffin JD. Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension.* 1993; 22:618-29 Review.

Drake CJ. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69(1):73-82.

Dudzinski, D. M. & Michel, T. (2007). Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.*, 75, 247–260.

Ekelund UE, Harrison RW, Shokek O, et al. (1999). “Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacinginduced heart failure”. *Circ. Res.*; 85: 437 - 445.

Ergenekon E., Bozkaya D., Goktas T., Erbas D., Yucel A., Turan O., Hirfanoglu I., Onal E., Turkyilmaz C., Koc E., Atalay Y. Are serum nitric oxide and vascular endothelial growth factor levels affected by packed red blood cell transfusions? *Hematology* 2010; 15:170-173.

Evans MJ, Kaufman MH (1981). “Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos”. *Nature*; 292: 154 - 156.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999; 56:794-814.

Fazzari et al. Plexin-B1 plays a redundant role during mouse development and in tumour angiogenesis. *BMC Dev Biol.* 2007; 7: 55.

Findeisen K. Bachelorarbeit: Die Rolle von β -Rezeptor-Antagonisten auf die Vaskulogenese 2010.

Fischer S, Nishio M, Peters SC, Tschernatsch M, Walberer M, Weidemann S, Heidenreich R, Couraud PO, Weksler BB, Romero IA, Gerriets T, Preissner KT. Signaling mechanism of extracellular RNS in endothelial cells; *FASEB J* 2009 Jul; 23(7):2100-9

Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, Sessa WC. Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme; *J Biol Chem.* 2002 Feb 8;277(6):4277-84.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47(5):412-426.

Frérart F., Lobysheva I., Gallez B., Dessy C., Feron O. Vascular caveolin deficiency supports the angiogenic effects of nitrite, a major end product of nitric oxide metabolism in tumors. *Mol Cancer Res* 2009; 7:1056-1063.

Frieden et al. Infantile hemangiomas: current knowledge, future directions. Proceedings of a research workshop on infantile hemangiomas, April 7-9, 2005, Bethesda, Maryland, USA. *Pediatr Dermatol.* 2005 Sep-Oct;22(5):383-406.

Gabbita S.P., Robinson K.A., Stewart C.A., Floyd R.A., Hensley K.: Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 376:1-13, 2000

Gan LQ, Ni SL, Tan Q, Wang H. A Retrospective Study of Propranolol Therapy in 109 Infants with Infantile Hemangioma. *Pediatr Dermatol.* 2012 Dec 18.

Gentile C, Muise-Helmericks RC, Drake CJ. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblast and embryonic endothelial cell proliferation. *Dev Biol.* 2013 Jan 1;373(1):163-75. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.10.020. Epub 2012.

Gentile C, Muise-Helmericks RC, Drake CJ. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblast and embryonic endothelial cell proliferation. *Dev Biol.* 2013 Jan 1;373(1):163-75.

Gilbertson DG, Duff ME, West JW, Kelly JD, Sheppard PO, Hofstrand PD et al. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem* 2001; 276(29):27406-27414.

Grimal I, Duveau E, Enjolras O, Verret JL, Giniès JL. Effectiveness and dangers of interferon-alpha in the treatment of severe hemangiomas in infants. *Arch Pediatr.* 2000 Feb;7(2):163-7.

Harfouche R, Malak NA, Brandes RP, Karsan A, Irani K, Hussain SN. Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J* 2005; 19(12):1728-1730.

Heldin CH, Wasteson A, Westermark B. Platelet-derived growth factor. *Mol Cell Endocrinol.* 1985 Mar;39(3):169-87.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1283-316. Review.

Hirata Y. , Nagata D., Suzuki E., Nishimatsu H., Suzuki J., Nagai R. Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease. *Int Heart J* 2010; 51:1-6.

Hiratsuka S., Kataoka Y., Nakao K., Nakamura K., Morikawa S., Tanaka S., Katsuki M., Maru Y., Shibuya M. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is involved in guidance of VEGF receptor-positive cells to the anterior portion of early embryos. *Mol Cell Biol* 2005; 25:355–363.

Hipler U-C., Wollina U., Denning D., Hipler B. Fluorescence analysis of reactive oxygen species (ROS) generated by six isolates of *Aspergillus fumigatus*. *BMG Labtechnologies* 2002; Application Note 105.

Hochedlinger K., Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 2009; 136:509-523.

Hua Zhou; Ying-Hua Yang; Nada O Binmadi; Patrizia Proia; John R Basile. The hypoxia-inducible factor-responsive proteins semaphorin 4D and vascular endothelial growth factor promote tumor growth and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Experimental cell research* 2012;318(14):1685-98.

Iscoe N. Haematopoiesis. Searching for stem cells. *Nature*. 1990; 347:126-127

Jansen S., et al. The relaxant properties in guinea pig airways of S-nitrosothiols. *Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 154-160, (1992)

Ji Y, Chen S, Xiao X, Zheng S, Li K. β -blockers: a novel class of antitumor agents. *Onco Targets Ther.* 2012;5:391-401. doi: 10.2147/OTT.S38403. Epub 2012 Nov 26.

Joussen A.M., Kirchhof B., Gottstein C. Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Ophthalmologie* 2003; 100:284-291.

Kanno S., Kim P.K., Sallam K., Lei J., Billiar T.R., Shears L.L.: Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12277-12281, 2004

Klinke, Silbernagl; Lehrbuch der Physiologie 2005

Klint, P. and Claesson-Welsh, L. (1999) Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front. Biosci.* 4, D165–D177

Kopp C.W., Steiner S., Minar E. Therapeutische Angiogenese bei peripher-arterieller Verschlusskrankheit. *J Kardiologie* 2004; 11:79-83.

Lander, H.M., et al. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J. Immunol.* 150, 1509-1516, (1993)

Lange S., Heger J., Euler G., Wartenberg M., Piper H.M., Sauer H. Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell – derived endothelial cells by calcium – mediated generation of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 2009; 81:159-168.

Larsson, H. et al. (1999) Fibroblast growth factor receptor-1-mediated endothelial cell proliferation is dependent on the Src homology (SH) 2/SH3 domain-containing adaptor protein Crk. *J. Biol. Chem.* 274, 25726–25734

Lassegue B., Sorescu D., Szöcs K., Yin Q., Akers M., Zhang Y., Lambeth D., Griendling K.K.: Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: NOX1 mediates angiotensin II- induced superoxide formation and redox- sensitive signalling pathways. *Circ Res* 88:888-894, 2001.

Léauté - Labrèze C., Dumas de la Roque E., Hubiche T. Boralevi F., Thambo J.B. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 2008; 358:2649-51.

Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-9.

Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994; 8(16):1875-1887.

Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287(5):R1014-R1030.

Liang X, Xu F, Ma C, Zhang Y, Xu W. VEGF Signal System: The Application of Antiangiogenesis; *Curr Med Chem.* 2013 Sep 16.

Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGFB-deficient mice. *Science* 1997; 277(5323):242-245.

Liu V.W.T., Huang P. L. Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 2008; 77:19-29.

Lüllman, Mohr, Hein. Lehrbuch Pharmakologie und Toxikologie 2006

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

Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, Takemoto M, Ueno H, Saito Y et al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274(20):13954-13960.

Martin GR (1981). “Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 78: 7634 - 7638.

Mehvar R., Brocks D.R. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta – adrenergic blockers in humans. *J Pharm Pharm Sci* 2001; 4:185-200.

Milosevic, N., Bekhite, M. M., Sharifpanah, F., Ruhe, C., Wartenberg, M. & Sauer, H. (2010). Redox stimulation of cardiomyogenesis versus inhibition of vasculogenesis

Mohammadi, M. et al. (1991) A tyrosinephosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C- γ 1. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5068–5078

Mohamed K.M., A. Le u.a.: Correlation between VEGF and HIF-1 α expression in human oral squamous cell carcinoma. In: *Experimental and molecular pathology* Band 76, Nummer 2, April 2004, S. 143–152.

Nagano T. Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 45:111-124.

Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol.* 2000 Aug;44(2):219-29.

Ornitz u. a.: *Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family.* In: *J Biol Chem* 271, 1996, S. 15292–15297.

Ornitz und N. Itoh: *Fibroblast growth factors.* In: *Genome Biol* 2, 2001, S. 1–12.

Papapetropoulos, A., García-Cardena, G., Madri, J. A. & Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 100, 3131–3139.

Paz K., Zhu Z. Development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor receptor 2. Current status and future perspective. *Front Biosci* 2005; 10:1415-1439.

Penzlin H., Beinbrech G., Birkenbeil H., Bleckmann H., Eckert M., Frings S., Henning M., Hildebrandt J.-P., Jessen C., Stengl M., Stumpner A. Lehrbuch der Tierphysiologie. *Spektrum Verlag* 2005; 7.Auflage.

Plotnikov, A.N. et al. (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98, 641–650

Qiujun Yu, Feng Gao1, and Xin L. Ma, Insulin says NO to cardiovascular disease, *Cardiovasc Res* (2011) 89 (3): 516-524.

Rasmussen T.P. Embryonic stem cell differentiation: A chromatin perspective. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:100.

Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, D'eustachio P and Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96:2846-2851

Ribatti D., Nico B., Crivellato E., Vacca A. Endothelial progenitor cells in health and disease. *Histol Histopathol* 2005; 20:1351-1358.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11:73-91.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-674.

Roche E, Ramirez M, Castillejo C.R, et al. (2007). “Stem cell potential for type 1 diabetes therapy”. *Cent. Eur. J. Biol.*; 2: 449 - 480.

Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.

Sauer H, Neukirchen W, Rahimi G, et al. (2004). “Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells”. *Exp. Cell Res.*; 294: 313 - 324.

Schmidt A., Brixius K., Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res* 2007; 101:125-136.

Schupp CJ, Kleber JB, Günther P, Holland-Cunz S. Propranolol therapy in 55 infants with infantile hemangioma: dosage, duration, adverse effects, and outcome. *Pediatr Dermatol.* 2011 Nov-Dec;28(6):640-4.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, et al. (1998). “Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95: 13726 - 12731

Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39:469-478.

Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and – independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 2008; 278-286.

Shinkaruk S., Bayle M., Lăin G., Délérís G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3: 95-117.

Stegmann: *A human growth factor in the induction of neoangiogenesis.* In: *Exp Opin Invest Drugs* 7, 1998, S. 2011–2015.

Stewart CL, Gadi I, Bhatt H (1994). “Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line”. *Dev. Biol.*; 161: 626 - 628.

Soker, S. et al. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735–745

Sorescu G.P., Song H., Tressel S.L., Hwang J., Dikalov S., Smith D.A., Boyd N.L., Platt M.O., Lassegue B., Griendling K.K., Jo H.: Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a NOX1- based NADPH oxidase. *Circ Res* 95:773-779, 2004

Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 1994; 8(16):1888-1896.

Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, et al. (2005). “Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model”. *J. Clin. Invest.*; 115: 102 - 109.

Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K. & Shibuya, M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBOJ.* 20, 2768–2678 (2001).

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

Tessier-Lavigne. M. Axon guidance by molecular gradients; *Curr Opin Neurobiol.* 1992 Feb;2(1):60-5.

Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 297:L-1005-L1028.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. (1998). “Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts”. *Science*; 282: 1145 - 1147.

Ulfig et. al. Kurzlehrbuch Histologie 2.Auflage 2005.

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M et al. Novel role of gp91(phox) containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 91(12):1160-1167.

Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(6):731-739.

Van Laake L.W, Haaink R, Doevendans P.A, Mummery C (2006). “Heart repair and stem cells”. *J. Physiol.*; 577: 467 - 478.

Vittet D., Prandini M.-H., Berthier R., Schweitzer A., Sisteron H.M., Uzan G., Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 1996; 9:3424-3431.

Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest* 1998; 78(10):1301-1314.

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

Weibel L. Propranolol – eine neue Therapie für infantile Hämangiome. *Paediatrica* 2009; 20:27-29.

Wobus A.M., Guan K., Yang H.-T., Boheler K.R.: Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol* 185:127-156, 2002

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

8. Danksagung

Als aller erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Sauer für das Vertrauen in meine Person danken, erst dies gab mir die Möglichkeit meine Dissertation am Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität anzufertigen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. H. Sauer für die sehr interessante und zugleich herausfordernde Aufgabenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien sowie für die kompetente Betreuung während meiner gesamten Dissertation.

Weiterhin gilt mein Dank dem ganzen Laborteam, ganz besonders möchte ich mich bei Sascha Behr, Elham Sharifpanah, Barbara Arnold und Lena Maschek bedanken. Frau Sharifpanah danke ich für die tolle Einarbeitung in die anspruchsvolle Methodik, Frau Arnold danke ich für die stets qualitativ hochwertigen Stammzellen. Bei Herrn Behr und Frau Mascheck möchte ich mich über die stets kollegiale Stimmung sowie die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen bedanken.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, die mich in allen Höhen und Tiefen, nicht nur während des Studiums und der Dissertation, sondern mein ganzes Leben über unterstützt und an mich geglaubt hat.

Ohne Euch wäre das Studium der Humanmedizin sowie die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Vielen Dank!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6245-3



9 783835 1962453