

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

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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