

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 Aufzucht und Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen	46

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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