

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SUSZEPTIBILITÄT
VON STAMM- UND PROGENITORZELLEN,
ENDOTHELZELLEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN
GEGENÜBER GENOTOXISCHEN NOXEN**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tatiana Hennicke
aus Solingen

Düsseldorf, Dezember 2017

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Herr Prof. Dr. G. Fritz

Korreferent: Herr Prof. Dr. U. Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2018

FÜR TAMARA

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS KARDIOVASKULÄRE SYSTEM.....	1
1.1.1	Aufbau der Blutgefäße	2
1.1.1.1	Endothelzellen.....	3
1.1.1.2	Glatte Muskelzellen.....	4
1.2	REGENERATION	6
1.2.1	Gefäßneubildung und Wundheilung.....	6
1.3	STAMMZELLEN	9
1.3.1	Adulte Stammzellen	10
1.3.2	Embryonale Stammzellen.....	10
1.3.3	In Vitro Differenzierung embryonaler Stammzellen	12
1.4	EXPOSITION DER BLUTGEFÄßE MIT (UMWELT-) NOXEN	13
1.4.1.1	Ionisierende Strahlung (IR).....	15
1.4.1.2	Doxorubicin	17
1.5	ZELLULÄRE STRESSANTWORT	18
1.5.1	DNA-Schadensantwort	18
1.5.2	DNA-Reparatur	20
1.5.3	Apoptose und prämaturne Seneszenz	26
1.6	DNA REPARATUR IN EMBRYONALEN STAMMZELLEN UND SOMATISCHEN ZELLEN	28
1.7	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	30
2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	MATERIAL	32
2.1.1	Herstellernachweise.....	32
2.1.2	Geräte und Software	34
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.4	Chemikalien und Kits.....	37
2.1.5	Medien und Medienzusätze.....	39
2.1.6	Zellkultur und Differenzierungsmedien	40
2.1.7	Zelllinien	41
2.1.8	Real-time PCR-Primer	41
2.1.8.1	Real-time PCR-Array.....	41
2.1.8.2	Real-time PCR.....	44

2.1.9	Antikörper	45
2.1.9.1	Primärantikörper	45
2.1.10	Sekundärantikörper.....	45
2.1.11	Lösungen und Puffer	46
2.2	METHODEN	49
2.2.1	Zellkultur	49
2.2.1.1	Präparation von Maus embryonalen Fibroblasten	49
2.2.1.2	Kultivierung und Passagieren von Zellen	49
2.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen.....	50
2.2.2	Differenzierungen.....	50
2.2.2.1	Endothelzelldifferenzierung	50
2.2.2.2	Glatte Muskelzelldifferenzierung	50
2.2.2.3	Kardiomyozytendifferenzierung.....	50
2.2.3	Behandlung der Zellen mit Genotoxinen	51
2.2.4	Vorbereitung der Deckgläschen	51
2.2.5	Analysen zur Charakterisierung der differenzierten Zellen	51
2.2.5.1	Inkorporation von Dil-Ac-LDL und Lektinbindung	51
2.2.5.2	Tube Formation-Assay.....	52
2.2.5.3	Calceinfärbung	52
2.2.5.4	Calcium-Assay.....	53
2.2.5.5	Kontraktions-Assay.....	54
2.2.5.6	Alkalische Phosphatase Färbung	54
2.2.5.7	Immunzytochemische Färbungen	55
2.2.6	Molekularbiologische Analysen	55
2.2.6.1	RNA-Isolation.....	55
2.2.6.2	cDNA Synthese (reverse Transkription)	56
2.2.6.3	Quantitative Real-time PCR.....	56
2.2.7	Proteinbiochemie	56
2.2.7.1	Isolation von Proteinextrakten aus Zellen.....	56
2.2.7.2	SDS-Page.....	57
2.2.7.3	Westernblot	57
2.2.8	Analyse der Zellviabilität	58
2.2.8.1	Seneszenz β -Galaktosidase Färbung	58
2.2.8.2	Resazurin-Reduktionstest (Alamar Blue-Assay)	58
2.2.9	Analyse der Zellzyklusverteilung	59

2.2.9.1	Zellzyklusanalyse/SubG1 Messung.....	59
2.2.9.2	EdU-Inkorporations-Assay.....	60
2.2.10	Analyse von DNA-Schäden	61
2.2.10.1	γ H2AX-Foci	61
2.2.11	Statistische Auswertung.....	61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	VASKULÄRE DIFFERENZIERUNG DER MURINEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN	62
3.1.1	Endothelzelldifferenzierung	62
3.1.1.1	Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen.....	63
3.1.1.2	Funktionelle Analysen der differenzierten Endothelzellen.....	66
3.1.2	Glatte Muskelzelldifferenzierung	68
3.1.2.1	Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen	69
3.1.2.2	Funktionelle Analysen der differenzierten glatten Muskelzellen	73
3.2	ANALYSEN ZUR DNA-SCHADENSINDUKTION UND DNA-REPARATUR	75
3.2.1	Erfassung basaler differentiell exprimierter Suszeptibilitätsfaktoren	75
3.2.2	Bestimmung hochregulierter Suszeptibilitätsfaktoren nach Behandlung mit Genotoxinen.....	81
3.2.3	Untersuchungen zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, der DNA- Schadensantwort und der Reparaturfähigkeit von embryonalen Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen	88
3.2.4	Einfluss von Genotoxinen auf das vaskuläre Differenzierungspotential von Progenitorzellen	97
3.2.4.1	Vaskuläres Differenzierungspotential mesodermaler Progenitorzellen nach Bestrahlung	98
3.2.4.2	Vaskuläres Differenzierungspotential mesodermaler Progenitorzellen nach Behandlung mit Doxorubicin.....	104
4	DISKUSSION	112
4.1	VASKULÄRE DIFFERENZIERUNG DER MURINEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN	113
4.2	VERGLEICHENDE EXPRESSIONSANALYSEN VON SUSZEPTIBILITÄTSFAKTOREN IN STAMMZELLEN, ENDOTHELZELLEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN.....	121
4.3	REPARATURFÄHIGKEIT UND DNA-SCHADENSANTWORT IN STAMMZELLEN, ENDOTHELZELLEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN NACH EXPOSITION MIT GENOTOXINEN	130
4.4	EINFLUSS VON GENOTOXINEN AUF DAS VASKULÄRE DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL MESODERMALER PROGENITORZELLEN	136

5	AUSBLICK	139
6	ZUSAMMENFASSUNG	142
7	SUMMARY	144
8	LITERATURVERZEICHNIS	146
9	ANHANG	178
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	178
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	185
9.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	187
9.4	DOKUMENTATION DES EIGENANTEILS DIESER ARBEIT	188
9.5	PUBLIKATIONEN.....	189

1 EINLEITUNG

1.1 DAS KARDIOVASKULÄRE SYSTEM

Der Blutkreislauf des Menschen ist das Transportsystem des Blutes, das vom Herzen und einem Netz aus Blutgefäßen (kardiovaskuläres System) gebildet wird (Rehner & Daniel 2010). Bei einem erwachsenen Menschen bestehen zwischen 7 und 8,5 % des Körpergewichtes aus Blut (Zander 1988). Das Herz pumpt diese Blutmenge rund 2000 Mal pro Tag durch den gesamten Körper, was in etwa 10000 Litern Blut entspricht, die täglich durch die Aorta fließen (Salvi et al. 2007). Die Hauptaufgaben des Blutkreislaufes sind zum einen die Versorgung sämtlicher Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen (Fette, Zucker oder Eiweiße) und zum anderen der Abtransport von Stoffwechselabfallprodukten, wie beispielsweise Kohlenstoffdioxid (CO₂) oder Harnsäure (Risau & Flamme 1995). Zudem spielt er eine entscheidende Rolle bei der Wärmeregulation, der Verteilung von Hormonen und dem Transport von Abwehrzellen (Leukozyten) des Immunsystems (Aitsebaomo et al. 2008). Die Transportwege des Blutes sind die Blutgefäße. Mit ihren kleinsten Verzweigungen erreichen sie nahezu alle Bereiche des menschlichen Körpers. Die Homöostase des Organismus hängt entscheidend von der Funktion und dem Aufbau des Blutgefäßsystems ab und Funktionseinschränkungen haben fatale Folgen für die Gesundheit. Dysfunktionen in den Zellbestandteilen der Blutgefäße führen zu schwerwiegenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie beispielsweise Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt, Bluthochdruck oder Arteriosklerose, um nur einige zu nennen (Schulz et al. 2011; Münzel et al. 2008). Sie zählen zu den häufigsten Krankheiten und sind, laut statistischem Bundesamt, in Deutschland und anderen Industrienationen die Todesursache Nr. 1. Neben den bekannten Risikofaktoren wie Bluthochdruck, erhöhte Cholesterinwerte, übermäßiger Alkohol- und Nikotinkonsum sowie Stress und Bewegungsmangel (Erhardt 2009; Johnson et al. 2016), können auch bestimmte Umweltgifte, wie beispielsweise Methylquecksilber, welches durch den Verzehr von Fisch aufgenommen wird oder in der Atemluft vorhandene Schwermetalle, das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhöhen (Raymond et al. 2016; Shakir et al. 2016; Wohlfahrt et al. 2016). Aufgrund ihrer Barrierefunktion sind die Blutgefäße einer sehr hohen Konzentration an systemisch präsenten Noxen ausgesetzt. Auch Medikamente, wie sie beispielsweise in der Tumorthherapie eingesetzt werden, führen zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie Kardiotoxizität (Menna et al. 2008; Kremer et al. 2001). Ebenso werden strahlenbedingte Gefäßveränderungen, wie sie unter anderem bei einer Bestrahlung im Rahmen einer Krebstherapie auftreten können, als Ursache für kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen und beeinflussen das regenerative Potential der Blutgefäße (M.-O. Lee et

al. 2012; Hildebrandt 2010). Die Ursachen für die kardiotoxischen Wirkungen solcher Einflüsse sind sehr komplex und bis heute nicht ausreichend aufgeklärt.

1.1.1 Aufbau der Blutgefäße

Prinzipiell liegt allen Blutgefäßen ein identischer Aufbau zugrunde (Abbildung 1. 1). Arterien und Venen sind aus drei Wandschichten (Tunicae) aufgebaut. Die innerste Wandschicht, welche das Lumen eines Blutgefäßes auskleidet, wird als Tunica Intima bezeichnet und besteht aus einem Monolayer von Endothelzellen. Diese haften an einer Basalmembran, welche in Verbindung mit dem subendothelialen Raum steht. Darauf folgt, abgegrenzt durch eine elastische Lamina, die mittlere Tunica Media, welche aus mehrschichtigen glatten Muskelzellen aufgebaut ist. Die einzelnen glatten Muskelzellen sind durch Desmosomen mechanisch untereinander verbunden und bilden so ein dichtes Netzwerk. Die Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße stehen in direktem Austausch miteinander. Die Abgrenzung zur dritten Wandschicht, der Tunica Adventitia (auch Tunica Externa genannt) erfolgt ebenfalls durch eine elastische Lamina. Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, welche in erster Linie aus Fibroblasten besteht. Es befinden sich aber auch residente Stamm- und Progenitorzellen in ihr (Hoshino et al. 2008), die beispielsweise in Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Makrophagen differenzieren können und so maßgeblich an der Regeneration von Blutgefäßen und der postnatalen Angiogenese beteiligt sind (Passman et al. 2008; Zengin et al. 2006; Stenmark et al. 2013; Pasquinelli et al. 2007; Sartore et al. 2001). Außerdem beherbergt sie immunmodulierende Zellen, wie Makrophagen und Dendriten, und adrenerge Nerven (Stenmark et al. 2013). In größeren Blutgefäßen, wie der Aorta finden sich zudem Vasa Vasora in dieser Schicht. Dies sind Kapillaren, welche die Adventitia und Media mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Kapillaren stellen die kleinste Einheit im Blutgefäßsystem dar. Sie bestehen nur aus Endothelzellen und der Basalmembran sowie den außen anliegenden Perizyten, welche sich zusammenziehen können und in diesen Blutgefäßen die Funktion der fehlenden glatten Muskulatur übernehmen (Avolio & Madeddu 2016; Lehmann et al. 2003).

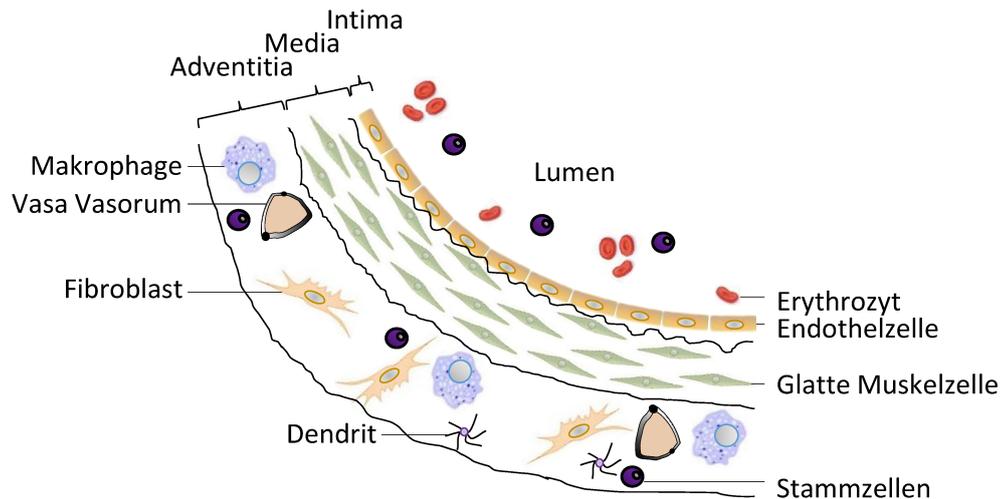


Abbildung 1. 1: Schematischer Aufbau eines Blutgefäßes.

Die Innerste, dem Blutstrom zugewandte Schicht besteht aus einem Monolayer aus Endothelzellen (Tunica Intima). Die mittlere Schicht (Tunica Media) beherbergt glatte Muskelzellen und die äußere Tunica Adventitia Makrophagen, Fibroblasten, Dendriten und residente Progenitorzellen (Stammzellen). Modifiziert nach Wang *et al.* und Stenmark *et al.* (Wang *et al.* 2008; Stenmark *et al.* 2013).

1.1.1.1 Endothelzellen

Die Endothelzellen (*endothelial cells*; EC) der Blutgefäße sind die Hauptregulatoren der vaskulären Homöostase. Dabei interagieren sie auf der einen Seite mit zirkulierenden Zellen im fließenden Blut und auf der anderen Seite parakrin, durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, mit den glatten Muskelzellen der Gefäßwand (Davies 1995). Auf diese Weise sind sie in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert. Das Endothel reguliert als Barriere den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut. Durch die Adhärenz von Immunzellen kontrolliert es Gerinnungs- und Entzündungsprozesse und ist somit maßgeblich an der Immunantwort eines Organismus beteiligt (Carman & Martinelli 2015). Durch eine Aktivierung des Endothels, beispielsweise durch inflammatorische Zytokine, können Leukozyten aus dem Blut an das Endothel binden (Leukodiapedese) und durch das Endothel in das darunterliegende Gewebe zum Infektionsort migrieren (transendotheliale Migration) und dort die Infektion bekämpfen. Außerdem regulieren die Endothelzellen den Tonus der Gefäßmuskulatur und somit den Blutdruck durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (Shu *et al.* 2015). Ebenso sind sie an komplexen vaskulären Remodellierungsprozessen, wie beispielsweise der Angiogenese, also der Sprossung neuer Gefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen, beteiligt (Yancopoulos *et al.* 2000). Aufgrund der Tatsache, dass sie die Grenzfläche zwischen dem Blut und dem Gewebe darstellen, sind sie im Blut enthaltenen (eventuell giftigen) Substanzen direkt ausgesetzt und von Veränderungen der Blutströmung am stärksten betroffen (Michiels 2003; Davies 1995; Chien 2007). Eine endotheliale Dysfunktion stellt einen kritischen Faktor für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen dar (Rösen

2002). Funktionsstörungen des Endothels, welche typischerweise mit einem Anstieg des oxidativen Stress und einer verminderten Stickstoffmonoxidverfügbarkeit einhergehen, sind vermutlich eine Hauptursache für die Entstehung von Arteriosklerose, welche wiederum ein Hauptrisikofaktor für Herzinfarkte und Schlaganfälle ist (Münzel et al. 2008; Schulz et al. 2011).

1.1.1.2 Glatte Muskelzellen

Die Hauptaufgabe der glatten Muskulatur innerhalb der Blutgefäße besteht in der Regulation des Gefäßtonus durch ihre Fähigkeit zur Kontraktion. Die Kontraktion wird durch eine steigende intrazelluläre Calciumionenkonzentration initiiert (Wynne et al. 2009; Perez & Sanderson 2005). Während andere Muskelzellen, wie beispielsweise Herzmuskelzellen irreversibel differenzieren, weisen glatte Muskelzellen (SMC, *smooth muscle cells*) eine funktionelle Plastizität auf (Owens 1995). In gesunden Gefäßen liegen SMC hauptsächlich in einem differenzierten, kontraktilen Phänotyp vor. Abhängig von Veränderungen der Umgebung und wechselnden Anforderungen können sie ihren Phänotyp ändern. Dabei dedifferenzieren sie zu einer synthetischen glatten Muskelzelle (Campbell & Campbell 1985). Diese phänotypische Modulation (Abbildung 1. 2) geht einher mit Veränderungen der Morphologie, Zellfunktion und des Genexpressionsmusters der SMC. Während kontraktile SMC durch die Ausrichtung der intrazellulären Filamente ein spindelförmiges Aussehen haben, sind synthetische SMC größer und flächiger. Synthetische SMC haben einen geringeren Anteil an kontraktilen Proteinen, enthalten weniger Myofilamente wie Myosin, Aktin und Caldesmon, besitzen jedoch mehr synthetische Organellen. Außerdem ist eine gesteigerte Proliferation und Proteinsynthese und eine erhöhte Migrationsrate charakteristisch für den synthetischen Phänotyp (Rensen et al. 2007; Hedin et al. 1991; Davis-Dusenbery et al. 2011).

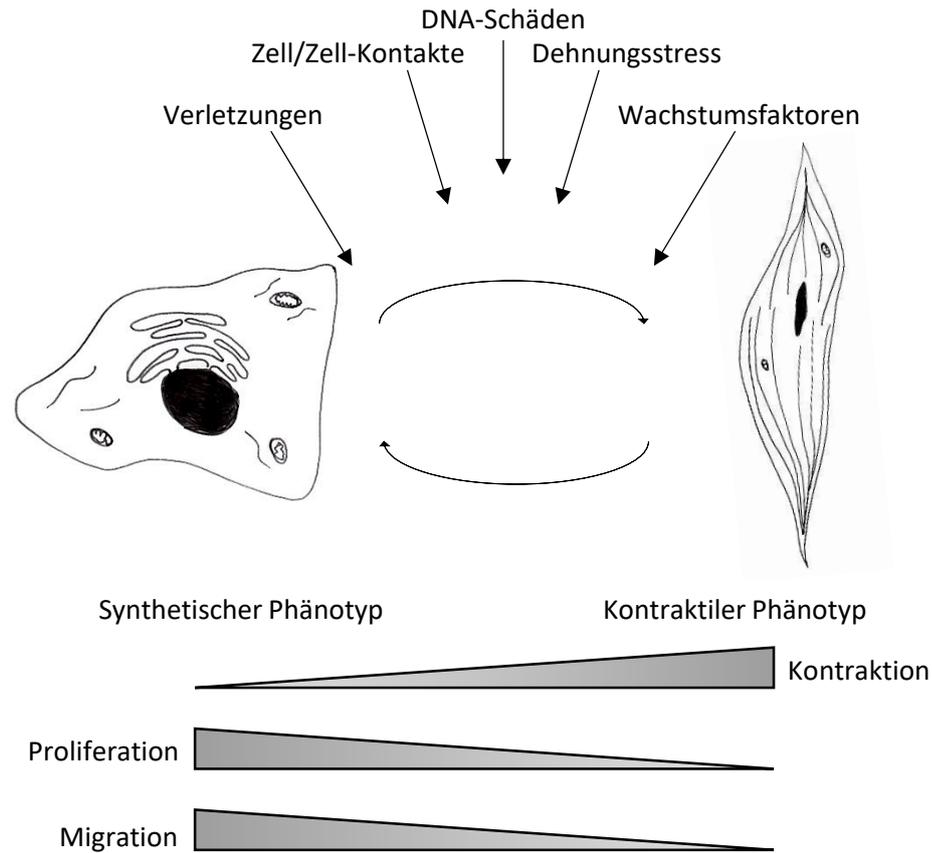


Abbildung 1. 2: Phänotypische Modulation der glatten Muskelzellen.

Unterschiedliche Ursachen können einen Phänotypenwechsel von einer kontraktilem zu einer synthetischen glatten Muskelzelle auslösen. Der kontraktile Phänotyp zeichnet sich durch seine Fähigkeit zur Kontraktion aus, proliferiert und migriert hingegen aber kaum. Modifiziert nach Davis-Dusenbery *et al.* (Davis-Dusenbery *et al.* 2011).

Nach einer Schädigung der Blutgefäßwand setzen EC Wachstumsfaktoren frei, welche eine phänotypische Modulation der SMC induzieren (Willis *et al.* 2004). Neben solchen sekretierten Wachstumsfaktoren wie beispielsweise den *platelet-derived growth factor* (PDGF), den *transforming growth factor beta* (TGF β) oder den *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), kann auch eine Veränderung in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, in welche die SMC eingebettet sind, einen Phänotypenwechsel bewirken (Moiseeva 2001; Ichii *et al.* 2001). Auch Veränderungen im Stickstoffmonoxidgehalt und reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) können einen Einfluss auf den Phänotyp der SMC nehmen (Rensen *et al.* 2007).

Das Auftreten von SMC mit einer gesteigerten synthetischen Aktivität wird mit verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert. So findet man den synthetischen Phänotyp in Gefäßen mit arteriosklerotischen Plaques, nach Gefäßverletzungen und in intimaler Hyperplasie (Lincoln *et al.* 1998; Manderson, Cocks, *et al.* 1989; Manderson, Mosse, *et al.* 1989; Shanahan & Weissberg 1998). Im frühen Krankheitsverlauf der Arteriosklerose wandelt sich die kontraktile SMC in eine synthetische SMC um und wandert in die Intima ein, wo sie verstärkt proliferiert, was eine intimale

Verdickung (arteriosklerotische Läsion) zur Folge hat und in letzter Konsequenz zu einem Herzinfarkt oder Schlaganfall führen kann (Bennett et al. 2016).

1.2 REGENERATION

Im Rahmen des natürlichen Verschleißes kommt es im menschlichen Organismus regelmäßig zu Regenerationsprozessen. Die Lebensdauer menschlicher Körperzellen ist ganz unterschiedlich. Nervenzellen beispielsweise überdauern 80 Jahre und länger. Andere Zellen erneuern sich dagegen ständig. So leben Erythrozyten beispielsweise 120 - 130 Tage, Hepatozyten 190 - 450 Tage, Leukozyten 1 - 3 Tage und die Schleimhautzellen des Dünndarms nur 30 - 35 Stunden (Bratosin et al. 1995; Bosman et al. 2008; MacDonald 1961; Flindt 1985). Im Rahmen des weiblichen Zyklus beispielsweise kommt es zu einer zyklischen Regeneration des Endometriums. Gerade bei stark beanspruchten Organen, wie der Leber oder der obersten Hautschicht, ist die Regenerationsfähigkeit am stärksten ausgeprägt (King & Newmark 2012). Neben diesen natürlich vorkommenden Prozessen haben auch von außen herbeigeführte Defekte in einem Zellsystem oder Gewebe einen Einfluss auf die Lebensdauer von Zellen. Die Fähigkeit der Selbstheilung geht von den Zellen aus, die die betroffenen Gewebe und Organe aufbauen. Durch die Sezernierung bestimmter Wachstumsfaktoren werden Stammzellen (siehe Abschnitt 1.3) aus dem Knochenmark, Blut oder einer organeigenen Stammzellnische mobilisiert (Jones & Wagers 2008). Für kurzlebige oder geschädigte Zellen in solchen Bereichen stellen Stammzellen ein Leben lang Nachschub bereit. Anders ist es hingegen beim menschlichen Gehirn, Auge oder Herzen. Zwar wurden vor einiger Zeit auch körpereigene Stammzellen innerhalb des menschlichen Herzens identifiziert, diese sind allerdings sehr selten. Eine komplette Regeneration, zum Beispiel nach einem Herzinfarkt, können sie nicht bewerkstelligen (Uchida et al. 2013). Zudem entsteht bei größeren Verletzungen ein Narbengewebe, so dass entstandene Defekte nur notdürftig repariert (Defektheilung), aber nicht vollständig regeneriert werden können. Eine Dysregulation oder Erschöpfung der Stammzellnische kann eine entscheidende Ursache für Gewebedegeneration sein (Jones & Wagers 2008).

1.2.1 Gefäßneubildung und Wundheilung

Im gesunden adulten Organismus kommt es hauptsächlich im Verlauf von regenerativen und pathologischen Prozessen zu einer Gefäßneubildung. Ausnahmen bilden Haarfollikel, der weibliche Zyklus, sowie eine Gravidität (Folkman 1995; Tamanini & De Ambrogi 2004; Plendl 2000; Yano et al. 2001). Dieser Prozess der Gefäßneubildung wird als Angiogenese bezeichnet, welcher klar von der Vaskulogenese abgegrenzt ist, die die Bildung des Blutgefäßsystems während der Embryonalentwicklung beschreibt. Die Angiogenese beschreibt im Gegensatz dazu, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen (Folkman & Klagsbrun 1987a; Folkman

& Klagsbrun 1987b). Dadurch kann zum einen eine Anpassung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung an die Bedürfnisse des Gewebes gewährleistet werden und zum anderen verletztes Gewebe regeneriert werden (DiPietro 2016). Am Wundheilungsprozess der Gefäße sind einerseits die in der Gefäßwand befindlichen Endothel- und glatten Muskelzellen beteiligt, andererseits kommt es im Zuge dessen auch zu einer Rekrutierung, Migration und Proliferation von vaskulären Progenitorzellen sowohl aus dem Knochenmark, als auch der Gefäßwand selbst (Adventitia) (Duong et al. 2011; Li Calzi et al. 2010; Klein et al. 2010; McDonald & Iruela-Arispe 2015).

Nach einer Schädigung kommt es zu einer Aktivierung der EC durch pathologische Reize, wie beispielsweise proangiogenetische Faktoren. Zu diesen zählen unter anderem die Chemokine *fibroblast growth factor* (FGF), PDGF und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Risau 1990). Dies hat zunächst eine Freisetzung von Proteasen zur Folge, welche die umliegende Basalmembran auflösen und so die Migration der EC ermöglichen (Carmeliet 2000). Diese wandern in Richtung des proangiogenetischen Stimulus, wo sie proliferieren und sich zur Bildung neuer Gefäßstrukturen zusammenlagern (Carmeliet 2000). Zwar ist die Aktivierung der EC zur Initiierung der Angiogenese ausreichend, für die vollständige Ausreifung des neuen Blutgefäßes sind aber auch SMC von entscheidender Bedeutung (Fisher 2010). So stimulieren vaskuläre Schädigungen auch die Proliferation der SMC durch die Modulation ihres Phänotyps (G. Wang et al. 2015). Die synthetischen SMC migrieren ebenfalls in Richtung des proangiogenetischen Stimulus aus der Media in die Intima, wo sie proliferieren. Das neu entstandene Gefäß wird stabilisiert und die weitere Migration und Proliferation der EC inhibiert (McDonald & Iruela-Arispe 2015). Erst wenn diese Schritte erfolgreich abgeschlossen sind und die Endothelintegrität wiederhergestellt ist, können die SMC wieder in ihren differenzierten kontraktilen Phänotyp wechseln (G. Wang et al. 2015).

Dysreguliertes Gefäßwachstum trägt zur Entstehung zahlreicher Krankheiten, wie beispielsweise Retinopathien, krankhafter Adipositas, Asthma, Autoimmunopathien und Arteriosklerose, bei (Carmeliet 2000).

So wie bei den meisten Regenerationsprozessen im menschlichen Körper, spielen Stammzellen auch bei der Regeneration von Blutgefäßen eine entscheidende Rolle (Abbildung 1. 3). Sie werden durch die Sekretion bestimmter Zytokine rekrutiert, migrieren in die geschädigten Bereiche und reichern sich dort an, wo sie unter anderem zu EC, SMC oder Myofibroblasten differenzieren. Die, zum Beispiel durch einen DNA-Schaden ausgelöste, Apoptose in SMC bewirkt eine Freisetzung des *stromal-derived factor 1* (SDF1). Dadurch werden Entzündungszellen wie Makrophagen und Leukozyten, aber auch vaskuläre Progenitorzellen aus dem Knochenmark rekrutiert (Zernecke et al.

2005). Die durch das Absterben der SMC herbeigeführte Zellosigkeit der mittleren Gefäßschicht, führt zu einem verstärkten *Homing* (gezieltes Einwandern) dieser Progenitorzellen (Zernecke et al. 2005). Zusätzlich besitzen hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut nicht nur die Fähigkeit in alle Zellen des blutbildenden Systems differenzieren zu können sondern auch in Herzmuskelzellen, EC und SMC (Yeh et al. 2003). Zudem befinden sich im Blut zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPC; *endothelial progenitor cells*) und die Gefäßwand selbst beherbergt residente Progenitorzellen, die eine entscheidende Funktion bei der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion spielen (Stenmark et al. 2013; Pacilli & Pasquinelli 2009). Als eine Antwort auf Stress, die Entwicklung von arteriosklerotische Plaques oder eine Verletzung können die residenten Progenitorzellen der Adventitia aktiviert und spezifiziert werden, um verschiedene funktionelle und strukturelle Aufgaben zu übernehmen (Klein 2016; Gómez-Gavira et al. 2012; Zengin et al. 2006).

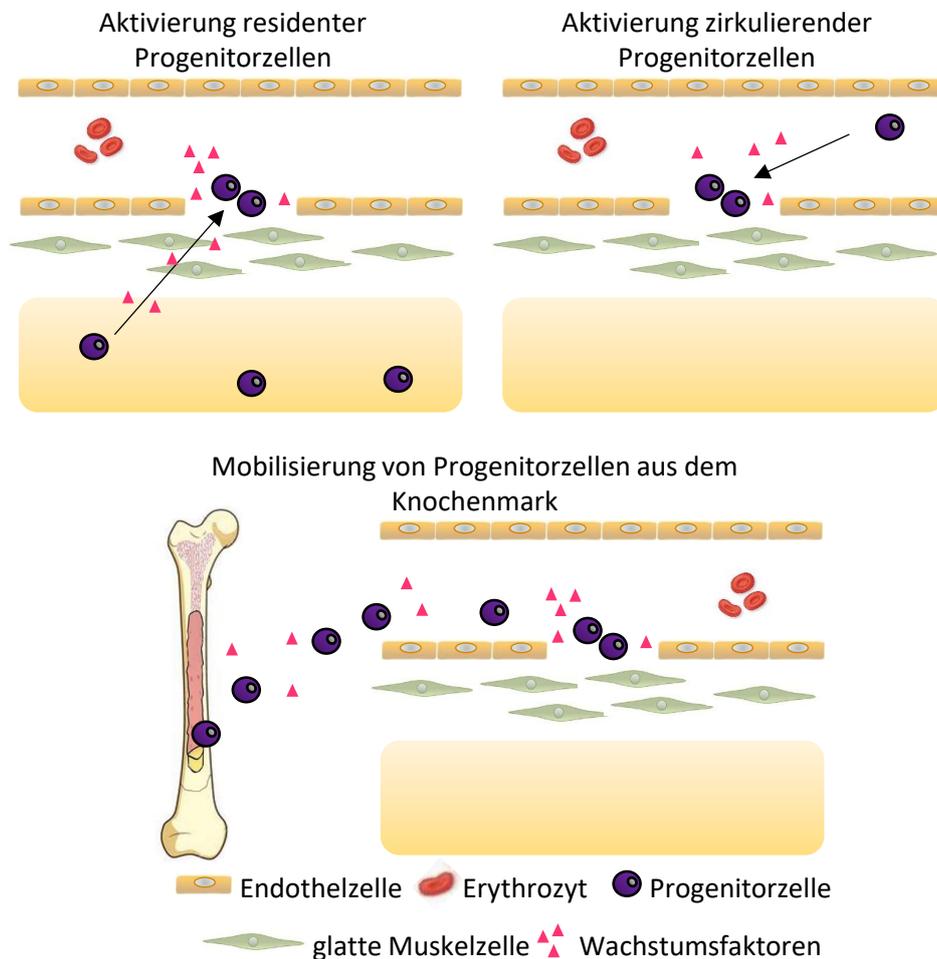


Abbildung 1. 3: Beteiligung von Stamm- und Progenitorzellen an vaskulären Reparatur- und Regenerationsprozessen.

An regenerativen Prozessen sind neben der Aktivierung der Endothelzellen und der Stimulation der Angiogenese auch Progenitorzellen beteiligt. Im Blut zirkulierende Stammzellen, sowie residente Progenitorzellen aus der Adventitia und dem Knochenmark können durch sezernierte Wachstumsfaktoren rekrutiert werden. Nach einer Einwanderung in die Läsion proliferieren diese und differenzieren.

Neben direkter Schädigungen der ausdifferenzierten Zellen der Blutgefäße, können Veränderungen des endogenen Stammzellpools zu einer vaskulären Dysfunktion führen. So werden die Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit, wie Diabetes, Hypercholesterinämie und Rauchen (Vasa et al. 2001), mit einer reduzierten Anzahl und einer eingeschränkten Funktion von zirkulierenden EPC assoziiert. Außerdem können chronische Entzündungen und oxidativer Stress ein Auslöser dafür sein, dass die regenerativen Signalwege der Stamm-/Progenitorzellen in proatherogene Richtung umschlagen, was zu einer Rekrutierung von Monozyten, Immunzellen und Progenitorzellen in die Gefäßwand führt. Die rekrutierten Zellen lagern sich im Lumen an und reifen dort zu SMC, was eine intimalen Verdickung zur Folge hat (Zernecke et al. 2008). Die beeinträchtigte Regeneration von vaskulären Schäden, welche zum Beispiel durch eine, durch DNA-Schäden induzierte, Seneszenz (siehe Abschnitt 1.5.3) in den EPC (M.-O. Lee et al. 2012) ausgelöst wird, fördert das Entstehen von vaskulären Krankheiten (Besler et al. 2008). Ebenso können die Art des entstandenen Schadens (Thomas et al. 2009) und die Verwendung von Medikamenten einen Einfluss auf den endogenen Stammzellstatus und die Fähigkeit des *Homings* in den geschädigten Bereichen haben (Dotsenko 2010).

1.3 STAMMZELLEN

Als Stammzellen werden undifferenzierte Zellen bezeichnet, die durch asymmetrische Zellteilung, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Gewebe besitzen (Abbildung 1. 4).

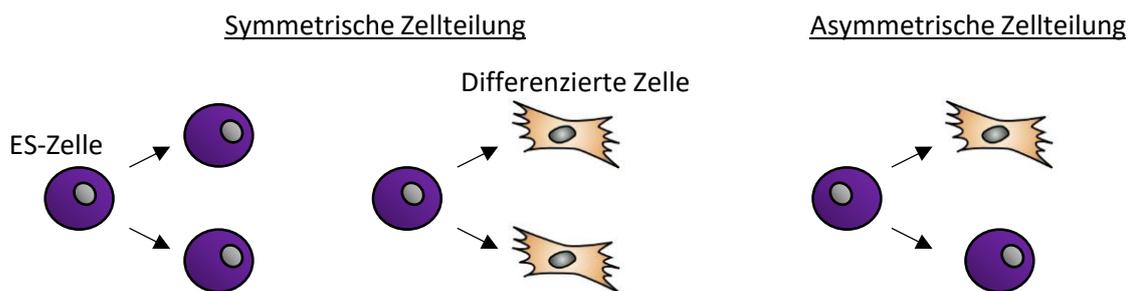


Abbildung 1. 4: Symmetrische und asymmetrische Stammzellteilung.

Stammzellen besitzen sowohl die Fähigkeit zur symmetrischen als auch zur asymmetrischen Zellteilung. Je nach Bedarf kann die Art der Zellteilung angepasst werden. Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen so entweder zwei neue Stammzellen oder zwei differenzierte Zellen. Bei der asymmetrischen Zellteilung entstehen eine neue Stammzelle und eine differenzierte Zelle. Abbildung modifiziert nach Shahriyari und Komarova (Shahriyari & Komarova 2013).

Entsprechend ihrer Herkunft werden embryonale, neonatale und adulte Stammzellen unterschieden. Je nach Art der Stammzellen besitzen sie ein totipotentes (befruchtete Eizelle, bis zum 8-Zell-Stadium), pluripotentes (embryonale Stammzelle, induziert pluripotente Zelle) oder multipotentes (neonatale und adulte Stammzellen) Differenzierungspotential. Totipotente Zellen

haben die Fähigkeit einen vollständigen Organismus bilden zu können. Pluripotente Stammzellen können zu Zellen aller drei Keimblätter, sowie zu Keimbahnzellen differenzieren und multipotente Stammzellen differenzieren in Zelltypen einer Linie, meist innerhalb eines Keimblattes (Mariani 2003).

1.3.1 Adulte Stammzellen

Bei den bereits mehrfach erwähnten Progenitorzellen (Vorläuferzellen) handelt es sich um adulte Stammzellen. Adulte Stammzellen finden sich in vielen Geweben des menschlichen Körpers, besonders im Knochenmark (Pittenger et al. 1999), in der Haut, aber auch im Fettgewebe (Vishnubalaji et al. 2012; Zuk et al. 2002), im Nabelschnurblut (Kögler et al. 2004), im peripheren Blut (Kuznetsov et al. 2001), im Gehirn, der Leber oder der Bauchspeicheldrüse (Seeberger et al. 2006) und zu sehr geringen Anteilen auch im menschlichen Herzen (Uchida et al. 2013). Sie dienen während der gesamten Lebensdauer des Organismus der Bildung neuer spezialisierter Zellen und können dadurch geschädigte, gewebespezifische Zellen ersetzen.

An der vaskulären Regeneration sind neben EPC auch weitere vaskuläre Progenitorzellen mesenchymalen und stromalen Ursprungs und hämatopoetische Stammzellen beteiligt. Diese ruhen im Knochenmark, der Adventitia oder zirkulieren im peripheren Blut (Zernecke et al. 2005; Yeh et al. 2003; Stenmark et al. 2013). EPC existieren in verschiedenen Stadien, deren Spannweite vom Hämangioblast bis hin zur ausdifferenzierten Endothelzelle reicht. Dabei können sie sowohl zirkulierend als auch resident vorkommen (Lin et al. 2000). Die endgültige Charakterisierung vaskulärer Vorläuferzellen ist jedoch bis heute nicht geklärt (Caplice & Doyle 2005; Khakoo & Finkel 2005), als erwiesen gilt, dass an der vaskulären Regeneration mehr als eine Art von Progenitorzelle beteiligt ist.

1.3.2 Embryonale Stammzellen

In dieser Arbeit wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus verwendet, um zum einen Endothelzellen und glatte Muskelzellen daraus abzuleiten und zum anderen, um Auswirkungen von genotoxischen Noxen auf das Differenzierungspotential von Progenitorzellen zu untersuchen. Das Differenzierungspotential von embryonalen Stammzellen ist schematisch in Abbildung 1. 5 dargestellt. ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse von Embryonen im Blastozysten-Stadium gewonnen. Sie besitzen das Potential, in Zelltypen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) des Körpers, sowie in Keimzellen zu differenzieren, ohne jedoch einen vollständigen Organismus ausbilden zu können. Nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle und der Vereinigung der Vorkerne durchläuft die befruchtete Eizelle eine Reihe von Zellteilungen: Über das Zwei-, Vier- und Acht-Zellstadium wird bei der Maus am Tag 2,5 der Embryonalentwicklung das Morula-Stadium (16-Zellstadium) und nach etwa 3,5 Tagen das Blastozystenstadium (mit ca. 150

Zellen) erreicht. Die Blastozyste besteht aus den Zellen der inneren Zellmasse, der Blastocoelhöhle sowie den äußeren Trophoblastenzellen (Trophectoderm). Blastozysten lassen sich bei Mäusen aus dem Uterus herauspülen. ES-Zellen werden aus dieser inneren Zellmasse von Embryonen im Blastozysten-Stadium gewonnen. Erstmals gelang dies 1980 (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981). Zur Gewinnung von ES-Zellen werden die Blastozysten unter definierten Bedingungen in die Zellkultur überführt. Durch Laserstrahlen oder unter Einsatz von Antikörpern wird der Trophoblast aufgelöst, so dass die innere Zellmasse isoliert und in die Petrischale überführt werden kann. Hier wachsen die Zellen der inneren Zellmasse als undifferenzierte Zellen aus.

ES-Zelllinien der Maus lassen sich nahezu unbegrenzt im undifferenzierten Zustand kultivieren. So zeigen z. B. Zelllinien, die über zwei Jahre in Kultur gehalten wurden, keinen Verlust ihres undifferenzierten Zustandes. Zudem weisen sie keine Veränderungen des normalen diploiden Chromosomensatzes auf, das heißt ihr Karyotyp bleibt stabil (Smith 2001). Die in dieser Arbeit verwendete Stammzelllinie LF2 (Nichols et al. 1990) wurde aus dem Mausstamm 129 isoliert. Embryonale Stammzelllinien werden entweder in Anwesenheit des Zytokins *leukemia inhibitory factor* (LIF) (Smith et al. 1988) oder auf einem Monolayer aus mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs, Fütterzellen) kultiviert, welche ebenfalls LIF sezernieren und die Stammzellen somit in einem undifferenzierten Zustand halten. Dies geschieht über die Aktivierung des JAK (Januskinase)/STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*) Signalweges. Entfernt man LIF aus dem Kulturmedium oder kultiviert die Zellen ohne *feeder-layer* fangen sie an zu differenzieren und verlieren ihre Pluripotenz (WiCell 2008).

Die Möglichkeit ES-Zellen *in vitro* zu kultivieren und zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren, weckte ein großes Interesse an der Erforschung der embryonalen Stammzellen als ein möglicher Ersatz für geschädigte Gewebe in der regenerativen Medizin.

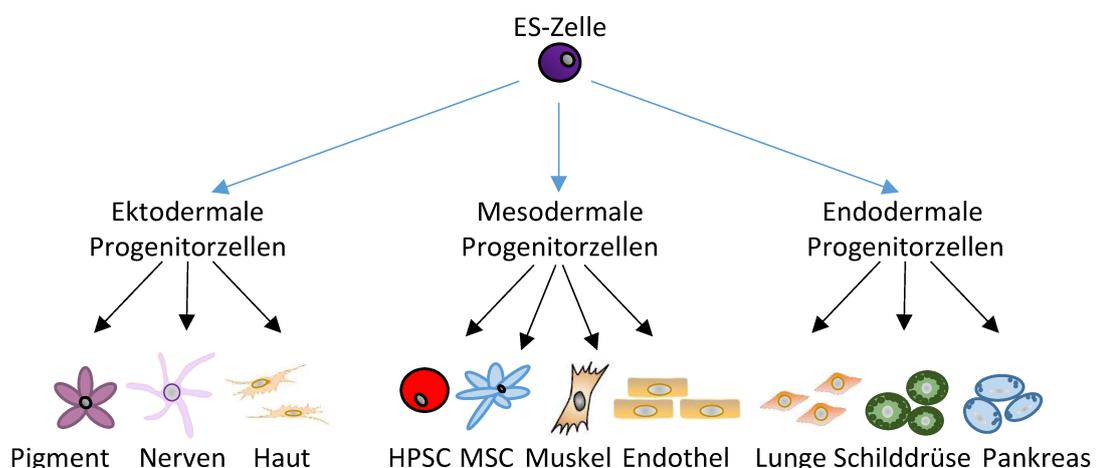


Abbildung 1. 5: Das Differenzierungspotential von embryonalen Stammzellen.

Embryonale Stammzellen sind pluripotent. Sie besitzen die Fähigkeit in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren: Ektoderm (wie Pigmentzellen, Neurone und Hautzellen), Mesoderm (wie hämatopoetische (HPSC) und mesenchymale (MSC) Stammzellen, Muskel- und Endothelzellen) und Endoderm (wie Zellen der

Lunge, der Schilddrüse und des Pankreas). Ebenso sind sie in der Lage in Keimbahnzellen (nicht gezeigt) zu differenzieren. Modifiziert nach Kaebisch *et al.* (Kaebisch et al. 2015).

1.3.3 *In Vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen

Die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen *in vitro* kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Zum einen über die Bildung von sogenannten *embryoid bodies* (EBs) zum anderen im Monolayer. Um in der Zellkultur eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen zu induzieren, wird den kultivierten ES-Zellen zunächst der *feeder-layer* bzw. das LIF entzogen. Um EBs bilden zu können, müssen die Zellen entweder in Bakterienkulturschalen, an denen sie nicht anheften, oder in sogenannten *hanging drops* (hängende Tropfen) kultiviert werden. Dieses führt dazu, dass sich die Zellen in Form von Zellverbänden aggregieren und mit einer spontanen Differenzierung beginnen. Diese Art der Differenzierung ist nicht gerichtet und führt zunächst zu einem Gemisch verschiedener Zelltypen der drei primären Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. In diesem Gemisch findet sich auch immer ein hoher Anteil von schlagenden Kardiomyozyten. Dieses Prinzip der spontanen, ungerichteten Differenzierung liegt dem in der Toxikologie verwendeten embryonalen Stammzelltest (EST) zugrunde. Der EST basiert auf der Fähigkeit der murinen embryonalen Stammzellen, sich spontan in kontrahierende Herzmuskelzellen zu entwickeln, die mikroskopisch detektiert werden können. So kann anhand eines biostatistischen Prädiktionsmodells das embryotoxische Potenzial einer Prüfsubstanz vorhergesagt werden (Doetschman et al. 1985; Genschow et al. 2002).

Mit Hilfe von Wachstumsfaktoren oder sogenannter *small molecules* ist es möglich, die im Monolayer kultivierten Zellen in eine bestimmte Richtung zu differenzieren. Durch diese Manipulation der Wachstumsbedingungen kultivierter muriner ES-Zellen ist in den vergangenen Jahren die Differenzierung von ES-Zellen der Maus in eine Reihe von Zelltypen gelungen. So konnte gezeigt werden, dass sich aus *in vitro* kultivierten ES-Zellen Zellen des Gefäßsystems und des Herzen, wie vaskuläre glatte Muskelzellen (Drab et al. 1997), Endothelzellen (Risau et al. 1988; Wartenberg et al. 1998; Yamashita et al. 2000; Blancas et al. 2008; Chiang & Wong 2011) und Kardiomyozyten (Guan et al. 1999; Miller-Hance et al. 1993; Maltsev et al. 1993) differenzieren lassen. Außerdem konnten sie zu Zellen des blutbildenden Systems und der Lymphe, wie hämatopoetische Zellen (Wiles & Keller 1991; Schmitt et al. 1991; Nakano et al. 1996; Nishikawa et al. 1998) und lymphoide Vorläuferzellen (Potocnik et al. 1994) differenziert werden. Außerdem zu Zellen des Nervensystems, einschließlich Astrozyten, dendritischen Zellen und Neuronen (Bain et al. 1995; Strübing et al. 1995; Park & Lee 2007; Fairchild et al. 2000) und zu Zellen des Knochen- und Muskelsystems, wie Chondrozyten (Kramer et al. 2000), Osteoblasten (Buttery et al. 2001) und Skelettmuskelzellen (Rohwedel et al. 1994). Zudem ist es gelungen murine embryonale

Stammzellen in Epithelzellen (Bagutti et al. 1996) und Fettzellen (Dani et al. 1997) zu differenzieren. Zusätzlich konnten diesen terminal differenzierten Zellen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften zugeordnet werden. So konnten Herzmuskelzellen in Vorhof-, Kammer-, Purkinjefaser- und Schrittmacherzellen (Maltsev et al. 1993; Rohwedel et al. 1994; Hescheler et al. 1997) unterschieden werden und Nervenzellen als inhibitorische und exzitatorische (Strübing et al. 1995) charakterisiert werden. Beispielsweise sind aus murinen embryonalen Stammzellen abgeleitete Endothelzellen in Kultur zur Ausbildung vaskulärer Strukturen (Blutgefäße) fähig. In diesen Strukturen konnten zudem erste Blutzellen nachgewiesen werden (Yamashita et al. 2000). Funktionelle Analysen an aus mESC abgeleiteten Neuronen zeigten, dass diese Zellen tatsächlich wie natürliche Neuronen reagieren. Sie wiesen nicht nur ein elektrisches Potenzial auf sondern reagierten sogar auf die Zugabe von Kaliumionen (K^+) mit der vermehrten Ausschüttung von Dopamin (Park & Lee 2007). Es konnten außerdem bereits ES-Zellen über mehrere Zwischenschritte in Inselzellen der Bauchspeicheldrüse differenziert werden (Lumelsky et al. 2001), welche auf die Zugabe von Glukose in das Medium mit der Produktion von Insulin reagierten. Auch zeigen sie die gleichen Reaktionen wie natürliche Inselzellen auf Pharmaka. Agonisten der Insulinproduktion stimulierten die Insulinausschüttung, Antagonisten hemmten sie. Diese Daten zeigen deutlich, dass man heute in der Lage ist aus embryonalen Stammzellen der Maus Zellen zu differenzieren, die in ihren funktionellen Eigenschaften den korrespondierenden, spezialisierten Körperzellen entsprechen. ES-Zellen der Maus spiegeln in der Zellkultur also anscheinend das natürliche Entwicklungsprogramm eines Zelltyps im Organismus wieder. Allerdings sind die den Differenzierungen in definierte Zelltypen zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen noch weitgehend ungeklärt.

Nichtsdestotrotz sind aus murinen ES-Zellen abgeleitete Zellen ein gutes Modellsystem für toxikologische Untersuchungen, vor allem da Primärkulturen teilweise schwer zugänglich sind oder sich schlecht kultivieren lassen (Scott et al. 2013; Wobus & Löser 2011). Zudem lassen sich äußere Einflüsse auf das Differenzierungspotential der Zellen untersuchen.

1.4 EXPOSITION DER BLUTGEFÄßE MIT (UMWELT-) NOXEN

Der Mensch ist während seines ganzen Lebens einer Vielzahl von Giften ausgesetzt. Dazu gehören beispielsweise künstliche Pflanzenschutzmittel, halogenierte Kohlenwasserstoffe oder Kunststoffe aber auch Medikamente und andere chemische und physikalische Umweltfaktoren. Diese Exposition birgt verschiedene ernsthafte Risiken und kann zu gewebespezifischen Schäden bis hin zur Entstehung von Tumoren führen (Wobus & Löser 2011). EC werden als natürliche Barriere zwischen Blutraum und Gewebe mit höchsten Konzentrationen von systemischen Noxen belastet. Aufgrund dieser permanenten Belastung ist es denkbar, dass das vaskuläre Endothelium effektive

Reparatur- und Regenerationsprozesse bereitstellen muss, um die vaskuläre Gesundheit sicherzustellen. Falsche oder unvollständige Reparatur könnte zu pathophysiologischen Veränderungen führen und eine endotheliale Dysfunktion manifestieren.

Studien zeigen, dass ein hoher Gehalt an Umweltgiften im Blut das Risiko für einen Schlaganfall erhöht. Bei Menschen mit erhöhten Werten von PCB (Polychlorierte Biphenyle) oder dem Insektizid DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) im Blut, kann sich das Schlaganfall-Risiko verdoppeln. Rückstände von PCB und DDT, wie sie sich beispielsweise in fetten Milchprodukten oder fettem Fisch von der Ostsee finden, können Verkalkungen der Blutgefäße verursachen (D.-H. Lee et al. 2012; Salihovic et al. 2016; Glynn et al. 2000).

Ebenso führt die Entstehung von DNA-Schäden in EC oder SMC zu vaskulären Dysfunktionen. Die DNA von Zellen kann auf viele verschiedene Weisen geschädigt werden. Spontane Schäden als Folge von Replikationsfehlern, Desaminierung oder Depurinierung müssen zusätzlich zu Schäden, verursacht durch Oxidation und in der Umwelt vorhandenen Chemikalien, repariert werden. Viele mit der Atherogenese assoziierte Risikofaktoren, wie Rauchen und Diabetes, können direkt DNA-Schäden induzieren (Mahmoudi et al. 2006). Rauchen beispielsweise kann oxidative DNA-Schäden verursachen und die DNA-Reparatur inhibieren (Erhardt 2009; Murohara et al. 1994; Heitzer et al. 1996). Auch andere Studien konnten zeigen, dass endotheliale Dysfunktionen, wie Arteriosklerose in einem direkten Zusammenhang mit DNA-Schäden und der daran anschließenden DNA-Schadensantwort stehen (Förstermann 2008; Shah & Mahmoudi 2015). Ein Verlust der Heterozygotität, DNA-Strangbrüche, Basenmodifikationen, Mikrosatelliteninstabilität und DNA-Addukte wurden sowohl in arteriosklerotische Plaques, vaskulären SMC als auch in zirkulierenden Zellen der betroffenen Patienten gefunden (Demirbag et al. 2005; Shah & Mahmoudi 2015; Gray et al. 2015). Es wird vermutet, dass vor allem DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs; *dna double strand breaks*) die Bildung von arteriosklerotischen Plaques fördern, indem sie zu einem Wachstumsarrest oder Apoptose (siehe Abschnitt 1.5.3) in vaskulären SMC führen. Die direkten Effekte von DSBs im Verlauf einer Atherogenese sind allerdings nicht ganz geklärt (Gray et al. 2015).

Auch im Rahmen einer Krebsbehandlung eingesetzte Medikamente, wie ionisierende Strahlung (IR; *ionizing radiation*) und Chemotherapeutika, haben eine genotoxische Wirkung. Dabei können sie, neben den gewünschten Effekten auf den Tumor, auch gesundes Gewebe schädigen. Entsprechend können IR und Chemotherapie auch negative Auswirkungen auf vaskuläre Funktionen haben. So werden zum einen strahlenbedingte Gefäßveränderungen als Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen (Hildebrandt 2010; M.-O. Lee et al. 2012). Zum anderen ist Kardiotoxizität eine unerwünschte Wirkung einer Vielzahl von Tumortherapeutika, wie Taxol, Trastuzumab und Anthrazyklin Derivaten (beispielsweise Doxorubicin) (Menna et al. 2008). Dabei spielen, neben den

direkten Auswirkungen auf die Zellen der Blutgefäße, wie EC und SMC, auch Auswirkungen auf Stamm- und Progenitorzellen eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass hohe Dosen Chemotherapeutika und IR die im Knochenmark befindliche Stammzellpopulation beeinträchtigen. Dadurch wird der endogene Stammzellpool erschöpft und die Regenerationsfähigkeit reduziert, was funktionelle Defekte verursacht (Cao et al. 2011; Mendelson & Frenette 2014). Auch bei chronisch-kardiotoxischen Anthrazyklinwirkungen ist es denkbar, dass diese aus einer endothelialen Dysfunktion resultieren. Ebenso ist es möglich, dass die zytotoxischen Wirkungen auf die ohnehin schon kleine Progenitorzellpopulation im Herzen zu einer Depletion des Progenitorpools führen und die kardiale Regenerationsfähigkeit damit gravierend eingeschränkt wird.

In dieser Arbeit wurden IR und Doxorubicin verwendet, um die Auswirkungen von genotoxischen Substanzen sowohl auf die differenzierten Zellen der Blutgefäße, als auch auf vaskuläre Progenitorzellen zu untersuchen. Als für die Zelle schädlichstes Ereignis führen beide Behandlungen zu DSBs. Allerdings unterscheiden sich die biochemischen Mechanismen die zu der Entstehung der DSBs führen grundlegend.

1.4.1.1 Ionisierende Strahlung (IR)

Bei IR handelt es sich um elektromagnetische Strahlung (Röntgen- oder Gammastrahlung), die so energiereich ist, dass sie aus Atomen oder Molekülen Elektronen entfernen kann. Zurück bleiben Ionen, welche in lebendem Gewebe großen Schaden anrichten können. Die zelluläre Zielstruktur von IR ist die DNA (Maier et al. 2016). Man unterscheidet zwischen einer direkten und einer indirekten Strahlenwirkung auf die DNA (Abbildung 1. 6) (Goodhead 1994; Nikjoo et al. 1997). Die durch IR erzeugte Energie kann von der DNA absorbiert werden und diese direkt ionisieren. Im Gegensatz dazu erfolgt die Energieabsorption und biologische Wirkung bei der indirekten Wirkung in unterschiedlichen Strukturen. Aufgrund der Tatsache, dass Zellen zu über 80 % aus Wasser bestehen, sind Wassermoleküle häufige Reaktionspartner von ionisierender Strahlung. Durch die Wasserradiolyse entstehen hoch reaktive freie Wasserradikale. Entstehen diese in der unmittelbaren Umgebung der DNA, so können sie dort chemische Veränderungen hervorrufen und DNA-Schäden induzieren (Chatgililoglu & O'Neill 2001). Die auf direkte und indirekte Weise entstehenden Schäden können identisch sein (Powell & McMillan 1990). Die induzierten chemischen Veränderungen der DNA können zu Basenschäden, Schäden im Zucker-Phosphat-Rückgrat, DNA-Vernetzungen, Einzelstrangbrüchen (SSBs, *single strand breaks*) oder DSBs führen (Abbildung 1. 6). Durchschnittlich verursacht 1 Gy Gamma-Strahlung in Säugerzellen ca. 1000 SSBs und 25-40 DSB (Ward 1988; Prise et al. 2005). Dennoch sind entstehende Basenschäden und SSBs von untergeordneter Bedeutung für das Überleben einer Zellen, da alle diese Schäden effektiv durch die Mechanismen der Basenexzisionsreparatur entfernt werden (Prasad et al. 2011). Die

Entstehung von DSBs stellt das für die Zelle kritischste Ereignis dar. Zwar werden auch ein Großteil der durch Strahlung induzierten DSBs repariert, allerdings sind residuale, nicht reparierte DSBs sehr potente Auslöser des programmierten Zelltods (Roos et al. 2013). Ebenso können nicht reparierte DSBs zu Seneszenz, Mutationen oder genomischer Instabilität führen (Ross 1999; Maier et al. 2016).

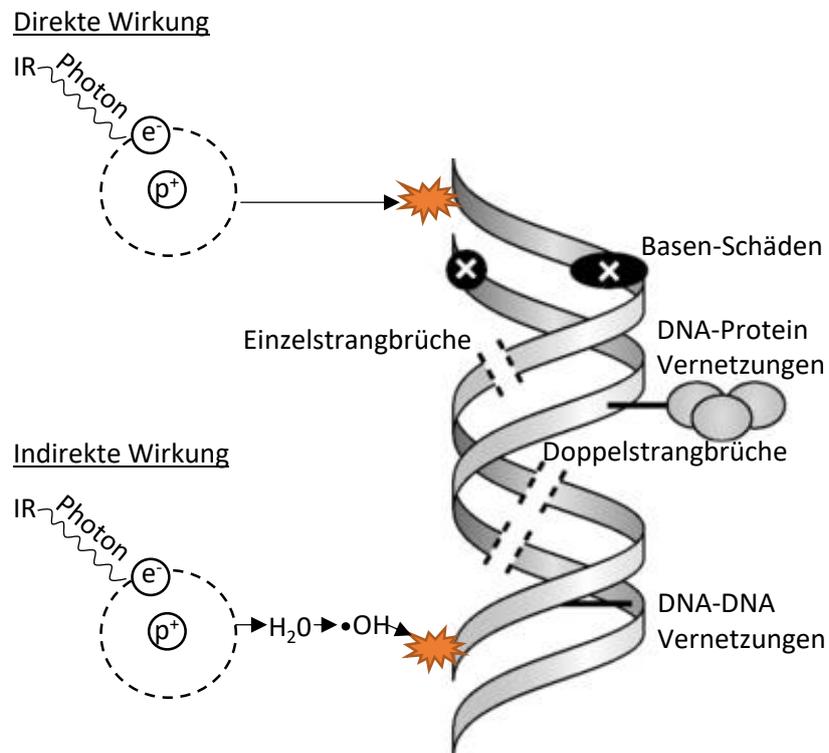


Abbildung 1. 6: Wirkungsmechanismen ionisierender Strahlung (IR) auf die DNA.

Die schädigende Wirkung von IR kann auf direktem Wege oder indirekt erfolgen. So kann die DNA direkt ionisiert werden, was zu Basen-Schäden, DNA-Protein-Vernetzungen, Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen oder DNA-DNA-Vernetzungen führen kann. Die indirekte Wirkung beruht auf der Hydrolyse von Wasser, einem Hauptbestandteil der Zellen, was die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Folge hat. Die auf direkte und indirekte Weise entstehenden Schäden können identisch sein. Modifiziert nach Kim *et al.* und Morgan und Sowa (Kim et al. 2015; Morgan & Sowa 2005).

In dieser Arbeit wurde Gammastrahlung aus radioaktiven Quellen verwendet, wie sie auch im Rahmen der Strahlentherapie (Radiotherapie) bei Krebsbehandlungen zum Einsatz kommt. Neben der chirurgischen Entfernung und der Chemotherapie ist die Strahlentherapie eine der zentralen Säulen in der Krebsbehandlung (Ross 1999). Im Gegensatz zur medikamentösen, im ganzen Körper wirkenden Chemotherapie, tritt die tumorzerstörende Wirkung der IR nur innerhalb des Bestrahlungsfeldes auf. Dennoch wird auch so gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen und somit bleibt die Reparaturfähigkeit der gesunden Zellen der dosislimitierende Faktor für die Strahlentherapie (Semik et al. 2004).

1.4.1.2 Doxorubicin

Anthracyclin-Derivate wie Doxorubicin, welches aus *Streptomyces peucetius* gewonnen wurde (Arcamone et al. 2000; Cassinelli et al. 1982), sind hochwirksame Chemotherapeutika und werden in der Krebstherapie unter anderem bei der Behandlung von kindlichen Leukämien und Mammakarzinomen eingesetzt (Massolo & Galli 1973; Blum & Carter 1974).

Die durch Doxorubicin entstehenden Schäden kommen auf unterschiedlichen Wegen zustande. Zum einen kann es in die DNA interkalieren und zum anderen Topoisomerase II Isoformen hemmen. Die Interkalation verursacht in erster Linie eine Hemmung der Transkription, während die Topoisomerase II-Inhibition zur Entstehung von DNA-Schäden führt (Gewirtz 1999). Der dominante DNA-schädigende Mechanismus, bei klinisch relevanten Dosen, ist die Wirkung als Topoisomerase-II-Gift, was letztlich DSBs und die Einleitung der Apoptose zur Folge hat (Thorn et al. 2011; Gewirtz 1999). Im Rahmen zellulärer Prozesse, wie der DNA-Synthese, Transkription und Rekombination, führen Topoisomerase II alpha und beta reversible DSBs ein, um die Topologie des geschlossenen DNA-Moleküls aufzulockern und so unter anderem die Voraussetzung für das Ablesen der DNA zu schaffen (Boege et al. 1993; Rose 1988). Unter ATP (Adenosintriphosphat)-Verbrauch wird in einen der beiden DNA-Doppelstränge ein transients DSB eingefügt, durch welchen dann der zweite DNA-Strang hindurchgeführt wird, um topologische Spannungen zu lösen (Goswami et al. 1996; Nitiss 2009). Doxorubicin bindet irreversibel an die Topoisomerase II und verhindert so, dass die gespaltenen Enden religiert werden. Der entstandene *cleavable complex* (spaltbare Komplex) aus Doxorubicin und der Topoisomerase II ist kovalent an die DNA gebunden und wird nach seiner Erkennung von Proteasen degradiert. In der Konsequenz bleiben DSBs zurück, welche, falls sie nicht erkannt und repariert werden, zum Zelltod führen (Thorn et al. 2011; Yang et al. 2014). Da nicht beide Isoformen der Topoisomerase II über den gesamten Zellzyklus hinweg exprimiert werden, sondern sich die Expression der Topoisomerase II alpha auf die S- und G2/M-Phase des Zellzyklus konzentriert (Goswami et al. 1996), werden sich teilende Zellen stärker durch Doxorubicin angegriffen (Potter et al. 2002). Da Tumorzellen stärker proliferieren als gesunde Körperzellen, werden sie durch Doxorubicin stärker geschädigt. Ähnliches könnte allerdings auch für körpereigene Stammzellen gelten.

Als zusätzliche toxische Mechanismen wurden für Doxorubicin die Bildung von ROS, DNA-Interkalation und DNA-Adduktbildung, sowie eine Interaktion mit Helikasen beschrieben (Bates & Winterbourn 1982; Swift et al. 2006; Bachur et al. 1992). DNA-Interkalation, DNA-Adduktbildung und die messbare Bildung von ROS treten erst bei relativ hohen Doxorubicindosen auf, die im Blut von Patienten während einer Krebstherapie nicht erreicht werden (der maximale Serumspiegel beträgt 1 - 2 μM). Die niedrigste *in vitro* verwendete Konzentration, bei der ROS gemessen werden

konnten, betrug 4 μM (Gewirtz 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden maximale Doxorubicinkonzentrationen von 1 μM eingesetzt.

Schwerwiegende Organtoxizitäten, wie irreversible Schädigungen des Herzens, sind bei der Verwendung von Doxorubicin dosislimitierend (Chlebowski 1979). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer akuten und chronischen Doxorubicin-bedingten Herzinsuffizienz führen sind bis heute nur im Ansatz verstanden (Oliveira et al. 2014).

1.5 ZELLULÄRE STRESSANTWORT

1.5.1 DNA-Schadensantwort

Um die genomische Integrität sicherzustellen, hat die Zelle komplexe und hoch konservierte Mechanismen entwickelt, um DNA-Schäden zu erkennen und auf diese reagieren zu können. Dabei erkennen Sensorsysteme die DNA-Schäden und leiten Signale über Kinasen weiter, was entweder zur Folge hat, dass die Zelle in der Zellzyklusprogression inhibiert wird und die DNA-Reparatur einsetzt oder sie durch die Induktion der Apoptose zu Grunde geht (Abbildung 1. 7).

In Säugetierzellen werden die Serin/Threonin-Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), sowie die katalytische Untereinheit der DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PKcs) durch DSBs oder Replikationsstress, beispielsweise verursacht durch DNA-Addukte, aktiviert (Maréchal & Zou 2013; Mazouzi et al. 2014). Die Aktivierung dieser Signalwege ist entscheidend für die korrekte Koordination der Zellzykluskontrollpunkte und die DNA-Reparatur. Allerdings können sie auch andere biologische Prozesse wie Apoptose oder Seneszenz modulieren (Smith et al. 2010). DNA-PKcs und ATM sind hauptsächlich in die Erkennung und Reparatur von DSB involviert, wohingegen ATR auf eine große Spanne von DNA-Schäden reagiert, welche eine Blockierung der Replikationsgabel zur Folge haben (Cimprich & Cortez 2008). Ein Mediator-Komplex (MRN-Komplex) bestehend aus MRE11 (*double-strand break repair protein MRE11A*), RAD50 (*DNA repair protein RAD50*) und NBS1 (Nibrin) agiert als DSB Sensor und rekrutiert ATM an den Ort des DNA-Schadens (Lee & Paull 2005). ATM liegt inaktiv als Dimer vor, welches, nachdem es an den DSB gebunden hat, dissoziiert, autophosphoryliert und so aktiviert wird (Bakkenist & Kastan 2003). Wenn DNA-Polymerasen blockiert werden, fahren Helikasen mit der Entwindung der DNA fort, was eine Bildung von SSBs zur Folge hat (Byun et al. 2005). Diese werden durch das einzelstrangbindende Replikationsprotein A2 (*replication protein A2*; RPA) erkannt und gebunden, woraufhin ATR zusammen mit ATRIP (*ATR interacting protein*) zu der Läsion rekrutiert und dort aktiviert wird (Zou & Elledge 2003). Nach ihrer Aktivierung phosphorylieren ATM und ATR eine Reihe spezifischer Substrate, welche an der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz beteiligt sind. So phosphoryliert ATM beispielsweise SMC1 (*structural maintenance of chromosomes 1*) (Kitagawa et al. 2004), KAP1 (*KRAB-associated protein 1*) (Cann & Delleire 2011)

und die Checkpointkinase 2 (CHK2) (Lukas et al. 2003). Das Histon H2AX wird sowohl durch ATM als auch durch ATR phosphoryliert, was die Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturfaktoren nach sich zieht (Fernandez-Capetillo et al. 2004; Mah et al. 2010). Eine effektive Aktivierung von ATR und die nachgeschaltete Phosphorylierung der Checkpointkinase 1 (CHK1) hängt zudem von zwei Mediatorproteinen, TopBP1 (*topoisomerase (DNA) II binding protein 1*) und Claspin ab (Delacroix et al. 2007).

Die Aktivierung von CHK1 und CHK2 ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellzykluskontrolle. Nachgeschaltet wirken diese Kinasen auf mehrere Substrate die in der Zellzyklusprogression, Apoptose und Transkription von Reparaturgenen involviert sind (Lukas et al. 2003). Zu den Substraten von CHK1 und CHK2 gehören unter anderem die Tumorsuppressorproteine P53 (Chehab et al. 2000; Shieh et al. 2000), BRCA1 (*breast cancer 1*) (Lee et al. 2000) und BRCA2 (*breast cancer 2*) (Bahassi et al. 2008), Phosphatasen der CDC25 (*cell division cycle 25*)-Familie (Blasina et al. 2008; Chaturvedi et al. 1999; Matsuoka et al. 1998), Transkriptionsfaktoren wie FOXM1 (*forkhead box M1*) (Tan et al. 2007) und E2F1 (*E2F transcription factor 1*) (Stevens et al. 2003), sowie RAD51 (Sørensen et al. 2005) und WEE1 (*G2 checkpoint kinase*) (Lee et al. 2001). Dadurch wird die Expression einer Reihe von Genen stimuliert, die entweder einen Zellzyklusarrest induzieren, um den DNA-Schaden zu reparieren, oder, falls der DNA-Schaden zu umfangreich ist und nicht repariert werden kann, Apoptose oder Seneszenz einleiten.

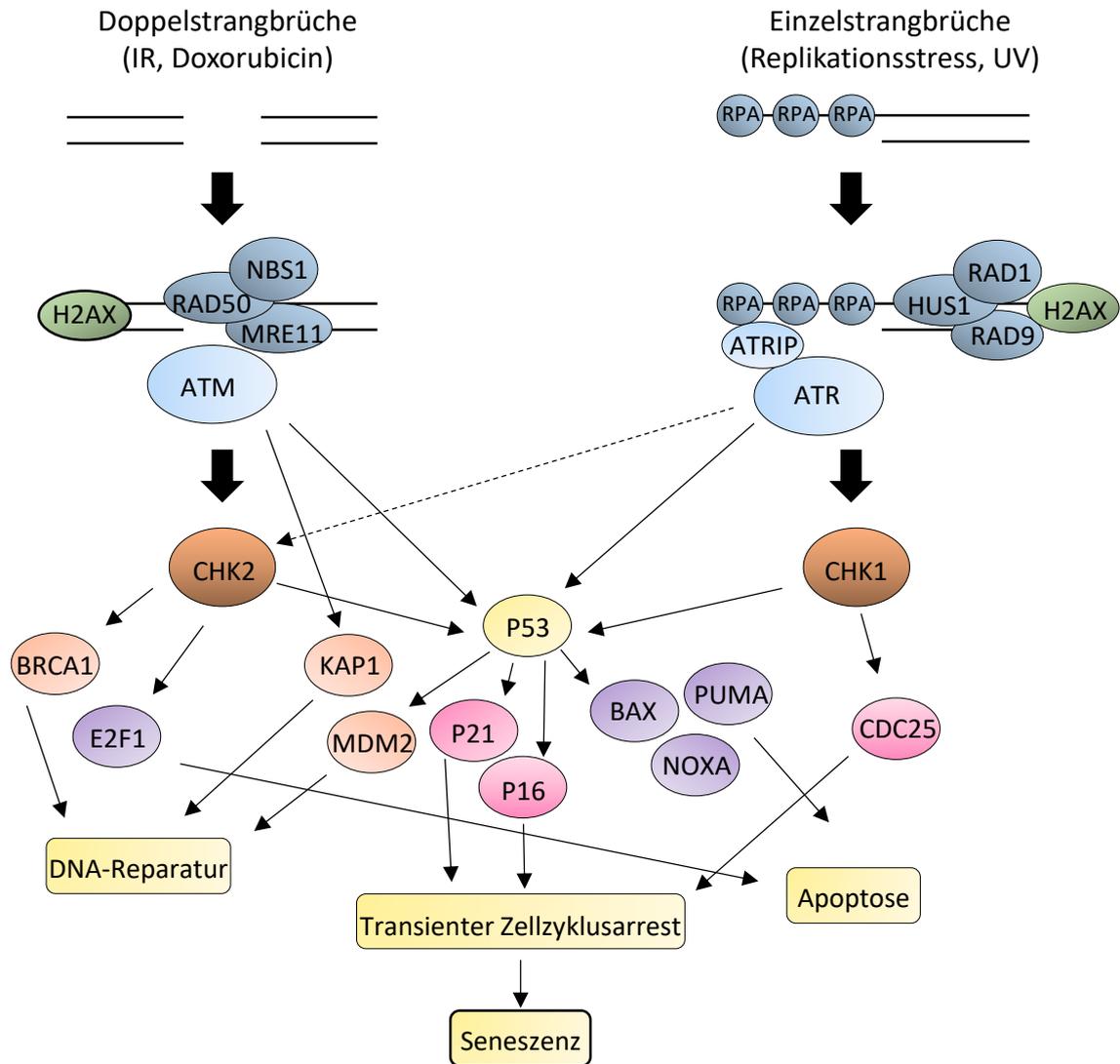


Abbildung 1. 7: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.

NBS1: Nibrin, MRE11: *double-strand break repair protein MRE11A*, RAD50: *DNA repair protein RAD50*, RPA: *replication protein A2*, ATM: *ataxia telangiectasia mutated*, ATR: *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*, ATRIP: *ATR interacting protein*, H2AX: H2A histone family, member X, HUS1: HUS1 checkpoint homolog (*S. pombe*), CHK1: checkpoint kinase 1, CHK2: checkpoint kinase 2, BRCA1: *breast cancer 1*, E2F1: E2F transcription factor 1, KAP1: *KRAB-associated protein 1*, MDM2: MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase, P21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, P16: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, BAX: BCL2-associated X protein, PUMA: BCL2 binding component 3, NOXA: BCL2 homology 3 (BH3), CDC25: cell division cycle 25, RAD9: *RAD9 homolog A*, RAD1: *RAD1 homolog*. Modifiziert nach Maier *et al.*, Smith *et al.*, sowie Bartek *et al.* (Maier *et al.* 2016; Smith *et al.* 2010; Bartek *et al.* 2003). Erklärungen im Text.

1.5.2 DNA-Reparatur

Abhängig von der Art des DNA-Schadens und der Zellzyklusphase verfügen alle Zellen über DNA-Reparaturmechanismen, um den Erhalt der genetischen Information sicherzustellen. Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen direkten und indirekten Reparatursystemen. So können Alkylierungen der DNA mit Hilfe des Enzyms MGMT (*O*⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) direkt repariert werden und Fehlpaarungen mit Thymin, welche zu Mutationen führen würde, verhindert werden. Dabei überträgt MGMT Alkylierungen am *O*⁶-Atom des Guanins auf sich selbst

und es bedarf keiner weiteren Reparatur. Da diese Übertragung irreversibel ist, wird MGMT bei dieser Reaktion verbraucht (Fu et al. 2012; Christmann et al. 2003). Zusätzlich können Alkylierungen der DNA auch durch die Mismatch-Reparatur (MMR), Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und Basenexzisionsreparatur (BER) beseitigt werden, bei welchen es sich um indirekte Reparatursysteme handelt. Ebenso gehören die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ), welche DSBs reparieren, zu den indirekten Reparatursystemen (Sancar et al. 2004).

Die MMR erkennt und repariert Schleifen in der DNA, die durch Basenfehlpaarungen oder Insertionen/Deletionen entstehen. Sie spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität indem sie die Fehlerrate bei der Replikation deutlich senkt, erkennt aber auch chemisch induzierte Läsionen, wie beispielsweise durch Alkylierung entstehende O⁶-Methylguaninfehlpaarungen mit Thymin oder durch UV-Licht herbeigeführte Photoprodukte (Harfe & Jinks-Robertson 2000; Duckett et al. 1996; Wang et al. 1999). Dabei erkennt der MutS α -Komplex, welcher aus MSH2 (*mutS homolog 2*) und MSH6 (*mutS homolog 6*) besteht, den Schaden und rekrutiert MutL α , einen weiteren Proteinkomplex, welcher einen Strangbruch in der Nähe der Fehlpaarung induziert. Dieser Strangbruch wird von einer Exonuklease erkannt und genutzt, um einen Teil der DNA, welcher die Fehlpaarung enthält, zu entfernen. Der Strang wird durch die Polymerasen Pol δ (*DNA polymerase delta*) oder Pol ϵ (*DNA polymerase epsilon, catalytic subunit*) neu synthetisiert und anschließend von einer Ligase verbunden (Christmann et al. 2003).

Die meisten Basenschäden werden durch die BER entfernt. Sie erkennt und repariert kleinere Läsionen, wie sie durch Oxidation oder DNA-Alkylierungen entstehen (Christmann et al. 2003). Spezifische DNA-Glycosylasen, wie beispielsweise MPG (*N-methylpurine DNA glycosylase*) oder OGG1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase*), erkennen die veränderte Base in der DNA und schneiden diese heraus, wodurch apurine Stellen entstehen (Christmann et al. 2003). Das Phosphatrückrat der DNA wird im Anschluss durch die Endonuklease APEX1 (*apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1*) geschnitten (Wilson & Barsky 2001). An dieser Stelle wird entschieden, ob die *short-patch* oder *long-patch* Variante der Reparatur gewählt wird. In der *short-patch* Variante wird die apurine Stelle durch die DNA-Polymerase β (*DNA polymerase beta*, Pol β) repariert und das Phosphatrückrat direkt geschlossen. Die Ligation erfolgt durch Ligase III, welche mit XRCC1 (*X-ray repair cross complementing 1*), Pol β und PARP1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) interagiert (Kubota et al. 1996). Während der *long-patch* Variante wird die DNA-Synthese durch Pol δ oder Pol ϵ zusammen mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und RFC1 (*replication factor C subunit 1*) vollendet, was zur Folge hat, dass ein längeres Stück der DNA neu synthetisiert wird. Der so

entstehende Überhang wird durch die Flap-Endonuklease FEN1 entfernt (Klungland & Lindahl 1997). Bei dieser Variante erfolgt die Ligation hauptsächlich durch die Ligase I (Prasad et al. 1996). Die BER befasst sich vornehmlich, aber nicht ausschließlich mit DNA-Schäden endogenen Ursprungs, wohingegen exogene Schäden vorrangig von der NER beseitigt werden (Rodriguez-Rocha et al. 2011).

Die NER kann verschiedene, sperrige, die Helix-Struktur störende DNA-Addukte, entfernen, wie sie durch UV-Licht, Cisplatin (Zytostatikum) oder andere genotoxische Substanzen entstehen (Lange et al. 2011; Christmann et al. 2003). In diesen Prozess sind mehr als 30 verschiedene Proteine involviert. Grundsätzlich kann die NER in zwei Signalwege unterteilt werden, welche sich in der Erkennung der DNA-Schäden und der beteiligten DNA-Reparaturfaktoren unterscheiden.

Die globale genomische NER (GG-NER) repariert hauptsächlich DNA-Schäden in transkriptionell inaktiven Bereichen des Genoms und erkennt die DNA-Läsion mittels der Proteinkomplexe XPC (*xeroderma pigmentosum, complementation group C*)/RAD23B (*RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein*) und RPA-XPA (*xeroderma pigmentosum, complementation group A*) (Christmann et al. 2003). Hingegen spielt XPC/RAD23B bei der transkriptionsgekoppelten NER (TCR-NER) keine Rolle, welche transkriptionsblockierende DNA-Schäden in transkriptionell aktiven Genbereichen erkennt und repariert (Bohr et al. 1985). Bei der TCR-NER muss zunächst die durch die Schädigung blockierte RNA Polymerase II entfernt werden, um den TCR-NER-Proteinen Zugriff zur DNA-Schädigung zu ermöglichen. Dies wird durch CSA (*Cockayne syndrome A ortholog*) und CSB (*Cockayne syndrome B ortholog*) ermöglicht, welche an die Schadensstelle rekrutiert werden. Die genauen molekularen Mechanismen sind allerdings noch nicht ganz geklärt (Christmann et al. 2003).

Nachdem der DNA-Schaden erkannt wurde, wird der Transkriptionsfaktor TFIIH an die Stelle des Schadens dirigiert, welcher die DNA, durch seine Helikaseuntereinheiten XPB (*xeroderma pigmentosum, complementation group B*) und XPD (*xeroderma pigmentosum, complementation group D*), in der Nähe der Schädigung entwindet (Schaeffer et al. 1993; Schaeffer et al. 1994; Evans et al. 1997). Im Anschluss daran schneiden die Endonukleasen XPG (*xeroderma pigmentosum, complementation group G*) und XPF (*xeroderma pigmentosum, complementation group F*)/ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*) den DNA-Strang sowohl 3' als auch 5' (Evans et al. 1997; O'Donovan et al. 1994; Sijbers et al. 1996). So wird ein ca. 27 - 29 Basen umfassendes Nukleotid aus dem DNA-Strang herausgeschnitten, welches den DNA-Schaden enthält. Der noch vorhandene DNA-Strang dient nun als Template für die Neusynthese durch die Polymerasen Pol δ oder Pol ϵ . Als letztes erfolgt die Ligation des synthetisierten Abschnitts durch die Ligase I (Aboussekhra et al. 1995; Araújo et al. 2000; Mu et al. 1995).

Besonders problematisch für die Zelle sind DSBs, da beide DNA-Stränge betroffen sind. Ein einziger, nicht reparierter DSB ist ausreichend, um Apoptose zu induzieren (Rich et al. 2000). DSBs können durch ionisierende Strahlung, Zytostatika oder auch während der Replikation an Stellen mit DNA-Basenschäden, DNA-Strangverknüpfungen oder SSBs entstehen. Zur Reparatur von DSBs existieren zwei unterschiedliche Mechanismen, die fehlerfreie HR und die für Fehler anfälligere NHEJ (Christmann et al. 2003). Die HR findet hauptsächlich in der S- und G2-Phase des Zellzyklus statt, wohingegen NHEJ hauptsächlich in der G0/G1-Phase Phase des Zellzyklus auftritt (Johnson & Jasin 2000; Takata et al. 1998). In Säugetieren ist die Reparatur von DSBs durch die NHEJ der dominierende Signalweg (Cromie et al. 2001).

Während der HR (Abbildung 1. 8) tritt das geschädigte Chromosom in direkten Kontakt zu einem unbeschädigten homologen DNA-Molekül, welches als Template für die Reparatur genutzt wird (Sonoda et al. 2001). Der DSB wird durch den MRN Komplex erkannt. Dieser prozessiert die DNA Enden. Der daraus resultierende 3'-Einzelstrangüberhang wird von einem heptameren Ringkomplex, bestehend aus Rad52 Proteinen, gebunden, was den Einzelstrang vor einer Degradation durch Exonukleasen schützt (Stasiak et al. 2000). Rad52 interagiert mit Rad51 und RPA (Kagawa et al. 2001; Reddy et al. 1997; Shen et al. 1996; Park et al. 1996). Rad51 vermittelt die Invasion des Einzelstranges in das Schwesterchromatid, auf der Suche nach der passenden homologen Sequenz (Baumann & West 1997; Gupta et al. 1998). Anhand des Schwesterstrangs wird die DNA neu synthetisiert, der Komplex aus den beiden DNA-Doppelhelices (Hollidaystrukturen) wieder aufgelöst und neu ligiert (Christmann et al. 2003).

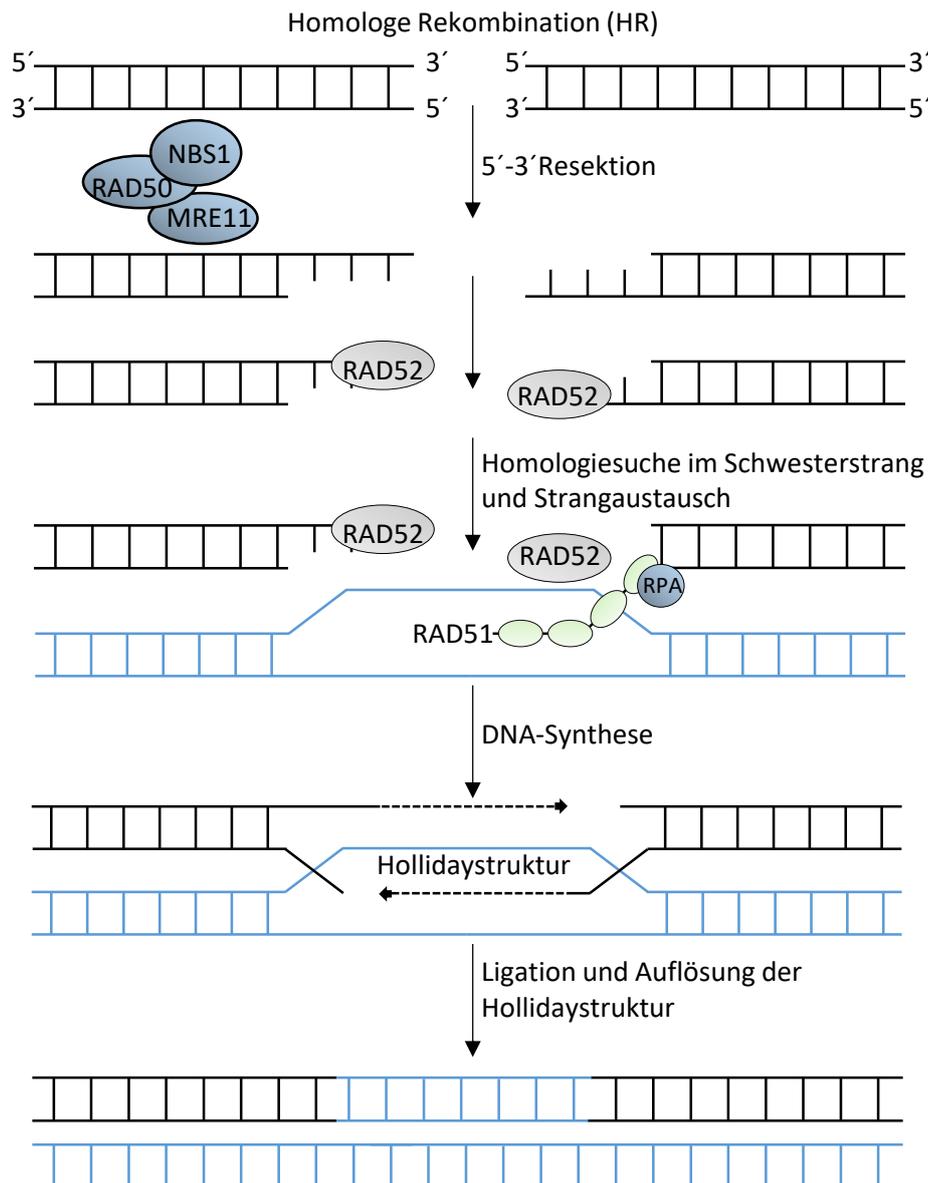


Abbildung 1. 8: Schematischer Ablauf der DSB-Reparatur mittels homologer Rekombination.

NBS1: Nibrin, Mre11: *Double-strand break repair protein MRE11A*, RAD50: *DNA repair protein RAD50*, RAD52: *RAD52 homolog (S. cerevisiae)*, RAD51: *RAD51 recombinase*, RPA: *replication protein A2*. DSB: *DNA double strand break*. Modifiziert nach Lange *et al.* und Christmann *et al.* (Lange *et al.* 2011; Christmann *et al.* 2003). Erklärungen im Text.

Eine andere Möglichkeit, um DSBs zu reparieren ist es, die stumpfen oder komplementären Enden der DNA einfach wieder mittels einer DNA Ligase zu verbinden, ohne den Bedarf einer Sequenzhomologie (Cromie *et al.* 2001; Critchlow & Jackson 1998). Bei der NHEJ (Abbildung 1. 9) werden die Enden des DSB zunächst durch das Ku70 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6; XRCC6*)-Ku80 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5; XRCC5*) Heterodimer gebunden, um diese vor einem Abbau durch Exonukleasen zu schützen (Christmann *et al.* 2003). Nachdem dieser Komplex gebunden hat, assoziiert er mit der katalytischen Untereinheit der DNA-PKcs, was zur Aktivierung derselben führt (Gottlieb & Jackson 1993; Smith & Jackson 1999). Dies wiederum hat eine Aktivierung von XRCC4 (*X-ray repair*

complementing defective repair in Chinese hamster cells 4) zur Folge, welches einen stabilen Komplex mit der DNA-Ligase IV bildet (Leber et al. 1998). Besitzt der Bruch homologe Überhänge, kann er nun direkt ligiert werden. Dieser Weg ist meistens fehlerfrei. Mutagene Substanzen führen allerdings in der Regel zu DSBs ohne passende Enden. In diesem Fall kann der Bruch nicht sofort ligiert werden, sondern muss zunächst durch den MRN-Komplex prozessiert werden (Christmann et al. 2003). Dieser besitzt, neben einer Exonukleaseaktivität auch eine Endonuklease- und Helikaseaktivität und entfernt 3'-Überhänge der DNA (Paull & Gellert 1999; Trujillo et al. 1998). Für das Entfernen von 5'-Überhängen ist FEN1 zuständig (Christmann et al. 2003). Anschließend können beide Stränge wieder miteinander verknüpft werden (van Attikum & Gasser 2005). Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass sie häufig zum Verlust von Informationen führt, da die gebrochenen DNA-Enden einfach abgeschnitten werden (Cromie et al. 2001).

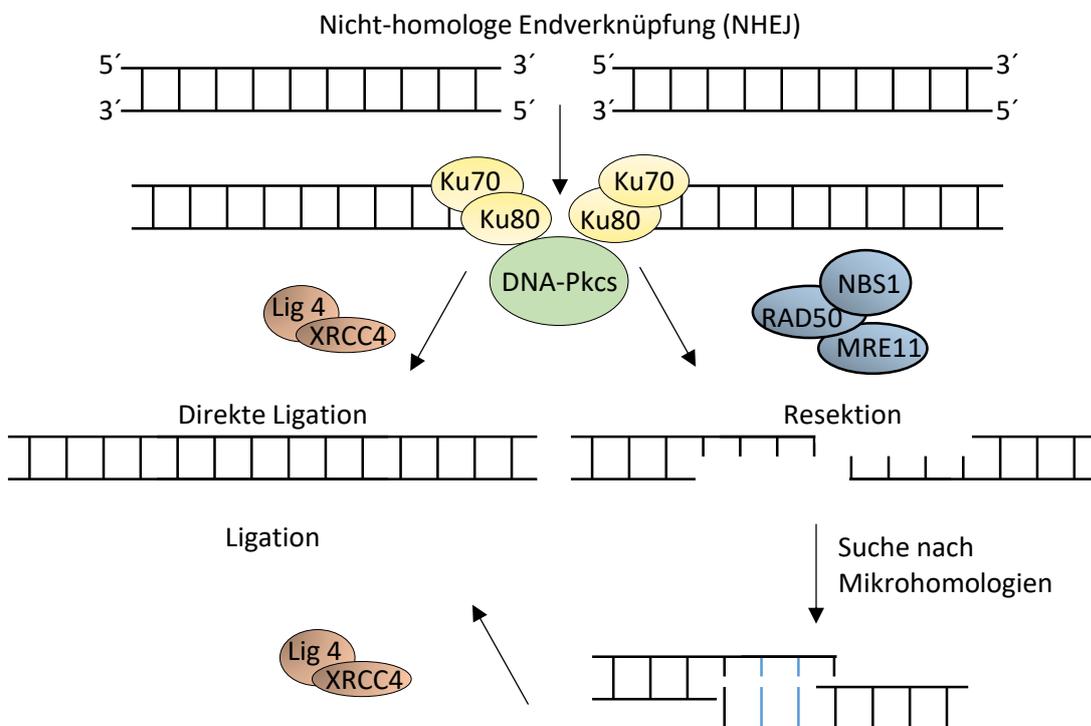


Abbildung 1. 9: Schematischer Ablauf der DSB-Reparatur mittels nicht-homologer Endverknüpfung.

NBS1: Nibrin, MRE11: *double-strand break repair protein MRE11A*, RAD50: *DNA repair protein RAD50*, Lig4: Ligase IV, DNA-PKcs: katalytische Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase, XRCC4: *X-ray repair cross-complementing protein 4*, DSB: *DNA double strand break*. Ku70 (XRCC6): *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6*, Ku80 (XRCC5): *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5*. Modifiziert nach Lange et al. und Christmann et al. (Lange et al. 2011; Christmann et al. 2003). Erklärungen im Text.

Sind die DNA-Schäden zu umfangreich und können diese von der Zelle nicht repariert werden, wird die Zelle mit einer großen Wahrscheinlichkeit, zum Schutz vor Mutationen, den Zelltod oder Seneszenz induzieren (Maier et al. 2016). Welchen Weg die Zelle wählt, hängt von einer Reihe von Parametern ab. Unter anderem spielen der Zelltyp, die Versorgung der Zelle mit Sauerstoff, die

Zellzyklusphase in der sich die Zelle während der Schädigung befindet und die Dosis bzw. Art der Substanz, die den Schaden verursacht hat, eine Rolle (Stewart et al. 2011).

1.5.3 Apoptose und prämaturne Seneszenz

Als einen zusätzlichen Schutzmechanismus des Organismus vor mutierten Zellen können DNA-Schäden eine Signalkaskade induzieren, an deren Ende der programmierte Zelltod (Apoptose) steht. Dies führt zur Elimination entarteter oder potentiell schädlicher Zellen aus dem Organismus. Im Zuge der Apoptose schrumpft die Zelle und es bilden sich blasenförmige Ausstülpungen an der Zelloberfläche. Schrittweise wird die DNA kondensiert und degradiert, die Mitochondrien abgebaut und die Zelle in membranumhüllte Apoptosekörper fragmentiert, welche schließlich von Makrophagen erkannt werden, die diese phagozytieren (Martin et al. 1995). Der programmierte Zelltod löst dabei keine Entzündungsreaktion aus, da die Zellmembran während des gesamten Vorganges intakt bleibt (Columbano 1995).

Bei der Induktion der Apoptose unterscheidet man zwischen dem intrinsischen, Mitochondrien-vermittelten Weg und dem extrinsischen Weg. Letzterer wird durch die Bindung eines Liganden an Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie ausgelöst, worauf hier im Detail nicht weiter eingegangen wird. Der intrinsische Signalweg spielt bei der Antwort auf Stimuli wie IR, Zytostatika oder ROS eine größere Rolle und wird im Allgemeinen durch DNA-Schäden ausgelöst.

Die Kontrolle und Regulation der Mitochondrien-vermittelten Apoptose geschieht durch Mitglieder der Bcl2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*)-Genfamilie, welche die Membranpermeabilität der Mitochondrien steuern und sowohl pro- als auch antiapoptotisch agieren können (Cory & Adams 2002). Die durch CHK1/CHK2 ausgelöste nukleäre Akkumulation von P53 aktiviert die Expression der proapoptotischen Bcl2-Gene Puma (*BCL2 binding component 3*), Bax (*BCL2-associated X protein*) und Noxa (*BCL2 homology 3 (BH3)*) (Kuribayashi et al. 2011; Oda et al. 2000). Je stärker die Aktivierung von P53 ist und je länger sie anhält desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass in der Zelle die Apoptose eingeleitet wird anstelle der Induktion eines transienten Zellzyklusarrests (Vousden 2000). PUMA und NOXA inhibieren das anti-apoptotische Protein BCL2, indem sie einen Komplex aus P53 und BCL2 zerstören. Das freigesetzte P53 wiederum löst anschließend einen Komplex aus BCL2 und BAX auf. BCL2 lagert sich unter normalen Umständen in der Membran der Mitochondrien ein und hemmt dort die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Cytochrom C. Das freigesetzte BAX lagert sich nun, anstelle von BCL2, in die Membran der Mitochondrien ein, was zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit für Cytochrom C führt (Dejean et al. 2006). Die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol der Zelle hat die Entstehung des Apoptosoms zur Folge, welches sich aus dem Cytochrom C, APAF1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) und der Caspase 9 zusammensetzt (Cain et al. 2000). Die Initiatorcaspase 9 aktiviert daraufhin die Effektorcaspasen 3 und 7. Diese besitzen Proteaseaktivität und führen zu einer Reihe von

Proteinspaltungen in deren Folge es auch zur Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der DNA kommt (Zou et al. 1999).

Alternativ zur Induktion der Apoptose kann eine Aktivierung von P53, durch beispielsweise DSB-induzierende Substanzen wie IR oder Doxorubicin (gefolgt von einem Zellzyklusarrest), auch zu prämaturer Seneszenz führen (Roninson et al. 2001). Neben einer Verkürzung der Telomere in Zellen, sind besonders DSBs potente Induktoren von Seneszenz (Robles & Adami 1998; Martens et al. 2000). Ersteres wird üblicherweise als replikative Seneszenz bezeichnet und spielt sich während des normalen Alterungsprozess in Zellen ab. Die stressinduzierte, prämaturre Seneszenz erfolgt hingegen unabhängig von einer Telomerverkürzung (Lin et al. 1998). Eine Beschleunigung der Seneszenz stellt, wie die Apoptose, einen programmierten Schutzmechanismus des Organismus gegen potentiell karzinogene Schäden dar (Gewirtz 2014). Senescente Zellen befinden sich in einem irreversiblen Zellzyklusarrest, bleiben aber lebendig und sind metabolisch aktiv (Maier et al. 2016). Die Zelle wird in ihrer Zellteilung inhibiert und kann Mutationen nicht an ihre Nachkommen weitergeben. Zusätzlich zu der Arretierung des Zellzyklus weisen senescente Zellen veränderte Eigenschaften und eine andere Morphologie auf. Sie sind größer und flacher als proliferierende Zellen des gleichen Zelltyps, zeigen eine höhere Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase und es kommt zu einer Reorganisation der Chromatinstruktur (Dimri et al. 1995; Narita et al. 2003).

Man unterscheidet zwischen zwei Signalwegen, die für die zelluläre Seneszenz von zentraler Bedeutung sind, dem P53/P21^{WAF1/CIP1}-Weg und dem P16^{INK4a}/RB1-Weg. Stimuli, die eine DNA-Schadensantwort auslösen, induzieren zelluläre Seneszenz hauptsächlich P53/P21^{WAF1/CIP1} vermittelt. Wie bereits erwähnt, wird P53 im Zuge der DNA-Schadensantwort durch CHK1/CHK2 stabilisiert und aktiviert. Eine wichtige Zielstruktur von aktiviertem P53 stellt P21^{WAF1/CIP1} (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) dar, ein Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen (CDKs), welcher sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex hemmt und somit den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert (Cheng et al. 1999; Saramäki et al. 2006; LaBaer et al. 1997; Brugarolas et al. 1999). P16^{INK4a} (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) ist ebenfalls ein Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6. Eine Inhibition von CDK4 und CDK6 verhindert eine Phosphorylierung von RB1 (*retinoblastoma 1*), welches so an den E2F Transkriptionsfaktor gebunden bleibt und die Expression von Genen, welche notwendig sind um den Übergang der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase zu ermöglichen, unterdrückt (Maier et al. 2016)

Wann welcher Weg gewählt wird und in welcher Beziehung die beiden Signalwege zueinander stehen ist nicht vollständig geklärt. P16^{INK4a}/RB1 scheint keine Rolle bei einem transienten Zellzyklusarrest zuzuspielen, dient aber möglicherweise als eine Art Backupsystem für den P53/P21^{WAF1/CIP1}-vermittelten Zellzyklusarrest (Mirzayans et al. 2012; Alcorta et al. 1996).

1.6 DNA REPARATUR IN EMBRYONALEN STAMMZELLEN UND SOMATISCHEN ZELLEN

Somatische Zellen und ES-Zellen haben ganz unterschiedliche Aufgaben und Funktionen. Somatische Zellen sind ausdifferenzierte Zellen, wohingegen ES-Zellen die Fähigkeit besitzen in alle Zelltypen eines Organismus zu differenzieren. Ihre Hauptaufgabe ist es, ein intaktes Genom an die nächste Generation weiterzugeben. Gleichermaßen müssen sie ihre genomische Stabilität bewahren, so dass sie in alle Gewebe und Zelltypen, einschließlich der Keimbahnzellen, eines Organismus differenzieren können. Treten schädlichen Mutationen früh in der Entwicklung auf, führen diese zu fötaler Letalität oder angeborenen Krankheiten. Dies gilt hingegen nicht für somatische Zellen, welche einen DNA-Schaden erleiden können, ohne direkte Konsequenzen für den Organismus. Schäden in Form von Mutationen können akkumulieren und eventuell somatische Krankheiten auslösen, jedoch werden diese (solange nicht die Keimbahnzellen betroffen sind) nicht an Nachkommen weiter gegeben. Dies legt die Vermutung nahe, dass ES-Zellen die Integrität ihrer Erbinformation in höherem Maße aufrechterhalten müssen als somatische Zellen (Stambrook 2007). Dies kann einerseits durch verstärkte DNA-Reparaturleistungen gewährleistet werden, andererseits kann aber auch eine Mutationsprävention durch eine gesteigerte Apoptoseinduktion in geschädigten ES-Zellen erfolgen (de Waard et al. 2004; Van Sloun et al. 1999). Genexpressionsstudien an murinen ES-Zellen und differenzierten Maus embryonalen Fibroblasten (MEFs) zeigen eine konsistente Überexpression einzelner Reparaturgene in der Stammzellfraktion. So konnten höhere Transkriptionsspiegel für die Gene Rad51, Xrcc4, Msh2 und Msh6 in ES-Zellen der Maus gezeigt werden (Tichy & Stambrook 2008; Tichy et al. 2011). Es gibt zudem deutliche Unterschiede in der Mutationsfrequenz von ES-Zellen und somatischen Zellen (Cervantes et al. 2002). Beispielsweise ist die Mutationsfrequenz in MEFs fast 100-fach höher als in ES-Zellen und die meisten dieser Mutationen führen zu einem Verlust der Heterozygotie. ES-Zellen weisen vorrangig *non-disjunction* (Fehlsegregation) auf, wohingegen MEFs in erster Linie über mitotische Rekombination den Verlust der Heterozygotie generieren (Cervantes et al. 2002; Larson et al. 2006). Die Unterdrückung der Mutagenese in ES-Zellen scheint zwar einer der Mechanismen zu sein, mit denen ES-Zellen ihre genomische Stabilität bewahren, jedoch ist dies nicht ausreichend (Tichy & Stambrook 2008). Es ist bekannt, dass ES-Zellen sehr sensitiv gegenüber DNA-Schäden sind und relativ schnell Apoptose einleiten, um die geschädigten Zellen aus dem Stammzellpool zu entfernen (Van Sloun et al. 1999; de Waard et al. 2004). Das Ausschalten von sich ständig selbsterneuernden geschädigten Zellen gewährleistet der proliferierenden Stammzellpopulation genetische Unversehrtheit. Des Weiteren fehlt in den ES-Zellen ein funktioneller G1 Checkpoint, zum Teil aufgrund der Sequestration von P53 im Zytoplasma. Das Fehlen dieses Checkpoints macht es möglich, dass geschädigte Zellen direkt von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus übergehen können und der Schaden sich durch mehrere Runden der Replikation potenziert. Durch diese

Erhöhung des Schadens wird dann die Apoptose in diesen Zellen eingeleitet (Aladjem et al. 1998; Hong & Stambrook 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass P53 in ES-Zellen eine größere Rolle bei der Differenzierung als bei der DNA-Reparatur spielt (Lin et al. 2005).

Des Weiteren ist bekannt, dass ES-Zellen DSBs vorwiegend mittels der HR reparieren, wohingegen in somatischen ausdifferenzierten Zellen die NHEJ vorherrscht (Donoho et al. 1998; Smih et al. 1995). Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass die Proteinexpression von RAD51, welches ein *Keyplayer* in der HR ist, in ES-Zellen circa 20-fach höher ist als in MEFs (Tichy & Stambrook 2008; Baumann et al. 1996). Die HR ist im Gegensatz zur NHEJ fehlerfrei. Die Beseitigung von DSBs scheint für ES-Zellen besonders wichtig zu sein, da sie eine hohe basale, nicht durch Genotoxine induzierte Anzahl von γ H2AX Foci aufweisen (Tichy & Stambrook 2008). Auf der anderen Seite könnte die große Anzahl basaler γ H2AX Foci auch auf eine hohe genetische Instabilität der mESC hindeuten. Die MMR spielt in ES-Zellen ebenfalls eine große Rolle, vermutlich, um zu entscheiden, ob ein Schaden repariert wird oder die Apoptose eingeleitet wird. Hohe endogene Mengen von MSH2, wie sie in ES-Zellen gefunden wurden, scheinen eher dafür verantwortlich zu sein, dass die Apoptose eingeleitet wird, wohingegen geringere Level, wie sie in somatischen Zellen gefunden wurden, zu einer Reparatur des Schadens führen (Claij & Te Riele 2002). Ähnliches gilt für die NER. ES-Zellen scheinen nicht in der Lage zu sein UV-Schäden effizient zu reparieren, was zur Einleitung der Apoptose führt (Van Sloun et al. 1999). Diese Daten zeigen, dass ES-Zellen sich sehr stark in Bezug auf ihre DNA-Reparaturkapazität von ausdifferenzierten somatischen Zellen unterscheiden.

1.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Aufgrund ihrer Barrierefunktion unterliegen die Zellen des vaskulären Systems einer permanenten Exposition von systemisch zirkulierenden schädlichen Substanzen, welche im schlimmsten Fall zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen können. Auch in der Therapie von Krebserkrankungen, wie kindlicher Leukämie oder Mammakarzinom, eingesetzte genotoxische Anthrazyklin-Derivate, sind in ihrer Anwendung durch das Auftreten akuter und chronischer Kardiotoxizität limitiert. Die Ursache dafür ist bis heute nicht ganz geklärt. Neben einer direkten schädigenden Wirkung der Anthrazyklin-Derivate, wie beispielsweise Doxorubicin, auf Kardiomyozyten, wäre es ebenfalls denkbar, dass die Wirkung indirekt aus einer, durch die Anthrazyklin-Derivate verursachten endothelialen Dysfunktion resultiert. Weiterhin ist unklar welcher vaskuläre Zelltyp (Endothelzellen oder glatte Muskelzellen) durch Anthrazykline am stärksten beeinträchtigt wird. Zudem besteht die Vermutung, dass eine Depletion des endogenen Stammzellpools für die chronische-kardiotoxische Anthrazyklinwirkung bedeutsam ist. Ebenso werden durch ionisierende Strahlung (IR) bedingte Gefäßveränderungen als Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen. IR beeinflusst durch ihre genotoxische Wirkung das regenerative Potential der Blutgefäße. Es scheint daher plausibel, dass eine insuffiziente DNA-Schadensantwort endotheliale Funktionen beeinflusst und die Regenerationsfähigkeit des Endothels beeinträchtigt.

Die Möglichkeit potentiell schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit, resultierend aus akuten oder chronischen Noxen, zu prognostizieren, ist eine große Herausforderung in Anbetracht der Komplexität der Biologie. Toxikologische *in vitro* Modellsysteme, welche das 3R-Prinzip zur Vermeidung (*replacement*), Verfeinerung (*refinement*) und Reduzierung (*reduction*) von Tierversuchen unterstützen, bekommen eine immer größere Bedeutung. Viele primäre Zelllinien, wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Kardiomyozyten, sind nur schwer zugänglich und lassen sich oftmals schlecht kultivieren bzw. sterben nach kurzer Zeit in Kultur ab. Immortalisierte Zelllinien wiederum weisen häufig Eigenschaften auf, die nicht mit denen von primären Zellen übereinstimmen. Embryonale Stammzellen, die sich *in vitro* in nahezu jeden Zelltyp differenzieren lassen, bieten hier eine ausgezeichnete Alternative.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine Methode zur vaskulären Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) in Endothel- sowie glatte Muskelzellen an die Stammzelllinie LF2 angepasst werden (Abbildung 1. 10). Vor allem die zelltypspezifischen Eigenschaften und Funktionen der differenzierten Zellen sollten dabei sichergestellt werden. Um einen Aufschluss darüber zu gewinnen, ob sich mESC und die aus ihnen abgeleiteten differenzierten Zellen untereinander in ihrem Expressionsmuster von Suszeptibilitätsfaktoren, welche in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und den Zelltod involviert sind, unterscheiden, sollten zunächst Genexpressionsanalysen durchgeführt werden. Außerdem sollte die molekulare Wirkung von

Genotoxinen, am Beispiel des Anthrazyklin-Derivates Doxorubicin und ionisierender Strahlung, auf die unterschiedlichen Zelltypen analysiert werden. In einem nächsten Schritt, sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die verwendeten Genotoxine einen Einfluss auf das Differenzierungspotential der Progenitorzellen haben.

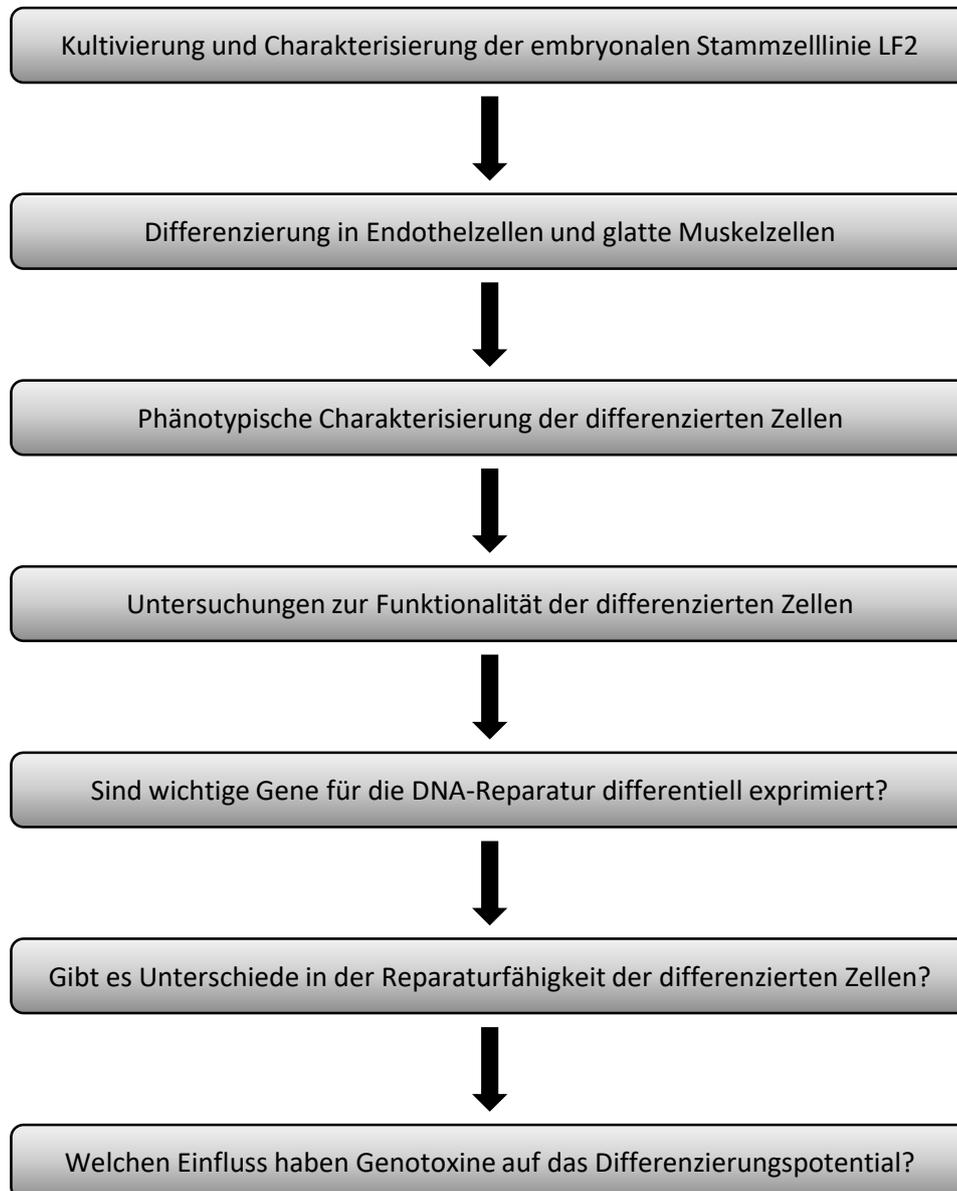


Abbildung 1. 10: Die Zielsetzung dieser Arbeit

Die Abbildung fasst die im Rahmen dieser Arbeit zu erreichenden Ziele zusammen. Ausführliche Erläuterungen im Text.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Herstellernachweise

Tabelle 2. 1: Auflistung der Herstellerhauptsitze.

Hersteller	Hauptsitz
Abcam	Cambridge, UK
Active Motif	La Hulpe, Belgien
Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
baseclick GmbH	Tutzing, Deutschland
Becton, Dickinson and Company™	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Best Theratronics Ltd.	Vancouver, Kanada
Bethyl Laboratories	Montgomery, USA
BINDER GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Bioline	London, UK
Biomedical Technologies	Ahrensburg, Deutschland
Bio-Rad	Hercules, Kalifornien, US
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
BMG LabTechnologies GmbH	Offenburg, Deutschland
Bosch GmbH	Gerlingen, Deutschland
BRAND GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Calbiochem®, Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Cell pharm GmbH	Hannover, Deutschland
Cell Signaling Technology, Inc.	Cambridge, UK
Compact Electronics	Oberursel, Deutschland
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Braunschweig, Deutschland
eBioscience, Inc.	San Diego, Kalifornien, USA

Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Epitomics Inc	Burlingame, Kalifornien, USA
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eurofins Genomics	Huntsville, Alabama, USA
GE Healthcare™	Little Chalfont, UK
Gelaire	Sydney, Australien
Gemini ^{BV}	Apeldoorn, Niederlande
GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
ICN Biomedicals GmbH	Eschwege, Deutschland
IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, USA
Liebherr-International Deutschland GmbH Robert	Biberach an der Riß, Deutschland
Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Mendingen	Arnsdorf, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
Olympus	Shinjuku, Japan
Oncogene Research Products	La Jolla, Kalifornien, USA
PAA Laboratories GmbH	Cölbe, Deutschland
PAN™ Biotech	Aidenbach, Deutschland
Paul Marienfeld GmbH & Co. K	Lauda-Königshofen, Deutschland
Pechiney Plastic Packaging, Inc	Chicago, Illinois, USA
PeproTech®	Rocky Hill, Connecticut, USA
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
PromoCell GmbH	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Rockland Immunochemicals	Limerick, Pennsylvania, USA
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, Texas, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Scientific Industries	Bohemia, New York, USA

Selleck Chemicals	Houston, Texas, USA
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Starlab	Hamburg, Deutschland
Systec GmbH	Linden, Deutschland
Taylor-Wharton	Mildstedt, Deutschland
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Vector Laboratories	Burlingame, Kalifornien, USA
Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA

2.1.2 Geräte und Software

Tabelle 2. 2: Auflistung der verwendeten Geräte und Computersoftware.

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Absaugstation MINI-VAC ECO	Peqlab Biotechnologie GmbH
BD Accuri™ C6	Becton, Dickinson and Company™
Bestrahlungsanlage Gammacell® 1000 Elite	Best Theratronics Ltd.
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad
Blottingsystem Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
CellSens Dimension	Olympus
CFX96™ Real-time PCR Detection System	Bio-Rad
CO2-Inkubator Serie CB	BINDER GmbH
DAVID Bioinformatics Resources 6.7	https://david.ncifcrf.gov/
Dokumentationssystem Fusion FX7	Peqlab Biotechnologie GmbH
Eismaschine Icematic F90	Compact Electronics
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH
Fluoreszenzmikroskop Axiolab	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus
Fusion Software Version 15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
Gefrierschrank (- 80° C)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Gefrierschrank (- 20° C)	Bosch
GraphPad Prism 5.01	GraphPad

Heizblock Drybath System	Starlab
ImageJ 1.9	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Kamera Axio Cam ICm1	Carl Zeiss AG
Kamera CoolSNAP-Pro (INAS)	Carl Zeiss AG
Kamera Olympus XC 10	Olympus
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge MIKRO 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Kühlzentrifuge MIKRO 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Laborschüttler SWIP SM25-C	Edmund Bühler GmbH
Lichtmikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG
Magnetrührer Combimag Ret	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Mendeley 1.14	Mendeley Ltd.
Mikroskopsoftware ZEN 2012	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise™	Tecan Group AG
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite® F200	Tecan Group AG
Mini-Zentrifuge	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
NanoVue™ Plus Spectrophotometer	GE Healthcare™
NOVOstar®- Software V1.20	BMG Labtech
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH
pH-Meter	Gemini ^{BV}
Roto-Shake Genie	Scientific Industries
Schüttler Swip	Edmund Bühler GmbH
Sonifiziergerät EpiShear™ Probe sonicator	Active Motif
Sterilbank BSB 4A	Gelaire
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Stickstofftank LS3000	Taylor-Wharton
Systec VX-95 (Autoklav)	Systec GmbH
Thermomixer® compact	Eppendorf AG
Waage 3716MP	Sartorius
Wärme-/Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Wasserbad W22	Mendingen
Wasser-Deionierungsanlage	Merck Millipore
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. K

Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X1	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Zentrifuge PerfectSpin P	Peqlab Biotechnologie GmbH
Zentrifuge Universal 30F	Andreas Hettich GmbH & Co.KG

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2. 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
12-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
24-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
6-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
96-Well Mikrotiterplatten 0,2 ml skirted	Thermo Fisher Scientific, Inc.
96-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
Adhesive PCR Plate Seals	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Chromatographie-Papier Whatman™	GE Healthcare™
Deckgläser 18 mm	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Deckgläser 18 x 18 mm	VWR International GmbH
Filterspitzen 10 µl, 20 µl	Biozym Scientific GmbH
Kryovials Cryo.s™	Greiner Bio-One International AGT
Mehrzweckröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG
Nitrozellulosemembran Amersham™	GE Healthcare™
Objekträger	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Öl Immersion Oil Type-F	Olympus
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc
Pasteurpipetten	BRAND GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Spritzen Braun Injekt 2 ml, 5 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG
Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm	VWR International GmbH
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner Bio-One International AGTM
Petrischalen 60 mm	Greiner Bio-One International AGTM
Zellschaber	Greiner Bio-One International AG

2.1.4 Chemikalien und Kits

Tabelle 2. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits.

Bezeichnung	Hersteller
6x Loading dye (green)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Ammoniumacetat	Merck KGaA
APS	Merck KGaA
Borsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
BSA	Merck Millipore
CaCl ₂	Merck KGaA
Carbachol	Sigma-Aldrich
Collagen 1	Sigma-Aldrich
D-Glucose-Monohydrat	Merck KGaA
Diethylether	Merck KGaA
Dil-Ac-LDL	Biomedical Technologies
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck Millipore
DNase-freie RNase	Qiagen
Doxorubicin	Cell pharm GmbH
DTT	AppliChem GmbH
EDTA	Sigma-Aldrich
EdU-Click 488	baseclick GmbH
Endothelin	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ethanol	Merck Millipore
Fibronectin	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Gelatine	Merck Millipore
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma-Aldrich
HCl	Carl Roth GmbH und Co. KG
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich
HNO ₃	Merck KGaA
Isopropanol	VWR International GmbH
KCl	Sigma-Aldrich

KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH und Co. KG
Luminol	Sigma-Aldrich
Matrigel™	Becton, Dickinson and Company™
Methanol	VWR International GmbH
Methylenblau	ICN Biomedicals GmbH
MgSO ₄	Merck KGaA
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG
Mitomycin C	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA
Na-Acetat	Carl Roth GmbH und Co. KG
Na-Citrat	Merck KGaA
NaHCO ₃	Merck KGaA
NaCl	VWR International GmbH
Na-Laurylsarcosinat	Sigma-Aldrich
NaOH	Merck KGaA
Na-Resazurin	Sigma-Aldrich
Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen
Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM	Thermo Fisher Scientific, Inc.
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich
PDL	Sigma-Aldrich
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH und Co. KG
RNase	SERVA Electrophoresis GmbH
RNase Inhibitor RiboLock	Thermo Fisher Scientific, Inc.
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini	Qiagen
Roti®-Load-Puffer	Carl Roth GmbH und Co. KG
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH und Co. KG
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
Senescence β-galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technology, Inc.
SensiMix SYBR® Hi-ROX	Bioline
TEMED	Carl Roth GmbH und Co. KG

Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck KGaA
UEA-1	Sigma-Aldrich
Vectashield®	Vector Laboratories
β-Mercaptoethanol	Merck Millipore

2.1.5 Medien und Medienzusätze

Tabelle 2. 5: Auflistung der verwendeten Medien und Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller
Activin A	PeptoTech®
ALKi	Selleck Chemicals
B27 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Bmp4	Thermo Fisher Scientific, Inc.
DMEM	Sigma-Aldrich
DMEM F12	Biochrom GmbH
DMEM ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Inc.
EGM2	PromoCell GmbH
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH
Fgf2	PeptoTech®
Forskolin	Sigma-Aldrich
Glutamax	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Gski	Calbiochem®, Merck Millipore
Heparin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
KO-DMEM	Thermo Fisher Scientific, Inc.
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
LIF	Merck Millipore
Neurobasalmedium	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Neuropan 2	PAN™ Biotech
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Serum Replacement (SR)	Thermo Fisher Scientific, Inc.

Vegf	PeptoTech®
Wnt-Inhibitor C-59	Selleck Chemicals
β- Mercaptoethanol (<i>cell culture grade</i>)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Calcein	Sigma-Aldrich

2.1.6 Zellkultur und Differenzierungsmedien

Tabelle 2. 6: Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur- und Differenzierungsmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Endothelinduktionsmedium (N2B27-VM)	N2B27 Fgf2 (12,5 ng/ml) Vegf (20 ng/ml) Forskolin (10 µM) ALKi (2 µM) Bmp4 (20 ng/ml)
H5V Kultivierungsmedium	DMEM FCS gold (10 %) L-Glutamin (1 %)
HUVECS	EGM2
Kardiomyozyteninduktion 1	N2B27 ohne Insulin Activin A (4 ng/ml) Fgf2 (12,5 ng/ml) Bmp4 (5 ng/ml) Gski (3 µM)
Kardiomyozyteninduktion 2	N2B27 ohne Insulin Wnt-Inhibitor C-59 (2 µM) Vegf (20 ng/ml)
MEF/NRK-52E-Medium	DMEM FCS gold (10 %) Penicillin/Streptomycin (1 %)
mESC Kultivierungsmedium (ES-Medium)	KO-DMEM FCS gold (10 %) SR (5 %) β- Mercaptoethanol (5 x 10 ⁻⁵ M) Penicillin/Streptomycin (1 %) L-Glutamin (1 %) LIF (1000 U /ml)
Mesoderminduktionsmedium (N2B27-Mi)	N2B72 Activin A (4 ng/ml) Fgf2 (12,5 ng/ml) Bmp4 (5 ng/ml) Gski (3 µM)
Präinkubationsmedium (N2B27)	DMEM F12 (50 %) Neurobasalmedium (50 %) Glutamax (0,5 %) B27 (1 %) Neuropan 2 (0,5 %) Heparin (3 µg/ml)

SMC Differenzierungsmedium	Penicillin/Streptomycin (1 %) L-Glutamin (1 %) EGM2 Penicillin/Streptomycin (1 %)
----------------------------	--

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 2. 7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Organismus	Bezugsquelle
LF2, embryonale Stammzellen (Nichols et al. 1990)	Maus	Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
H5V, Endothelzellen (Garlanda et al. 1994)	Maus	Institut Mario Negri, Mailand, Italien
EA.hy926, Endothelzellen	Mensch	PromoCell GmbH
HUVEC, Endothelzellen isoliert aus Nabelschnurblut	Mensch	PromoCell GmbH

2.1.8 Real-time PCR-Primer

2.1.8.1 Real-time PCR-Array

Der PCR-Array wurde in Zusammenarbeit mit Sigma-Aldrich Deutschland erstellt.

Tabelle 2. 8: Auflistung der Primersequenzen des Real-time PCR-Arrays.

Bezeichnung	Primersequenz, <i>forward</i> (5'-3')	Primersequenz, <i>reverse</i> (5'-3')
Actb	GCATTGCTGACAGGATGCAG	CCTGCTTGCTGATCCACATC
Akt1	AGAAGAGACTCTGAGCATCA	AAGGTGCCATCGTTCTTG
Apex1	AGAAATTGACCTCCGTAACC	CGCCAACCAACATTCTTAGA
Arhgdia	CCCTACCTACCCCAAACC	TGGACAACCCTGACAGTG
Atf2	TATCGTTCGTCCAGCATCA	TACTTGAGGTTGGTGAAGGTA
Atg3	ACCACCTCCTATGTGTCA	ATCATTAAGTCTATGTTGAGTCCAA
Bax	CTGGACACTGGACTTCCT	GCCACAAAGATGGTCACT
Bcl2	GTGTGGTTGCCTTATGTAT	GTATATCCGCTACAAGTTACA
Becn1	GATGGGAACTCTGGAGGT	GGCTGTGGTAAGTAATGGA
Bid	CACCATGTACCTTTGTCCTATC	ACCTCTCCTAATGCTGTCT
Birc3	GCTGACACCTTTGAGTTGA	GCAGAAGCACTTGACCTT
Brc1	TTGTGAGCGTTTGAATGA	ACCTGGCTTAGTTACTGT

Brca2	TAACGCCTGCTGACTCTC	TGCCAGATGAATCTCCTAACA
Casp2	TACTGCTCACAACCCTCTC	GGACCATCACCATTATCTAAGG
Ccna1	GAGGGCATCATATTTGAGGAT	CTTGGGTCTGTGTCTTACTTC
Ccnb1	GGTCACTAGGAACACGAAA	TTTGGTAGGGCTTTAAACAGT
Ccne1	AGCCCTGGGATGATAATTCA	GCTCTGGGTGGTCTGATT
Cd44	ACACCTACCTTCCTACTG	TTGTGGACTGTGAATTACC
Cdc25a	TCAAATGAAAGTGAATCAGGAAAT	CTTCATATTCTCGCCATCCA
Cdc25b	CACATCCCTCTCCTCACT	GAAGCCATCAGACTCAAACCT
Cdkn1a	ACCTGAATAGCACTTTGGAAA	TCTGAGCAATGTCAAGAGTC
Cdkn1b	CCCTCCAGTACACTTGAT	TAAACAACAAAACCGAACAAA
Chek1	TGAACGCTTACTGAACAAGAT	CCACAGGACCAAACATCAA
Chek2	TGAGAAGGACGGACAAGT	TCTACATAGTGAAAGTGCGATTT
Cxcr4	ATACCTGACTTCATCTTTGCC	TGGAGTGTGACAGCTTAGA
Cyp1a1	CCTCCGTTACCTGCCTAA	GTCCTGACAATGCTCAATGA
Cyp1b1	GACGATGCGGAGTTCCTA	GCTGAAGTTGCGGTTGAG
Ddb2	AGGCAACATTCTCAGAGT	CATTCGGAGGTTCCAAAG
Ddit3	GTCAGTTATCTTGAGCCTAA	GTGTGGTGGTGTATGAAG
Elk1	AGCCTGAGGTGTCTGTAA	GTGTTGGGAAGCACTGAG
Erc1	AAACAGGAGCAAAGTCTAAT	GGATGTAGTCTGGATGGA
Fancc	GCTTGTTGGAATCCTCTCAT	CCACGAGTTAAGTCCTGAC
Fas	AGAACCTCCAGTCGTGAA	ATCTATCTTGCCCTCCTTGA
Fas1	CTGGAATGGGAAGACACATAT	TGGTCAGCACTGGTAAGA
Fen1	GGAACGATACTGAAAGAACGG	CGGCGAAGAGGAATGTTC
Fos	AACTTCGACCATGATGTTCT	GCACTAGAGACGGACAGA
Gadd45a	GTCGCTACATGGATCAGTG	GTGACTGCTTGAGTAACTACA
Gapdh	TCTCCTGCGACTTCAACA	TCTCTTGCTCAGTGTCTT
Gpx1	TTGGTGATTACTGGCTGC	TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
Gstm1	ACACAGCCTTCATTCTCC	AATTCTAGGAAGCGTGAGTT
Hif1a	GAGGAGCGCCTAGGAACC	CGGAGAAAGAGACAAGTCCA
Hmox1	CCAGAGTCCCTCACAGAT	CCCAAGAGAAGAGAGCCA
Hsp90aa1	CGGAGGCTTCTGGAAAGA	CATCGTGGCTGAATGAACA
Hspa1b	AGACGCTGACAGCTACTC	CTCGCTTCTGGAAGGCT
Hus1	TGGAAGGAGTCTCTGAAGAA	AGGGAAAAGTGTGTTAGTCA
Icam1	TGCTCAGGTATCCATCCAT	GGAAACGAATACACGGTGAT
Il12a	GGAACTACACAAGAACGAGAG	CGCCATTATGATTAGAGACT

Itgb1	GCCAGCCAAGTGACATAG	ACTTCTGTGGTTCTCCTGAT
Jun	AACTTTCCTGACCCAGAG	GCGAACTGGTATGAGTATAG
Lamp1	AAGTGGAGAACAAGAACAGAG	TCAGTGAATGGTTGGAGATG
Lig1	ATTCGGGTTTGCCTCTC	ACCACTTGATTCCTCTCCTT
Lig4	GTGTCCTGATGCTTAGTTGT	CTCCTTGAAGTGCCTGATT
Mdm2	AAGGTGGGAGTGATCTGAA	TCTGTGTTCTCTTCTGTCTCA
Mgmt	GCTGCTGAAGGTTGTGAA	TCTCATTGCTCCTCCTACTG
Mmp13	GCCACCTTCTTCTTGTTGA	TAGTATGATTTCAAGTAGTGCTCTG
Mmp3	GCTGTGGGAAAGTCAATGA	GCCATAGTAGTTTTCTAGGTATT
Mmp7	GAACAGGCTCAGAATTATCTTAGA	CCACTACGATCCGAGGTAA
Mpg	CTGTATGTGTACCTCATCTATGG	CAGAGTTCACGGTCCTTG
Mre11a	TACGGCTTAGGCTCCATT	ATGCTTACTCCTGTTCTGATG
Msh2	GTCTAAGGAGAATGAGTGGTATC	CCATAACGCCAACGGAAG
Nos2	GCTGTTAGAGACACTTCTGAG	CACTTTGGTAGGATTTGACTTTG
Nos3	GCATGGGCAACTTGAAGA	AGGGTGTCTGATAGGTGATG
Nox1	GGCTAAATCCCATCCAGTC	CCTAAGCAGATGATATAGACGATAA
Ogg1	TGAGACTGCTGAGACAAGA	GGAAGCCATGATAAGTGACA
Pcna	GACTTAGATGTGGAGCAACTT	GGCTAAGGTCTCGGCATA
Pold1	CTCCATTTCTCCGCATCAC	CAATGTCAGCATCCACCAT
Pole	CGGTGGATTACTACTTCATTCA	CTTCTTTGGGCACATTCTCTA
Pten	ATCAAGAGATCGTTAGCAGAAA	TTGGCGGTGTCATAATGTC
Rac1	ACAAAGCCTTCTTAAAGCCTTA	GCGGTCTTCTTAGCAACA
Rad51	CAGCGATGTCCTAGATAATGTAG	TTACCACTGCGACACCAA
Rev1	TCTGCGGAGGAATTGAGA	ACACAGGATTGAAGTTGAGAC
Rev3l	TTCTCAGATGGCATTAGTATC	TCATTATGGCTCCGCTTTG
RhoA	AAGTCTGGGTGCCTCAT	AATAATCGTGGTTGGCTTCTAA
RhoB	CAGCATCAGCCATCACTTC	CTAGGCTCGCTAACTGCA
Selektin	TGCGAGAAGAACGGATAGA	CTGAATTGCCACCAGATGT
Sod1	ACCAGTTGTGTTGTCAGG	TTTCTTAGAGTGAGGATTAATGAG
Tiam1	GGTAGAACCATTGTGGACTG	CGGTGTGGCATTAGAGAC
Timp2	CAAAGCAGTGAGCGAGAA	CATCTTGCCATCTCCTTCTG
Top2a	CTTCAGGAGCCGTCACCAT	GAGCAGTATATGTTCCAGTTGT
Top2b	TGGGTGAACAATGCTACAAA	TGTATGTATCAGGACGAAGGA
Trex1	GCTACCACTGGAACAACC	TGCTATGGAAGTCTTTATTCATCA
Trp53	AAGTTCTGTAGCTTCAGTTCAT	GGCAGTCATCCAGTCTTC

Trp63	AGCATCAGAAAGCAGCAA	GATCTTCAGCAACATCTCGTA
Trp73	CTCCGCACCCTTATAACC	GCTGAGCAAATTGAACTGG
Txnrd1	CAGTTCGTCCCAACGAAAAT	GCACATTGGTCTGCTCTTCA
Vcam1	ATATACTTGGAAAGTGTCTGTGTT	GACCATCTTCACAGGCATT
Wee1	GTAGTCTCTATTCATGGACACA	GTTGCTTTCAGTAATTGTAATCTTT
Wrn	TGATTGCTCCTCCTGTCT	ACTGCGACTCTGCTTCTT
Wrnip1	GCCAATGAGATCCCTTCG	AACCTTATGCTGTGCTTCTT
Xpa	GACAACCACTCACCAACATA	TGAACTTTGAACAGGGTCTTTA
Xpc	GCGAAAGAACGGGAAAGA	AAGCGAATTGGAATGATGGA
Xrcc1	CCAACCGTGTTCGCATTT	GCACTGTCATCCTCCTCTT
Xrcc3	GGAGGAAGTCTGAGTTGGT	CTCTTAACCGCAGCAGTAAT
Xrcc4	TGCCTGGACACCATTACA	CTTCTCATTGACACCAAGAT

2.1.8.2 Real-time PCR

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und vor Gebrauch auf 3 μ M verdünnt.

Tabelle 2. 9: Auflistung der verwendeten Real-time PCR-Primer.

Bezeichnung	Primersequenz, <i>forward</i> (5'-3')	Primersequenz, <i>reverse</i> (5'-3')
α SMA	CGGCAGTAGTCACGAAGGAAT	GGACGTACAACCTGGTATTGTGG
Calponin	GCTGCCTGTTGCGCTTGTCT	CGGCCTGTCACCCCTCAAT
Efnb2	CGCTGCTAACTGTGCCAGACC	GCACACCCTCCCTCCTGGTTA
Ephb4	TCAGCCAAAGGAGGCGGCG	GCGGACGCTGTGCTGTTCTT
Flk1	GTTCTGCGTGAGACCGAGC	CAAAGCCAGTCCAGGTCCCGC
GAPDH	GACGGCCGCATCTTCTGTGC	CACTGCAAAGGCAGCCCTGG
Klf4	GTGCCCCGACTAACCGTTG	GTCGTTGAACTCCTCGGTCT
Myh6	GAGTGCTTCGTGCCTGATGA	GGGGGCGATATTACTCGCAA
Nanog	AGAGGAAGGGCGAGGAGA	TTCTTGCTTACAAGGGTCTGC
Nkx2,5	GTCCGGCCTGGCAGAG	GCTTTGTCCAGCTCCACT
Oct4	CTGCCCCCAGGTCCCCACTT	AGCATCCCCAGGGAGGGCTG
Pecam1	GCTCTGAACGAGAGCCACAG	CTGCTTTCGGTGGGACAGGC
Smoothelin	AGCAGAGTCCAGGGTACGTT	GTCCTCTGCCCCAGGGTATT
Taglin	CGGCCTTTAAACCCCTCACC	GACCCCTGTTGGCCATGTTG
Tnnt2	CTGAGGCTGAACAGATACCTC	CAGACATGCTCTCGGCTCTCC
VE-Cadherin	AAGGCTCAGCGCAGCATCGG	TCGTTGGCCTCCACAGTCGGT

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primärantikörper

Tabelle 2. 10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.

Name	Spezies	Hersteller
BRCA1	Maus	New England Biolabs
ERK2 (C-14)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
FLK1	Ratte	Abcam
HMOX1	Kaninchen	Epitomics Inc
MSH2	Maus	Oncogene Research Products
PARP (H-250)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc
p-CHK1 (S345)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc
p-CHK2 (pT68)	Kaninchen	Epitomics Inc
PECAM1	Maus	Abcam
p-KAP1 (S824)	Kaninchen	Bethyl Laboratories
p-P53 (Ser15)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc
p-SMC	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Rad51	Ratte	New England Biolabs
TNNT2	Maus	Becton, Dickinson and Company™
VE-Cadherin	Maus	eBioscience, Inc.
α SMA	Maus	Abcam
β -Aktin	Maus	Santa Cruz Biotechnology
γ H2AX (S139)	Maus	Merck Millipore

2.1.10 Sekundärantikörper

Tabelle 2. 11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.

Name	Spezies	Hersteller
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Maus	Life Technologies
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Kaninchen	Life Technologies
Alexa Fluor® 546	Ziege anti-Kaninchen	Life Technologies
Alexa Fluor® 546	Ziege anti-Ratte	Life Technologies
anti-Kaninchen IgG Peroxidasekonjugiert	Ziege anti-Kaninchen	Rockland

anti-Maus IgG Peroxidasekonjugiert	Ziege anti-Maus	Immunochemicals Rockland Immunochemicals
anti-Ratte IgG Peroxidasekonjugiert	Ziege anti-Ratte	Rockland Immunochemicals

2.1.11 Lösungen und Puffer

Tabelle 2. 12: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
AP-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Blottingpuffer	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
ECL-Lösung	3 ml Lösung A 30 µl Lösung B 3 µl H ₂ O ₂ (30 %)
Krebs-HEPES-Puffer	100 mM Tris pH 9,5 135 mM NaCl 3,6 mM KCl 5 mM NaHCO ₃ 0,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM MgCl ₂ 1,5 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES pH-Wert 7,4
Lösung A	100 mM Tris-HCl pH 8,6 50 mg Luminol in 200 ml
Lösung B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
NaCl/Pi-Puffer	1,06 mM KH ₂ PO ₄ 154 mM NaCl

	3,77 mM Na ₂ HPO ₄
PBS	2 mM KH ₂ PO ₄
	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
PBS <i>high salt</i>	2 mM KH ₂ PO ₄
	400 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
PBST	PBS
	0,3 % (v/v) Triton X-100
Ponceau-S-Lösung	1,5 g/l Ponceau-S
	5 ml/l Essigsäure
Resazurin-Lösung	1 ml Resazurinstocklösung
	9999 ml NaCl/Pi-Puffer
Resazurin-Stocklösung	440 mM Na-Resazurin in Dimethylformamid
Sammelgel (5 %)	1,3 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30)
	1 ml 1,5 M Tris-Base pH 6,8
	5,5 ml MilliQ-H ₂ O
	160 µl SDS 10 %
	80 µl APS (100 g/l)
	80 µl TEMED 10 %
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base
	192 mM Glycin
TBS	50 mM Tris-Base pH 7,4
	150 mM NaCl
TBST	0,05 % (v/v) Tween 20
	10 mM Tris-Base pH 8,0
	1 mM EDTA
Trenngel (12 %)	8 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30)
	5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8
	6,5 ml Milli-Q-H ₂ O
	200 µl SDS 10 %

Trenngel (6 %)

200 µl APS (100 g/l)

80 µl TEMED 10 %

4 ml Acrylamid 30 %

(Rotiphorese® Gel 30)

5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8

10,4 ml MilliQ-H₂O

200 µl SDS 10 %

200 µl APS (100 g/l)

160 µl

TEMED 10 %

2.2 METHODEN

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche im Folgenden beschriebenen zellkulturellen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C mit 21 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.1.1 Präparation von Maus embryonalen Fibroblasten

Die Maus embryonalen Fibroblasten (MEFs), welche als Feeder-Zellen für die embryonalen Stammzellen dienen, wurden aus E14 Mausembryonen gewonnen. Dazu wurden die Uteri freipräpariert und aus dem Mutterleib entfernt. Danach wurden die Embryonen auf Eis gelagert und in eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie dekapiert und die inneren Organe sowie die Wirbelsäule entfernt. Der verbleibende Haut- und Muskelschlauch wurde in kleine Stücke zerteilt, in PBS gewaschen und in 2 ml Trypsin-EDTA für 10 min (*minutes*; Minuten) bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde zentrifugiert (10 min, 500 g), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml MEF-Medium resuspendiert. 20 ml MEF-Medium und 1 ml Zellsuspension wurden in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h (*hours*; Stunden) wurde das Medium gewechselt. Konfluente Zellen wurden entweder passagiert, kryokonserviert oder für die weitere Verwendung als Feeder-Zellen inaktiviert. Zur Inaktivierung wurden die Zellen 2 h mit Mitomycin C (4 µg/ml, 37 °C) behandelt.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die mESC (*mouse embryonic stem cells*; embryonale Stammzellen der Maus) wurden passagiert, bevor Subkolonien sich berührten, H5V-Zellen (immortalisierte Mausendothelzelllinie), HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) und NRK-52E-Zellen wurden kultiviert bis sie eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten. Bevor die Zellen passagiert wurden, wurden Medien, PBS und Trypsin auf 37 °C erwärmt. Um die adhärent wachsenden Zellen von den Kulturflaschen zu lösen wurden sie nach Entfernung des Mediums, mit Trypsin/EDTA (0,25 %) inkubiert. Um die Enzymreaktion des Trypsins zu verlangsamen wurde das jeweilige Kulturmedium zu den abgelösten Zellen gegeben bevor diese pelletiert (5 min, 500g, RT) wurden. Nach Ermittlung der Zellzahl mittels einer Neubauerkammer wurden die Zellen entweder neu ausplattiert, für Differenzierungen eingesetzt, als Pellet zur RNA-Isolation weggefroren (Lagerung bei -80 °C) oder kryokonserviert. Für das Aussäen der mESC wurden die Zellkulturflaschen zunächst für 10 min mit 0,1 % Gelatine beschichtet (RT, Raumtemperatur). H5V-Zellen sind plastik-adhärent und brauchten keine Beschichtung zur Kultivierung in Zellkulturflaschen.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen zur späteren Verwendung einzufrieren, wurde die gewünschte Zellzahl zentrifugiert (5 min, 500 g) und der Überstand verworfen. Pro Kryovial wurden $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ Zellen in 2 ml Einfriermedium, bestehend aus 1 ml 80 % FCS gold in DMEM und 1 ml 20 % DMSO in DMEM, eingefroren. Nach Zugabe des DMSO wurden die Kryovials sofort bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und nach 24 h - 48 h zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt. Zur weiteren Verwendung der kryokonservierten Zellen, wurden die Zellen im Kryovial im Wasserbad aufgetaut, bis sich nur noch ein Eiskristall darin befand. Der Inhalt wurde in 2 ml FCS Gold ($4\text{ }^\circ\text{C}$, vorgelegt in einem 15 ml Polyethylen-Röhrchen) überführt. Nach 30 s wurden 10 ml zellspezifisches Medium ($4\text{ }^\circ\text{C}$) zugegeben, resuspendiert und zentrifugiert (7 min, 500 g, $4\text{ }^\circ\text{C}$). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml frischem Medium ($37\text{ }^\circ\text{C}$) resuspendiert und in Kultur genommen.

2.2.2 Differenzierungen

Die Differenzierungen wurden in verschiedenen Passagen durchgeführt. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Passagen 19 - 28. Bevor eine Differenzierung gestartet wurde, wurden die mESC für 48 h in Kultur genommen. Für verschiedene Versuche wurden die Differenzierungen auf Deckgläschen durchgeführt. Diese wurden ebenso beschichtet wie die 6-Well-Platten.

2.2.2.1 Endothelzeldifferenzierung

Für die endotheliale Differenzierung wurden zunächst 6-Well-Platten mit Fibronectin ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) beschichtet. Zu diesem Zweck wurden die 6-Well-Platten zunächst für 1 h (RT) mit Poly-d-Lysine ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) behandelt und anschließend über Nacht ($37\text{ }^\circ\text{C}$) mit Fibronectin beschichtet. Zur Differenzierung in endotheliale Richtung wurden $0,15 \times 10^5$ mESC pro Well einer 6-Well-Platte in 2 ml N2B27 Medium ohne Wachstumsfaktoren (Präinkubationsmedium) ausplattiert. Dieser Zeitpunkt wurde als d0 (Tag 0) festgelegt. An Tag 2 (d2) wurde auf N2B27-Mi Medium (2 ml) gewechselt und an Tag 4 (d4) auf 2 ml N2B27-VM. Ab d6 erfolgte der Mediumwechsel täglich.

2.2.2.2 Glatte Muskelzeldifferenzierung

Eine Transdifferenzierung in glatte Muskelzellen erfolgte mit 9 Tage (d9) alten endothelial differenzierten Zellen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 1:3 auf mit 0,1 % Gelatine beschichtet 6-Wells in EGM2 Medium gesplittet. Ein Mediumwechsel (2 ml/6-Well) erfolgte täglich.

2.2.2.3 Kardiomyozytendifferenzierung

Für die Differenzierung wurden zunächst 6-Well-Platten mit Fibronectin ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) beschichtet. Zu diesem Zweck wurden die 6-Well-Platten zunächst für 1 h (RT) mit Poly-d-Lysine ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) behandelt und anschließend über Nacht ($37\text{ }^\circ\text{C}$) mit Fibronectin beschichtet. Zur Differenzierung in

Kardiomyozyten wurden $0,3 \times 10^5$ mESC pro Well einer 6-Well-Platte in 2 ml N2B27 (+Insulin) Medium ohne Wachstumsfaktoren ausplattiert. An d2 wurde auf das Kardiomyozyten-induktionsmedium 1 und an d4 auf das Kardiomyozyteninduktionsmedium 2 gewechselt. Ab d6 erhielten die Zellen täglich N2B27, supplementiert mit Vegf (20 ng/ml).

2.2.3 Behandlung der Zellen mit Genotoxinen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einer Cäsium137-Quelle in der Bestrahlungsanlage Gammacell® 1000 Elite. Die Behandlung der Zellen mit Doxorubicin erfolgte für 2 h. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Medium weiterkultiviert.

2.2.4 Vorbereitung der Deckgläschen

Für immunozytologische Untersuchungen und den Kontraktions-Assay (siehe Abschnitt 2.2.5.5) wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät bzw. differenziert. Damit die Zellen auf den Deckgläschen anwachsen, musste diese zunächst vorbehandelt werden. Bis zu 100 Plättchen wurden dazu in ein Becherglas gegeben und in Diethylether für 15 min geschwenkt (vorsichtig). Daraufhin wurde der Diethylether abgegossen und die Plättchen zuerst mit 100 % EtOH, dann mit 70 % und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden sie in 1 M HCl für 20 min geschwenkt. Die HCl wurde entfernt und die Plättchen in einem Gefäß mit 70 % EtOH bis zum Gebrauch gelagert. Vor Gebrauch wurden die jeweiligen Plättchen in der Petrischale, in der die Zellen wachsen sollen, in einer Sterilbank getrocknet und für 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Für die Kultivierung der mESC (siehe Abschnitt 2.2.1.2) oder eine Transdifferenzierung von EC in SMC (siehe Abschnitt 2.2.2.2) wurden die Plättchen vor Versuchsbeginn mit Gelatine beschichtet und für eine Differenzierung in Endothelzellen (siehe Abschnitt 2.2.2.1) oder Kardiomyozyten (siehe Abschnitt 2.2.2.3) erfolgte eine Beschichtung mit Fibronectin.

2.2.5 Analysen zur Charakterisierung der differenzierten Zellen

2.2.5.1 Inkorporation von Dil-Ac-LDL und Lektinbindung

Die Fähigkeit zur Aufnahme von Acetyliertem Low Density Lipoprotein (Dil-Ac-LDL), welches an 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate gekoppelt ist, fungiert als Marker für Endothelzellen. Die Färbung beruht auf der Tatsache, dass ein Lipoprotein, sobald es von einer Zelle aufgenommen wird, von lysosomalen Enzymen gespalten wird und Dil (ein Fluoreszenzfarbstoff) in den lysosomalen Membranen angereichert wird. Zum Nachweis der Fähigkeit von Endothelzellen LDL aufzunehmen und Lektin zu binden wurde eine direkte Fluoreszenzfärbemethode verwendet. Zu diesem Zweck wurden fluoresceinisothiocyanat-gekoppeltes Ulex europaeus agglutinin Lektin (UEA-1, grün) und Dil-Ac-LDL (rot) benutzt. 10 µg/ml

Dil-Ac-LDL wurden dem Zellkulturmedium zugesetzt und die Zellen für 4 h im Inkubator weiter kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min bei RT in kaltem 4 % Formaldehyd/PBS fixiert, gefolgt von einer Inkubation mit UEA-1 (10 µg/ml, 1 h). Die Zellen wurden 3 x mit PBS (5 min) gewaschen und schließlich mit Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), welches DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zum Anfärben der Zellkerne enthielt, eingedeckelt und versiegelt. Zur Beurteilung der Fähigkeit LDL aufzunehmen und Lektin zu binden wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.5.2 Tube Formation-Assay

Eingefrorenes Matrigel wurde über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Am nächsten Morgen wurden 200 µl Matrigel pro Well einer 24-Well-Platte (gekühlt, auf Eis) mit eiskalten Pipettenspitzen pipettiert und gleichmäßig in den Wells verteilt. Die Kühlung der Pipettenspitzen und der 24-Well Platte verhindert eine vorzeitige Polymerisierung des Matrigels, welche ab > 4 °C geschieht. Die Platte wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsinisiert und 2×10^4 Zellen wurden auf die mit Matrigel beschichteten Wells ausplattiert (in 500 µl zelltypspezifischem Medium). Nach 4 - 18 h Inkubationszeit wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop fotografiert. HUVEC und H5V-Zellen dienen als Kontrollen.

2.2.5.3 Calceinfärbung

Um die gebildeten gefäßähnlichen Strukturen (Tubes) deutlicher sichtbar zu machen, wurden die Zellen teilweise vor Beginn des Tube Formation-Assays (Abschnitt 2.2.5.2) mit Calcein gefärbt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vor dem Trypsinieren mit Calcein-AM (320 nM) haltigem PBS für 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Das zellwandpermeable Esterase-Substrat Calcein-AM (nicht-fluoreszierend) diffundiert während der Inkubationszeit in das Zytoplasma der Zellen. Nach der Diffusion in die Zelle wird der Acetoxymethylesterrest (AM) enzymatisch durch Esterasen abgespalten. Das so entstandene Calcein ist dann in der Lage, Calciumionen (Ca²⁺) innerhalb der Zelle zu komplexieren, was in einer starken, grünen Fluoreszenz resultiert (Abbildung 2. 1). Calcein fluoresziert in komplexierter Form bei einer Anregung von 494 nm mit einem Emissionsmaximum von 517 nm.

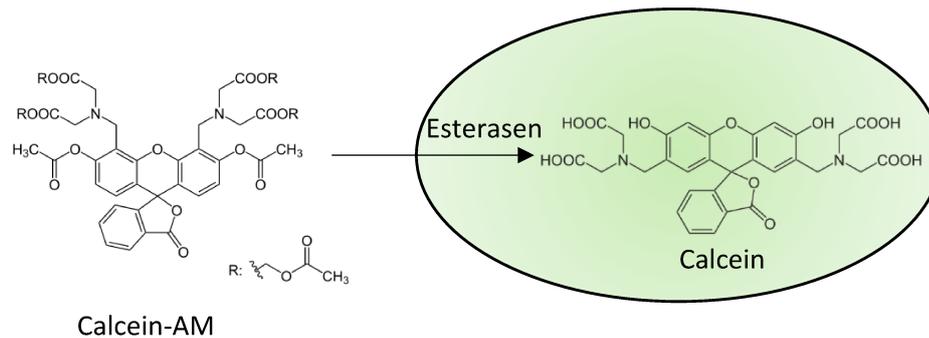


Abbildung 2. 1: Prinzip der Calceinfärbung.

Calcein-AM ist zellwandpermeabel und diffundiert in das Zytoplasma der Zellen. In lebenden Zellen wird der Acetoxymethylesterrest (AM) von Esterasen abgespalten. Es entsteht das stark fluoreszierende Calcein.

2.2.5.4 Calcium-Assay

Der Ca^{2+} -Assay ist ein funktioneller Assay zur direkten Bestimmung des Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Hierzu wurde ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff (Oregon Green 488 BAPTA-1/AM) verwendet, der eine Ca^{2+} -komplexierende Komponente (BAPTA: *1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) enthält. Die Carbonsäurereste dieses Farbstoffes liegen zunächst acetoxymethyliert vor. Diese Methylierung macht den Farbstoff zellpermeabel. Nach passiver Diffusion durch die Zellmembran werden die AM-Ester durch unspezifische Esterasen enzymatisch gespalten und der Farbstoff so im Zytoplasma lebender Zellen zurückgehalten. Die Komplexierung mit Ca^{2+} innerhalb der Zelle erhöht die Fluoreszenzemission des Farbstoffs proportional zur Ca^{2+} -Konzentration. Aus dem Anstieg der Fluoreszenz kann so die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration detektiert werden.

Zur Messung der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde der NOVOstar® Microplate Reader mit integriertem Pipettiersystem verwendet. Die jeweiligen Zellen wurden trypsiniert, in frischem zelltypspezifischen Medium resuspendiert und in Suspension für 15 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Krebs-HEPES-Puffer gewaschen und 45 min bei RT mit 500 μl Krebs-HEPES-Puffer der 1,5 μM Oregon Green 488 BAPTA-1/AM und 0,03 % Pluronic F-127 enthielt, unter Schütteln inkubiert. Pluronic F-127 ist ein nichtionisches Tensid-Polyol, welches die Auflösung von wasserunlöslichen Oregon Green 488 BAPTA-1/AM in physiologischen Medien erleichtert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit Krebs-HEPES-Puffer gewaschen, um Farbstoffreste zu entfernen. Daraufhin wurden 75.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Im NOVOstar® plate reader wurden die verschiedenen Agonisten (1 mM und 0,316 mM Carbachol, 10 μM Endothelin) zu den Zellen pipettiert (bei 37 °C) und die Veränderungen in der Fluoreszenz gemessen. Die Anregung fand bei 485 nm (Bandbreite 25 nm) statt. Die Gesamtmesszeit betrug, unter Berücksichtigung der Injektionszeit von 7,2 s (*seconds*; Sekunden), 31,2 s. Die gemessenen Daten der Fluoreszenz-Zeit-

Verläufe wurden mit Hilfe der NOVOstar®- Software ausgewertet. Alle in dieser Arbeit gezeigten Ca^{2+} -Messungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Kassack des Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt, welcher seine Laborräume und Geräte für diese Versuche zur Verfügung stellte.

2.2.5.5 Kontraktions-Assay

Um die Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskelzellen (SMC) nachzuweisen, wurde die Differenzierung auf mit 0,1 % Gelatine-beschichteten Deckgläschen durchgeführt. An d15 der Differenzierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 50 mM KCl alleine oder in Kombination mit 2,5 mM EDTA in EGM2 Medium für 30 min unter dem Mikroskop inkubiert. Dabei wurde für das Zeitintervall von 30 min alle 10 s eine Aufnahme gemacht und daraus anschließend ein Video erstellt, um die Kontraktion der Zellen beobachten zu können. NRK-52E-Zellen dienten dabei als Negativkontrolle.

2.2.5.6 Alkalische Phosphatase Färbung

Ein Merkmal undifferenzierter ES-Zellen ist eine starke Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP), die bei Differenzierung der Zellen abnimmt. Sie dient somit als ein schnell zu überprüfender Marker für den Differenzierungszustand einer ES-Zellkultur. Zu diesem Zweck wurden NBT/BCIP *Ready-to-Use* Tabletten zur Herstellung einer Substratlösung unter Befolgung des Herstellerprotokolls verwendet. 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) ist ein artifizielles, chromogenes Substrat für die Alkalische Phosphatase (AP), welches durch diese zu Indoxyl und Phosphat hydrolysiert wird. Nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung entsteht aus dem reduzierten Indoxyl blaues Indigo. Diese Reaktion wird durch NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) verstärkt. NBT ist ein Di-Tetrazoliumsalz und Redoxfarbstoff. Bei der Substratumsetzung durch die AP entsteht über die Zwischenstufe eines roten Monoformazanfarbstoffes ein blauer unlöslicher Diformazanfarbstoff (Abbildung 2. 2).

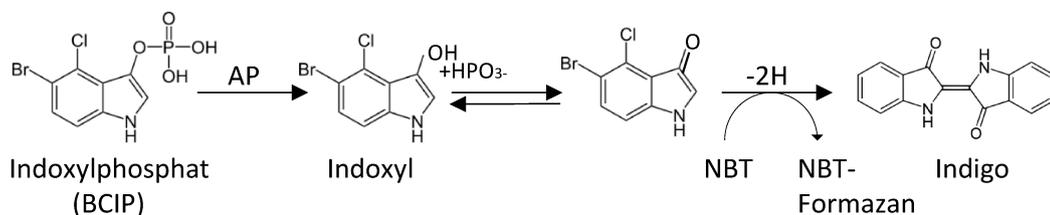


Abbildung 2. 2: Prinzip der Substratumsetzung (BCIP/NBT) durch die alkalische Phosphatase.

5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) wird durch die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase zu Indoxyl und Phosphat hydrolysiert. Nach Oxidation mit Luftsauerstoff entsteht der blaue Indigofarbstoff. NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) verstärkt diese Reaktion, indem es zu einem blauen Diformazanfarbstoff reduziert.

Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit eiskaltem Ethanol fixiert, mit AP-Puffer gewaschen und anschließend für 15 min in frisch angesetzter AP-Färbelösung inkubiert. Zur Ansetzung der Färbelösung wurde eine NBT/BCIP *Ready-to-Use* Tablette in 10 ml AP-Puffer gelöst. Dies entsprach 0,4 mg/ml NBT und 0,19 mg/ml BCIP. Die AP arbeitet nur in schwach alkalischer Lösung. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Färbelösung und Waschen mit Wasser gestoppt und die Färbung der Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

2.2.5.7 Immunzytochemische Färbungen

Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert bzw. differenziert. Zum Anfärben zelltypspezifischer Proteine wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in kaltem 4 % Formaldehyd/PBS für 15 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mindestens für 60 min in 5 % BSA in PBS/0,3 % Triton X-100 (PBST) oder 5 % BSA in PBS, je nachdem ob es sich um Oberflächenmoleküle oder zytosolische Proteine handelte, inkubiert, um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde der Primärantikörper (PECAM1 1:50, alle anderen 1:100 in PBST oder PBS, über Nacht, bei 4 °C) in einer Feuchtkammer auf die Zellen gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper mit PBS von den Zellen gewaschen. Danach wurden sie 1 - 2 Stunden mit dem Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper unter Lichtausschluss in PBST/PBS inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und schließlich mit Vectashield®, welches DAPI, einen DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, zum Anfärben der Zellkerne enthielt, eingedeckelt und versiegelt. Die nachfolgende mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension.

2.2.6 Molekularbiologische Analysen

2.2.6.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden Kits der Firma Qiagen genutzt. Es wurden QIAshredder-Säulen und je nach Zellzahl das RNeasy® Micro Kit (< 0,5 x 10⁶ Zellen) oder das RNeasy® Mini Kit (> 0,5 x 10⁶ Zellen) verwendet. Dabei wurde das Herstellerprotokoll „*Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology*“ inklusive des optionalen DNA-Verdaus befolgt. Das Prinzip dieser RNA-Isolation beruht auf der Bindung von RNA an eine Silicagel-Membran. Dabei wird die Probe unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert. In mehreren Waschschrritten werden Kontaminationen entfernt und die RNA nachfolgend mit DEPC-Wasser von der Membran eluiert. Für die Isolation wurden die Zellpellets mit PBS gewaschen und zur Inaktivierung von RNasen, in Dithiothreitol (DTT)-haltigem RLT-Puffer lysiert (RT). Die RNA-Konzentration sowie die Reinheit der

isolierten RNA wurde mit dem NanoVue Plus spektrophotometrisch bestimmt. Anschließend wurde die RNA direkt in cDNA umgeschrieben oder bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 cDNA Synthese (reverse Transkription)

Die Synthese der cDNA wurde mit dem Omniscript RT Kit gemäß des Herstellerprotokolls unter Verwendung von Oligo-dT-Primern durchgeführt.

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird dabei aus der zuvor isolierten mRNA (Abschnitt 2.2.6.1) die dazu komplementäre cDNA im Zuge einer RT-PCR synthetisiert. Als Primer, zur Ermöglichung des Synthesestarts, wurde ein Oligo-dT-Nukleotid verwendet, welches komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist. Für die cDNA-Synthese wurden 500-1000 ng der mRNA verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei 4 °C oder, bei längerer Lagerung, bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.6.3 Quantitative Real-time PCR

Für die quantitative Analyse der mRNA-Expression wurde das SensiMix SYBR® Hi-ROX Kit verwendet. Das Prinzip der quantitativen Real-time PCR beruht auf der Nutzung von DNA-Farbstoffen (hier SYBR-Green), die in die doppelsträngige DNA interkalieren, was einen Anstieg der Fluoreszenz dieser Farbstoffe zur Folge hat. Die Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes (C_q-Wert), welcher den Zyklus markiert, an dem die SYBR-Green Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dem letzten Zyklus schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse an, um die Spezifität des amplifizierten Produkts zu überprüfen. Je Reaktionsansatz wurden 20 ng cDNA und 0,25 µM der Primer eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten im CFX96™ Real-time PCR Detection System detektiert. Es wurde das folgende Programm verwendet: 10 min 95 °C; 15 s 95 °C, 15 s 55/60 °C, 17 s 72 °C (45 Zyklen). Die Expression der untersuchten Gene wurde auf die Housekeeping-Gene Gapdh und/oder β-Aktin bezogen und mittels der Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software berechnet.

2.2.7 Proteinbiochemie

2.2.7.1 Isolation von Proteinextrakten aus Zellen

Zur Gesamtproteinisolation wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlung pelletiert (ca. 1×10^6 Zellen), in 150 µl (SDS)-haltigem, Roti®-Load-Puffer lysiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie zum Zellaufschluss in zwei Durchgängen sonifiziert (50 % Amplitude; 1 s Puls; 1 s Pause; 5 Stöße).

Der eingesetzte Ultraschall mit hoher Frequenz erzeugt in der Flüssigkeit Blasen, die implodieren. Die dadurch wechselnde Druckänderung hat zur Folge, dass die Membranen der beschallten Zellen zerreißen und die Zellen so aufgeschlossen werden. Da dabei Wärme freigesetzt wird, fand die

Sonifizierung auf Eis statt. Das im Roti®-Load-Puffer enthaltene SDS und β -Mercaptoethanol sorgen für eine Denaturierung der Proteine, Sekundär- und Tertiärstrukturen werden dabei durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und die Spaltung von Disulfidbrücken aufgebrochen. Zudem sind die mit SDS komplexierten Proteine negativ geladen. Beides sind Grundvoraussetzung für die anschließende Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld (SDS-Page, siehe Abschnitt 2.2.7.2). Nach dem Zellausschluss wurden die Zellen zentrifugiert (10000 g, 10 min), um Zelltrümmer zu entfernen und der proteinhaltige Überstand für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurden die Proteinextrakte entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert oder direkt in die Taschen des SDS-Gels zur Analyse aufgetragen.

2.2.7.2 SDS-Page

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit SDS-Polyacrylamidgelen. Die mit SDS komplexierten und damit negativ geladenen monomeren und gestreckten Proteine wandern im elektrischen Feld zunächst durch ein Sammelgel, um sie am Übergang zum Trenngel zu konzentrieren und dann durch ein Trenngel in Richtung Anode. Dabei werden sie durch die Poren des Acrylamids nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. 30 μ l Proteine aus den Zelllysaten wurde dabei mittels 5 %igem Sammelgel und 6 bis 12 %igem Trenngel separiert (40 - 70 Minuten bei 10 - 30 mA pro Gel). Die Elektrophorese erfolgte mittels Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese-System in SDS-Laufpuffer. Als Größenstandard diente eine PageRuler™ Plus Prestained Protein Leiter.

2.2.7.3 Westernblot

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine mittels Mini Trans-Blot® Cell System (Nassblot) durch Anlegen eines elektrischen Feldes (1,5 h bei 300 mA) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Die Membranen wurden anschließend mindestens eine Stunde in Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,1 % Tween 20 (TBST) und 5 % Milchpulver inkubiert, um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren. Daraufhin wurden sie mit TBST gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper (1:1000) in TBST, 5 % Milch in TBST oder 5 % BSA in TBST inkubiert (je nach Herstellerangaben des Antikörpers). Am Folgetag wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen der Membranen mit TBST (3 x 5 min, RT) entfernt und mit dem entsprechenden Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in TBST + 5 % Milch (1:15000) für mindestens 2 h inkubiert. Zur Normalisierung wurden Erk2 (Mapk1), β -Actin und/oder GAPDH als Referenzproteine verwendet. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde eine luminolhaltige Chemilumineszenzlösung (*enhanced chemiluminescence*; ECL) verwendet und die Intensität der Signale mittels des Fusion FX7 Imaging Systems und der Fusion Software Version 15.17 analysiert.

2.2.8 Analyse der Zellviabilität

2.2.8.1 Seneszenz β -Galaktosidase Färbung

Um sicherzustellen, dass die glatten Muskelzellen nach 15 Tagen in Kultur nicht seneszent wurden, wurde eine β -Galaktosidase Färbung mit Hilfe des *Senescence β -galactosidase Staining Kits* der Firma Cell Signaling durchgeführt. Dabei wurde das Herstellerprotokoll befolgt. Eine verstärkte Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase ist charakteristisch für seneszente, nicht aber präseneszente, ruhende oder immortalisierte Zellen. Eine Enzymaktivität wird in dieser Färbemethode über die Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) nachgewiesen. X-Gal ist ein chromogenes Substrat für das Enzym β -Galaktosidase und wird durch diese in 5-Brom-4-chlor-Indoxyl und H_2O gespalten. Dieses wiederum bildet nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo, welcher unter dem Lichtmikroskop in den Zellen sichtbar ist (Abbildung 2. 3).

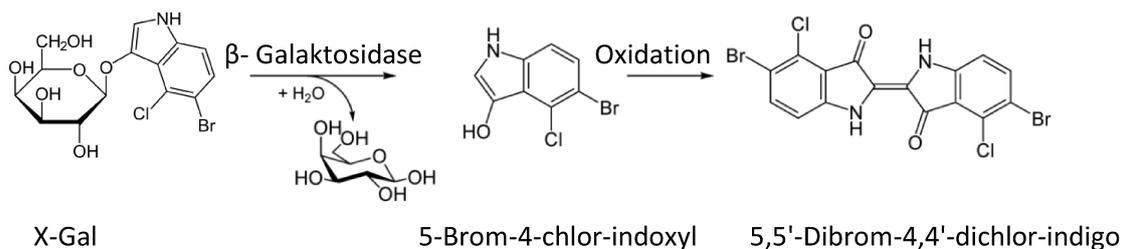


Abbildung 2. 3: Prinzip der Seneszenz β -Galaktosidase Färbung.

5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) wird durch die β -Galaktosidaseaktivität in den seneszenten Zellen enzymatisch in 5-Brom-4-chlor-Indoxyl und H_2O gespalten. 5-Brom-4-chlor-Indoxyl bildet nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo.

Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei RT mit der im Kit enthaltenen Fixierlösung fixiert. Nach Waschen mit PBS wurde die X-Gal-haltige Färbelösung zu den Zellen gegeben und über Nacht in einer Feuchtkammer bei 37 °C inkubiert (kein CO_2). Am nächsten Tag wurde die Blaufärbung, welche ein Maß für die β -Galaktosidaseaktivität der Zellen darstellt, unter dem Mikroskop dokumentiert.

2.2.8.2 Resazurin-Reduktionstest (Alamar Blue-Assay)

Um den Einfluss der Genotoxine auf die Viabilität der Zellen zu untersuchen wurde ein Alamar Blue-Assay durchgeführt. Blaues, nicht-fluoreszierendes 7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10-oxid (Resazurin) wird von metabolisch-aktiven Zellen zu pinkfarbenem, fluoreszierendem (7-Hydroxyphenoxazin-3-on) Resorufin reduziert. Die Reduktionsrate des Resazurins korreliert dabei mit der Zellviabilität/Zytotoxizität bzw. der Proliferation der Zellen (Abbildung 2. 4).

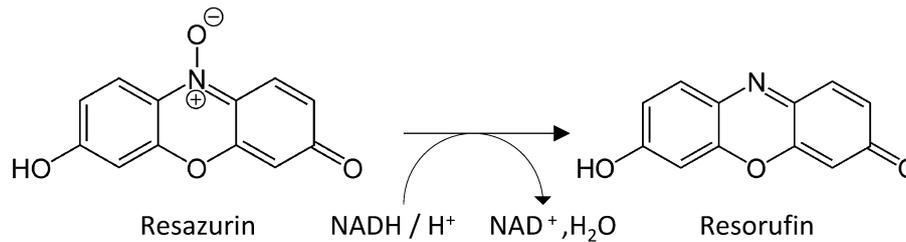


Abbildung 2. 4: Prinzip des Alamar Blue-Assays.

Lebende Zellen setzen das nicht-fluoreszierende Substrat 7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10oxid (Resazurin) zu dem pinkfarbenem, fluoreszierenden 7-Hydroxyphenoxazin-3-on (Resorufin) um. Anschließend kann die Fluoreszenz gemessen werden. Sie dient als Maß für die Zellviabilität.

Nach der jeweiligen Behandlung der Zellen, wurde das Medium von den Zellen entfernt und ein entsprechendes Volumen an vorgewärmter Resazurin-Arbeitslösung (100 µl Resazurin-Lösung in DMEM ohne Phenolrot (1:10)/96-Well; finale Konzentration: 44 µM) zu den Zellen gegeben und für 4 h im Brutschrank inkubiert. *Blanks* (mit Zellkulturmedium befüllte Wells) wurden mitgeführt. Zur Analyse wurde die Fluoreszenz mittels des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® F200 gemessen (Exzitation: 535 nm; Emission: 590 nm; 5 Blitze; Integrationszeit: 20 µs) und die Hintergrundfluoreszenz (*Blank*) subtrahiert. Die relative Viabilität der unbehandelten Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt.

2.2.9 Analyse der Zellzyklusverteilung

2.2.9.1 Zellzyklusanalyse/SubG1 Messung

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers kann bei der Zellzyklusanalyse der relative DNA Gehalt von Einzelzellen gemessen werden. Dabei passieren die Zellen nach hydrodynamischer Fokussierung einen Laser, wodurch es zur Brechung und Streuung des Lichts und zur Anregung der Fluorochrome kommt. Die Größe der Zellen wird vom Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) erfasst und die Granularität der Zellen vom Seitwärtsstreulicht (*side scatter*). Die verschiedenen Fluoreszenzdetektoren messen die Intensität in bestimmten Bereichen des Spektrums. Durch die unterschiedliche Menge an DNA während des Zellzyklus lassen sich dessen einzelne Zellzyklusphasen nach Anfärbung der DNA mit einem fluoreszierenden Marker, der in die DNA interkaliert (hier: PI), mit dieser Methode gut unterscheiden. Dabei weist die Zelle in der G₀/G₁-Phase einen einfachen DNA-Gehalt auf, in der S-Phase einen ein- bis zweifachen DNA-Gehalt und in der G₂/M-Phase eine doppelten DNA-Gehalt auf. Die Zellzyklusanalyse kann zusätzlich als Nachweis der Apoptose dienen. Genauer lässt sich eine SubG₁-Phase mit apoptotischen Zellkernen identifizieren, deren DNA-Gehalt geringer ist als in der G₀/G₁-Phase.

Nach Ende der jeweiligen Behandlung wurde das Kulturmedium in 15 ml Polyethylen-Röhrchen überführt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und dies ebenfalls in das entsprechende Röhrchen

überführt. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 500 µl 1x Trypsin abgelöst, in 1,5 ml PBS aufgenommen und mit dem Inhalt im Röhrchen vereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 800 g, 4 °C) wurde das Pellet in 2 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch 2 x wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und auf dem Vortexer wurden 2 ml eiskaltes 80 % Ethanol tropfenweise hinzugegeben. Die Proben wurden mindestens 20 min bei -20 °C bis zur Messung gelagert. Vor der Messung wurden die Zellen zentrifugiert (800 g, 10 Minuten, 4 °C). Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurden die Zellen in 132 µl PBS + 1 µl DNase freier RNase (1 mg/ml) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden 367 µl PI (50 µg/ml) je Probe hinzugegeben, resuspendiert und 15 - 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Resuspendieren wurden die Proben im BD Accuri™ C6 gemessen (10000 events, Geschwindigkeit medium, Kanal 2: 585/40 nm) und die Zellzyklusverteilung analysiert. Quantifiziert wurden der prozentualen Anteile der Zellen in der SubG1-Fraktion, welche als apoptotische Zellpopulation betrachtet wurde.

2.2.9.2 EdU-Inkorporations-Assay

Die EdU-Färbung dient der Analyse des Proliferationsverhaltens von Zellen. EdU (5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine) ist ein Thymidin Analoga. Gibt man es zu den Zellen, so wird es anstelle von Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA inkorporiert. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffs 6-Carboxyfluorescein-Azid (6 FAM-Azid), welcher in einer kupferkatalysierten Reaktion an die Alkin-Gruppe kovalent und unter Ringschluss an EdU bindet, kann der Einbau unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Es wurde das EdU-Click 488 Kit der Firma *baseclick* GmbH nach Herstellerprotokoll verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst auf beschichteten Glascoverslips kultiviert. Nach der jeweiligen Behandlung der Zellen wurde das Medium von den Zellen gesaugt und eine 1x EdU-Färbelösung (vorgewärmt) zu den Zellen gegeben und für 3 h inkubiert (37 °C mit 21 % O₂ und 5 % CO₂). Anschließend wurden die Färbelösung entfernt und die Zellen mit in 3,7 % Formaldehyd/PBS bei RT für 15 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen mit 3 % BSA in PBS gewaschen und 20 min bei RT in 0,5 % Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen erneut mit 3 % BSA in PBS gewaschen und für 30 min bei RT im Dunkeln mit der Färbelösung inkubiert. Im Anschluss wurde mit PBS gewaschen und schließlich mit Vectashield®, welches DAPI zum Anfärben der Zellkerne enthielt, eingedeckelt und versiegelt. Die Anzahl an EdU-positiven Zellen wurde mikroskopisch mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension quantifiziert.

2.2.10 Analyse von DNA-Schäden

2.2.10.1 γ H2AX-Foci

Um die genotoxische Wirkung der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen zu analysieren, wurden γ H2AX-Foci, welche dem Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen (*DNA double strand breaks*; DSBs) dienen, nach einer Behandlung nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass DSBs durch den MRN-Komplex erkannt werden, was eine Rekrutierung der Proteinkinasen ATM, ATR und DNA-PKcs zur Folge hat. Diese phosphorylieren das dem DSB nächstgelegene Histon H2AX (γ H2AX-Focus) an seinem Serin 139. Diese γ H2AX-Foci können durch eine spezifische Antikörperfärbung detektiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf beschichteten Glascoverslips kultiviert. Zum Anfärben der γ H2AX-Foci wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und in kaltem 4%igem Formaldehyd/PBS für 15 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und wenigsten für 20 min in eiskaltem Methanol bei - 20 °C permeabilisiert. Unspezifische Antigenbindungsstellen wurden mindestens für 60 min in 5 % BSA in PBS/0,3 % Triton X-100 (PBST) blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (γ H2AX(S139), 1:500 in PBST, über Nacht, bei 4 °C) in einer Feuchtkammer auf die Zellen gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper mit PBS, PBS *high salt* und PBST von den Zellen gewaschen. Danach wurden sie 1 - 2 h mit dem Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper (AlexaFluor488 goat anti-mouse/anti-rabbit) in PBST im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS und PBST gewaschen und schließlich mit Vectashield®, welches DAPI zum Anfärben der Zellkerne enthielt, eingedeckelt und versiegelt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension. Anschließend wurde die Anzahl der nukleären γ H2AX-Foci pro Zelle ermittelt.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des zweiseitigen ungepaarten t-Tests nach Student. Eine Zufallswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p \leq 0,05$) wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistisch signifikanten Unterschiede wurden in den Abbildungen mit * versehen. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 VASKULÄRE DIFFERENZIERUNG DER MURINEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN

Die in dieser Arbeit verwendete Stammzelllinie LF2 (Nichols et al. 1990) wurde ohne Feeder-Zellen kultiviert. Der undifferenzierte Status der Zellen wurde durch die Zugabe von LIF in das Kultivierungsmedium gewährleistet. In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stammzellen unter diesen Bedingungen die Stammzellfaktoren Klf4 (*kruppel like factor*), Nanog (*Nanog homeobox*) und Oct4 (*octamer binding transcription factor 4*) exprimierten (Hennicke et al. 2015) und eine erhöhte Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase aufwiesen, was allgemein für einen undifferenzierten Status der Zellen spricht.

3.1.1 Endothelzelldifferenzierung

Als Grundlage für die Endothelzelldifferenzierung diente ein Protokoll von Chiang und Wong (Chiang & Wong 2011). Dabei handelt es sich um eine direkte Differenzierung, die unter chemisch definierten Bedingungen (Wachstumsfaktoren, *small molecules*) ohne FKS abläuft. Da es sich bei diesem Protokoll um eine klonale Differenzierung handelt und eine andere Stammzelllinie verwendet wurde, wurde das Protokoll zunächst an die Stammzelllinie LF2 angepasst.

Um als Ausgangssituation für die Differenzierung möglichst einzelne Zellen zu haben und keine größeren Stammzellkolonien, da die Zell-Zell-Kontakte die Differenzierung stören können, wurden in Vorversuchen unterschiedliche Zelldichten ausgetestet. Eine sehr dünne Ausgangszelldichte von $0,15 \times 10^5$ Zellen/6-Well, erwies sich als geeignet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellen im Laufe der Endothelzelldifferenzierung auf mit Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen besser hafteten als auf Gelatine oder Collagen.

Nachdem den Stammzellen für zwei Tage LIF entzogen wurde, um die Differenzierung zu initialisieren, erfolgte zwei Tage später die Zugabe der Wachstumsfaktoren Activin A, Fgf2 (*basic fibroblast growth factor*), Bmp4 (*bone morphogenetic protein 4*) und eines Glykogensynthase-Kinase 3 Inhibitors (GSKI), um das mesodermale Schicksal der Zellen zu prägen. In einem dritten Schritt wurde die Differenzierung in die endotheliale Richtung gelenkt, indem dem Medium Vegf (*vascular endothelial growth factor*), Forskolin und ALKi (*activin receptor-like kinase receptor inhibitor*) zugesetzt wurden. Das adaptierte Differenzierungsprotokoll ist schematisch in Abbildung 3. 1 A dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendete Stammzelllinie LF2 wird in den folgenden Kapiteln nur noch als mESC bezeichnet.

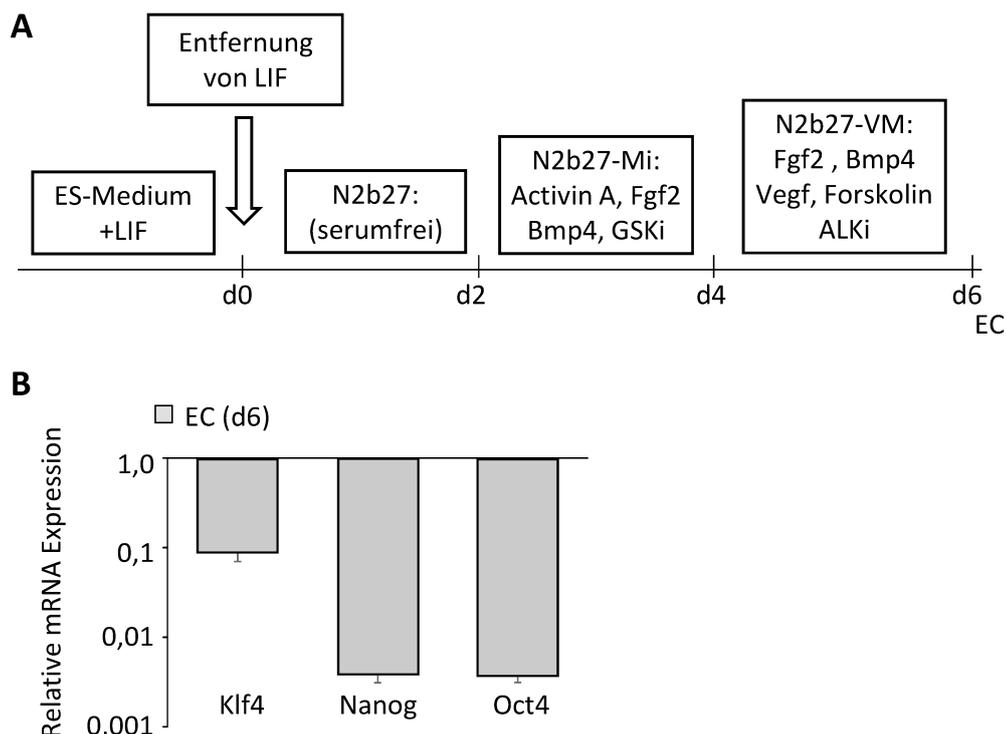


Abbildung 3. 1: Angepasstes Protokoll zur Differenzierung der Stammzelllinie LF2 in Endothelzellen.

A: Schematische Darstellung des verwendeten Differenzierungsprotokolls (modifiziert nach Chiang und Wong (Chiang & Wong 2011)). B: Quantitative Real-time PCR Analyse der Stammzellfaktoren Klf4, Nanog und Oct4. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Stammzellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 3, N = 3). LIF: *leukemia inhibitory factor*, N2b27: Präinkubationsmedium, N2b27-Mi: Mesoderminduktionsmedium, N2b27-VM: Endothelinduktionsmedium, Fgf2: *basic fibroblast growth factor*, Bmp4: *bone morphogenetic protein 4*, GSKi: Glykogensynthase-Kinase 3 Inhibitor, Vegf: *vascular endothelial growth factor*, ALKi: *activin receptor-like kinase receptor inhibitor*, EC: *endothelial cells*, Klf4: *kruppel like factor 4*, Nanog: *Nanog homeobox*, Oct4: *octamer binding transcription factor 4*, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Sechs Tage nach Beginn der Differenzierung waren die Stammzellfaktoren Klf4, Nanog und Oct4 verglichen mit den mESC herunterreguliert, was für einen differenzierten Zustand der Zellen spricht (Abbildung 3. 1 B).

3.1.1.1 Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen

Die Differenzierung der mESC in Endothelzellen ging mit deutlichen Veränderungen in der Morphologie der Zellen einher (Abbildung 3. 2 A). Sechs Tage nach Induktion der Differenzierung zeigten die Zellen eine für Endothelzellen typische kopfsteinpflasterförmige Morphologie (Abbildung 3. 2 B), wie sie auch H5V-Zellen (immortalisierte Maus Endothelzelllinie) und HUVECs (menschliche Endothelzelllinie isoliert aus Nabelschnurblut) aufweisen. Die aus den mESC abgeleiteten endothelähnlichen Zellen werden fortan als EC (*endothelial cells*; Endothelzellen) bezeichnet.

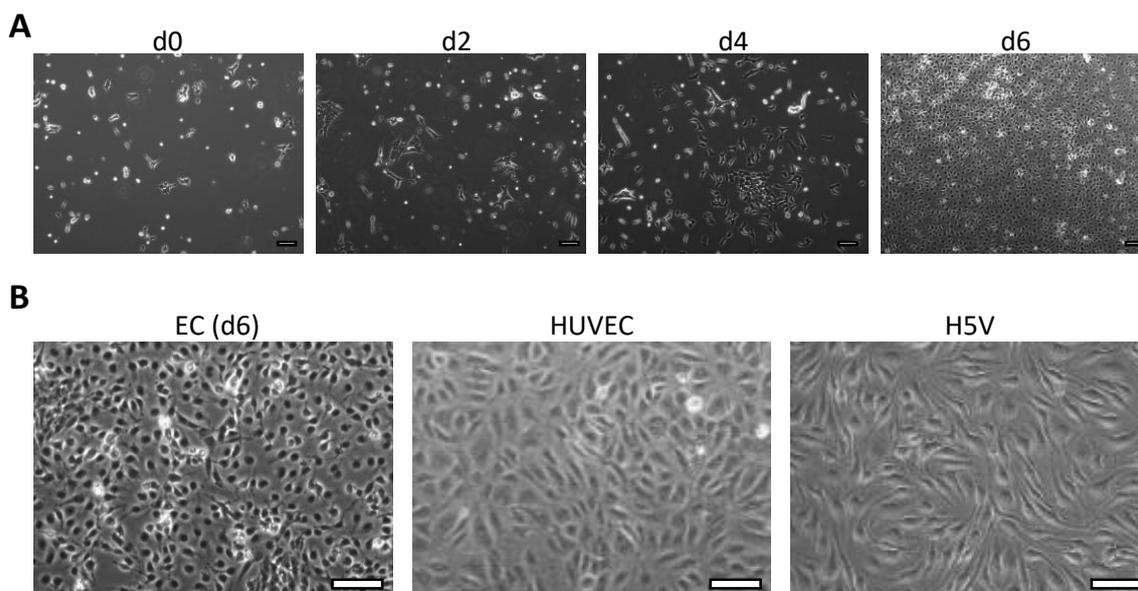


Abbildung 3. 2: Übergang von einer undifferenzierten Stammzelle in eine differenzierte Endothelzelle.

A: Dargestellt ist die Veränderung der Morphologie der Zellen nach Induktion der endothelialen Differenzierung. d0 nach Entzug von LIF, d2 - d4 nach Mesoderm-Induktion und d6 nach Endothel-Induktion. B: Phänotypen von Endothelzellen aus unterschiedlichen Quellen: H5V (immortalisierte Maus Endothelzelllinie), HUVEC (menschliche Endothelzelllinie isoliert aus Nabelschnurblut) und EC (die in dieser Arbeit aus mESC abgeleiteten Endothelzellen). Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . HUVEC: *human umbilical vein endothelial cell*, EC: *endothelial cell*, mESC: *mouse embryonic stem cells*.

Zur weiteren Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen wurden die Endothelzellmarker VE-Cadherin (*vascular endothelium cadherin*), Flk1 (*fetal liver kinase 1*) und Pecam1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) in Genexpressionsanalysen und immunzytochemischen Verfahren untersucht. In einigen Publikationen (Blancas et al. 2008; Glaser et al. 2011; Blancas et al. 2011) wurde beschrieben, dass eine Differenzierung in endotheliale Richtung auch zur Differenzierung von glatten Muskelzellen führt. Um auszuschließen, dass sich am Ende der Endothelzeldifferenzierung auch glatte Muskelzellen in der Zellpopulation befinden, wurde die Expression typischer glatter Muskelzellmarker ebenfalls analysiert.

Sechs Tage nach Induktion der Differenzierung waren die Endothelzellmarker in den aus mESC abgeleiteten EC im Vergleich zur undifferenzierten Stammzelle deutlich hochreguliert. Diese Hochregulation blieb in den drauf folgenden drei Tagen konstant, was ein geeignetes Zeitfenster für anschließende Versuche aufzeigt (Abbildung 3. 3 A). Zudem war der venöse Marker Ephb4 (*ephrin type-B receptor 4*) deutlich stärker exprimiert als der arterielle Marker Efnb2 (Ephrin B2) (Abbildung 3. 3 B). Zusätzlich zeigte sich keine Hochregulation der glatten Muskelzellmarkergene αSMA (*alpha smooth muscle actin*) und Calponin. Diese Befunde zeigen deutlich, dass das verwendete Differenzierungsprotokoll spezifisch für eine EC Differenzierung ist.

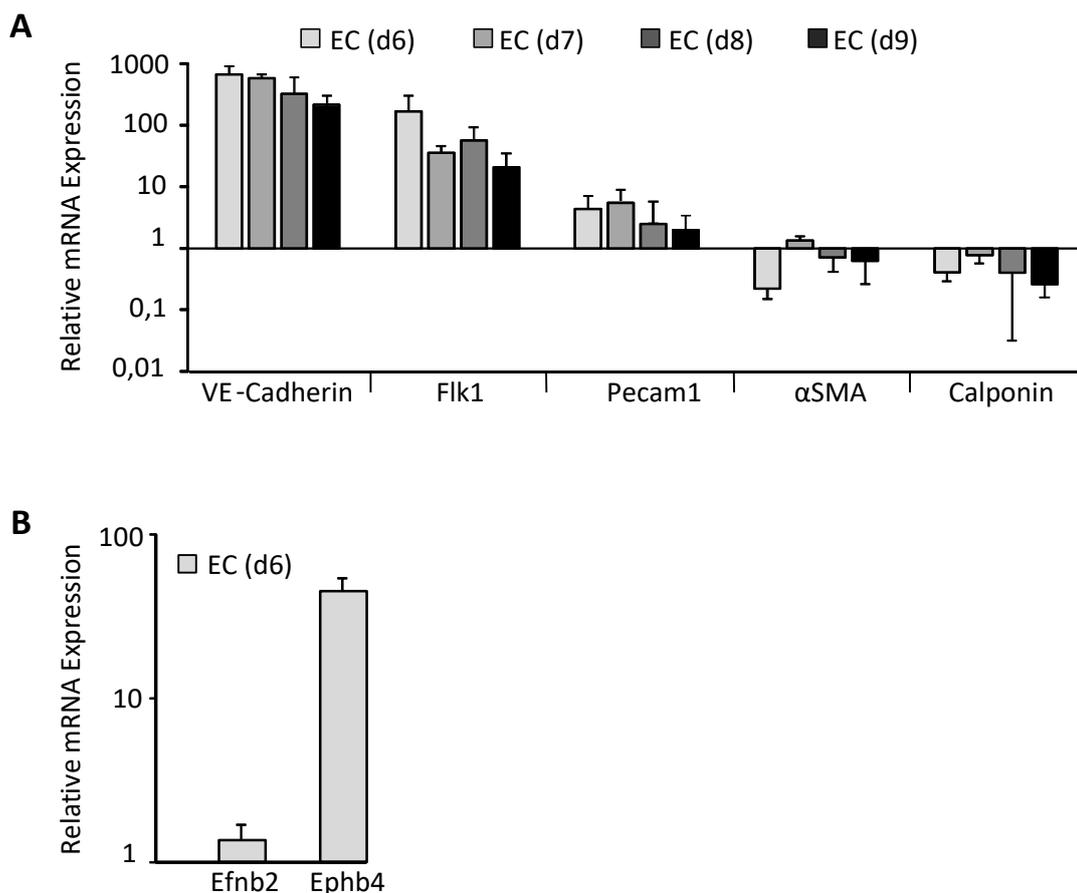


Abbildung 3. 3: Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen auf mRNA Ebene.

A: Quantitative Real-time PCR Analyse der Endothelzellmarker VE-Cadherin, Flk1 und Pecam1 und der glatten Muskelzellmarker α SMA und Calponin. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde ($n \geq 3$, $N = 2$). B: Quantitative Real-time PCR Analyse des venösen Endothelzellmarkers Ephb4 und des arteriellen Markers Efnb2. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde ($n \geq 3$, $N = 2$). EC: *endothelial cells*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelium cadherin*, α SMA: *alpha smooth muscle actin*, Efnb2: Ephrin B2, Ephb4: *ephrin type-B receptor 4*, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Auch auf Proteinebene konnte die Expression der Endothelzellmarker FLK1, VE-Cadherin und PECAM1 in den differenzierten EC nachgewiesen werden. Die undifferenzierten Stammzellen zeigten keine oder eine sehr schwache Expression dieser Gene (Abbildung 3. 4).

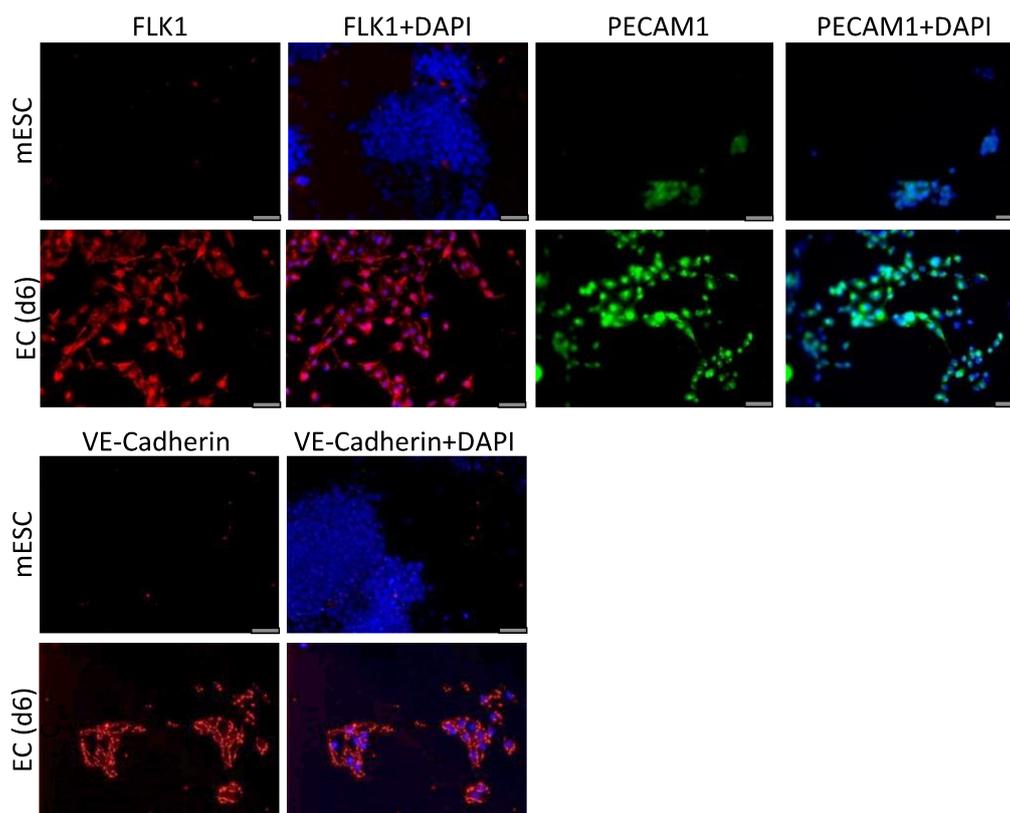


Abbildung 3. 4: Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen auf Proteinebene.

Immunzytochemische Analysen der Proteinexpression von FLK1, VE-Cadherin und PECAM1 an Tag 6 der Endothelzellendifferenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . Die Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. FLK1: *fetal liver kinase 1*, PECAM1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelium cadherin*, DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol, EC: *endothelial cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*.

3.1.1.2 Funktionelle Analysen der differenzierten Endothelzellen

Um genauer zu analysieren, ob die aus Stammzellen abgeleiteten Endothelzellen auch funktionell aktiv sind, wurden typische Fähigkeiten von Endothelzellen an ihnen untersucht. Von humanen Endothelzellen ist bekannt, dass die mRNA Expression von Adhäsionsmolekülen im Rahmen der Immunantwort als Folge einer Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen hochreguliert wird (Carlos & Harlan 1994; Peltz 1993). In Abbildung 3. 5 wird gezeigt, dass auch die Behandlung der aus Stammzellen abgeleiteten EC mit einem Zytokincocktail aus IL1 β (Interleukin 1 beta) und TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) zu einer Hochregulation der mRNA Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, Icam1 (*intercellular adhesion molecule 1*), der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und Nos3 (*nitric oxide synthase 3, endothelial cells*) innerhalb von 1 h führte. Gleiches konnte durch ionisierende Strahlung (5 Gy) ausgelöst werden, was ebenfalls für humane EC (HUVEC) *in vitro* beschrieben ist (Nübel et al. 2004).

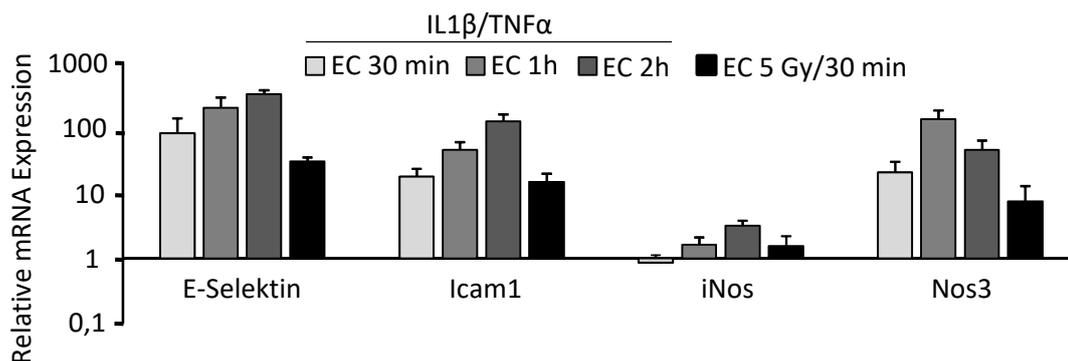


Abbildung 3. 5: Regulation der mRNA Expression von E-Selektin, Icam1, iNos und Nos3 in den differenzierten Endothelzellen nach Stimulation mit Zytokinen.

Die aus Stammzellen abgeleiteten Endothelzellen (EC) wurden mit einem Cocktail aus IL1 β und TNF α (10 ng/ml) behandelt. 30 min, 1 h und 2 h nach Zytokingabe wurde die Expression von E-Selektin, Icam1, iNos und Nos3 mittels quantitative Real-time PCR Analyse bestimmt. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der nicht behandelten Zellen bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde (n = 3, N = 2). Zur Kontrolle wurden die EC mit 5 Gy bestrahlt und die Expression der Gene 30 min später analysiert. EC: *endothelial cells*, E-Selektin: *endothelial selectin*, Icam1: *intercellular adhesion molecule 1*, iNos: *inducible nitric oxide synthases*, Nos3: *nitric oxide synthase 3, endothelial cells*, IL1 β : *Interleukin 1 beta*, TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*, Gapdh: *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*.

Der zelluläre Cholesterin Metabolismus und das Cholesterin Plasmalevel werden durch eine rezeptorvermittelte *low-density* Lipoprotein (LDL) Aufnahme reguliert, zu der spezifische Zellen fähig sind, zu denen unter anderem Endothelzellen gehören (Voyta et al. 1984). Die Aufnahme von LDL kann mit einem acetylierten *low-density* Lipoprotein Dil (Dil-Ac-LDL) Komplex sichtbar gemacht werden. Das in die lysosomalen Membranen der Endothelzellen aufgenommene Dil-Ac-LDL zeigt sich im Fluoreszenzlicht rot leuchtend. Des Weiteren wird oft ein Lektin-Marker, das UEA-1 (Ulex europaeus-Lektin Typ 1), zur Identifizierung von Endothelzellen verwendet (Sun et al. 2009; Jackson et al. 1990). Die EC waren sowohl dazu in der Lage LDL aufzunehmen als auch Lektin zu binden (Abbildung 3. 6 A). Die undifferenzierten Stammzellen hingegen besaßen diese Fähigkeiten nicht.

Außerdem wurde die Fähigkeit der differenzierten Zellen gefäßähnliche Strukturen (*Tubes*) auszubilden mittels eines Tube Formation-Assays untersucht. Die Gefäßbildung stellt eine weitere prototypische Funktion von Endothelzellen dar (Vishnubalaji et al. 2012; Hudon et al. 2003). Auch hierzu waren die differenzierten EC in der Lage, wohingegen die undifferenzierten Stammzellen keine solche gefäßähnlichen Strukturen ausbilden konnten (Abbildung 3. 6 B und C).

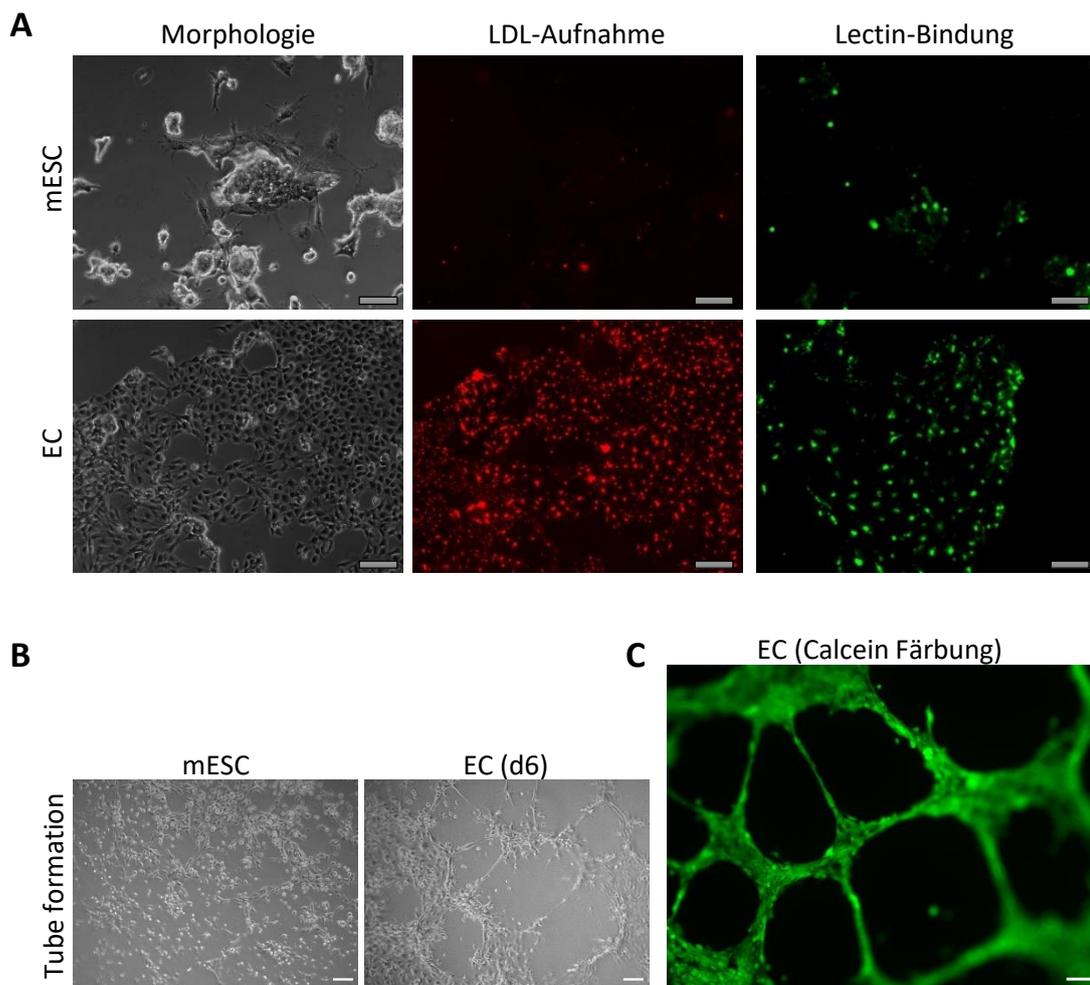


Abbildung 3. 6: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen.

A: Die Fähigkeit der aus mESC abgeleiteten EC zur LDL-Aufnahmen und Lektin-Bindung (UEA-1) wurde analysiert und mit den undifferenzierten Stammzellen (mESC) verglichen. B: Um das angiogenetische Potential der EC zu analysieren wurde ein Tube Formation-Assay durchgeführt und mit den Stammzellen verglichen. C: Vergrößerte Darstellung der gebildeten Tubes. Die Zellen wurden mit Calcein angefärbt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen aus $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . EC: *endothelial cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, LDL: *low density lipoprotein*.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass durch das adaptierte Differenzierungsprotokoll aus der Stammzelllinie LF2 funktionell kompetente endothelähnliche Zellen abgeleitet werden konnten.

3.1.2 Glatte Muskelzellendifferenzierung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben folgt auf die aus Endothelzellen bestehende innere Gewebeschicht eines Blutgefäßes (Tunica intima) die Tunica media. Diese mittlere Schicht reguliert die Weite des Gefäßes durch gezielte Muskelkontraktionen und besteht aus glatten Muskelzellen (SMC) sowie Collagenfasern und elastischen Fasern, welche ringförmig angeordnet sind. Da die SMC ebenfalls essentiell für die Aufrechterhaltung der Funktion in Blutgefäßen sind und ebenso wie Endothelzellen, aufgrund ihrer Barrierefunktion einer stetigen Exposition mit Noxen ausgesetzt sind, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, auch diesen Zelltyp zu generieren. Die Zielsetzung war es,

eventuelle Unterschiede in der Regenerations- und Reparaturfähigkeit dieser beiden Zelltypen identifizieren zu können. Aus verschiedenen Publikationen geht hervor, dass EC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu SMC transdifferenzieren können (Coll-Bonfill et al. 2015; DeRuiter et al. 1997). Um die EC zu transdifferenzieren wurden die Zellen an Tag 9 vereinzelt und auf gelatinebeschichtete 6- Wells ausplattiert. Das Differenzierungsschema ist in Abbildung 3. 7 dargestellt. Durch die Veränderung des Mediums und die Zugabe der Wachstumsfaktoren Igf1 (*insulin-like growth factor 1*), Egf (*epidermal growth factor*) und Tgf β (*transforming growth factor, beta 1*) sollten die Zellen dazu angeregt werden in glatte Muskelzellen zu differenzieren. Die aus den EC transdifferenzierten glatten muskellähnlichen Zellen werden fortan als SMC bezeichnet.

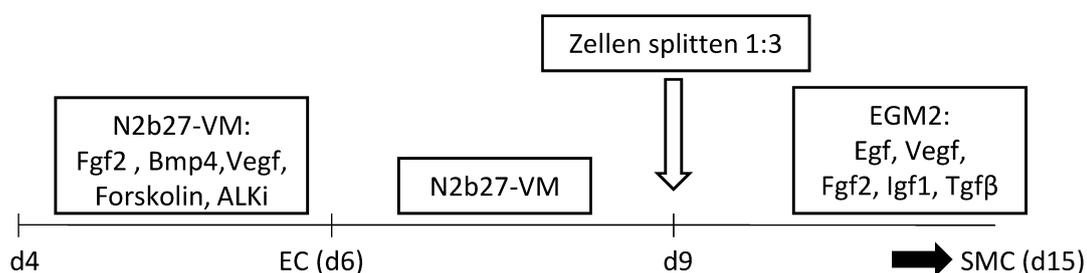


Abbildung 3. 7: Protokoll zur Transdifferenzierung aus Stammzellen abgeleiteter Endothelzellen in glatte Muskelzellen.

Schematische Darstellung des verwendeten Protokolls zur Transdifferenzierung von EC in SMC.

N2b27-VM: Endothelinduktionsmedium, Fgf2: *basic fibroblast growth factor*, Bmp4: *Bone morphogenetic protein 4*, Vegf: *Vascular endothelial growth factor*, ALKi: *activin receptor-like kinase receptor inhibitor*, EGM2: glattes Muskelzellendifferenzierungsmedium, Egf: *epidermal growth factor*, Igf1: *insulin-like growth factor 1*, Tgf β : *transforming growth factor, beta 1*, EC: *endothelial cells*, SMC: *Smooth muscle cells*.

3.1.2.1 Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen

Die Transdifferenzierung der EC in SMC ging erneut mit deutlichen Veränderungen in der Morphologie der Zellen einher. Der Übergang einer Endothelzelle in eine glatte Muskelzelle ist in Abbildung 3. 8 A schematisch dargestellt. Glatte Muskelzellen lassen sich ebenfalls durch die Expression bestimmter Markergene identifizieren. Sechs Tage nach Induktion der Transdifferenzierung (d15) zeigte ein Großteil der Zellen eine für den kontraktilen Phänotyp der glatten Muskelzellen typische spindelförmige Morphologie (Abbildung 3. 8 C). In der Vergrößerung wird deutlich, dass das in dieser Arbeit verwendete Differenzierungsprotokoll zu einer Mischpopulation der glatten Muskelzellen führte. Es fanden sich in der SMC Kultur auch Zellen mit einem synthetischen Phänotyp. Diese Zellen sind deutlich größer und flacher als die kontraktilen SMC (Abbildung 3. 8 C).

Da eine vergrößerte Morphologie auch ein Hinweis auf seneszente Zellen sein kann und die Zellen nach 21 Tagen in Kultur kaum noch proliferierten, wurde ein β -Galaktosidase Assay durchgeführt,

um seneszente Zellen zu detektieren. Seneszente Zellen verharren in der G₁-Phase des Zellzyklus, die S-Phase wird also nicht mehr erreicht. Die Zellen erhalten zwar ihr Funktion aufrecht, teilen sich aber nicht mehr. Sie haben ihre spezielle endgültige physiologische Funktion übernommen. Die seneszenten Zellen sind dann auch gegen den programmierten Zelltod, die Apoptose, resistent (Clark & Pazdernik 2009). Wären die in Kultur gehaltenen SMC seneszent, wären nachfolgende Untersuchungen zur DNA-Schadensinduktion und Reparaturfähigkeit weniger aussagekräftig. Der Nachweis von seneszenten Zellen erfolgte über eine Umsetzung von X-Gal durch Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase bei pH6 und anschließender Oxidation des Produkts, wodurch ein Indigo-Farbstoff entsteht. Anhand der geringen Färbung in Abbildung 3. 8 B ist zu erkennen, dass so gut wie keine der transdifferenzierten SMC den Seneszenzmarker β -Galaktosidase exprimierten. Es handelt sich bei den größeren Zellen also nicht um seneszente Zellen. Als Kontrolle ist die Induktion der Seneszenz anhand der β -Galaktosidase Expression in humanen Endothelzellen (EA.hy926) gezeigt, drei Tage nachdem sie mit 10 Gy bestrahlt wurden, da bekannt ist, dass sie nach einer solchen Behandlung seneszent werden. Im Vergleich zu den SMC ist bei den EA.hy926 in Abbildung 3. 8 B deutlich eine dunkle Färbung der Zellen zu erkennen.

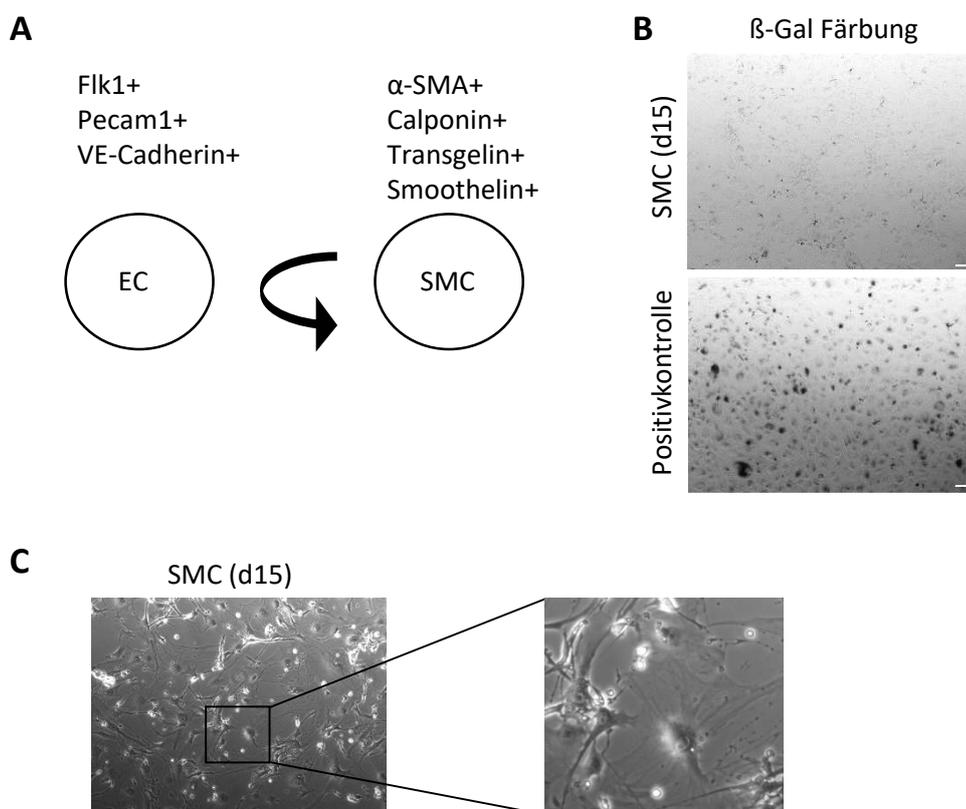
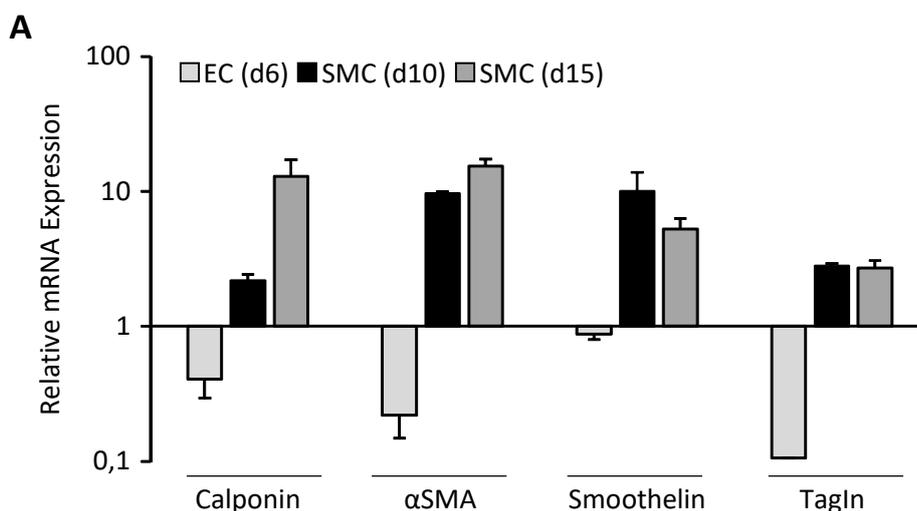


Abbildung 3. 8: Transdifferenzierung aus mESC abgeleiteter EC in glatte Muskelzellen (SMC).

A: Schematische Darstellung des Übergangs von EC in SMC. Marker, die gewöhnlich benutzt werden um den jeweiligen Zelltyp zu identifizieren, sind über jeder Zelle aufgeführt. B: 21 Tage nach Induktion der Differenzierung wurden die Zellen auf Seneszenz untersucht. Als Kontrolle ist die Induktion der Seneszenz

anhand der β -Galaktosidase Expression in humanen Endothelzellen (EA.hy926) gezeigt, drei Tage nachdem sie mit 10 Gy bestrahlt wurden (Positivkontrolle). C: Morphologie der SMC an Tag 15 der Differenzierung. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass sich sowohl kontraktile als auch synthetische SMC in der Zellpopulation befinden. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μ m. EC: *endothelial cells*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelium cadherin*, SMC: *smooth muscle cells*, α SMA: *alpha smooth muscle actin*, β -Gal: *beta-galactosidase*.

Zur weiteren Charakterisierung der differenzierten SMC wurde die Expression der glatten Muskelzellmarker Calponin, Smoothelin und Transgelin in Genexpressionsanalysen und von α SMA sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene untersucht. 10 und 15 Tage nach Induktion der Differenzierung zeigten die aus EC abgeleiteten SMC eine deutliche Hochregulation der glatten Muskelzellmarker im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen. In den EC hingegen waren diese Marker nicht hochreguliert (Abbildung 3. 9 A). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die SMC im Vergleich zu differenzierten EC verstärkt Mmp1 (*matrix metalloproteinase 1*) und Icam1 exprimierten, was ein charakteristisches Merkmal des synthetischen Phänotyps der SMC darstellt. Außerdem exprimierten sie Mmp3 (*matrix metalloproteinase 3*) und Mmp7 (*matrix metalloproteinase 7*) was ebenfalls ein Merkmal des synthetischen Phänotyps ist. Zwar war diese Expression schwächer als in den undifferenzierten Stammzellen, allerdings konnte in den EC eine Expression von Mmp3 oder Mmp7 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3. 9 B). Diese Daten bestätigen, dass das in dieser Arbeit verwendete Differenzierungsprotokoll zu einer SMC Population führt, in der sich sowohl kontraktile als auch synthetische SMC befinden (Abbildung 1. 2).



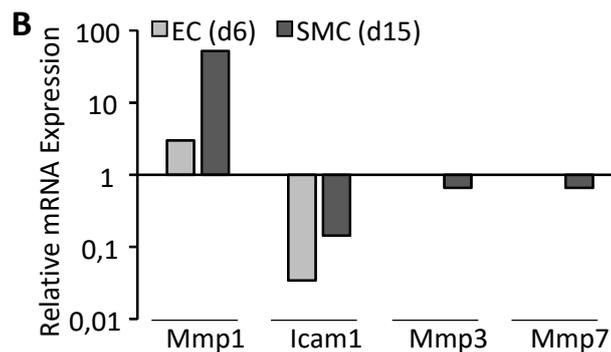


Abbildung 3. 9: Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen.

A: Quantitative Real-time PCR Analyse der glatten Muskelzellmarker Calponin, α SMA, Smoothelin und Tagln in EC (d6) und SMC (d15). Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichungen ($n = 3$, $N = 2$). B: Quantitative Real-time PCR Analyse von Mmp1, Icam1, Mmp3 und Mmp7 in EC (d6) und SMC (d15). Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde. ($n = 2$, $N = 1$). SMC: *smooth muscle cells*, α SMA: *alpha smooth muscle actin*, Tagln: *Transgelin*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, EC: *endothelial cells*, Mmp1: *matrix metalloproteinase 1*, Icam1: *intercellular adhesion molecule 1*, Mmp3: *matrix metalloproteinase 3*, Mmp7: *matrix metalloproteinase 7*, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Auch auf Proteinebene konnte die Expression des glatten Muskelzellmarkers α SMA nachgewiesen werden. Undifferenzierte Stammzellen und EC hingegen exprimierten α SMA nicht. In der Vergrößerung in Abbildung 3. 10 lassen sich die einzelnen Aktinfilamente in den SMC deutlich erkennen.

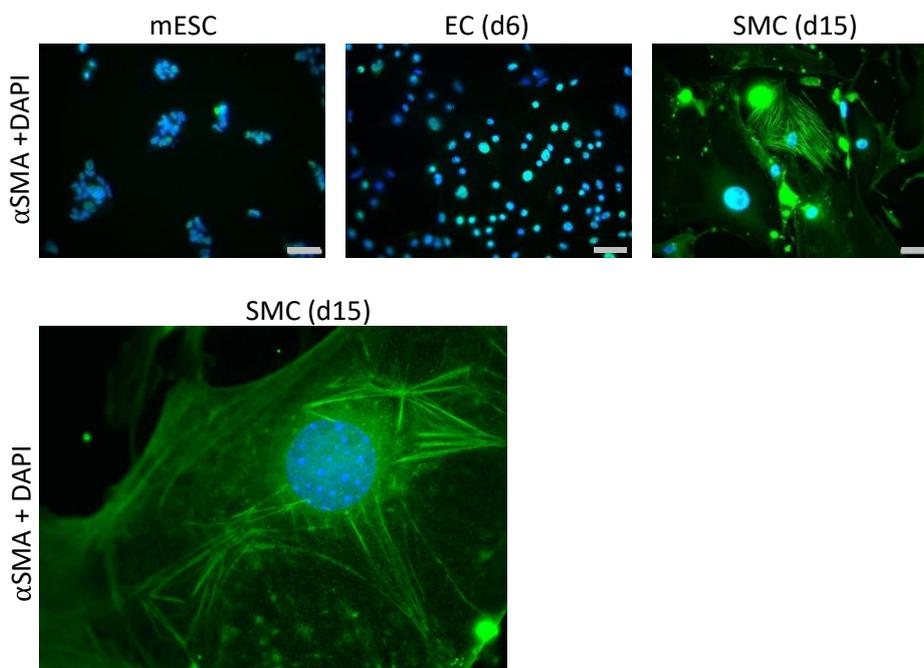


Abbildung 3. 10: α SMA Expression der differenzierten glatten Muskelzellen.

Immunzytochemische Analysen der Proteinexpression von α SMA an Tag 15 der glatten Muskelzelldifferenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Stammzellen und Endothelzellen. Die Zellkerne

wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . Im unteren Bild ist eine vergrößerte SMC dargestellt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. SMC: *smooth muscle cells*, αSMA : *alpha smooth muscle actin*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, EC: *endothelial cells*, DAPI: *4',6-Diamidin-2-phenylindol*.

3.1.2.2 Funktionelle Analysen der differenzierten glatten Muskelzellen

Die Hauptaufgabe der glatten Muskulatur in Blutgefäßen besteht in der Regulation des Blutdruckes. Dies erreichen sie durch ihre Fähigkeit zur Kontraktion. Die Kontraktion der glatten Muskulatur kann durch verschiedenen Mechanismen ausgelöst werden, welche fast alle einen Anstieg in der intrazellulären Calciumkonzentration bewirken. Unter anderem reagieren rezeptorgesteuerte Calciumkanäle auf Botenstoffe wie Noradrenalin, Acetylcholin, Angiotensin oder Histamin und öffnen sich (Pharmakomechanische Kopplung). Ein Anstieg in der intrazellulären Calciumkonzentration kann auch durch die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle ausgelöst werden. Dies geschieht durch Aktionspotentiale oder länger anhaltende Depolarisation der Zellmembran (Elektromechanische Kopplung) (Wynne et al. 2009). Außerdem sind inzwischen einige Calciumkanal-unabhängige Signalwege zur Kontraktion in glatten Muskelzellen beschrieben worden, von denen einer durch Endothelin aktiviert wird, welches seine Effekte über G-Proteingekoppelte Rezeptoren vermittelt (Wynne et al. 2009).

Daher wurden die SMC hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kontraktion genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Calcium-Assay durchgeführt. Diese Methode wurde von Lin et al. beschrieben und durch Kassack et al. weiterentwickelt (Lin et al. 1999; Kassack et al. 2002). Dabei werden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green[®] 488 BAPTA-1/AM beladen, der nach Spaltung des Acetoxymethyl-(AM)-Esters Ca^{2+} binden kann und dadurch seine Fluoreszenz verstärkt. Dabei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration. Abbildung 3. 11 A zeigt den intrazellulären Calciumanstieg in den SMC nach Stimulation mit den Agonisten Carbachol und Endothelin. Bei Carbachol handelt es sich um ein Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin, welches wesentlich stabiler ist und daher in diesem Experiment stellvertretend eingesetzt wurde. Es ist zu erkennen, dass sowohl Carbachol als auch Endothelin zu einem Anstieg in der intrazellulären Calciumkonzentration der SMC führten. Die alleinige Zugabe des Versuchspuffers (Negativkontrolle ohne Agonisten) hingegen führte nur zu einem schwachen Anstieg. Um die Kontraktion zu visualisieren und auch die elektromechanische Kopplung nachzuweisen, wurden die Zellen mit KCl stimuliert und Zeitrafferaufnahmen in 10 s Intervallen angefertigt. In Abbildung 3. 11 B sind die Zellen vor der Zugabe von KCl (links) und 30 min nach der Inkubation mit KCl (rechts) dargestellt. In der Vergrößerung lässt sich ein deutliches Zusammenziehen der einzelnen Zellen erkennen. Auch konnte man in diesem Versuch sehen, dass

sich nur Zellen mit einem kontraktilem Phänotyp zusammenziehen. Die gleichzeitige Gabe von EDTA konnte die Kontraktion der glatten Muskelzellen verhindern.

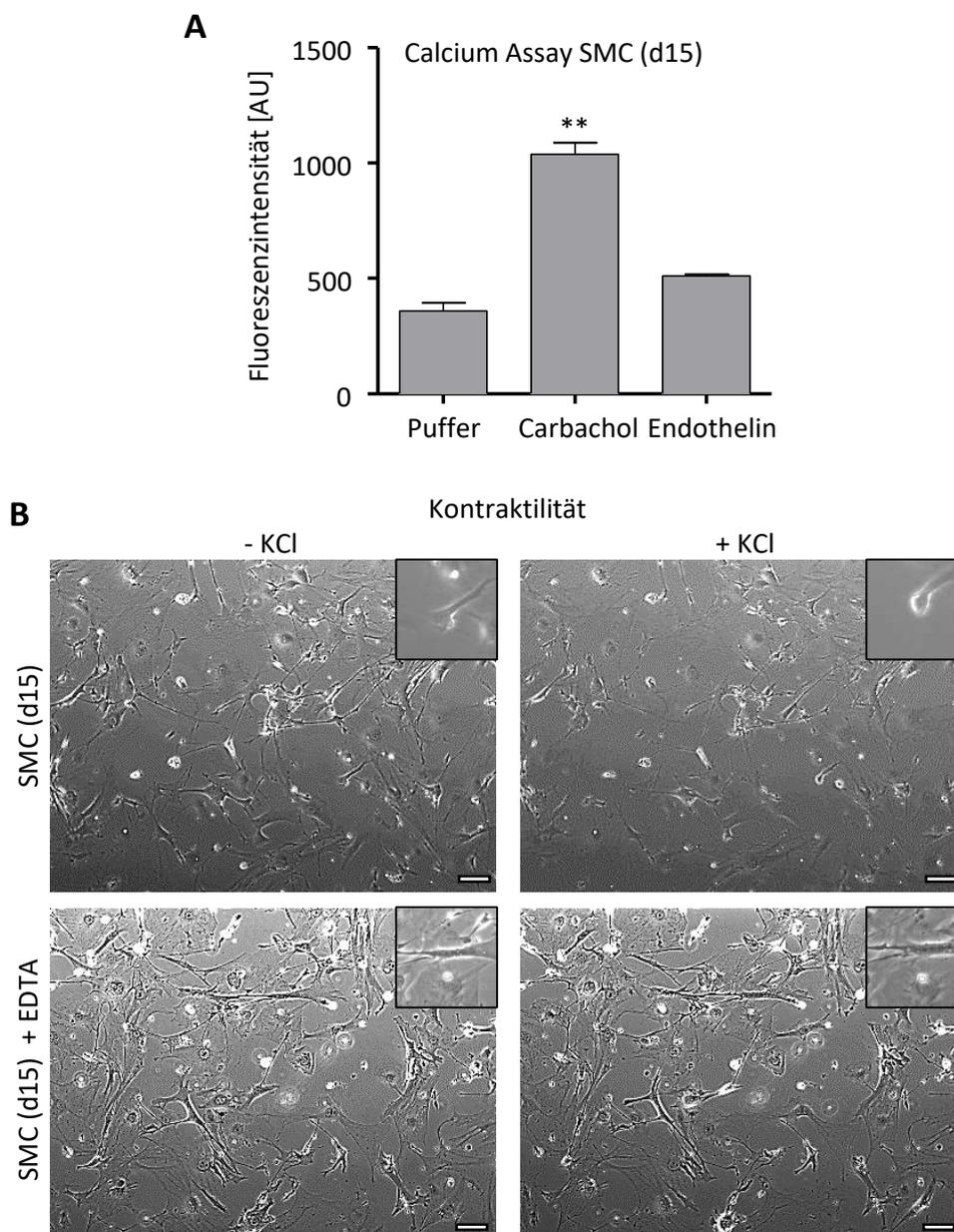


Abbildung 3. 11: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen.

A: An Tag 15 der Differenzierung wurden die SMC mit Carbachol (316 μM) und Endothelin (50 nM). Anschließend wurde der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration anhand der Fluoreszenz Intensität [AU] detektiert ($n = 3$, $N = 3$). ** $p \leq 0,01$ (Puffer verglichen mit Carbachol). B: SMC (d15) wurden 30 min mit 50 mM Kaliumchlorid (KCl) behandelt. Es wurden Aufnahmen der Zellen in 10 s Intervallen gemacht. Dabei ist ein Zusammenziehen der Zellen (Kontraktion) zu beobachten ($n = 2$). Die Kontraktion konnte durch die Zugabe von EDTA (2,5 mM) verhindert werden. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . AU: *arbitrary units*, SMC: *smooth muscle cells*, KCl: Kaliumchlorid, EDTA: Ethylendiamintetraacetat.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass es gelungen ist funktionell kompetente SMC zu generieren, welche SMC spezifische Markergene exprimieren, nach einer Stimulation mit Carbachol oder Endothelin Calcium freisetzen und die Fähigkeit zur Kontraktion besitzen.

In den folgenden Versuchen wurden diese aus den Stammzellen abgeleiteten Zelltypen zunächst auf ihre Expression von Genen, die in Zusammenhang mit der DNA-Reparatur, der Zellzyklusregulation und dem Zelltod stehen, untersucht und anschließenden Toxizitätsanalysen unterzogen. Die hier aufgeführten Versuche zur Analyse der Funktionalität dienten in den folgenden Experimenten dazu, zu überprüfen, ob bestimmte Genotoxine einen Einfluss auf die Differenzierung in funktionell kompetente Zelltypen haben.

3.2 ANALYSEN ZUR DNA-SCHADENSINDUKTION UND DNA-REPARATUR

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, dass sich funktionell kompetente EC und SMC differenzieren lassen, sollten nun untersucht werden, ob sie sich untereinander in ihrem Genexpressionsmuster von Suszeptibilitätsfaktoren, welche in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und den Zelltod involviert sind, unterscheiden.

Zu diesem Zweck wurde ein 96-Well basierender Real-time PCR Array verwendet, welcher von unserer Arbeitsgruppe entworfen wurde (Fritz et al. 2011) und zunächst die basale, nicht durch Genotoxine induzierte Expression dieser Suszeptibilitätsfaktoren in mESC, EC und SMC ermittelt (Abschnitt 3.2.1). In weiteren Versuchen sollte dann festgestellt werden, ob die Expression solcher Suszeptibilitätsfaktoren durch Bestrahlung oder Doxorubicin induziert wird (Abschnitt 3.2.2).

3.2.1 Erfassung basaler differentiell exprimierter Suszeptibilitätsfaktoren

Es konnten differentiell exprimierte Gene zwischen mESC, EC und SMC nachgewiesen werden, welche im Venn-Diagramm in Abbildung 3. 12 A aufgeführt sind. Nach Endotheldifferenzierung wurden 29 Gene und nach glatter Muskelzelldifferenzierung 19 Gene im Vergleich zur undifferenzierten mESC hochreguliert, wovon 15 identisch waren. Herunterreguliert wurden nach der Differenzierung 15 Gene in EC und 42 in SMC, wovon 10 Gene in beiden Differenzierungen betroffen waren.

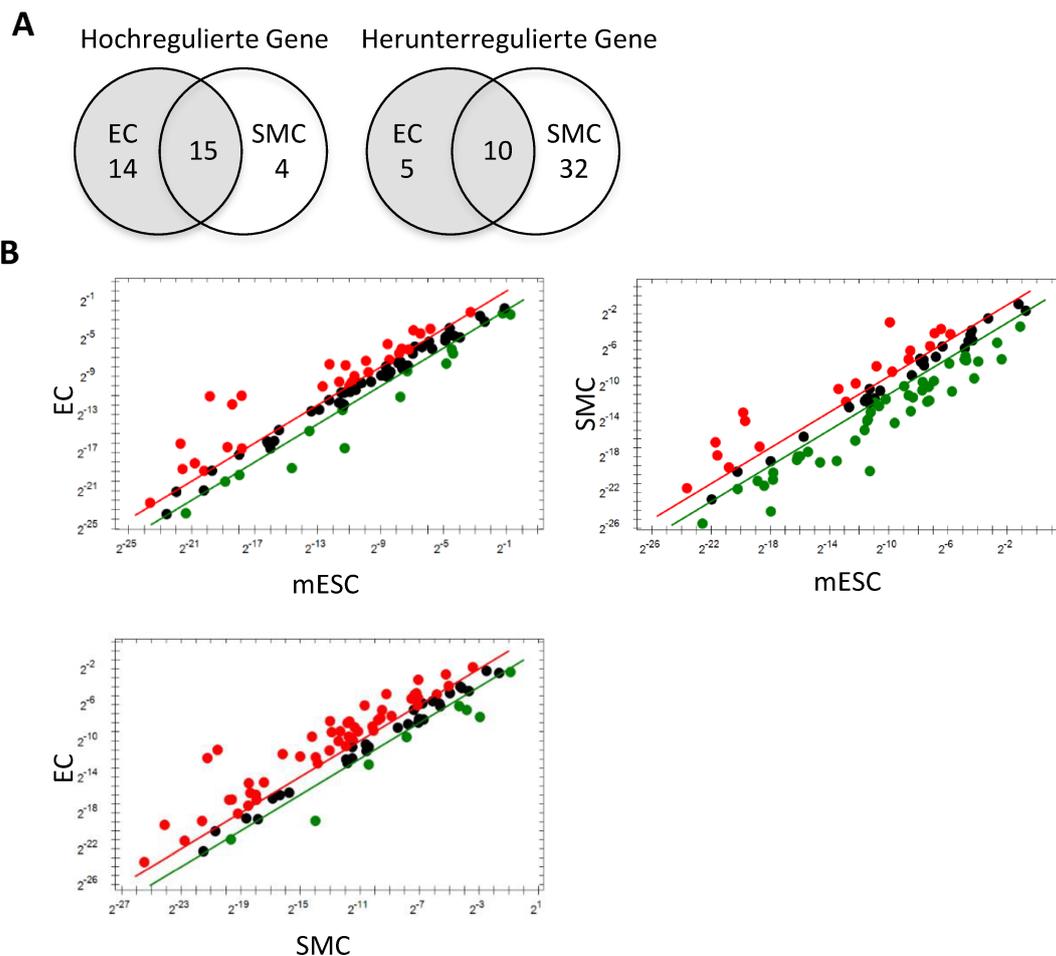


Abbildung 3. 12: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von Suszeptibilitätsfaktoren.

Die mRNA Expression von 94 ausgewählten Genen (Fritz et al. 2011), welche die Sensitivität von Zellen gegenüber Genotoxinen beeinflussen und in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und den Zelltod involviert sind, wurde mittels quantitativer Real-time PCR unter Verwendung eines zu diesem Zweck entwickelten PCR-Arrays analysiert. Gezeigt sind die basalen Unterschiede in der mRNA Expression zwischen mESC, EC und SMC. Nur Expressionsveränderungen ≥ 2 (rote Punkte/Linie) bzw. $\leq 0,5$ (grüne Punkte/Linie) wurden als biologisch relevant betrachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. A: Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene in EC und SMC zusammen oder alleine im Vergleich zu den undifferenzierten mESC. Die mRNA Expression wurde auf mehrere Housekeeping-Gene (Gapdh und β -Aktin) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde. B: Streudiagramme der gefundenen Unterschiede zwischen mESC und EC, mESC und SMC und zwischen EC und SMC (in diesem Falle wurde die Expression der SMC auf 1,0 gesetzt). EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*.

Die differentiell exprimierten Gene sind in der nachfolgenden Tabelle 3. 1 namentlich aufgelistet.

Tabelle 3. 1: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von Suszeptibilitätsfaktoren.

In der Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene aus Abbildung 3. 12 A aufgelistet. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

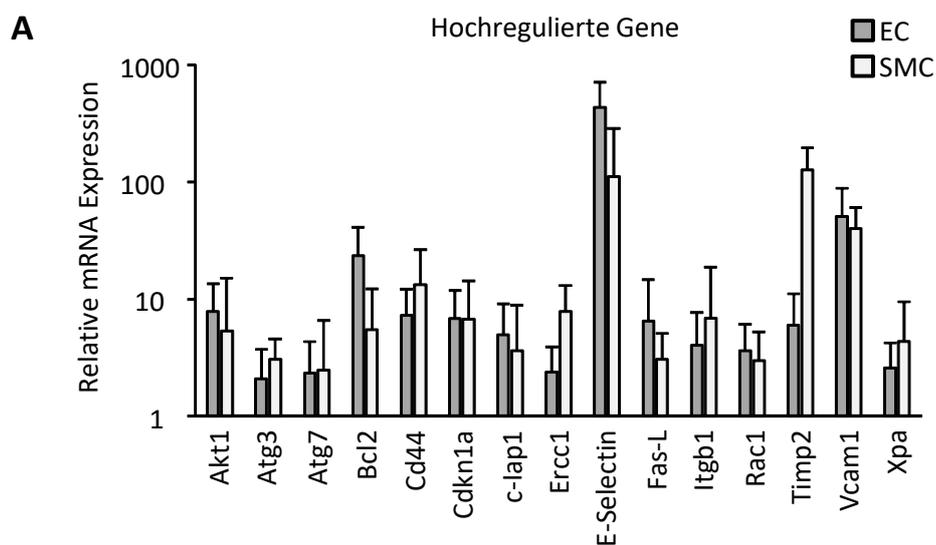
Hochregulierte Gene			Herunterregulierte Gene		
EC + SMC	EC	SMC	EC + SMC	EC	SMC
Akt1	Beclin1	Fas-R	CyclinA1	Ddit3	Atf2
Atg3	Caspase2	Fos	CyclinE1	Gadd45a	Atm
Atg7	C-Jun	Mdm2	Ddb2	Lamp1	Brca1
Bcl2	Cxcr4	Mmp1	Gstm1	Gpx1	Brca2
Cd44	Cyp1A1		Icam1	Trp73	Caspase2
p21 ^{WAF1/CIP1}	Il12a		Msh2		Cdc25a
c-lap1	Hif1a		Pole		Cdkn1b
Ercc1	Lig4		Rad51		Chk1
E-Selektin	Nos3		Trp63		Chk2
Fas-L	Pten		Wee1		Cxcr4
Itgb1	RhoA				CyclinB1
Rac1	Tiam				Cyp1A1
Timp2	Topo2b				Elk1
Vcam1	Xrcc4				Fancc
Xpa					Fen1
					Hsp90
					Hus1
					Il12a
					Lig1
					Mre11a
					Nox1
					Pcna
					Pold1
					Rev1
					Sod1
					Tiam1
					Topo2a
					Trp53
					Wrn
					Xpc
					Xrcc1
					Xrcc4

Unter diesen 15 gemeinsam hochregulierten Genen (Abbildung 3. 12 A, Abbildung 3. 13 A, Tabelle 3. 1 und Tabelle 3. 2) fanden sich unter anderem die Gene Ercc1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) und Xpa (*Xeroderma pigmentosum, complementation group A*). Diese codieren für Faktoren, die in die DNA-Reparatur

über die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) involviert sind. Des Weiteren wurde die Gene Fas-L (*fas ligand*), c-lap1 (*baculoviral IAP repeat-containing 3*), Bcl2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*) und Akt1 (*thymoma viral proto-oncogene 1*), die eine Rolle während der Apoptose spielen und Atg3 (*autophagy related 3*) und Atg7 (*autophagy related 7*), welche in die Regulation der Autophagie involviert sind, gemeinsam hochreguliert.

Ebenfalls hochreguliert wurden Gene, die wichtig sind für eine transendotheliale Migration von Zellen, namentlich Rac1 (*RAS-related C3 botulinum substrate 1*), Itgb1 (*integrin beta 1*) und Vcam1 (*vascular cell adhesion molecule 1*). Sowie Gene, die für Adhäsionsprozesse bedeutsam sind, wie Itgb1, E-Selektin und Vcam1.

Unter den 10 gemeinsam herunterregulierten Genen (Abbildung 3. 12 A, Abbildung 3. 13 B, Tabelle 3. 1 und Tabelle 3. 2) fanden sich Gene, die ebenfalls für Proteine codieren, die in die DNA-Reparatur durch NER (*Ddb2, damage specific DNA binding protein 2*) involviert sind, aber auch Gene der Mismatch-Reparatur (MMR, *Msh2 (MutS homolog 2)*) und der Homologen Rekombination (HR, *Rad51 (RAD51 homolog)*). Ebenfalls wurden Gene, die eine Rolle während der Zellzyklusregulation spielen, im Verlauf beider Differenzierungsvorgänge herunterreguliert (*CyclinA1, CyclinE1, Wee1 (WEE 1 homolog 1)*). Eine Zuordnung der regulierten Gene zu bestimmten Signalwegen wurde in Tabelle 3. 2 vorgenommen.



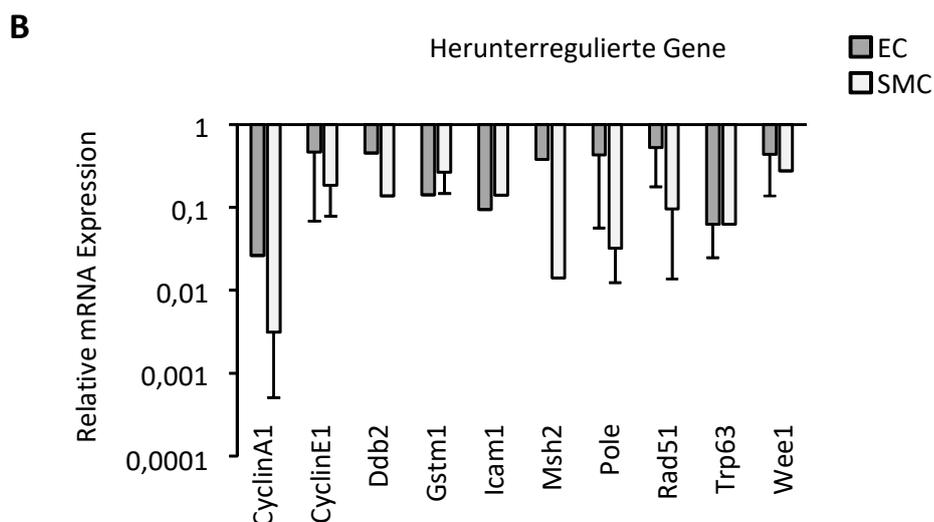


Abbildung 3. 13: Gene, die in beiden Differenzierungen einheitlich reguliert wurden.

Die mRNA Expression von 94 ausgewählten Genen, welche die Sensitivität von Zellen gegenüber Genotoxinen beeinflussen, wurde mittels quantitativer Real-time PCR und einem, speziell zu diesem Zweck entwickelten PCR-Array analysiert. Gezeigt sind die basalen Unterschiede in der mRNA Expression zwischen mESC, EC und SMC. Nur Expressionsveränderungen ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$ wurden als biologisch relevant betrachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. A: In beiden Differenzierungen (EC und SMC) hochregulierte Gene. B: In beiden Differenzierungen (EC und SMC) herunterregulierte Gene. Die mRNA Expression wurde auf mehrere Housekeeping-Gene (Gapdh und β -Aktin) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde ($n = 3$, $N = 1$). EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

Tabelle 3. 2: Einteilung der in beiden Differenzierungen (EC und SMC) einheitlich hochregulierten und herunterregulierten Gene in Signalwege.

Gene, die sowohl nach EC als auch SMC Differenzierung hoch- und herunterreguliert wurden, wurden nach DAVID-Analyse (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

	KEGG Pathway	Zugeordnete Gene
EC+SMC \uparrow (mESC \downarrow)	<i>Pathways in cancer</i>	Fas-L, Rac1, c-lap1, p21 ^{WAF1/CIP1} , Itgb1, Bcl2, Akt1
	<i>Apoptosis</i>	Fas-L, c-lap1, Bcl2, Akt1
	<i>Cell adhesion molecules (CAMs)</i>	Itgb1, E-Selektin, Vcam1
	<i>Nucleotide excision repair</i>	Ercc1, Xpa
	<i>Transendothelial migration</i>	Rac1, Itgb1, Vcam1
	<i>Regulation of autophagy</i>	Atg3, Atg7
EC+SMC \downarrow (mESC \uparrow)	<i>Mismatch repair</i>	Msh2
	<i>Homologous recombination</i>	Rad51
	<i>Cell cycle</i>	CyclinA1, CyclinE1, Wee1
	<i>Nucleotide excision repair</i>	Ddb2, Pole
	<i>Pathways in cancer</i>	Rad51, CyclinE1, Msh2
	<i>p53 signaling pathway</i>	CyclinE1, Ddb2

Für die weitere Fragestellung dieser Arbeit waren aber nicht nur solche Gene von Interesse, die differenzierungsabhängig, d.h. sowohl in EC als auch in SMC, ihre Expression im Vergleich zur undifferenzierten Stammzelle (mESC) verändern, sondern vor allem auch Expressionsunterschiede zwischen beiden Differenzierungen. Unter den nur nach Endothelzelldifferenzierung hochregulierten Genen fanden sich Gene, die eine wichtige Rolle während der DNA-Reparatur spielen: Lig4 (*Ligase IV, DNA, ATP-dependent*) und Xrcc4 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4*) oder am *Chemokine signaling pathway* beteiligt sind: Tiam (*T cell lymphoma invasion and metastasis 1*), Cxcr4 (*chemokine (C-X-C motif) receptor 4*) und RhoA (*Ras homolog gene family, member A*). Nach erfolgreicher Differenzierung zu glatten Muskelzellen, wurden Gene stärker exprimiert, die für Proteine codieren, die am P53 Signalweg (Fas-R (*TNF receptor superfamily member 6*) und Mdm2 (*transformed mouse 3T3 cell double minute 2*) und am MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalweg (Fos (*FBJ osteosarcoma oncogene*) und Fas-R) beteiligt sind. Weitere Signalwege, denen Gene zugeordnet werden konnten, die nur nach zellspezifischer Differenzierung hochreguliert wurden, sind Tabelle 3. 3 zu entnehmen.

Tabelle 3. 3: Einteilung der ausschließlich in EC oder SMC hochregulierten Gene in Signalwege.

Gene, die nur in einzelnen Zelltypen hochreguliert sind (EC oder SMC), wurden nach DAVID-Analyse (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

	KEGG Pathway	zugeordnete Gene
EC↑	<i>Pathways in cancer</i>	c-Jun, Hif1a, Pten, RhoA
	<i>Non-homologous end-joining</i>	Lig4, Xrcc4
	<i>Chemokine signaling pathway</i>	Tiam, Cxcr4, RhoA
	<i>Focal adhesion</i>	c-Jun, Pten, RhoA
SMC↑	<i>Pathways in cancer</i>	Fos, Fas-R, Mdm2
	<i>p53 signaling pathway</i>	Fas-R, Mdm2
	<i>MAPK signaling pathway</i>	Fos, Fas-R

In den EC waren einige Gene, die im p53 Signalweg eine Rolle spielen (Gadd45a (*growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha*), Trp73 (*transformation related protein 73*), Gpx1 (*glutathione peroxidase 1*), Ddit3 (*DNA-damage inducible transcript 3*), Lamp1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*)) herunterreguliert. Grundsätzlich auffällig ist die hohe Anzahl an herunterregulierten Genen nach der glatten Muskelzelldifferenzierung. Unter diesen Genen fanden sich viele Gene die essentiell zur Zellzyklusregulation sind: Chk2 (*checkpoint kinase 2*), Atm (*ataxia telangiectasia mutated homolog*), Cdc25a (*cell division cycle 25A*), PcnA (*proliferating cell nuclear antigen*), Chk1 (*checkpoint kinase 1*), Cdkn1b (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), Ccnb1 (*Cyclin B1*) und Faktoren die an verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind: Xrcc1 (*X-ray repair*

complementing defective repair in Chinese hamster cells 1), Fen1 (*flap structure specific endonuclease 1*), Lig1, PcnA, Pold1 *polymerase (DNA directed)*, delta 1, catalytic subunit), Xpc, Brca2 (*breast cancer 2*), Mre11a (*meiotic recombination 11 homolog A*).

Tabelle 3. 4: Einteilung der ausschließlich in EC oder SMC herunterregulierten Gene in Signalwege.

Gene, die nur in einzelnen Zelltypen herunterreguliert sind (EC oder SMC), wurden nach DAVID-Analyse (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

	KEGG Pathway	zugeordnete Gene
EC↓	p53 signaling pathway	Gadd45a, Trp73, Gpx1, Ddit3, Lamp1
SMC↓	Cell cycle	Chk2, Atm, Cdc25a, PcnA, Chk1, Cdkn1b, Cyclin B1
	Base excision repair	Xrcc1, Fen1, Lig1, PcnA, Pold1
	DNA replication	Lig1, PcnA, Pold1
	Nucleotide excision repair	Lig1, PcnA, Xpc, Pold1
	p53 signaling pathway	Chk2, Fen1, Chk1, CyclinB1
	Mismatch repair	Lig1, Pold1, PcnA
	Homologous recombination	Brca2, Mre11a, Pold1

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die große Anzahl an differentiell exprimierten Suszeptibilitätsfaktoren die Vermutung nahelegt, dass ein Unterschied in der Art und Weise mit der DNA-Schäden repariert werden zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen besteht. Auch legt die große Anzahl von in SMC herunterregulierten Genen die Vermutung nahe, dass sich SMC in ihrer Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren deutlich von undifferenzierten Stammzellen, aber auch von EC unterscheiden.

3.2.2 Bestimmung hochregulierter Suszeptibilitätsfaktoren nach Behandlung mit Genotoxinen

Um der Fragestellung nachzugehen, ob es einen Unterschied in der Reparaturfähigkeit dieser drei Zelltypen (mESC, EC und SMC) und des Reparaturmechanismus bei der Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen (*dna double strang breaks*; DSBs) gibt, wurden die Zellen mit Genotoxinen behandelt, die hauptsächlich DSBs verursachen. Im Anschluss daran wurde erneut ein Screening nach unterschiedlicher Expression von Suszeptibilitätsfaktoren, welche in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und den Zelltod involviert sind, durchgeführt.

Die Anzahl der nach Bestrahlung (IR) oder Doxorubicinbehandlung (Doxo) hochregulierten Gene ist im Venn-Diagramm in Abbildung 3. 14 aufgeführt. Die Gene sind namentlich in Tabelle 3. 5 aufgelistet. In den undifferenzierten Stammzellen konnten 37 hochregulierte Gene nach Bestrahlung und 34 nach Doxorubicinbehandlung gefunden werden, 17 davon waren identisch. Nach Differenzierung in Endothelzellen wurden 12 Gene nach Bestrahlung und 28 Gene nach

Doxorubicinbehandlung hochreguliert, davon waren 7 identisch. In den SMC wurden nach Bestrahlung 7 hochregulierte Gene und nach Doxorubicinbehandlung 9 gefunden, davon waren keine identisch. mESC und EC zeigten nach Bestrahlung 5 und nach Doxorubicinbehandlung 12 gemeinsam hochregulierte Gene. mESC und SMC nach Bestrahlung 3 und Doxorubicinbehandlung 4 gemeinsam hochregulierte Gene. EC und SMC besaßen nach Bestrahlung 2 und 6 nach Doxorubicinbehandlung gemeinsam hochregulierte Gene.

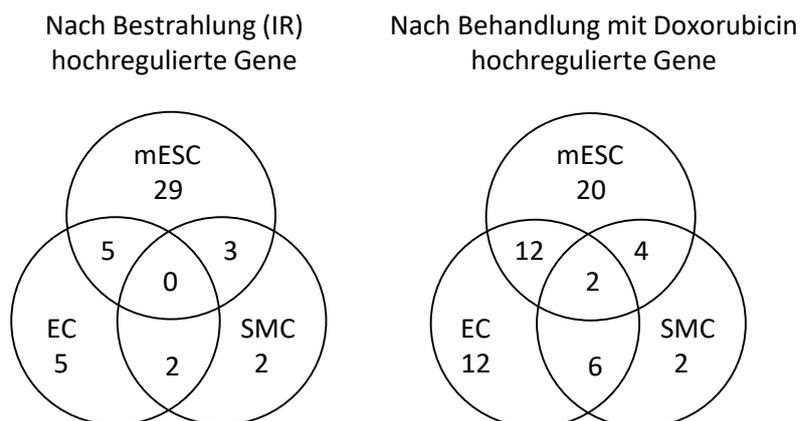


Abbildung 3. 14: Nach Behandlung mit Genotoxinen (Bestrahlung, Doxorubicin) hochregulierte Suszeptibilitätsfaktoren in mESC, EC und SMC.

Die mRNA Expression von 94 ausgewählten Genen, welche die Sensitivität von Zellen gegenüber Genotoxinen beeinflussen, wurde mittels quantitativer Real-time PCR unter Verwendung eines zu diesem Zweck entwickelten PCR-Arrays analysiert. Gezeigt sind die Unterschiede in der mRNA Expression nach Behandlung mit Genotoxinen zwischen mESC, EC und SMC. Nur Expressionsveränderungen ≥ 2 wurden als biologisch relevant betrachtet. Das Venn-Diagramm zeigt die Anzahl der hochregulierten Gene in mESC, EC und SMC zusammen oder alleine nach Bestrahlung (10 Gy, 24 h später wurde die RNA isoliert) und Doxorubicin Behandlung (1 μ M für 2 h, 24 h später wurde die RNA isoliert, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die mRNA Expression wurde auf mehrere Housekeeping-Gene (Gapdh und β -Aktin) normalisiert und auf die Expression der unbehandelten Zellen bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*.

Tabelle 3. 5: Nach Behandlung mit Genotoxinen hochregulierte Suszeptibilitätsfaktoren in mESC, EC und SMC.

In der Tabelle sind die, 24 h nach Bestrahlung (IR, 10 Gy) und 24 h nach Doxorubicinbehandlung (Doxo, 1 μ M 2 h Pulsbehandlung), hochregulierten Gene (Expressionsveränderungen ≥ 2) aus Abbildung 3. 14 aufgelistet. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, Doxo: Doxorubicin, IR: Ionisierende Strahlung. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

Nach IR Exposition hochregulierte Gene			Nach Doxo Exposition hochregulierte Gene		
mESC	EC	SMC	mESC	EC	SMC
Atg3	Cd44	Chk1	Akt1	Apex1	Cd44
Atm	Cdkn1a	Cxcr4	Apex1	Atg3	Cdc25b
Brca1	Cip1b1	Hmox1	Atf2	Bax	Ddit3
Brca2	E-Selektin	Hsp90	Atg3	Bid	Cip1b1
Caspase2	Fas-R	Hspa1b	Bid	Cd44	Ddb2
Cdc25b	Gstm1	Msh2	Brca1	Cdc25b	IL12a
Chk1	Hmox1	Trp63	Brca2	Cdkn1a	Nos2
Ciap1	Icam1		Cd44	Ddit3	Nox1
Cip1b1	Mdm2		Cdc25b	Cxcr4	Trp3
Cxrc4	Mmp1		Chk2	CyclinA1	
CyclinA1	Trp63		Cip1b1	Ercc1	
CyclinB1	Txnrd1		clAP1	Fas-R	
CyclinE1			CyclinA1	Gadd45a	
Cyp1A1			CyclinB1	Gpx1	
E-Selektin			CyclinE1	Gstm1	
Fancc			Cyp1A1	HMox1	
Fas-L			E-Selektin	Hspa1b	
Fas-R			Fas-L	IL12a	
Fos			Fas-R	Lamp1	
IL12a			HMox1	Mgmt	
Mdm2			Hspa1b	Mmp1	
Msh2			Mmp7	Mpg	
Nos2			Mre11a	Rac1	
Nos3			Nos2	Sod1	
Ogg1			Ogg1	Trex1	
Pten			Pten	Trp63	
Rev1			Rac1	Wrn	
Tiam1			Rad51		
Topo2a			Rev1		
Topo2b			Trex1		
Txnrd1			Wrn		
Vcam1			Xpa		
Wee1			Xrcc1		
Wmip1			Xrcc4		
Wrn					
Xrcc1					
Xrcc4					

Eine Übersicht der nach Bestrahlung hochregulierten Gene und die Zugehörigkeiten zu bestimmten Signalwegen ist in Tabelle 3. 6 und nach Doxorubicinbehandlung in Tabelle 3. 7 dargestellt. Es wurden in allen Zelltypen Gene gefunden, die für Proteine kodieren, die an der Zellzyklusregulation, am p53 Signalweg, der Apoptose und verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. In den undifferenzierten Stammzellen wurde die Expression von Apoptose-relevanten Genen nach Bestrahlung und Doxorubicinbehandlung deutlich stärker erhöht als in EC und SMC. Zudem wurden in den EC nach Bestrahlung *Icam1* und nach Doxorubicinbehandlung in den EC *Cxcr4* und in den SMC *Nox1* (*NADPH oxidase 1*) hochreguliert. Diese Gene kodieren für Proteine, die an der transendothelialen Migration im Rahmen der Immunantwort beteiligt sind. Sie ermöglicht den Zellen des Immunsystems das Gefäßsystem zu verlassen, um beispielsweise an einen Infektionsort zu gelangen. mESC zeigten als einziger Zelltyp eine Hochregulation der ATM mRNA Expression nach Bestrahlung. ATM wird unter anderem durch DSBs aktiviert und ist maßgeblich an deren Reparatur beteiligt.

Tabelle 3. 6: Einteilung der nach Bestrahlung hochregulierten Gene in Signalwege.

24 h nach Bestrahlung (10 Gy) hochregulierte Gene wurden nach DAVID-Analyse (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, IR: Ionisierende Strahlung. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

IR	KEGG Pathway	zugeordnete Gene
mESC↑	<i>Cell cycle</i>	Wee1, Atm, Fas-L, CyclinA1, CyclinE1, CyclinB1 Fas-R, Chk1, Mdm2
	<i>p53 signaling pathway</i>	Atm, CyclinE1, Pten
	<i>Apoptosis</i>	c-lap1, Atm, Fas-L, Fas-R
	<i>Homologous recombination</i>	Brca2
	<i>Non homologous endjoining</i>	Xrcc4
	<i>Base excision repair</i>	Xrcc1, Ogg1
	<i>Mismatch repair</i>	Msh2
EC↑	<i>p53 signaling pathway</i>	p21 ^{WAF1/CIP1}
	<i>Killer cell mediated cytotoxicity</i>	Icam1
	<i>Transendothelial migration</i>	Icam1
	<i>Cell adhesion molecules (CAMs)</i>	Icam1
SMC↑	<i>MAPK signaling pathway</i>	Hsp90
	<i>Cell cycle</i>	Chk1
	<i>Endocytosis</i>	Hsp90
	<i>Mismatch repair</i>	Msh2

Tabelle 3. 7: Einteilung der nach Doxorubicinbehandlung hochregulierten Gene in Signalwege.

24 h nach Doxorubicinbehandlung (1 μ M, 2 h Pulsbehandlung) hochregulierte Gene wurden nach DAVID-Analyse (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

Doxorubicin	KEGG Pathway	zugeordnete Gene
mESC↑	<i>Cell cycle</i>	Chk2, CyclinE1, CyclinB1, CyclinA1, Cdc25a
	<i>p53 signaling pathway</i>	Chk2, CyclinE1, Pten, CyclinB1
	<i>Apoptosis</i>	c-lap1, Akt1, Fas-L, Fas-R, Bid
	<i>Homologous recombination</i>	Brca2, Rad51, Mre11
	<i>Non homologous endjoining</i>	Xrcc4, Mre11
	<i>Base excision repair</i>	Xrcc1, Ogg1, Apex1
EC↑	<i>p53 signaling pathway</i>	p21 ^{WAF1/CIP1} , Bax, Gadd45a
	<i>Apoptosis</i>	Bax, Fas-R, Bid
	<i>Transendothelial migration</i>	Cxcr4
	<i>Base excision repair</i>	Mpg, Apex1
	<i>Nucleotide excision repair</i>	Ercc1
	<i>Autophagy</i>	Atg3
	<i>Cell cycle</i>	CyclinA1, Cdc25a
SMC↑	<i>Nucleotide excision repair</i>	Ddb2
	<i>Transendothelial migration</i>	Nox1
	<i>Cell cycle</i>	CyclinA1, Cdc25a

Sowohl nach Bestrahlung als auch nach Doxorubicinbehandlung wurde in den mESC die größte Anzahl hochregulierter Gene, welche für an DNA-Reparaturmechanismen beteiligte Proteine kodieren, detektiert (Abbildung 3. 15). Nach Bestrahlung wurden Xrcc1 und Ogg1 (*8-oxoguanine DNA-glycosylase 1*), welche für Proteine kodieren, die an der Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt sind, in mESC doppelt so stark exprimiert wie in unbestrahlten mESC. Das gleiche gilt für Xrcc1, Ogg1 und Apex1 (*apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*) nach Doxorubicinbehandlung. An der homologen Reparatur (HR) beteiligte Gene wurden sowohl nach Bestrahlung (Brca1, Brca2), als auch nach Doxorubicinbehandlung (Brca1, Brca2, Mre11a, Rad51) in undifferenzierten Stammzellen bis zu 3-fach stärker exprimiert. Msh2, welches an der MMR beteiligt ist, wurde nach Bestrahlung hochreguliert und Xpa, welches an der NER beteiligt ist, nach einer Behandlung mit Doxorubicin. Xrcc4, welches eine wichtige Funktion während der NHEJ hat, wurde sowohl nach Bestrahlung als auch Doxorubicinbehandlung in mESC hochreguliert.

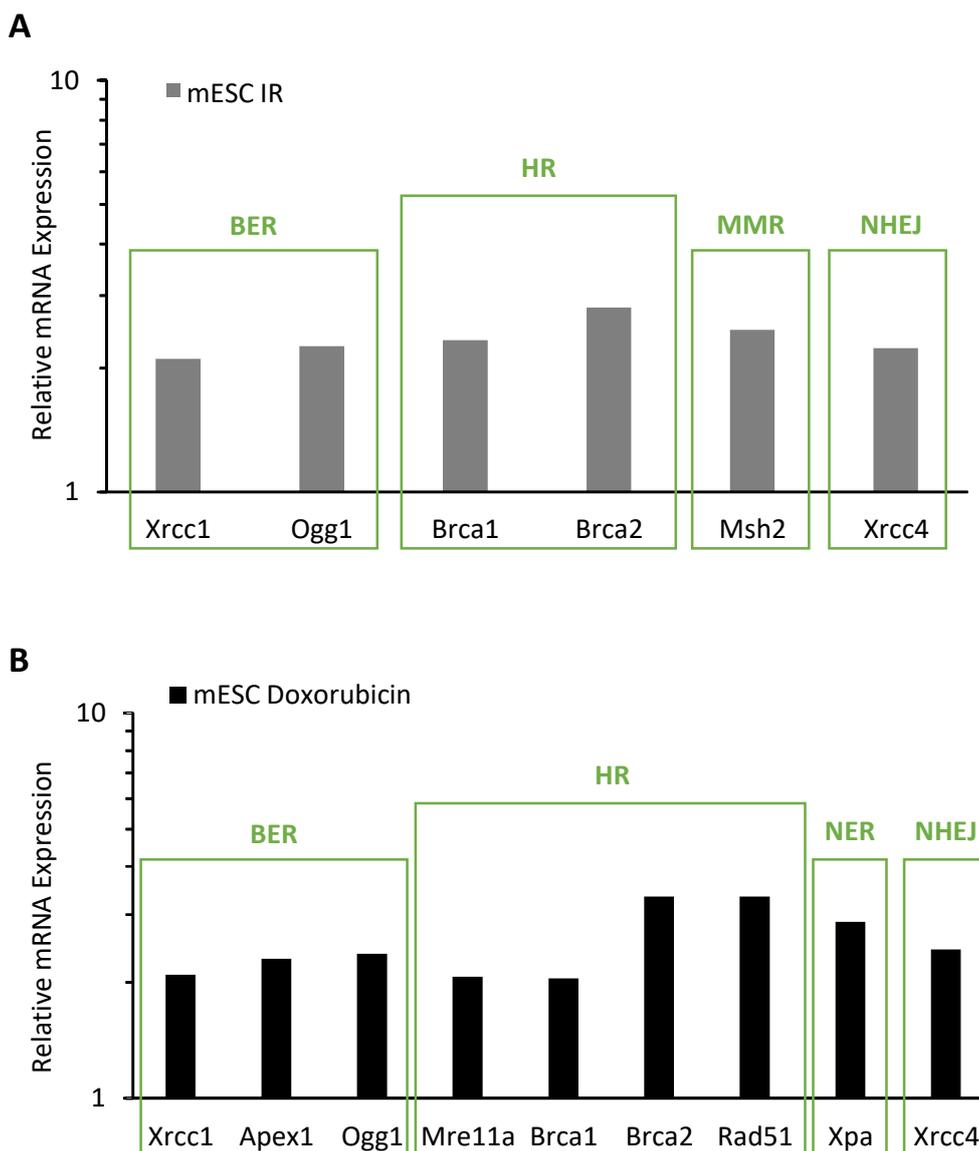


Abbildung 3. 15: Expression von DNA-Reparaturgenen in undifferenzierten Stammzellen nach Behandlung mit Genotoxinen.

Die mRNA Expression von DNA-Reparaturgenen wurde mittels quantitativer Real-time PCR analysiert. Gezeigt sind die basalen Unterschiede in der mRNA Expression zwischen behandelten und unbehandelten mESC. Die mRNA Expression wurde auf mehrere Housekeeping-Gene (Gapdh und β -Aktin) normalisiert und auf die Expression der unbehandelten Zellen bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde (n=2, N=1). A: Regulation der DNA-Reparaturgene nach Bestrahlung (1 Gy nach 24 h). B: Regulation der DNA-Reparaturgene nach Doxorubicinbehandlung (1 μ M für 2 h, 24 h später wurde die RNA isoliert). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten. BER: *base excision repair*, HR: *homologous recombination*, MMR: *DNA mismatch repair*, NHEJ: *non-homologous end joining*, NER: *nucleotide excision repair*, mESC: *mouse embryonic stem cells*. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

In Tabelle 3. 8 sind die Gene, die sowohl nach Bestrahlung als auch Doxorubicinbehandlung hochreguliert wurden zusammengefasst. In SMC konnten keine Gene detektiert werden, die sowohl nach Bestrahlung als auch einer Doxorubicinbehandlung hochreguliert wurden.

Tabelle 3. 8: Nach Bestrahlung und Doxorubicinbehandlung gemeinsam hochregulierte Gene.

Sowohl 24 h nach Bestrahlung (10 Gy) als auch nach Doxorubicinbehandlung (1 μ M, 2 h Pulsbehandlung) gemeinsam hochregulierte Gene (Doxo+IR) wurden nach DAVID-Analyse (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. In SMC wurden keine gemeinsam hochregulierten Gene detektiert. EC: *endothelial cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, Doxo: Doxorubicin, IR: ionisierende Strahlung. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

Doxo + IR	KEGG Pathway	zugeordnete Gene
mESC \uparrow	<i>Cell cycle</i>	CyclinA1, CyclinE1, CyclinB1
	<i>p53 signaling pathway</i>	Fas-R, CyclinE1, Pten, CyclinB1
	<i>Apoptosis</i>	c-lap1, Fas-R, Fas-L
	<i>Homologous recombination</i>	Brca2
	<i>Non homologous endjoining</i>	Xrcc4
	<i>Base excision repair</i>	Ogg1, Xrcc1
	<i>Cell adhesion</i>	E-Selektin
EC \uparrow	<i>p53 signaling pathway</i>	Fas-R, p21 ^{WAF1/CIP1}
	<i>Apoptosis</i>	Fas-R

Die Real-time PCR-Array Analysen ergaben eine höhere Anzahl gemeinsam exprimierter Gene nach Exposition mit Genotoxinen in den mESC und EC als in mESC und SMC. Die undifferenzierten Stammzellen zeigten eine verstärkte mRNA Expression bei einer höheren Anzahl von Suszeptibilitätsfaktoren als EC und SMC. Viele der ausschließlich in den mESC nach Behandlung mit Genotoxinen hochregulierten Gene sind relevant für die DNA-Reparatur und Apoptose. An der homologen Rekombination beteiligte Gene wurden ausschließlich von mESC hochreguliert. Diese Daten bekräftigten die Vermutung, dass ein Unterschied zwischen den drei Zelltypen in der Art wie auf DNA-Schäden reagiert wird, besteht. Zudem lassen sie vermuten, dass Stammzellen eine höhere Reparatur- und Apoptosekapazität besitzen als EC und SMC. Die insgesamt geringe Expression von Suszeptibilitätsfaktoren in SMC, im Vergleich mit EC und mESC, deutete darauf hin, dass sie weniger widerstandsfähig gegen DNA-Schäden sind. Um zu untersuchen, ob sich diese Vermutungen bestätigen wurden die drei Zelltypen mit Genotoxinen behandelt und anschließend ihre Reparaturfähigkeit analysiert.

3.2.3 Untersuchungen zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, der DNA-Schadensantwort und der Reparaturfähigkeit von embryonalen Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Die genotoxische Wirkung bestimmter Substanzen beruht darauf, dass die DNA der Zellen angegriffen wird. Zellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt auf diese DNA-Schäden zu reagieren. Entweder wird die Zelle in der Zellzyklusprogression inhibiert und die DNA-Reparatur verstärkt oder sie geht durch Apoptoseinduktion zu Grunde. Eine zentrale Rolle bei der DNA-Schadensantwort spielen unter anderem die Serin/Threonin-Proteinkinasen ATM und ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) und die katalytische Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs), die eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren und dadurch die DNA-Schadensantwort einleiten. Dabei spielen unter anderem P53 und BRCA1/2 eine zentrale Rolle (Lavin et al. 2005; Harper JW 2007; Christmann et al. 2003). P53 aktiviert P21 und proapoptotische Proteine wie BAX (*BCL2-associated protein*). So kann entweder ein Zellzyklusarrest induziert werden, welcher eine DNA-Reparatur ermöglicht oder die Apoptose eingeleitet werden. BRCA1 und BRCA2 tragen unter anderem durch Regulation der homologen Rekombination zum Erhalt der genomischen Stabilität bei und sind somit essentiell für die Reparatur von DSBs.

Da etliche Schlüsselfiguren der DNA-Schadenserkenkung und der DNA-Schadensantwort basal sowie nach Behandlung mit Genotoxinen (IR, Doxorubicin) in mESC, EC und SMC differentiell exprimiert wurden, sollte ihre Fähigkeit hinsichtlich der DNA-Reparatur genauer untersucht werden. Während der DNA-Schadensantwort wird unter anderem das Histon H2AX (*H2A histone family, member X*) an Serin 139 durch ATM/ATR phosphoryliert (Harper JW 2007). Diese Phosphorylierung von H2AX (γ H2AX) dient als etablierter Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche (Löbrich et al. 2010; Sánchez-Flores et al. 2015; Rogakou et al. 1998; Olive 2004). Um die Suszeptibilität von Stammzellen und daraus differenzierten Endothelzellen und transdifferenzierten glatten Muskelzellen gegenüber Genotoxinen und ihre DNA-Reparaturfähigkeit vergleichend zu analysieren, wurden die Zellen zunächst mit ionisierender Strahlung (ionizing radiation, IR) als prototypische Noxe für die Induktion von DSBs und der DNA-Schadensantwort behandelt (Taleei R, Girard PM 2015; Vignard J., Mirey G 2013). Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt und die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüchen sofort (0 h) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (1 h, 4 h und 6 h) mittels immunzytochemischer Färbung der γ H2AX-Foci quantifiziert (Abbildung 3. 16).

Diese Quantifizierung zeigte, dass die basal vorhandene, nicht durch Genotoxine induzierte Anzahl von γ H2AX-Foci (DNA-Doppelstrangbrüchen) in den undifferenzierten Stammzellen am höchsten war und eine Stunde nach der Bestrahlung um ca. das 4-fache anstieg. Sowohl EC als auch SMC

zeigten im Vergleich zu den mESC einen höheren Anstieg von γ H2AX-Foci als Folge der Bestrahlung. Der stärkste Effekt war 1 h nach Bestrahlung der SMC zu sehen. In allen Zelllinien stieg die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zellkern bis zu 1 h nach Bestrahlung auf ein Maximum an, um dann mit weiterer Postinkubationsdauer wieder abzufallen, was die Reparaturfähigkeit der DSBs reflektierte. Ausgehend von den maximal induzierten γ H2AX-Foci 1 h nach Bestrahlung war die Abnahme 6 h nach der Bestrahlung in EC und SMC stärker. Dies lässt den Schluss zu, dass EC und SMC eine höhere DNA-Reparaturkapazität besitzen als mESC. Die Anzahl residueller γ H2AX-Foci 6 h nach Bestrahlung war in den EC am geringsten und in SMC am höchsten.

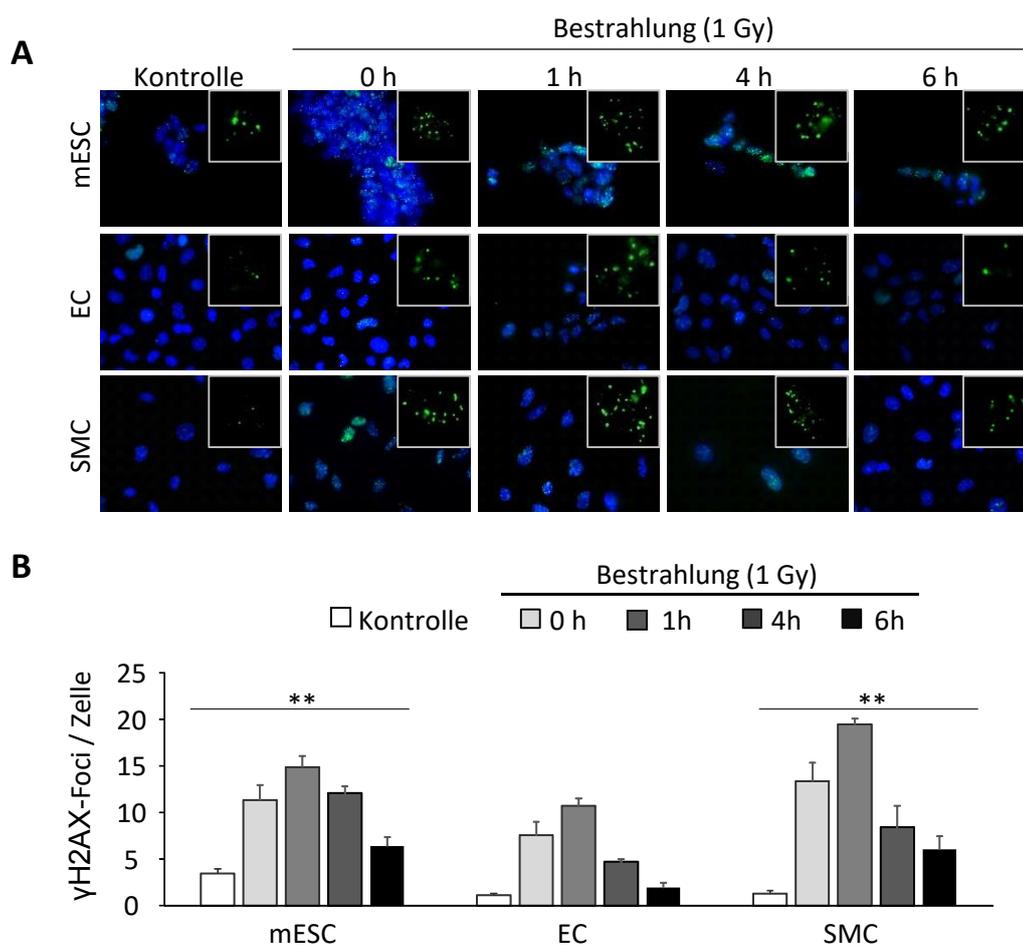


Abbildung 3. 16: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Bestrahlung.

Die Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und sofort, 1 h, 4 h und 6 h nach der Bestrahlung die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci mittels immunzytochemischer Färbung quantifiziert wurde. A: repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt. Die Vergrößerungen im oberen rechten Bildrand zeigen die Foci innerhalb einer einzigen Zelle. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. B: Mittelwerte + Standardabweichungen der Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zellkern. Pro Bedingung wurden 50 Zellkerne ausgezählt. (n = 3, N = 50). **p \leq 0,01 (basale Anzahl der γ H2AX-Foci verglichen mit residuellen γ H2AX-Foci 6 h nach Bestrahlung), EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, γ H2AX: phosphoryliertes *H2A histone family, member X*.

Um die Sensitivität der Zellen gegenüber eines weiteren Genotoxins und ihrer DNA-Reparaturkapazität nach einer Behandlung mit diesem zu analysieren, wurde sich für das tumortherapeutisch ebenfalls sehr relevante Doxorubicin entschieden. Zwar unterscheidet sich die Schadensentstehung durch Doxorubicin grundsätzlich von Mechanismen mit denen ionisierende Strahlung die DNA schädigt, aber beide haben gemeinsam, dass sie DSBs herbeiführen (Yang et al. 2014). Dazu wurden die Zellen für 2 h mit 1 μ M Doxorubicin inkubiert und die Anzahl der DSBs sofort (0 h) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (1 h, 4 h und 6 h) mittels immunzytochemischer Färbung der γ H2AX-Foci quantifiziert (Abbildung 3. 17).

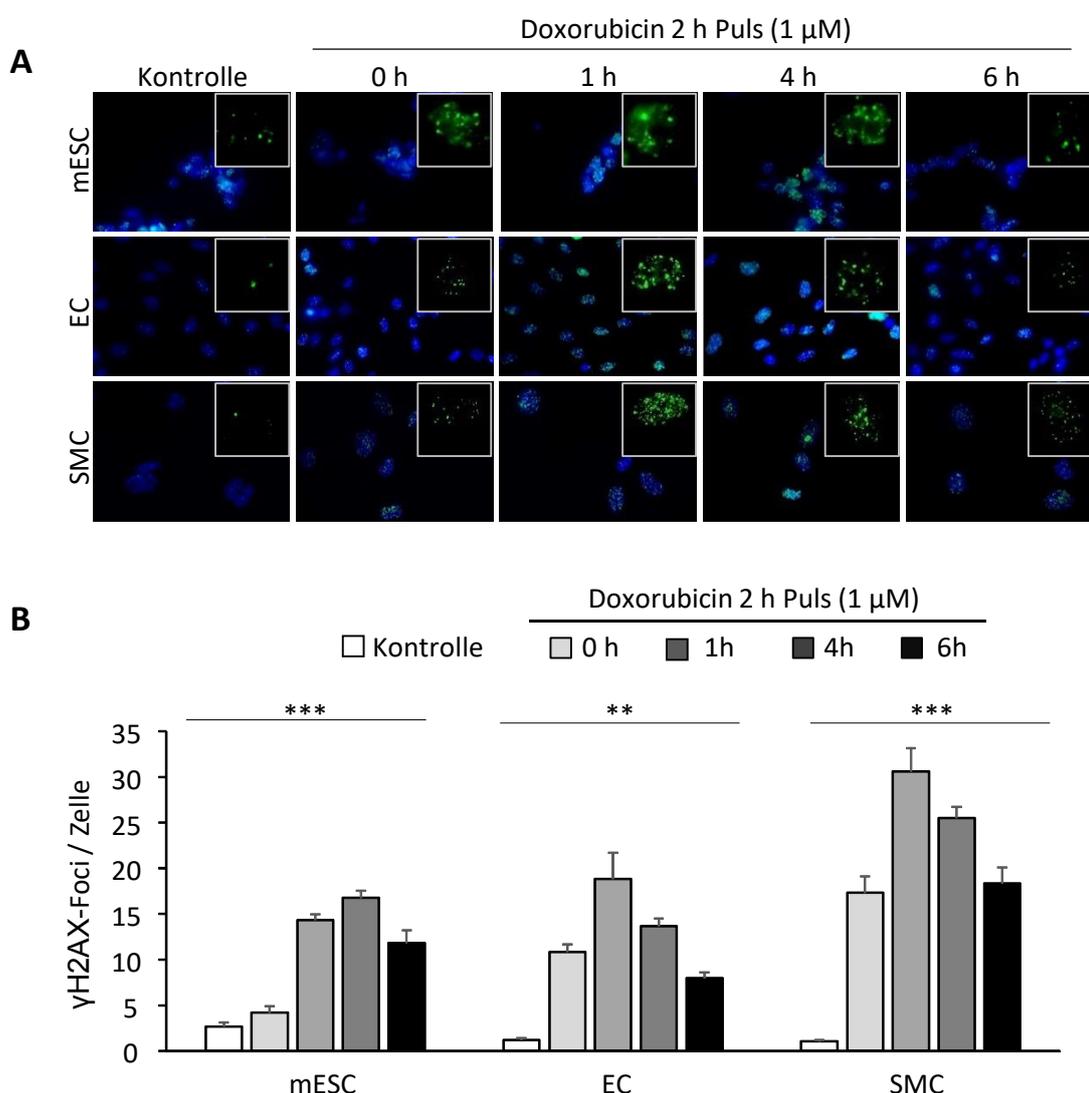


Abbildung 3. 17: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Behandlung mit Doxorubicin.

Die Zellen wurden mit 1 μ M Doxorubicin für 2 h behandelt. Sofort, 1 h, 4 h und 6 h nach der Behandlung wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) ermittelt, indem die Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci mittels immunzytochemischer Färbung quantifiziert wurde. A: repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt. Die Vergrößerungen im oberen rechten Bildrand zeigen die Foci innerhalb einer einzigen Zelle. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. B: Mittelwerte + Standardabweichungen der Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zellkern. Pro Bedingung wurden 50

Zellkerne ausgezählt (n = 3, N = 50). **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,01 (basale Anzahl der γ H2AX-Foci verglichen mit residualen γ H2AX-Foci 6 h nach Doxorubicinbehandlung), EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, γ H2AX: phosphoryliertes H2A histone family, member X.

Sowohl EC als auch SMC zeigten im Vergleich zu den mESC einen höheren Anstieg der γ H2AX-Foci als Folge der Behandlung mit Doxorubicin (Abbildung 3. 17). Der stärkste Effekt war 1 h nach Behandlung der SMC zu sehen, welcher auch nochmal deutlich stärker war, als nach Bestrahlung (Abbildung 3. 18). In allen Zelllinien stieg die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zellkern bis zu 1 h (EC und SMC) oder 4 h (mESC) nach Behandlung auf ein Maximum an, um dann mit weiterer Postinkubationsdauer wieder langsam abzufallen, was die Reparaturfähigkeit der DSBs reflektiert. Jedoch war die zeitabhängige Abnahme der γ H2AX-Foci in allen drei Zelltypen nach Doxorubicinbehandlung deutlich geringer als nach Bestrahlung. Dies zeigt, dass die hier verwendete Doxorubicindosis (1 μ M) toxischer für alle drei Zelltypen war, als eine Bestrahlung der Zellen mit 1 Gy. Die Anzahl residualer γ H2AX-Foci 6 h nach Doxorubicinbehandlung war in den EC, ebenso wie nach Bestrahlung, am geringsten und den SMC am höchsten. Ein Vergleich der Kinetik der DNA-Reparaturkapazität nach Behandlung mit den Genotoxinen ist in Abbildung 3. 18 zusammengefasst.

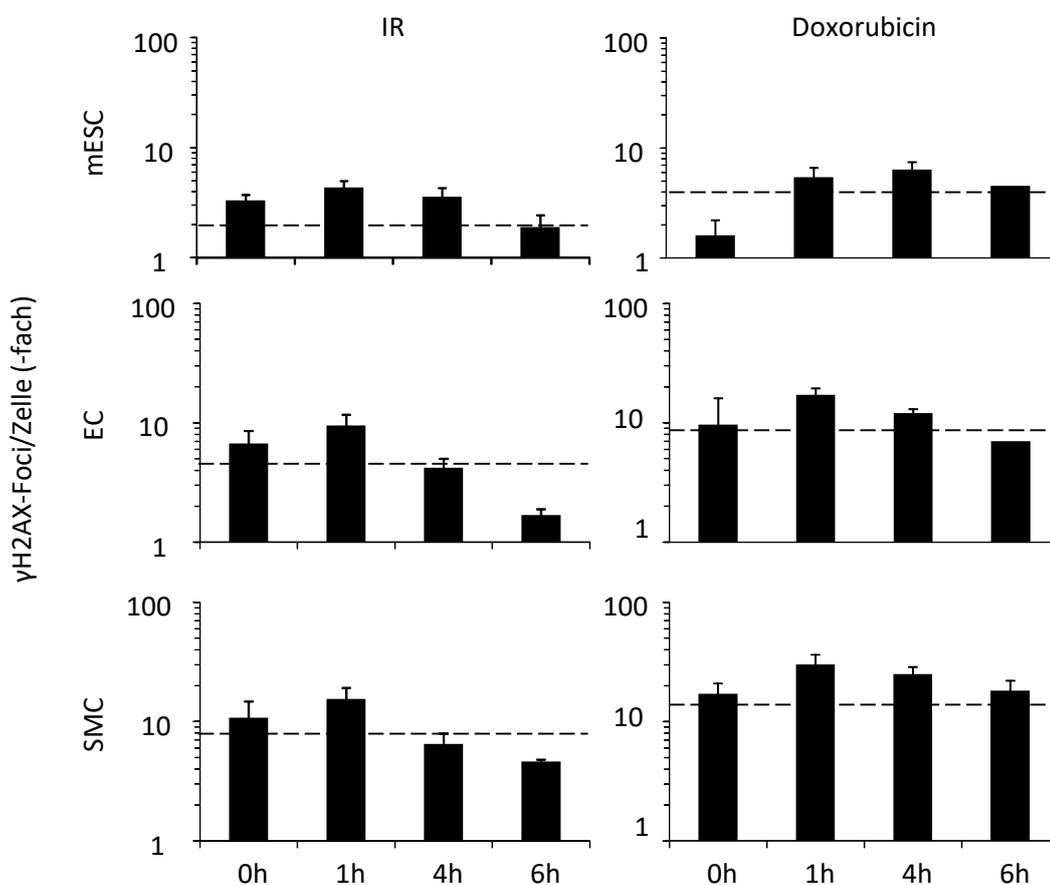


Abbildung 3. 18: Vergleichende DNA-Doppelstrangbruch Reparaturkinetik in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Behandlung mit Genotoxinen.

Die Abbildung zeigt die x-fache Änderung in der Anzahl der γ H2AX-Foci in mESC, EC und SMC nach Bestrahlung (IR) und Doxorubicinbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung (sofort, 1 h, 4 h und 6 h). Die Anzahl der γ H2AX-Foci in der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Die gestrichelte Linie markiert die zelltypspezifische Reduktion der maximalen Anzahl von γ H2AX-Foci um 50 %. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*, IR: ionisierende Strahlung, γ H2AX: phosphoryliertes *H2A histone family, member X*.

Um die durch diese induzierten DSBs ausgelöste zelluläre Schadensantwort weiter zu untersuchen, wurden zusätzlich Western Blot-Analysen, sofort und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 4 h, 6 h) nach der Bestrahlung oder Doxorubicinbehandlung, zur Detektion von Proteinen, die während der Reparatur von DSBs eine zentrale Rolle spielen wie RAD51, MSH2, BRCA1 und PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) durchgeführt. Außerdem wurde die im Rahmen der DNA-Schadensantwort erfolgende Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins P53, KAP1 (*KRAB-associated protein 1*), SMC1 (*Structural maintenance of chromosomes protein 1A*) und der Checkpointkinase 1 (CHK1) analysiert. In die Analyse wurden zusätzlich der antioxidative Faktor HMOX1 (*heme oxygenase 1*) mit einbezogen.

Die Ergebnisse zeigten (Abbildung 3. 19 und Abbildung 3. 20), dass die basale Expression von RAD51, BRCA1 und MSH2 in EC und SMC, auch auf Proteinebene niedriger ist als in den mESC. Diese Ergebnisse deckten sich mit den im Abschnitt 3.3.1 gefundenen differentiell exprimierten Suszeptibilitätsfaktoren auf mRNA Ebene. Nur in den undifferenzierten Zellen konnte eine Erhöhung der Expression von MSH2 durch Bestrahlung induziert werden (Abbildung 3. 19). Die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP) konnte nur in mESC und schwach in EC detektiert werden. Der Abbau von PARP durch die Caspase 3 stellt einen wesentlichen Schritt des apoptotischen Zelltods dar. Die basale Expression von HMOX1 war in den mESC ebenfalls deutlich höher als in EC und SMC. Alle drei Zelltypen reagierten auf die Bestrahlung mit einer Phosphorylierung von P53 (p-P53), wobei diese in mESC und EC ausgeprägter war. Ebenso exprimierten alle Zelltypen P53, dessen Expression allerdings nur in den SMC nach Bestrahlung deutlich verstärkt wird. Eine Aktivierung der Checkpointkinase 1 war nur in mESC zu detektieren. Die basale Expression von p-CHK1 war in den EC am höchsten. mESC zeigten außerdem eine deutlich stärkere durch ATM-katalysierte S437 Phosphorylierung von KAP1 als EC, wohingegen in SMC keine Proteinexpression von p-KAP1 nachweisbar war. Eine Phosphorylierung von SMC1 (p-SMC1) konnte nach Bestrahlung in keinem Zelltyp detektiert werden. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Unterschied sowohl in der basalen als auch in der durch IR induzierbaren Expression von Faktoren der DNA-Reparatur, DNA-Schadensantwort und der antioxidativen Abwehr.

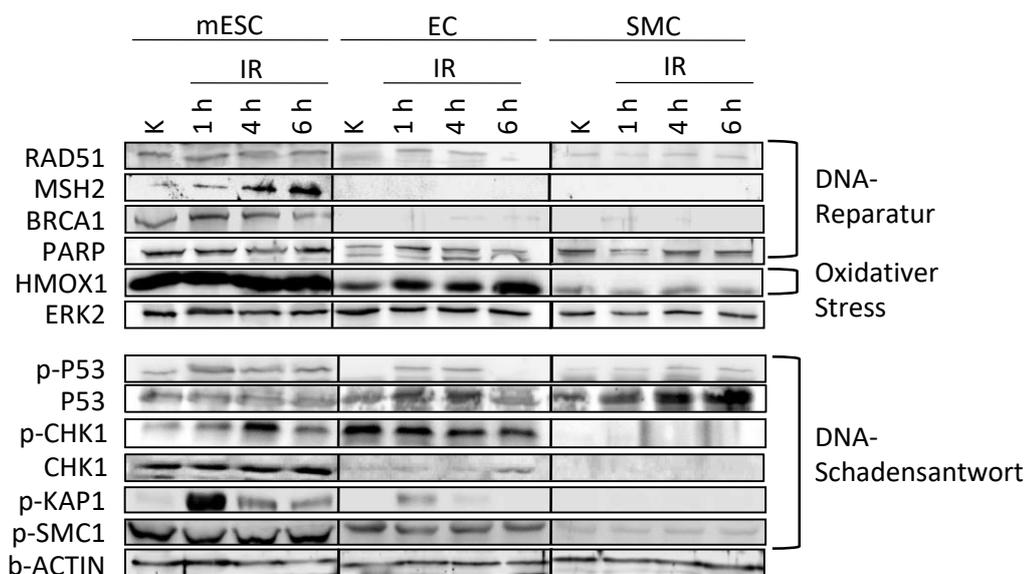


Abbildung 3. 19: Aktivierung von DNA-Schadensantworten in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Bestrahlung.

Die Zellen wurden bestrahlt (10 Gy) und anschließend wurde der Aktivierungsstatus von Mechanismen der DNA-Schadensantwort mittels (phospho)spezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (Sofort, 1 h, 4 h und 6 h) untersucht (n = 2, N = 1). Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. K: unbehandelte Kontrolle. mESC: *mouse embryonic stem cells*, EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, IR: *ionizing radiation*, RAD51: *RAD51 homolog*, MSH2: *MutS protein homolog 2*, BRCA1: *breast cancer 1*, PARP: *poly(ADP-ribose) polymerase 1*, HMOX1: *heme oxygenase 1*, p-P53: phosphoryliertes Tumorsuppressorprotein, p-CHK1: phosphorylierte Checkpointkinase 1, p-KAP1: phosphoryliertes *KRAB-associated protein 1*, p-SMC1: phosphoryliertes *Structural maintenance of chromosomes protein 1A*, IR: ionisierende Strahlung.

Die Untersuchungen zur zellulären Schadensantwort bzw. Stressantwort mittels Western-Blot zeigten nur geringe Unterschiede zwischen den beiden DNA-schädigenden Substanzen. So konnte nach einer Behandlung mit Doxorubicin eine Erhöhung der Expression von MSH2 ebenfalls nur in den mESC induziert werden (Abbildung 3. 20). Die Spaltung von PARP wurde in mESC und EC nach einer Behandlung mit Doxorubicin deutlicher sichtbar als nach Bestrahlung der Zellen. In SMC konnte weder nach Bestrahlung noch nach Doxorubicin eine Spaltung von PARP nachgewiesen werden. Nur mESC und EC reagierten auch auf eine Doxorubicinbehandlung mit einer Phosphorylierung von P53 (p-P53). Eine Aktivierung von CHK1 nach Doxorubicinbehandlung war hingegen in mESC und EC zu detektieren. Ebenso wie nach Bestrahlung zeigten mESC als Reaktion auf die Doxorubicinbehandlung eine deutlich stärkere durch ATM-katalysierte S437 Phosphorylierung von KAP1 als EC, wohingegen in SMC p-KAP1 nicht nachweisbar war. Eine Phosphorylierung von SMC1 (p-SMC1) konnte nach einer Behandlung mit Doxorubicin in mESC nachgewiesen werden.

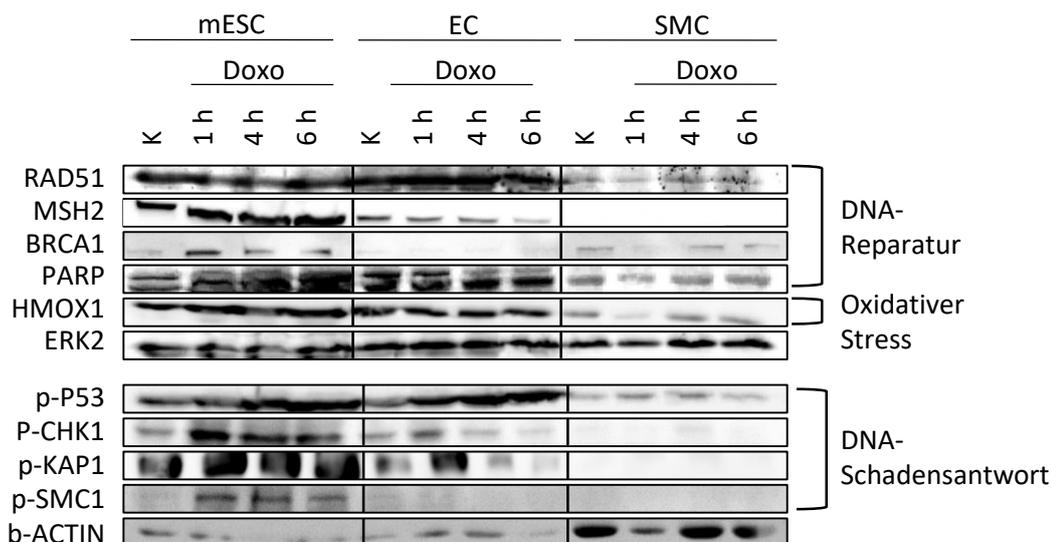


Abbildung 3. 20: Aktivierung von DNA-Schadensantworten in undifferenzierten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Doxorubicinbehandlung.

Die Zellen wurden 2 h mit Doxorubicin (1 μ M) behandelt und anschließend wurde der Aktivierungsstatus von Mechanismen der DNA-Schadensantwort mittels (phospho)spezifischer Antikörper in Western Blot-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Doxorubicinbehandlung (Sofort, 1 h, 4 h und 6 h) untersucht (n = 2, N = 1). Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin sowie der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) dienen als Ladekontrolle. K: unbehandelte Kontrolle, mESC: *mouse embryonic stem cells*, EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, Doxo: Doxorubicin, RAD51: *RAD51 homolog*, MSH2: *MutS protein homolog 2*, BRCA1: *breast cancer 1*, PARP: *poly(ADP-ribose) polymerase 1*, HMOX1: *heme oxygenase 1*, p-P53: phosphoryliertes Tumorsuppressorprotein, p-CHK1: phosphorylierte Checkpointkinase 1, p-KAP1: phosphoryliertes *KRAB-associated protein 1*, p-SMC1: phosphoryliertes *Structural maintenance of chromosomes protein 1A*.

Zusätzlich wurde die Viabilität der Zellen 72 Stunden nach Kontakt mit den Genotoxinen mittels eines Alamar Blue-Assays untersucht (Abbildung 3. 21). Zudem wurde mittels Zellzyklusanalyse die SubG1-Fraktion als Indikator für apoptotische Zellen gemessen (Abbildung 3. 22). Im Alamar Blue-Assay reduzieren lebende Zellen den blauen, wasserlöslichen, nicht-fluoreszierenden Farbstoff Resazurin zu rosafarbenem, fluoreszierendem Resorufin, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann und als Maß für die Zellviabilität dient.

Wie zu erwarten war, nahm die Viabilität der mESC und EC mit steigender Konzentration sowohl nach Behandlung mit Doxorubicin als auch nach Bestrahlung ab. Erstaunlicherweise hatte weder eine Bestrahlung noch eine Doxorubicinbehandlung einen Einfluss auf die Viabilität der SMC. 1 Gy IR und 0,01 μ M Doxorubicin hatten einen vergleichbaren Effekt auf die Viabilität der Zellen. mESC reagierten auf beide Genotoxine am sensitivsten.

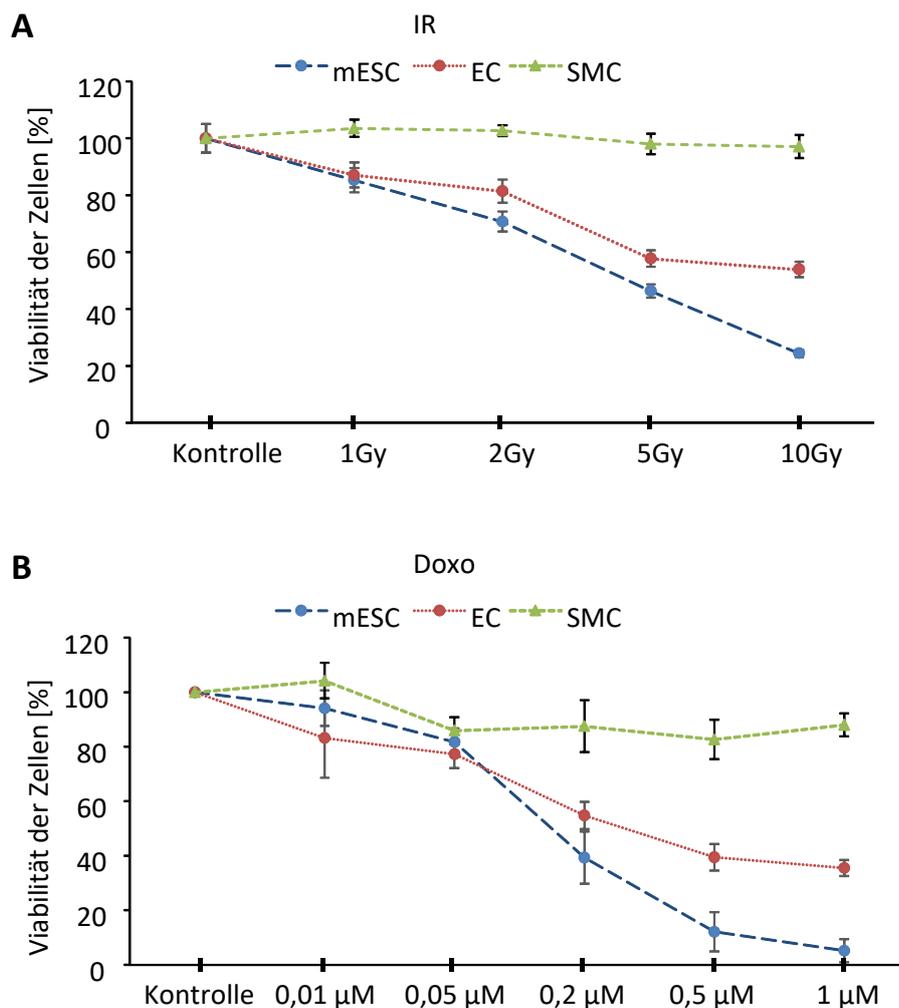


Abbildung 3. 21: Viabilitätsuntersuchungen von undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Behandlung mit Genotoxinen.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen ionisierender Strahlung (A) (1 Gy, 2 Gy, 5 Gy und 10 Gy) und Doxorubicin (B) (0,01 µM, 0,05 µM, 0,2 µM, 0,5 µM und 1 µM) behandelt. 72 h später wurde die Viabilität der Zellen mittels Alamar Blue-Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent relativ zur unbehandelten Kontrolle, welche auf 100 % gesetzt wurde ($n = 3$, $N = 3$). IR: *ionizing radiation*, Doxo: Doxorubicin, mESC: *mouse embryonic stem cells*, EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*.

Durch IR wurde in allen Zellen Apoptose induziert, was an der Zunahme der SubG1 Fraktion des Zellzyklus sichtbar wurde (Abbildung 3. 22 A). Bei Dosen von 2 und 5 Gy reagierten mESC verstärkt mit der Einleitung des programmierten Zelltodes, wohingegen die prozentuale Zunahme in der SubG1 Fraktion nach einer Bestrahlung mit hohen IR Dosen (10 Gy) in allen Zelltypen vergleichbar stark war. Eine Behandlung mit Doxorubicin führte, auch mit hohen Konzentration von 1 µM nur zu einer Induktion der Apoptose in mESC und EC. Bei SMC konnte keine prozentuale Zunahme in der SubG1 Fraktion beobachtet werden. Betrachtet man den Zellzyklus der drei Zelltypen nach Exposition mit Doxorubicin genauer, wird deutlich, dass mESC und EC verstärkt mit der Einleitung

der Apoptose auf das Genotoxin reagierten (Abbildung 3. 22 B). Auf die Zellzyklusverteilung der SMC hingegen hatte Doxorubicin kaum Auswirkungen.

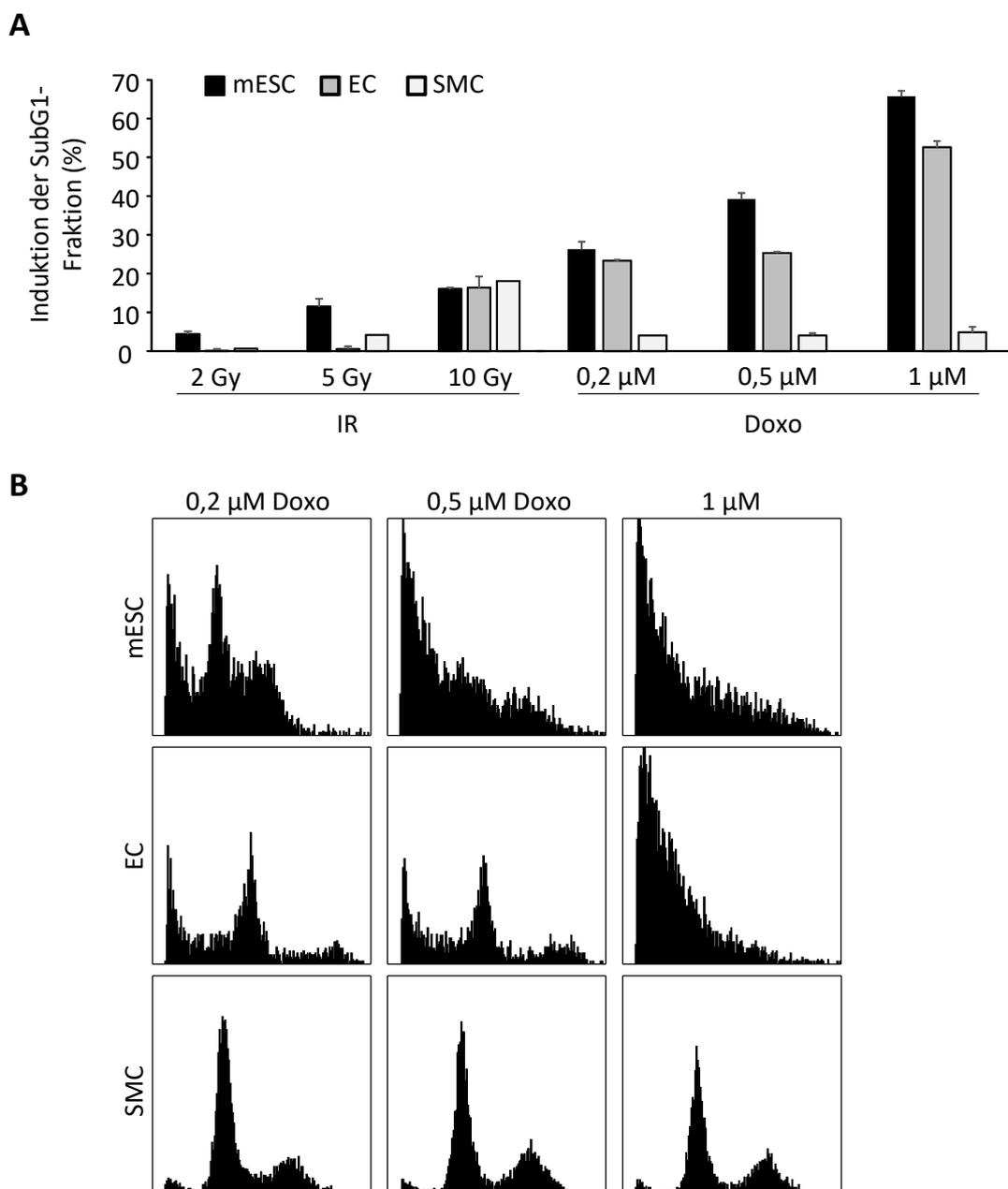


Abbildung 3. 22: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Bestrahlung und Behandlung mit Doxorubicin. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt (2 Gy, 5 Gy und 10 Gy) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin behandelt (2 h Pulsbehandlung 0,2 μ M, 0,5 μ M und 1 μ M). 48 h später wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. A: Prozentuale Induktion der SubG1-Fraktion nach Kontakt zu den Genotoxinen. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung in Prozent. ($n \geq 2$, $N = 3$) B: Exemplarische Zellzyklusverteilungen nach Behandlung mit Doxorubicin. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, mESC: *mouse embryonic stem cells*.

3.2.4 Einfluss von Genotoxinen auf das vaskuläre Differenzierungspotential von Progenitorzellen

Von medizinischer Relevanz ist nicht nur die Auswirkung von Genotoxinen auf bereits differenzierte Zellen, sondern auch auf Progenitorzellen (Vorläuferzellen), die für die Regenerationsfähigkeit bestimmter Zelltypen und Gewebe bedeutsam sind. Multipotente adulte Stamm- bzw. Progenitorzellen finden sich in fast allen menschlichen Organen. So fungiert beispielsweise das Knochenmark als Reservoir für viele verschiedene Progenitorpopulationen, wie beispielsweise hematopoetische Stammzellen, mesenchymale Stammzellen und endotheliale Stammzellen (Ballas et al. 2002). Kommt es in einem Gewebe zu einer Verletzung, wird dessen Regenerierung durch die Aktivierung und Differenzierung spezifischer Progenitorzellen in Gang gesetzt (Ceafalan et al. 2014). Ebenso finden sich in Blutgefäßen mesodermale Stammzellen (Chen CW, Corselli M, Péault B 2012). Um die Auswirkungen von Genotoxinen auf sich differenzierende Progenitorzellen zu untersuchen, wurden die Zellen an Tag 4 der Differenzierung bestrahlt oder mit Doxorubicin behandelt (Abbildung 3. 23). Im Anschluss an die Differenzierung wurden die Zellen nach Tag 6 (EC) und Tag 15 (SMC) hinsichtlich ihres Phänotyp und ihrer Funktionalität mit den zuvor ausgewählten Methoden (Abschnitt 3.2) charakterisiert. In Abbildung 3. 23 ist das Schema der Schädigung skizziert. Der Zeitpunkt der Schädigung wurde bewusst an Tag 4 der Differenzierung gewählt, da sich die Zellen dort schon zu mesodermalen Progenitorzellen differenziert hatten und diese bei der Gefäßerneuerung *in vivo* die entscheidende Rolle spielen. Zudem exprimierten die Zellen an Tag 4 die Endothelzellmarker Flk1 und VE-Cadherin auf mRNA Ebene nur schwach und waren Pecam1 negativ, auf Proteinebene wurden die Endothelzellmarker zu diesem Zeitpunkt so gut wie nicht exprimiert (Abbildung 3. 25). Nach Einwirkung der Genotoxine wurden die Differenzierungen wie gewohnt abgeschlossen und die Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktionalität untersucht, um die Auswirkung einer Schädigung der Progenitorzellen auf ihr Differenzierungspotential zu analysieren.

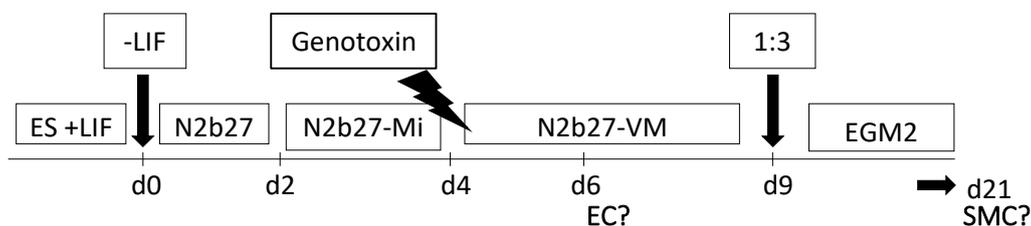


Abbildung 3. 23: Übersicht über den Zeitpunkt der Schädigung der Zellen im Verlauf der Differenzierung.

Die Abbildung zeigt schematisch den Zeitpunkt der Schädigung mit Genotoxinen an Tag 4 der Differenzierung. Nach Einwirkung der Genotoxine (ionisierende Strahlung oder Doxorubicin) wurde die Differenzierung bzw. Transdifferenzierung wie gewohnt fortgeführt. ES: Stammzellkultivierungsmedium, LIF: *leukemia inhibitory factor*, N2b27: Prädifferenzierungsmedium, N2b27-Mi: Medium zur Mesoderminduktion, N2b27-VM: Medium zur Endothelinduktion, EGM2: glattes Muskelzelldifferenzierungsmedium, EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*.

3.2.4.1 Vaskuläres Differenzierungspotential mesodermaler Progenitorzellen nach Bestrahlung

Zunächst wurden die Zellen an Tag 4 der Differenzierung unterschiedlichen Intensitäten ionisierender Strahlung ausgesetzt (1 Gy, 2 Gy, 5 Gy und 10 Gy). In Abbildung 3. 24 A ist zu erkennen, dass die Zellen 6 Tage nach Beginn der Endothelzellendifferenzierung trotz Bestrahlung an Tag 4 eine kopfsteinplasterförmige Morphologie aufwiesen. Selbst eine Bestrahlung mit 10 Gy, welche zu einem Viabilitätsverlust von mehr als 80 % in den Progenitorzellen führte, hatte keinen Einfluss auf das Differenzierungspotential der überlebende Zellpopulation. Allerdings fanden sich deutlich weniger differenzierte Zellen in der Zellkultururschale. Die Viabilität der Progenitorzellen wurde 72 h nach einer Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen mittels Alamar Blue-Assays untersucht (Abbildung 3. 24 B). Die Viabilität der Zellen nahm, mit steigender Strahlendosis ab. Bereits bei einer Strahlung von 5 Gy reduzierte sich die Viabilität der Zellen um 50 %.

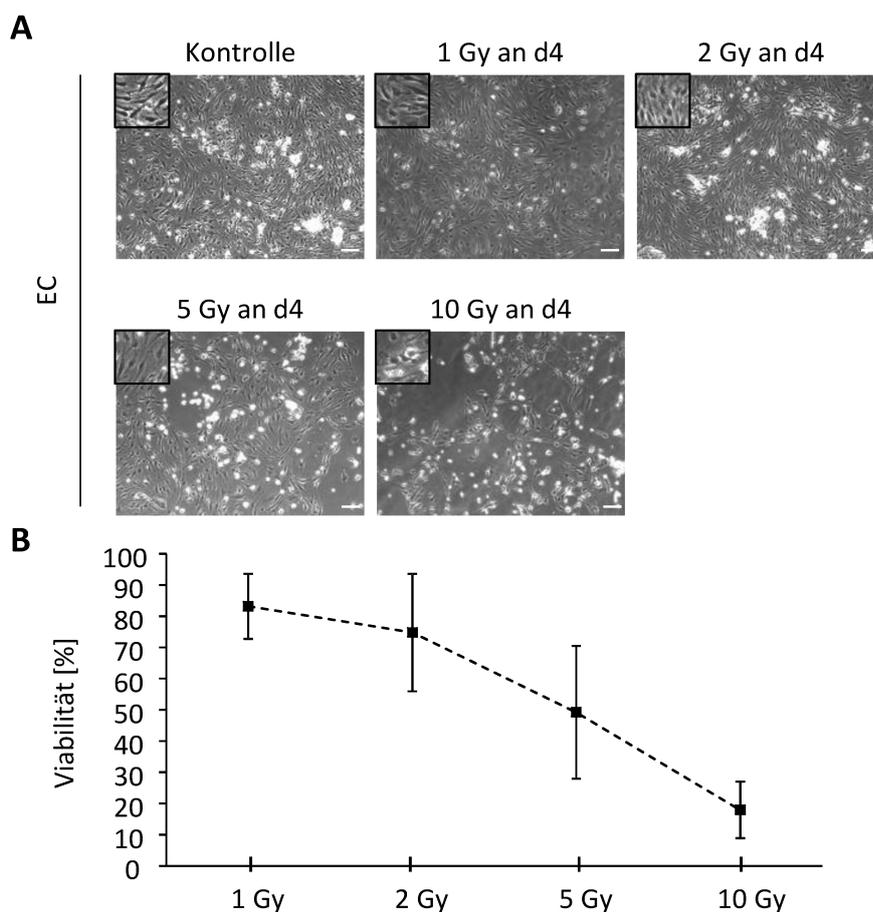


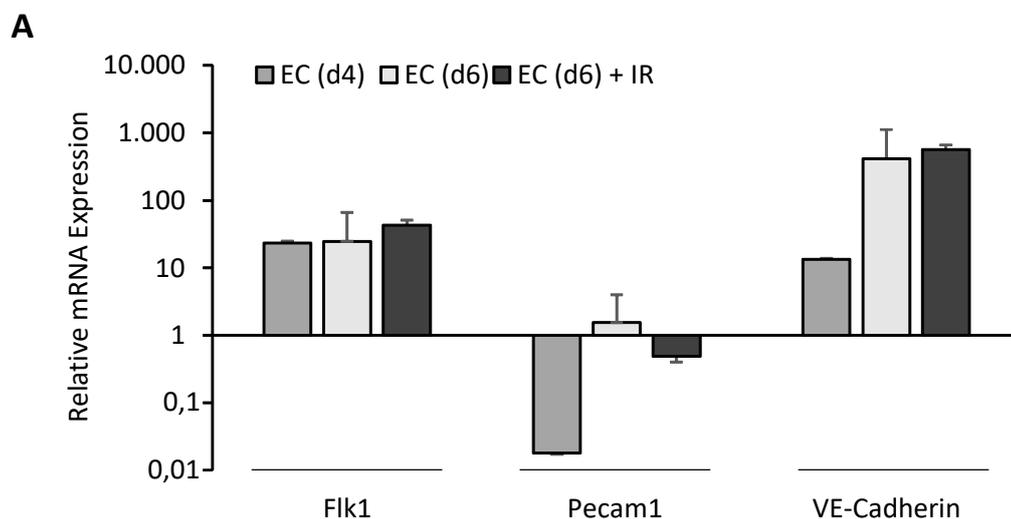
Abbildung 3. 24: Einfluss unterschiedlicher Strahlungsdosen auf die Endothelzellendifferenzierung und die Viabilität der Zellen.

A: Auswirkungen der Strahlung auf die typische Morphologie der Zellen nach 6 Tagen Differenzierung in Richtung Endothel. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μ M. B: Viabilitätsmessung mittels Alamar Blue-Assay. Die Zellen wurden an Tag 4 (d4) der Endothelzellendifferenzierung unterschiedlichen Dosen ionisierender Strahlung (1 Gy, 2 Gy, 5 Gy und 10 Gy) ausgesetzt und 72 h später mittels Alamar Blue-Assay hinsichtlich ihrer Viabilität

untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent relativ zur unbehandelten Kontrolle, welche auf 100 % gesetzt wurde ($n = 3$, $N = 3$).

Für die weiteren Analysen wurden Dosen gewählt, die zu einem 20 %igem Viabilitätsverlust der Zellen führten. Es sollte festgestellt werden, ob die überlebenden Zellen, trotz der Strahlenexposition, in der Lage waren in funktionell kompetente EC und SMC zu differenzieren. Daher wurden die Zellen für die folgenden Versuche mit 1 Gy ionisierender Strahlung bestrahlt.

Abbildung 3. 25 zeigt deutlich, dass 1 Gy Bestrahlung keinen Effekt auf den Phänotyp der differenzierten Zellen hatte. Sie exprimierten, wie die unbehandelte Kontrolle die Endothelzellmarker Flk1 und VE-Cadherin sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene. Zwar war die Pecam1 mRNA Expression nach Bestrahlung deutlich vermindert, auf Proteinebene konnte PECAM1 aber deutlich nachgewiesen werden.



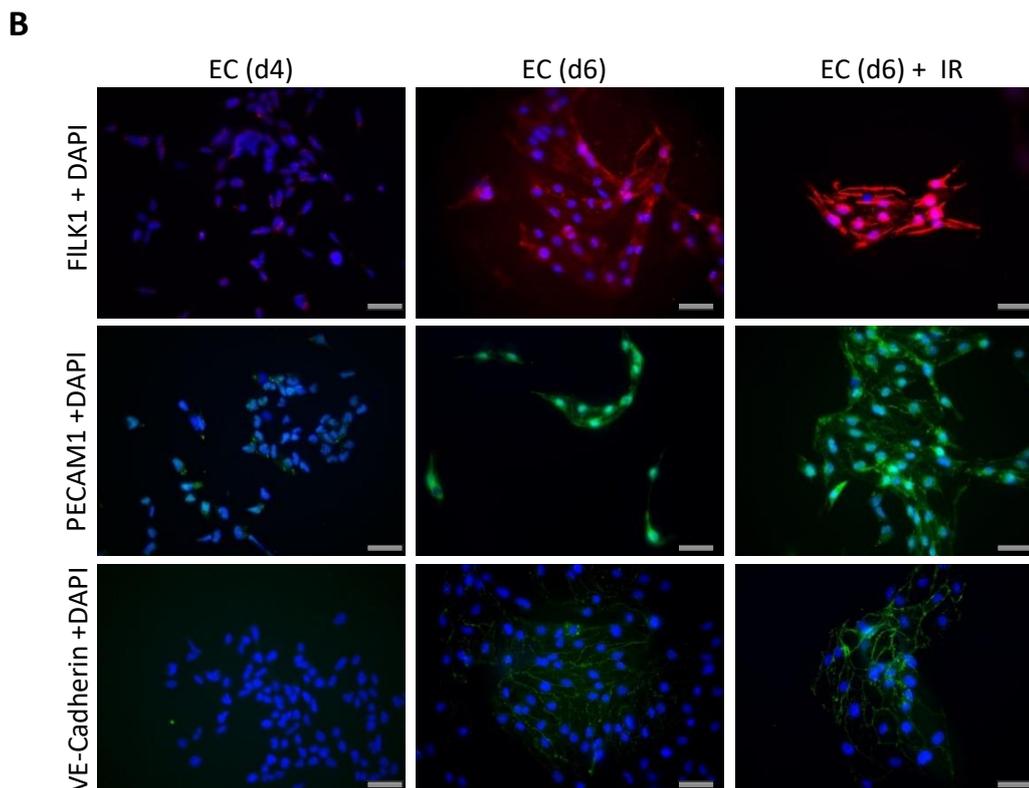


Abbildung 3. 25: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Bestrahlung mit 1 Gy an Tag 4.

Die Zellen wurden an Tag 4 (d4) und Tag 6 (d6) der Endothelzellendifferenzierung, sowie an Tag 6 nachdem sie an Tag 4 der Differenzierung bestrahlt wurden (1 Gy) hinsichtlich ihrer Endothelzellmarkerexpression untersucht. A: Quantitative Real-time PCR Analyse der Endothelzellmarker VE-Cadherin, Flk1 und Pecam1. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde (n = 3, N = 1) B: Immunzytochemische Analysen der Proteinexpression von FLK1, VE-Cadherin und PECAM1 an Tag 4 und Tag 6 der Endothelzellendifferenzierung. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Maßstabsleiste beträgt 50 µm. EC: *endothelial cells*, IR: *ionizing radiation*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, Pecam1: *platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*, CD31, VE-Cadherin: *vascular epithelium cadherin*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Die während ihrer Differenzierung bestrahlten Zellen waren zudem in der Lage LDL aufzunehmen (Abbildung 3. 26 A). Da die mesodermalen Progenitorzellen (d4) noch nicht zur LDL-Aufnahme fähig waren, handelte es sich hierbei um eine im restlichen Verlauf der Differenzierung trotz Bestrahlung erworbene Fähigkeit. Auch auf die Gefäßbildung hatte die Bestrahlung keinen Einfluss, diese Fähigkeit ist den Zellen also durch eine Bestrahlung nicht verloren gegangen (Abbildung 3. 26).

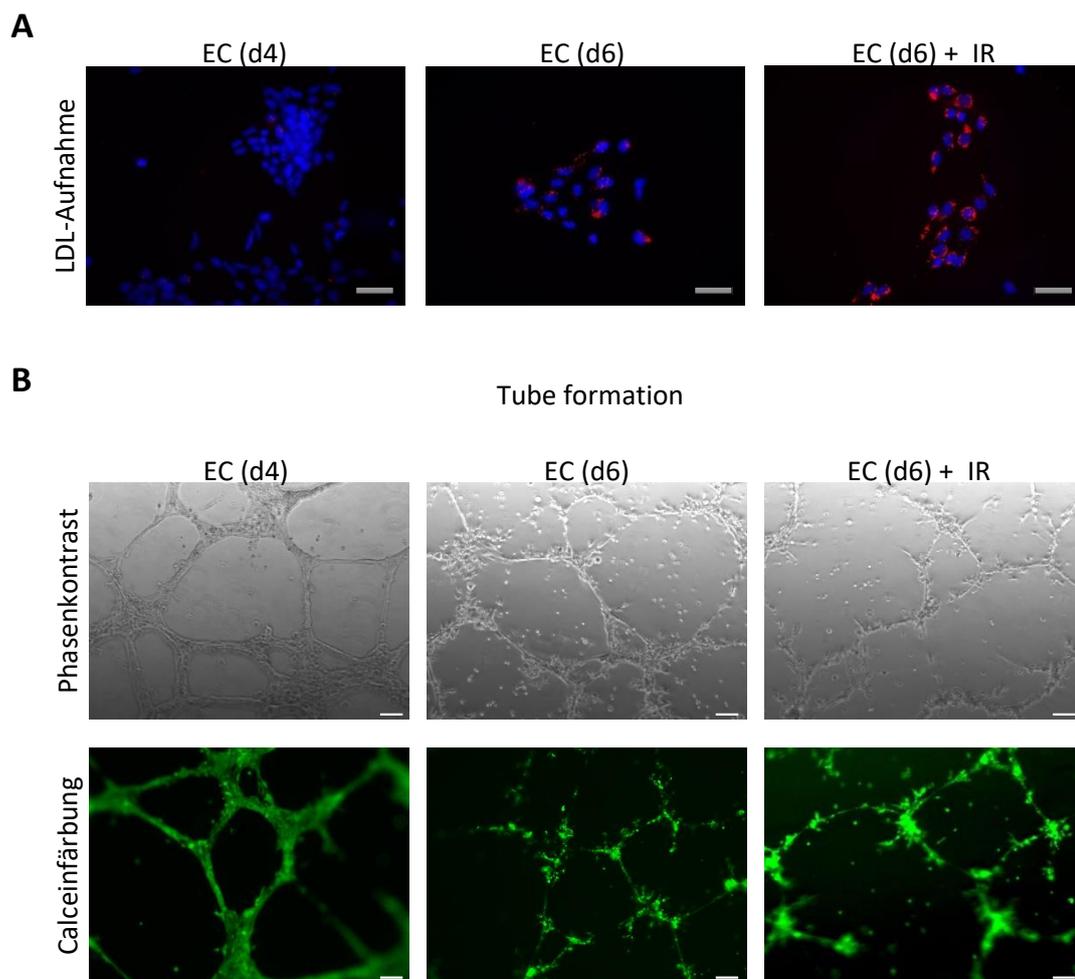


Abbildung 3. 26: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Bestrahlung.

A: Die Fähigkeit der aus mESC abgeleiteten EC nach Bestrahlung (an Tag 4, 1 Gy) zur LDL-Aufnahme wurde analysiert und mit den Progenitorzellen (EC d4) und unbestrahlten EC (d6) verglichen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. B: Um das angiogenetische Potential der EC nach Strahlenexposition zu analysieren wurde ein Tube Formation-Assay durchgeführt und mit den Progenitorzellen (EC d4) und unbestrahlten EC (d6) verglichen. Zusätzlich wurden die Zellen mit Calcein angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . LDL: *low density lipoprotein*, EC: *endothelial cells*, IR: *ionizing radiation*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Auch auf eine Transdifferenzierung der EC in SMC hatte eine geringe Strahlendosis von 1 Gy keinen negativen Einfluss. Abbildung 3. 27 fasst die Charakterisierung der SMC nach Einfluss von Strahlung zusammen. Trotz Bestrahlung an Tag 4 der Differenzierung zeigten sie an Tag 15 die für glatte Muskelzellen typische spindelförmige Morphologie (Abbildung 3. 27 A). Ebenso exprimierten sie die typischen Markergene αSMA , Calponin, Smoothelin und Transgelin auf mRNA Ebene (Abbildung 3. 27 B). Auch auf Proteinebene konnten die einzelnen Aktinfilamente in den von bestrahlten Progenitorzellen abgeleiteten SMC deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 3. 27 C).

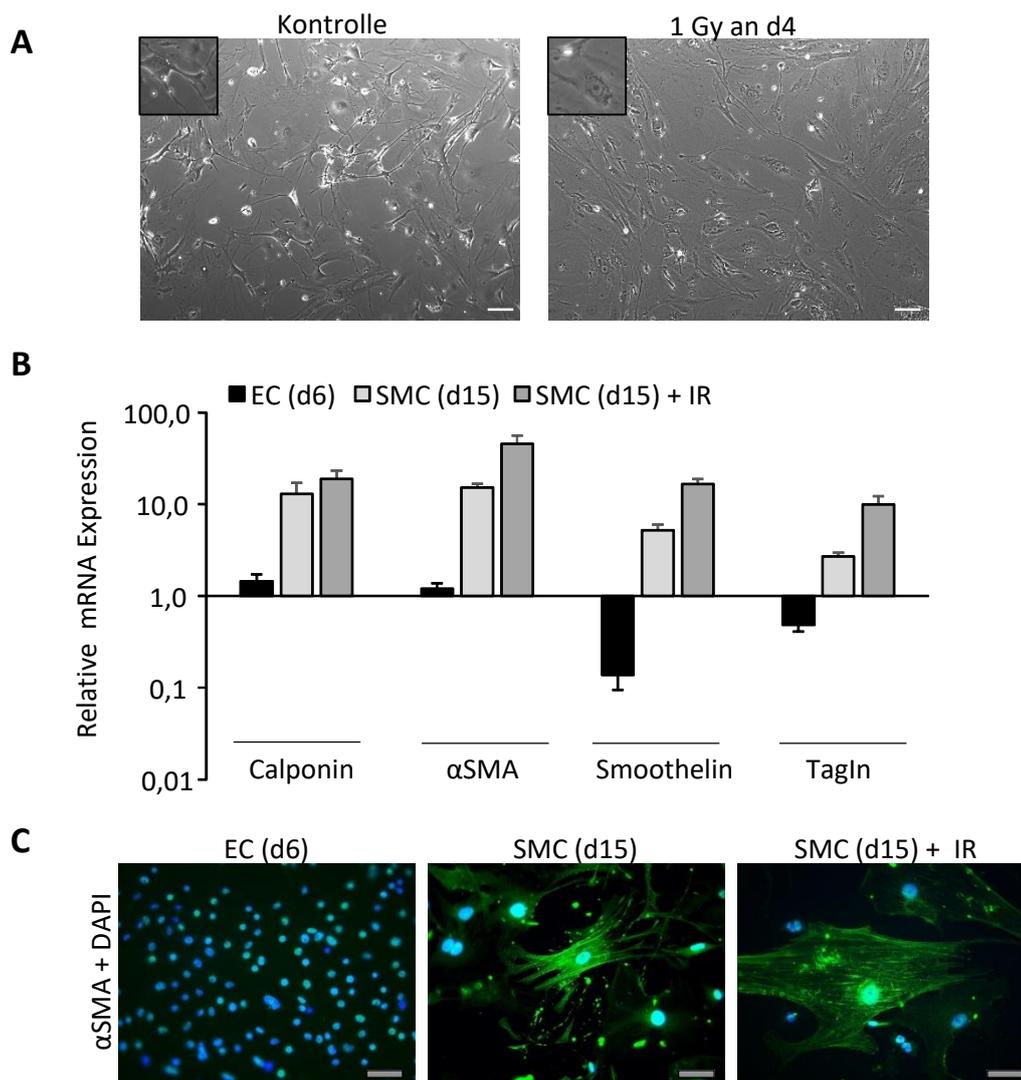


Abbildung 3. 27: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen nach Bestrahlung mit 1 Gy an Tag 4.

Die Zellen wurden an Tag 4 (d4) der Endothelzelldifferenzierung bestrahlt (1 Gy) und anschließend (an Tag 6, d6) in SMC transdifferenziert. A: Die Morphologie der Zellen und die Expression von Markergenen wurden mit unbestrahlten Zellen verglichen. B: Quantitative Real-time PCR Analyse der glatten Muskelzellmarker Calponin, αSMA, Smoothelin und Tagln. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde (n = 3, N = 1). C: Immunzytochemische Analysen der Proteinexpression von αSMA an Tag 15 (d15) der glatten Muskelzelldifferenzierung im Vergleich zu Endothelzellen und nicht bestrahlten Zellen. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Maßstabsleiste beträgt 50 µm. EC: *endothelial cells*, SMC: *smooth muscle cells*, IR: *ionizing radiation*, Calponin: *basic smooth muscle calponin 1*, αSMA: *alpha smooth muscle actin*, Tagln: *transgelin*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, Gapdh: *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*.

Zusätzlich konnte gezeigt werden (Abbildung 3. 28), dass die aus bestrahlten EC transdifferenzierten SMC, ebenso wie die nicht im Verlaufe der Differenzierung bestrahlten SMC in der Lage waren zu kontrahieren und intrazelluläres Calcium nach Stimulation mit Carbachol freizusetzen. Als interne Versuchskontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit ATP stimuliert, um sicherzustellen, dass der Assay funktioniert hat, auch wenn die Zellen nicht auf Carbachol reagiert hätten. In vorigen Experiment konnte gezeigt werden, dass SMC P2Y-Rezeptoren exprimieren

(Daten nicht gezeigt), welche durch ATP stimuliert werden und zu einer intrazellulären Calciumfreisetzung führen.

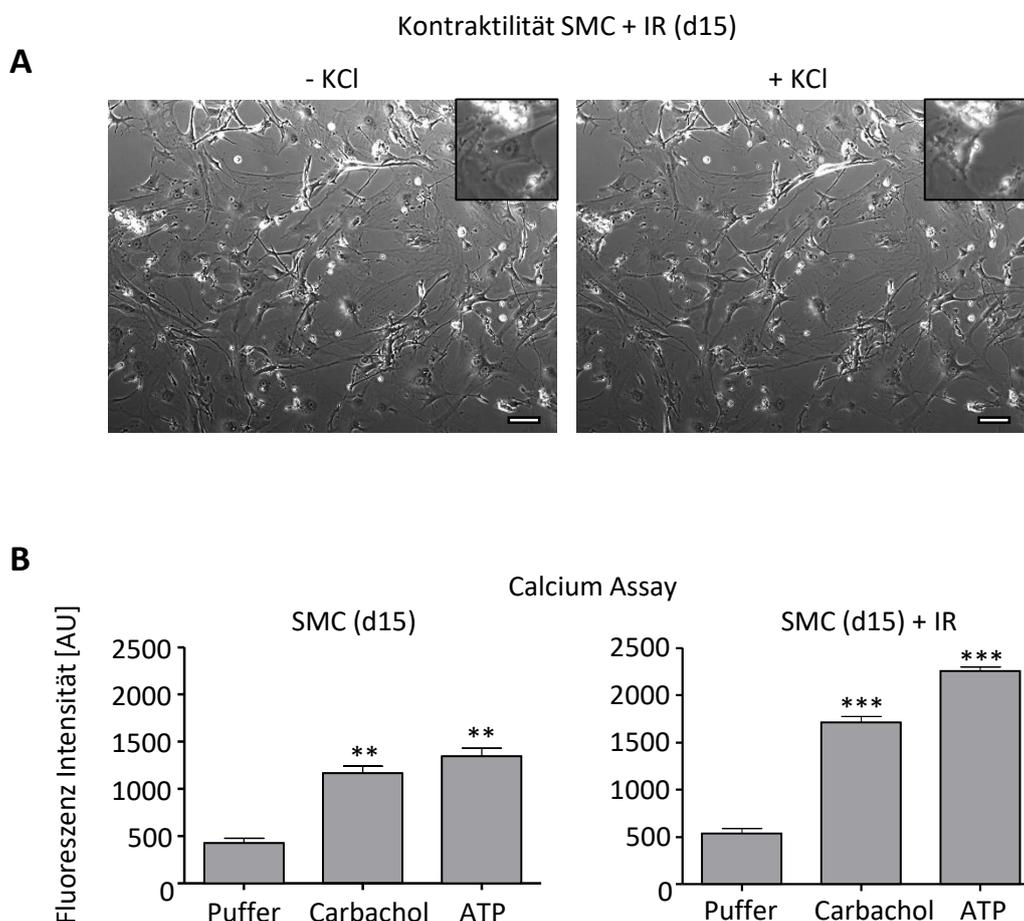


Abbildung 3. 28: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen nach Bestrahlung mit 1 Gy an Tag 4.

A: SMC (d15) + IR wurden 30 min mit 50 mM Kaliumchlorid (KCl) behandelt. Es wurden Aufnahmen der Zellen in 10 s Intervallen gemacht. Dabei ist ein Zusammenziehen der Zellen (Kontraktion) zu beobachten ($n = 1$, $N = 3$). Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . B: An Tag 15 (mit und ohne Bestrahlung an Tag 4 (d4) der Differenzierung) der Differenzierung wurden die SMC mit Carbachol (316 μM) und ATP (Positivkontrolle, 10 μM) behandelt. Anschließend wurde der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gemessen. ($n = 3$, $N = 2$). ** $p \leq 0,01$ (SMC (d15), Puffer verglichen mit Carbachol und ATP), *** $p \leq 0,01$ (SMC (d15) + IR, Puffer verglichen mit Carbachol und ATP). AU: *arbitrary units*, SMC: *smooth muscle cells*, KCl: Kaliumchlorid, IR: *ionizing radiation*, ATP: Adenosintriphosphat.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Bestrahlung der mesodermalen Progenitorzellen mit geringen Dosen IR keinen Einfluss auf ihr Differenzierungspotential in funktionell kompetente EC und SMC hatte. Um die Auswirkungen eines weiteren Genotoxins auf das Differenzierungspotential der Progenitorzellen zu untersuchen, wurden die Zellen in den folgenden Experimenten mit Doxorubicin behandelt.

3.2.4.2 Vaskuläres Differenzierungspotential mesodermaler Progenitorzellen nach Behandlung mit Doxorubicin

Um die Auswirkung eines weiteren Genotoxins auf das vaskuläre Differenzierungspotential mesodermaler Progenitorzellen zu untersuchen, wurden die Zellen an Tag 4 der Endothelzell-differenzierung für zwei Stunden mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen (0,01 μM , 0,05 μM , 0,2 μM , 0,5 μM und 1 μM) behandelt und die Differenzierung in EC und Transdifferenzierung in SMC wie gewohnt fortgeführt. Ebenso wie nach der Bestrahlung der Zellen, wurden sie im Anschluss daran anhand ihrer Morphologie und ihrer Viabilität beurteilt (Abbildung 3. 29).

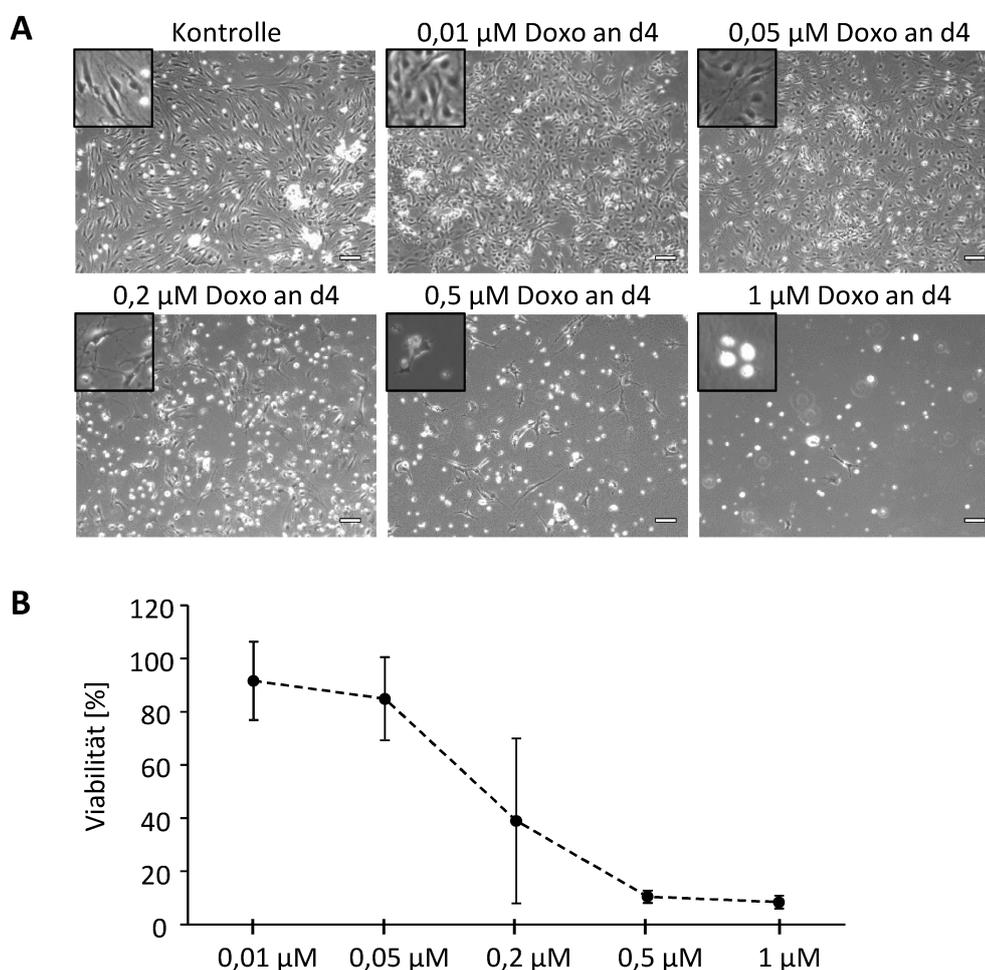


Abbildung 3. 29: Einfluss unterschiedlicher Doxorubicinkonzentrationen auf die Endothelzelldifferenzierung und die Viabilität der Zellen.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen (0,01 μM , 0,05 μM , 0,2 μM , 0,5 μM und 1 μM , 2 h Pulsbehandlung) behandelt und die Auswirkungen auf die Differenzierung untersucht.

A: Auswirkungen der Doxorubicinbehandlung auf die Morphologie der Zellen nach 6 Tagen Differenzierung in Richtung Endothel. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . B: Viabilitätsmessung mittels Alamar Blue-Assay. Die Zellen wurden an Tag 4 der Endothelzelldifferenzierung den unterschiedlichen Konzentrationen des Genotoxins ausgesetzt und 72 h später hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen in Prozent relativ zur unbehandelten Kontrolle, welche auf 100 % gesetzt wurde (n = 3, N = 3). Doxo: Doxorubicin.

Sowohl eine Behandlung mit 0,01 μM oder 0,05 μM Doxorubicin hatten keinen Einfluss auf die Entwicklung der für Endothelzellen spezifischen kopfsteinpflasterartigen Morphologie der Zellen. Außerdem nahm die Viabilität der Zellen, bei diesen Konzentrationen lediglich um 10 % ab. Höhere Doxorubicinkonzentrationen verhinderten eine Endothelzelldifferenzierung und hatten drastische Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen. Für die weiteren Analysen wurde, wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, eine Konzentration ausgewählt, die makroskopisch keinen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen hat. Es sollte überprüft werden, ob diese Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin trotzdem Endothelzellmarker exprimieren und funktionell sind und ob eine Transdifferenzierung in funktionell kompetente SMC möglich ist. Daher wurden die Zellen für die folgenden Versuche mit 0,01 μM Doxorubicin behandelt.

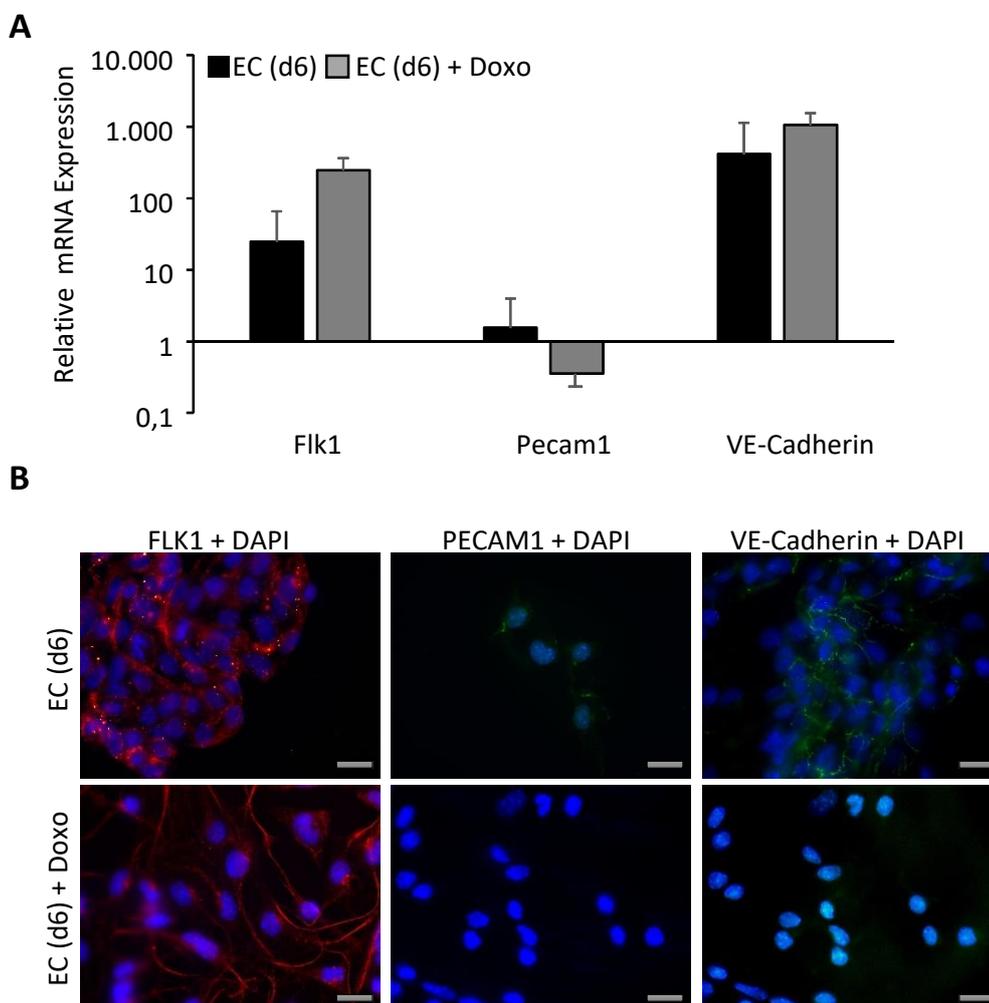


Abbildung 3. 30: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Behandlung mit Doxorubicin an Tag 4.

Die Zellen wurden an Tag 4 (d4) der Endothelzelldifferenzierung mit Doxorubicin (0,01 μM , 2 h Pulsbehandlung) behandelt und an Tag 6 hinsichtlich ihrer Endothelzellmarkerexpression untersucht. Die Expression wurde mit unbehandelten Zellen verglichen. A: Quantitative Real-time PCR Analyse der Endothelzellmarker Flk1, Pecam1 und VE-Cadherin. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde ($n = 3$, $N = 1$). B: Immunzytochemische Analysen der Proteinexpression von FLK1, PECAM1 und VE-

Cadherin an Tag 6 der Endothelzelldifferenzierung nach Doxorubicinbehandlung und in unbehandelten Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus einem Versuch. Maßstabsleiste = 50 μm . Doxo: Doxorubicin, EC: *endothelial cells*, IR: *ionizing radiation*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, Pecam1: *platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*, CD31, VE-Cadherin: *vascular epithelium cadherin*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Anhand der Abbildung 3. 29 ist zu erkennen, dass die mit 0,01 μM Doxorubicin behandelten Vorläuferzellen am Ende der Endothelzelldifferenzierung die für diese Zellen typische Morphologie aufweisen. Sie exprimierten weiterhin Flk1 und VE-Cadherin, die Pecam1 Expression hingegen war deutlich reduziert. Auf Proteinebene hingegen konnte lediglich eine FLK1 Expression und eine sehr schwache VE-Cadherin Expression nachgewiesen werden. PECAM1, der spezifischste Endothelzellmarker konnte in den behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3. 30).

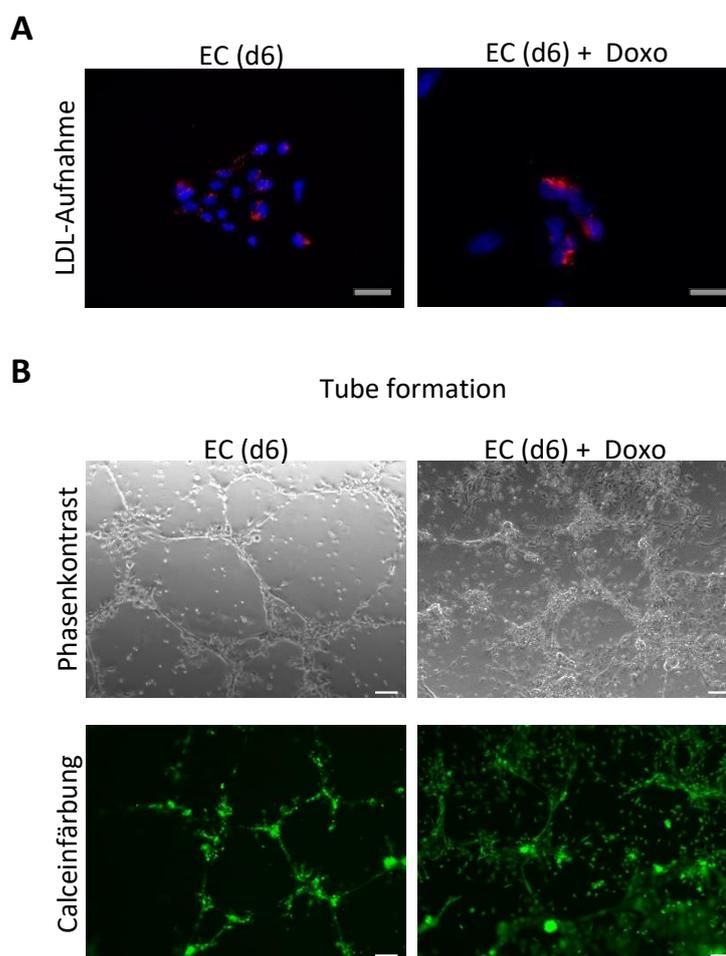


Abbildung 3. 31: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Doxorubicinbehandlung.

A: Die Fähigkeit der aus mESC abgeleiteten EC zur LDL-Aufnahmen, nach Einfluss von Doxorubicin (an Tag 4 (d4), 0,01 μM , 2 h Pulsbehandlung) wurde analysiert und mit unbehandelten EC (d6) verglichen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. B: Um das angiogenetische Potential der EC nach Doxorubicinbehandlung zu analysieren, wurde ein Tube Formation-Assay durchgeführt und mit den unbehandelten EC (d6) verglichen. Zusätzlich wurden die Zellen mit Calcein angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Färbungen aus einem

Versuch. Die Maßstabsleiste beträgt 50 μm . LDL: *low density lipoprotein*, EC: *endothelial cells*, IR: *ionizing radiation*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, Doxo: Doxorubicin.

Zudem waren die Zellen nach Doxorubicinbehandlung zwar in der Lage, LDL aufzunehmen, aber eine Gefäßbildung fand nur im Ansatz statt (Abbildung 3. 31).

Auch auf die Transdifferenzierung in SMC zeigte eine Behandlung mit Doxorubicin drastische Auswirkungen (Abbildung 3. 32). Sie zeigten nicht nur eine veränderte Morphologie, sondern exprimierten auch nur zwei der glatten Muskelzellmarker, Calponin und αSMA . Smoothelin wurde nicht exprimiert (Abbildung 3. 32 B). Zwar war die mRNA Expression von αSMA nach Behandlung mit Doxorubicin erhöht, aber auf Proteinebene konnte eine deutlich verminderte αSMA Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3. 32 C). Es wurde vermutlich nicht die komplette mRNA translatiert.

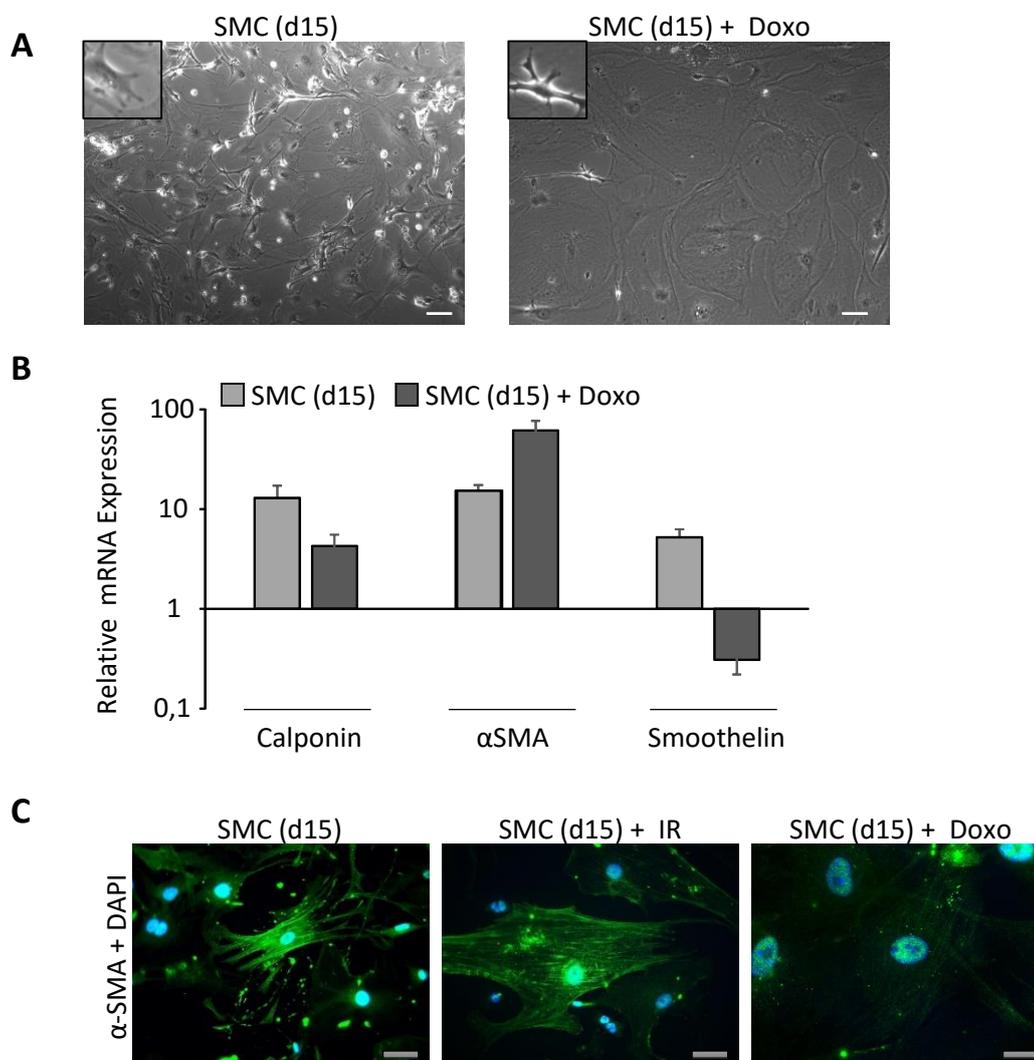


Abbildung 3. 32: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen nach Doxorubicinbehandlung.

Die Zellen wurden an Tag 4 (d4) der Endothelzelldifferenzierung mit Doxorubicin (0,01 μM , 2 h Pulsbehandlung) behandelt und anschließend (an Tag 6) in SMC transdifferenziert. A: Die Morphologie der

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Progenitorzellen deutlich sensitiver auf eine Behandlung mit Doxorubicin reagierten als auf eine Bestrahlung. Durch sehr geringe Doxorubicinkonzentrationen konnte eine Differenzierung in EC und SMC zwar nicht gänzlich verhindert werden, dennoch schienen die Zellen in ihrer Funktionsfähigkeit teilweise eingeschränkt zu sein. Unter *in vivo* Bedingungen könnte dies zu drastischen Konsequenzen führen. Die Regenerationsfähigkeit von Blutgefäßen könnte durch eine Doxorubicinbehandlung deutlich eingeschränkt werden, was wiederum zu Dysfunktionen führen würde.

Abbildung 3. 34 zeigt deutlich, dass eine Behandlung der Progenitorzellen mit verschiedenen Genotoxinen zu Unterschieden im Phänotyp der SMC führte. Nach einer Behandlung mit Doxorubicin war der Anteil an größeren und flacheren Zellen innerhalb der SMC Population, was auf einen synthetischen Phänotyp hindeutet, im Vergleich zu bestrahlten Progenitorzellen deutlich verstärkt.

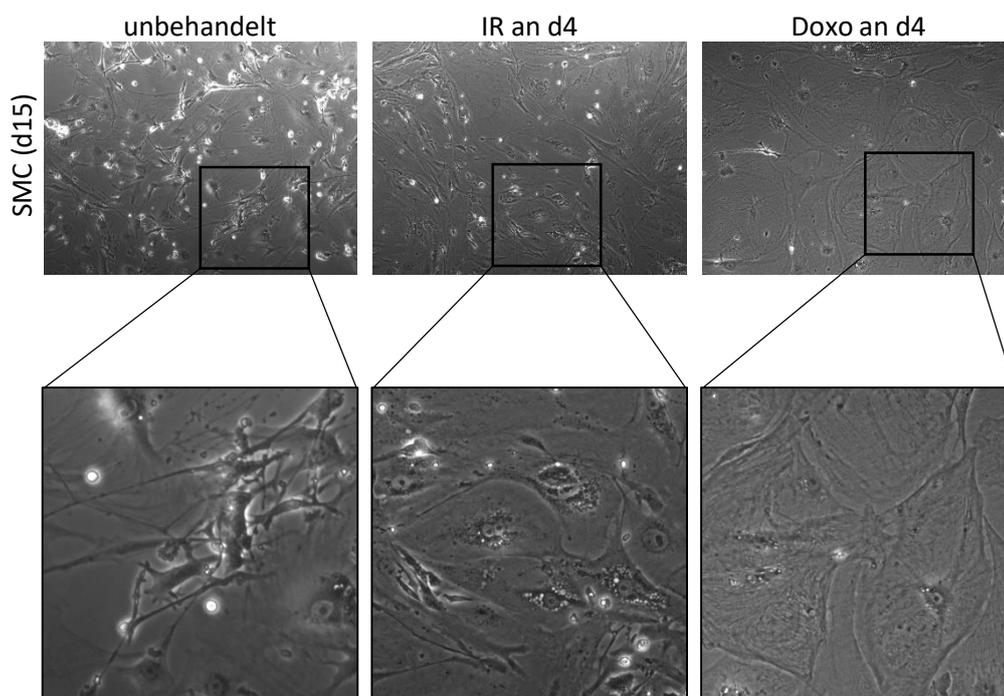


Abbildung 3. 34: Morphologie der differenzierten glatten Muskelzellen nach Einwirkung von Genotoxinen. Die Abbildung zeigt die Morphologie der SMC an Tag 15 (d15) ohne das Einwirken von Genotoxinen im Verlauf der Differenzierung (unbehandelt) und nach Exposition mit Strahlung (1 Gy) oder Doxorubicin (2 h Pulsbehandlung, 1 µM) an Tag 4 (d4) der Differenzierung. SMC: *Smooth muscle cells*, IR: *ionizing radiation*, Doxo: Doxorubicin.

Um der Fragestellung nachzugehen, weshalb bereits geringe Doxorubicinkonzentration von nur 0,2 µM und 0,5 µM die Differenzierung zu EC und SMC vollständig blockieren, wurde die DNA-Syntheseaktivität der Progenitorzellen 48 h nach Behandlung mit Doxorubicin untersucht. Dazu wurde ein EdU-Inkorporations-Assay verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen an Tag 6 der Endothelzelldifferenzierung (unbehandelt und an Tag 4 der Differenzierung mit Doxorubicin

behandelt) einem zwei stündigem EdU-Puls ausgesetzt. Bei EdU handelt es sich um ein modifiziertes Nukleosid, ein Thymidinanalogon, welches während der S-Phase in die DNA inkorporiert wird (Yu et al. 2009). Die so fluoreszenzmarkierten, in der S-Phase befindlichen, Zellen können somit mikroskopisch sichtbar gemacht werden und ihr Anteil an der gesamten Zellpopulation ist quantifizierbar und dient als Maßstab für die Proliferationsrate der Zellen. Zusätzlich wurde die Menge an apoptotischen Zellen untersucht. Ist der durch diese Doxorubicinkonzentrationen herbeigeführte DNA-Schaden zu groß, so kann entweder ein Zellzyklusarrest induziert oder Apoptose eingeleitet werden. Typische Anzeichen für die Apoptose sind eine Verkleinerung der Zellen mit Ausstülpungen auf der Zelloberfläche (*membrane blebbing*), die Abschnürung von apoptotischen Körperchen, die Kondensation des Chromatins und eine DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen. Um diese eventuellen morphologischen Veränderungen des Chromatins nach Doxorubicin-behandlung sichtbar zu machen wurden die Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt und die Menge der fragmentierten Zellkerne quantifiziert (Abbildung 3. 35).

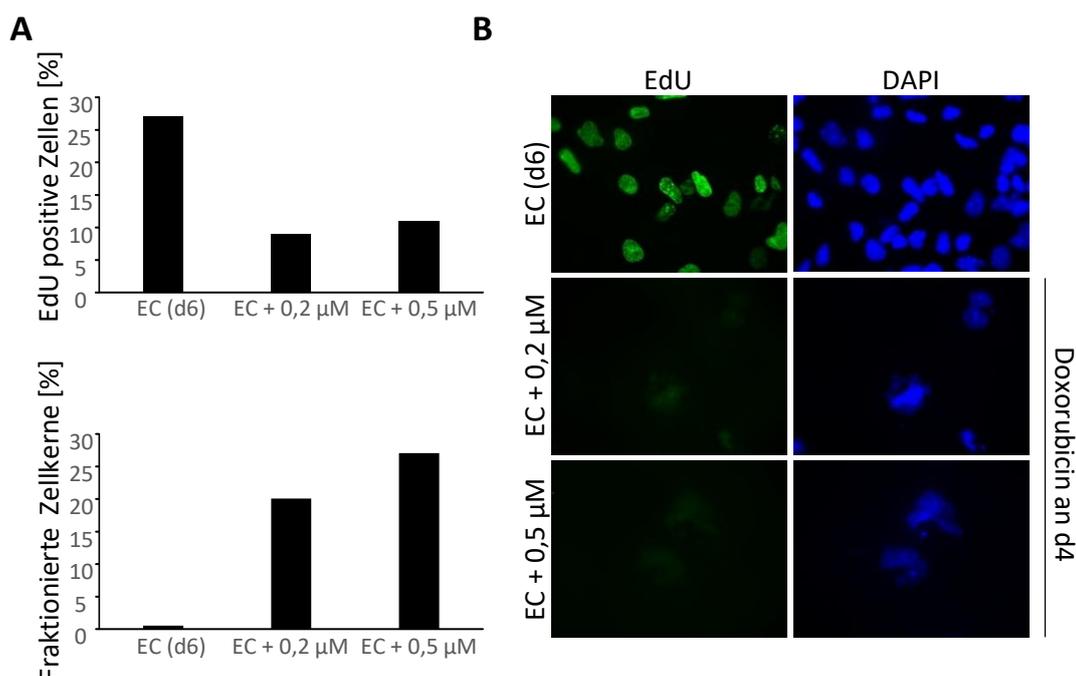


Abbildung 3. 35: Einfluss von Doxorubicin auf die Proliferation der mesodermalen Progenitorzellen und die Apoptoserate.

Die Zellen wurden an Tag 4 der Differenzierung mit Doxorubicin behandelt und 48 h später die DNA-Syntheseaktivität mittels EdU-Inkorporations-Assay und die Apoptoserate mittels DAPI-Färbung analysiert. A: Die Anteile an fragmentierten Zellkernen und EdU positive Zellen in Prozent. Pro Bedingung wurden 50 Zellen ausgezählt. B: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, EdU: 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, EC: *endothelial cells*.

Es zeigte sich eine deutliche Abnahme an EdU-positiven Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin. 0,2 μ M und 0,5 μ M scheinen dabei einen ähnlichen Effekt auf das Proliferationspotential der Zellen zu haben. Der Anteil an apoptotischen Zellen nach Behandlung der Progenitorzellen mit

Doxorubicin stieg deutlich an. Ohne die Doxorubicinbehandlung fanden sich so gut wie keine fragmentierten Zellkerne in der Zellpopulation, nach Behandlung mit Doxorubicin stieg die Anzahl auf bis zu 28 % an. So scheinen bereits Doxorubicinkonzentrationen von 0,2 μM nicht nur einen Einfluss auf die Proliferationskapazität der Zellen zu haben sondern auch irreparable DNA-Schäden zu hinterlassen, welche zur Einleitung der Apoptose führen und eine erfolgreiche Differenzierung der mesodermalen Vorläuferzellen in EC und SMC verhindern.

4 DISKUSSION

Während die zelltherapeutischen Anwendungen von Stammzellen größtenteils noch hypothetischer Natur sind, ist in den letzten Jahren der potentielle Nutzen von Stammzellen in der pharmakologisch-toxikologischen Forschung in den Vordergrund gerückt (Wobus & Löser 2011). Murine embryonale Stammzellen gelten als das beste *in vitro* Modellsystem für die Erforschung der Embryonalentwicklung bei Säugern. Vor allem die Möglichkeit die Embryonalentwicklung mit Stammzellen *in vitro* nachzubilden, macht sie interessant für embryotoxische Untersuchungen nach den Kriterien des 3R (*replace, reduce and refine*) Prinzips (Genschow et al. 2002; Scholz et al. 1999). Auch eignen sie sich für Toxizitätsuntersuchungen an differenzierten Zellen, da sie sich *in vitro* in eine Vielzahl spezifischer Zellen differenzieren lassen (Rohdewohld & Wobus 2002). Die toxische und mutagene Wirkung bestimmter Substanzen wird zurzeit meist an immortalisierten Zelllinien getestet. Ein großer Nachteil solcher Testsysteme ist allerdings die Tatsache, dass immortalisierte Zellen häufig Eigenschaften aufweisen, die nicht mit denen von primären Zellen übereinstimmen. So zeigen permanente Zelllinien häufig morphologische und genetische Veränderungen gegenüber den Zellen der Primärkultur. Primärkulturen wiederum sind schwer zugänglich oder schlecht zu kultivieren, da sie meist nach mehreren Generation absterben und nicht so stark proliferieren (Scott et al. 2013; Wobus & Löser 2011). Dass sich murine embryonale Stammzellen dazu eignen, die Wirkung von Pharmaka direkt an ihnen zu analysieren konnte bereits mehrfach gezeigt werden. So reagieren aus ES-Zellen der Maus differenzierte Kardiomyozyten in gleicher Weise wie Zellen aus dem Organismus auf herzaktive Pharmaka (Wobus et al. 1991; Maltsev et al. 1993).

Zudem eignen sich murine embryonale Stammzellen und daraus differenzierte Zelltypen hervorragend zur molekularen Analyse von differenzierungsabhängigen Veränderungen der genetischen Stabilität nach Einwirkung von Genotoxinen. Genetische Stabilität ist eine Grundvoraussetzung für eine spezifische Differenzierung, effektive regenerative Prozesse und die Aufrechterhaltung zelltypspezifischer Funktionen. Bisher verfügbare Studien konzentrieren sich hauptsächlich auf den Vergleich von mESC (*mouse embryonic stem cells*; embryonale Stammzellen der Maus) mit MEFs (murine embryonale Fibroblasten). Zwar werden so undifferenzierte Zellen mit differenzierten Zellen verglichen, allerdings haben sie nicht den gleichen genetischen Hintergrund. Außerdem ist es mit diesem Testsystem nicht möglich die Auswirkungen eines Genotoxins auf das Differenzierungspotential in einen spezifischen Zelltyp zu untersuchen. Um diese Untersuchungen zu ermöglichen wurde in der vorliegenden Arbeit eine direkte Differenzierungsmethode für die Stammzelllinie LF2 entwickelt, mit der sich Zellen des vaskulären Systems (EC und SMC) ableiten lassen.

Aufgrund ihrer Barrierefunktion innerhalb von Blutgefäßen sind Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen der höchsten Konzentration von systemisch vorhandenen Zyto- und Genotoxinen ausgesetzt, welche Stressantworten und Zelltod herbeiführen können. Effektive regenerative Mechanismen sind entscheidend, um den Schaden zu reparieren und so nachfolgende Dysfunktionen zu vermeiden.

4.1 VASKULÄRE DIFFERENZIERUNG DER MURINEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN

Die *in vitro* Kultivierung von mESC setzt Kulturbedingungen voraus, die einen undifferenzierten Status der Zellen gewährleisten. Nur so können die Zellen ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation und zur Differenzierung in spezifische Zelltypen beibehalten. In dieser Arbeit wurde eine Feeder-Zell freie Kultivierung, mit reduzierter Serumkonzentration des Mediums gewählt. Anstelle eines *Feeder-Layers* wurde dem Medium LIF (*leukemia inhibitory factor*) hinzugesetzt, um das Ausdifferenzieren der Stammzellen zu verhindern (Smith et al. 1988). Dies geschieht über die Aktivierung von drei Signalwegen: Jak-Stat3, PI3K-Akt und Shp2-MAPK. Entfernt man LIF aus dem Kulturmedium fangen die Zellen an zu differenzieren und verlieren ihre Pluripotenz (Ohtsuka et al. 2015). Um aus diesen mESC vaskuläre Zelltypen zu differenzieren, wurde eine Methode an die Stammzelllinie LF2 angepasst, die eine direkte Differenzierung in endothelähnliche Zellen mittels sogenannter kleiner Moleküle (*small molecules*) und Wachstumsfaktoren ermöglicht. Die Zellen standen sechs Tage nach Beginn der Differenzierung für anschließende Analysen zur Verfügung oder um in SMC transdifferenziert zu werden. Dies ermöglichte den direkten Vergleich zweier unterschiedlicher vaskulärer Zelltypen mit dem gleichen genetischen Hintergrund.

Zur endothelialen Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen existieren zahlreiche Publikationen. Viele dieser Protokolle enthalten aufwändige Reinigungsschritte, wie *magnetic cell separation* (Blancas et al. 2008), bei denen die Zellen anhand von bestimmten Oberflächenstrukturen voneinander separiert werden, um aus einem Gemisch von differenzierten Zellen eine möglichst reine Endothelzellpopulation zu erhalten. Außerdem finden die Differenzierungen häufig in sogenannten „*embryoid bodies*“ statt (Nishikawa et al. 2007). Dies sind dreidimensionale Aggregate, die sich bilden, wenn Stammzellen ohne Kontakt zu einer Oberfläche kultiviert werden. In dieser Form sind die Zellen für weitere Analysen, wie beispielsweise zur Ermittlung von DNA-Doppelstrangbrüchen oder andere immunzytochemische Färbungen, kaum zugänglich. Außerdem wäre eine Transdifferenzierung in SMC so ebenfalls nicht möglich gewesen. Daher wurde als Ausgangsbasis eine Methode gewählt (Chiang & Wong 2011), bei der die Differenzierung im Monolayer stattfindet und keine Reinigungsschritte nötig sind. Hierbei handelte es sich um eine direkte Differenzierung.

Nachdem die für die in dieser Arbeit verwendete Stammzelllinie optimalen Ausgangsbedingungen, wie die Ausgangszelldichte und die Beschichtung der Zellkulturschalen, ermittelt wurden, wurden dem Differenzierungsmedium zu festen Zeitpunkten definierte Mengen unterschiedlicher Kombinationen aus Wachstumsfaktoren und *small molecules* zugesetzt, um die Differenzierung in eine spezifische Richtung zu lenken (Abbildung 3. 1).

Während der Ontogenese eines Vertebraten Embryos ist das kardiovaskuläre System das sich als erstes entwickelnde funktionelle Organsystem. Vereinfacht dargestellt bildet sich in der Embryonalentwicklung während eines sehr frühen Stadiums der Epiblast aus dem Trophoblasten. Aus dem Epiblasten gehen während der Gastrulation die drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) hervor. Aus dem lateralen Mesoderm bilden sich schließlich im Rahmen der Vaskulogenese die Blutgefäße (Risau & Flamme 1995).

In Anlehnung an die während der Embryonalentwicklung ablaufenden Schritte ist es zunächst erforderlich die Differenzierung der mESC in Zellen des Epiblasten zu induzieren (Tag 0 bis Tag 2). Dies geschieht vornehmlich durch das Präinkubationsmedium (N2b27) ohne Wachstumsfaktoren und den Entzug von LIF (Chiang & Wong 2011). Um die Differenzierung in die mesodermale Richtung zu lenken ist die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges erforderlich (Wodarz & Nusse 1998; Chiang & Wong 2011). Dieser ist notwendig für die Bildung des Primitivstreifens während der Embryonalentwicklung. Durch den Primitivstreifen wird die Längsachse des Embryos festgelegt. Außerdem beginnt mit Bildung des Primitivstreifens die Gastrulation und es erfolgt vom Primitivstreifen ausgehend die Herausbildung des intraembryonalen Mesoderms. *Wnt3 (wingless-related MMTV integration site 3)*- oder β -catenin-defiziente Mäuse entwickeln keinen Primitivstreifen und bilden kein Mesoderm aus (Huelsen et al. 2000; Liu et al. 1999). In der in dieser Arbeit angewandten *in vitro* Differenzierungsmethode geschah die Aktivierung des Wnt-Signalweges über die Zugabe von Gsk3 (Lindsley et al. 2006), einem Glykogensynthase-Kinase 3 Inhibitor der β -catenin aktiviert in das Differenzierungsmedium (Tag 2 bis Tag 4). Activin A besitzt eine Mesoderm-induzierende Aktivität (Jones et al. 1995). Außerdem spielt Fgf2 (*basic fibroblast growth factor*) eine entscheidende Rolle bei der Induktion und Formierung des Mesoderms während der Embryonalentwicklung (Slack et al. 1987). Eine Deletion des Fgf-Rezeptor-Gens in Mäusen hat einen starken Einfluss auf die Formation der Körperachse. Diese Mutanten zeigen eine fehlerhafte Bildung des Primitivstreifens und anderer axialer Strukturen und sterben vor oder im Laufe der Gastrulation (Deng et al. 1994).

In einem dritten Schritt wurde die Differenzierung unter anderem durch die Supplementierung des Differenzierungsmediums mit Vegf (*vascular endothelial growth factor*) und Fgf2 in die endotheliale Richtung gelenkt (Tag 4 bis Tag 6). Auch bei der Blutgefäßbildung im Embryo nimmt Fgf2, neben Vegf und seinen Rezeptoren (unter anderem Flk1), eine ausschlaggebende Rolle ein (Risau &

Flamme 1995; Damert et al. 2002; Risau et al. 1988). Die Aktivierung der mesodermalen FGF-Rezeptoren führt unter anderem zur Differenzierung mesodermaler Zellen zu Angioblasten/Hämangioblasten und deren Transkription des Vegf-Rezeptors, Flk1 (Wilting et al. 1996). Zahlreiche Untersuchungen an Flk1-defizienten Mäusen zeigen, dass das korrekte Zusammenspiel von Vegf und seinem Rezeptor Flk1 für eine normale Gefäßentwicklung im Embryo absolut erforderlich ist, da die Vaskulogenese ansonsten ausbleibt (Carmeliet et al. 1996; Shalaby et al. 1995). Die Zugabe eines TGF β Antagonisten (ALKi) zum Differenzierungsmedium erhöht die Reinheit der Endothelzellpopulation, indem die Differenzierung in murale Zellen, zu denen vaskuläre glatte Muskelzellen und Pericyten zählen, verhindert wird (Watabe et al. 2003). Die Zugabe von Bmp4 (*bone morphogenetic protein 4*) inhibiert eine neuroektodermale Differenzierung (Wiles & Johansson 1999) und ist essentiell, um das endotheliale Schicksal der Zellen zu prägen (Chiang & Wong 2011). Sechs Tage nach Induktion der Differenzierung mit diesem Differenzierungsmodell (Abbildung 3. 1 A) zeigten die Zellen eine für Endothelzellen (EC; *endothelial cells*) charakteristische kopfsteinplasterförmige Morphologie (Abbildung 3. 2 B) und die Stammzellfaktoren wurden im Vergleich zu den undifferenzierten mESC herunterreguliert (Abbildung 3. 1 B).

Eine Transdifferenzierung in SMC erfolgte mit 9 Tage alten EC. Es ist bekannt, dass Endothelzellen im adulten Organismus eine gewisse Plastizität aufrechterhalten, so dass sie in der Lage sind sich ihrer Umgebung anzupassen (Augustin-Voss et al. 1991; Nakajima et al. 1997). Darunter versteht man die Umprogrammierung einer determinierten Endothelzelle in einen Zelltyp eines anderen Gewebes (Condorelli et al. 2001; Arciniegas et al. 2003; Stenmark et al. 2016). So sind sie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in der Lage zu glatten Muskelzellen zu transdifferenzieren (Frid et al. 2002; Paranya et al. 2001). Bei der *in vitro* Differenzierung in glatte Muskelzellen spielen Tgf β (*transforming growth factor beta*) und Egf (*epidermal growth factor*) eine zentrale Rolle (Ahmed et al. 2006; Lachaud et al. 2013; Lachaud et al. 2014).

Die Transdifferenzierung der EC in SMC geht erneut mit starken morphologischen Veränderungen einher. Bereits wenige Tage nach Induktion der Transdifferenzierung zeigten die Zellen zum größten Teil eine spindelförmige Morphologie (Abbildung 3. 8 C). Gerade von Endothelzellen *in vivo* ist bekannt, dass sie eine ausgesprochen heterogene Zellpopulation darstellen. Die Phänotypen der Endothelzellen innerhalb eines Organismus variieren in Struktur und Funktion, metabolischen Eigenschaften sowie der Expression von Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren (Thorin & Shreeve 1998; Aird 2003). Auch von glatten Muskelzellen weiß man, dass sie unterschiedliche Phänotypen besitzen können (Owens 1995). Zudem besitzen unterschiedliche Zelltypen oft eine ähnliche Morphologie. Daher scheint die Morphologie kein verlässliches Kriterium zu sein, um einen Zelltyp zu identifizieren. Aus diesem Grund wurden die differenzierten Zellen zusätzlich ausführlich

hinsichtlich ihrer Markergenexpression untersucht. Zwar ist keiner dieser Marker für sich allein genommen ausreichend spezifisch, um eine Zelle zu charakterisieren aber durch die gleichzeitige Erfüllung mehrere Kriterien kann die Identität einer Endothelzelle eindeutig bestätigt werden. Um festzustellen, ob die differenzierten Endothelzellen auch funktionell kompetent sind und um später die Funktionalität der Zellen nach Einwirkung von Genotoxinen untersuchen zu können, wurden sie hinsichtlich prototypischer zellspezifischer Funktionen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die aus mESC abgeleiteten EC die Markergene *Pecam1* (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*), VE-Cadherin (*vascular endothelium cadherin*) und Flk1 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene exprimierten (Abbildung 3. 3 und Abbildung 3. 4). Endothelzellen exprimieren spezifische Marker, die sehr hilfreich sind, um diese Zellen *in vivo* und in Kultur zu identifizieren (Garlanda & Dejana 1997). So gilt unter anderem das Transmembran-Glykoprotein PECAM1 als ein in erster Linie endothelzellspezifisches Adhäsionsmolekül, wird allerdings auch schwach von Stammzellen des Knochenmarks, Leukozyten, T-Lymphozyten, Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert (Robson et al. 2001). Im Verlauf der Differenzierung von mesodermalen Vorläuferzellen zu Endothelzellen zeigt sich PECAM1 als erstes nachweisbares Adhäsionsmolekül (Pinter et al. 1997; Drake & Fleming 2000). PECAM1 nimmt verschiedene Funktionen bei der Aktivierung von Immunreaktionen und dem Erhalt der Barrierefunktion des Endothels ein (Thompson et al. 2000; Patil et al. 2001). Zusätzlich zeichnet sich die endotheliale Determination von Stammzellen in weiteren Entwicklungsstadien durch die Expression des endothelzellspezifischen Oberflächenantigenes VE-Cadherin aus (Kalka et al. 2000; Nishikawa et al. 1998). Neben Endothelzellen zeigen Zellen des Trophoblasten und Makrophagen eine schwache VE-Cadherin Expression (Lampugnani et al. 1992). VE-Cadherin ist ein transmembranes Adhäsionsmolekül, welches sich an interzellulären Verbindungen befindet und an der Herstellung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist (Angst et al. 2001). Als ein weiteres charakteristisches Antigen, welches allerdings von hämatopoetischen Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen ko-exprimiert wird, gilt der Wachstumsfaktorrezeptor *vascular endothelial growth factor receptor 2* (Flk1) (Wang et al. 2007; Choi et al. 1998; Drake et al. 1998; Quinn et al. 1993). Dieser Tyrosin-Kinase-Rezeptor spielt, über die Bindung von Vegf, bei der Gefäßbildung und Hämatopoese sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus eine entscheidende Rolle (Risau & Flamme 1995) und hat einen großen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Blutgefäßwand für beispielsweise kleine Proteine wie Albumin (Gille et al. 2001; Radu & Chernoff 2013).

Des Weiteren wurde die mRNA Expression von Ephrin B2 und Ephb4 (*ephrin type-B receptor*) untersucht (Abbildung 3. 3 B). Ephrine funktionieren nicht wie typische lösliche Liganden, sondern

müssen membrangebunden sein, um ihre Rezeptoren zu aktivieren (Michiels 2003). Zwar wurden Ephrin B2 und Ephb4 zunächst im Nervensystem beschrieben und charakterisiert, sie werden aber auch von Endothelzellen exprimiert und spielen dort eine zentrale Rolle während der frühen vaskulären Entwicklung (Pandey et al. 1995). Dabei wird Ephrin B2 ausschließlich in Arterien und nicht in Venen exprimiert und Ephb4 entgegengesetzt nur in Venen, nicht aber in Arterien. Dieses Verteilungsmuster lässt vermuten, dass diese beiden Moleküle maßgeblich an der Determination von arteriellen oder venösen Blutgefäße beteiligt sind. Trotz dieser bemerkenswerten reziproken Expression ist aber bis heute ungeklärt, wo und wie diese kritischen Interaktionen zwischen Zellen, die dieses Expressionsmuster aufweisen, auftreten und wie Venen und Arterien schlussendlich gebildet werden (Michiels 2003). Nichtsdestotrotz dient die Expression von entweder Ephrin B2 oder Ephb4 auf Endothelzellen zur eindeutigen Unterscheidung von Arterien und Venen. Die in dieser Arbeit differenzierten EC zeigten eine deutlich höhere mRNA Expression des venösen Markers Ephb4.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die aus mESC abgeleiteten Endothelzellen die Fähigkeit zu prototypischen Endothelfunktionen besaßen. Auf eine Behandlung mit den Zytokinen IL1 β (Interleukin 1 beta) und TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*) reagierten die differenzierten Zellen mit einer bis zu 100-fachen Hochregulation der Zell-Adhäsionsmoleküle E-Selektin und Icam1 (*intercellular adhesion molecule 1*) (Abbildung 3. 5) Diese Fähigkeit besitzen auch aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleitete EC (Nourse et al. 2010; Springer 1990). Eine der Hauptaufgaben von Endothelzellen liegt in der Koordination der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen zu entzündetem Gewebe. Dabei reagieren Endothelzellen auf inflammatorische Stimuli, wie Zytokine, die sie zum Teil selbst sekretieren (Carlos & Harlan 1994; Peltz 1993). Diese para- und autokrinen Fähigkeiten der Endothelzellen katalysieren den Entzündungsprozess durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), E- und P-Selektin, welche die Adhäsion und Migration von Leukozyten aus dem vaskulären System zum Ort der Entzündung ermöglichen (Cines et al. 1998; Hurairah & Ferro 2004). Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist die Regulation des Blutflusses in Blutgefäßen. Zu diesem Zweck wird der vasomotorische Tonus durch die Aktivität autokriner, parakriner und zirkulierender Faktoren gesteuert. Endothelzellen synthetisieren hierfür vasoaktive Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin und Prostacyclin. NO wird in den Endothelzellen vornehmlich durch die endotheliale Isoform der NO-Synthase (Nos3) und der induzierbaren NO-Synthase (iNos) gebildet. (Michiels 2003; Fulton 2016). Eine Stimulation der hier differenzierten EC mit inflammatorischen Zytokinen führte zu einer Hochregulation in der mRNA Expression der NO-Synthase 3 und der induzierbaren NO-Synthase (Abbildung 3. 5).

Weiterhin gelten die Fähigkeiten acetyliertes Low Density Lipoprotein (Ac-LDL) aufzunehmen und Lektin zu binden als typische Marker von Endothelzellen *in vitro*. Dabei ist allerdings zu beachten, dass Ac-LDL nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von Makrophagen über den sogenannten "scavenger cell pathway" des LDL Metabolismus aufgenommen wird (Voyta et al. 1984). Allerdings ist der Ac-LDL Metabolismus von Endothelzellen im Vergleich zu anderen Zelltypen deutlich gesteigert (Goldstein et al. 1977; Asahara et al. 1997). Durch die Kopplung an 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate (Dil-Ac-LDL) kann die Aufnahme sichtbar gemacht werden. Die in dieser Arbeit differenzierten EC besaßen eindeutig diese Fähigkeit (Abbildung 3. 6) wohingegen die undifferenzierten Stammzellen nicht zur Ac-LDL Aufnahme fähig waren. Desweiteren wird oft ein Lektin-Marker, das UEA-1 (Ulex-europaeus-Lektin Typ 1), zur Identifizierung von Endothelzellen verwendet. Dabei handelt es sich um ein für bestimmte Zuckerreste (α -L-Fukosyl) auf Endothelzellen spezifisches Lektin aus Stechginstersamen. Aufgrund ihrer Struktur können Lektine Zellen agglutinieren oder Präzipitate mit Glykokonjugaten bilden (Holthöfer et al. 1982; Hormia et al. 1983). Ebenfalls binden Erythrozyten dieses Lektin. UEA-1-konjugierte paramagnetische Beads werden häufig zur Isolation von humanen Endothelzellen verwendet (Jackson et al. 1990). Abbildung 3. 6 A zeigt, dass die aus mESC abgeleiteten EC ebenfalls die Fähigkeit zur Lektinbindung besaßen.

Schließlich wurde das angiogene Potential der differenzierten Zellen mittels eines Tube Formation-Assays getestet. Die Angiogenese, also das Wachstum von Blutgefäßen, durch Sprossungs- oder Spaltungsvorgänge, ist ein komplexer Prozess, der durch eine Balance von pro- (wie FGF, VEGF, PDGF und EGF) und antiangiogenetischen (wie Thrombospondin, Endostatin und Angiostatin) Signalen reguliert wird (Bouïs et al. 2006). Proangiogenetische Wachstumsfaktoren wie FGF, VEGF, PDGF (*platelet derived growth factor*) oder EGF aktivieren die Endothelzellen und diese setzen Proteasen frei, um das umliegende Bindegewebe zu lysieren. Darauf folgt die Proliferation und Migration der Endothelzellen zur Bildung neuer Sprossungen (Ausprunk & Folkman 1977; Chung et al. 2010). Mittels des Tube-Formation Assays kann diese Situation *in vitro* nachgestellt werden. Der Assay beruht auf der Fähigkeit von Endothelzellen sich in Erwiderung auf angiogenetische Signale zu teilen und schnell zu migrieren (Kubota et al. 1988). Ferner induziert die Kultivierung von Endothelzellen auf Matrigel eine Bildung von gefäßähnlichen Strukturen. Diese enthalten ein von Endothelzellen umgebenes Lumen (DeCicco-Skinner et al. 2014). Abbildung 3. 6 B und C zeigen, dass die aus Stammzellenabgeleiteten EC in der Lage waren gefäßähnliche Strukturen in Matrigel zu bilden, wohingegen die undifferenzierten Zellen diese Fähigkeit nicht besaßen.

Ebenso wurden die, mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode, aus EC transdifferenzierten glatten Muskelzellen hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktionalität untersucht. Die mRNA

Expression der glatten Muskelzellmarker Calponin, α SMA (*alpha smooth muscle actin*), Smoothelin und Transgelin (Potta et al. 2009; Owens 1995) wurde im Vergleich zur undifferenzierten Stammzelle und zu den EC hochreguliert (Abbildung 3. 9 A). Zusätzlich konnte die Expression von α SMA, auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 3. 10). Da die Expression dieser Markergene in den EC im Vergleich zu mESC nicht hochreguliert waren (Abbildung 3. 3 A und Abbildung 3. 9 A) eignen sie sich, um EC und SMC voneinander abzugrenzen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die SMC im Vergleich zu differenzierten EC verstärkt Mmp1 (*matrix metalloproteinase 1*) und Icam1 exprimierten. Außerdem exprimierten sie Mmp3 (*matrix metalloproteinase 3*) und Mmp7 (*matrix metalloproteinase 7*). Zwar war die Expression von Mmp3 und Mmp7 schwächer als in den undifferenzierten Stammzellen, allerdings konnte in den EC eine Expression von Mmp3 oder Mmp7 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3. 9 B).

Vaskuläre glatte Muskelzellen besitzen neben Myosin- und Intermediärfilamenten auch Aktinfilamente aus der Gruppe der Desmine, wobei α SMA die prädominante Isoform ist (Perrin & Ervasti 2010). α SMA ist maßgeblich an der Kontraktion der glatten Muskulatur beteiligt (Skalli et al. 1989), konnte aber auch in anderen Zelltypen nachgewiesen werden, wie beispielsweise in der sich entwickelnden quergestreiften Muskulatur (Babai et al. 1990). Calponin wird ebenfalls von Zellen der glatten Muskulatur exprimiert und gilt als Marker für den differenzierten kontraktilen Phänotyp der sich entwickelnden glatten Muskulatur. Es ist ein calciumbindendes Protein und ist vermutlich an der Steuerung von Kontraktionen der glatten Muskulatur beteiligt (Ferjani et al. 2010; El-Mezgueldi 1996). Geht dieses Protein verloren, werden Zellen der glatten Muskulatur in einen synthetischen entdifferenzierten Phänotyp umgewandelt (Miano et al. 2003; Owens 1995; Owens et al. 2004; Owens 2007). Mitunter tritt eine Calponin Expression allerdings auch in anderen Zelltypen, wie Perizyten oder Thrombozyten, auf (Takeuchi et al. 1991). Bei Smoothelin handelt es sich um ein Zytoskelettprotein, welches bislang ausschließlich in vollständig differenzierten glatten Muskelzellen des kontraktilen Phänotyps nachgewiesen werden konnte und so als spezifischer Marker gilt. Es besitzt eine Aktin bindende Domäne, seine genaue Funktion ist allerdings bislang ungeklärt (Van Der Loop et al. 1996).

Da vaskuläre glatte Muskelzellen nicht vollständig ausdifferenziert sind, sind sie extrem veränderbar und weisen eine Reihe von unterschiedlichen Morphologien und Genexpressionsprofilen mit verschiedenen Zellfunktionen auf (Rensen et al. 2007; Owens 2007; Proudfoot & Shanahan 2012). So sind sie in der Lage, auf Veränderungen des Umfeldes wie beispielsweise Entzündungen oder Dehnungsstress zu reagieren, um die beschädigte Gefäßwand zu regenerieren (Dethlefsen et al. n.d.; Saul et al. 1999; Ross 1993). Hierbei ändert sich der Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen von ruhend und kontraktile zu aktiviert und synthetisch (Gomez & Owens 2012). Nach wie vor ist jedoch unklar durch welche Stimuli diese Anpassung des Phänotyps initiiert wird.

So können sie auch *in vitro* eine Bandbreite an Phänotypen zwischen differenziert (kontraktile) und dedifferenziert (synthetisch) aufweisen (Campbell & Campbell 1985). Der kontraktile Phänotyp zeigt, aufgrund der Ausrichtung der intrazellulären Filamente, eine spindelförmige Morphologie. Seine Hauptfunktion liegt in der Aufrechterhaltung der Wandspannung durch Kontraktion, er proliferiert kaum. Der synthetische Phänotyp hingegen zeichnet sich durch eine erhöhte Proliferation und Migration aus und hat nur noch eine geringe Fähigkeit zur Kontraktion. Typisch für den synthetischen Phänotyp ist eine erhöhte Expression von Collagen 1, verschiedene Isoformen der MMPs und ICAM-1. Die Expression Kontraktion-assoziiierter Genprodukte wie α SMA oder Calponin ist hingegen vermindert (Stegemann et al. 2005). Er hat sein spindelförmiges Aussehen verloren, ist nicht mehr langgestreckt, sondern zeigt eine rhombenförmige Morphologie. Generell haben synthetische SMC einen geringeren Anteil an kontraktile Proteinen, enthalten weniger Myofilamente aber besitzen mehr Organellen (zum Beispiel endoplasmatische Retikula und Mitochondrien) (Rensen et al. 2007).

Abbildung 3. 8 zeigt deutlich, dass das in dieser Arbeit angewendete Differenzierungsmodell glatte Muskelzellen beider Phänotypen hervor gebracht hat. Neben spindelförmigen Zellen fanden sich auch rundere, rhombenförmige Zellen in der Population. Dies und die Expression von *Mmp1* und *Icam1* deuteten auf das Vorhandensein sowohl kontraktile als auch synthetische SMC hin. Obwohl bereits Protokolle zur Differenzierung in nur einen SMC Phänotyp existieren (L. Yang et al. 2016), wurde in dieser Arbeit bewusst mit einer Mischpopulation gearbeitet. Da die verminderte Expression Kontraktion-assoziiierter Genprodukte während der Redifferenzierung zum synthetischen Phänotyp reversibel ist, scheint der Phänotypenwechsel etwas Kontinuierliches zu sein. In der Gefäßwand existiert also nicht nur ein Phänotyp, viel mehr ist der glattmuskuläre Phänotyp sehr heterogen (Owens 1995; Stegemann et al. 2005; Beamish et al. 2010).

Zusätzlich zur Markergenexpression wurden die differenzierten SMC hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kontraktion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die rezeptorgesteuerten Kalziumkanäle der differenzierten SMC auf Botenstoffe des vegetativen Nervensystems reagieren. Abbildung 3. 11 zeigt, dass die SMC auf eine Behandlung mit Carbachol, einem Acetylcholin Analogon, mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration reagierten. Durch eine steigende intrazelluläre Calciumkonzentration wird die Kontraktion der SMC initiiert (Wynne et al. 2009). Dies zeigt, dass die differenzierten SMC die Fähigkeit zur Kontraktion mittels pharmakomechanischer Kopplung besaßen. Auch eine Stimulation der SMC mit Endothelin (Abbildung 3. 11) führte zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, was einen Rho-Kinase abhängigen Signalweg der Kontraktion suggeriert (Sinha et al. 2006). Zusätzlich wurde die Kontraktionsfähigkeit über eine elektromechanische Kopplung untersucht. Kaliumchlorid (KCl) induziert durch die Depolarisation

der Membran eine Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen des L-Typs und damit einen langsamen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum, wobei dieser intrazelluläre Calciumanstieg zur Kontraktion der glatten Muskelzelle führt (Kalthof et al. 1993; Perez & Sanderson 2005). So konnte die Kontraktion der differenzierten SMC innerhalb von 30 min nach Behandlung mit KCl in Zeitrafferaufnahmen sichtbar gemacht werden. Hierbei war auch zu erkennen, dass sich nur Zellen des kontraktiven spindelförmigen Phänotyps zusammenzogen (Abbildung 3. 11). Durch die Zugabe von EDTA konnte eine Kontraktion der SMC verhindert werden, was zeigt, dass die Kontraktion auf dem Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Calciumkanäle aus dem Extrazellularraum beruhte und nicht etwa durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. EDTA bildet als Komplexbildner stabile Chelatkomplexe mit den Ca^{2+} Kationen und verhindert so den Calciumeinstrom (Potta et al. 2009). Diese Daten zeigen, dass die SMC funktionelle Ca^{2+} Kanäle besitzen, die von anderen ausdifferenzierten Zelltypen nicht exprimiert werden.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass mit der in dieser Arbeit adaptierten Differenzierungsmethode, aus embryonalen Stammzellen der Maus funktionsfähige, endothel-ähnliche Zellen differenziert werden konnten, welche in einem weiteren Schritt zu funktionsfähigen glattmuskulärähnlichen Zellen transdifferenziert werden konnten. Die differenzierten Zellen exprimierten nicht nur zelltypspezifische Markergene sondern besaßen die Fähigkeit zu prototypischen zelltypspezifischen Funktionen. Dies macht sie zu einem besonders aussagefähigen *in vitro* Modell für toxikologische Studien zur Untersuchung von differenzierungsabhängigen Veränderungen der DNA-Schadenserkennung und Antwort.

4.2 VERGLEICHENDE EXPRESSIONSANALYSEN VON SUSZEPTIBILITÄTSFAKTOREN IN STAMMZELLEN, ENDOTHELZELLEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN

Die mRNA-Expressionsanalyse von Suszeptibilitätsfaktoren, welche in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und den Zelltod involviert sind, zeigte eine Anzahl von Genen, die in den differenzierten EC und SMC gemeinsam hoch- oder herunterreguliert waren, verglichen mit den undifferenzierten Stammzellen (Tabelle 3. 1).

Die Regulation einiger Gene (Abbildung 3. 13 und Tabelle 3. 2) ist vermutlich auf den Verlust der Pluripotenz bzw. des Stammzellcharakters, der mit einer Differenzierung der mESC einhergeht, zurückzuführen. Proliferation entsteht durch eine Progression der Zelle durch den Zellzyklus, der sich aus 4 definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G1-, S-, G2- und M-Phase. An der Regulation des Zellzyklus sind drei Proteine maßgeblich beteiligt: Cyclinabhängige Kinasen (CDKs), Cycline und cyclinabhängige Kinaseinhibitoren (CKIs) (Gillett & Barnes 1998). Cyclin E und Cyclin A wurden von den differenzierten Zellen deutlich schwächer exprimiert als von den

Stammzellen. Cyclin E zählt zu den G1 Cyclinen und initiiert die Progression der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus. Ist die Zelle in die S-Phase eingetreten wird Cyclin E degradiert und Cyclin A leitet die DNA-Synthese ein und erhält sie aufrecht (Stillman 1996). Die Cycline werden in jeder Runde des Zyklus neu synthetisiert und degradiert.

Zusätzlich unterstreicht die gleichzeitige Hochregulation von p21^{WAF1/CIP1} (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*; Cdkn1a) in EC und SMC diese gravierenden Unterschiede in der Zellzyklusverteilung von undifferenzierten und differenzierten Zellen. Durch erhöhte P21^{WAF1/CIP1} Konzentrationen wird die Aktivierung von CDK2 durch Cyclin E oder Cyclin A inhibiert, was einen G1 Arrest der Zelle zur Folge hat (Gartel & Radhakrishnan 2005; Sherr & Roberts 2004). Weitere am Zellzyklus und dessen Kontrolle beteiligte Gene waren in den SMC alleine herunterreguliert (Chk1, Cdc25a, Chk2 und Cyclin B1 (Tabelle 3. 4)). CDC25A (*cell division cycle 25A*) wird durch den CDK2/Cyclin E Komplex in der späten G1-Phase aktiviert. Die Inaktivierung von CDC25A hemmt den Eintritt in die S-Phase, was zeigt, dass CDC25A ebenfalls für den Übergang der G1 in die S-Phase notwendig ist (Nilsson & Hoffmann 2000). Um wiederum in die M-Phase des Zellzyklus einzutreten sind die Expression von Cyclin B und die Aktivität der CDK2 kritische Ereignisse (Smits & Medema 2001). Die zusätzliche Herunterregulation von Cdc25a und Cyclin B1 steht in Einklang mit der Tatsache, dass die SMC an Tag 15 der Differenzierung nur noch wenig proliferierten.

Zusätzlich waren die beiden Checkpoint Kinasen Chk1 und Chk2 in den SMC herunterreguliert. Die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der Checkpointkinasen CHK1 und CHK2 durch ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) bzw. ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) sind wesentlicher Bestandteil der Zellzykluskontrolle (Smith et al. 2010). CHK2 ist ein stabiles Protein und wird während des gesamten Zellzyklus exprimiert. Allerdings wird es aber nur im Falle von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ATM aktiviert. Im Gegensatz dazu ist eine CHK1 Expression auf die S und G2 Phase des Zellzyklus begrenzt (Bartek et al. 2003). Über die Aktivierung von CHK1/CHK2 reagiert die Zelle relativ schnell auf DNA-Schäden, der Zellzyklus wird angehalten und Reparaturmechanismen in Gang gesetzt. Die Tatsache, dass sowohl Chk1 als auch Chk2 in den SMC herunterreguliert waren, könnte darauf hindeuten, dass sie eine geringere Kapazität zur DNA-Schadensantwort als EC und mESC besitzen oder länger brauchen, um auf einen Schaden zu reagieren.

Nur eine kleine Anzahl von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) bilden alle Gewebe des späteren Embryos. Das bedeutet, dass ES-Zellen mit hoch effizienten Mechanismen ausgestattet sein sollten, um sich gegen verschiedene Stresssituationen zu verteidigen und ihr Genom vor DNA-Schäden zu schützen oder dieses reparieren zu können (Saretzki et al. 2004). Die normale Embryonalentwicklung ist ein engmaschig regulierter, komplexer und räumlich-zeitlich festgelegter

Prozess, der, wenn er gestört wird, zu Entwicklungstoxizität führen kann, die Geburtsfehler oder embryonale Sterblichkeit verursacht. Oxidativer Stress, die ER-Stressantwort und Apoptose spielen sowohl während der frühen Embryonalentwicklung als auch während der späten Organogenese und Morphogenese eine große Rolle in der Säugetierentwicklung (Kupsco & Schlenk 2015). Auch wenn der Fokus der Forschung meist auf den exogenen Quellen für reaktive Sauerstoffspezies liegt, so werden ROS auch endogen produziert und Redox-Regulation spielt eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung von Vertebraten (Kupsco & Schlenk 2015). Unter physiologischen Bedingungen entstehen reaktive Sauerstoffspezies in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung und sind eine Hauptursachen von DNA-Schädigungen. Am häufigsten sind dies Basenschäden und Einzelstrangbrüche. Es konnte gezeigt werden, dass mESC sehr geübt in der antioxidativen Verteidigung sind und diese Kapazität mit zunehmender Differenzierung abnimmt (Saretzki et al. 2004). Transkriptom und Proteomik Analysen zeigten, dass murine embryonale Stammzellen höhere Mengen antioxidativer Enzyme exprimieren als differenzierte Zellen (Unwin et al. 2006). Geringe ROS (reaktive Sauerstoffspezies) Mengen scheinen notwendig zu sein, um die Fähigkeit der Selbsterneuerung in humanen und murinen adulten Stammzellen aufrechtzuerhalten (Jang & Sharkis 2007), wohingegen erhöhte ROS Mengen eine Differenzierung durch die Aktivierung der p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinase einleiten (Ito et al. 2006; Schmelter et al. 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mESC DNA-Einzelstrangbrüche effizienter reparieren als ihre somatischen Gegenspieler (3T3-Zellen, Fibroblasten der Maus) (Saretzki et al. 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine spontane Differenzierung von humanen Stammzellen von einer Zunahme des oxidativen Stress begleitet wird, was auf eine Herunterregulation der Gene *Sod2* (*superoxide dismutase 2, soluble*) und *Gpx* (*glutathione peroxidase*), welche eine antioxidativen Funktion besitzen, zurückzuführen ist. Diese Herunterregulation spiegelt den Anstieg von ROS wieder (Saretzki et al. 2008).

Entsprechend dieser Daten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mRNA Expression der antioxidativen Faktoren *Gpx1* (*glutathione peroxidase 1*), *Sod1* (*superoxide dismutase 1, soluble*) und *Gstm1* (*glutathione S-transferase, mu 1*) (Tabelle 3. 1) und die Proteinexpression von HMOX1 (*heme oxygenase (decycling) 1*) (Abbildung 3. 19 und Abbildung 3. 20) nach der Differenzierung in EC und SMC herabgesenkt wurde. Ein in diesem Zusammenhang ausgleichender Anstieg in der Reparaturkapazität von oxidativer DNA-Läsionen durch BER, NER oder MMR, um den anhäufenden Mutationen in den differenzierten Zellen entgegen zu wirken, konnte anhand der basalen mRNA Expression der Suszeptibilitätsfaktoren nur für die NER gefunden werden.

Die Verminderung der Expression von antioxidativen Faktoren scheint also auch für die Differenzierung von mESC in EC und SMC einen notwendigen Schritt darzustellen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) und dessen Antwort (*unfolded protein response, UPR*) molekulare und biochemische Mechanismen beeinflussen, die die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen vermitteln (Kratochvílovát al. 2016). ER-Stress wird durch die Störung der Homöostase des Endoplasmatischen Retikulums (ER), infolge von Calciumabbau, Hypoxie oder Dysfunktion der N-terminalen Glykosylierung von Proteinen ausgelöst (Kaufman 1999; Koumenis 2006). Durch die Anhäufung miss- und ungefalteter Proteine im Lumen des ER wird die UPR induziert, um die Nebeneffekte des ER-Stress zu mildern und das Überleben der Zellen zu fördern (Xu et al. 2005). Einige Studien vermuten, dass ER-Stress in viele zelluläre Differenzierungsprozesse involviert ist, wie Erythropoese, Adipogenese und chondrogene und osteogene Differenzierungen (Cui et al. 2000; Gass et al. 2002; Pereira et al. 2004). Des Weiteren weiß man, dass die ER-Stressantwort (*unfolded protein response=UPR*) mit zunehmender Differenzierung eines Gewebes abnimmt. Die ER-Stressantwort stellt einen intrazellulären Signalweg dar, um den im Lumen des ER anfallenden fehlgefalteten Proteinen zu begegnen (Schröder & Kaufman 2005). Bei Untersuchungen der Embryogenese konnte gezeigt werden, dass ER-Stressmarker wie BiP (GRP-78) eine wesentliche Funktion bei der Entwicklung der embryonalen Zellen haben. Sie werden in der inneren Zellmasse des Embryoblasten stark exprimiert und nehmen im Verlauf der Embryonalentwicklung ab. Bei BiP-defizienten Zellen konnten Proliferationsstörungen und eine massive Apoptose beobachtet werden (Luo et al. 2006). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der ER-Stressantwort eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Herzentwicklung spielt. So wurde GRP-78/BiP in Herzen von Mausembryonen stark exprimiert, wohingegen es in den Herzen von 3 Monate alten Mäusen nur noch sehr schwach exprimiert wurde (Luo et al. 2006). Eine Induktion der UPR konnte auch während einer neuronalen Differenzierung von mESC beobachtet werden (Cho et al. 2009). Ebenso konnte gezeigt werden, dass DKK3 (*dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)*) die Differenzierung von Stammzellen in glattmuskuläre Zellen über eine Aktivierung von ATF6 (*activating transcription factor 6*) reguliert (X. Wang et al. 2015). Außerdem lässt die Differenzierung von Stammzellen nach, wenn die ER-Stressantwort geblockt wird (Y. Yang et al. 2016). Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen ein erhöhtes ER-Stress-Niveau aufweisen. Die genauen Ursachen hierfür scheinen jedoch bisher unklar zu sein. Vermutlich erfordert die in proliferierenden Zellen erhöhte Proteinbiosyntheserate eine Erhöhung der Chaperonkonzentration, um mit den gesteigerten Faltungsanforderungen zurechtzukommen. Zusätzlich könnten an der ER-Stressantwort beteiligte Proteine weitere Funktionen im Verlauf der Differenzierung von Zellen erfüllen (Wu & Kaufman 2006).

In Rahmen dieser Arbeit konnte eine Herunterregulation der, an der ER-Stressantwort beteiligten Gene Aft2 (*activating transcription factor 2*) und dem Chaperon Hsp70 (*heat shock 70kDa protein 1A*) nur in den differenzierten SMC bestätigt werden (Tabelle 3. 1). In den EC wurde die Expression von ER-Stressmarkern nicht herunterreguliert. Dies liegt vermutlich an den Kultivierungsbedingungen der Stammzellen mit LIF, da diese ihren pluripotenten Charakter beibehalten sollen. LIF fördert unter anderem die Selbsterneuerung der mESC indem es die VEGF Expression durch das Herunterregulieren von HIF1 α (*hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*) und ER-Stress Signalwegen reduziert (Chen et al. 2014). Würde man die Stammzellen kurz nach LIF-Entzug auf ER-Stressmarker untersuchen, würde man vermutlich eine deutlich erhöhte Expression verglichen mit SMC und EC beobachten. Parallel zu einem Abfall der ER-Stressantwort konnte ein Anstieg von Autophagie und Apoptosemarkern im Laufe einer ungerichteten Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen beobachtet werden (Liu et al. 2012). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erhöhte Expression der an der Autophagie beteiligten Gene, Atg3 (*autophagy related 3*) und Atg7 (*autophagy related 7*) und der an der Apoptose beteiligten Gene Fas-L (*Fas ligand (TNF superfamily, member 6)*), cIAP1 (*baculoviral IAP repeat-containing 3*), Bcl2 (*Beclin 1, autophagy related*) und Akt1 (*thymoma viral proto-oncogene 1*) in beiden differenzierten Zelltypen im Vergleich zu mESC gefunden (Abbildung 3. 13). Allerdings wird Bcl2 und cIAP1 eine antiapoptotische Funktion zugeschrieben. Kann die ER-Stressantwort einen Schaden nicht beheben, werden Proteinaggregate durch Autophagie beseitigt. Im Zuge dessen werden die Proteinaggregate von einer Doppelmembran eingeschlossen und verschmelzen mit einem Lysosom. Die in diesem befindlichen proteolytischen Enzyme bauen die Proteine ab (Yorimitsu & Klionsky 2005). Kann der ER-Stress über die genannten Wege nicht beseitigt werden, so wird in der Zelle die Apoptose induziert (Ma et al. 2002). Neben der Tatsache, dass Proteinaggregate, welche nicht durch die UPR beseitigt werden konnten durch Autophagie entfernt werden wird auch vermutet, dass Autophagie an der Differenzierung von Zellen beteiligt ist (Wu et al. 2016; Ozeki et al. 2016). Da mittels Autophagie große Proteinstrukturen und Organellen schnell beseitigt werden können, spielt sie eine wichtige Rolle, um den grundlegenden Wandel des Zellinneren während einer Differenzierung gewährleisten zu können (Cecconi & Levine 2008). Die erhöhte mRNA Expression von E-Selektin, Itgb1 (*integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)*), Vcam1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und Ras1 in sowohl SMC und EC bestätigte noch einmal die Funktionalität der in dieser Arbeit differenzierten Zelltypen innerhalb eines Blutgefäßes (Abbildung 3. 13). Die oben genannten Gene sind für die transendotheliale Migration von Zellen unabdingbar. Die transendotheliale Migration ermöglicht es, den Zellen des Immunsystems das Gefäßsystem zu verlassen und an einen Infektionsort zu gelangen. Dabei spielen das Anheften der Leukozyten an

Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin auf der Endotheloberfläche und die Aktivierung von Integrinen eine entscheidende Rolle (Molossi et al. 1995; Engelhardt & Wolburg 2004).

Neben diesen, auf den Differenzierungszustand der Zelle zurückzuführenden differentiell exprimierten Genen, sind auch Gene, die an den verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind, herunterreguliert. Vor allem bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist bekannt, dass ES-Zellen diese vorwiegend über homologe Rekombination (HR) reparieren, wohingegen in somatischen Zellen die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) vorherrscht (Donoho et al. 1998; Smih et al. 1995). Aber auch von den anderen Reparaturmechanismen ist bekannt, dass sich ihre Kapazität in ES-Zellen und somatischen Zellen voneinander unterscheidet.

Die hier gefundene reduzierte Rad51 Expression in EC und SMC, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abbildung 3. 13, Abbildung 3. 19 und Abbildung 3. 20) deutet ebenfalls darauf hin, dass die Fähigkeit zur DNA-Reparatur mittels HR mit zunehmender Differenzierung der mESC abnimmt. Auch im Vergleich ES-Zellen mit MEFs konnten diese Unterschiede in der Rad51 Expression gefunden werden (Tichy & Stambrook 2008; Baumann et al. 1996). Rad51 ist eine der Schlüsselfiguren in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels HR. Die Expression von Rad51 variiert typischerweise im Verlauf des Zellzyklus, die höchste Expression wird in G2/M erreicht (Chen et al. 1997; Flygare et al. 1996). Zu diesem Zeitpunkt sind die Schwesterchromatiden optimal zugänglich, um als Template für die Reparatur genutzt zu werden (Saleh-Gohari & Helleday 2004). Nach einer Induktion von Doppelstrangbrüchen ist RAD51 an diesen lokalisiert und ist an der Suche nach homologen Sequenzen, die als Template zur Reparatur dienen, beteiligt (Sinha & Peterson 2008). Die genauen Mechanismen, die dieser Funktion zugrunde liegen, sind allerdings noch weitgehend ungeklärt. Zusätzlich zeigten die SMC eine herunterregulierte Brca2 (*breast cancer 2*) und Mre11 (*meiotic recombination 11 homolog A*) Expression (Tabelle 3. 1). Dem gegenüber stand eine erhöhte Expression von Lig4 (*ligase IV, DNA, ATP-dependent*) und Xrcc4 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4*) in EC, welche beide maßgeblich an der Reparatur von DSB (Doppelstrangbrüchen) mittels NHEJ beteiligt sind. Dies deutet auf eine endothelspezifische erhöhte Kapazität zur DSB-Reparatur mittels NHEJ.

Betrachtet man die weiteren Reparaturmechanismen, so deutet eine reduzierte Expression von Msh2 (*mutS homolog 2*), einem Faktor der Mismatch-Reparatur (MMR), sowohl in EC als auch in SMC (Abbildung 3. 13), auf eine höhere MMR Kapazität der mESC hin, was auch im Vergleich mESC mit MEFs gezeigt werden konnte. Zellen, die mit einem MMR Reporterplasmid transfiziert wurden, zeigten, dass die Fähigkeit zur MMR in MEFs sehr gering, in ES-Zellen hingegen aber stark erhöht war (Tichy et al. 2011).

Neben den bereits erwähnten Unterschieden scheint sich aber die Kapazität der Basenexzisionsreparatur (BER) im Laufe einer Differenzierung am stärksten zu verändern. So konnte zum Beispiel eine Abnahme in der Expression der BER Faktoren Ligase 1 und Ligase 3 in aus Satelittenzellen der Maus differenzierten Skelettmuskelzellen im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen gefunden werden (Narciso et al. 2007). Nach Induktion von oxidativen Schäden durch eine Exposition mit H_2O_2 , war die Reparatur des induzierten Schadens in humanen ES-Zellen signifikant besser im Vergleich zu Fibroblasten. Zudem konnte eine erhöhte Fen1 (*flap structure specific endonuclease 1*) und Ligase 2 Expression in den humanen ES-Zellen festgestellt werden, welche ebenfalls an der BER beteiligt sind (Maynard et al. 2008). Auch im Vergleich mESC mit MEFs konnte eine in mESC erhöhte BER Aktivität und Expression von Ligase 3, Xrcc1 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*) und Apex (*apurinic/aprimidinic endonuclease*) gezeigt werden (Tichy et al. 2011). Demgegenüber stehen Daten, die eine Zunahme der BER Aktivität in differenzierten Zellen zeigen. Die Differenzierung von humanen Monozyten in dendritische Zellen und Makrophagen beispielsweise, wurde von einer verstärkten Expression der BER Faktoren Xrcc1, Ligase 3 und PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*) begleitet, was eine geringere BER Aktivität in Monozyten vermuten lässt (Bauer et al. 2011). Es scheint also, dass eine Differenzierung nicht automatisch mit einer Verringerung der BER Aktivität einhergehen muss. Vielmehr scheint der Verlust der BER Kapazität ein zelltypspezifisches Phänomen zu sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BER Faktoren Ligase 1, Fen1 und Xrcc1 nur in den aus mESC differenzierten SMC, nicht aber in den EC, herunterreguliert wurden, was diese Hypothese unterstützt.

Es existieren nur wenige aussagekräftige Daten hinsichtlich veränderter Nukleotidexzisionsreparatur (NER) Kapazitäten, die in Bezug zum Differenzierungsstatus einer Zellen stehen. In humanen ES-Zellen wurde im Vergleich zu Fibroblasten zwar eine erhöhte Rpa (*replication protein A2*) Expression gefunden, Xpa (*Xeroderma pigmentosum, complementation group A*) wurde allerdings signifikant schwächer exprimiert und bezüglich der Xpc (*Xeroderma pigmentosum, complementation group C*) Expression konnten keine Unterschiede in den beiden Zelltypen festgestellt werden (Maynard et al. 2008). In andere Studien wird die Vermutung aufgestellt, dass ES-Zellen vermehrt die Apoptose einleiten und gleichzeitig die NER Aktivität herunterfahren, um ihr Genom vor durch UV-induzierten DNA-Schäden zu schützen (Van Sloun et al. 1999). Die in dieser Arbeit gefundene Erhöhung in der mRNA Expression der NER Faktoren Xpa und Ercc1 (*excision repair crosscomplementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) in beiden differenzierten Zelltypen unterstützt diese Hypothese (Abbildung 3. 13). Eine gemeinsame Runterregulation von Ddb2 (*damage specific DNA binding protein 2*) in EC und SMC kann in diesem

Zusammenhang nicht erklärt werden und deutet darauf hin, dass die NER Kapazität komplexen Veränderung im Laufe der vaskulären Differenzierung unterliegt.

Zusätzlich konnte eine Herunterregulation von PcnA (*proliferating cell nuclear antigen*), Lig1 (*ligase I, DNA, ATP-dependent*) und Pold1 (*polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit*) in den SMC nachgewiesen werden (Tabelle 3. 1). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und sind somit zentraler Bestandteil sämtlicher DNA-Reparaturmechanismen. Dies weist erneut auf die geringe Proliferationskapazität der SMC hin, könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die SMC in ihrer Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren, verglichen mit EC und mESC deutlich eingeschränkt waren.

Diese Daten deuten darauf hin, dass mESC HR und MMR Signalwege unter basalen Konditionen mit erhöhter Kapazität nutzten als die differenzierten Zellen. Die mRNA von Genen, die an der BER beteiligt sind, wurde von mESC und EC im Vergleich zu SMC verstärkt exprimiert. Eine verstärkte NHEJ Kapazität scheint auf die endothelial differenzierten Zellen beschränkt zu sein. NER hingegen scheint in den differenzierten Zellen generell eine erhöhte Kapazität zu besitzen.

Durch eine Behandlung mit Genotoxinen (IR oder Doxorubicin) wurde die mRNA Expression von Genen, die an den unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind, teilweise verstärkt (Abbildung 3. 14 und Tabelle 3. 5). Die Tatsache, dass nur wenige Gene sowohl in den mESC als auch in den EC und SMC gemeinsam hochreguliert wurden, deutet darauf hin, dass die DNA-Schadensantwort strikt zelltypspezifisch ist. Wobei die Daten zeigen, dass sich mESC und EC am ähnlichsten zu sein scheinen.

Ionisierende Strahlung führt neben DNA-Doppelstrangbrüchen auch zu DNA-Einzelstrangbrüchen, Basenschäden, DNA-DNA oder DNA-Protein Vernetzungen und Zuckerschäden. Dies geschieht unter anderem indirekt, durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Ward 1988; Prise et al. 2005). Doxorubicin verursacht DNA-Schäden über andere biochemische Mechanismen als ionisierende Strahlung. Beide Genotoxine haben aber gemeinsam, dass sie als für die Zelle kritischstes Ereignis DNA-Doppelstrangbrüche induzieren (Agarwal et al. 2006). Dies geschieht bei geringen Doxorubicindosen (0,5 μM bis 5,0 μM) durch die irreversible Inhibition der Topoisomerasen II alpha und beta (Kumar et al. 2016; Kaufmann & Hancock 1995). Zusätzliche Schädigungen zu denen Doxorubicin führen kann, wie beispielsweise DNA-Adduktbildung, DNA-Querverbindungen, DNA-Interkalation oder die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, treten erst bei deutlich höheren als in dieser Arbeit verwendeten Dosen auf (Gewirtz 1999).

So wurde sowohl durch Bestrahlung als auch durch eine Behandlung mit Doxorubicin in den mESC die Expression von Genen aller in dieser Arbeit betrachteten DNA-Reparaturmechanismen (HR, NHEJ, BER, MMR und NER) verstärkt (Abbildung 3. 15). Strahlung induzierte in den SMC die mRNA Expression von Msh2, welches an der MMR beteiligt ist (Tabelle 3. 6). In den EC wurde durch Bestrahlung die Expression von DNA-Reparaturgenen nicht verstärkt (Tabelle 3. 6). Nach einer Behandlung mit Doxorubicin wurden, sowohl in den EC als auch in den SMC, Gene der BER und NER vermehrt exprimiert (Tabelle 3. 7). Eine Behandlung der Zellen mit Bestrahlung oder Doxorubicin führte nur in den mESC zu einer gemeinsamen erhöhten Expression von Brca2, Xrcc4, Ogg1 (*8-oxoguanine DNA-glycosylase 1*) und Xrcc1. In den EC und SMC wurden keine an den genannten Reparaturmechanismen beteiligten Gene nach beiden Behandlungen gemeinsam hochreguliert (Tabelle 3. 8). Dies deutet darauf hin, dass die DNA-Schadensantwort in den drei Zelltypen sehr genotoxin-spezifisch ist.

Ist der durch ein Genotoxin verursachte DNA-Schaden zu schwerwiegend und kann von der Zelle nicht repariert werden, so wird entweder ein Zellzyklusarrest induziert oder der programmierte Zelltod eingeleitet (Norbury & Zhivotovsky 2004; Roos et al. 2013). Ein einzelner, von der Zelle nicht erkannter und reparierter DSB kann dabei ausreichen, um die Apoptose einzuleiten (Rich et al. 2000). Die Mutationsprävention in Stammzellen wird einerseits durch erhöhte DNA-Reparaturleistungen gewährleistet, andererseits auch durch eine gesteigerte Apoptoseinduktion in geschädigten Stammzellen (de Waard et al. 2004; Van Sloun et al. 1999). Sowohl in den mESC als auch in den differenzierten EC wurde nach einer Behandlung mit Genotoxinen die mRNA Expression von Genen, die an Signalwegen der Apoptose beteiligt sind, verstärkt. In den SMC konnte eine solche Hochregulation nicht beobachtet werden (Tabelle 3. 6 und Tabelle 3. 7).

Um die genomische Integrität des Gesamtorganismus sicherzustellen kann die geschädigte Zelle aber auch durch einen terminalen Wachstumsarrest dauerhaft von weiteren Zellteilungen, durch die Mutationen auf Tochterzellen weitergegeben werden könnten, ausgeschlossen werden (Janus et al. 1999; Albrechtsen et al. 1999). In diesem Fall wird durch Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte nicht eine temporäre Verzögerung der Zellteilung induziert, um für eine Reparatur Zeit zugewinnen, sondern ein dauerhafter, so genannter irreversibler Wachstumsarrest. Solche terminal arretierten Zellen sind vital, proliferieren aber nicht mehr. In solchen Zellen spielt der Zelltod durch Apoptose keine Rolle (Enns et al. 1998). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Induktion eines solchen dauerhaften Arrests sehr zelltyp- und genotoxinspezifisch ist. So reagieren beispielsweise Fibroblasten auf hohe Dosen ionisierender Strahlung mit einem terminalen Wachstumsarrest, während Zellen des hämatopoetischen Systems nach gleicher Bestrahlung durch Apoptose eliminiert werden (Gudkov & Komarova 2003). Auch scheint die

Induktion des permanenten Zellzyklusarrests dosisabhängig zu sein. Eine Behandlung mit geringen Dosen der chemotherapeutischen Agenzien Etoposid, Doxorubicin oder Cisplatin führte in proliferierenden Fibroblasten zu einem dauerhaften Zellzyklusarrest, wohingegen höhere Dosen zur Einleitung der Apoptose führten (Robles et al. 1999). Die genauen Mechanismen, die zu einer dauerhaften Arretierung des Zellzyklus führen können sind nicht vollständig bekannt. Unterschiedliche Studien konnten jedoch zeigen, dass p53, p23 und p21^{WAF1/CIP1} eine entscheidende Rolle bei der Induktion eines terminalen Wachstumsarrests spielen (Chang et al. 1999; Gudkov & Komarova 2003). In dieser Arbeit konnten in mESC und EC eine Hochregulation von Genen, welche am p53 Signalweg beteiligt sind, sowohl nach Bestrahlung als auch nach einer Behandlung mit Doxorubicin beobachtet werden (Tabelle 3. 6 und Tabelle 3. 7).

Die aus der mRNA Expression von Suszeptibilitätsfaktoren, welche in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und den Zelltod involviert sind, gewonnenen Daten lassen verschiedene Schlussfolgerungen zu. Die sowohl basale als auch nach Genotoxinbehandlung induzierbare Expression von Genen, die an den verschiedenen in dieser Arbeit betrachteten DNA-Reparaturmechanismen (HR, NHEJ, BER, MMR und NER) beteiligt sind, deutet auf eine grundsätzlich erhöhte Kapazität zur Reparatur von DNA-Schäden in den Stammzellen hin. Die SMC zeigten eine vergleichsweise geringe basale Expression von Reparaturgenen, welche auch nicht durch Genotoxine induziert werden konnte, was bedeuten könnte, dass sie eine schwächere Reparaturkapazität als mESC und EC besitzen. Allerdings führte auch die Genotoxinbehandlung in den EC nicht zu einer verstärkten Expression von Reparaturgenen. Da sie aber im Vergleich zu SMC eine basal erhöhte Expression von Genen, die an der NHEJ beteiligt sind aufwiesen, könnte dies bedeuten, dass EC besser dazu in der Lage sind, die durch IR und Doxorubicin induzierten Doppelstrangbrüche zu reparieren. Zudem lässt eine verstärkte Expression von an der Apoptose beteiligten Genen in mESC und EC die Vermutung zu, dass diese nach einer Behandlung mit Genotoxinen verstärkt Apoptose einleiten, wohingegen dies in den SMC nicht der Fall zu sein scheint.

4.3 REPARATURFÄHIGKEIT UND DNA-SCHADENSANTWORT IN STAMMZELLEN, ENDOTHELZELLEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN NACH EXPOSITION MIT GENOTOXINEN

Um weiterhin zu untersuchen, in wie weit sich die undifferenzierten Stammzellen, EC und SMC in ihrer Sensitivität gegenüber Genotoxinen und ihrer Fähigkeit zur DNA-Reparatur unterscheiden, wurde die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) sowie die nachfolgende Aktivierung der DNA-Schadensantwort untersucht. Ersteres wurde über die Bildung nukleärer γ H2AX (*H2A histone family, member X* an Serin139 phosphoryliert)-Foci als Surrogatmarker für DSB, letzteres über

Western Blot-Analysen mittels phosphospezifischer Antikörper gegen Proteine, die in der DNA-Schadensantwort ATM und ATR nachgeschaltet sind, untersucht. Anschließend wurde der Einfluss der Genotoxine auf die Induktion der Apoptose mittels durchflusszytometrischer Messungen und die Viabilität der Zellen, mit Hilfe des Alamar Blue-Assays, analysiert.

Die Analyse der Doppelstrangbrüche, die durch die nukleären γ H2AX Foci widergespiegelt wird, zeigte die höchste Anzahl an basalen, nicht durch Genotoxine induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in den Stammzellen (Abbildung 3. 16 und Abbildung 3. 17). Das Histon H2AX wird als Folge der Erkennung von DSBs oder von Replikationsstress durch ATM und ATR an Serin 139 phosphoryliert. Die basal höhere Anzahl von nukleären γ H2AX-Foci in den Stammzellen, beruht vermutlich auf der Tatsache, dass der replikative Stress in den stark proliferierenden mESC deutlich höher ist, als in den differenzierten EC und SMC, die jeweils eine deutlich schwächere Proliferationskapazität aufweisen. Rad51 spielt, neben seiner Funktion in der HR und der Reparatur von DSB, auch eine große Rolle während der Bildung der Replikationsgabel (Hashimoto et al. 2010) und schützt innegehaltene Replikationsgabeln vor einer Degradation (Schlacher et al. 2012). Die in dieser Arbeit und anderen (Tichy & Stambrook 2008; Baumann et al. 1996) gefundene erhöhte Expression von Rad51 (Abbildung 3. 19 und Abbildung 3. 20) könnte also dazu dienen, die Replikationsgabel während des replikativen Stress zu stabilisieren und zu schützen. Zudem wurden zahlreiche Cycline, PcnA und Checkpoint Kinasen in EC und SMC schwächer exprimiert als in mESC (Tabelle 3. 1), was ebenfalls auf einen verminderten replikativen Stress der differenzierten Zellen hindeutet. Außerdem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass TopBP1 (*topoisomerase (DNA) II binding protein 1*), welches ATR aktiviert (Cimprich & Cortez 2008; Kumagai et al. 2006; Mordes et al. 2008), vor replikativen DNA-Schäden schützt, indem es die genomische Integrität von frühen neuronalen Progenitorzellen während der Neurogenese sicherstellt (Y. Lee et al. 2012). Ob TopBP1 ebenfalls relevant ist, um die genomische Integrität von vaskulären Progenitorzellen sicherzustellen, ist nicht bekannt. Die Expression von Topoisomerase II Isoformen veränderte sich mit der vaskulären Differenzierung der mESC. So war die Topoisomerase II β Expression in EC hochreguliert, während Topoisomerase II α in den SMC spezifisch herunterreguliert wurde (Tabelle 3. 1). Ebenso deutet die verstärkte Zunahme der Phosphorylierung von CHK1 in den mESC auf einen erhöhten Replikationsstress der Stammzellen hin. Durch Replikationsstress kommt es zur Aktivierung von ATR und nachfolgend zu einer Phosphorylierung von CHK1. Dies ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellzykluskontrolle (Roos et al. 2013; Ciccia & Elledge 2010).

Sowohl nach Bestrahlung als auch nach einer Behandlung mit Doxorubicin wurde in EC und SMC eine stärkere Zunahme von DSBs als in mESC beobachtet. Dabei wurden in den SMC die meisten

Doppelstrangbrüche durch eine Behandlung mit den Genotoxinen induziert. Grundsätzlich führte die Behandlung mit 1 μ M Doxorubicin zu mehr DSBs als eine vergleichsweise milde Bestrahlung mit 1 Gy (Abbildung 3. 16 und Abbildung 3. 17). Eine schwächere Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in den mESC könnte drauf zurückgeführt werden, dass sie früher mit der Reparatur beginnen als EC und SMC und so 1 h nach der Behandlung bereits Schäden repariert wurden. Darauf könnte die basal hohe Expression von DNA-Reparaturgenen hindeuten. Die Kapazität zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, gemessen an der zeitabhängigen Abnahme der γ H2AX Foci, war in den EC am ausgeprägtesten und in den SMC am geringsten. Die EC konnten bereits 4h nach Bestrahlung deutlich mehr als 50% der induzierten Schäden beseitigen. 6 h nach Bestrahlung konnten EC und mESC nahezu alle induzierten Doppelstrangbrüche reparieren, wohingegen in den SMC zu diesem Zeitpunkt noch einige verbleibende DSBs nachweisbar waren (Abbildung 3. 16). Bereits in anderen Studien wurde gezeigt, dass ES-Zellen der Maus durch Bestrahlung herbeigeführte DSBs deutlich schneller reparieren als MEFs (Tichy & Stambrook 2008). Nach einer Behandlung mit 1 μ M Doxorubicin, welche deutlich schädigender war als die Bestrahlung, reparierten die EC nach 6 h über 50 % des Schadens. In mESC und SMC verblieben innerhalb des beobachteten Zeitraums deutlich mehr als 50 % der induzierten Doppelstrangbrüche (Abbildung 3. 17).

In der Aktivierung der DNA-Schadensantwort der drei Zelltypen konnten gravierende Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 3. 19 und Abbildung 3. 20). Zwar wurde in allen Zelltypen der ATM Signalweg relativ schnell aktiviert, was an der Bildung der γ H2AX Foci unmittelbar nach der Schädigung (0 h) sichtbar wird, doch die nachfolgende Phosphorylierung von spezifischen Substraten, die unter anderem an der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur sowie an der Apoptose beteiligt sind, war sehr unterschiedlich. So reagierten alle drei Zelltypen auf eine Genotoxinbehandlung mit der Erhöhung der p-P53 Expression, allerdings war diese Induktion in mESC und EC stärker als in den SMC. Eine Phosphorylierung von KAP1 (*KRAB-associated protein 1*) und SMC1 (*structural maintenance of chromosomes*) konnte sowohl nach Bestrahlung als auch Behandlung mit Doxorubicin nur in mESC und EC detektiert werden. Die unterschiedliche KAP1 und SMC1-Aktivierung nach Einwirkung der Genotoxine könnte eine bessere Zugänglichkeit des Chromatins für Reparaturfaktoren in mESC und EC zur Folge haben (Iyengar & Farnham 2011; Wu & Yu 2012). KAP1 ist für die Chromatinkondensation (Cann & Dellaire 2011) verantwortlich und SMC1 übernimmt ebenfalls wichtige Funktionen bei der Ausbildung der Chromosomen während der DNA-Reparatur (Schar et al. 2004). Die Genotoxin-induzierte Zunahme von p-P53, p-CHK1 und p-KAP1 war in den mESC am ausgeprägtesten, was auf eine besonders effiziente Zellzyklusregulation in den mESC hindeutet (Abbildung 3. 19 und Abbildung 3. 20). Dieses spiegelte

sich ebenso in der erhöhten Expression von Genen, die eine Rolle während der Zellzyklusregulation spielen, in mESC nach Behandlung mit Genotoxinen wider (Tabelle 3. 6 und Tabelle 3. 7). Wiederum ist auch bekannt, dass ES-Zellen hypersensitiv auf DNA-Schäden reagieren und sehr schnell Apoptose induzieren um die geschädigten Zellen aus dem pluripotenten Pool zu entfernen (Van Sloun et al. 1999; de Waard et al. 2003). Außerdem existieren Hinweise dazu, dass die Differenzierung von adulten Stammzellen eine Antwort auf DNA-Schäden darstellt. Dadurch wird die geschädigte Zelle ebenfalls aus dem sich ständig teilenden Stammzellpool entfernt (Mandal & Rossi 2012). Zum Beispiel wird vermutet, dass hämatopoetische Stammzellen einen BATF (*basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*) abhängigen Differenzierungs-Checkpoint besitzen (Betz et al. 2010; Schraml et al. 2009). Durch ionisierende Strahlung verursachte DNA-Schäden induzieren die Expression von BATF, was in einer lymphoiden Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen resultiert (Mandal & Rossi 2012). In Einklang zu diesen Beobachtungen fehlt ES-Zellen ein funktionsfähiger G1 Kontrollpunkt, teilweise aufgrund der Sequestration von p53 im Zytoplasma und dem Verlust von nachgeschalteten Faktoren (wie p21 und Mdm2), welche einen Zellzyklusarrest induzieren (Aladjem et al. 1998; Tichy & Stambrook 2008). In den meisten somatischen Zellen resultiert ein DNA-Schaden in einer schnellen Abnahme der Anzahl sich in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen, da p53 abhängige Mechanismen G1 Zellen davon abhalten in die S-Phase überzugehen (Kastan et al. 1991; Kastan et al. 2016; Di Leonardo et al. 1994).

Zwar exprimieren ES-Zellen, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, relative hohe Mengen an P53 (Abbildung 3. 19), allerdings kann dieses nicht effizient in den Nukleus transloziert werden (Aladjem et al. 1998). Im Rahmen der DNA-Schadensantwort wird P53 phosphoryliert. In seiner phosphorylierten Form kann P53 nicht mehr proteolytisch vom Proteasom abgebaut werden und stimuliert die Expression einer Reihe von Genen, zu denen unter anderem der Cdk Inhibitor 1 ($p21^{WAF1/CIP1}$) und an der Apoptose beteiligte Faktoren (wie Mitglieder der Bcl-2-Familie) gehören. So wird entweder ein Zellzyklusarrest induziert oder Apoptose eingeleitet, wenn der DNA-Schaden nicht beseitigt werden kann. Ein durch $P21^{WAF1/CIP1}$ eingeleiteter Zellzyklusarrest kann sowohl P53-abhängig als auch -unabhängig erfolgen (Hoeflerlin et al. 2011; Roos et al. 2013). Zellen aus unterschiedlichen Geweben reagieren mitunter sehr unterschiedlich auf Genotoxine (Aladjem et al. 1998). Zum Beispiel führt ionisierende Strahlung (IR) in Fibroblasten zu einem anhaltenden Zellzyklusarrest, welcher der Seneszenz gleich kommt (Di Leonardo et al. 1994; Chang & Little 1992; Nagasawa et al. 1995; Linke et al. 1997), wohingegen die gleiche Schädigung in Thymozyten (blutbildende Vorläuferzellen aus der Thymusdrüse) (Clarke et al. 1993; Lowe et al. 1993) und intestinalen Epithelzellen (Clarke et al. 1994) Apoptose induziert. Selbst Zellen benachbarter

Gewebe zeigen komplett unterschiedliche DNA-Schadensantworten. So induzieren Stromalzellen der Prostata (Fibroblasten) eine P53 Expression und gehen in den Zellzyklusarrest nach Bestrahlung, aber angrenzende Epithelzellen induzieren weder p53 noch wird ihr Zellzyklus angehalten (Girinsky et al. 1995). Auch während der Embryonalentwicklung konnte in verschiedenen Geweben eine Heterogenität in der stressinduzierten Transkription von P53 abhängigen Promotoren nachgewiesen werden (MacCallum et al. 1996). Diese Unterschiede in der Induktion von p53 und der Einleitung eines Zellzyklusarrest machen deutlich, dass die Signaltransduktion innerhalb der DNA-Schadensantwort gewebespezifisch reguliert wird (Aladjem et al. 1998). Es wird vermutet, dass ES-Zellen Apoptose nach einem DNA-Schaden über einen P53 unabhängigen Mechanismus induzieren (Aladjem et al. 1998) und P53 in ES-Zellen eine entscheidendere Rolle bei der Differenzierung als bei der DNA-Schadensantwort spielt (Lin et al. 2005).

In Erwidern auf milden genotoxischen Stress, wie geringe Dosen IR, reparieren humane ES-Zellen den DNA-Schaden mit ähnlichen Effizienzen wie somatische Zellen. Nach einer Bestrahlung mit hohen Dosen IR leiten sie jedoch verstärkt den programmierten Zelltod ein, wohingegen aus ihnen abgeleitete NSC (neuronalen Stammzellen) seneszent wurden oder vermehrt in Astrozyten differenzierten. Neben Astrozyten gehen aus NSC auch Neurone und Oligodendrozyten hervor. Es wird vermutete, dass die verstärkte Differenzierung in Astrozyten nach einer Bestrahlung darauf zurückzuführen ist, dass Astrozyten eine Rolle bei der Verletzungsantwort im Gehirn spielen. (Zou et al. 2012). Ebenfalls konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mESC, aber auch daraus abgeleitete Endothelzellen auf hohe Genotoxindosen verstärkt mit der Einleitung der Apoptose reagieren. So konnte eine Zunahme in der Spaltung von PARP in mESC und EC nach Bestrahlung schwach und nach einer Behandlung mit Doxorubicin verstärkt detektiert werden (Abbildung 3. 19 und Abbildung 3. 20). In den SMC konnte eine solche Spaltung nicht nachgewiesen werden. Die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP und dessen Abbau durch die Caspase 3, stellen einen wesentlichen Schritt des apoptotischen Zelltods dar. Die weiterhin durchgeführten Untersuchungen konnten die daraus resultierende Annahme, dass EC und mESC verstärkt mit einer Apoptoseinduktion auf eine Behandlung mit Genotoxinen reagieren, bestätigen. Betrachtet man die Viabilität der Zellen nach einer Behandlung mit den Genotoxinen, zeigt sich in mESC und EC eine dosisabhängige steigende Abnahme in der Viabilität (Abbildung 3. 21). Wobei 0,01 μ M Doxorubicin und 1 Gy Bestrahlung einen vergleichbaren Einfluss auf die Zellviabilität haben. In beiden Fällen sank die Viabilität in EC und SMC um etwa 10 %. mESC reagieren sowohl auf Bestrahlung als auch auf eine Behandlung mit Doxorubicin am sensitivsten. Und auch EC reagieren auf die jeweils höchste Dosis mit einer Herabsetzung der Viabilität auf weniger als 50 %. Auf die Viabilität der SMC hingegen scheinen beide Genotoxine, selbst in der höchsten getesteten Dosis, so gut wie keinen Einfluss zu nehmen (Abbildung 3. 21). Analysiert man die Anzahl der apoptotischen Zellen,

gemessen an der Zunahme von Zellen in der SubG1 Fraktion, wird deutlich, dass nur EC und mESC auf die Behandlung mit beiden Genotoxinen Apoptose induzieren. SMC leiten nach einer Bestrahlung mit sehr hohen IR Dosen ebenfalls die Apoptose ein (Abbildung 3. 22). Auf die Zellzyklusverteilung der SMC hatte eine Doxorubicinbehandlung keinen Einfluss. Sie reagieren also selbst auf hohe Dosen Doxorubicin nicht mit der Einleitung der Apoptose. Denkbar wäre, dass sie seneszent werden, worauf eine Abnahme der sich in der in der S-Phase befindlichen Zellen hindeuten könnte. Möglich wäre auch, dass SMC zunächst vom kontraktilen Phänotyp in den synthetischen differenzieren müssen, um den DNA-Schaden reparieren zu können. Es wäre interessant diesen Fragestellungen in zukünftigen Versuchen weiter nachzugehen. Gerade von glatten Gefäßmuskelzellen weiß man, dass sie sehr sensibel, aber auch sehr unterschiedlich auf exo- und endogene Einflüsse reagieren. So kann beispielsweise ihr Proliferationsstatus verändert werden, aber auch Migration, Differenzierung, Apoptose oder die Ausbildung eines seneszenten Phänotyps ausgelöst werden. Zahlreiche Erkrankungen sind mit Veränderungen des glattmuskulären Phänotyps assoziiert. Der anfängliche Verlauf von Arteriosklerose beispielsweise ist mit einer kontinuierlichen Proliferation von glatten Muskelzellen assoziiert (O'Brien et al. 1993). So kommt es zu einer intimalen Verdickung, was unter anderem gravierende Einflüsse auf den Blutdruck hat. In späteren Stadien der Arteriosklerose kommt es zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit, zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen ihre Eigenschaft zur Reparatur ruptierter Plaques verloren (Gorenne et al. 2006).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen in vaskuläre Zelltypen (EC und SMC) von qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Kapazität der DNA-Schadensantwort begleitet wird. Diese Unterschiede lassen sich nicht alleine auf den Differenzierungsstatus der Zellen zurückführen, da mESC und EC ähnlich auf einen Schaden reagierten, SMC hingegen andere Antworten zeigten. Bei einer Behandlung der Zellen mit milden Genotoxindosen (1 Gy IR; 0,01 μ M Doxorubicin) waren diese Unterschiede nicht so gravierend, da alle drei Zelltypen solche Schäden mit ähnlicher Effizienz reparierten. Zwar wurde auch ein durch hohe Genotoxindosen verursachter Schaden von allen drei Zelltypen teilweise repariert, doch war die Reparaturreffizienz der EC am größten und die der SMC am geringsten. Zudem induzierten mESC und EC, trotz der besseren Fähigkeit zur DNA-Reparatur, verstärkt Apoptose. Hingegen hatten auf die Viabilität der SMC selbst hohe Genotoxindosen (10 Gy IR; 1 μ M Doxorubicin) keinen Einfluss.

4.4 EINFLUSS VON GENOTOXINEN AUF DAS VASKULÄRE DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL MESODERMALER PROGENITORZELLEN

Vor allem bei Krebspatienten, die sich einer Bestrahlung oder Chemotherapie unterziehen müssen, werden endogene Stammzellen schädigenden Substanzen ausgesetzt, was eine Verminderung des Stammzell-Reservoirs und akute und chronische Veränderungen der Gewebemikroumgebung zur Folge haben kann (Jamal et al. 2010; Barani et al. 2007).

Änderungen in der Redox Homöostase beeinflussen das Überleben, Proliferation und das Zellschicksal und haben einen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit spezifischer Gewebe einer Verletzung standzuhalten (Kondo et al. 2007; Kondo et al. 2010). Viele der durch Bestrahlung verursachten Spätfolgen (Bluthochdruck, Schlaganfälle) werden durch eine Veränderung des endogenen Stammzellpools bewirkt. Nebeneffekte, wie oxidativer Stress und Inflammation, haben einen signifikanten Einfluss auf die dynamische Umwandlung des Gewebes und die Regenerationskapazität nach einer Verletzung (Tofilon & Fike 2000; Fike et al. 2009).

Hochwirksame Tumorthapeutika, wie beispielsweise Taxol und Anthrazyklin-Derivate wie Doxorubicin werden unter anderem bei der Therapie kindlicher Leukämien eingesetzt. Jedoch wird die Anwendung durch das Auftreten akuter und chronischer irreversibler Kardiotoxizität limitiert (Menna et al. 2008; Carvalho et al. 2014; Gianni et al. 2008). Die genauen Ursachen, die zu dieser Kardiotoxizität führen sind unklar. Denkbar ist auch hier, dass regenerative Prozesse beeinträchtigt werden. Zytotoxische Wirkungen von Anthrazyklinen auf Progenitorzellen und/ oder eine Depletion des mesenchymalen Progenitorpools könnten die Regenerationskapazität beeinträchtigen. Alternativ ist auch eine Hemmung des Differenzierungspotentials von Progenitorzellen in funktionell kompetente terminale Zelltypen denkbar. Ebenso ist es denkbar, dass diese Nebenwirkungen aus einer endothelialen Dysfunktion resultieren. Da Endothelzellen auf Grund ihrer systemischen Barrierefunktion der genotoxischen Wirkung von Anthrazyklinen direkt und in höchster Konzentration ausgesetzt sind.

Auch der Einsatz von Stammzellen in der regenerativen Medizin zeigt die Notwendigkeit die genauen Stressantworten von pluripotenten und multipotenten Stammzellen zu verstehen. Während die oben beschriebenen Prozesse dazu dienen die Regeneration des normalen Gewebes zu regulieren, beeinflussen sie ebenso das Überleben, Schicksal und Funktionalität aller transplantierten Stammzellen, wie beispielsweise nach einer Knochenmarkstransplantation (Lan et al. 2012) oder einer Transplantation von autologen mesenchymalen Stammzellen. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Bestrahlung und Doxorubicin auf das Differenzierungsverhalten mesodermaler Progenitorzellen untersucht. Dazu wurden die Zellen an d4 der Differenzierung mit den Genotoxinen behandelt und die Differenzierung bzw. Transdifferenzierung in Endothelzellen und glatte Muskelzellen wie gewohnt fortgeführt und diese

schließlich hinsichtlich ihrer Funktionalität analysiert. Die Konzentration der Genotoxine wurde so gewählt, dass sie zu einer Verminderung der Viabilität der Progenitorzellen um maximal 20 % führten und makroskopisch keinen Einfluss auf die Differenzierung hatten, um zu untersuchen, ob die überlebenden Zellen in der Lage sind in funktionelle EC und SMC zu differenzieren. Daher wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt (Abbildung 3. 24) und 0,01 μ M Doxorubicin (Abbildung 3. 29) behandelt.

Die Versuche zeigten, dass die Bestrahlung der Progenitorzellen so gut wie keinen Einfluss auf eine Differenzierung der überlebenden Zellen in funktionell kompetente EC und SMC hatte. Die differenzierten Zellen zeigten keine Veränderungen in der Morphologie (Abbildung 3. 24), exprimierten die jeweiligen zelltypspezifischen Markergene (Abbildung 3. 25 und Abbildung 3. 27) und besaßen die Fähigkeit zu prototypischen, zelltypspezifischen Funktionen (Abbildung 3. 26 und Abbildung 3. 28).

Selbst sehr hohe Strahlendosen von 10 Gy, welche zu einem 80-prozentigen Verlust der Zellviabilität in den Progenitorzellen führte, konnten eine Differenzierung der wenigen überlebenden Zellen in endothelähnliche Zellen nicht verhindern (Abbildung 3. 24). Auch in anderen Studien konnten dieses Phänomen beobachtet werden. Während eine akute Exposition mit klinisch relevanten Dosen IR zwar zum Zelltod in einem Teil der Progenitorzellen führte, hatten sie keinen Einfluss auf eine effiziente neuronale Differenzierung der überlebenden Zellen (Lan et al. 2012). Das Fehlen von Strahlungseffekten konnte ebenfalls bei der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen vermerkt werden (Nicolay et al. 2013). Es wird vermutet, dass in der überlebenden Zellfraktion durch die Bestrahlung die metabolische Aktivität der Zellen erhöht wird. Dies könnte eine ausgleichende Reaktion der Stammzellen auf genotoxischen Stress darstellen. Außerdem könnten Veränderungen im Redox Status der Zellen verantwortlich für die Determinierung der Stammzellendifferenzierung sein (Lan et al. 2012). Deshalb sollten Schwellenwerte für IR Dosen, die eine Differenzierung der Progenitorzellen durch das Auslösen von Apoptose oder Seneszenz, verhindern, in kommenden Studien bestimmt werden.

Die Behandlung der Zellen mit 0,01 μ M Doxorubicin, welche ähnliche Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen wie 1 Gy IR hatte, hatte gravierendere Auswirkungen auf das Differenzierungspotential der Progenitorzellen. Bereits ab Doxorubicindosen von 0,2 μ M, waren die 40 % überlebenden Zellen nicht in der Lage in eine endotheliale Richtung zu differenzieren (Abbildung 3. 29). Die Untersuchungen zeigten, dass durch eine Behandlung mit Doxorubicin die Proliferationsrate der Progenitorzellen deutlich abnimmt und die Apoptoserate steigt (Abbildung 3. 35). Zwar zeigen die aus an d4 mit 0,01 μ M Doxorubicin behandelten Progenitorzellen

abgeleiteten EC die typische kopfsteinpflasterartige Morphologie (Abbildung 3. 29), exprimierten aber nicht alle spezifischen Markergene (Abbildung 3. 30) und waren in ihrer Funktionalität eingeschränkt. Insbesondere waren sie nicht in der Lage *in vitro* Gefäßstrukturen zu bilden (Abbildung 3. 31). Es konnten ähnliche Einflüsse von Doxorubicin auf humane kardiale Progenitorzellen beobachtet werden, welche seneszent wurden und ihre Funktionalität verloren (Piegari et al. 2013). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen, die aus mit Doxorubicin behandelten Mäusen isoliert wurden, nach einer Differenzierung in Kardiomyozyten Connexin 43 und Troponin T, welche für die Funktionalität der Zellen essentiell sind, vermindert exprimierten (Oliveira et al. 2014).

Nach einer Transdifferenzierung der EC in SMC wurde der Einfluss der Doxorubicinbehandlung auf die Differenzierung der Progenitorzellen, vor allem anhand der veränderten Morphologie der SMC, sichtbar. Nach einer Behandlung mit Doxorubicin war ein großer Anteil der SMC flacher und größer (Abbildung 3. 34). Zudem exprimierten sie nur zwei der glatten Muskelzellmarker (Abbildung 3. 32). Die wenigen in der Population verbliebenen kontraktile SMC, waren zur Kontraktion fähig (Abbildung 3. 33). Die Veränderungen in der Morphologie könnten zum einen darauf beruhen, dass eine Behandlung der Progenitorzellen mit Doxorubicin verstärkt zu einer Differenzierung von synthetischen SMC führt, was *in vivo* schwerwiegende Folgen für die Funktionalität der Blutgefäße hätte. Auch die verringerte Calponin Expression in den SMC spricht dafür, dass sich mehr Zellen des synthetischen Phänotyps in der Population befinden. Andererseits geht auch zelluläre Seneszenz einher mit funktionellen und morphologischen Änderungen. So werden seneszente Zellen größer, flacher und der granulöse Anteil steigt (Ben-Porath & Weinberg 2005). Die Folgen für die Funktionalität der Blutgefäße wären nicht weniger gravierend.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der Einfluss von Genotoxinen auf die Differenzierung weniger dosisabhängig sondern verstärkt agensspezifisch (IR oder Doxorubicin) zu sein scheint. So konnten selbst hohe Dosen IR eine Differenzierung der Zellen nicht blockieren, wohingegen äquivalente Dosen Doxorubicin zu einem Verlust des Differenzierungspotentials in funktionell kompetente EC und SMC führten. Der Einfluss von Genotoxinen auf die Differenzierung von endogene Progenitorzellen und damit die Fähigkeit zur Geweberegeneration wurde bisher wenig untersucht. Ein genaueres Verständnis über die Reaktionen von pluripotenten und multipotenten Stammzellen auf Genotoxine könnte helfen, die Ursachen für Nebenwirkungen von unter anderem Tumortheraeutika zu identifizieren und ihren schädlichen Einfluss auf normales Gewebe zu minimieren.

5 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ergaben, dass sich die beiden untersuchten Zelltypen der Blutgefäße gravierend in ihrer Sensitivität gegenüber Genotoxinen und entsprechender DNA-Schadenantwort unterscheiden. In den glatten Muskelzellen (SMC) wurde nicht nur eine größere Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen induziert, auch besaßen sie eine deutlich geringere DNA-Reparaturkapazität. Die Endothelzellen reparierten den induzierten DNA-Schaden zwar mit höherer Effizienz, leiteten aber ebenso verstärkt die Apoptose ein. Auf die Viabilität der SMC hingegen scheinen die Genotoxine keinen Einfluss zu nehmen. Intensivere Untersuchungen sollten aufbauend auf diesen neuen Erkenntnissen der Frage nachgehen, ob SMC möglicherweise anstelle die Apoptose einzuleiten, in einen permanenten Zellzyklusarrest eintreten. Dies könnte mit dem Seneszenzmarker β -Galaktosidase geschehen. Die Exposition von vaskulären Progenitorzellen mit Genotoxinen führte zu einer Differenzierung von SMC, die in ihrer Morphologie stark an den synthetischen Phänotyp erinnern. Weitere Untersuchungen dieser Zellen könnten klären, ob ein Phänotypenwechsel stattgefunden und ob dieser reversibel ist.

Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen von Genotoxinen auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen und das Differenzierungspotential von Progenitorzellen in ebendiese untersucht. Unter anderem sind bei der akuten kardiotoxischen Wirkung von Doxorubicin auch direkte Wirkungen auf Kardiomyozyten von enormer Bedeutung. Resultate der direkten Wirkung können unzureichende Reparaturvorgänge oder die Induktion von Zelltod sein. Ebenso ist auch hier vorstellbar, dass regenerative Prozesse beeinträchtigt werden oder es zu einer Depletion des Stammzellpools kommt, welche mit dem in dieser Arbeit entwickelten *in vitro* Testsystems ebenfalls analysiert werden können. Daher ist es von großem Interesse, zusätzlich ein Protokoll zur Differenzierung der Stammzelllinie LF2 in Kardiomyozyten zu entwickeln und diese in die Analysen mit einzubinden. Die Vorarbeiten dazu konnten im Rahmen dieser Arbeit bereits geleistet werden. Mit dem entwickelten Protokoll konnten rhythmisch pulsierende Zellen, welche Kardiomyozyten-spezifische Markergene exprimieren, generiert werden. Eine Expression des *cardiac muscle troponin T* (Tnnt2) konnte sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Das an die Stammzelllinie LF2 angepasste Differenzierungsprotokoll und eine Zusammenfassung der erzielten Daten ist in Abbildung 5. 1 dargestellt.

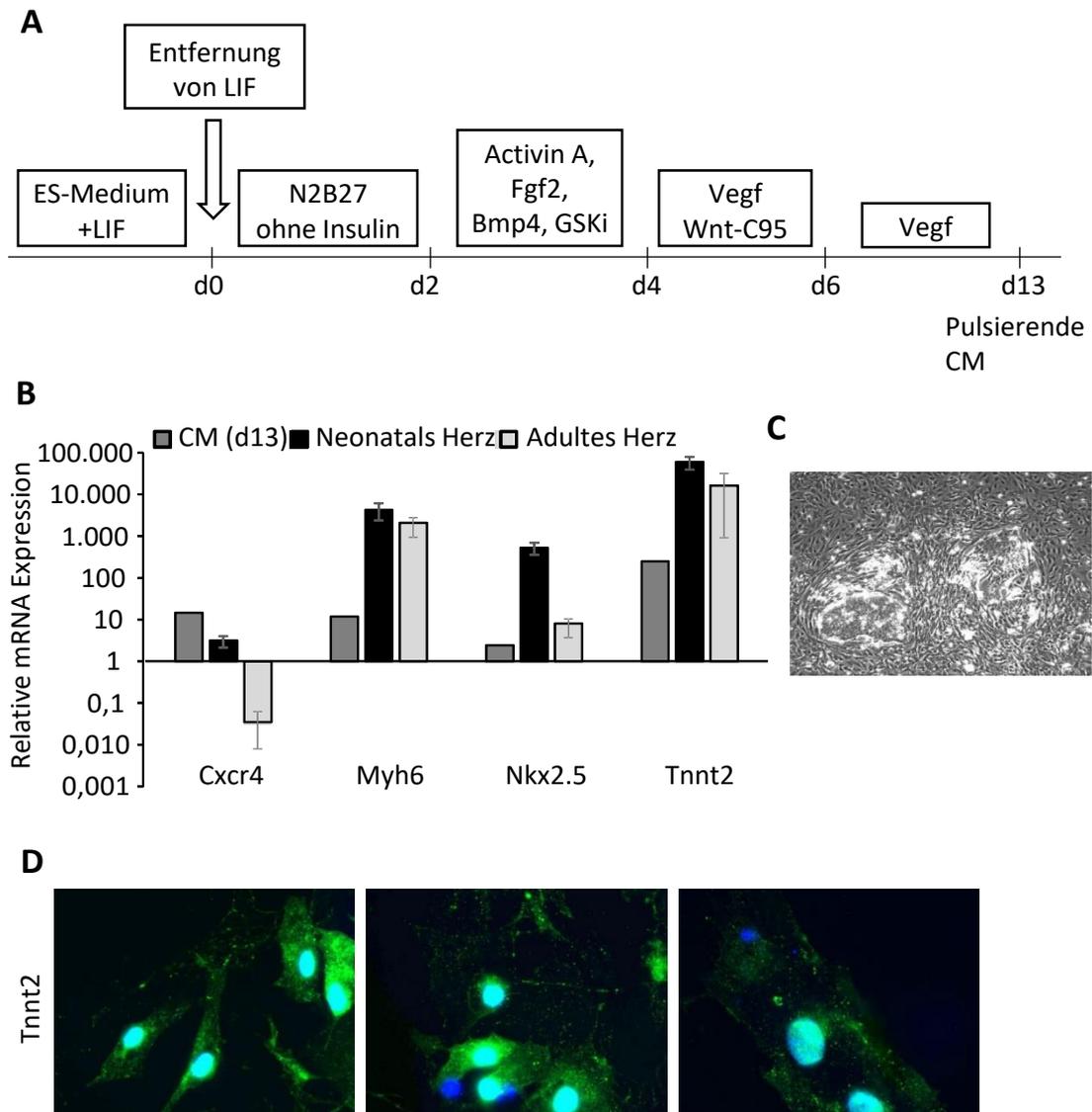


Abbildung 5. 1: Aus mESC abgeleitete Kardiomyozyten.

A: Schematische Darstellung des Protokolls zur Differenzierung von mESC in pulsierende Kardiomyozyten. B: Quantitative Real-time PCR Analyse der Kardiomyozytenmarker Cxcr4, Mhy6, Nkx2.5 und Tnnt2. Die mRNA Expression wurde auf ein Housekeeping-Gen (Gapdh) normalisiert und auf die Expression der undifferenzierten Zellen (mESC) bezogen, welche auf 1,0 gesetzt wurde. Die mRNA aus adulten und neonatalen Mäuseherzen wurde als Referenz herangezogen. B: Morphologie der rhythmisch pulsierenden Zellen. C: Immunzytochemische Analysen der Proteinexpression von Tnnt2 an Tag 13 der Kardiomyozytendifferenzierung. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Cxcr4: *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*, Myh6: *myosin heavy chain, α isoform*, Nkx2.5: *NK2 homeobox 5*, Tnnt2: *Troponin T2, cardiac*, DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol, CM: Kardiomyozyten, mESC: *mouse embryonic stem cells*, Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Die Gewinnung von detaillierten Informationen über Faktoren, welche die Suszeptibilität von vaskulären Progenitorzellen und daraus abgeleiteten vaskulären Zelltypen gegenüber Doxorubicin oder anderen kardiotoxischen Genotoxinen beeinflussen, ist für die Entwicklung kardiopräventiver Strategien unabdingbar. Untersuchungen an primären Zelllinien konnten zeigen, dass der Lipidsenker Lovastatin und Rac1 Inhibitoren die von Doxorubicin und IR induzierten Stressantworten teilweise hemmten, was zu einer erhöhten Resistenz der Zellen führte

(Huelsenbeck et al. 2012; Wartlick et al. 2013). In *in vivo* Experimenten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Lovastatin die Organtoxizität von Doxorubicin vermindert ohne dabei die anti-tumorigene Wirksamkeit zu beeinträchtigen (Huelsenbeck et al. 2011; Henninger et al. 2012). Mit dem entwickelten Testsystem ist es möglich, zytoprotektive Wirkungen solcher oder anderer Substanzen auch auf die vaskulären Progenitorzellen zu analysieren. Durch die Identifikation protektiver Substanzen könnte möglicherweise verhindert werden, dass eine Differenzierung in funktionell kompetente Progenitorzellen gehemmt wird. Auf lange Sicht gesehen, wäre es sicherlich von Vorteil in das humane System überzugehen. Zu diesem Zweck bieten sich vor allem induzierte pluripotente Stammzellen an, um den ethischen Bedenken, die vor allem bei der Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen bestehen, aus dem Wege zu gehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Endothelzellen und glatte Muskelzellen, welche das Innere von Blutgefäße auskleiden, agieren als eine selektive Barriere zwischen dem Lumen der Blutgefäße und dem sie umgebenden Gewebe. Aufgrund dieser Barrierefunktion werden die Zellen der Blutgefäße einer sehr hohen Konzentration an systemisch präsenten Noxen ausgesetzt. Daher ist es denkbar, dass das vaskuläre Endothelium effektive Reparatur- und Regenerationsprozesse bereitstellen muss, um die vaskuläre Gesundheit sicherzustellen. Falsche oder unvollständige Reparatur von Schäden resultiert in pathophysiologischen Veränderungen und manifestiert möglicherweise eine endotheliale Dysfunktion.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen in Deutschland und anderen Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. Dysfunktionen in den Zellbestandteilen der Blutgefäße können beispielsweise zu Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt, Bluthochdruck oder Arteriosklerose führen. Neben den bekannten Risikofaktoren wie erhöhte Cholesterinwerte, übermäßiger Alkohol- und Nikotinkonsum sowie Stress und Bewegungsmangel, können auch bestimmte Umweltgifte das Risiko zur Entstehung solcher Krankheiten erhöhen. Auch Medikamente, wie sie beispielsweise in der Tumorthapie eingesetzt werden, führen zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie u.a. Kardiotoxizität. Ebenso werden strahlenbedingte Gefäßveränderungen als Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen und beeinflussen das regenerative Potential der Blutgefäße. Neben einer direkten Schädigung der Zellen der Blutgefäße durch Genotoxine, könnte auch der Einfluss auf den endogenen Stammzellpool eine Rolle spielen. Vaskuläre Stamm- und Progenitorzellen tragen maßgeblich zur Regeneration der Blutgefäße bei. Eine Akkumulation von DNA-Schäden in Progenitorzellen oder eine Erschöpfung des Stammzellpool kann eine entscheidende Ursache für das Entstehen von vaskulären Krankheiten sein. Die molekularen Mechanismen, die zu solchen endothelialen Dysfunktion führen und welcher Zelltyp der Blutgefäße am stärksten durch Genotoxine beeinträchtigt wird, ist nicht genau geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Testsystem entwickelt mit dem sich die molekularen Auswirkungen von Genotoxinen (am Beispiel von ionisierender Strahlung und Doxorubicin) auf die Zellen der Blutgefäße (Endothelzellen und glatte Muskelzellen), sowie auf das regenerative Potential von Progenitorzellen untersuchen lassen. Der Fokus lag auf der Analyse der resultierenden DNA-Schadensantwort und der Reparaturfähigkeit der Zellen. Zu diesem Zweck wurden zunächst Protokolle entwickelt, mit denen sich die embryonale Stammzelllinie LF2 (mESC) in funktionsfähige Endothelzellen (EC) und glatte Muskelzellen (SMC) differenzieren lassen. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die phänotypische und funktionelle Charakterisierung der Zellen gelegt, da diese Methoden auch dazu genutzt werden sollten, den Einfluss von Genotoxinen

auf das Differenzierungspotential der Progenitorzellen beurteilen zu können. Die in dieser Arbeit differenzierten Zellen exprimierten nicht nur zelltypspezifische Markergene, sondern besaßen prototypischen zelltypspezifische Funktionen. Vergleichende Genexpressionsanalysen von Suszeptibilitätsfaktoren, welche in die DNA-Reparatur, die Zellzyklusregulation und den Zelltod involviert sind, zeigten deutliche Unterschiede in der basalen und Genotoxin-induzierten Expression, zwischen mESC, EC und SMC. Die Expression von Genen, die an den verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen (HR, NHEJ, BER, MMR und NER) beteiligt sind, war in den mESC deutlich verstärkt. SMC zeigten die geringste basale Expression von Reparaturgenen, welche auch nicht durch Bestrahlung (IR) oder Behandlung mit Doxorubicin induziert werden konnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von an der Apoptose beteiligten Genen (c-lap1, Fas-R, Bax, Bid) in mESC und EC im Vergleich zu SMC deutlich erhöht war. In Einklang zu diesen Daten, zeigten Untersuchungen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, dass mESC und EC diese Schäden mit einer größeren Effizienz reparieren als SMC. Außerdem leiten mESC und EC, trotz der besseren Fähigkeit zur DNA-Reparatur, verstärkt den programmierten Zelltod ein. Die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen in vaskuläre Zelltypen (EC und SMC) wurde von qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Kapazität der DNA-Schadensantwort begleitet. Diese Unterschiede lassen sich nicht alleine auf den Differenzierungsstatus der Zellen zurückführen, da mESC und EC ähnlich auf einen Schaden reagierten, SMC hingegen andere Antworten zeigten. Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Genotoxinen auf das Differenzierungspotential von Progenitorzellen in funktionsfähige EC und SMC analysiert. Der Einfluss von Genotoxinen auf die Differenzierung scheint weniger dosisabhängig sondern verstärkt agensspezifisch (IR oder Doxorubicin) zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass selbst hohe Dosen IR eine Differenzierung der Zellen nicht verhinderten, wohingegen vergleichbar zytotoxische Dosen Doxorubicin zu einem Verlust des Differenzierungspotentials in funktionell kompetente EC und SMC führten. Der Einfluss von Genotoxinen auf die Differenzierung von endogenen Progenitorzellen und damit die Fähigkeit zur Geweberegeneration wurde bisher wenig untersucht. Ein genaueres Verständnis über die Reaktionen von pluripotenten und multipotenten Stammzellen auf Genotoxine könnte helfen, die Ursachen für Nebenwirkungen von Medikamenten zu identifizieren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit machen das Potential von auf mESC basierenden *in vitro* Differenzierungssystemen für (i) toxikologische Arzneimittelbewertungen und für (ii) die gründliche Charakterisierung von Einflüssen der DNA-Reparatur und der DNA-Schadensantwort auf die Angiogenese und die vaskuläre Funktionalität unter chronischen umweltbedingten Stresssituationen deutlich.

7 SUMMARY

Endothelial cells and smooth muscle cells line the entire of blood vessels, thereby acting as a semi-selective barrier between the vessel lumen and the surrounding tissue. Due to their barrier function endothelial cells and also smooth muscle cells are exposed to high concentrations of systemically present noxae. Therefore it is conceivable that the vascular endothelium has to ensure distinct damage defense and regenerative mechanisms to guarantee vascular health. Incorrect repair of damage and incomplete regeneration eventually ends up in pathophysiological alterations, which manifest as endothelial dysfunction. Cardiovascular diseases are the most frequent cause of death in industrialized nations. Dysfunctions in the constituent parts of blood vessels might lead to cardiac insufficiency, coronary heart disease, heart attack, hypertension or arteriosclerosis. Beside the known risks like increased cholesterol levels, alcohol abuse, smoking, stress and physical inactivity also certain environmental pollutants can raise the risk for cardiovascular diseases. Drugs that are used in the treatment of cancers lead to side effects like cardiotoxicity, too. Also irradiation dependent vessel transformations are considered to be a cause of cardiovascular diseases and influence the regenerative potential of blood vessels. Beside direct impairments of blood vessel cells through genotoxins, the effect on endogenous stem and progenitor cells plays a crucial role in the impairment of blood vessels. An accumulation of DNA-damage in progenitor cells or a depletion of the stem cell pool might be an essential reason for the development of vascular diseases. The molecular mechanisms which lead to such endothelial and vascular dysfunctions and which cell type of the blood vessel is mostly affected, still remain unclear.

In this work an *in vitro* test system was adapted, to analyze the molecular effects of genotoxins (ionizing radiation and doxorubicin) on specific cell types of a blood vessel (endothelial cells and smooth muscle cells), as well as on the regenerative potential of progenitor cells. Particular emphasis was placed on the resulting DNA-damage response and the repair capacity of the cells. Therefore initially a protocol that is useful to differentiate mouse embryonic stem cells (mESC) in functionally competent endothelial- and smooth muscle-like cells was established. It was made a crucial point on the phenotypical and functional characterization of the differentiated cells, because the applied methods were also used to analyze the influence of genotoxins on the differentiation potential of progenitor cells. The differentiated cells expressed cell type specific marker genes and showed prototypical functions. Comparative gene expression analysis of susceptibility factors, which are involved in DNA-repair, cell cycle regulation and cell death, showed distinct differences in the basal and genotoxin-induced expression, between mESC, endothelial (EC) and smooth muscle cells (SMC). The expression of genes, which are involved in the different DNA-repair mechanisms

(HR, NHEJ, BER, MMR and NER) was increased in mESC. SMC showed the lowest basal expression of repair genes, which couldn't even be induced by the used genotoxins. Furthermore it could be shown, that the expression of genes, which are involved in apoptosis, was increased in mESC and EC compared to SMC. Consistent with these data, analysis of the repair capacity of DNA double-strand breaks showed, that mESC and EC repair these type of DNA damage with a higher efficiency. In addition, the initiation of apoptosis was increased in mESC and EC. The differentiation of mouse embryonic stem cells in vascular cell type was accompanied by distinct alterations in the DNA-damage response capacity. These alterations can not only be ascribed to the differentiation status of a cell, because mESC and EC respond similar to DNA damage. Furthermore the influence of genotoxins on the differentiation potential of progenitor cells in functionally competent EC and SMC was analyzed. The influence of genotoxins seemed to be more agent specific than dose dependent. It could be shown that even high dose of ionizing radiation did not block the differentiation into competent cells, whereas equivalent concentrations of doxorubicin led to a loss of the differentiation potential.

The findings highlight the potential of mESC-based *in vitro* differentiation systems for (1) meaningful toxicological drug assessment and (2) thorough characterization of the impact of DNA repair and DDR mechanisms for angiogenesis and vascular functionality under situation of chronic environmental stress.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aboussekhra, A. et al., 1995. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, 80(6), pp.859–68.
- Agarwal, S., Tafel, A.A. & Kanaar, R., 2006. DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair*, 5(9), pp.1075–1081.
- Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, A.N., 2006. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 290(6), pp.1532–42.
- Aird, W.C., 2003. Endothelial cell heterogeneity. *Critical care medicine*, 31(4 Suppl), pp.S221-30.
- Aitsebaomo, J. et al., 2008. Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity. *Circulation research*, 103(9), pp.929–39.
- Aladjem, M.I. et al., 1998. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Current biology : CB*, 8(3), pp.145–55.
- Albrechtsen, N. et al., 1999. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, 18(53), pp.7706–17.
- Alcorta, D.A. et al., 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), pp.13742–7.
- Angst, B.D., Marcozzi, C. & Magee, A.I., 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of cell science*, 114(Pt 4), pp.629–41.
- Araújo, S.J. et al., 2000. Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes & development*, 14(3), pp.349–59.
- Arcamone, F. et al., 2000. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnology and bioengineering*, 67(6), pp.704–13.
- Arciniegas, E., Parada, D. & Graterol, A., 2003. Mechanically altered embryonic chicken endothelial cells change their phenotype to an epithelioid phenotype. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 270(1), pp.67–81.
- Asahara, T. et al., 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302), pp.964–7.
- van Attikum, H. & Gasser, S.M., 2005. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(10), pp.757–65.
- Augustin-Voss, H.G., Johnson, R.C. & Pauli, B.U., 1991. Modulation of endothelial cell surface

- glycoconjugate expression by organ-derived biomatrices. *Experimental cell research*, 192(2), pp.346–51.
- Ausprunk, D.H. & Folkman, J., 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular research*, 14(1), pp.53–65.
- Avolio, E. & Madeddu, P., 2016. Discovering cardiac pericytes biology: From physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic heart disease. *Vascular pharmacology*.
- Babai, F. et al., 1990. Coexpression of alpha-sarcomeric actin, alpha-smooth muscle actin and desmin during myogenesis in rat and mouse embryos I. Skeletal muscle. *Differentiation; research in biological diversity*, 44(2), pp.132–42.
- Bachur, N.R. et al., 1992. Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Molecular pharmacology*, 41(6), pp.993–8.
- Bagutti, C. et al., 1996. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Developmental biology*, 179(1), pp.184–96.
- Bahassi, E.M. et al., 2008. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*, 27(28), pp.3977–85.
- Bain, G. et al., 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Developmental biology*, 168(2), pp.342–57.
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), pp.499–506.
- Ballas, C.B., Zielske, S.P. & Gerson, S.L., 2002. Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 38, pp.20–8.
- Barani, I.J., Benedict, S.H. & Lin, P.-S., 2007. Neural stem cells: implications for the conventional radiotherapy of central nervous system malignancies. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 68(2), pp.324–33.
- Bartek, J. et al., 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell*, 3(5), pp.421–9.
- Bates, D.A. & Winterbourn, C.C., 1982. Deoxyribose breakdown by the adriamycin semiquinone and H₂O₂: evidence for hydroxyl radical participation. *FEBS letters*, 145(1), pp.137–42.
- Bauer, M. et al., 2011. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), pp.21105–10.

- Baumann, P., Benson, F.E. & West, S.C., 1996. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 87(4), pp.757–66.
- Baumann, P. & West, S.C., 1997. The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *The EMBO journal*, 16(17), pp.5198–206.
- Beamish, J.A. et al., 2010. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(5), pp.467–91.
- Ben-Porath, I. & Weinberg, R.A., 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), pp.961–976.
- Bennett, M.R., Sinha, S. & Owens, G.K., 2016. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research*, 118(4), pp.692–702.
- Besler, C. et al., 2008. Pharmacological approaches to improve endothelial repair mechanisms. *Expert review of cardiovascular therapy*, 6(8), pp.1071–82.
- Betz, B.C. et al., 2010. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *The Journal of experimental medicine*, 207(5), pp.933–42.
- Blancas, A.A. et al., 2011. Endothelial cells from embryonic stem cells in a chemically defined medium. *Stem cells and development*, 20(12), pp.2153–61.
- Blancas, A.A., Lauer, N.E. & McCloskey, K.E., 2008. Endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Current protocols in stem cell biology*, Chapter 1, p.Unit 1F.5.
- Blasina, A. et al., 2008. Breaching the DNA damage checkpoint via PF-00477736, a novel small-molecule inhibitor of checkpoint kinase 1. *Molecular cancer therapeutics*, 7(8), pp.2394–404.
- Blum, R.H. & Carter, S.K., 1974. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Annals of internal medicine*, 80(2), pp.249–59.
- Boege, F. et al., 1993. A drug-resistant variant of topoisomerase II alpha in human HL-60 cells exhibits alterations in catalytic pH optimum, DNA binding and sub-nuclear distribution. *European journal of biochemistry / FEBS*, 218(2), pp.575–84.
- Bohr, V.A. et al., 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, 40(2), pp.359–69.
- Bosman, G.J.C.G.M. et al., 2008. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfusion medicine (Oxford, England)*, 18(6), pp.335–47.
- Bouis, D. et al., 2006. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacological Research*, 53(2), pp.89–103.
- Bratosin, D. et al., 1995. Flow cytometric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span. *Glycoconjugate journal*, 12(3), pp.258–67.

- Brugarolas, J. et al., 1999. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), pp.1002–7.
- Buttery, L.D. et al., 2001. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue engineering*, 7(1), pp.89–99.
- Byun, T.S. et al., 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & development*, 19(9), pp.1040–52.
- Cain, K. et al., 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *The Journal of biological chemistry*, 275(9), pp.6067–70.
- Campbell, G.R. & Campbell, J.H., 1985. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 42(2), pp.139–162.
- Cann, K.L. & Dellaire, G., 2011. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 89(1), pp.45–60.
- Cao, X. et al., 2011. Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), pp.1609–14.
- Caplice, N.M. & Doyle, B., 2005. Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem cells and development*, 14(2), pp.122–39.
- Carlos, T.M. & Harlan, J.M., 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84(7), pp.2068–101.
- Carman, C. V & Martinelli, R., 2015. T Lymphocyte-Endothelial Interactions: Emerging Understanding of Trafficking and Antigen-Specific Immunity. *Frontiers in immunology*, 6, p.603.
- Carmeliet, P. et al., 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), pp.435–9.
- Carmeliet, P., 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), pp.389–95.
- Carvalho, F.S. et al., 2014. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Medicinal research reviews*, 34(1), pp.106–35.
- Cassinelli, G. et al., 1982. New anthracycline glycosides: 4-O-demethyl-11-deoxydoxorubicin and analogues from *Streptomyces peucetius* var. *aureus*. *The Journal of antibiotics*, 35(2), pp.176–83.

- Ceafalan, L.C. et al., 2014. Cellular players in skeletal muscle regeneration. *BioMed research international*, 2014, p.957014.
- Cecconi, F. & Levine, B., 2008. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Developmental cell*, 15(3), pp.344–57.
- Cervantes, R.B. et al., 2002. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), pp.3586–90.
- Chang, B.D. et al., 1999. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, 18(34), pp.4808–18.
- Chang, W.P. & Little, J.B., 1992. Delayed reproductive death as a dominant phenotype in cell clones surviving X-irradiation. *Carcinogenesis*, 13(6), pp.923–8.
- Chatgililoglu, C. & O'Neill, P., 2001. Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology*, 36(9), pp.1459–1471.
- Chaturvedi, P. et al., 1999. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 18(28), pp.4047–54.
- Chehab, N.H. et al., 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes & development*, 14(3), pp.278–88.
- Chen, F. et al., 1997. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutation Research/DNA Repair*, 384(3), pp.205–211.
- Chen, G. et al., 2014. Blocking autocrine VEGF signaling by sunitinib, an anti-cancer drug, promotes embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Cell research*, 24(9), pp.1121–36.
- Chen CW, Corselli M, Péault B, H.J., 2012. Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *J Biomed Biotechnol*.
- Cheng, M. et al., 1999. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *The EMBO journal*, 18(6), pp.1571–83.
- Chiang, P.-M. & Wong, P.C., 2011. Differentiation of an embryonic stem cell to hemogenic endothelium by defined factors: essential role of bone morphogenetic protein 4. *Development (Cambridge, England)*, 138(13), pp.2833–43.
- Chien, S., 2007. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 292(3), pp.H1209-24.
- Chlebowski, R.T., 1979. Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: a review. *The Western journal of medicine*, 131(5), pp.364–8.

- Cho, Y.M. et al., 2009. Induction of unfolded protein response during neuronal induction of rat bone marrow stromal cells and mouse embryonic stem cells. *Experimental & molecular medicine*, 41(6), pp.440–52.
- Choi, K. et al., 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development (Cambridge, England)*, 125(4), pp.725–32.
- Christmann, M. et al., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1–2), pp.3–34.
- Chung, A.S., Lee, J. & Ferrara, N., 2010. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 10(7), pp.505–14.
- Ciccia, A. & Elledge, S.J., 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), pp.179–204.
- Cimprich, K.A. & Cortez, D., 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8), pp.616–27.
- Cines, D.B. et al., 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10), pp.3527–61.
- Claij, N. & Te Riele, H., 2002. Methylation tolerance in mismatch repair proficient cells with low MSH2 protein level. *Oncogene*, 21(18), pp.2873–9.
- Clark, D.P. & Pazdernik, N.J., 2009. Altern und Apoptose. In *Molekulare Biotechnologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 523–550.
- Clarke, A.R. et al., 1994. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene*, 9(6), pp.1767–73.
- Clarke, A.R. et al., 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362(6423), pp.849–52.
- Coll-Bonfill, N. et al., 2015. Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling. *American journal of stem cells*, 4(1), pp.13–21.
- Columbano, A., 1995. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *Journal of cellular biochemistry*, 58(2), pp.181–90.
- Condorelli, G. et al., 2001. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10733–8.
- Cory, S. & Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*, 2(9), pp.647–56.
- Critchlow, S.E. & Jackson, S.P., 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends in biochemical sciences*, 23(10), pp.394–8.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C. & Leach, D.R., 2001. Recombination at double-strand breaks and DNA

- ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular cell*, 8(6), pp.1163–74.
- Cui, K. et al., 2000. Novel interaction between the transcription factor CHOP (GADD153) and the ribosomal protein FTE/S3a modulates erythropoiesis. *The Journal of biological chemistry*, 275(11), pp.7591–6.
- Damert, A. et al., 2002. Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 129(8), pp.1881–92.
- Dani, C. et al., 1997. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *Journal of cell science*, 110 (Pt 1, pp.1279–85.
- Davies, P.F., 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological reviews*, 75(3), pp.519–60.
- Davis-Dusenbery, B.N., Wu, C. & Hata, A., 2011. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(11), pp.2370–7.
- DeCicco-Skinner, K.L. et al., 2014. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (91), p.e51312.
- Dejean, L.M. et al., 2006. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1762(2), pp.191–201.
- Delacroix, S. et al., 2007. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes & development*, 21(12), pp.1472–7.
- Demirbag, R. et al., 2005. Lymphocyte DNA damage in patients with acute coronary syndrome and its relationship with severity of acute coronary syndrome. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 578(1), pp.298–307.
- Deng, C.X. et al., 1994. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes & development*, 8(24), pp.3045–57.
- DeRuiter, M.C. et al., 1997. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circulation research*, 80(4), pp.444–51.
- Dethlefsen, S.M., Shepro, D. & D'Amore, P.A., Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *Journal of vascular research*, 33(5), pp.405–13.
- Dimri, G.P. et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp.9363–7.
- DiPietro, L.A., 2016. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of leukocyte biology*.

- Doetschman, T.C. et al., 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology*, 87, pp.27–45.
- Donoho, G., Jasin, M. & Berg, P., 1998. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 18(7), pp.4070–8.
- Dotsenko, O., 2010. Stem/Progenitor cells, atherosclerosis and cardiovascular regeneration. *The open cardiovascular medicine journal*, 4, pp.97–104.
- Drab, M. et al., 1997. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(11), pp.905–15.
- Drake, C.J. & Fleming, P.A., 2000. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood*, 95(5), pp.1671–9.
- Drake, C.J., Hungerford, J.E. & Little, C.D., 1998. Morphogenesis of the first blood vessels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 857, pp.155–79.
- Duckett, D.R. et al., 1996. Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), pp.6443–7.
- Duong, H.T., Erzurum, S.C. & Asosingh, K., 2011. Pro-angiogenic hematopoietic progenitor cells and endothelial colony-forming cells in pathological angiogenesis of bronchial and pulmonary circulation. *Angiogenesis*, 14(4), pp.411–22.
- El-Mezgueldi, M., 1996. Calponin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(11), pp.1185–1189.
- Engelhardt, B. & Wolburg, H., 2004. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European journal of immunology*, 34(11), pp.2955–63.
- Enns, L. et al., 1998. Radiosensitivity in ataxia telangiectasia fibroblasts is not associated with deregulated apoptosis. *Radiation research*, 150(1), pp.11–6.
- Erhardt, L., 2009. Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 205(1), pp.23–32.
- Evans, E. et al., 1997. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *The EMBO journal*, 16(3), pp.625–38.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse

- embryos. *Nature*, 292(5819), pp.154–6.
- Fairchild, P.J. et al., 2000. Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Current biology : CB*, 10(23), pp.1515–8.
- Ferjani, I. et al., 2010. Two distinct regions of calponin share common binding sites on actin resulting in different modes of calponin–actin interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(9), pp.1760–1767.
- Fernandez-Capetillo, O. et al., 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair*, 3(8–9), pp.959–67.
- Fike, J.R., Rosi, S. & Limoli, C.L., 2009. Neural precursor cells and central nervous system radiation sensitivity. *Seminars in radiation oncology*, 19(2), pp.122–32.
- Fisher, S.A., 2010. Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiological genomics*, 42A(3), pp.169–87.
- Flindt, R., 1985. *Biologie in Zahlen : eine Datensammlung in Tabellen mit über 9000 Einzelwerten*, Fischer.
- Flygare, J., Benson, F. & Hellgren, D., 1996. Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1312(3), pp.231–6.
- Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*, 1(1), pp.27–31.
- Folkman, J. & Klagsbrun, M., 1987a. Angiogenic factors. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4787), pp.442–7.
- Folkman, J. & Klagsbrun, M., 1987b. Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature*, 329(6141), pp.671–2.
- Förstermann, U., 2008. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 5(6), pp.338–49.
- Frid, M.G., Kale, V.A. & Stenmark, K.R., 2002. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circulation research*, 90(11), pp.1189–96.
- Fritz, G., Henninger, C. & Huelsenbeck, J., 2011. Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *British medical bulletin*, 97, pp.17–26.
- Fu, D., Calvo, J.A. & Samson, L.D., 2012. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature reviews. Cancer*, 12(2), pp.104–20.
- Fulton, D.J.R., 2016. Chapter Two – Transcriptional and Posttranslational Regulation of eNOS in the Endothelium. In *Advances in Pharmacology*. pp. 29–64.
- Garlanda, C. et al., 1994. Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by

- mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), pp.7291–5.
- Garlanda, C. & Dejana, E., 1997. Heterogeneity of Endothelial Cells : Specific Markers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(7), pp.1193–1202.
- Gartel, A.L. & Radhakrishnan, S.K., 2005. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer research*, 65(10), pp.3980–5.
- Gass, J.N., Gifford, N.M. & Brewer, J.W., 2002. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(50), pp.49047–54.
- Genschow, E. et al., 2002. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 30(2), pp.151–76.
- Gewirtz, D., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), pp.727–741.
- Gewirtz, D.A., 2014. Autophagy and senescence in cancer therapy. *Journal of cellular physiology*, 229(1), pp.6–9.
- Gianni, L. et al., 2008. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(22), pp.3777–84.
- Gille, H. et al., 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *The Journal of biological chemistry*, 276(5), pp.3222–30.
- Gillett, C.E. & Barnes, D.M., 1998. Cell cycle. *Mol Pathol.*, 51(6), pp.310–6.
- Girinsky, T. et al., 1995. Attenuated response of p53 and p21 in primary cultures of human prostatic epithelial cells exposed to DNA-damaging agents. *Cancer research*, 55(17), pp.3726–31.
- Glaser, D.E. et al., 2011. Functional characterization of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of vascular research*, 48(5), pp.415–28.
- Glynn, A.W. et al., 2000. Organochlorines and bone mineral density in Swedish men from the general population. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 11(12), pp.1036–42.
- Goldstein, J.L. et al., 1977. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism: clinical and experimental*, 26(11), pp.1257–75.

- Gómez-Gaviro, M.V. et al., 2012. The vascular stem cell niche. *Journal of cardiovascular translational research*, 5(5), pp.618–30.
- Gomez, D. & Owens, G.K., 2012. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 95(2), pp.156–64.
- Goodhead, D.T., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology*, 65(1), pp.7–17.
- Gorenne, I. et al., 2006. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 72(1), pp.9–17.
- Goswami, P.C., Roti Roti, J.L. & Hunt, C.R., 1996. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase IIalpha during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Molecular and cellular biology*, 16(4), pp.1500–8.
- Gottlieb, T.M. & Jackson, S.P., 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), pp.131–42.
- Gray, K. et al., 2015. Effects of DNA damage in smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circulation research*, 116(5), pp.816–26.
- Guan, K., Rohwedel, J. & Wobus, A.M., 1999. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology*, 30(1–3), pp.211–26.
- Gudkov, A. V & Komarova, E.A., 2003. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(2), pp.117–29.
- Gupta, R.C. et al., 1998. Polarity of DNA strand exchange promoted by recombination proteins of the RecA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), pp.9843–8.
- Harfe, B.D. & Jinks-Robertson, S., 2000. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annual review of genetics*, 34, pp.359–399.
- Harper JW, E.S., 2007. The DNA damage response: ten years after.
- Hashimoto, Y. et al., 2010. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nature structural & molecular biology*, 17(11), pp.1305–11.
- Hedin, U., Holm, J. & Hansson, G.K., 1991. Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype. *The American journal of pathology*, 139(3), pp.649–56.
- Heitzer, T. et al., 1996. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation*, 93(7), pp.1346–53.

- Hennicke, T. et al., 2015. mESC-based in vitro differentiation models to study vascular response and functionality following genotoxic insults. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 144(1), pp.138–50.
- Henninger, C. et al., 2012. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 261(1), pp.66–73.
- Hescheler, J. et al., 1997. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovascular research*, 36(2), pp.149–62.
- Hildebrandt, G., 2010. Non-cancer diseases and non-targeted effects. *Mutation research*, 687(1–2), pp.73–7.
- Hoeflerlin, L.A. et al., 2011. Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. *Genes & cancer*, 2(9), pp.889–99.
- Holthöfer, H. et al., 1982. Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(1), pp.60–6.
- Hong, Y. & Stambrook, P.J., 2004. Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), pp.14443–8.
- Hormia, M., Lehto, V.P. & Virtanen, I., 1983. Identification of UEA I-binding surface glycoproteins of cultured human endothelial cells. *Cell biology international reports*, 7(6), pp.467–75.
- Hoshino, A. et al., 2008. Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 368(2), pp.305–10.
- Hudon, V. et al., 2003. A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *The British journal of dermatology*, 148(6), pp.1094–104.
- Huelsenbeck, J. et al., 2011. Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell Death and Disease*, 2(8), p.e190.
- Huelsenbeck, S.C. et al., 2012. Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. *The Journal of biological chemistry*, 287(46), pp.38590–9.
- Huelsken, J. et al., 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *The Journal of cell biology*, 148(3), pp.567–78.
- Hurairah, H. & Ferro, A., 2004. The role of the endothelium in the control of vascular function. *International journal of clinical practice*, 58(2), pp.173–83.
- Ichii, T. et al., 2001. Fibrillar collagen specifically regulates human vascular smooth muscle cell genes

- involved in cellular responses and the pericellular matrix environment. *Circulation research*, 88(5), pp.460–7.
- Ito, K. et al., 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature medicine*, 12(4), pp.446–51.
- Iyengar, S. & Farnham, P.J., 2011. KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *The Journal of biological chemistry*, 286(30), pp.26267–76.
- Jackson, C.J. et al., 1990. Binding of human endothelium to *Ulex europaeus* I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *Journal of cell science*, 96 (Pt 2), pp.257–62.
- Jamal, M. et al., 2010. Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(24), pp.6049–59.
- Jang, Y.-Y. & Sharkis, S.J., 2007. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 110(8), pp.3056–63.
- Janus, F. et al., 1999. The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 55(1), pp.12–27.
- Johnson, C.B. et al., 2016. Shared Risk Factors for Cardiovascular Disease and Cancer: Implications for Preventive Health and Clinical Care in Oncology Patients. *The Canadian journal of cardiology*, 32(7), pp.900–7.
- Johnson, R.D. & Jasin, M., 2000. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO journal*, 19(13), pp.3398–407.
- Jones, C.M. et al., 1995. Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development (Cambridge, England)*, 121(11), pp.3651–62.
- Jones, D.L. & Wagers, A.J., 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(1), pp.11–21.
- Kaebisch, C. et al., 2015. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Computational and structural biotechnology journal*, 13, pp.75–84.
- Kagawa, W. et al., 2001. Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), pp.35201–8.
- Kalka, C. et al., 2000. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circulation research*, 86(12), pp.1198–202.
- Kalthof, B. et al., 1993. Monitoring of Ca²⁺-transients in electrically stimulated A7r5 vascular smooth muscle cells fills the experimental gap between KCL-induced depolarization and patch-clamp studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 30(3), pp.143–

- 147.
- Kassack, M.U. et al., 2002. Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *Journal of biomolecular screening*, 7(3), pp.233–46.
- Kastan, M.B. et al., 2016. Commentary on ‘Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage’. *Cancer research*, 76(13), pp.3663–5.
- Kastan, M.B. et al., 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*, 51(23 Pt 1), pp.6304–11.
- Kaufman, R.J., 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & development*, 13(10), pp.1211–33.
- Kaufmann, S.H. & Hancock, R., 1995. Topoisomerase II as a target for anticancer chemotherapy. *Acta biochimica Polonica*, 42(4), pp.381–93.
- Khakoo, A.Y. & Finkel, T., 2005. Endothelial progenitor cells. *Annual review of medicine*, 56, pp.79–101.
- Kim, B.M. et al., 2015. Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 16(11), pp.26880–913.
- King, R.S. & Newmark, P.A., 2012. The cell biology of regeneration. *The Journal of Cell Biology*, 196(5).
- Kitagawa, R. et al., 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes & development*, 18(12), pp.1423–38.
- Klein, D., 2016. Vascular Wall-Resident Multipotent Stem Cells of Mesenchymal Nature within the Process of Vascular Remodeling: Cellular Basis, Clinical Relevance, and Implications for Stem Cell Therapy. *Stem cells international*, 2016, p.1905846.
- Klein, D. et al., 2010. Vascular wall-resident stem cells. *Histology and histopathology*, 25(5), pp.681–9.
- Klungland, A. & Lindahl, T., 1997. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO journal*, 16(11), pp.3341–8.
- Kögler, G. et al., 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *The Journal of experimental medicine*, 200(2), pp.123–35.
- Kondo, H. et al., 2010. Oxidative stress and gamma radiation-induced cancellous bone loss with musculoskeletal disuse. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 108(1), pp.152–61.
- Kondo, H. et al., 2007. Shared oxidative pathways in response to gravity-dependent loading and

- gamma-irradiation of bone marrow-derived skeletal cell progenitors. *Radiatsionnaia biologii, radioecologii / Rossiiskaia akademiia nauk*, 47(3), pp.281–5.
- Koumenis, C., 2006. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Current molecular medicine*, 6(1), pp.55–69.
- Kramer, J. et al., 2000. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of development*, 92(2), pp.193–205.
- Kratochvílová, K. et al., 2016. The role of the endoplasmic reticulum stress in stemness, pluripotency and development. *European Journal of Cell Biology*, 95(3), pp.115–123.
- Kremer, L.C. et al., 2001. Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(1), pp.191–6.
- Kubota, Y. et al., 1996. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *The EMBO journal*, 15(23), pp.6662–70.
- Kubota, Y. et al., 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of cell biology*, 107(4), pp.1589–98.
- Kumagai, A. et al., 2006. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*, 124(5), pp.943–55.
- Kumar, A. et al., 2016. Nitric oxide inhibits topoisomerase II activity and induces resistance to topoisomerase II-poisons in human tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(7), pp.1519–1527.
- Kupsco, A. & Schlenk, D., 2015. Oxidative stress, unfolded protein response, and apoptosis in developmental toxicity. *International review of cell and molecular biology*, 317, pp.1–66.
- Kuribayashi, K. et al., 2011. The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(14), pp.2380–9.
- Kuznetsov, S.A. et al., 2001. Circulating skeletal stem cells. *The Journal of cell biology*, 153(5), pp.1133–40.
- LaBaer, J. et al., 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & development*, 11(7), pp.847–62.
- Lachaud, C.C. et al., 2014. EGF-induced adipose tissue mesothelial cells undergo functional vascular smooth muscle differentiation. *Cell death & disease*, 5, p.e1304.
- Lachaud, C.C. et al., 2013. Functional vascular smooth muscle-like cells derived from adult mouse uterine mesothelial cells. *PloS one*, 8(2), p.e55181.
- Lampugnani, M.G. et al., 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-

- cell contacts. *The Journal of cell biology*, 118(6), pp.1511–22.
- Lan, M.L. et al., 2012. Characterizing the radioresponse of pluripotent and multipotent human stem cells. *PLoS one*, 7(12), p.e50048.
- Lange, S.S., Takata, K. & Wood, R.D., 2011. DNA polymerases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), pp.96–110.
- Larson, J.S. et al., 2006. Expression and loss of alleles in cultured mouse embryonic fibroblasts and stem cells carrying allelic fluorescent protein genes. *BMC molecular biology*, 7, p.36.
- Lavin, M.F. et al., 2005. Atm and cellular response to DNA damage. *Advances in experimental medicine and biology*, 570, pp.457–76.
- Leber, R. et al., 1998. The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 273(3), pp.1794–801.
- Lee, D.-H. et al., 2012. Background exposure to persistent organic pollutants predicts stroke in the elderly. *Environment international*, 47, pp.115–20.
- Lee, J.-H. & Paull, T.T., 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721), pp.551–4.
- Lee, J., Kumagai, A. & Dunphy, W.G., 2001. Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Molecular biology of the cell*, 12(3), pp.551–63.
- Lee, J.S. et al., 2000. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*, 404(6774), pp.201–4.
- Lee, M.-O. et al., 2012. Effect of Ionizing Radiation Induced Damage of Endothelial Progenitor Cells in Vascular Regeneration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(2), pp.343–352.
- Lee, Y. et al., 2012. Neurogenesis requires TopBP1 to prevent catastrophic replicative DNA damage in early progenitors. *Nature neuroscience*, 15(6), pp.819–26.
- Lehmann, R. et al., 2003. Investigation of a capillary electrophoretic approach for direct quantification of apolipoprotein A-I in serum. *Electrophoresis*, 24(9), pp.1422–8.
- Di Leonardo, A. et al., 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & development*, 8(21), pp.2540–51.
- Li Calzi, S. et al., 2010. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvascular research*, 79(3), pp.207–16.
- Lin, A.W. et al., 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & development*, 12(19), pp.3008–19.
- Lin, K., Sadée, W. & Quillan, J.M., 1999. Rapid measurements of intracellular calcium using a fluorescence plate reader. *BioTechniques*, 26(2), pp.318–22, 324–6.

- Lin, T. et al., 2005. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature cell biology*, 7(2), pp.165–71.
- Lin, Y. et al., 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation*, 105(1), pp.71–7.
- Lincoln, T.M. et al., 1998. Nitric oxide--cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: implications in vascular diseases. *Acta physiologica Scandinavica*, 164(4), pp.507–15.
- Lindsley, R.C. et al., 2006. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development (Cambridge, England)*, 133(19), pp.3787–96.
- Linke, S.P., Clarkin, K.C. & Wahl, G.M., 1997. p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer research*, 57(6), pp.1171–9.
- Liu, L. et al., 2012. ER stress response during the differentiation of H9 cells induced by retinoic acid, Liu, P. et al., 1999. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature genetics*, 22(4), pp.361–5.
- Löbrich, M. et al., 2010. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(4), pp.662–9.
- Van Der Loop, F.T.L. et al., 1996. Smoothelin, a Novel Cytoskeletal Protein Specific for Smooth Muscle Cells. *J Cell Biol.*, 134(2), pp.401–11.
- Lowe, S.W. et al., 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362(6423), pp.847–9.
- Lukas, C. et al., 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature cell biology*, 5(3), pp.255–60.
- Lumelsky, N. et al., 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5520), pp.1389–94.
- Luo, S. et al., 2006. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and cellular biology*, 26(15), pp.5688–97.
- Ma, Y. et al., 2002. Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response. *Journal of Molecular Biology*, 318(5), pp.1351–1365.
- MacCallum, D.E. et al., 1996. The p53 response to ionising radiation in adult and developing murine tissues. *Oncogene*, 13(12), pp.2575–87.
- MacDonald, R.A., 1961. "Lifespan" of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Archives of internal medicine*, 107, pp.335–43.

- Mah, L.-J., El-Osta, A. & Karagiannis, T.C., 2010. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), pp.679–86.
- Mahmoudi, M. et al., 2006. DNA damage and repair in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 71(2), pp.259–68.
- Maier, P. et al., 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *International journal of molecular sciences*, 17(1).
- Maltsev, V.A. et al., 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mechanisms of development*, 44(1), pp.41–50.
- Mandal, P.K. & Rossi, D.J., 2012. DNA-Damage-Induced Differentiation in Hematopoietic Stem Cells. *Cell*, 148(5), pp.847–848.
- Manderson, J.A., Mosse, P.R., et al., 1989. Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 9(3), pp.289–98.
- Manderson, J.A., Cocks, T.M. & Campbell, G.R., 1989. Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. II. Selective increase in reactivity to some vasoconstrictor drugs. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 9(3), pp.299–307.
- Maréchal, A. & Zou, L., 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9).
- Mariani, S.M., 2003. Stem cells: dreams or reality? *MedGenMed : Medscape general medicine*, 5(1), p.23.
- Martens, U.M. et al., 2000. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Experimental cell research*, 256(1), pp.291–9.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), pp.7634–8.
- Martin, S.J. et al., 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), pp.1545–56.
- Massolo, F. & Galli, V., 1973. [Adriamycin in the treatment of acute infantile leukemia]. *Minerva pediatrica*, 25(16), pp.741–7.
- Matsuoka, S., Huang, M. & Elledge, S.J., 1998. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5395), pp.1893–7.
- Maynard, S. et al., 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), pp.2266–74.
- Mazouzi, A., Velimezi, G. & Loizou, J.I., 2014. DNA replication stress: causes, resolution and disease.

- Experimental cell research*, 329(1), pp.85–93.
- McDonald, A.I. & Iruela-Arispe, M.L., 2015. Healing arterial ulcers: Endothelial lining regeneration upon vascular denudation injury. *Vascular pharmacology*, 72, pp.9–15.
- Mendelson, A. & Frenette, P.S., 2014. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature medicine*, 20(8), pp.833–46.
- Menna, P., Salvatorelli, E. & Minotti, G., 2008. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chemical research in toxicology*, 21(5), pp.978–89.
- Miano, J.M. et al., 2003. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 35(6), pp.577–93.
- Michiels, C., 2003. Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology*, 196(3), pp.430–43.
- Miller-Hance, W.C. et al., 1993. In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. *The Journal of biological chemistry*, 268(33), pp.25244–52.
- Mirzayans, R. et al., 2012. Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochemistry research international*, 2012, p.951574.
- Moiseeva, E.P., 2001. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovascular research*, 52(3), pp.372–86.
- Molossi, S. et al., 1995. Lymphocyte transendothelial migration toward smooth muscle cells in interleukin-1 beta-stimulated co-cultures is related to fibronectin interactions with alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Journal of cellular physiology*, 164(3), pp.620–33.
- Mordes, D.A. et al., 2008. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes & development*, 22(11), pp.1478–89.
- Morgan, W.F. & Sowa, M.B., 2005. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), pp.14127–8.
- Mu, D. et al., 1995. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *The Journal of biological chemistry*, 270(6), pp.2415–8.
- Münzel, T. et al., 2008. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Annals of medicine*, 40(3), pp.180–96.
- Murohara, T. et al., 1994. Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. *The American journal of physiology*, 266(3 Pt 2), pp.H874-80.
- Nagasawa, H. et al., 1995. Relationship between radiation-induced G1 phase arrest and p53 function in human tumor cells. *Cancer research*, 55(9), pp.1842–6.
- Nakajima, Y. et al., 1997. Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during

- formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor beta3. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 209(3), pp.296–309.
- Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T., 1996. In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5262), pp.722–4.
- Narciso, L. et al., 2007. Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), pp.17010–5.
- Narita, M. et al., 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), pp.703–16.
- Nichols, J., Evans, E.P. & Smith, A.G., 1990. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development (Cambridge, England)*, 110(4), pp.1341–8.
- Nicolay, N.H. et al., 2013. Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 87(5), pp.1171–8.
- Nikjoo, H. et al., 1997. Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *International journal of radiation biology*, 71(5), pp.467–83.
- Nilsson, I. & Hoffmann, I., 2000. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Progress in cell cycle research*, 4, pp.107–14.
- Nishikawa, S.-I., Jakt, L.M. & Era, T., 2007. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(6), pp.502–7.
- Nishikawa, S.I. et al., 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development (Cambridge, England)*, 125(9), pp.1747–57.
- Nitiss, J.L., 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 9(5), pp.338–50.
- Norbury, C.J. & Zhivotovsky, B., 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23(16), pp.2797–808.
- Nourse, M.B. et al., 2010. VEGF Induces Differentiation of Functional Endothelium From Human Embryonic Stem Cells: Implications for Tissue Engineering. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(1), pp.80–89.
- Nübel, T. et al., 2004. Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis*, 25(8), pp.1335–44.

- O'Brien, E.R. et al., 1993. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circulation research*, 73(2), pp.223–31.
- O'Donovan, A. et al., 1994. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*, 371(6496), pp.432–5.
- Oda, E. et al., 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5468), pp.1053–8.
- Ohtsuka, S., Nakai-Futatsugi, Y. & Niwa, H., 2015. LIF signal in mouse embryonic stem cells. *JAK-STAT*, 4(2), p.e1086520.
- Olive, P.L., 2004. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods in cell biology*, 75, pp.355–73.
- Oliveira, M.S. et al., 2014. Doxorubicin has in vivo toxicological effects on ex vivo cultured mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*, 224(3), pp.380–386.
- Owens, G.K., 2007. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity. *Novartis Foundation symposium*, 283, pp.174-91–3, 238–41.
- Owens, G.K., 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews*, 75(3), pp.487–517.
- Owens, G.K., Kumar, M.S. & Wamhoff, B.R., 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*, 84(3), pp.767–801.
- Ozeki, N. et al., 2016. Autophagy-related gene 5 and Wnt5 signaling pathway requires differentiation of embryonic stem cells into odontoblast-like cells. *Experimental Cell Research*, 341(1), pp.92–104.
- Pacilli, A. & Pasquinelli, G., 2009. Vascular wall resident progenitor cells: a review. *Experimental cell research*, 315(6), pp.901–14.
- Pandey, A. et al., 1995. Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5210), pp.567–9.
- Paranya G, Vineberg S, Dvorin E, Kaushal S, Roth SJ, Rabkin E, Schoen FJ, B.J., 2001. Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro. *Am J Pathol.*, 159(4), pp.1335–43.
- Park, C.-H. & Lee, S.-H., 2007. Efficient generation of dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 407, pp.311–22.
- Park, M.S. et al., 1996. Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 271(31), pp.18996–9000.
- Pasquinelli, G. et al., 2007. Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(7), pp.1627–34.

- Passman, J.N. et al., 2008. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27), pp.9349–54.
- Patil, S., Newman, D.K. & Newman, P.J., 2001. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood*, 97(6), pp.1727–32.
- Paull, T.T. & Gellert, M., 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes & development*, 13(10), pp.1276–88.
- Peltz, G., 1993. Inflammatory disease: where immunology and adhesion meet? *Current opinion in biotechnology*, 4(6), pp.745–50.
- Pereira, R.C., Delany, A.M. & Canalis, E., 2004. CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology*, 145(4), pp.1952–60.
- Perez, J.F. & Sanderson, M.J., 2005. The contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary arterioles is determined by the frequency of Ca²⁺ oscillations induced by 5-HT and KCl. *The Journal of general physiology*, 125(6), pp.555–67.
- Perrin, B.J. & Ervasti, J.M., 2010. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(10), pp.630–4.
- Piegari, E. et al., 2013. Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. *Basic research in cardiology*, 108(2), p.334.
- Pinter, E. et al., 1997. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus. *The American journal of pathology*, 150(5), pp.1523–30.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), pp.143–7.
- Plendl, J., 2000. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anatomia, histologia, embryologia*, 29(5), pp.257–66.
- Potocnik, A.J., Nielsen, P.J. & Eichmann, K., 1994. In vitro generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *The EMBO journal*, 13(22), pp.5274–83.
- Potta, S.P. et al., 2009. Functional characterization and transcriptome analysis of embryonic stem cell-derived contractile smooth muscle cells. *Hypertension*, 53(2), pp.196–204.
- Potter, A.J. et al., 2002. Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin. *Carcinogenesis*, 23(3), pp.389–401.
- Powell, S. & McMillan, T.J., 1990. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 19(2), pp.95–108.

- Prasad, R. et al., 2011. A review of recent experiments on step-to-step "hand-off" of the DNA intermediates in mammalian base excision repair pathways. *Molekuliarnaia biologiya*, 45(4), pp.586–600.
- Prasad, R. et al., 1996. Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *The Journal of biological chemistry*, 271(27), pp.16000–7.
- Prise, K.M. et al., 2005. New insights on cell death from radiation exposure. *The Lancet. Oncology*, 6(7), pp.520–8.
- Proudfoot, D. & Shanahan, C., 2012. Human vascular smooth muscle cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 806, pp.251–63.
- Quinn, T.P. et al., 1993. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), pp.7533–7.
- Radu, M. & Chernoff, J., 2013. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (73), p.e50062.
- Raymond, M.R. et al., 2016. Associations Between Fish Consumption and Contaminant Biomarkers With Cardiovascular Conditions Among Older Male Anglers in Wisconsin. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine*, 58(7), pp.676–82.
- Reddy, G., Golub, E.I. & Radding, C.M., 1997. Human Rad52 protein promotes single-strand DNA annealing followed by branch migration. *Mutation research*, 377(1), pp.53–9.
- Rehner, G. & Daniel, H., 2010. Das Blut — Transportsystem und Vermittler der Homöostase. In *Biochemie der Ernährung*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 363–407.
- Rensen, S.S.M., Doevendans, P.A.F.M. & van Eys, G.J.J.M., 2007. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*, 15(3), pp.100–8.
- Rich, T., Allen, R.L. & Wyllie, A.H., 2000. Defying death after DNA damage. *Nature*, 407(6805), pp.777–83.
- Risau, W., 1990. Angiogenic growth factors. *Progress in growth factor research*, 2(1), pp.71–9.
- Risau, W. et al., 1988. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development (Cambridge, England)*, 102(3), pp.471–8.
- Risau, W. & Flamme, I., 1995. Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 11, pp.73–91.
- Robles, S.J. et al., 1999. Permanent cell cycle arrest in asynchronously proliferating normal human

- fibroblasts treated with doxorubicin or etoposide but not camptothecin. *Biochemical Pharmacology*, 58(4), pp.675–685.
- Robles, S.J. & Adami, G.R., 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, 16(9), pp.1113–23.
- Robson, P. et al., 2001. Inner Cell Mass-Specific Expression of a Cell Adhesion Molecule (PECAM-1/CD31) in the Mouse Blastocyst. *Developmental Biology*, 234(2), pp.317–329.
- Rodriguez-Rocha, H. et al., 2011. DNA damage and autophagy. *Mutation research*, 711(1–2), pp.158–66.
- Rogakou, E.P. et al., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), pp.5858–68.
- Rohdewohld, H. & Wobus, A.M., 2002. Leitthema: Stammzellen Mouse Embryonic Stem Cells. Properties, Potential, and Applications.
- Rohwedel, J. et al., 1994. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental biology*, 164(1), pp.87–101.
- Roninson, I.B., Broude, E. V & Chang, B.D., 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 4(5), pp.303–13.
- Roos, W.P. et al., 2013. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters*, 332(2), pp.237–48.
- Rose, K.M., 1988. DNA topoisomerases as targets for chemotherapy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2(9), pp.2474–8.
- Rösen, P., 2002. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *Journal für Kardiologie -Austrian Journal of Cardiology*, 9(12), pp.556–562.
- Ross, G.M., 1999. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-related cancer*, 6(1), pp.41–4.
- Ross, R., 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362(6423), pp.801–9.
- Saleh-Gohari, N. & Helleday, T., 2004. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic acids research*, 32(12), pp.3683–8.
- Salihovic, S. et al., 2016. The metabolic fingerprint of p,p'-DDE and HCB exposure in humans. *Environment international*, 88, pp.60–6.
- Salvi, S. et al., 2007. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatric respiratory reviews*, 8(4), pp.275–80.

- Sancar, A. et al., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73, pp.39–85.
- Sánchez-Flores, M. et al., 2015. γ H2AX assay as DNA damage biomarker for human population studies: defining experimental conditions. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 144(2), pp.406–13.
- Saramäki, A. et al., 2006. Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic acids research*, 34(2), pp.543–54.
- Saretzki, G. et al., 2008. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(2), pp.455–64.
- Saretzki, G. et al., 2004. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(6), pp.962–71.
- Sartore, S. et al., 2001. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circulation research*, 89(12), pp.1111–21.
- Saul, G.D. et al., 1999. Arterial stress from intraluminal pressure modified by tissue pressure offers a complete explanation for the distribution of atherosclerosis. *Medical hypotheses*, 52(4), pp.349–51.
- Schaeffer, L. et al., 1993. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5104), pp.58–63.
- Schaeffer, L. et al., 1994. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *The EMBO journal*, 13(10), pp.2388–92.
- Schar, P., Fäsi, M. & Jessberger, R., 2004. SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Research*, 32(13), pp.3921–3929.
- Schlacher, K., Wu, H. & Jasin, M., 2012. A distinct replication fork protection pathway connects Fanconi anemia tumor suppressors to RAD51-BRCA1/2. *Cancer cell*, 22(1), pp.106–16.
- Schmelter, M. et al., 2006. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), pp.1182–4.
- Schmitt, R.M., Bruyns, E. & Snodgrass, H.R., 1991. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes & development*, 5(5), pp.728–40.
- Scholz G, Genschow E, Pohl I, Bremer S, Paparella M, Raabe H, Southee J, S.H., 1999. Prevalidation of the Embryonic Stem Cell Test (EST)-A New In Vitro Embryotoxicity Test. *Toxicol In Vitro*, 13(4–5), pp.675–81.
- Schraml, B.U. et al., 2009. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature*, 460(7253), pp.405–9.

- Schröder, M. & Kaufman, R.J., 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.739–89.
- Schulz, E., Gori, T. & Münzel, T., 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 34(6), pp.665–73.
- Scott, C.W., Peters, M.F. & Dragan, Y.P., 2013. Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. *Toxicology letters*, 219(1), pp.49–58.
- Seeberger, K.L. et al., 2006. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86(2), pp.141–53.
- Semik, M. et al., 2004. Preoperative chemotherapy with and without additional radiochemotherapy: benefit and risk for surgery of stage III non-small cell lung cancer. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 26(6), pp.1205–1210.
- Shah, N.R. & Mahmoudi, M., 2015. The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: A review. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 86, pp.147–57.
- Shahriyari, L. & Komarova, N.L., 2013. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? A. B. Pant, ed. *PloS one*, 8(10), p.e76195.
- Shakir, S.K. et al., 2016. Toxic Metal Pollution in Pakistan and Its Possible Risks to Public Health. *Reviews of environmental contamination and toxicology*.
- Shalaby, F. et al., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), pp.62–6.
- Shanahan, C.M. & Weissberg, P.L., 1998. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18(3), pp.333–8.
- Shen, Z. et al., 1996. Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *The Journal of biological chemistry*, 271(1), pp.148–52.
- Sherr, C.J. & Roberts, J.M., 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & development*, 18(22), pp.2699–711.
- Shieh, S.Y. et al., 2000. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes & development*, 14(3), pp.289–300.
- Shu, X. et al., 2015. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72(23), pp.4561–75.
- Sijbers, A.M. et al., 1996. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-

- specific DNA repair endonuclease. *Cell*, 86(5), pp.811–22.
- Sinha, M. & Peterson, C.L., 2008. A Rad51 presynaptic filament is sufficient to capture nucleosomal homology during recombinational repair of a DNA double-strand break. *Molecular cell*, 30(6), pp.803–10.
- Sinha, S. et al., 2006. Assessment of contractility of purified smooth muscle cells derived from embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(7), pp.1678–88.
- Skalli, O. et al., 1989. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 37(3), pp.315–21.
- Slack, J.M. et al., 1987. Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature*, 326(6109), pp.197–200.
- Van Sloun, P.P. et al., 1999. The role of nucleotide excision repair in protecting embryonic stem cells from genotoxic effects of UV-induced DNA damage. *Nucleic acids research*, 27(16), pp.3276–82.
- Smih, F. et al., 1995. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic acids research*, 23(24), pp.5012–9.
- Smith, A.G., 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology*, 17, pp.435–62.
- Smith, A.G. et al., 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336(6200), pp.688–90.
- Smith, G.C. & Jackson, S.P., 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development*, 13(8), pp.916–34.
- Smith, J. et al., 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research*, 108, pp.73–112.
- Smits, V.A.. & Medema, R.H., 2001. Checking out the G2/M transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1519(1), pp.1–12.
- Sonoda, E. et al., 2001. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), pp.8388–94.
- Sørensen, C.S. et al., 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature cell biology*, 7(2), pp.195–201.
- Springer, T.A., 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283), pp.425–434.
- Stambrook, P.J., 2007. An ageing question: do embryonic stem cells protect their genomes? *Mechanisms of ageing and development*, 128(1), pp.31–5.
- Stasiak, A.Z. et al., 2000. The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Current biology : CB*, 10(6), pp.337–40.

- Stegemann, J.P., Hong, H. & Nerem, R.M., 2005. Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(6), pp.2321–7.
- Stenmark, K.R. et al., 2013. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual review of physiology*, 75, pp.23–47.
- Stenmark, K.R., Frid, M. & Perros, F., 2016. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: An Evolving Paradigm and a Promising Therapeutic Target in PAH. *Circulation*, 133(18), pp.1734–7.
- Stevens, C., Smith, L. & La Thangue, N.B., 2003. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nature cell biology*, 5(5), pp.401–9.
- Stewart, R.D. et al., 2011. Effects of radiation quality and oxygen on clustered DNA lesions and cell death. *Radiation research*, 176(5), pp.587–602.
- Stillman, B., 1996. Cell cycle control of DNA replication. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293), pp.1659–64.
- Strübing, C. et al., 1995. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mechanisms of development*, 53(2), pp.275–87.
- Sun, X. et al., 2009. Effects of an endothelial cell-conditioned medium on the hematopoietic and endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Cell biology international*, 33(11), pp.1201–5.
- Swift, L.P. et al., 2006. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer research*, 66(9), pp.4863–71.
- Takata, M. et al., 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*, 17(18), pp.5497–508.
- Takeuchi, K. et al., 1991. Co-localization of immunoreactive forms of calponin with actin cytoskeleton in platelets, fibroblasts, and vascular smooth muscle. *Journal of biochemistry*, 109(2), pp.311–6.
- Taleei R, Girard PM, N.H., 2015. DSB repair model for mammalian cells in early S and G1 phases of the cell cycle: application to damage induced by ionizing radiation of different quality.
- Tamanini, C. & De Ambrogi, M., 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 39(4), pp.206–16.
- Tan, Y., Raychaudhuri, P. & Costa, R.H., 2007. Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Molecular and cellular biology*, 27(3), pp.1007–16.
- Thomas, H.E. et al., 2009. Local vessel injury following percutaneous coronary intervention does

- not promote early mobilisation of endothelial progenitor cells in the absence of myocardial necrosis. *Heart (British Cardiac Society)*, 95(7), pp.555–8.
- Thompson, R.D. et al., 2000. Divergent effects of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and beta 3 integrin blockade on leukocyte transmigration in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(1), pp.426–34.
- Thorin, E. & Shreeve, S.M., 1998. Heterogeneity of Vascular Endothelial Cells in Normal and Disease States. *Pharmacology & Therapeutics*, 78(3), pp.155–166.
- Thorn, C.F. et al., 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), pp.440–6.
- Tichy, E.D. et al., 2011. Mismatch and base excision repair proficiency in murine embryonic stem cells. *DNA repair*, 10(4), pp.445–51.
- Tichy, E.D. & Stambrook, P.J., 2008. DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. *Experimental cell research*, 314(9), pp.1929–36.
- Tofilon, P.J. & Fike, J.R., 2000. The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. *Radiation research*, 153(4), pp.357–70.
- Trujillo, K.M. et al., 1998. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), pp.21447–50.
- Uchida, S. et al., 2013. Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem cell reports*, 1(5), pp.397–410.
- Unwin, R.D. et al., 2006. Quantitative proteomics reveals posttranslational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells. *Blood*, 107(12), pp.4687–94.
- Vasa, M. et al., 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation research*, 89(1), pp.E1-7.
- Vignard J., Mirey G, S.B., 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up.
- Vishnubalaji, R. et al., 2012. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC developmental biology*, 12, p.7.
- Vousden, K.H., 2000. p53: death star. *Cell*, 103(5), pp.691–4.
- Voyta, J.C. et al., 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *The Journal of cell biology*, 99(6), pp.2034–40.
- de Waard, H. et al., 2003. Cell type-specific hypersensitivity to oxidative damage in CSB and XPA mice. *DNA repair*, 2(1), pp.13–25.
- de Waard, H. et al., 2004. Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 24(18), pp.7941–8.

- Wang, G. et al., 2015. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *The Journal of physiology*, 593(14), pp.3013–30.
- Wang, H. et al., 1999. Specific binding of human MSH2.MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases. *The Journal of biological chemistry*, 274(24), pp.16894–900.
- Wang, H. et al., 2007. Wnt2 coordinates the commitment of mesoderm to hematopoietic, endothelial, and cardiac lineages in embryoid bodies. *The Journal of biological chemistry*, 282(1), pp.782–91.
- Wang, H.-W., Le, T.T. & Cheng, J.-X., 2008. Label-free Imaging of Arterial Cells and Extracellular Matrix Using a Multimodal CARS Microscope. *Optics communications*, 281(7), pp.1813–1822.
- Wang, X. et al., 2015. Dickkopf Homolog 3 Induces Stem Cell Differentiation into Smooth Muscle Lineage via ATF6 Signalling. *The Journal of biological chemistry*, 290(32), pp.19844–52.
- Ward, J.F., 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 35, pp.95–125.
- Wartenberg, M. et al., 1998. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 78(10), pp.1301–14.
- Wartlick, F. et al., 2013. DNA damage response (DDR) induced by topoisomerase II poisons requires nuclear function of the small GTPase Rac. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp.3093–3103.
- Watabe, T. et al., 2003. TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *The Journal of cell biology*, 163(6), pp.1303–11.
- WiCell, 2008. *Feeder dependent (MEF) culture protocol – collagenase passaging*,
- Wiles, M. V. & Johansson, B.M., 1999. Embryonic Stem Cell Development in a Chemically Defined Medium. *Experimental Cell Research*, 247(1), pp.241–248.
- Wiles, M. V & Keller, G., 1991. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development (Cambridge, England)*, 111(2), pp.259–67.
- Willis, A.I. et al., 2004. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vascular and endovascular surgery*, 38(1), pp.11–23.
- Wilson, D.M. & Barsky, D., 2001. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation research*, 485(4), pp.283–307.
- Wilting, J. et al., 1996. VEGF121Induces Proliferation of Vascular Endothelial Cells and Expression of flk-1 without Affecting Lymphatic Vessels of the Chorioallantoic Membrane. *Developmental Biology*, 176(1), pp.76–85.

- Wobus, A.M. & Löser, P., 2011. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Archives of toxicology*, 85(2), pp.79–117.
- Wobus, A.M., Wallukat, G. & Hescheler, J., 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation; research in biological diversity*, 48(3), pp.173–82.
- Wodarz, A. & Nusse, R., 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology*, 14, pp.59–88.
- Wohlfahrt, P. et al., 2016. Threshold for diagnosing hypertension by automated office blood pressure using random sample population data. *Journal of hypertension*, 34(11), pp.2180–6.
- Wu, J. & Kaufman, R.J., 2006. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation*, 13(3), pp.374–84.
- Wu, N. & Yu, H., 2012. The Smc complexes in DNA damage response. *Cell & bioscience*, 2, p.5.
- Wu, X. et al., 2016. Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis. *Nature communications*, 7, p.10533.
- Wynne, B.M., Chiao, C.-W. & Webb, R.C., 2009. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*, 3(2), pp.84–95.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B. & Reed, J.C., 2005. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), pp.2656–64.
- Yamashita, J. et al., 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 408(6808), pp.92–6.
- Yancopoulos, G.D. et al., 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), pp.242–8.
- Yang, F. et al., 2014. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, 1845(1), pp.84–9.
- Yang, L. et al., 2016. Differentiation of Human Induced-Pluripotent Stem Cells into Smooth-Muscle Cells: Two Novel Protocols. *PloS one*, 11(1), p.e0147155.
- Yang, Y. et al., 2016. New insights into the unfolded protein response in stem cells. *Oncotarget*, 5(0).
- Yano, K., Brown, L.F. & Detmar, M., 2001. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 107(4), pp.409–17.
- Yeh, E.T.H. et al., 2003. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*, 108(17), pp.2070–3.

- Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J., 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, pp.1542–52.
- Yu, Y. et al., 2009. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [3H]thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *Journal of Immunological Methods*, 350(1), pp.29–35.
- Zander, R., 1988. COHb-Konzentrationen im Blut bei Rauchern und Nichtrauchern. In *Der Sauerstoff-Status des arteriellen Blutes*. S. Karger AG, pp. 183–186.
- Zengin, E. et al., 2006. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 133(8), pp.1543–51.
- Zernecke, A. et al., 2005. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circulation research*, 96(7), pp.784–91.
- Zernecke, A., Shagdarsuren, E. & Weber, C., 2008. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(11), pp.1897–908.
- Zou, H. et al., 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry*, 274(17), pp.11549–56.
- Zou, L. & Elledge, S.J., 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), pp.1542–8.
- Zou, Y. et al., 2012. Responses of human embryonic stem cells and their differentiated progeny to ionizing radiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 426(1), pp.100–5.
- Zuk, P.A. et al., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), pp.4279–95.

9 ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Actb	<i>Actin, beta</i>
Akt1	<i>thymoma viral proto-oncogene 1</i>
ALKI	<i>activin receptor-like kinase receptor inhibitor</i>
AM	Acetoxymethylesterrest
AP	Alkalische Phosphatase
APAF1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
Apex1	<i>apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arhgdia	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha</i>
Atf2	<i>activating transcription factor 2</i>
Atf6	<i>activating transcription factor 6</i>
Atg3	<i>Autophagy related 3</i>
Atg7	<i>autophagy related 7</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetracetic acid
BATF	<i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bcl2	<i>B cell leukemia/lymphoma 2</i>
Becn1	<i>Beclin 1, autophagy related</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Birc3/cIAP1	<i>baculoviral IAP repeat-containing 3</i>
Bmp4	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
bp	<i>base pairs; Basenpaare</i>
Brca1	<i>breast cancer 1</i>
Brca2	<i>breast cancer 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin; Rinderserumalbumin</i>
Casp2	<i>caspase 2</i>
Ccna1	<i>cyclin A1</i>
Ccnb1	<i>cyclin B1</i>
Ccne1	<i>cyclin E1</i>
Cd44	<i>cluster of differentiation 44 antigen</i>
CDC25	<i>cell division cycle 25</i>
Cdc25a	<i>cell division cycle 25A</i>
Cdc25b	<i>cell division cycle 25B</i>
Cdkn1a/P21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
Cdkn1b	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>

Cdkn2a/p16	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKs	Cyclinabhängige Kinasen
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
Chek1	<i>checkpoint kinase 1</i>
Chek2	<i>checkpoint kinase 2</i>
CHK1	Checkpointkinase 1
CHK2	Checkpointkinase 2
CKIs	cyclinabhängige Kinaseinhibitoren
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col1	Colagen 1
Cq-Wert	quantification cycle value
CSA	<i>Cockayne syndrome A ortholog</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome B ortholog</i>
Cxcr4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
Cyp1a1	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1</i>
Cyp1b1	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1</i>
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
Ddb2	<i>damage specific DNA binding protein 2</i>
Ddit3/Chop	<i>DNA-damage inducible transcript 3</i>
DDR	DNA damage response
DEPC	Diethyldicarbonat
Dil-Ac-LDL	acetyliertes <i>low-density</i> lipoprotein
DKK2	<i>dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)</i>
DMEM	Dulbeccos's modified Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase, katalytische Untereinheit
DNase	Desoxyribonuklease
DSB	<i>dna double strang break</i> , Doppelstranbruch
DTT	1,4-Dithiothreitol
E14	Tag 14 der Embryonalentwicklung der Maus
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EB	<i>embryoid body</i>
EC	<i>endothelial cells</i> ; Endothelzellen
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
Efnb2	Ephrin B2
Egf	<i>epidermal growth factor</i>
EGM2	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
EHT	5-(5-(7-(Trifluoromethyl)quinolin-4-ylthio)pentylloxy)-2(morpholinomethyl)-4H-pyran-4-on dihydrochlorid
Elk1	<i>ELK1, member of ETS oncogene family</i>
EPC	<i>endothelial progenitor cells</i>

Ephb4	<i>ephrin type-B receptor</i>
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ERCC1	<i>excision repair cross-complementing 1</i>
Erccl	<i>excision repair crosscomplementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
ERK	extracellular signal-regulated kinase; extrazellulär regulierte Kinase
EST	Embryonalen Stammzelltest
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
et al.	et alii; und andere
EtOH	Ethanol
FAM	Carboxyfluorescein-Azid
Fancc	<i>fanconi anemia, complementation group C</i>
Fas	<i>Fas (TNF receptor superfamily member 6)</i>
FasL	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>
Fen1	<i>flap structure specific endonuclease 1</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fgf2	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Fgf5	<i>fibroblast growth factor 5</i>
FKS	fötales Kälberserum
Flk1	<i>fetal liver kinase 1</i>
FN	Fibronectin
Fos	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>
FOXM1	<i>forkhead box M1</i>
g	Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
G0-Phase	gap 0-Phase; Ruhephase des Zellzyklus
G1-Phase	gap 1-Phase; postmitotische bzw. präsynthetische Phase des Zellzyklus
G2-Phase	gap 2-Phase; postsynthetische bzw. prämitotische Phase des Zellzyklus
Gadd45a	<i>growth arrest and DNA-damageinducible 45 alpha</i>
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.
GG-NER	globale genomische NER
Gpx1	<i>glutathione peroxidase 1</i>
GSKi	Glykogensynthase-Kinase 3 Inhibitors
Gstm1	<i>glutathione S-transferase, mu 1</i>
h	Stunde
H2	Histon 2
H2AX	<i>H2A histone family, member</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hif1a	<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>
HIF1 α	<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>
Hmox1	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>
HNO ₃	Salpetersäure
HR	homologous recombination; homologe Rekombination
HRP	horseraddish peroxydase; Meerrettich-Peroxidase
HSP	heat shock protein

Hsp70	<i>heat shock 70kDa protein 1A</i>
Hsp90aa1	<i>heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1</i>
Hspa1b	<i>heat shock protein 1B (Hsp70)</i>
Hus1	<i>Hus1 homolog (S. pombe)</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
Icam1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Immunglobulin
Igf1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
Il12a	<i>interleukin 12a</i>
IL1β	Interleukin 1 beta
iPS	<i>induced pluripotent stem cells</i> ; induzierte pluripotente Stammzellen
IR	<i>ionizing radiation</i> ; ionisierende Strahlung
Itgb1	<i>integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>
JAK	Januskinase
Jun	<i>Jun oncogene</i>
Kap1	<i>KRAB-associated protein 1</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Klf4	<i>kruppel like factor 4</i>
KU70 (XRCC6)	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i>
KU80 (XRCC5)	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5</i>
Lamp1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LF2	Stammzelllinie
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
Lig1	<i>ligase I, DNA, ATP-dependent</i>
Lig4	<i>ligase IV, DNA, ATP-dependent</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mdm2	<i>transformed mouse 3T3 cell double minute 2</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mESC	<i>mouse embryonic stem cells</i> ; Embryonale Stammzellen der Maus
Mgmt	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> ;
Mhy6	<i>myosin heavy chain, α isoform</i>
Mmp13	<i>matrix metalloproteinase 13; collagenase 1; Mmp1</i>
Mmp3	<i>matrix metalloproteinase 3</i>
Mmp7	<i>matrix metalloproteinase 7</i>
MMR	Mismatch-Reparatur
mnr2	<i>damage specific DNA binding protein 2</i>
Mpg	<i>N-methylpurine-DNA glycosylase</i>
Mre11a	<i>meiotic recombination 11 homolog A</i>
mRNA	messenger RNA
Msh2	<i>MutS homolog 2</i>
MSH6	<i>mutS homolog 6</i>
MutSα	Komplex, bestehend aus MSH2 und MSH6
n	Anzahl der biologischen Replikate
N	Anzahl der technischen Replikate je biologischem Replikat

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrat
Nanog	<i>Nanog homeobox</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NER	nucleotide excision repair; Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> ; nicht-homologe Endverknüpfung
Nkx2.5	<i>NK2 homeobox 5</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Nos2/iNos	<i>nitric oxide synthase 2, inducible</i>
Nos3/eNos	<i>nitric oxide synthase 3, endothelial cell</i>
Nox1	<i>NADPH oxidase 1</i>
NOXA	<i>BCL2 homology 3 (BH3)</i>
NRK-52E	renale proximale Tubulusepithelzelllinie aus der Ratte
NSB1	Nibrin
NSC	<i>neuronale Stammzellen</i>
O ₂	Sauerstoff
Oct4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>
Ogg1	<i>8-oxoguanine DNA-glycosylase 1</i>
p-	phospho-
P53	Tumorsuppressorprotein P53
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis; Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>
PBS	phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit 0,3 % Triton X-100
PCB	Polychlorierte Biphenyle
Pcna	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
Pdgf	<i>platelet derived growth factor</i>
Pecam1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PI	Propidiumiodid
Poly-A	Polyadenylierung
Polβ	<i>DNA polymerase beta</i>
Polδ/ Pold1	<i>DNA polymerase delta</i>
Polε/Pole	<i>DNA polymerase epsilon, catalytic subunit</i>
Pten	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	<i>BCL2 binding component 3</i>
Rac1	<i>RAS-related C3 botulinum substrate 1</i>
RAD1	<i>RAD1 homolog</i>
RAD9	<i>RAD9 homolog A</i>
RAD23B	<i>RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein</i>
RAD50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
RAD51	<i>RAD51 homolog</i>
RB1	<i>retinoblastoma 1</i>

Rev1	<i>REV1 homolog</i>
Rev3l	<i>REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta RAD54 like</i>
RFC1	<i>replication factor C subunit 1</i>
RFU	relative fluorescence unit; relative Fluoreszenzeinheit
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RhoB	<i>Ras homolog gene family, member B</i>
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPA	<i>replication protein A2</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDF1	<i>stromal-derived factor 1</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
Selektin/E-Selektin	<i>Selectin, endothelial cell</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i> ; glatte Muskelzellen
SMC1	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 1A</i>
Sod1	<i>superoxide dismutase 1, soluble</i>
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSB	<i>single strand break</i> , Einzelstrangbruch
STAT3	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TagIn	<i>Transgelin</i>
TBS	tris buffered saline; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS plus Tween 20
TCR-NER	transkriptionsgekoppelten NER
TE	Tris-EDTA
TFIIH	Transkriptionsfaktor
Tgf β	<i>transforming growth factor, beta 1</i>
Tiam1	<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
Timp2	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>
TMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tnnt2	<i>Troponin T2, cardiac</i>
Top2a	<i>topoisomerase (DNA) II alpha</i>
Top2b	<i>topoisomerase (DNA) II beta</i>
TopBP1	<i>topoisomerase (DNA) II binding protein 1</i>
Trex1	<i>three prime repair exonuclease 1</i>
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
Trp53	<i>transformation related protein 53</i>
Trp63	<i>transformation related protein 63</i>
Trp73	<i>transformation related protein 73</i>
Txnrd1	<i>thioredoxin reductase 1</i>
ü.N.	über Nacht
UEA-1	Ulex-europaeus-Lektin Typ 1
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	ultraviolett
Vcam1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>

VE-Cadherin	<i>vascular endothelium cadherin</i>
Vegf	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Wee1	<i>WEE 1 homolog 1</i>
Wnt3	<i>wingless-related MMTV integration site 3</i>
Wrn	<i>Werner syndrome homolog</i>
Wrnip1	<i>Werner helicase interacting protein</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XPA	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
XPB	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group B</i>
XPC	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
XPD	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group D</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group F</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group G</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing 1</i>
Xrcc1	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1</i>
Xrcc3	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3</i>
XRCC4	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4</i>
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
γ H2AX	H2A histone family, member X an Serin139 phosphoryliert

9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. 1: Schematischer Aufbau eines Blutgefäßes.....	3
Abbildung 1. 2: Phänotypische Modulation der glatten Muskelzellen.	5
Abbildung 1. 3: Beteiligung von Stamm- und Progenitorzellen an vaskulären Reparatur- und Regenerationsprozessen.	8
Abbildung 1. 4: Symmetrische und asymmetrische Stammzellteilung.	9
Abbildung 1. 5: Das Differenzierungspotential von embryonalen Stammzellen.	11
Abbildung 1. 6: Wirkungsmechanismen ionisierender Strahlung (IR) auf die DNA.	16
Abbildung 1. 7: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.....	20
Abbildung 1. 8: Schematischer Ablauf der DSB-Reparatur mittels homologer Rekombination.....	24
Abbildung 1. 9: Schematischer Ablauf der DSB-Reparatur mittels nicht-homologer Endverknüpfung.	25
Abbildung 1. 10: Die Zielsetzung dieser Arbeit	31
Abbildung 2. 1: Prinzip der Calceinfärbung.....	53
Abbildung 2. 2: Prinzip der Substratumsetzung (BCIP/NBT) durch die alkalische Phosphatase.	54
Abbildung 2. 3: Prinzip der Seneszenz β -Galaktosidase Färbung.	58
Abbildung 2. 4: Prinzip des Alamar Blue-Assays.	59
Abbildung 3. 1: Angepasstes Protokoll zur Differenzierung der Stammzelllinie LF2 in Endothelzellen.....	63
Abbildung 3. 2: Übergang von einer undifferenzierten Stammzelle in eine differenzierte Endothelzelle.....	64
Abbildung 3. 3: Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen auf mRNA Ebene.	65
Abbildung 3. 4: Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen auf Proteinebene.	66
Abbildung 3. 5: Regulation der mRNA Expression von E-Selektin, Icam1, iNos und Nos3 in den differenzierten Endothelzellen nach Stimulation mit Zytokinen.	67
Abbildung 3. 6: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen.	68
Abbildung 3. 7: Protokoll zur Transdifferenzierung aus Stammzellen abgeleiteter Endothelzellen in glatte Muskelzellen.	69
Abbildung 3. 8: Transdifferenzierung aus mESC abgeleiteter EC in glatte Muskelzellen (SMC).....	70
Abbildung 3. 9: Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen.....	72
Abbildung 3. 10: α SMA Expression der differenzierten glatten Muskelzellen.	72
Abbildung 3. 11: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen.....	74

Abbildung 3. 12: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von Suszeptibilitätsfaktoren.....	76
Abbildung 3. 13: Gene, die in beiden Differenzierungen einheitlich reguliert wurden.....	79
Abbildung 3. 14: Nach Behandlung mit Genotoxinen (Bestrahlung, Doxorubicin) hochregulierte Suszeptibilitätsfaktoren in mESC, EC und SMC.	82
Abbildung 3. 15: Expression von DNA-Reparaturgenen in undifferenzierten Stammzellen nach Behandlung mit Genotoxinen.	86
Abbildung 3. 16: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Bestrahlung.	89
Abbildung 3. 17: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Behandlung mit Doxorubicin.....	90
Abbildung 3. 18: Vergleichende DNA-Doppelstrangbruch Reparaturkinetik in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Behandlung mit Genotoxinen.	91
Abbildung 3. 19: Aktivierung von DNA-Schadensantworten in undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Bestrahlung.	93
Abbildung 3. 20: Aktivierung von DNA-Schadensantworten in undifferenzierten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Doxorubicinbehandlung.....	94
Abbildung 3. 21: Viabilitätsuntersuchungen von undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Behandlung mit Genotoxinen.....	95
Abbildung 3. 22: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung von undifferenzierten Stammzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach Bestrahlung und Behandlung mit Doxorubicin.....	96
Abbildung 3. 23: Übersicht über den Zeitpunkt der Schädigung der Zellen im Verlauf der Differenzierung.....	97
Abbildung 3. 24: Einfluss unterschiedlicher Strahlungsdosen auf die Endothelzellendifferenzierung und die Viabilität der Zellen.	98
Abbildung 3. 25: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Bestrahlung mit 1 Gy an Tag 4.	100
Abbildung 3. 26: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Bestrahlung.	101
Abbildung 3. 27: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen nach Bestrahlung mit 1 Gy an Tag 4.	102

Abbildung 3. 28: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen nach Bestrahlung mit 1 Gy an Tag 4.	103
Abbildung 3. 29: Einfluss unterschiedlicher Doxorubicinkonzentrationen auf die Endothelzelldifferenzierung und die Viabilität der Zellen.	104
Abbildung 3. 30: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Behandlung mit Doxorubicin an Tag 4.	105
Abbildung 3. 31: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen nach Doxorubicin-behandlung.	106
Abbildung 3. 32: Phänotypische Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen nach Doxorubicinbehandlung.	107
Abbildung 3. 33: Funktionelle Charakterisierung der differenzierten glatten Muskelzellen nach Doxorubicinbehandlung an Tag 4 der Differenzierung.	108
Abbildung 3. 34: Morphologie der differenzierten glatten Muskelzellen nach Einwirkung von Genotoxinen.	109
Abbildung 3. 35: Einfluss von Doxorubicin auf die Proliferation der mesodermalen Progenitorzellen und die Apoptoserate.	110
Abbildung 5. 1: Aus mESC abgeleitete Kardiomyozyten.	140

9.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2. 1: Auflistung der Herstellerhauptsitze.	32
Tabelle 2. 2: Auflistung der verwendeten Geräte und Computersoftware.	34
Tabelle 2. 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	36
Tabelle 2. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits.	37
Tabelle 2. 5: Auflistung der verwendeten Medien und Zusätze.	39
Tabelle 2. 6: Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur- und Differenzierungsmedien.	40
Tabelle 2. 7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.	41
Tabelle 2. 8: Auflistung der Primersequenzen des Real-time PCR-Arrays.	41
Tabelle 2. 9: Auflistung der verwendeten Real-time PCR-Primer.	44
Tabelle 2. 10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.	45
Tabelle 2. 11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.	45
Tabelle 2. 12: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer.	46
Tabelle 3. 1: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von Suszeptibilitätsfaktoren.	77

Tabelle 3. 2: Einteilung der in beiden Differenzierungen (EC und SMC) einheitlich hochregulierten und herunterregulierten Gene in Signalwege.....	79
Tabelle 3. 3: Einteilung der ausschließlich in EC oder SMC hochregulierten Gene in Signalwege. .	80
Tabelle 3. 4: Einteilung der ausschließlich in EC oder SMC herunterregulierten Gene in Signalwege.	81
Tabelle 3. 5: Nach Behandlung mit Genotoxinen hochregulierte Suszeptibilitätsfaktoren in mESC, EC und SMC.	83
Tabelle 3. 6: Einteilung der nach Bestrahlung hochregulierten Gene in Signalwege.	84
Tabelle 3. 7: Einteilung der nach Doxorubicinbehandlung hochregulierten Gene in Signalwege. ...	85
Tabelle 3. 8: Nach Bestrahlung und Doxorubicinbehandlung gemeinsam hochregulierte Gene. ...	87

9.4 DOKUMENTATION DES EIGENANTEILS DIESER ARBEIT

Einige der in dieser Dissertation gezeigten Daten wurden bereits im Journal *Toxicological Sciences* unter dem Titel „*mESC-based in vitro differentiation models to study vascular response and functionality following genotoxic insults*“ veröffentlicht. Die gezeigten Daten zu den Calciummessungen (Abb. 3.11 A, Abb. 3.28 B und Abb. 3.33 B) wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Kassack, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gewonnen. Wobei dieser seine Laborräume, Geräte und Materialien für diese Versuche zur Verfügung stellte, die Durchführung aber bei mir lag. Darauf wird im Material und Methoden Teil dieser Dissertation (S.53, Abschnitt 2.2.5.4) hingewiesen. Auf S. 102 dieser Dissertation wird auf die Expression von P2Y-Rezeptoren in SMC verwiesen. Die zugrunde liegenden Daten wurden mit Unterstützung von Nicole Brockmann (Arbeitskreis Kassack, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erzielt. Wobei die Differenzierung der Zellen, RNA-Isolation und cDNA-Synthese von mir durchgeführt wurden und Nicole Brockmann die PCR durchgeführt hat. Alle anderen gezeigten Versuche (sowohl in der Publikation als auch in der Dissertation) wurden von mir durchgeführt.

9.5 PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert.

Hennicke, T., Nieweg, K., Brockmann, N., Kassack, MU., Gottmann, K., Fritz, G., 2015. mESC-based in vitro differentiation models to study vascular response and functionality following genotoxic insults. *Toxicological Sciences*, 144(1), pp.138-50.