

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün**

**Die Rolle von Acetylcholin und cholinergem Signalling in der
Angiogenese**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Wienke Münster
aus Wittenberge**

Würzburg, Oktober 2019

Referentin: Prof. Dr. med. vet. Krasteva-Christ
Korreferentin: Prof. Dr. med. habil. Rer. Nat. Carmen Villmann
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anatomie von Arterien, Arteriolen und Kapillaren	1
1.2. Die Bildung und Physiologie von Blutgefäßen	2
1.2.1. Vaskulogenese	3
1.2.2. Angiogenese	3
1.2.2.1. Physiologische Angiogenese	3
1.2.2.2. Pathologische Angiogenese	5
1.2.2.3. Therapeutische Angiogenese	7
1.2.3. Arteriogenese	8
1.3. VEGF	9
1.3.1. Struktur und Rezeptoren	9
1.3.2. Rolle in der Angiogenese	10
1.4. Acetylcholin	12
1.4.1. Das klassische neuronale System des Acetylcholins	12
1.4.2. Das nicht-neuronale System des Acetylcholins	14
1.5. Transgene Mausmodelle	16
1.6. Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.2. Methoden	24
2.2.1. Haltung und Zucht	24
2.2.2. Whole-mount-Präparation und Aufbereitung	24
2.2.3. Aortenring-Assay	26
2.2.4. Statistik	30
2.2.5. Immunhistochemie	30

2.2.6. Paraffineinbettung und Immunhistochemie	32
3. Ergebnisse	35
3.1. Whole-mount	35
3.2. Aortenring-Assay	37
3.2.1. Bedeutung von VEGF für die Aussprossung von neuen Gefäßen	37
3.2.2. Auswirkung von ACh auf die wachsenden Aussprossungen	39
3.2.3. Inhibitorversuch mit Lenvatinib	43
3.2.3. Inhibitorversuch mit Atropin und Mecamylamin	45
3.2.4. Gesamtlänge der Primär- und Sekundäraussprossungen am Tag 5	46
3.2.5. Entwicklung der Aussprossungen nach Versuchstag 5	50
3.3. Immunhistochemische Analyse der Aortenringe	55
3.3.1. Zelltyp der ChAT-positiven Zellen beim VEGF-Modell	55
3.3.2. Zelltyp der ChAT-positiven Zellen nach Carbacholstimulation	68
3.3.3. Herkunft der aussprossenden Zellen	72
4. Diskussion	77
4.1. Auswahl des Aortenringassays	78
4.2. Der Einfluss des Acetylcholins auf die Angiogenese	80
4.3. Cholinerge Zellen in der Angiogenese	84
4.4. Herkunft der Perizyten	88
4.5. Ausblick in Therapieideen	90
5. Zusammenfassung	95
6. Literaturverzeichnis	97
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

%	= Prozent
°C	= Grad Celsius
µl	= Mikroliter
µm	= Mikrometer
µM	= Mikromolar
A. dem.	= demineralisiertes Wasser
A1	= Apoptose-Protein
Abb	= Abbildung
ACh	= Acetylcholin
AChE	= Acetylcholinesterase
BAC	= bakteriell künstliches Chromosom
Bcl-2	= B-cell-lymphoma-Protein
bFGF	= basic Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
BM-MSCs	= aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellen
BSA	= Rinderserumalbumin
cAMP	= cyclisches Adenosinmonophosphat
ChAT	= Cholin-Acetyltransferase
CHT	= Cholintransporter
DAPI	= 4',6-Diamidin-2'phenylinol
DMEM	= Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
eGFP	= grün fluoreszierendes Protein
EphB4- Rezeptor	= Ephrinrezeptor type-B4
FCS	= fetales Kälberserum
FGF	= Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	= Fluoresceinisothiocyanat
IGF	= insulinähnlicher Wachstumsfaktor

mAChR	= muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
min	= Minuten
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
mRNA	= messenger- (Boten-) Ribonukleinsäure
MSC	= mesenchymale Stammzelle
nAChR	= nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
ng	= Nanogramm
NHS	= normales Pferdeserum
NM	= nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor vom Muskeltypen
nM	= Nanomolar
NN	= nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor vom Nerventypen
NO	= Stickstoffmonoxid
OCTs	= organische Kationentransporter
PBS	= phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	= Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor
PECAM-1	= Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
Pen/Strep	= Penicillin/Streptomycin
PFA	= Paraformaldehyd
RNA	= Ribonukleinsäure
TGF	= Transformierender Wachstumsfaktor
VACHT	= vesikulärer Acetylcholintransporter
VE- Cadherin	= vaskulär-endotheliales Cadherin
VEGF	= vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	= Endothel-Wachstumsfaktor-Rezeptor
VPF	= vaskulärer Permeabilitätsfaktor
ZNS	= zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Aufbau einer Arterie	2
Abb. 2. Aortenpräparation	28
Abb. 3. Versuchsablauf Auswirkung VEGF/Acetylcholin + zeitliche Weiterentwicklung	29
Abb. 4. Auswertung von Primär- und Sekundäraussprossungen mittels ImageJ	29
Abb. 5. Versuchsablauf zur Auswirkung von Inhibitoren auf die wachsenden Aussprossungen	30
Abb. 6. Färbekombinationen der Immunhistochemie	32
Abb. 7. Schnitt durch die Thoraxorgane einer ChAT-eGFP-Maus	36
Abb. 8. Histologische Darstellung der Aorta einer ChAT-eGFP-Maus	37
Abb. 9. Durchlichtmikroskopie von Aortenringen nach Stimulation mit VEGF. d1-d5: Tag1 bis 5 nach Stimulation	38
Abb. 10. Einfluss des ACh auf die Angiogenese bei C57Bl6/J- und ChAT- eGFP-Mäusen	40
Abb. 11. Statistischer Vergleich der Länge der Primär- aussprossungen (PA) von C57bl67J und ChAT-eGFP unter verschiedenen Bedingungen	41
Abb. 12. Statistischer Vergleich der Länge der Sekundär- aussprossungen (SA) von C57bl67J und ChAT-eGFP unter verschiedenen Bedingungen	42
Abb. 13. Inhibition der Neugefäßbildung mit Lenvatinb (1 μ M)	44
Abb. 14. Inhibition der Neugefäßbildung mit Atropin (10 μ M) bei einer Carbachol- und VEGF-Stimulation	45
Abb. 15. Inhibition der Neugefäßbildung mit Mecamylamin (100 μ M) bei Carbachol- und VEGF-Stimulation	46
Abb. 16. Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der Primär- aussprossungen nach einer Stimulation mit VEGF und Carbachol	48

Abb. 17.	Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der Sekundäraussprossungen nach einer Stimulation mit VEGF und Carbachol	49
Abb. 18.	Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der primären und sekundären Aussprossungen am Tag 5 unter Kontrollbedingungen und nach Carbacholstimulation	50
Abb. 19.	Repräsentative Darstellung der Gefäßaussprossungen am Tag 5 und Tag 7	52
Abb. 20.	Repräsentative Darstellung der Gefäßaussprossungen am Tag 5, 7 und am Tag 11	53
Abb. 21.	Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der primären Aussprossung am Tag 5 und Tag 7	54
Abb. 22.	Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der sekundären Aussprossung am Tag 5 und Tag 7	55
Abb. 23.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Endothelzellmarker CD-31	56
Abb. 24.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Glattmuskelzellmarker α -SMA	57
Abb. 25.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker Desmin	58
Abb. 26.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker NG2	59
Abb. 27.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. ChAT-Marker	60
Abb. 28.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. ChAT-Marker	61
Abb. 29.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. ChAT-Marker	62
Abb. 30.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Endothelzellmarker CD-31	63
Abb. 31.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Glattmuskelzellmarker α -SMA	64

Abb. 32.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Fibroblastenmarker α -Vimentin	65
Abb. 33.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker NG2	66
Abb.34.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker NG2	67
Abb. 35.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker Desmin	68
Abb. 36.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation am Tag 5. Glattmuskelzellmarker α -SMA	69
Abb. 37.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation am Tag 5. ChAT-Zellen-marker ChAT	70
Abb. 38.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation (100 nM) am Tag 5. Perizytenmarker NG2	71
Abb. 39.	Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation (1 μ M) am Tag 5. Perizytenmarker Desmin	72
Abb. 40.	DAB Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Stammzellmarker CD34	73
Abb. 41.	DAB Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Stammzellmarker CD44	74
Abb. 42.	DAB Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Makrophagenmarker F4/80	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verzeichnis der verwendeten Geräte	19
Tabelle 2. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien	19
Tabelle 3. Verzeichnis der verwendeten Puffer- und Inkubationslösungen	21
Tabelle 4. Verzeichnis der verwendeten Primärantikörper und deren Arbeitsverdünnungen	22
Tabelle 5. Verzeichnis der verwendeten Sekundärantikörper und deren Arbeitsverdünnungen	23
Tabelle 6. Verzeichnis der verwendeten Programme	23
Tabelle 7. Verzeichnis der verwendeten Mausstämme	24
Tabelle 8. Zusammenfassung der CD34-, CD44- und F4/80-positiven Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen	76

1. Einleitung

1.1. Anatomie von Arterien, Arteriolen und Kapillaren

Das Gefäßsystem und das Herz bilden die Kreislauforgane des Körpers. Die Arterien leiten das Blut vom Herzen aus zu den einzelnen Zellen des Organismus. Im Lungenkreislauf transportieren sie sauerstoffarmes Blut zu den Lungen. Im großen Körperkreislauf stellt ihre Aufgabe den Transport von sauerstoffreichem Blut zu den Organen dar. Herznahe Arterien sind elastische Arterien (Bsp. Aorta). Sie nehmen das ausgeworfene Blut während der Systole durch Dehnung auf. Durch die elastische Rückstellung der Arterienwand kann so während der Diastole der Blutstrom in eine kontinuierliche Strömung überführt werden. Arterien vom muskulären Typ sind herzferne Gefäße. Sie können durch Vasodilatation und Vasokonstriktion die lokale Durchblutung steuern. Auf Grund des hohen Drucks im Gefäß ist die Arterienwand dicker als die von Venen. Die Arteriolen versorgen die Organe mit Blut und bestehen hauptsächlich aus glatten Muskeln. Sie reagieren, gesteuert durch das Nervensystem, auf den Bedarf des Gewebes nach mehr Nährstoffen oder Sauerstoff. Sie spielen aufgrund des Fehlens von elastischem Gewebe in den Wänden eine bedeutende Rolle beim Gefäßwiderstand. Die Kapillaren sind dünnwandige Gefäße, die aus einer einzigen Endothelschicht bestehen. Sie gehören zum Endstromgebiet mit Aufgabe des Stoff-, Gas- und Flüssigkeitsaustausches durch Diffusion (Tucker et al., 2018). Grundsätzlich zeigt der Wandaufbau der Arterien drei Schichten. Die Tunica interna (Intima), die Tunica media (Media) und die Tunica externa (Adventitia). Die meisten Arterien wie zum Beispiel die Arteria brachialis, femoralis oder facialis lassen sich zu Arterien vom muskulären Typ zählen und zeigen den typischen Wandaufbau. Die Intima besteht aus dem Endothel und einer subendothelialen Schicht. Die breiteste Schicht stellt die Media dar. Sie besteht aus glatten Muskelfasern und der Extrazellulärmatrix. Die Membrana elastica interna stellt ein Flechtwerk aus elastischen Fasern dar. Die Membrana elastica externa ist nur bei größeren Arterien zu finden. Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht. Sie verankert das Gefäß mit der Umgebung. Hier lassen

sich auch Blut- (Vasa vasorum), Lymphgefäße und Nerven finden. Die Aorta und die großen herznahen Arterien gehören zu den Arterien vom elastischen Typ. Die subendotheliale Schicht der Intima ist hier stärker ausgebildet und enthält longitudinal ausgerichtete glatte Muskelzellen und eine Extrazellulärmatrix. Die gesamte Media besteht aus konzentrischen, elastischen Lamellen. Dazwischen befinden sich Schichten aus glatten Muskelzellen. Die Membrana elastica interna und externa sind nicht mehr klar von den übrigen elastischen Lamellen zu unterscheiden. Weiter peripher geht der Wandaufbau dieser Arterien aber auch in den des muskulären Typ über (Lüllmann-Rauch, 2012). Die Wand der Arteriolen besteht zwar auch aus den typischen 3 Schichten, jedoch ist die Media nur schwach ausgebildet. Die Kapillaren bestehen nur noch aus einer Endothelschicht und einer Basalmembran. Dieser können Perizyten aufliegen (Tucker et al., 2018).

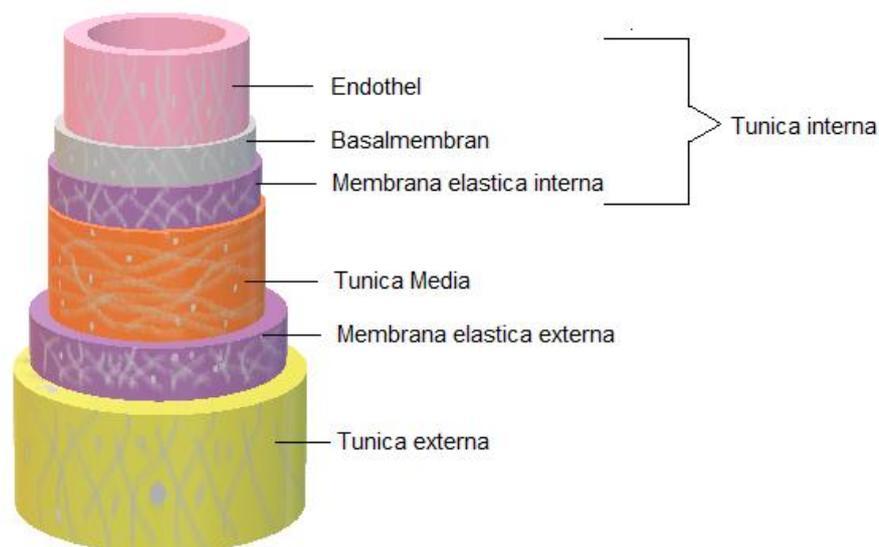


Abbildung (Abb.) 1. Aufbau einer Arterie

Bild modifiziert nach „Prometheus Lernatlas der Anatomie“ 3.Auflage.

1.2. Die Bildung und Physiologie von Blutgefäßen

Bei vielen Vorgängen im Körper kommt es zur Bildung neuer Blutgefäße. Dazu gehören unter anderem physiologische Prozesse wie die Embryogenese, die

Wundheilung, der weibliche Reproduktionszyklus und pathologische Prozesse wie das Tumorwachstum und die Bildung neuer Gefäße in ischämischen Geweben (Fallah et al., 2019). Die Neubildung von Blutgefäßen aus Vorläuferzellen des Gefäßendothels wird als Vaskulogenese definiert. Die Angiogenese beschreibt die Gefäßneubildung aus vorbestehenden Blutgefäßen im Embryo und im erwachsenen Organismus (Kalka et al., 2000).

1.2.1. Vaskulogenese

Die Neubildung von Blutgefäßen erfolgt während der Embryogenese unter dem Einfluss von dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und dem vaskulärem endothelialelem Wachstumstumsfaktor (VEGF) (Carmeliet et al., 1996). Sie leiten die Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen zu Endothelzellen ein. Angioblasten sind Endothelzellen, die noch kein Lumen haben, sich weiter differenzieren und die ersten primitiven Blutgefäße bilden (Risau, 1997). Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass die Vaskulogenese sich ausschließlich auf die Embryogenese beschränkt. Nach dem heutigen Wissensstand ist die Vaskulogenese ein Entwicklungsprozess, in dem sich multipotente Zellen des Mesoderms in Angioblasten differenzieren und so Endothelzellen bilden können (Fallah et al., 2019). Neuste Studien deuten darauf hin, dass arterielle und venöse Endothelzellen aus verschiedenen Angioblastenpools kommen, die aus dem Mesenchym stammen (Rouwkema et al., 2016).

1.2.2. Angiogenese

1.2.2.1. Physiologische Angiogenese

Die Angiogenese beruht auf der Ausweitung des Gefäßnetzes durch differenzierte Endothelzellen. Man unterscheidet zwischen dem klassischen Ausprossen von Gefäßen („Sprouting Angiogenesis“) und der Einstülpung (Intusseption) von Gefäßen („Non-Sprouting Angiogenesis“) (Ribatti et al., 2012). Bei der klassischen Variante leitet eine Vasodilatation die Angiogenese ein und erfolgt hauptsächlich als Antwort auf freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO). NO

kann die Produktion von VEGF hochregulieren (Kimura et al., 2000). VEGF seinerseits steigert die Gefäßpermeabilität für zum Beispiel Proteasen. Dies geschieht durch die Reorganisation von Adhäsionsmolekülen wie Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmoleküle (PECAM-1) oder Vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-Cadherin). Aktivierte und proliferierende Endothelzellen können so wandern und schließlich ein Lumen ausbilden. Angiopoietin-2 trägt dazu bei, glatte Muskelzellen von Endothelzellen abzulösen und die extrazelluläre Matrix aufzulösen. Dadurch wird die Migration von Endothelzellen angeregt. Angiopoietin-2 konnte in Speichergranula von Endothelzellen nachgewiesen werden und kann von aktivierten Endothelzellen autokrin innerhalb von 30 Minuten (min) ausgeschüttet werden (Joussen et al., 2003). Die Auflösung der extrazellulären Matrix erfordert Proteinase, die nicht nur den „Platz“ für die proliferierenden Endothelzellen schaffen, sondern auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF und dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF-1) ermöglichen (Bergers et al., 2000; Nelson et al., 2000). Wenn die physikalischen Barrieren durch die Auflösung der extrazellulären Matrix beseitigt werden, können sich die Endothelzellen aus dem Verband lösen. Es setzt eine komplexe Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF, FGFs, Hepatozytenwachstumsfaktor, Differenzierungsfaktoren wie den Angiopoietinen und den zugehörigen Rezeptoren ein. Endothelzellen, die in die Matrix einwachsen, bilden solide Stränge, die nachfolgend ein Lumen bilden. Durch die Fusion mit einem existierenden Gefäß wird ein längeres Gefäß gebildet. Der Durchmesser des Gefäßlumens wird durch eine Reihe von Faktoren reguliert. VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ und ihre Rezeptoren beispielsweise vergrößern das Gefäßlumen, wohingegen VEGF₁₈₉ den Gefäßdurchmesser verringert. Angiopoietin-1 vergrößert in Kombination mit VEGF ebenfalls den Gefäßdurchmesser (Joussen et al., 2003). Im Jahr 2003 entwickelte sich ein „neues“ Modell mit der Beschreibung zweier Hauptzellen, den „Tip“- (Spitzenzelle) und „Stalk“-Zellen (Stielzelle), die an der Angiogenese beteiligt sind. Die Tip-Zelle ist wandernd und polarisierend, während die Stalk-Zelle sich während der Sprossverlängerung vermehrt und das entstehende Gefäßlumen auskleidet. Tip-Zellen besitzen zahlreiche Filopodien, die dazu dienen, das neue

Blutgefäß auf einen angiogenen Stimulus in eine bestimmte Richtung zu lenken. Stalk-Zellen besitzen weniger Filopodien, sind stärker proliferativ, bilden Schläuche, Gefäßverzweigungen und bilden ein Gefäßlumen. Nur ein Gleichgewicht zwischen beiden Zellprozessen führt zu angemessen geformten Gefäßen (Ribatti et al., 2012).

Das „Non-sprouting“ Gefäßwachstum beschreibt die Bildung eines Gefäßnetzwerkes aus einem mit Endothelzellen ausgekleideten Gefäß durch Spaltung eines Gefäßes. Dieses Gefäßwachstum resultiert in einem komplexen Gefäßnetzwerk und entsteht über einen nicht sprossenden also im eigentlichen Sinne nicht angiogenen Mechanismus (Augustin, 2001). Jüngste Studien identifizierten den Epinephrinrezeptor Typ-B4 (EphB4) als einen zentralen Regulator der intussuszeptiven Angiogenese im ischämischen Skelettmuskel. EphB4 stimmt den Grad der Endothelproliferation ab, der durch VEGF induziert wird, wodurch die Gefäßgröße und das -wachstum begrenzt wird und anschließend eine erfolgreiche Aufspaltung in normale Kapillarnetze ermöglicht wird. Es verhindert nicht die Aktivierung von VEGF-Rezeptor 2 durch VEGF, sondern moduliert die VEGF-Rezeptor-2-Downstream-Signalisierung durch die phosphorylierte Extrazellulärsignal-regulierende-Kinase 1/2 (Groppa et al., 2018).

1.2.2.2. Pathologische Angiogenese

Endotheliale Zellen können sich zwar über Jahre hinweg im Ruhezustand befinden, wechseln jedoch als Reaktion auf Wachstumsfaktorstimuli, vor allem durch die Signalisierung des VEGF, fast augenblicklich in einen aktivierten, stark proliferativen und migratorischen Zustand (Eelen et al., 2018). Dies ist unter physiologischen Umständen ein Vorteil, wenn man z. B. die Erhöhung der Blutversorgung während der Wundheilung oder die Einbettung eines befruchteten Eies in ein stärker vaskularisiertes Endometrium betrachtet. Leider kann diese schnelle Wachstumsreaktion auch zu unserem Nachteil sein. Ein wichtiges Merkmal, das die physiologische von der pathologischen Angiogenese unterscheidet, ist, dass unter physiologischen Umständen die Angiogenese nur wenige Tage bis Wochen andauert. Unter pathologischen Einflüssen kann sie

jedoch für Monate oder Jahre bestehen bleiben (Carmeliet et al., 2000). Von der Angiogenese abhängige Krankheiten wurden erstmals 1971 von Judah Folkman beschrieben. Er berichtete, dass die Blockierung der Blutgefäßbildung in Tumorzellen zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums und Metastasierung führt (Folkman et al., 1971). Die pathologische Angiogenese spielt in einer Reihe von Erkrankungen eine bedeutende Rolle. Beispiele sind die Anomalitäten der Blutgefäße wie beim kavernösen Hämangiom oder bei der Arteriosklerose. Außerdem ist sie bedeutend bei Adipositas, Hauterkrankungen wie Psoriasis, allergischer Dermatitis, Narben-Keloiden, Karposi-Sarkomen bei AIDS-Patienten, Augenerkrankungen wie diabetische Retinopathien, Lungenanomalien wie bei Asthma oder Nasenpolypen, entzündlichen Darmerkrankungen, bei Erkrankungen der Fortpflanzungsorganen wie Endometriose oder Ovarialzysten und bei Abnormalitäten der Knochen und Gelenken wie bei Arthritis, Synovitis und Osteomyelitis (Fallah et al., 2019). Eines der wichtigsten Beispiele für eine pathologische Angiogenese ist jedoch die Tumorangio-genese. Das schnelle und fortschreitende Wachstum neuer Blutgefäße ist ein Markenzeichen der Krebserkrankung (Hanahan et al., 2011). Die Beobachtung, dass es zur Ausbildung neuer Gefäße rund um Tumoren kommt, wurde schon vor 100 Jahren beschrieben (Goldmann, 1908). Im Jahr 1968 wurde die Hypothese aufgestellt, dass Tumore eine diffusionsfähige „angiogene“ Substanz produzieren können (Ehrmann et al., 1968; Greenblatt et al., 1968). Tumorgefäße entwickeln sich aus Keimung oder Intussuszeption aus bereits existierenden Gefäßen. Verschiedene molekulare Stoffe sind an dem Gefäßwachstum beteiligt (Carmeliet, 2000). Darunter findet man VEGF und Angiopoietin. Die zeitliche und räumliche Expression dieser Regulatoren ist in Tumoren nicht so gut koordiniert wie in der physiologischen Angiogenese. Die Gefäßwand wird nicht immer durch eine homogene Schicht aus Endothelzellen umgeben. Stattdessen kann sie nur von Krebszellen oder einem Zusammenschluss von Krebs- und Endothelzellen umhüllt werden (Carmeliet et al., 2000). Tumorgefäße sind strukturell und funktionell abnormal. Sie sind unorganisiert, gewunden und erweitert. Sie besitzen ungleiche Durchmesser und übermäßige Verzweigungen. Dies kann aus dem Ungleichgewicht angiogener

Regulatoren wie VEGF und Angiopoietinen resultieren. Folglich ist der Blutfluss in Tumoren chaotisch und führt zu hypoxischen Zuständen und einem niedrigen pH-Wert (Tilki et al., 2007). Das tumorassoziierte Endothel ist strukturell defekt. Diskontinuitäten und Lücken sind übliche Merkmale. Diese Fakten korrelieren mit dem malignen Potential des Tumors, da dies zu einer Extravasation von Plasmaproteinen, Erythrozyten und Tumorzellen in den Blutkreislauf und folglich die Entstehung von Metastasen erleichtern kann. Interzelluläre Lücken, transendotheliale Löcher, vesikulo-vakuolare Organellen und endotheliale Fenestrae sind im Endothel von Tumorgefäßen vorhanden. Tumor-Perizyten sind lose mit den Endothelzellen assoziiert und weisen eine abnorme Form auf (Ribatti et al., 2007). Menschliche Tumore können aufgrund eines Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose jahrelang inaktiv bleiben. Aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit kann die systemische Konzentration von angiogenen Inhibitoren die der Stimulatoren überschreiten, was zur Inhibition des Wachstums und der Metastasierung des Tumors führen kann (Oreilly et al., 1994). Aufgrund dessen wird große Hoffnung in die Entwicklung einer anti-angiogenen Therapie gegen Tumoren gesetzt (Carmeliet et al., 2000).

1.2.2.3. Therapeutische Angiogenese

Es besteht zunehmend Hoffnung, dass aufgrund der fortlaufenden Erforschungen der molekularen Mechanismen der Angiogenese neue zuverlässige Therapiemöglichkeiten für z. B. chronische Erkrankungen wie Krebs oder rheumatoide Arthritis entwickelt werden. Auch im Bereich der Behandlung von ischämischen Geweben oder Organen wie zum Beispiel dem Herzen oder einem diabetischen Glied erhofft man sich eine Weiterentwicklung. Der Erfolg in Organ- und Geweberegeneration hängt hier von der Fähigkeit ab, eine stabile und erneuerbare Versorgung mit Blutgefäßen gewährleisten zu können (Polverini, 2002). Zunächst war das vorherrschende Dogma der angiogenen Reaktion, die sich im postnatalen Leben entwickelt, dass die Entstehung neuer Gefäße ausschließlich aus bereits vorhandenen Kapillaren stattfindet. Allerdings gibt es seit einigen Jahren überzeugende Hinweise darauf, dass ein kleiner, aber biologisch signifikanter Anteil an Endothelzellen, die an der Bildung neuer

KapillargefäÙe beteiligt sind, aus endothelialen Stammzellen stammt. Dieser Vorrat befindet sich im Knochenmark und bleibt im Erwachsenenleben bestehen (Carmeliet et al., 2001). Zunächst wurden mesenchymale Stammzellen im Knochenmark identifiziert, die sich in Endothelzellen ausdifferenzieren können. Diese multipotenten, adulten Vorläuferzellen (MAPCs) haben die Fähigkeit, eine Vielzahl von Mesoderm-abgeleiteten Gewebe einschließlich Fett-, Muskel-, Knochen-, Knorpel- und vaskuläres Endothel zu bilden. Solche Endothelzellen können zur Neoangiogenese bei der Wundheilung und zur Tumorgenese beitragen (Reyes et al., 2008). Aktuelle Studien zeigen, dass aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellen (BM-MSCs) eine gute Therapiemöglichkeit bei der Behandlung von Herzinsuffizienzen darstellt. Die BM-MSCs können die Herzfunktion der ischämischen Kardiomyopathie verbessern, indem sie die Angiogenese nach dem Infarkt parakrin verstärken (Bao et al., 2017). Außerdem haben kürzlich Berichte gezeigt, dass die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen nach einem Myokardinfarkt sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien infarktlimitierende Wirkungen haben können. Die mesenchymalen Stammzellen unterstützen die Regeneration des Herzens, indem sie entweder die Herzstammzellen revitalisieren oder die Arterien und Venen des Herzens revaskularisieren. Darüber hinaus können sie parakrine Wachstumsfaktoren produzieren, die das Überleben naheliegender Kardiomyozyten erhöhen und die Angiogenese durch Rekrutierung von Stammzellen aus dem Knochenmark oder durch Induktion von GefäÙwachstum aus vorhandenen Kapillaren verstärken (Shafei et al., 2017). Die Anti-Angiogenese zeigt sich vielversprechend in der Tumortherapie. Die Eliminierung angiogener Faktoren aus der VEGF-Familie hat sich zu einer wirksamen Strategie zur Hemmung des Tumorwachstums entwickelt. Bisher wurden die erfolgreichsten Ergebnisse bei metastasierendem Darmkrebs, bei Nierenzellkarzinomen und nichtkleinzelligem Lungenkarzinomen erzielt (Dimova et al., 2014).

1.2.3. Arteriogenese

Die Umwandlung von kleinen, vorbestehenden Kollateralarteriolen zu funktionell bedeutsamen Kollateralarterien durch aktive Prozesse wird als Arteriogenese bezeichnet (Schaper, 2009). Dieser Prozess wird durch lokale hämodynamische und mechanische Effekte der Gefäßwand nach einem Gefäßverschluss gesteuert. Der Shearstress erhöht sich und der Blutfluss vermehrt sich. Dies führt zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Auch kommt es zum Einwandern inflammatorischer Zellen, die wie beispielsweise Monozyten durch die Freisetzung von angiogenen Wachstumsfaktoren und Mediatoren zur Kollateralausbildung beitragen (Kalka et al., 2002).

1.3. VEGF

1.3.1. Struktur und Rezeptoren

Bei der Untersuchung von Tumorblutgefäßen identifizierte 1983 eine Forschungsgruppe um Donald Senger ein Protein, welches die Gefäßpermeabilität erhöhen kann. Dieses Protein wurde als tumorvaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet. 1989 wurden weitere Studien zur endgültigen biochemischen und molekularen Identifizierung dieses Proteins veröffentlicht. Da VPF nur gegenüber vaskulären Endothelzellen eine wachstumsfördernde Aktivität zeigte, wurde es seitdem als vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor bezeichnet (Ferrara, 2002). VEGF und seine Rezeptoren sind sowohl für das Wachstum und die Differenzierung von Endothelzellen während der Embryonalentwicklung, als auch unter physiologischen und pathologischen Zuständen in den Gefäßen des adulten Organismus von besonderer Bedeutung (Kalka et al., 2000). Es hat einen direkten Einfluss auf Endothelzellen hinsichtlich Migration, Proliferation und Formänderungen (Darden et al., 2018). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass VEGF als lebenserhaltender Faktor („Survival Factor“) für Endothelzellen und neu gebildete Gefäße fungiert. In vitro verhindert es die Apoptose, vermittelt durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT-weg. VEGF induziert auch die

Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und A1 in Endothelzellen. Zu der VEGF-Familie gehören neben VEGF-A die verwandten Faktoren VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und der Plazenta-Wachstumsfaktor. Das humane VEGF-A-Gen besteht aus 8 Exonen, die durch alternatives Spleißen 6 Isoformen mit einer Aminosäureanzahl von 121 (VEGF121), 145 (VEGF145), 165 (VEGF165), 183 (VEGF183), 189 (VEGF189) und 206 (VEGF206) kodieren (Yla-Herttuala et al., 2007).

VEGF165 ist in den meisten Geweben die dominierende sezernierte Isoform. VEGF ist ein basisches Heparin-bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 46 Kilodalton (Ferrara et al., 2003). In adulten Geweben ist VEGF nur schwach nachweisbar. Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Muskelzellen und Endothelzellen sind in der Lage unter pathologischen Bedingungen VEGF und auch seine Rezeptoren in großer Menge bereitzustellen (Kroll et al., 2000). Für die Induktion der VEGF-Genexpression gilt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Hypoxie als das stärkste Signal. Die biologischen Wirkungen von VEGF werden von drei Rezeptoren vermittelt. Der Endothel-Wachstumsfaktor-Rezeptor (VEGFR) -1 (FMS-like tyrosine kinase-1, Flt-1), VEGFR-2 (Fetal liver kinase-1, KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (fms-like-Tyrosinkinase, Flt-4) sind der Gruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren zuzuordnen (Yla-Herttuala et al., 2007). VEGFR-1 und -2 werden in den Zelloberflächen der meisten Endothelzellen des Blutes exprimiert. VEGFR-3 ist weitgehend auf lymphatische Endothelzellen beschränkt. VEGF-A bindet sowohl an VEGFR-1 als auch an -2. Im Gegensatz dazu interagieren PLGF und VEGF-B nur mit VEGFR-1. VEGF-C und -D binden an VEGFR-2 und -3. Es gibt viele Hinweise darauf, dass VEGFR-2 der Hauptmediator der Endothelmitogenese sowie der Angiogenese und der mikrovaskulären Permeabilität ist. Im Gegensatz dazu vermittelt VEGFR-1 kein wirksames mitogenes Signal in Endothelzellen (Ferrara et al., 2003).

1.3.2. Rolle in der Angiogenese

Mitglieder der VEGF-Familie zählen zu den leistungsfähigsten Modulatoren der vaskulären Biologie. Sie regulieren die Vaskulogenese, Angiogenese und die

Gefäßerhaltung während der Embryogenese und beim adulten Organismus. Sie werden in praktisch allen vaskularisierten Geweben exprimiert, insbesondere von endokrinen und sekretorischen Organen, großen Blutgefäßen, Skelettmuskeln und dem Myokard (Yla-Herttuala et al., 2007). VEGF steigert die Gefäßpermeabilität für Proteasen und andere Substanzen. Dies geschieht durch die Reorganisation von Adhäsionsmolekülen wie PECAM-1 oder VE-Cadherin. Es fördert die Proliferation und Migration von Endothelzellen und deren Organisation in röhrenförmige Strukturen (Joussen et al., 2003). Der Sauerstoffdruck ist ein wichtiger Regulator von VEGF. Hypoxische Zustände in Geweben induziert die VEGF-Expression schnell und reversibel durch Transkription und Stabilisierung der messenger-RNA (mRNA). Unter normoxischen Bedingungen wird die VEGF-Produktion herunterreguliert und es kommt zu einer Regression von neu gebildeten Mikrogefäßen (Yla-Herttuala et al., 2007). Dazu kommen mehrere Wachstumsfaktoren, einschließlich Epidermiswachstumsfaktor, Transformierender Wachstumsfaktor (TGF) - α , TGF- β , Keratinozytenwachstumsfaktor, IGF, FGF und Thrombozytenwachstumsfaktor die die VEGF-mRNA-Expression zusammen mit der lokalen Hypoxie regulieren. Zusätzlich induzieren inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1a und Interleukin-6 die Expression von VEGF in verschiedenen Zelltypen. Diese Beobachtung stimmt mit der Hypothese überein, dass VEGF ein Mediator für die Angiogenese und Permeabilität bei entzündlichen Erkrankungen sein kann (Ferrara et al., 2003). Wenn VEGF an VEGFR-2 bindet, induziert es so die Phosphorylierung mehrerer Proteine in den Endothelzellen. Dazu zählen die Phospholipase C- γ , Phosphoinositid-3-Kinase, kleines G-Protein Ras-GTPase-Aktivierungsprotein und die Tyrosinkinase-Familie Src. VEGF induziert das Endothelzellwachstum durch den Raf-Mek-Erk-Signalweg. Neuste Studien belegen, dass VEGF auch einen indirekten Einfluss auf Perizyten hat. Perizyten tragen zur Entwicklung reifer Gefäße bei, indem sie die endothelialen Zellkontakte aufrechterhalten und Komponenten aus der extrazellulären Matrix der Basalmembran umliegender Gefäße synthetisieren. Wenn die VEGF-Signalisierung unterbrochen wird, kommt es in *ex-vivo* und *in-vitro*-Modellen der Angiogenese zu einer gestörten Perizytenabdeckung und so zu missgebildeten

Gefäßen (Darden et al., 2018). Bei der adulten Angiogenese spielt VEGF außerdem eine Rolle bei der Entwicklung des Corpus luteums und es gilt als Hauptvermittler der Gefäßneubildung während des Endometriumkreislaufes. Außerdem wurde ein erhöhtes Niveau von VEGF während der Granulationsphase der Wundheilung festgestellt (Polverini, 2002). Die Inaktivierung eines einzelnen VEGF-Allels in Mäusen führte zu embryonaler Letalität.

Im postnatalen Leben führt eine Hemmung von VEGF zu erhöhter Mortalität, verkümmerten Körperwachstum und beeinträchtigter Organentwicklung. Die VEGF-Neutralisierung bei juvenilen Primaten führt zu keinen signifikanten Abnormalitäten außer zu einer Unterdrückung der Angiogenese der Eierstöcke (Ferrara et al., 2003).

1.4. Acetylcholin

1.4.1. Das klassische neuronale System des Acetylcholins

Vor etwa 500-400 Millionen Jahren entstand neuronales Gewebe. Schon in diesen Zellen diente Acetylcholin (ACh) als klassischer Neurotransmitter (Wessler et al., 1999). ACh wird aus Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert. Das synthetisierende Enzym ist die Cholin-Acetyltransferase (ChAT) (Rassow, 2008). In aeroben Organismen bildet das Acetyl-CoA das Hauptprodukt des Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidkatabolismus. Aus dem intrazellulären Abbau von cholinhaltigen Phospholipiden oder aus der Aufnahme von extrazellulärem Cholin stammt das Cholin. Dieses wird über einen nieder- oder hochaffinen Cholintransporter (CHT) 1 in die Zelle transportiert (Wessler et al., 2008). In Neuronen wird ACh von dem vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in kleine Vesikel aufgenommen und dort gespeichert. VACHT ist ein 12-Transmembrandomänenprotein das den elektrochemischen Gradienten, erzeugt durch die vaskuläre Protonen-Adenosintriphosphatasen-ATPase, verwendet, um Neurotransmitter in Vesikel zu transportieren und zu speichern. ACh wird dann nach Eintreffen eines Aktionspotentials über Exozytose freigesetzt (Prado et al., 2013). Nach Ausschüttung in den synaptischen Spalt bindet das ACh an

nikotinsche und/oder muskarinsche ACh-Rezeptoren (nAChR, mAChR). nAChR binden außer ACh noch Nicotin, das Alkaloid des Tabaks. Es gibt zwei Typen dieser Rezeptoren: den Nerventypen N_N , der sich an den Enden des ersten Neurons vom Sympathikus und Parasympathikus befindet und den Muskeltyp N_M , der an der motorischen Endplatte zu finden ist (Rassow, 2008). nAChR sind selbst Kationenkanäle (Dellas, 2015). Grundstruktur aller nAChR bilden 5 Untereinheiten die sich um eine Pore anordnen. Jede Untereinheit besitzt eine extrazelluläre Domäne (NH_2 – terminale Domäne von 200 Aminosäuren), vier Transmembrandomänen (TM1-TM4) und eine intrazelluläre Domäne. Charakteristisch ist außerdem die sogenannte „Cys-Schleife“ in den extrazellulären Domänen. Sie besteht aus 2 disulfidgebundenen Cysteinen, die durch 13 Aminosäuren getrennt sind (Albuquerque et al., 2009). Der nAChR N_M besteht aus fünf homologen Untereinheiten $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Sie liegen ringförmig zusammen und bilden eine Pore. Wenn ACh an die α -Untereinheit bindet, öffnet sich die Pore für etwa 1 Sekunde. Sie ist für Natrium, Kalium und im geringen Maße auf für Kalzium permeabel. Primär strömen Natriumionen in die Zelle und lösen dort ein Aktionspotential aus (Rassow, 2008). So wird die chemische Neurotransmission bei Neuronen, Ganglien, Interneuronen und der motorischen Endplatte vermittelt (Wessler et al., 2008). N_N können in neuronalem und nicht-neuronalem Gewebe vorkommen. Dieser Rezeptor besteht aus der homomeren oder heteromeren Kombination aus 12 verschiedenen Untereinheiten (α_2 - α_{10} und β_2 - β_4) (Gotti et al., 2004; Albuquerque et al., 2009). mAChR sind G-Proteingekoppelte second messenger mit 7 Transmembranproteinen. Sie binden außer ACh noch Muscarin, eines der Toxine des Fliegenpilzes und werden inhibiert durch Atropin. Man unterscheidet 5 Subtypen (M_1 - M_5). Die Aktivierung des mAChR ist relativ langsam (Millisekunden bis Sekunden) und ändert, in Abhängigkeit von den vorhandenen Subtypen, direkt die zelluläre Homöostase von Phospholipase C, Inositoltriphosphat, cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und freiem Calcium (Albuquerque et al., 2009). ACh wird im synaptischen Spalt durch das Enzym Acetylcholin-Esterase (AChE) sehr schnell abgebaut. Neben der AChE gibt es weitere, weniger spezifische Esterasen, die ACh spalten, wobei die Butyrylcholinesterase die bekannteste ist. Das bei der

Hydrolyse anfallende Cholin kann mithilfe von CHT wieder in die präsynaptische Membran der Zelle aufgenommen werden und steht so einer erneuten Synthese zur Verfügung (Kummer et al., 2008; Rassow, 2008).

1.4.2. Das nicht-neuronale System des Acetylcholins

In den letzten Jahrzehnten wurden die unterschiedlichen Komponenten des cholinergen Systems auch in Geweben nachgewiesen, die keine neuronale Innervation erfahren. Diese Beobachtung hat einen neuen Begriff des sogenannten „nicht-neuronalen cholinergen Systems“ geprägt. So wurde eine cholinerge Kommunikation in primitiven Organismen wie Bakterien, Algen, Protozoen, Schwämmen und primitive Pflanzen und Pilzen unabhängig von Neuronen nachgewiesen (Wessler et al., 2003a). Auch in nicht-neuronalen Säugetierzellen, einschließlich die des Menschen, wie zum Beispiel in Epithelzellen der Atemwege (Kummer et al., 2014), des Urothels (Lips et al., 2007), des Darms (Bader et al., 2014) oder der Haut (Kurzen et al., 2007) sowie in Endothelzellen (Zhang et al., 2014), Immunzellen (Fujii et al., 2017), mesothelialen (Trombino et al., 2004) und auch mesenchymalen Zellen (Zablotni et al., 2015), wurden Komponenten des cholinergen Systems nachgewiesen. Der Transport des ACh geschieht auch hier zu einem gewissen Teil über den oben beschriebenen VACht. Dieser Transporter konnte nämlich auch in einigen nicht-neuronalen Zellen wie zum Beispiel den Endothelzellen des Ösophagus und der Harnblase (Wolf-Johnston et al., 2012) , in der Plazenta (Pfeil et al., 2004) und im Bronchialepithel (Proskocil et al., 2004) nachgewiesen werden. Da nicht alle Gewebe diesen Transporter in ausreichender Menge exprimieren, spielt hier zusätzlich ein anderer Transportmechanismus eine bedeutende Rolle. Aufgrund seiner kationischen Natur diffundiert ACh auch durch organische Kationentransporter (OCTs) (Prado et al., 2013). OCTs sind niedrig-affine Transporter mit hoher Kapazität, die den Natrium-unabhängigen Transport biogener Kationen wie Katecholamin, Serotonin, Histamin und eben ACh vermitteln (Matsui et al., 2016). Es gibt 3 Subtypen (OCT 1-3) die zur SLC22-Familie gehören (Koepsell et al., 2007). Auch wurde die Expression von n- und mAChR auf nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen. Nach der Freisetzung von

ACh bindet es an die Rezeptoren und vermittelt so die Signaltransduktion durch die Vermittlung von auto- oder parakrinen Regulationsschleifen (Fujii et al., 2017). Der Einfluss des nicht-neuronalen AChs auf die Epithelzellen in der Epidermis wurde schon detailliert analysiert. Hier zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang mit zahlreichen Zellfunktionen wie Zellzyklus, Apoptose, Organisation des Zytoskeletts, Zellkontakten und Migration (Kurzen et al., 2007). Die Organisation des Zytoskeletts und der Zellkontakte geschieht durch die Regulation von M3-Rezeptoren von zytoplasmatischem Myosin über die kleine GTPase RhoA und Proteinkinase C (Strassheim et al., 1999). Die Stimulierung von mAChRs induziert Proliferationsmarker wie Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen PCNA, Ki67 und Cyclin D1. Die Eliminierung von $\alpha 7$ -nAChR-Signalen verlangsamt die terminale Differenzierung und reduziert die Mengen an proapoptischen Proteinen wie Bad und Bax (Grando et al., 2006). In der Schleimhaut der humanen und Rattenatemwege stimuliert ACh die Proliferation von Epithelzellen (Klapproth et al., 1997). Auch die Wundreparatur des oberflächlichen bronchialen Epithels wurde durch ACh signifikant verbessert (Tournier et al., 2006). ACh wirkt stimulierend auf die Ziliaraktivität und die Clearance (Acevedo, 1994).

Das cholinerge System ist auch stark an der Angiogenese beteiligt (Kurzen et al., 2007). *In vitro* vermitteln nAChR die Proliferation und die Migration von Endothelzellen und sind für die Röhrenbildung verantwortlich. Auch *in vivo* stimulieren sie die Angiogenese. Nikotin erleichtert die Migration von Endothelzellen und fördert die Bildung von Wachstumsfaktoren wie Endothelin und Prostacyclin (Cooke, 2007). Die Bildung von Kapillarnetzwerken wird durch spezifische nAChR-Antagonisten blockiert, was auf einen endogenen Tonus nicht-neuronalen ACh hinweist. Diese Antagonisten reduzieren auch die Neovaskularisation als Reaktion auf Entzündung, Ischämie und Neoplasien (Heeschen et al., 2002). Darüber hinaus stimuliert Nikotin Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Monozyten und erleichtert dadurch die Arteriogenese (Heeschen et al., 2003). Auch Lymphozyten können die meisten cholinergen Komponenten exprimieren (Kurzen et al., 2007). Beispielsweise produzieren T-Zellen nachgewiesenerweise ACh, ChAT und CHT1 (Fujii et al.,

2012). Sowohl T- als auch B-Zellen exprimieren AChE und unterschiedliche Mengen an mAChR (M1, M2, M3, M4 und M5) und nAChR ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$ und $\beta 4$). ACh hat selbst einen Einfluss auf die Immunzellen. ACh- und mAChR-Agonisten induzieren über M3- und /oder M5-mAChRs ein intrazelluläres Kalzium-Signal, was zu einer Inositoltrisphosphat-vermittelten Hochregulierung der c-fos-Expression und zu einer Aktivierung der Desoxyribonukleinsäure- (DNA) und Ribonukleinsäure- (RNA) Synthese führt. Es stimuliert die NO-Synthese durch nNOS und /oder iNOS über Phospholipase C-gekoppelte M1-, M3- und / oder M5- mAChR-vermittelte Wege. Daraus resultiert eine erhöhte Zytotoxizität und cyclische Guanosinmonophosphat-Synthese in Lymphozyten (Kawashima et al., 2004). Es wirkt außerdem als autokriner Faktor, um die IL-2-Signalgebung und das Zellwachstum von humanen Lymphozyten positiv zu beeinflussen (Nomura et al., 2003). ACh beteiligt sich an der Erzeugung von zytolytischen CD8+ T-Lymphozyten, durch Stimulation des M1-Rezeptors (Zimring et al., 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ACh die Immunantwort modulieren kann. So scheinen nAChR eine Rolle bei der Erzeugung von Antikörpern zu spielen (Skok et al., 2007). Auch bei einer Vielzahl von Erkrankungen kann ein Einfluss von nicht-neuronalem ACh nachgewiesen werden. Zum Beispiel wird in Lungentumoren n- und mAChR exprimiert. Durch Stimulation dieser Rezeptoren durch Nikotin oder ACh wird das Wachstum dieses Tumors stimuliert (Friedman et al., 2019). Interessanterweise können chronische Entzündungen zu einer Hochregulation der ACh-Synthese führen. So konnte bei atopischer Dermatitis ein erhöhtes ACh-Niveau in der Haut nachgewiesen werden (Wessler et al., 2003b). Nicht-neuronales ACh kann über $\alpha 7$ -nAChRs bei akuten systemischen Entzündungen eine entzündungshemmende Wirkung auslösen (de Jonge et al., 2007). Ein anderes Beispiel stellt die Untersuchung bei Patienten mit zystischer Fibrose dar. Hier wurde gezeigt, dass der ACh-Gehalt in Leukozyten sowie in den Bronchien deutlich reduziert ist (Wessler et al., 2008).

1.5. Transgene Mausmodelle

Für die Untersuchung von Humankrankheiten können Mausmodelle genutzt

werden, da die Organisation ihrer DNA und ihre Genexpression dem Menschen sehr ähnlich sind. Etwa 99 Prozent (%) der Gene der Maus haben ein homologes Gen im menschlichen Genom (Waterston et al., 2002). Es wird erwartet, dass die Ergebnisse, ausgehend von Versuchen an Mausmodellen, weitestgehend auf den Menschen übertragbar sind (Houdebine, 2007). Das menschliche ChAT-Gen wurde dem Chromosom 10 zugeordnet. Das erste Intron des ChAT-Gens kodiert gleichermaßen für VAcHT. Dieser „cholinerge Genlocus“ kodiert für die Expression des VAcHT- und ChAT-Proteins und enthält regulatorische Sequenzen, die ihre Expression kontrollieren. Das neuronale ChAT ist ein 69 kDa Protein. Aktivatoren der Proteinkinase A oder cAMP-Analoga, Nervenzellwachstumsfaktoren, ziliärer neurotrophischer Faktor, Leukämie-hemmender Faktor und Retinoide können die ChAT-Expression im neuronalen Gewebe erhöhen. Auch Sexualhormone und Glukokortikoide können die Genexpression und/ oder die ChAT-Enzymaktivität beeinflussen. Die Spezifität von ChAT ist für Cholin sehr hoch. Jedoch zeigte es beispielsweise im Rattenhirn die gleiche Affinität für Acetyl-CoA, Propionyl-CoA und Butyryl-CoA. Es kann sein, dass das ChAT-Enzym daher nicht nur für die ACh-Synthese, sondern auch für andere Signalmoleküle wie Propionylcholin oder Butyrylcholin verantwortlich ist (Wessler et al., 1999). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden unter anderem ChAT-BAC-eGFP-Mäuse verwendet. Diese Tiere sind transgene Mäuse, bei denen ein verstärktes grün fluoreszierendes Protein (eGFP, engl. enhanced green fluorescent protein) unter der Kontrolle des ChAT-Promotors, in Neuronen und in peripheren cholinergen Zellen exprimiert wird. Die transgenen Mäuse entstehen durch das Knock-in von eGFP innerhalb eines bakteriellen künstlichen Chromosoms (BAC), welches in den ChAT-Locus eingefügt wird. Die immunhistologischen Auswertungen der Gewebeschnitte zeigten zum einen positive Ergebnisse in Zellen des zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystems und zum anderen eine intensive Fluoreszenz und Färbung in Epithelzellen der Atemwege und im Verdauungstrakt, sowie in einer Untergruppe von Lymphozyten. ChAT-BAC-eGFP-Mäuse ermöglichen somit hervorragend eine Visualisierung des klassischen als auch des nicht-klassischen cholinergen Systems im Organismus (Tallini et al., 2006)

1.6. Zielsetzung

Bekannt ist der Einfluss des ACh im neuronalen System. Die Rolle im nicht-neuronalen System dagegen ist noch nicht geklärt.

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, den Einfluss des ACh aus nicht-neuronalen Quellen auf die Angiogenese zu untersuchen. Dafür wurden *in vitro* Versuche an isolierten Aortenringen durchgeführt.

Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1) Welchen Einfluss hat das Acetylcholin auf die Gefäßneubildung

Hierfür wurde das Aortenringassay durchgeführt. Stimuliert wurde mit verschiedenen Konzentrationen vom Carbachol, ein Strukturderivat des ACh, um die Dosis-Wirkung vom ACh für die Angiogenese zu bestimmen. Zum funktionellen Vergleich wurden Stimulationsversuche mit VEGF durchgeführt.

2) Zu welchen Zelltypen gehören die cholinergen Zellen in der Gefäßwand?

Wie schon in der Literatur beschrieben, spielen Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Perizyten eine wichtige Rolle in der Angiogenese. In diesem Versuchsschritt wurde anhand von immunhistochemischer Doppelfärbungen untersucht, um welche Zellart es sich bei den ChAT-eGFP-Zellen handelt.

3) Wo sind nicht-neuronale cholinerge Zellen in den Gefäßen während der Angiogenese lokalisiert?

Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde bei ChAT-eGFP-Mäusen ein Aortenringassay durchgeführt. So konnte die Lokalisation von cholinergen Zellen nach Durchführung der Immunhistochemie mittels Fluoreszenzmikroskopie festgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tabelle 1. Verzeichnis der verwendeten Geräte.

Gerät	Model	Hersteller, Ort
Einbettkarussell	TP1020	Leica-Biosystem, Nussloch
Gießstation	2080/K	Bavimed, Birkenau
Mikroskope	Binokulares Mikroskop, Axiovert 135 TV	Zeiss, Jena
	Fluoreszenzmikroskop, Axioskop 2 mot plus	Zeiss, Jena
	Keyence BZ-9.000	Keyence, Japan
	Konfokales Mikroskop Eclipse Ti	Niko, Düsseldorf
	Leica DM IL LED	Leica-Biosystem, Nussloch
Schlittenmikrotom	SM2010 R	Leica-Biosystem, Nussloch
Sterilbank	Aura 2000 M.A.C.	Bioair Instruments, Italien
Zellkultur-Inkubator	Hera Cell 240	Thermo Scientific, USA

Tabelle 2. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien.

Produkt	Hersteller, Ort
Aluminiumsulfat-18-hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	Fluka, München
Atropin 10 µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carbachol, 182,65 g/mol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citronensäure	AppliChem, Darmstadt
Collagen, Type I, rat tail, 4,0 mg/ml	Merck Millipore, Darmstadt
D (+) - Glucose, wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
DePex	Serva, Heidelberg
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life technologies, Ober-Olm
Ethanol	Firma Nordbrand, Nordhausen
Fetales Kälberserum (FCS,) 2,5%	Merck Millipore, Darmstadt
Glucoseoxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopentan	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem , Darmstadt
Kernechtrot	Merck Millipore, Darmstadt
Lenvatinib 1 µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mecamylamin 100 µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mowiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, 40 mol ⁻¹	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nickelsulfat	Merck Millipore, Darmstadt
Normal goat serum (NGS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Normal horse serum (NHS)	Schlachthof, Gießen
Opti-MEM + GlutaMax I	Life technologies, Ober-Olm
Paraffin, Histocec-Pastillen	Merck Millipore, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA), 4%	Carl Roth, Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	Life technologies, Ober-Olm
Pure-col, 3,1 mg/ml	Cell Systems, Troisdorf

Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura, Alphen aan den Rijen, Niederlande
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Triton-X 100 0,25%	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
VEGF, murine, 30 ng/ml	PeproTech, Hamburg
Xylol	Uni Würzburg, Würzburg

Tabelle 3. Zusammensetzung der verwendeten Puffer- und Inkubationslösungen.

Lösung	Zusammensetzung
0,1% Kernechtrot-Lösung	50 g Aluminiumsulfat-18-hydrat, reinst in 1 l A. dest. lösen 1 g Kernechtrot unter Erhitzen darin lösen
Citratpuffer	18 ml 0,1 M Citronensäure 82 ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat 900 ml Aqua demineralisiert (A. dem.) pH= 6,0
DAB-Entwicklerlösung für eine Küvette	67,5 ml Phosphatpuffer 1,350 ml Nickelsulfat (13 mg/ml Nickelsulfat) 1,350 ml Glucose (10%) 0,150 ml Ammoniumchlorid (180 mg/ml) 1,5 ml DAB (22,5 mg/ml) 0,225 ml Glucose-Oxidase (1,2 mg/ml)
Mowiol	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 6 ml 0,2M TRIS Puffer pH8

NHS	0,1 % BSA 10 % NHS 0,5 % Tween 20
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 5-fach konzentriert	400,3 g NaCl 10,0 g KCl 68 g Na ₂ HPO ₄ 10,0 g KH ₂ PO ₄ Ad 10 l A. dem.
Phosphatpuffer 0,1 M pH= 7,4	4,9 g KH ₂ PO ₄ 23,3 g Na ₂ HPO ₄ Ad 2 l Aqua destilliert (A. dest.)

Tabelle 4. Verzeichnis der verwendeten Primärantikörper und deren Arbeitsverdünnungen.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller, Ort
CD34 (rat)	1:400	Abcam, Cambridge, UK
CD44 (rat)	1:400	Bio-Legend, San Diego, USA
CHAT (goat)	1:400	Merck Millipore, Darmstadt
DAPI	1:10.000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
F4/80	1:100	Abcam, Cambridge, UK
GFP (chicken)	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Goat- anti- Desmin	1:100	antikörper-online.de
Lectin- Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	1:1.000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rabbit- anti- NG2	1:100	Merck Millipore, Darmstadt
Rat- anti - CD31	1:400	Dianova, Hamburg

Rat- anti- ms F4/80	1:200	AbD Serotec, Puchheim
α -SMA Cy3	1:1.000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -Vimentin (rabbit)	1:250	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 5. Verzeichnis der verwendeten Sekundärantikörper und deren Arbeitsverdünnungen.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller, Ort
Donkey- anti- rabbit IgG, Cy3-konjugiert	1:1.000	Merck Millipore, Darmstadt
Donkey- anti- rat IgG, Cy3-konjugiert	1:1.000	Dianova, Hamburg
Donkey- anti-goat IgG, Cy3-konjugiert	1:500	Merck Millipore, Darmstadt
Donkey-anti- goat IgG, TXR-konjugiert	1:400	Life technologies, Ober-Olm
Donkey-anti-chicken IgY, Cy2-konjugiert	1:1000	Merck Millipore, Darmstadt
Goat-anti-rabbit IgG, biotinyliert	1:250	Biozol, Eching
Goat-anti-rat IgG, biotinyliert	1:250	Biozol, Eching
Streptavidin	1:250	Linaris, Dossenheim

Tabelle 6. Verzeichnis der verwendeten Programme.

Software	Quelle
Axiovision Rel 4.8.	https://www.zeiss.de/mikroskopie/downloads/axiovision-downloads.html
BZ-II Analyser	http://bz-ii-analyzer.software.informer.com/

IBM.SPSS. Statistics.v23	<i>Universität Würzburg</i>
ImageJ<	<i>https://imagej.net/</i>
LAS X+ Leica DMI8	<i>https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/mikroskop-software/details/product/leica-las-x-ls/</i>
NIS-Elements-AR	<i>https://www.nikoninstruments.com/en_DE/Products/Software/NIS-Elements-Advanced-Research</i>

Tabelle 7. Verzeichnis der verwendeten Mausstämme.

Mausart	Stamm
BI6	C57BI6/J
ChAT	Kortikoff eGFP

2.2. Methoden

2.2.1. Haltung und Zucht

Die verwendeten Mauslinien (C57BI6/J und ChAT-eGFP) stammten aus dem Tierstall des Physiologischen Instituts sowie aus der Tierhaltung des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (SPF, ZEMM) der Universität Würzburg. Die Mäuse wurden in Typ-I-Käfigen bei einer Temperatur von 22-26 C° und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Tiere erhielten Zucht- und Haltungsfutter der Firma Ssniff und Wasser ad libidum. Die Versuche wurden mit 8-12 Wochen alten Tieren beider Geschlechter durchgeführt.

2.2.2. Whole-mount-Präparation und Aufbereitung

Hierbei war es das Ziel, Herz, Lunge, Ösophagus und Aorta als ein zusammenhängendes Organpaket schonend zu entnehmen. Bei diesem Versuchsablauf wurden die Tiere durch zervikale Dislokation abgetötet. Für die Organentnahme wurde die Maus in dorsaler Lage auf einer Unterlage stabil fixiert. Mit einer Schere wurde ein Schnitt auf der Medianlinie des Thorax und

Abdominalraumes durchgeführt. Wichtig war hierbei, die Bauchdecke des Tieres nicht zu verletzen. Anschließend konnte durch Zug mit einer groben Pinzette das Fell des Tieres entfernt werden. Als nächstes wurde die Bauchdecke zum Schutz der darunterliegenden Organe mit einer Pinzette angehoben und mit einer groben Schere entfernt. Durch einen Schnitt durch die Rippen jeweils lateral der Medioclavikularlinien, konnten die ventralen Anteile des Brustkorbes abgesetzt werden. Somit wurde ein freier Blick auf die Lunge und das Herz möglich. Als nächstes wurden der Thymus und die Trachea entfernt. Die verbleibenden Thoraxorgane wurden vorsichtig von Fett, Bindegewebe und Blutgefäßen freipräpariert. An der am weitesten kranial und dorsal gelegenen Stelle des Ösophagus und der thorakalen Aorta wurden die Organe durchtrennt. Sie konnten nun zusammenhängend herausgenommen werden. Die zusammenhängenden Organe, bestehend aus Herz, Lunge, Ösophagus und Aorta, wurden nach der Entnahme für eine Stunde in 4% PFA-Lösung gelegt und anschließend in 20% Saccharose 12 Tage ausgewaschen. Danach folgte die Cryokonservierung und die Lagerung der Präparate bei -20 Grad Celsius (°C). Die Einbettung erfolgte mit Tissue-Tek. Mittels -20°C gelagertem Isopentan, eingefüllt in einen durch flüssigen Stickstoff gekühlten Kupferzylinder, wurden die Präparate in kleine Blöckchen gefroren. Die histologischen Schnitte wurden an einem Cryostat bei -20°C hergestellt. Dabei wählte man eine Schnittdicke von 10 Mikrometer (μm). 28 Objektträger \times 3 Gewebeschnitte stellten das Ergebnis dar. Anschließend folgte eine 2 stündige lichtgeschützte Trocknung der Objektträger. Zur Rehydrierung des Gewebes wurden die Präparate nun dreimal 1 Minute mit PBS gewaschen. Die Hälfte der Gewebeproben sollten mittels Immunhistochemie noch optisch verstärkt werden. Dazu wurde auf die ausgewählten Objektträger eine Blocklösung (0,1% BSA, 10% NHS, 0,5% Tween 20) für eine Stunde aufgetragen und anschließend mittels PBS wieder entfernt. Nun wurden die Schnitte mit dem ersten Antikörper GFP (1:500) über Nacht versehen. Am folgenden Tag erfolgte das Waschen der Schnitte mit PBS und das Auftragen des Zweitantikörpers goat-anti-chicken (1:1000) für eine Stunde. Die Objektträger konnten nun alle mit Mowiol eingedeckt und nach Trocknung am Mikroskop ausgewertet werden.

2.2.3. Aortenring-Assay

Zur Analyse der Effekte des nicht-neuronalen ACh auf die Angiogenese wurde der Aortenring-Assay nach Baker durchgeführt (Baker et al., 2012). Zunächst wurden die Tiere, wie bereits beschrieben, fachgerecht abgetötet und fixiert. Nun erfolgte die Desinfektion der Bauchregion mit 70% -igem Ethanol. Das Fell wurde durch einen Schnitt entlang der Medianlinie mit einer stumpfen Schere und anschließendem Ziehen mit einer Pinzette entfernt. Nach Öffnung der Bauchdecke wurde der Darm vorsichtig beiseitegeschoben, um die Arteria iliaca communis freizulegen. Diese wurde nun durch einen Schnitt mit einer spitzen Schere getrennt, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Das Ligamentum falciforme wurde als nächstes durchtrennt. Der Ösophagus wurde vom Magen abgesetzt und die gesamten Abdominalorgane wurden leicht nach kaudal verlagert, um eine bessere Übersicht auf das Präparationsgebiet zu erhalten. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter einem Binokularmikroskop durchgeführt. Zunächst wurden der Thymus und die Lungenflügel herauspräpariert. Das Herz wurde nun vorsichtig in die rechte Brusthöhle verlagert, um eine bessere Erreichbarkeit der Aorta zu gewährleisten. Das Gefäß wurde danach von den abgehenden kleinen thorakalen Arterien getrennt. Anschließend folgte die Entfernung des Fettgewebes. Dieser Schritt ist sehr wichtig, da die Aorta am Ende der Präparation nahezu fettfrei vorliegen muss, um ein Neuaussprossen von Gefäßen zu ermöglichen. Nach Fixierung der Aorta mit einer feinen Pinzette im Bereich des Arcus aortae, wurde das Gefäß in diesem Bereich vom Herzen getrennt. Dann folgte die kaudale Absetzung im Bereich des Überganges von thorakalen zur abdominalen Aorta. In einer Petrischale, gefüllt mit PBS, wurde das entnommene Gefäß vorsichtig vom verbliebenen Fett befreit und mit 1 Milliliter (ml) Opti-MEM luminal durchspült. Mit einem Skalpell wurde die Aorta nun in etwa 20-30 ca. 1 Millimeter (mm) breite Ringe geschnitten. Über Nacht wurden die Aortenringe in einem Medium, bestehend aus 3 ml Opti-MEM und 30 Mikroliter (μ l) Pen-Strep, bei 37°C und einer Begasung mit 5 % Kohlenstoffdioxid in einem Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ringe in einer 96-Well-Platte kultiviert (Abb.2). Diese Arbeit erfolgte unter einer Sterilbank. Zunächst wurde DMEM und das Collagen-

Typ-I in einer Schale auf Eis vorbereitet. Dieser Schritt ist sehr wichtig, da es sonst zu einer vorzeitigen Polymerisation kommen kann. Bei Ringen, die später immunhistologisch mit einem anti-CD31 Antikörper gefärbt werden sollten, wurde alternativ zum Collagen Purecol verwendet. Grund dafür ist, dass der anti-CD31 Antikörper und das Collagen aus der Ratte gewonnen wurden. Inkubation mit einem anti-rat-Antikörper würde auch das Collagen markieren. Unter der Sterilbank wurde dem DMEM jetzt das Collagen zugefügt und der pH-Wert nun mit Natriumhydroxid so eingestellt, bis die Lösung sich rosa zeigte. 20 µl Natriumhydroxid pro 10 ml Medium reichten aus, um die Einbettmatrix basisch werden zu lassen. Es folgte das Einsetzen der Ringe in 70 µl der Einbettmatrix mittig in jedes Well. Die Ringe mussten vollständig mit Collagen umschlossen sein und die Lumen sich senkrecht zum Boden des Wells befinden. Damit das Collagen auspolymerisieren konnte, wurde die Platte für eine Stunde in den Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid-Begasung gestellt. Anschließend wurden die Aortenringe mit einem Medium bestehend aus Opti-MEM und Pen-Strep, inkubiert. In Kontrollversuchen wurde 2,5% FCS zugesetzt. Um die Wirkung von VEGF und ACh auf die Angiogenese zu untersuchen, wurde dem Medium jeweils 30 ng/ml VEGF oder Carbachol, einem Strukturderivat des ACh mit einer längeren Halbwertszeit und nicht abbaubar durch die AChE, in den Konzentrationen 100 Mikromolar (µM), 10 µM, 1 µM, 500 Nanomolar (nM) und 100 nM hinzugegeben. Die Medien wurden an Tag 4 gewechselt. An Tag 5 wurde ein Teil der Versuchsreihen gestoppt. Zur Untersuchung der zeitlichen Weiterentwicklung der neu ausgesprossenen Gefäße, nahm man an Tag 5 nochmals bei einigen Aortenringen ein Medienwechsel vor. An Tag 7 wurde die Hälfte dieser Versuchsreihen gestoppt und quantifiziert. Bei der anderen Hälfte führte man den Versuch bis Tag 11 durch (Abb.3). Bilder der Aortenringe wurden bei der Versuchsreihe „Auswirkung des VEGFs auf die wachsenden Aussprossungen“ an Tag 1-5, bei „Auswirkung des ACh auf die wachsenden Aussprossungen“ an Tag 5 und bei „zeitlich weitere Entwicklung der Aussprossung“ an Tag 5, 7 und 11 angefertigt. An Tag 5 und 7 wurden dann die Längenmessung mittels ImageJ vorgenommen (Abb. 4).

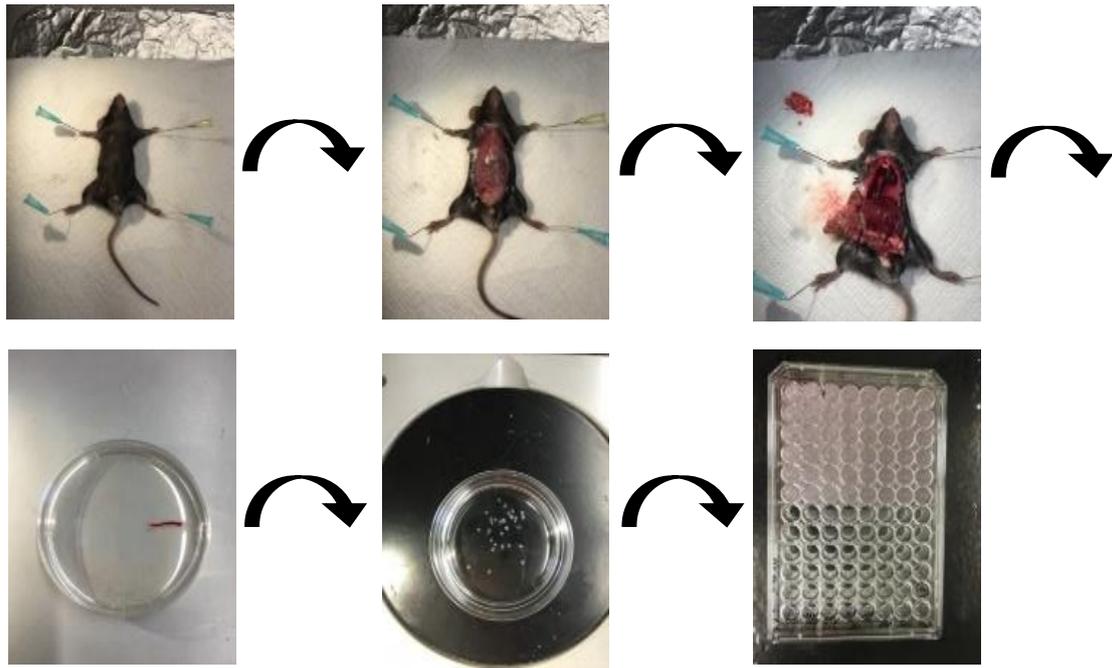


Abb. 2. Aortenpräparation. Die Maus wurde an den Gliedmaßen befestigt. Dann folgten die vorsichtige Freilegung und Entfernung der Aorta. Anschließend wurde das Gefäß in Ringe geschnitten und in einer 96-Well-Platte in Collagen eingebettet.

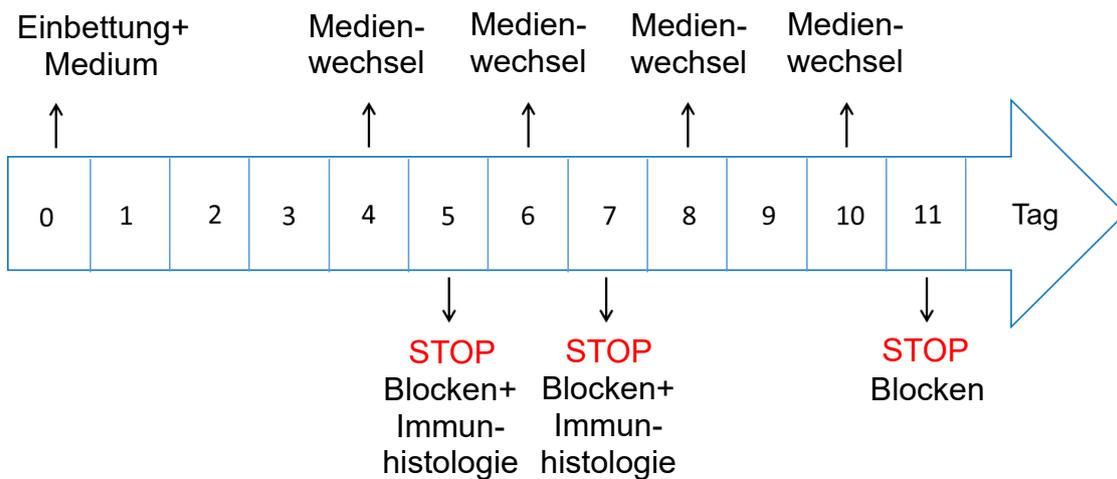


Abb. 3. Versuchsaufbau Auswirkung VEGF/Acetylcholin + zeitliche Weiterentwicklung. Nachdem die Aortenringe in Collagen eingebettet wurden, erfolgte an Tag 4,6,8 und 10 für die jeweiligen Ringe ein Medienwechsel. Der Versuch wurde unter verschiedenen Fragestellungen an Tag 5, 7 und 11 gestoppt. Anschließend folgte die Immunhistochemie.

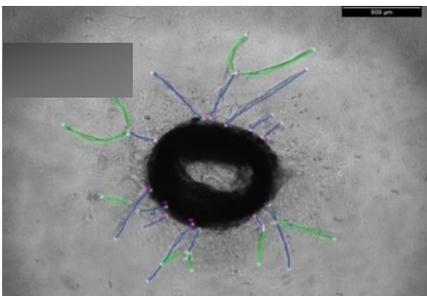


Abb. 4. Auswertung von Primär- und Sekundäraussprossungen mittels ImageJ. Hierzu wurden die fotodokumentierten Bilder der ausgesprossenen Aortenringe in das Programm ImageJ kopiert. Da die Distanz von 500 µm durch die Längenskala bekannt war, diente sie als Referenzlänge für die Messungen. Zunächst wurden die Primäraussprossungen mit blauen Linien nachgezogen und so ihre Länge und Anzahl gemessen. Anschließend wurden so die Sekundäraussprossungen in grün ausgewertet. Die Resultate wurden zunächst im Programm Excel gesammelt und anschließend mit SPSS statistisch ausgewertet.

In den Versuchsreihen der Inhibitoren wurden den mit VEGF oder Carbachol versetzten Medien jeweils Lenvatinib ($c=1\mu\text{M}$), Atropin ($c=10\ \mu\text{M}$) oder Mecamylamin ($c=100\ \mu\text{M}$) zugegeben. Das Medium wurde jeweils an den Tagen 4 und 6 gewechselt (Abb. 5). Eine Fotodokumentation erfolgte an jedem Versuchstag.

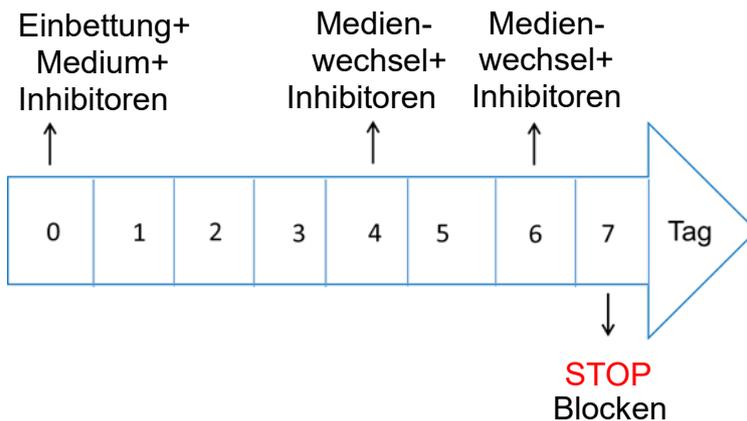


Abb. 5. Versuchsablauf zur Auswirkung von Inhibitoren auf die wachsenden Aussprossungen.

2.2.4. Statistik

Alle Messdaten wurden zunächst im Programm Microsoft Excel tabellarisch erfasst und anschließend mit Hilfe des Programms SPSS Version 23 statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Zuerst wurde eine explorative Datenanalyse vorgenommen. Danach wurden die Messdaten mittels nichtparametrischen Tests untersucht. Für die statistische Berechnung von intergruppalen Unterschieden kam der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Wenn sich eine Signifikanz darstellte, wurde anschließend der Mann-Whitney-Test für jeweils zwei definierte Gruppen durchgeführt. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angesehen.

2.2.5. Immunhistochemie

Um das Medium zu entfernen, wurden die ausgesprossenen Aortenringe in der 96-Well-Platte zuerst dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden sie für 10

min mit 2%-igem PFA unter dem Abzug fixiert. Anschließend folgte ein 3-maliges Waschen für 5 min mit PBS. Nach 15-minütiger Behandlung mit Triton-X-100 0,25% bei Raumtemperatur und weiterem dreimaligen Waschen für 5 min mit PBS folgte das Blocken mit einer Lösung aus 0,1% BSA, 10% NHS und 0,5% Tween 20 für 1 Stunde. Der Blockvorgang ist wichtig, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren, den Färbeerfolg zu optimieren und hohe Hintergrundsignale zu minimieren. Anschließend wurden die Aortenringe mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach dreimaligem Waschen mit PBS für fünf min die Inkubation mit dem jeweiligen Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörper (Abb. 6). Diesen beließen wir für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. 10 min vor Ablauf der Gesamtzeit wurde zusätzlich 4',6-Diamidin-2'phenylinol (DAPI) 1:10.000, zur Visualisierung des Nukleus, auf die Ringe pipettiert. Anschließend folgte dreimal das Waschen mit PBS für 5 min. Als nächstes wurden die Ringe samt Collagen bzw. Purecol vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Well entnommen und auf einem Objektträger mit Mowiol und Deckgläschen eingedeckt. Nach mindestens einer Stunde im Kühlraum folgte die Auswertung der Färbung am Fluoreszenzmikroskop. Zusätzlich wurden Aufnahmen an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt.

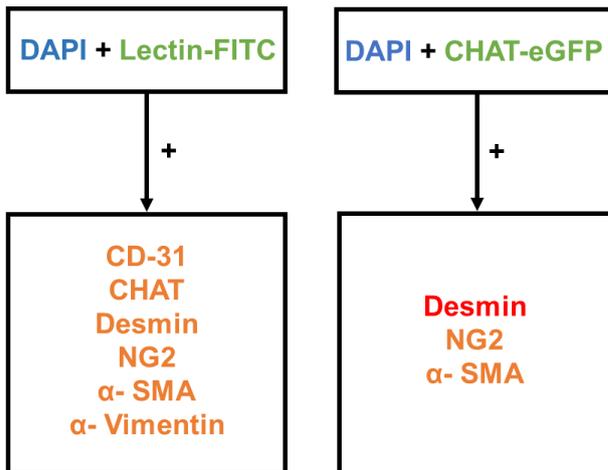


Abb. 6. Färbekombinationen der Immunhistochemie. Kombiniert wurden DAPI und Lectin-FITC und CHAT-eGFP. Dazu kamen dann die jeweils hier aufgeführten Antikörper. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI fluoresziert im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. Lectin-FITC und CHAT-eGFP fluoreszieren jeweils grün. Die anderen Erstantikörper wurden mit Cy3- oder TXR-konjugierten Zweitantikörpern gekoppelt.

2.2.6. Paraffineinbettung und Immunhistochemie

Unterstützende Hilfe leistete bei diesem Versuch die technische Mitarbeiterin Erna Kleinschroth. Die ausgesprosten Aortenringe wurden mit 4% PFA über Nacht bei Raumtemperatur unter einem Abzug fixiert. Anschließend folgte die Überführung der Proben in Kunststoffeinbettkassetten. Die Kassetten wurden sofort in 70% Ethanol gegeben. Die Proben blieben für die Auswaschung des Fixans für ca. 2 bis 3 Stunden auf einem Schüttler in dem Ethanol, welches zusätzlich noch zweimal ausgewechselt wurde. Die Kassetten wurden in das Einbettkarussell angehängt und durchliefen für 15 Stunden das Programm 1 (Programm 1= ½ h 70% Ethanol I, ½ h 70% Ethanol II, 1h 80% Ethanol, 1h 96% Ethanol, 1h 100% Ethanol I, 1h 100% Ethanol II, 1h 100% Ethanol III, 1h Xylol I, 1h Xylol III, 3h Paraffin I, 3h Paraffin II). Nun wurden die Blöckchen an der Gießstation gegossen. Die Schnittherstellung geschah mit einem Schlittenmikrotom. Es entstanden 10 µm dicke Paraffinschnitte, die im Wasserbad gestreckt und auf Superfrost Objektträger aufgezogen wurden.

Abschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C im Trockenschrank getrocknet. Nun folgte die immunhistologische Färbung. Am ersten Tag erfolgte zunächst die Entparaffinierung der Schnitte (10 min Xylol II, 10 min Xylol I, 5 min Ethanol 100% II, 5 min Ethanol 100% I, 5 min Ethanol 96%, 5 min Ethanol 80%, 5 min Ethanol 70%, 5 min Aqua dest). Zur Reduzierung einer unerwünschten Hintergrundfärbung folgte nun die Anwendung eines endogenen Peroxidase Blocks für 10 min lichtgeschützt auf dem Schüttler. Danach folgte das zweimalige Waschen für 5 min mit destilliertem Wasser. Die Demaskierung wurde in 10 mM Citratpuffer pH=6 durchgeführt. Nun wurden die Proben in der Mikrowelle siebenmal jeweils für 10 Sekunden aufgekocht. Nach 30-35 min Abkühlung, folgte ein dreimaliges Waschen der Proben mit PBS bei Raumtemperatur jeweils 5 min lang. Geblockt wurde mit 5% NGS in PBS für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper inkubiert. Diese stellen CD44 (1:400), CD34 (1:2.500) und F4/80 (1:200) dar. Die Objektträger mussten über Nacht in einem Kühlraum bei 4°C belassen werden. Am 2. Versuchstag wurde zuerst die Antikörperlösung mit einer Pasteurpipette abgenommen und dann dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur versehen. Der Zweitantikörper stellte einen goat anti-rat biotinyliert (1:250) und goat anti-rabbit biotinyliert (1: 250) dar. Ein Avidin-Biotin Komplex 1:250 wurde 30 min vor Ende der Inkubationszeit hergestellt. Dazu musste 0,004 µl des Avidin-Biotin-Komplexes in je 1 µl PBS gelöst werden. Um den Zweitantikörper zu entfernen, wurden die Schnitte wieder drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Avidin-Biotin-Komplex-Inkubation musste 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur andauern. Es folgte ein zweimaliges weiteres Waschen für 5 min mit PBS und ein letzter Waschschrift in einer dunklen Küvette mit 0,1 M Phosphatpuffer mit pH 7,4. Nun musste ein Messzylinder mit Alufolie umwickelt werden, um lichtgeschützt die DAB-Entwicklungslösung ansetzen zu können. Der Ansatz bestand aus 67,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer, 1350 µl Nickelsulfat, 1350 µl Glucose 10%, 150 µl Ammoniomchlorid 18 mg, 1,5 ml DAB 22,5 mg/ml) und 225 µl Glucose-Oxidase 1,2 mg/ml Aqua dest. Die Lösung wurde auf einem Magnetrührer gemischt. Die

Reaktion trat nach 10-30 min je nach Antikörper ein und musste somit regelmäßig kontrolliert werden. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte in PBS gestellt. Danach folgte wieder ein dreimaliges Waschen für 5 min mit PBS und abschließend ein kurzes Waschen mit Aqua dest. Die Schnitte wurden dann mit 0,1% Kernechtrot für 3 min gegengefärbt. Nach einem Waschen mit Aqua dest. erfolgte die Dehydrierung der Schnitte (Ethanol 70% 1 min, Ethanol 80% 1 Minute, Ethanol 96% 1 Minute, Ethanol I 100% 3 min, Ethanol II 100% 3 min, Xylol I 5 min, Xylol II 5 min). Eingedeckt wurden die Schnitte dann mit DePex. Unter dem Abzug konnten die Proben fest werden. Dieser Vorgang dauerte 1-2 Stunden oder sie wurden über Nacht stehen gelassen. Nun konnte die Auswertung unter dem Mikroskop erfolgen.

3. Ergebnisse

3.1. Whole-mount

Die Lokalisation von ChAT in thorakal gelegenen Organen wurde an histologischen Schnitten unter der Verwendung eines transgenen Mausstammes ChAT-eGFP untersucht. In diesem Mausstamm wird das eGFP unter der Kontrolle des ChAT-Promotors in Neuronen und in peripheren cholinergen Zellen exprimiert. Das Thema der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss dieser Zellen als eine nicht-neuronale Quelle für ACh und des cholinergen Signallings zu untersuchen. Wir konnten das Vorhandensein von ChAT-Zellen in bereits bekannten Lokalisationen nachvollziehen. Es wurden stark grün-fluoreszierende Zellen in der Herzmuskulatur beobachtet (Abb. 7). Bei weiterem Betrachten fiel auf, dass sich auch an anderen Orten stark grün-fluoreszierende Zellen befanden. Schon unter kleineren Vergrößerungen ließ sich eine stärkere Fluoreszenz von Zellen in der Aortenwand beobachten. Bei der genauen Untersuchung der Aortenwand unter höheren Vergrößerungen, waren stark grün-fluoreszierende Zellen zu erkennen. Diese befanden sich in der aortalen Adventitia der Gefäßwand (Abb. 8).

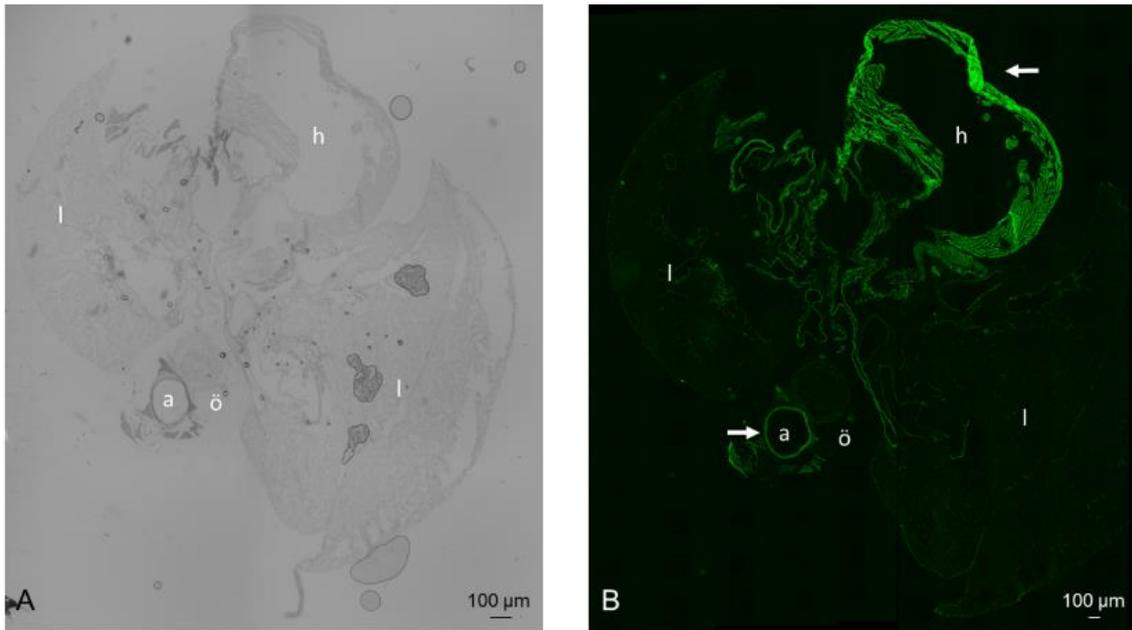


Abb. 7. Schnitt durch die Thoraxorgane einer ChAT-eGFP-Maus.

A: Durchlichtmikroskopie, B: Epifluoreszenz: a: Aorta, h: Herz, l: Lunge, ö: Ösophagus. eGFP-Zellen wurden in der Herzmuskulatur und in der Aortenwand gefunden (Pfeile). Maßstab: 100 µm.

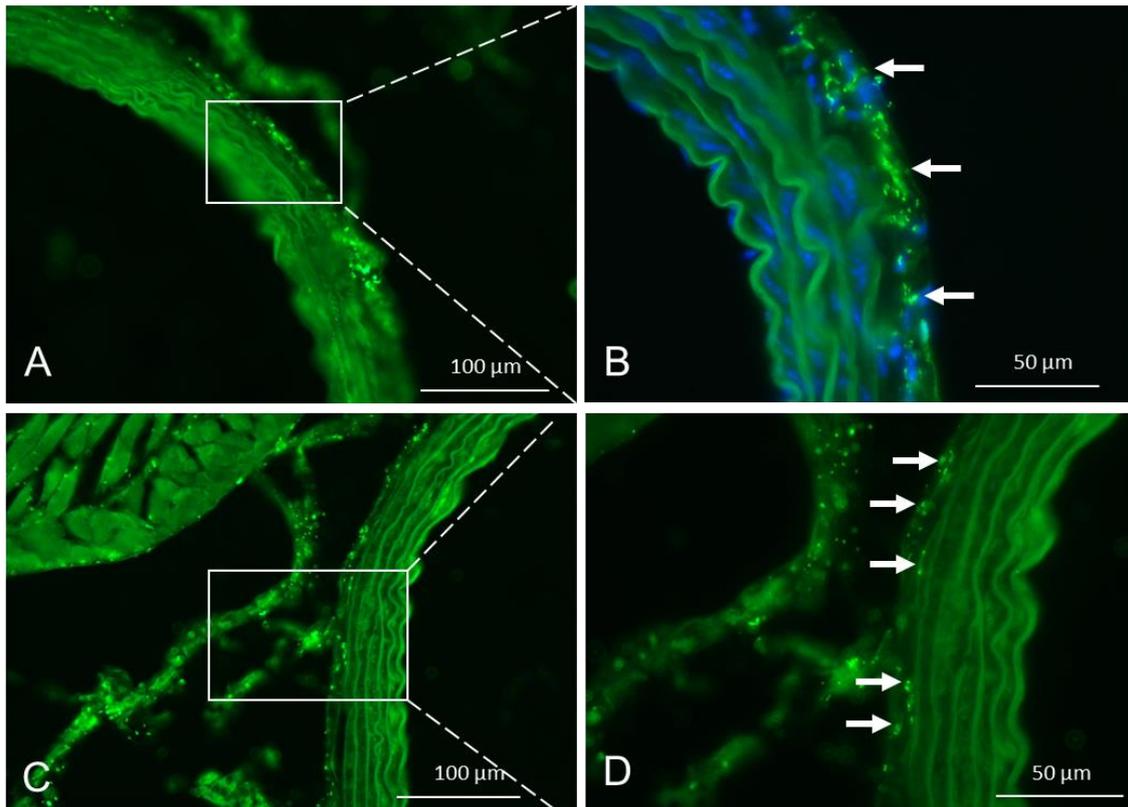


Abb. 8. Histologische Darstellung der Aorta einer ChAT-eGFP-Maus.

A-D: Ausschnitt aus der Aortenwand, Epifluoreszenz, B und D: Insets aus A und C, B und D: ChAT-eGFP-positive Zellen (Pfeile) konnten in der Aortenwand lokalisiert werden. Zellkerne wurden in B mittels DAPI dargestellt. Maßstab: A und C: 100 µm, B und D: 50 µm.

3.2. Aortenring-Assay

3.2.1. Bedeutung von VEGF für die Aussprossung von neuen Gefäßen

Bevor der Einfluss des ACh auf die Angiogenese untersucht werden konnte, wurden Kontrollversuche mit VEGF, einem bekannten Angiogenesestimulator, durchgeführt. Anschließend wurde die Wirkung von ACh mit der VEGF-Wirkung verglichen, von dem zu erwarten war, dass durch ihn die maximale Stimulation der Angiogenese erreicht wird. Um den Einfluss des VEGF auf die stimulierten Aortenringe zu untersuchen, wurden die Ringe an jedem Versuchstag während des Experimentes unter einem Durchlichtmikroskop aufgenommen. Am ersten

Tag nach der Stimulation erkannte man einzelne Zellen, die sich um den Ring gruppierten (Abb. 9, d1). Nach Tag 2 wuchs die Anzahl der Zellen rapide an (Abb. 9, d2). Ab Tag 3 gruppierten sich die Zellen zu tubulären Strukturen, die morphologisch neuen Gefäßen ähnelten. Diese gingen aus dem gegebenen Aortenring hervor (Abb. 9, d3). Sie wurden als Primäraussprossungen bezeichnet und nahmen an den folgenden Versuchstagen an Länge und Anzahl zu. Abschließend zweigten sich die Primäraussprossungen an ihren Enden auf und es entstanden die Sekundäraussprossungen (Abb. 9, d4). Mit VEGF stimulierte Aortenringe bildeten nach 5 Tagen neue stabile Gefäße aus (Abb. 9, d5).

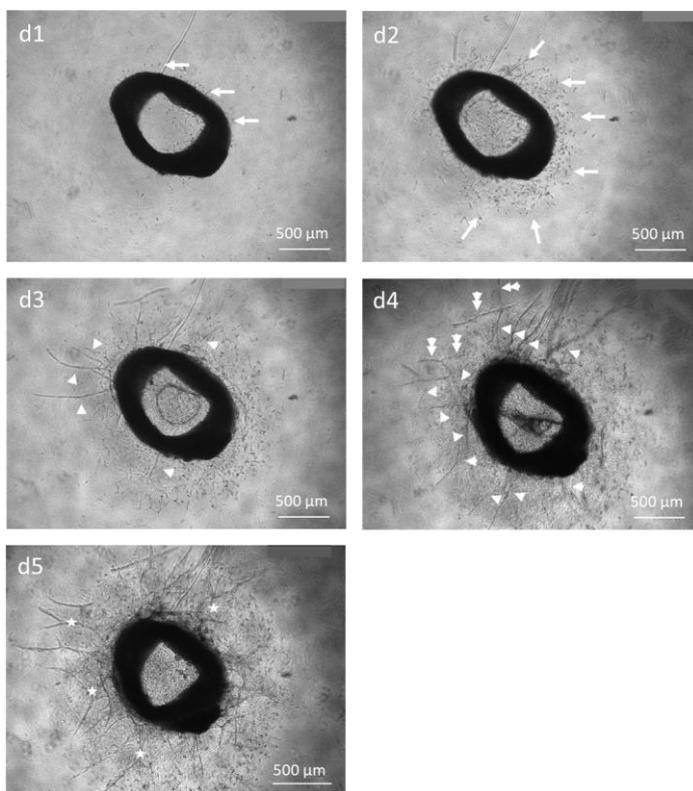


Abb. 9. Durchlichtmikroskopie von Aortenringen nach Stimulation mit VEGF. d1-d5: Tag1 bis 5 nach Stimulation. d1- d2: Pfeile kennzeichnen einzelne neu entstandene Zellen. d3-d4: einfache Pfeilköpfe (▶) = Primäraussprossung. doppelte Pfeilköpfe (►►) = Sekundäraussprossung. d5: Sterne (★) kennzeichnen neu gebildete stabile Gefäße bestehend aus Primär- und Sekundäraussprossungen. Maßstab: 500 µm.

3.2.2. Auswirkung von ACh auf die wachsenden Aussprossungen

Um zu untersuchen, ob und wenn ja, welchen Einfluss das ACh auf die Angiogenese hat, wurden Aortenringe mit ACh unterschiedlicher Konzentration stimuliert. Da ACh selbst eine kurze Halbwertszeit aufweist und eine Stimulation über einen längeren Zeitraum vorgesehen war, wurde in den Versuchen ein Strukturderivat, das Carbachol, eingesetzt. Hier liegt anstelle einer Acetylgruppe eine Carbamoylgruppe vor, die dem Substrat eine erhöhte chemische Stabilität verleiht und nur schlecht von der Acetylsterase gespalten werden kann. Zunächst wurde untersucht, ob die aortalen Ringe der zwei verwendeten Mausstämmen (C57Bl6/J, Kortikoff eGFP) sich unter Stimulation unterschiedlich entwickeln würden. Dazu wurden von jeweils 3 Mäusen pro Mausstamm, insgesamt 16 Aortenringe pro Bedingung, mit den Carbacholkonzentrationen 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 500 nM und 100 nM stimuliert. Als Vergleichskontrollen dienten in jeder Versuchsreihe Ringe, die mit einem Medium, bestehend aus OPTI-MEM, Pen/Strep und mit und ohne FCS-Zugabe, stimuliert wurden. Außerdem wurden die mit Carbachol stimulierten Ringe mit den VEGF (30 ng/ml) -stimulierten Ringen verglichen. Die Länge und Anzahl der Primär- und Sekundäraussprossungen wurde nach der VEGF- und Carbacholstimulation, anhand der dokumentierten Fotos am Tag 5 und 7 (Abb. 9), mit dem Programm ImageJ gemessen und anschließend statistisch ausgewertet. Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigten sich Länge und Anzahl der Aussprossungen unter den gleichen Bedingungen bei beiden Mausstämmen sehr ähnlich (Abb. 10). Nach statistischer Auswertung konnte keine Signifikanz zwischen den beiden Mausstämmen unter gleichen Bedingungen festgestellt werden (Abb. 11, 12). Folglich konnten die Ergebnisse von den C57Bl6/J- und ChAT-eGFP-Mäusen hinsichtlich der Gesamtlänge der neu gebildeten Gefäße gemeinsam ausgewertet werden. Bei den Konzentrationen von 100 μ M und 10 μ M Carbachol kam es zu einer sehr geringen Aussprossung. Diese Konzentrationen zeigten sich als vergleichbar schlechte Angiogenesestimulatoren. Unter Stimulation mit Carbachol in einer Konzentration von 1 μ M- 100 nM kam es zu einer effektiven Ausbildung von neuen Primär- und Sekundäraussprossungen. Im Vergleich zu

den VEGF-stimulierten Ringen musste im Allgemeinen eine geringeren Gefäßbildung festgestellt werden (Abb.10).

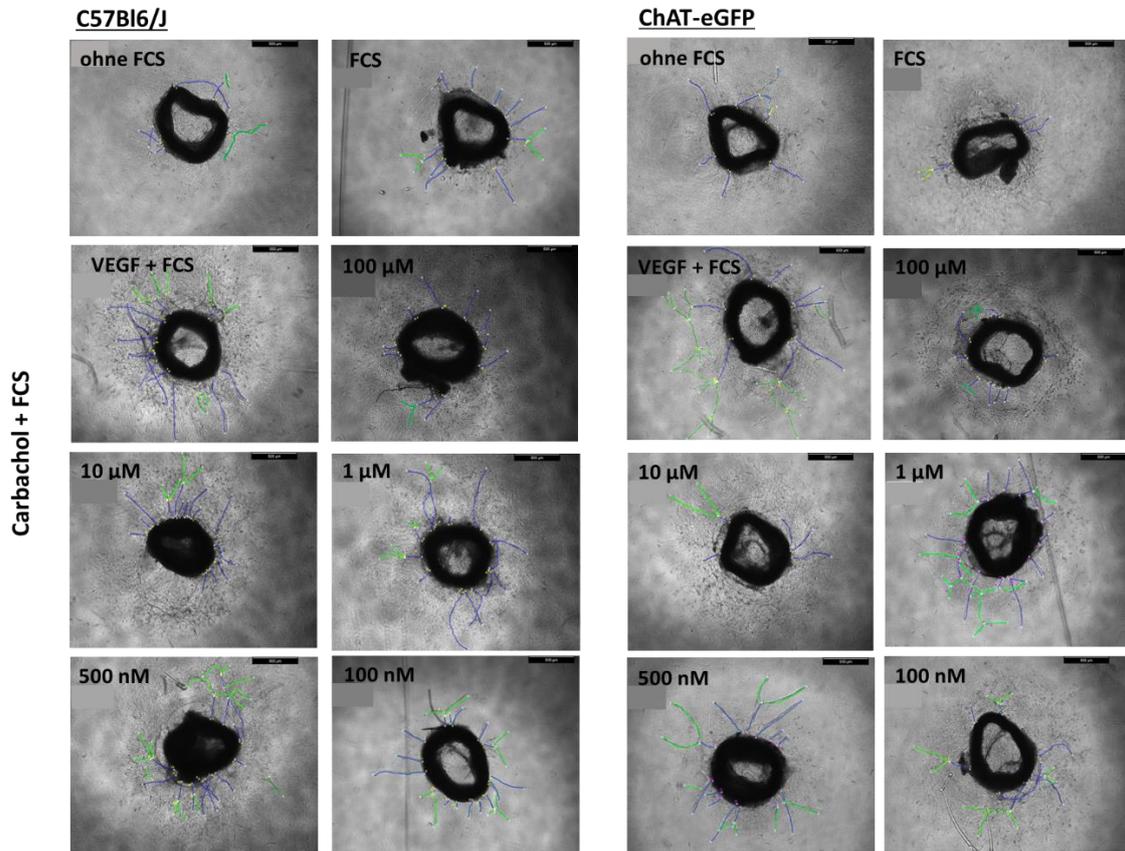


Abb. 10. Einfluss des ACh auf die Angiogenese bei C57Bl6/J- und ChAT-eGFP-Mäusen. Durchlichtmikroskopie. Carbachol wirkt als Angiogenese-stimulator. Blau dargestellt sind die Primäraussprossungen. Grün dargestellt die Sekundäraussprossungen. Maßstab: 500 μm.

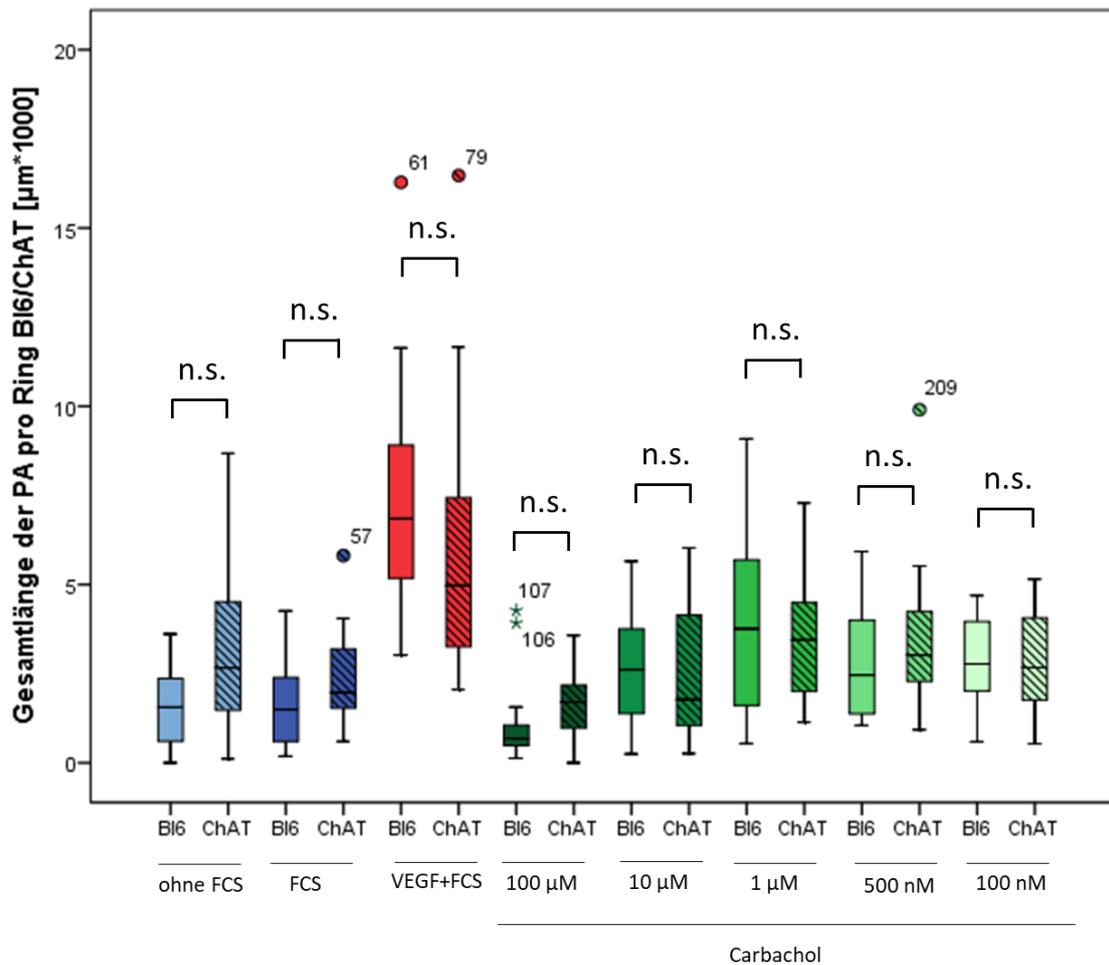


Abb. 11. Statistischer Vergleich der Länge der Primäraussprossungen (PA) von C57Bl6/7J und ChAT-eGFP unter verschiedenen Bedingungen. Es wurden 3 Mäuse und 16 Ringe ausgewertet. Es wurde die Gesamtlänge (Länge aller Primäraussprossungen) pro Ring angegeben. Die Länge der Primäraussprossungen beider Mausstämme ist jeweils unter den gleichen Bedingungen nicht signifikant. Nicht signifikant: n.s. = $p > 0,05$, * : $p \leq 0,05$ = signifikant, **: $p \leq 0,01$ sehr signifikant, ***: $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

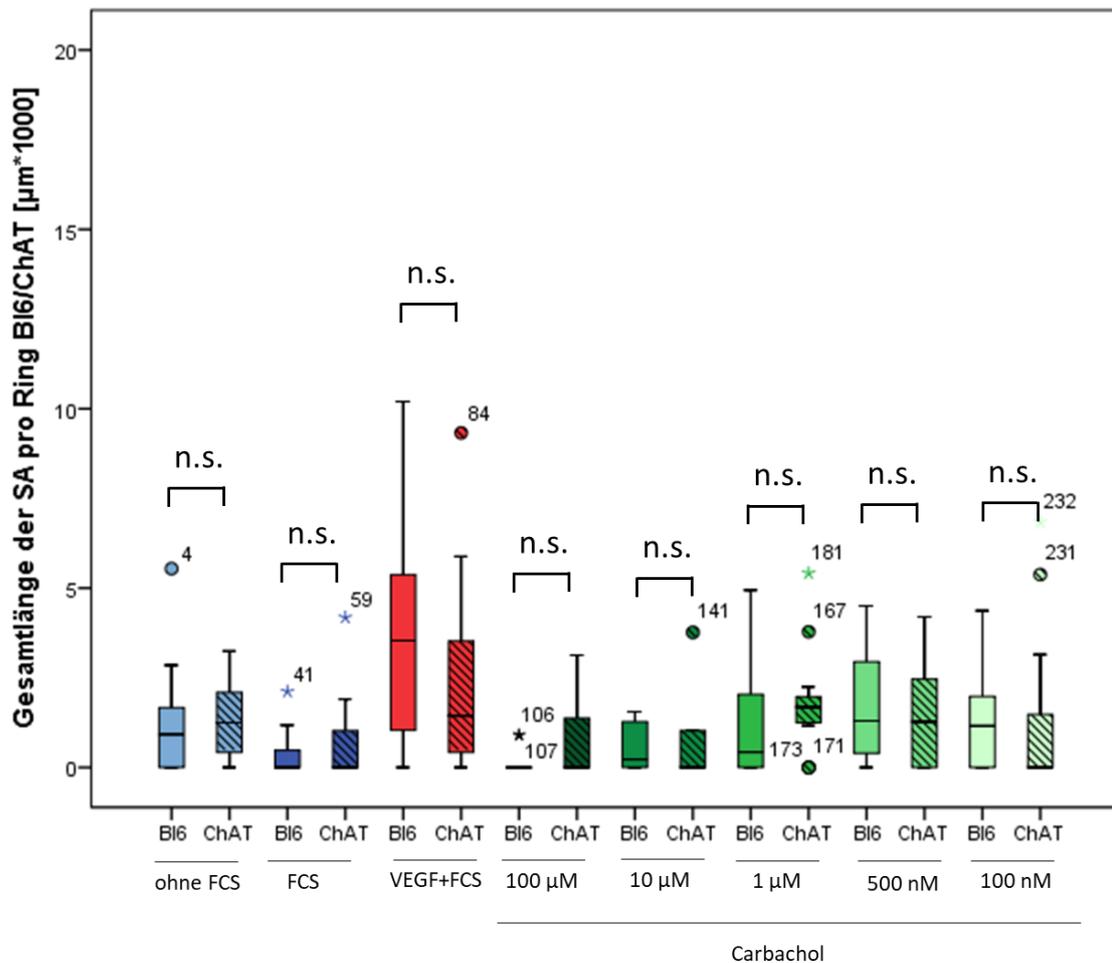


Abb. 12. Statistischer Vergleich der Länge der Sekundäraussprossungen (SA) von C57Bl6/7J und ChAT-eGFP unter verschiedenen Bedingungen. Es wurden 3 Mäuse und 16 Ringe ausgewertet. Es wurde die Gesamtlänge (Länge aller Sekundäraussprossungen) pro Ring angegeben. Die Länge der Sekundäraussprossungen beider Mausstämme ist jeweils unter den gleichen Bedingungen nicht signifikant. Nicht signifikant: n.s. = $p > 0,05$, * : $p \leq 0,05$ = signifikant, **: $p \leq 0,01$ sehr signifikant, ***: $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

3.2.3. Inhibitorversuch mit Lenvatinib

Um zu überprüfen, ob die cholinerge Wirkung auf die Aktivierung ähnlicher Mechanismen wie bei einer VEGF-Stimulation basiert, wurde ein Inhibitorversuch mit Lenvatinib durchgeführt. Die Aortenringe wurden zusätzlich zu VEGF und Carbachol mit Lenvatinib 1 μ M kultiviert. Diese Versuchsreihe dauerte 7 Tage und die Aussprossungen wurden täglich dokumentiert. Nach Tag 7 hatten sich bei einer Stimulation der Aortenringe mit VEGF oder Carbachol stabile neue Gefäße ausgebildet. Mit einer zusätzlichen Lenvatinib-Zugabe im Medium ließen sich nach Tag 7 nur einzelne neu ausgewanderte Zellen um den Aortenring erkennen. Weder bei VEGF noch bei Carbachol entwickelte sich einer Art der Gefäßausbildung (Abb. 13). Es ist daher anzunehmen, dass es zu ähnlichen Wirkmechanismen unter Acetylcholineinfluss wie bei der Stimulation mit VEGF über den VEGFR kommt.

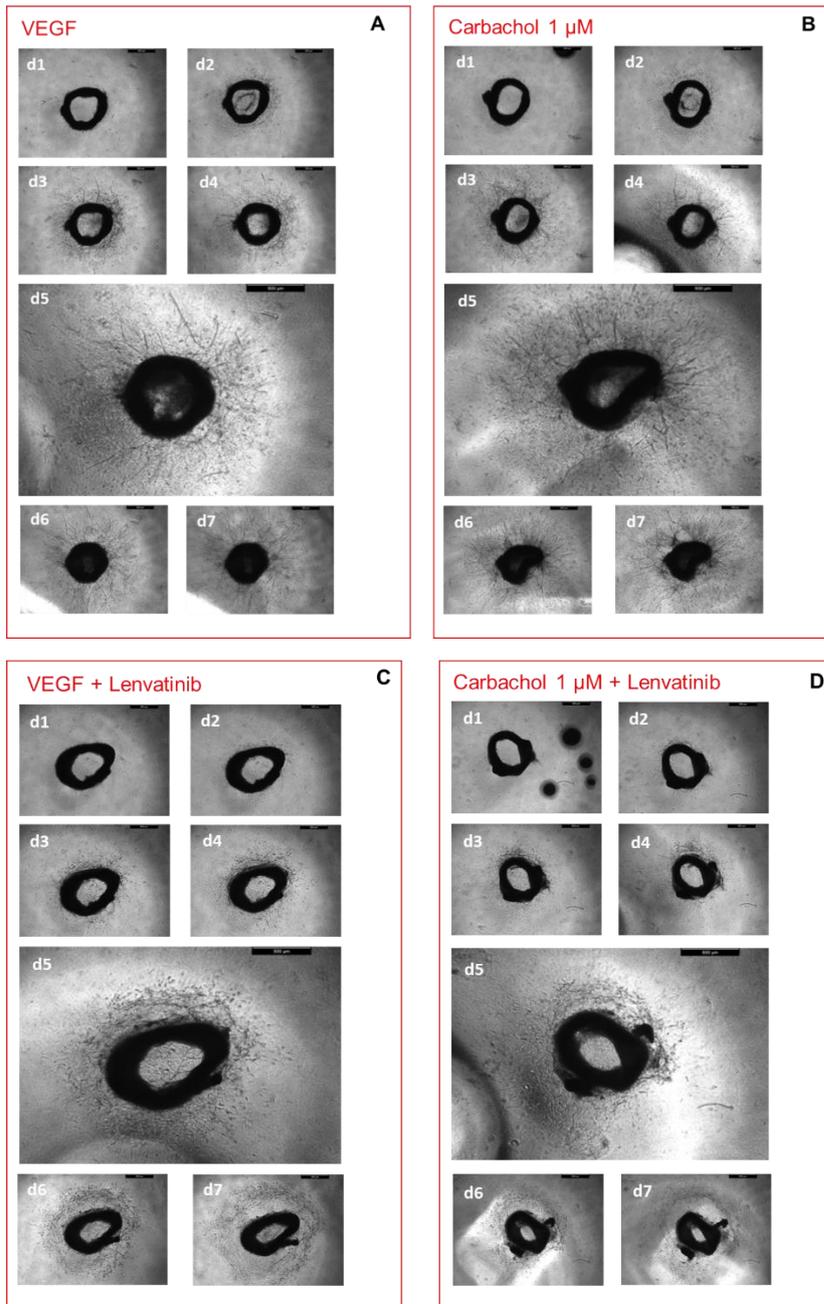


Abb. 13. Inhibition der Neugefäßbildung mit Lenvatinib (1 μ M). Durchlichtmikroskopie. d1-d7= Versuchstag 1 bis 7. Im Gegensatz zu den Kontrollen (A-B), kommt es unter dem Einsatz von Lenvatinib zu keiner Gefäßneubildung bei einer VEGF- (C) sowie einer Carbacholstimulation (D) der Aortenringe. Bis Tag 5 haben sich viele einzelne Zellen um den Aortenring gebildet. Diese verändern bis Versuchstag 7 ihre Lokalisation um den Ring und wandern nach außen. Maßstab: 500 μ m.

3.2.3. Inhibitorversuch mit Atropin und Mecamylamin

ACh wirkt über mAChR und den nAChR. Um festzustellen über welche Rezeptoren das ACh einen Einfluss auf die Angiogenese hat, wurde ein weiterer Inhibitorversuch durchgeführt. Diesmal wurde mit Atropin und Mecamylamin gearbeitet. Mecamylamin ist ein genereller Antagonist des nAChR, Atropin von mAChR. Mittels eines Aortenringassays wurden Aortenringe mit VEGF und Carbachol stimuliert. Jeweils die Hälfte der Ringe wurden zusätzlich mit Atropin $10\ \mu\text{M}$ und Mecamylamin $100\ \mu\text{M}$ behandelt. In den Ergebnissen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten und inhibierten Ringen. Auch stellte sich kein Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren Atropin und Mecamylamin dar (Abb. 14,15). Es konnte nicht bewiesen werden, über welchen Rezeptor nicht-neuronales ACh auf die Angiogenese Einfluss nimmt.

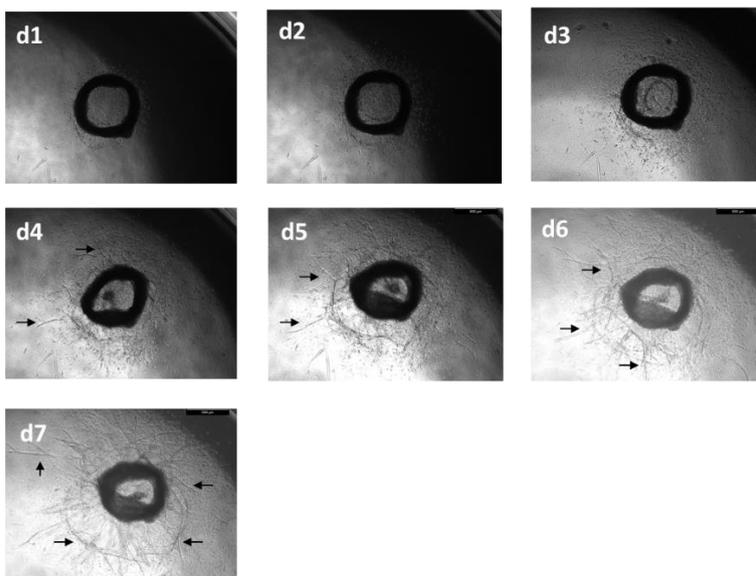


Abb. 14. Inhibition der Neugefäßbildung mit Atropin ($10\ \mu\text{M}$) bei einer Carbachol- und VEGF-Stimulation. Durchlichtmikroskopie. d1-d7: Versuchstag 1 bis 7. Die Aortenringe wurden mit VEGF ($30\ \text{ng/ml}$), Carbachol ($500\ \mu\text{M}$) und Atropin ($10\ \mu\text{M}$) 7 Tage lang stimuliert. Nach dem 2. Versuchstag kam es zur Bildung neuer Zellen die sich um den Aortenring gruppierten (d1, d2). Ab Versuchstag 4 bildeten sich trotz Inhibitorgabe neue Gefäße (d5-d7). Die Pfeile (\longrightarrow) stellen die neu gebildeten Gefäße dar. Maßstab: $500\ \mu\text{m}$.

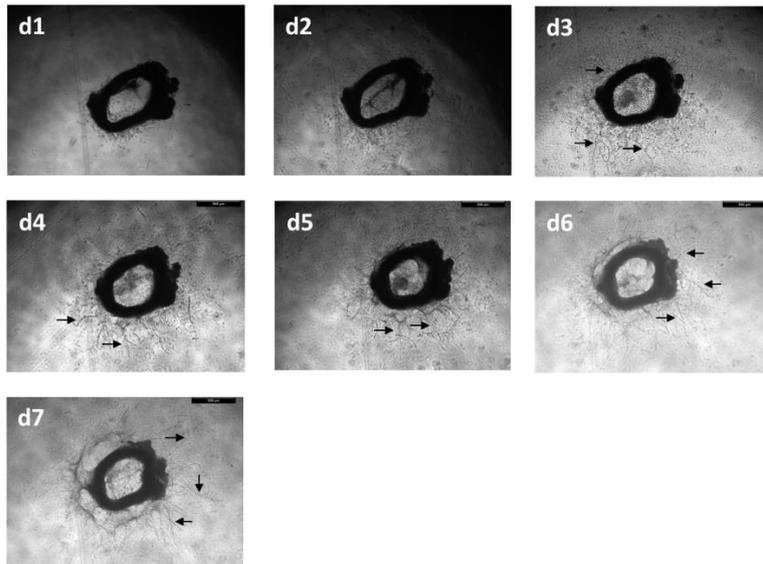


Abb. 15. Inhibition der Neugefäßbildung mit Mecamylamin (100 μM) bei Carbachol- und VEGF-Stimulation. Durchlichtmikroskopie. d1-d7: Versuchstag 1 bis 7. Die Aortenringe wurden mit VEGF (30 ng/ml), Carbachol (500 μM) und Mecamylamin (100 μM) 7 Tage lang stimuliert. Nach dem 2. Versuchstag kam es zur Bildung neuer Zellen die sich um den Aortenring gruppierten (d1, d2). An den folgenden Versuchstagen bildeten sich trotz Inhibitorgabe neue Gefäße (d3-d7). Die Pfeile (\longrightarrow) stellen die neu gebildeten Gefäße dar. Maßstab: 500 μm .

3.2.4 Gesamtlänge der Primär- und Sekundäraussprossungen am Tag 5

Es wurde die Gesamtlänge der primären und sekundären Aussprossungen am Versuchstag 5 unter den verschiedenen Bedingungen untersucht. Im Allgemeinen zeigte sich Carbachol weniger potent als VEGF. Als Vergleichskontrollen dienten Ringe, die mit einem Medium ohne Zugabe von VEGF oder Carbachol versehen wurden. Sie unterschieden sich nicht in der Art der Gefäßbildung. Aufgrund des Collagens in dem die Ringe eingebettet wurden, welches allein schon als Wachstumsstimulanz wirkt, entstanden wenige kleine neue Gefäße. Bei der Gesamtlänge der Primäraussprossungen unterschieden sich 100 und 10 μM Carbachol nicht von den Vergleichskontrollen. Diese beiden Konzentrationen wirkten nicht stimulierend auf die Angiogenese. Die mit VEGF stimulierten Ringe zeigten die längsten primären und sekundären

Aussprossungen und waren auch gegenüber allen anderen Bedingungen signifikant länger. Am potentesten bei beiden Arten von Aussprossungen ergab sich die Stimulation der Aortenringe mit einer Carbacholkonzentration von 1 μM (Abb. 16,17). Bei den Sekundäraussprossungen unterschieden sich die Carbacholkonzentrationen 1 μM , 500 nM und 100 nM nicht stark voneinander (Abb. 17). Der Längenvergleich der primären, direkt aus der Aorta aussprossenden Gefäße, mit den sekundären, aus den Primäraussprossungen abgehenden Gefäßen, zeigte, dass die Primäraussprossungen bei allen Bedingungen signifikant länger waren als die sekundären (Abb. 18).

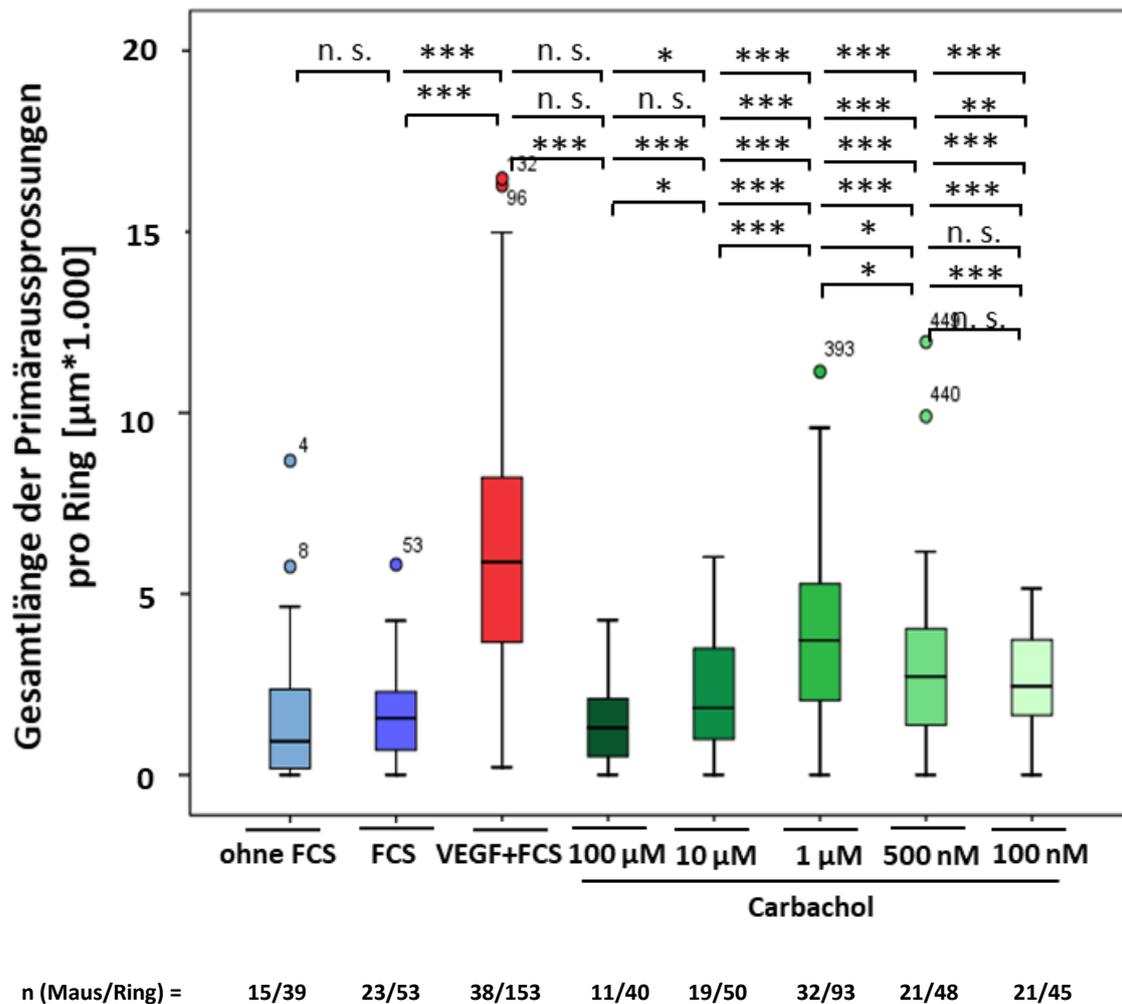


Abb. 16. Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der Primäraussprossungen nach einer Stimulation mit VEGF und Carbachol.

Es wurde die Gesamtlänge (Länge aller Primäraussprossungen) angegeben.

Die Kontrollen ohne Stimulation (ohne FCS, FCS) sind, außer zu Carbachol 100 µM, gegenüber allen Bedingungen signifikant kürzer gewachsen. Auch 10 µM Carbachol wirkt ähnlich schwach auf die Angiogenese. Die VEGF-stimulierten Ringe bildeten die längsten primären Aussprossungen aus und sind gegenüber allen anderen Bedingungen hoch signifikant. Carbachol mit einer Konzentration von 1 µM zeigte den stärksten Effekt verglichen mit den anderen Carbacholkonzentrationen. Nicht signifikant: n.s. = $p > 0,05$, * : $p \leq 0,05$ = signifikant, **: $p \leq 0,01$ sehr signifikant, ***: $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

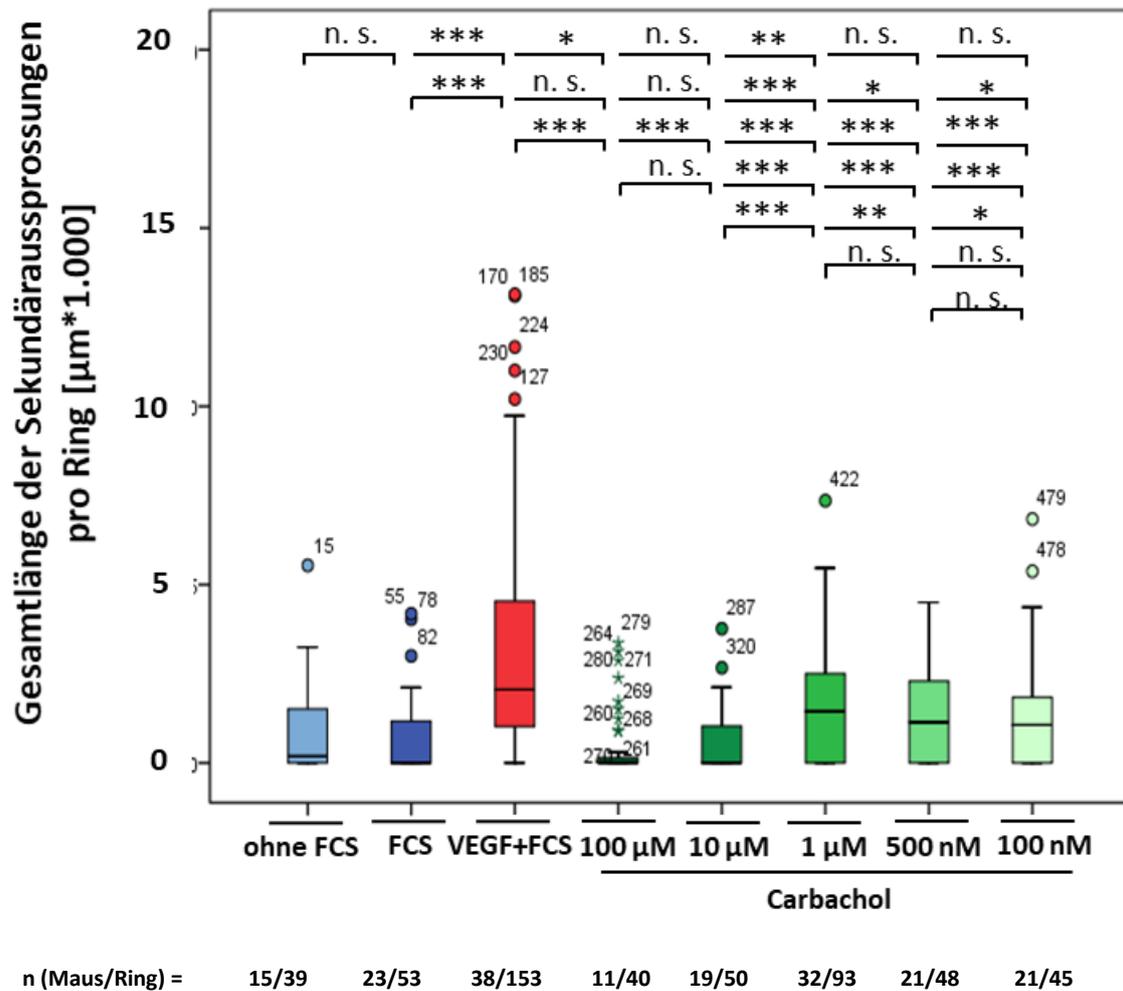


Abb. 17. Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der Sekundäraussprossungen nach einer Stimulation mit VEGF und Carbachol.

Es wurde die Gesamtlänge (Länge aller Sekundäraussprossungen) angegeben. Die Kontrolle ohne FCS ist gegenüber 10 µM, 500 nM und 100 nM Carbachol nicht signifikant. Die Kontrolle mit FCS ist gegenüber 100 µM und 10 µM Carbachol nicht signifikant. Die VEGF-stimulierten Ringe bildeten die längsten sekundären Gefäße aus und sind gegenüber allen anderen Bedingungen signifikant. Carbachol mit einer Konzentration von 1µM zeigte den stärksten Effekt verglichen mit den anderen Carbacholkonzentrationen. Nicht signifikant: n.s. = $p > 0,05$, * : $p \leq 0,05$ = signifikant, ** : $p \leq 0,01$ sehr signifikant, *** : $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

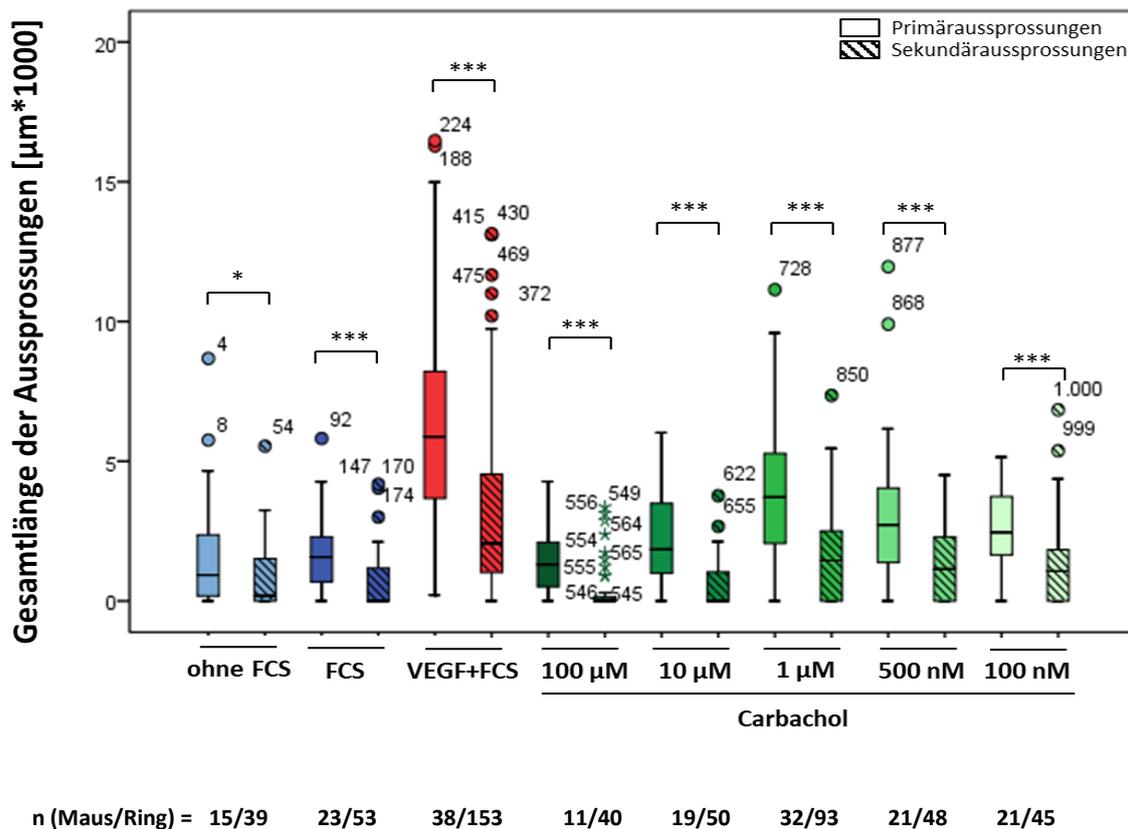


Abb. 18. Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der primären und sekundären Aussprossungen am Tag 5 unter Kontrollbedingungen und nach Carbacholstimulation. Es wurde die Gesamtlänge (Länge aller Primäraussprossungen) angegeben. Die primären Aussprossungen sind bei allen Bedingungen signifikant länger als die sekundären. Nicht signifikant: n.s. = $p > 0,05$, * : $p \leq 0,05$ = signifikant, ** : $p \leq 0,01$ sehr signifikant, ***: $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

3.2.5. Entwicklung der Aussprossungen nach Versuchstag 5

Um zu untersuchen, wie sich die neu gebildeten Gefäße weiter entwickeln würden, wurde in den Versuchsablauf ein zusätzlicher Medienwechsel eingeführt. Dieser Versuch wurde bis Tag 11 fortgesetzt. Am Versuchstag 7 war bei VEGF und bei den Carbacholkonzentrationen 1 µM, 500 nM und 100 nM ein großes stabiles Gefäß kreisförmig um den Aortenring zu erkennen. Von diesem gingen nun die Sekundärgefäße ab. Ringe die mit einem Medium ohne FCS

behandelt wurden, bildeten am Tag 7 kein ringförmiges stabiles Gefäß aus. Es ließen sich einzelne Zellen und einige wenige tubuläre Strukturen erkennen. Mit einem Medium mit FCS formierte sich ein weitaus kleineres neues Gefäß kreisförmig um den Aortenring. Auch bildeten sich weniger neue Zellen und neue Gefäße (Abb. 19). Möglicherweise beruht die Bildung der einzelnen Zellen und Gefäße auf die stimulierende Wirkung des Collagens auf die Aortenringe. Bei den Carbacholkonzentrationen 100 μM und 10 μM kam es am Tag 7 zu einer geringeren Gefäßbildung als bei den anderen Carbacholkonzentrationen (Abb. 19). Am Versuchstag 11 breiteten sich bei allen Bedingungen die neu gebildeten Zellen und Gefäße bis zum Rand des Wells der Kultivierungsplatte aus, sodass sich eine Auswertung zu diesem Zeitpunkt als nicht mehr möglich herausstellte (Abb. 20). Um einen realistischen Vergleich erhalten zu können, wurden die Versuche an Tag 5 und 7 ausgewertet. In der statistischen Auswertung fiel auf, dass sich zwischen Tag 5 und Tag 7 bei keiner Konzentrationen außer bei FCS und 10 μM Carbachol eine Signifikanz bezüglich der Länge der Primäraussprossungen finden ließ (Abb. 21). Da es sich an diesen beiden Versuchstagen um eine morphologisch andere Formation der tubulären Strukturen handelte, sind sie nicht miteinander vergleichbar. Die Sekundärgefäße wurden bei FCS, VEGF, Carbachol 10 μM und 1 μM signifikant länger (Abb. 22). Am Tag 5 gingen die primären Aussprossungen direkt aus dem Aortenring hervor und zweigten sich dann in der Peripherie in die Sekundärgefäße auf. Am Versuchstag 7 wurde eine ringförmige Einzelgefäßbildung um den Aortenring erkannt, von dem die sekundären Gefäße ausgingen (Abb. 19).

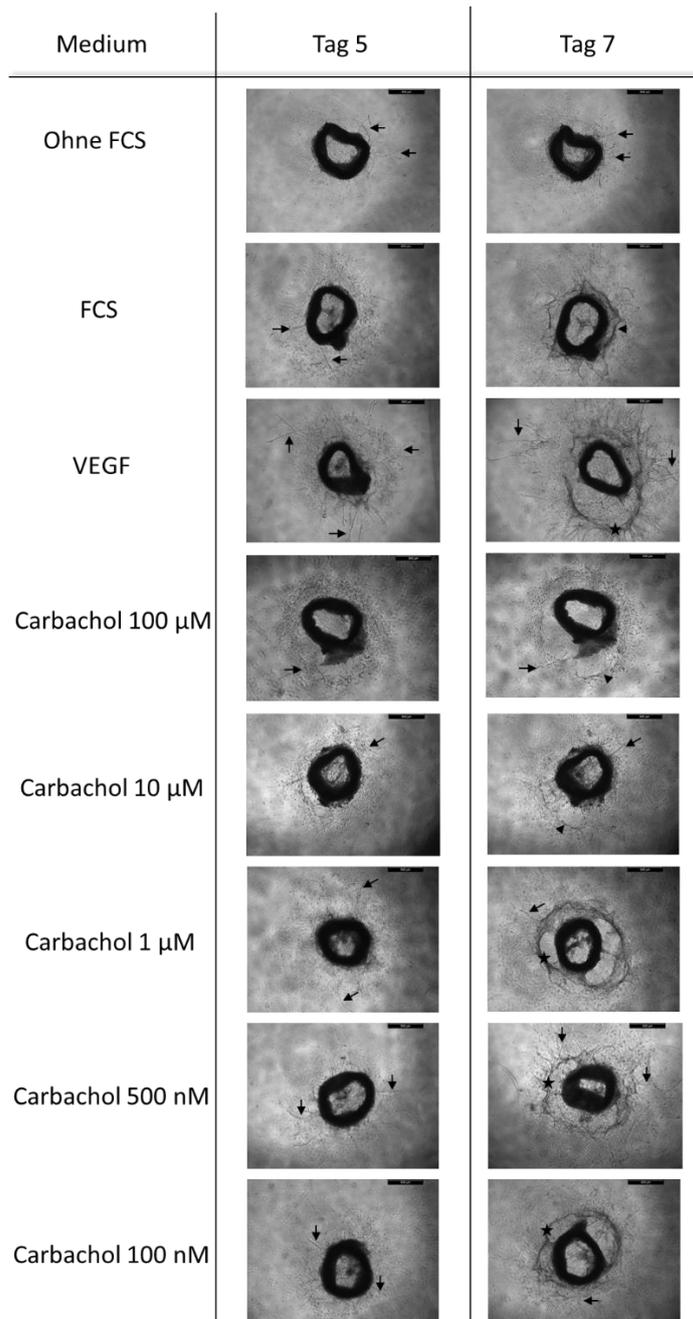
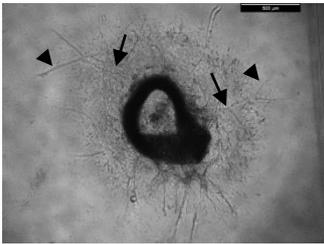
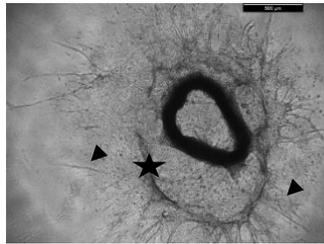


Abb. 19. Repräsentative Darstellung der Gefäßaussprossungen am Tag 5 und Tag 7. Aortenringassay. Durchlichtmikroskopie. Ohne Zugabe von FCS, Tag 5 und 7: Bildung von Zellen und kleinen Gefäßen (→), keine Ringgefäßbildung. FCS, Tag 5: wenige kleine neue Gefäße (→), Tag 7: kleine Ringgefäßbildung (▶). Carbachol 100 µM, 10 µM: Tag 5: wenige kleine neue Gefäße (→), Tag 7: kaum Ringgefäßbildung (▶). VEGF, Carbachol 1 µM- 100 nM, Tag 5: stabile Gefäße (→), Tag 7: stabile Ringgefäßbildung (★).

Tag 5



Tag 7



Tag 11

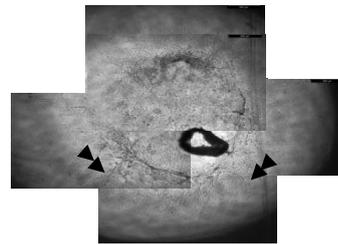


Abb. 20. Repräsentative Darstellung der Gefäßaussprossungen am Tag 5, 7 und am Tag 11. Aortenringassay. Durchlichtmikroskopie. Tag 5: primäre Aussprossung direkt aus dem Aortenring (→), sekundäre Gefäße gehen aus den primären hervor (▶). Tag 7: ringförmiges stabiles Gefäß bildet sich um Aortenring (★), sekundäre Gefäße gehen daraus ab (▶). Tag 11: Zellen und Gefäße bis an den Rand des Wells (▶▶). Maßstab: 500 μ m.

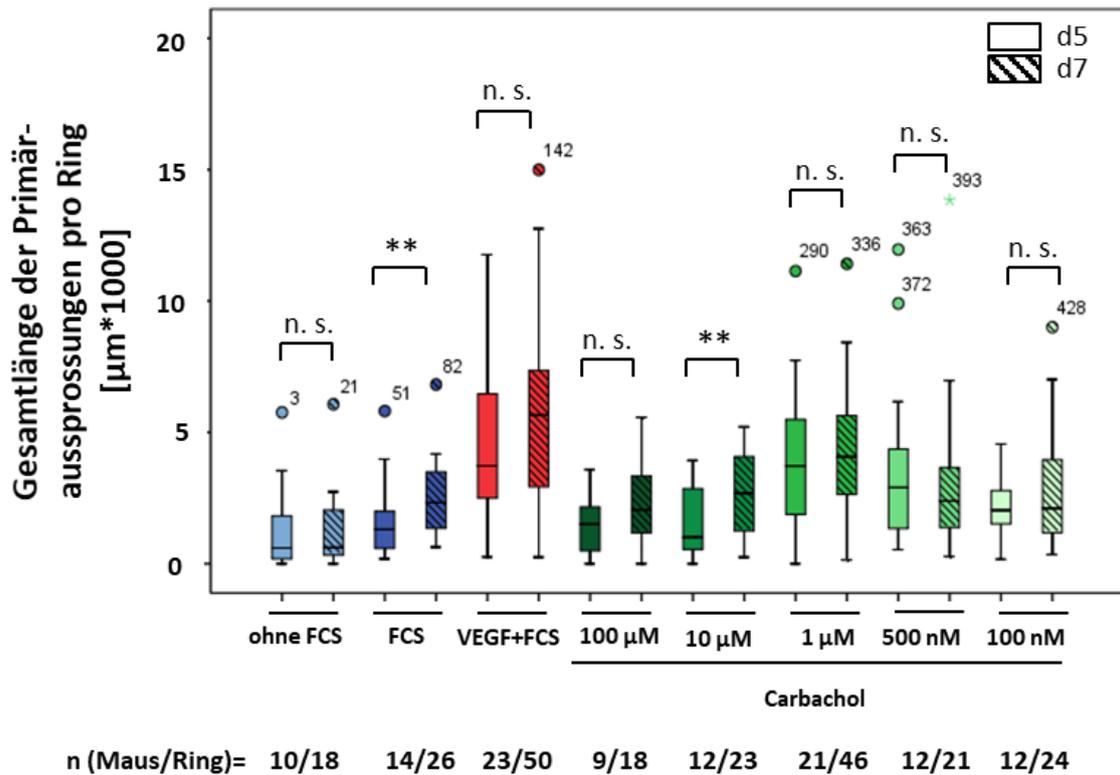


Abb. 21. Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der primären Aussprossung am Tag 5 und Tag 7. Es wurde die Gesamtlänge (Länge aller Primäraussprossungen) angegeben. Bei allen Bedingungen, außer nach einer Zugabe von FCS und 10 µM Carbachol, zeigte sich keine Signifikanz zwischen Tag 5 und Tag 7. Nicht signifikant: n.s. = $p > 0,05$, * : $p \leq 0,05$ = signifikant, **: $p \leq 0,01$ sehr signifikant, ***: $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

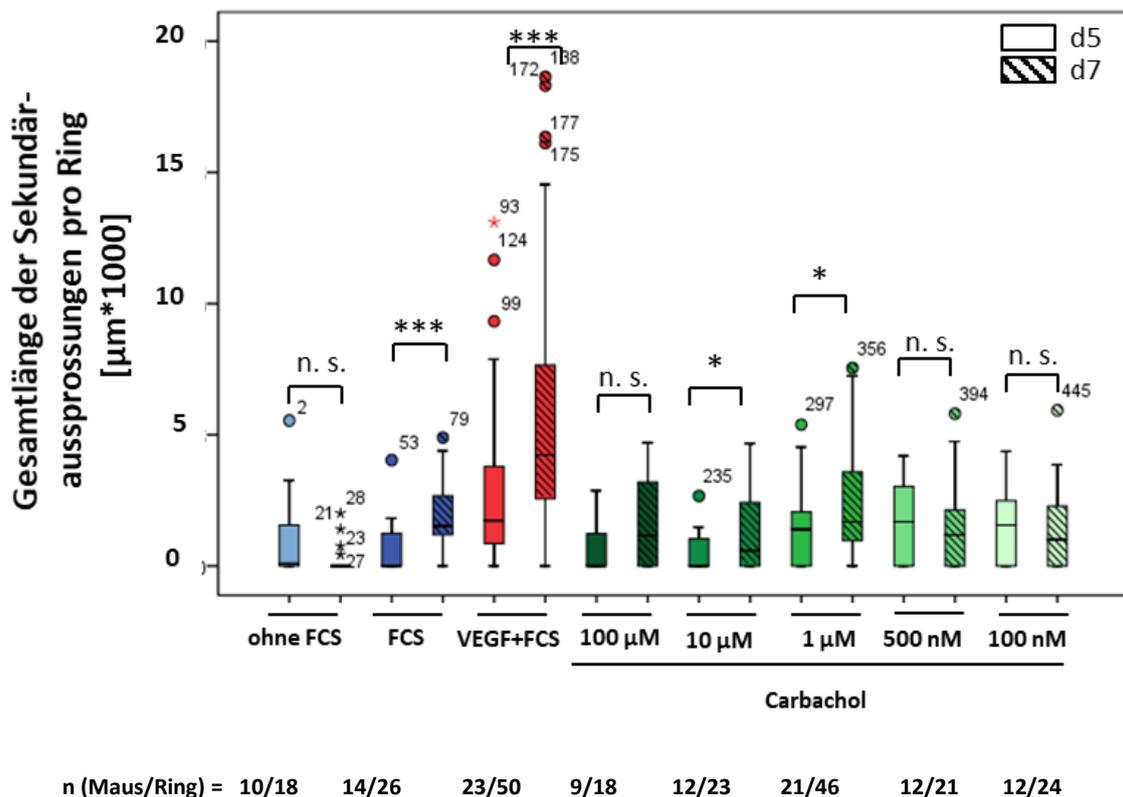


Abb. 22. Statistischer Vergleich der Gesamtlänge der sekundären Aussprossung am Tag 5 und Tag 7. Es wurde die Gesamtlänge (Länge aller Primäraussprossungen) angegeben. Eine Zugabe von FCS, VEGF, 10 µM und 1 µM Carbachol führte zur Ausbildung von längeren sekundären Gefäßen am Tag 7 im Vergleich zum Tag 5. Nicht signifikant: n.s. = $p > 0,05$, * : $p \leq 0,05$ = signifikant, **: $p \leq 0,01$ sehr signifikant, ***: $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

3.3. Immunhistochemische Analyse der Aortenringe

3.3.1. Zelltyp der ChAT-positiven Zellen beim VEGF-Modell

Die immunhistologischen Untersuchungen der stimulierten Aortenringe sollten zum einen die Lokalisation der ChAT-Zellen während der Ausbildung eines neuen Gefäßes aufzeigen und zum anderen die Identifikation von ihrem Zelltyp ermöglichen. Als Endothelzellenmarker wurde CD 31 und Lectin, als Glattmuskelzellmarker α -SMA, als Fibroblastenmarker α -Vimentin und als Perizytenmarker Desmin und NG2 verwendet. Die verschiedenen Zelltypen, die an der Angiogenese beteiligt sind, wurden zunächst auf VEGF-stimulierten

Aortenringen angefärbt. CD31-positiv markierte Endothelzellen waren in der gesamten Länge des neu gebildeten Gefäßes zu finden (Abb. 23). Auch die Glattmuskelzellen befanden sich auf der gesamten Länge (Abb. 24). Sie schienen das Gefäß wie von außen zu umhüllen. NG2 und Desmin positiv angefärbte Perizyten lagern sich während der Aussprossung von außen an das Gefäß an (Abb. 25, 26).

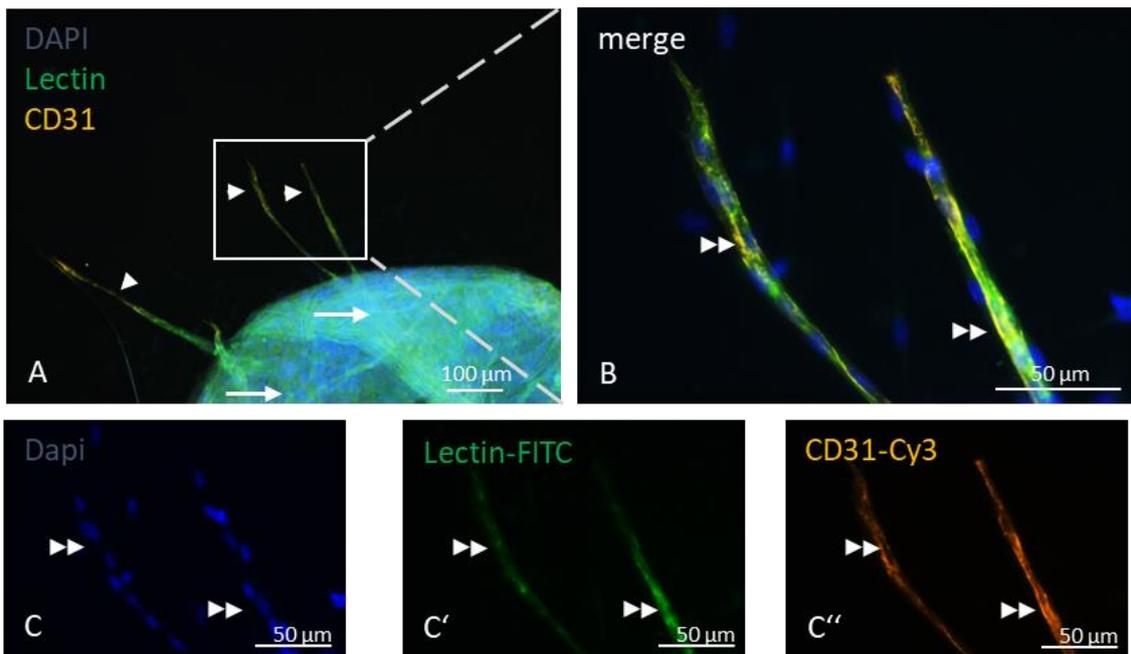


Abb. 23. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Endothelzellmarker CD-31. Repräsentative Darstellung. A: primäre (\rightarrow) und sekundäre (\blacktriangleright) Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für die Endothelzellmarker CD31 (orange) und Lectin (grün) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. \blacktriangleright : Lectin und CD31-Lokalisation überlappen (B). Maßstab: A: 100 μm , B-C'': 50 μm .

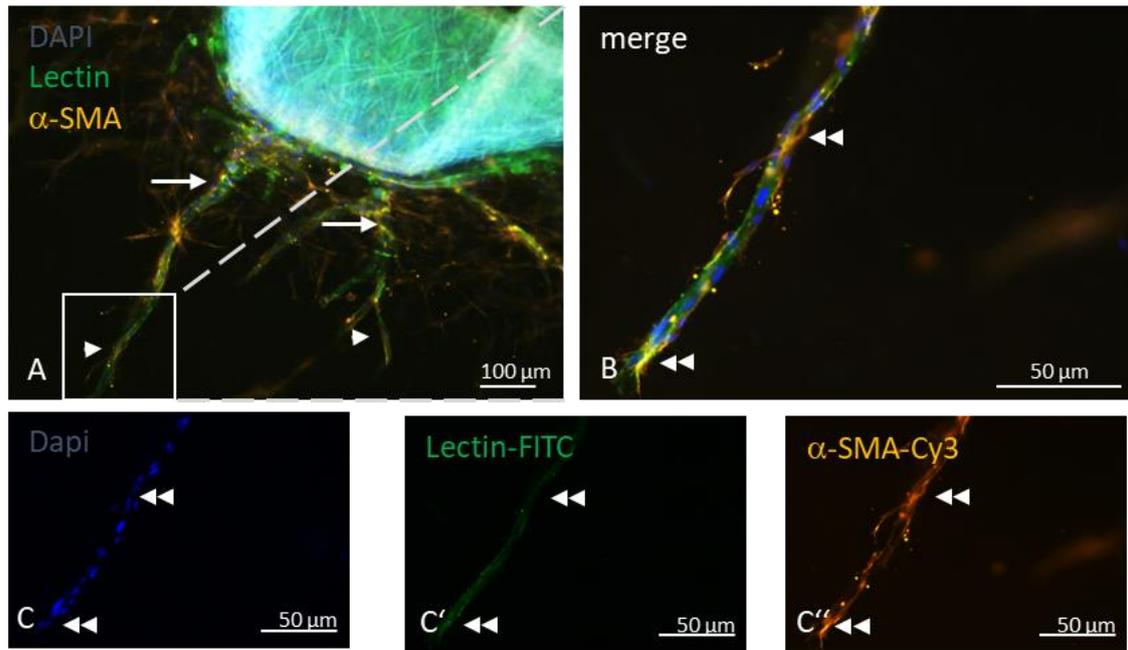


Abb. 24. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Glattmuskelzellmarker α -SMA. Repräsentative Darstellung. A: primäre (\rightarrow) und sekundäre (\blacktriangleright) Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den Glattmuskelzellmarker α -SMA (orange) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. \blacktriangleright : α -SMA - Lokalisation. α -SMA- positive Zellen liegen den Lectin-positiven Zellen an. Maßstab: A: 100 μ m, B-C'': 50 μ m.

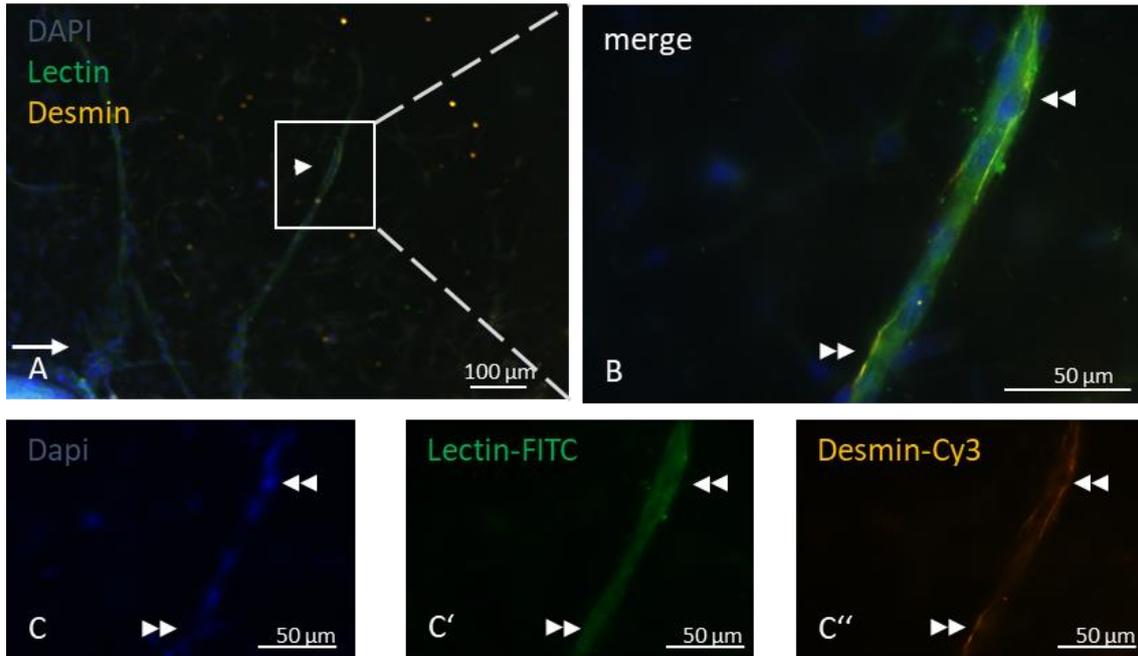


Abb. 25. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker Desmin. Repräsentative Darstellung. A: primäre (→) und sekundäre (▶) Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den Perizytenmarker Desmin (orange) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶▶ : Desmin positive Zellen (B). Maßstab: A: 100 μm, B-C'': 50 μm.

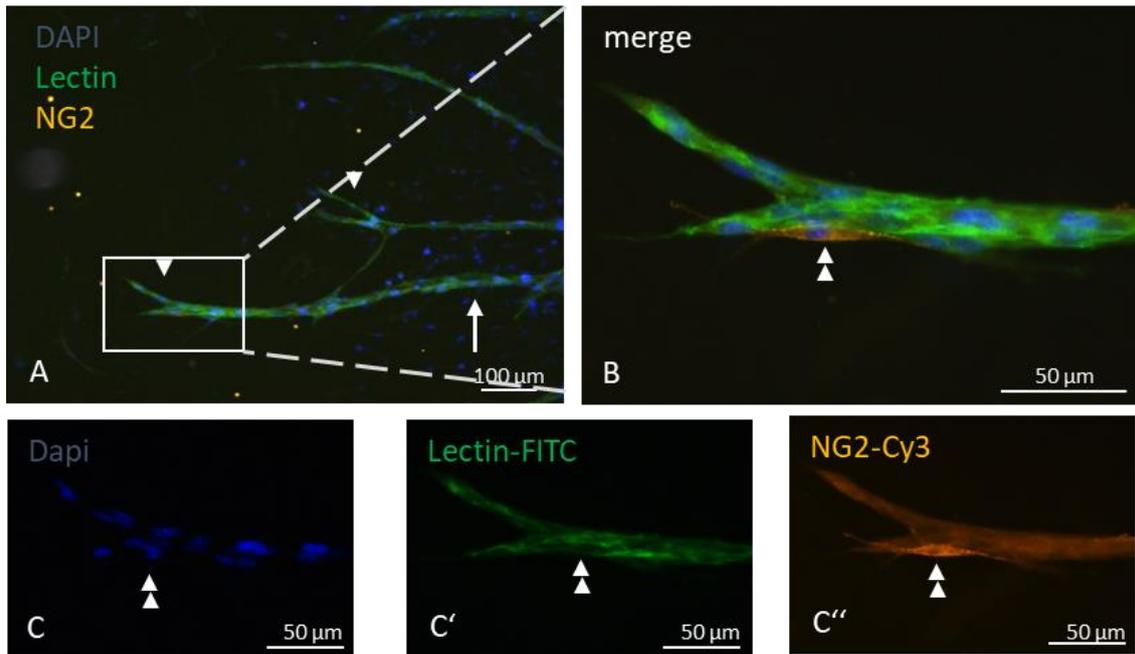


Abb. 26. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker NG2. Repräsentative Darstellung. A: primäre (→) und sekundäre (▶) Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den Perizytenmarker NG2 (orange) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶▶ : NG2- positive Zellen (B). Maßstab: A: 100 μm, B-C'': 50 μm.

In weiteren Versuchen sollte die Lokalisation von ChAT-positiven Zellen während der Angiogenese untersucht werden. Dafür wurden die ausgesprossenen Ringe mit dem ChAT-Antikörper angefärbt. Es ließen sich einzelne positive Zellen entlang des neu gebildeten Gefäßes ausmachen (Abb. 27). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ACh-synthetisierende Zellen eine gewisse Rolle bei der Angiogenese spielen könnten, die es weiter zu untersuchen galt.

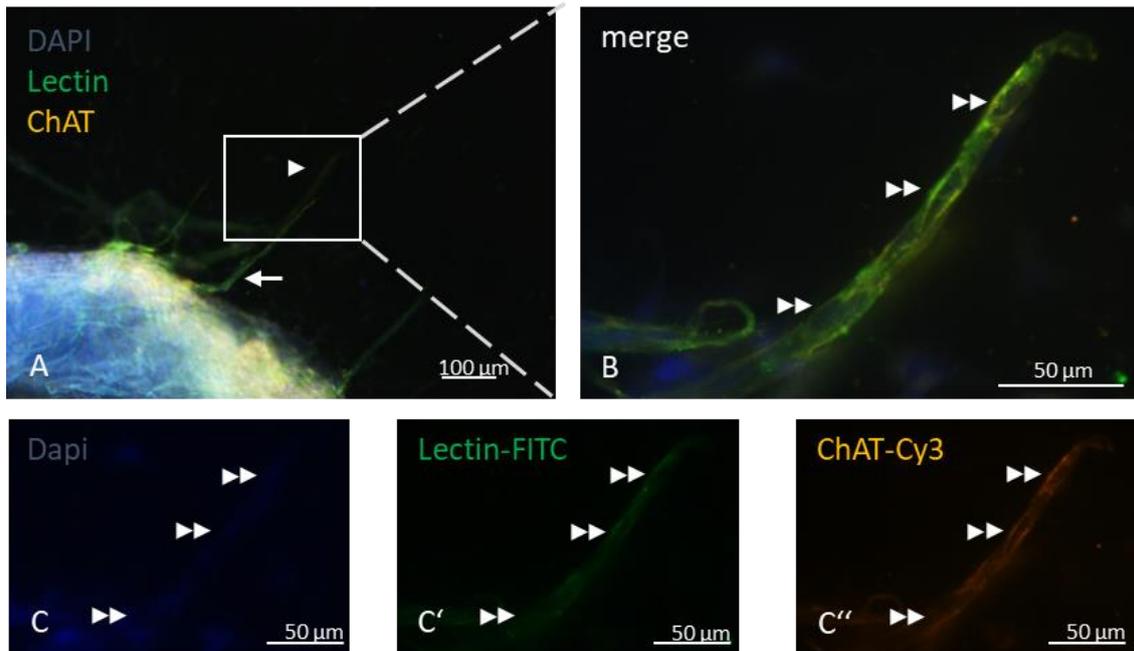


Abb. 27. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. ChAT-Marker. Repräsentative Darstellung. A: primäre (→) und sekundäre (▶) Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den ChAT-Zellen-Marker ChAT (orange) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶▶ : ChAT- positive Zellen (B). Maßstab: A: 100 μm , B-C'': 50 μm .

Um die Fragestellung zu klären, um welchen Zelltypen es sich bei den an der Angiogenese beteiligten ChAT-positiven Zellen handelte, wurden nun immunhistologische Färbungen mit Aortenringen aus ChAT-eGFP-Mäusen und verschiedenen Zelltypmarkern durchgeführt. Zunächst wurden als Kontrollen neu ausgesprossene Aortenringe einer ChAT-eGFP-Maus mit einem ChAT Antikörper angefärbt. Die grün-fluoreszierenden ChAT-Zellen waren auch für den ChAT-Antikörper positiv (Abb. 28, 29). Bei Doppelfärbungen mit CD31 und α -SMA war deutlich zu erkennen, dass es sich bei den ChAT-Zellen weder um Endothelzellen noch um Glattmuskelzellen handelte (Abb. 30, 31). Auch nach den Färbungen mit α -Vimentin, einen Marker für Fibroblasten, ließ sich mit Gewissheit sagen, dass die ACh-synthetisierenden Zellen nicht diesem Zelltyp entsprachen. Die Fibroblasten waren in der Peripherie des Aortenrings lokalisiert

und hatten keinen Kontakt zu den sich bildenden oder ausgebildeten neuen Gefäßen (Abb. 32).

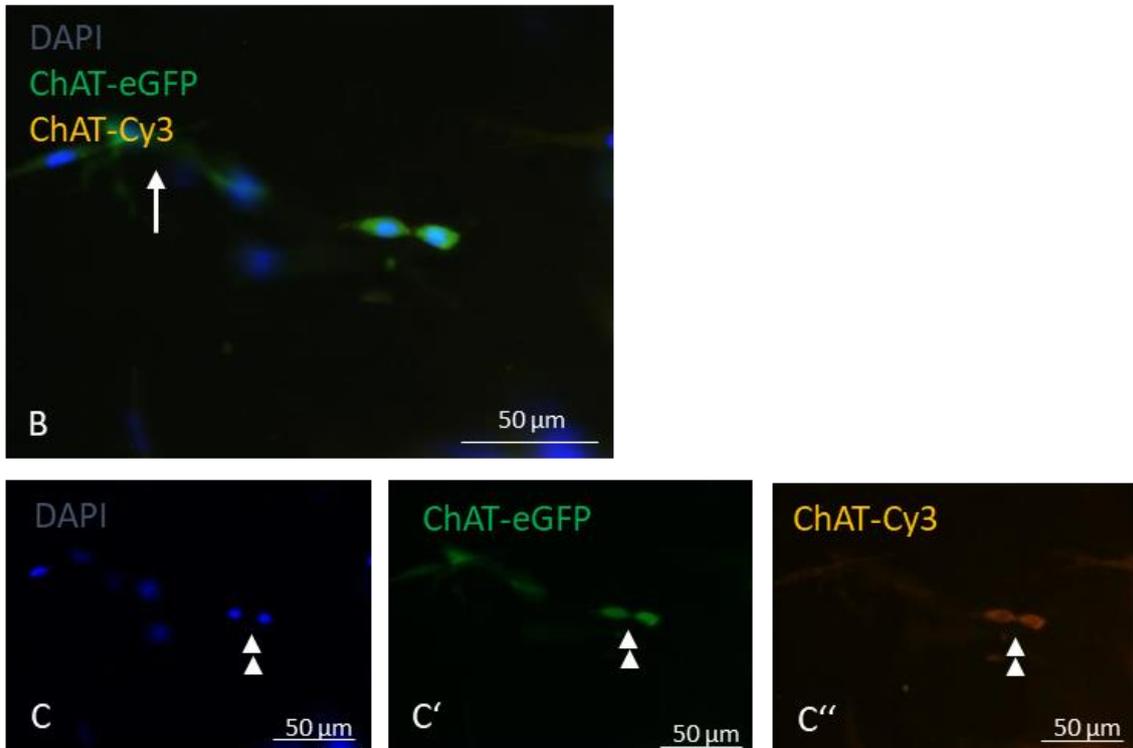


Abb. 28. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. ChAT-Marker. Repräsentative Darstellung. B: Aussprossungen (→) enthalten Zellen, die positiv für den ChAT-Zellen-Marker ChAT (orange) und ChAT-eGFP (grün) sind. **B:** Overlay von C-C''. **C-C'':** Einzelkanaldarstellung. ▶▶ : ChAT- positive Zellen (B). Maßstab: B-C'': 50 µm.

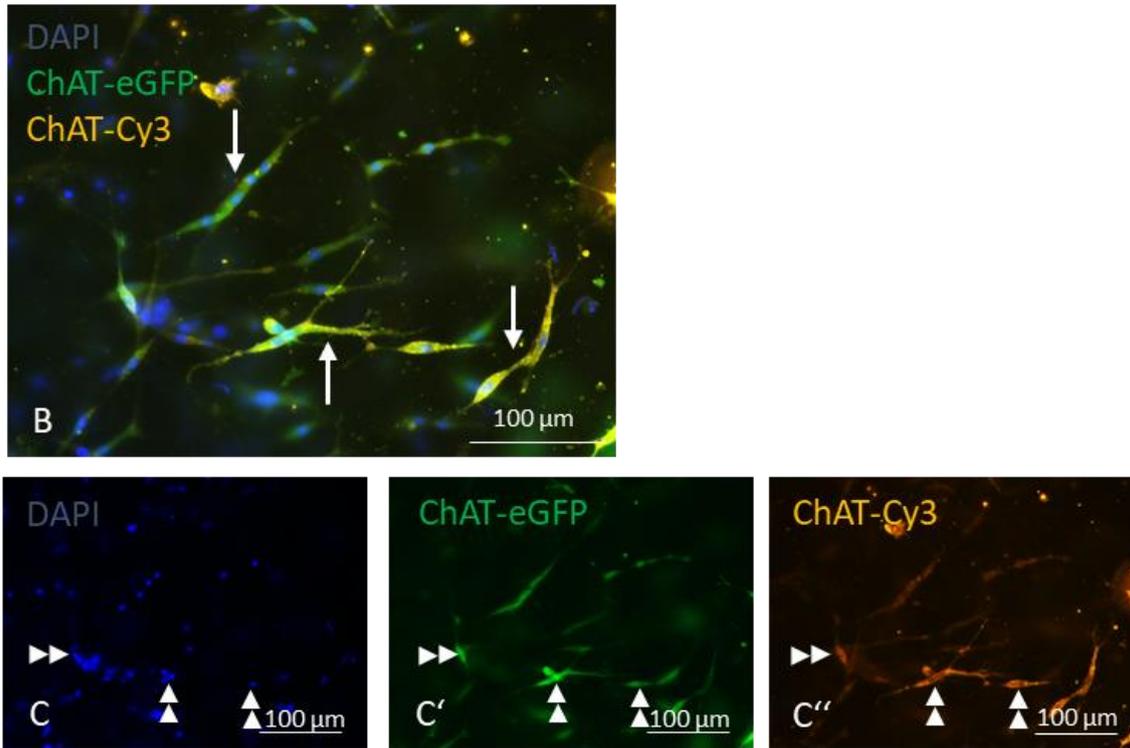


Abb. 29. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. ChAT-Marker. Repräsentative Darstellung. B: Aussprossungen (→) enthalten Zellen, die positiv für den ChAT-Zellen-Marker ChAT (orange) und ChAT-eGFP (grün) sind. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶▶ : ChAT- positive Zellen (B). Maßstab: B-C'': 100 μm.

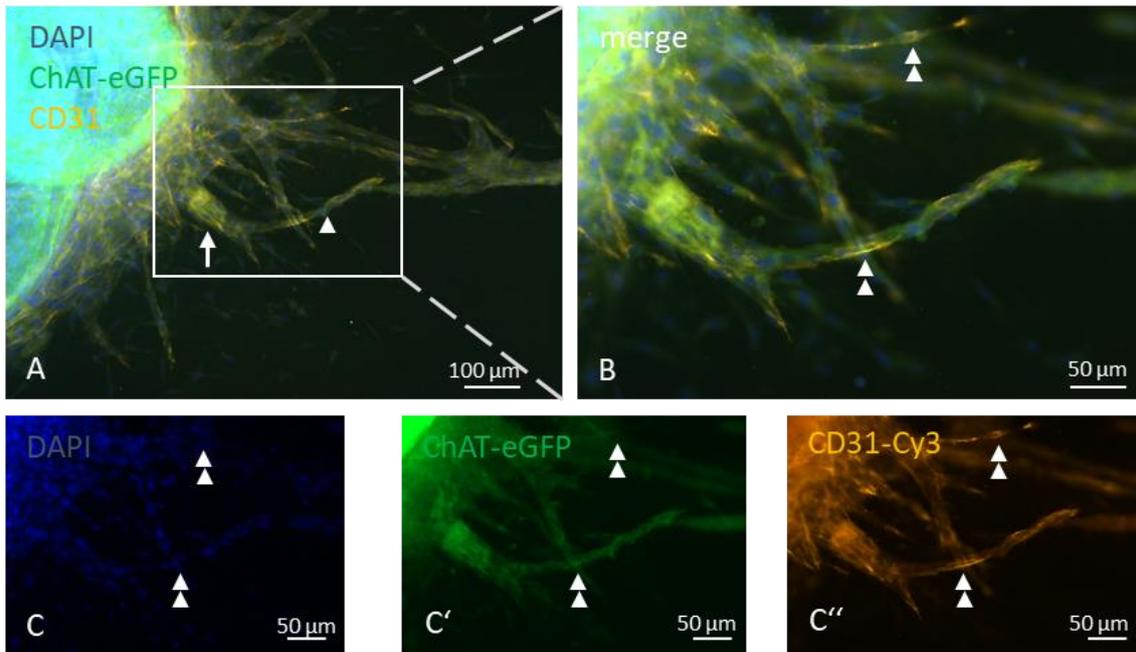


Abb. 30. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Endothelzellmarker CD-31. Repräsentative Darstellung. A: primäre (→) und sekundäre (▶) Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für die Endothelzellmarker CD31 (orange) und nicht positiv für ChAT-eGFP (grün) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶ : CD31-Lokalisation (B). Maßstab: A: 100 μm , B-C'': 50 μm .

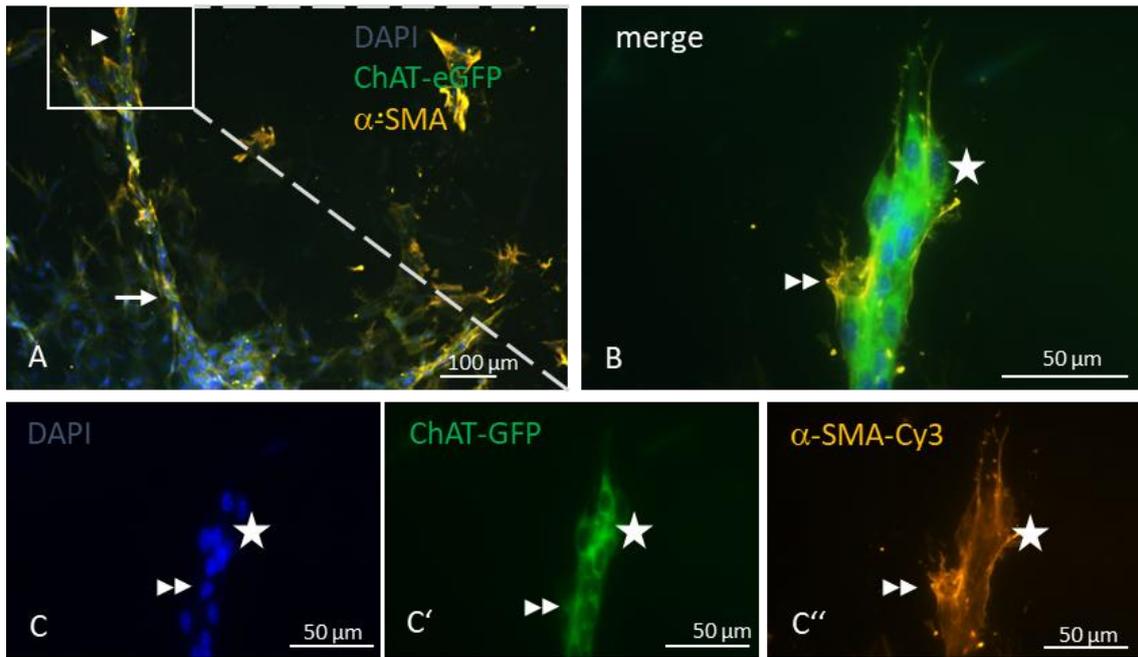


Abb. 31. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Glattmuskelzellmarker α -SMA. Repräsentative Darstellung. A: primäre (\rightarrow) und sekundäre (\blacktriangleright) Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den Glattmuskelzellmarker α -SMA (orange) und nicht positiv für ChAT-eGFP (grün) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. \blacktriangleright : Glattmuskelzell-Lokalisation. \star : ChAT-Lokalisation (B). Maßstab: A: 100 μ m, B-C'': 50 μ m.

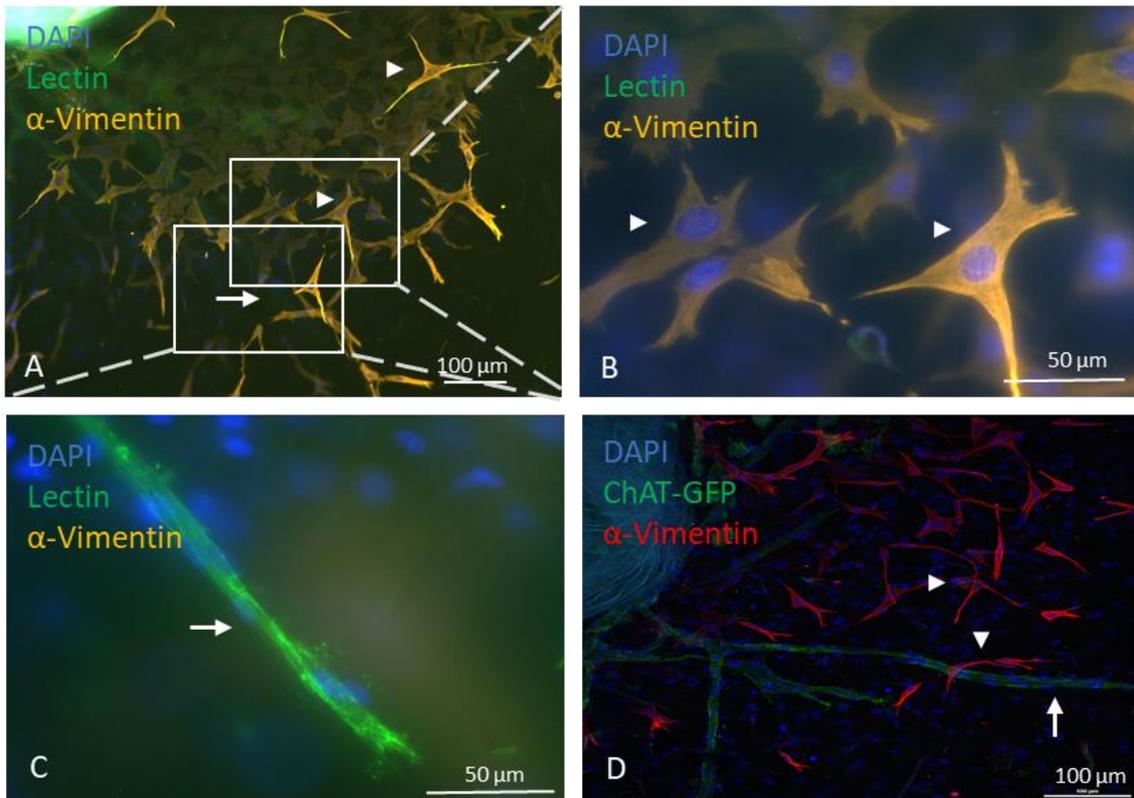


Abb. 32. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Fibroblastenmarker α -Vimentin. Repräsentative Darstellung. A-C: C57/Bl6-Mäuse. D: ChAT-Mäuse. B+ C: vergrößerter Ausschnitt aus A. \rightarrow : Aussprossung. \blacktriangleright : Fibroblasten-Lokalisation. Maßstab: A, D: 100 μ m, B, C: 50 μ m. A-C: Der gleiche Ring wurde in verschiedenen Ebenen einmal in 10-facher und in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Fibroblasten sind ausschließlich in der Peripherie lokalisiert. Sie haben keinen Zusammenhang mit den neu gebildeten Gefäßen gezeigt. D: Aortenring aufgenommen mit einem konfokalen Mikroskop. Rot dargestellt sind die α -Vimentin-positiven Fibroblasten am Tag 5, die einzeln im umliegenden Gel vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt ist kein örtlicher Zusammenhang mit den grün dargestellten Gefäßen erkennbar.

Bei den Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen ChAT und mit den Perizytenmarkern NG2 und Desmin wurde festgestellt, dass ChAT-positive Zellen, die während des Angiogeneseprozesses zunächst Kontakt mit dem neu gebildeten Gefäß aufnahmen, keinen Perizytencharakter aufwiesen (Abb. 33).

ChAT-Zellen mit Perizytencharakter ließen sich meist erst am Tag 5 auf neu gebildeten stabilen Gefäßen finden (Abb. 34, 35). Zellen, die eine überlappende Immunfluoreszenz für NG2 und ChAT aufwiesen, waren eher im Mittelteil eines stabilen Gefäßes lokalisiert (Abb. 34, 35).

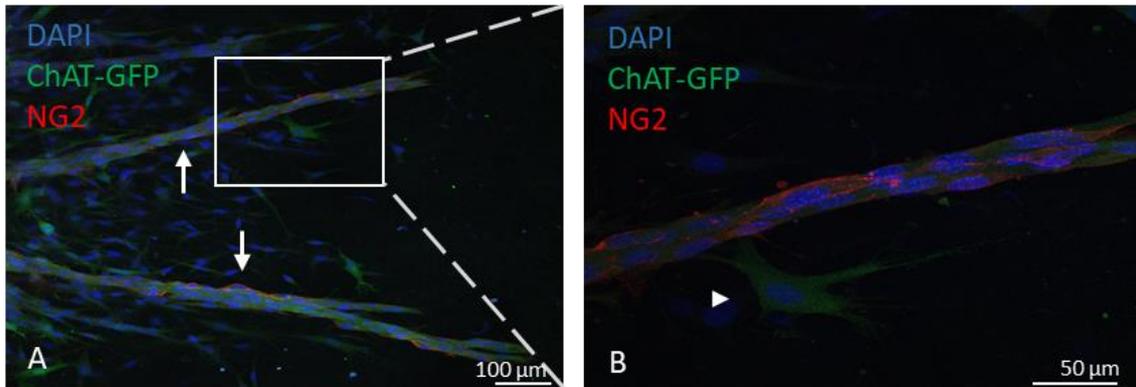


Abb. 33. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker NG2. Repräsentative Darstellung. A und B: Aufnahme mit einem konfokalen Mikroskop. A: Aussprossungen (→) angelagert sind Zellen, die positiv für ChAT-eGFP (grün) aber nicht positiv für den Perizytenmarker NG2 (rot) sind. B: vergrößerter Ausschnitt aus A. B: ► : ChAT-Lokalisation. Zelle bei Kontaktaufnahme mit einem Gefäß. Keine Immunreaktivität für NG2. Maßstab: A: 100 µm, B-C“: 50 µm.

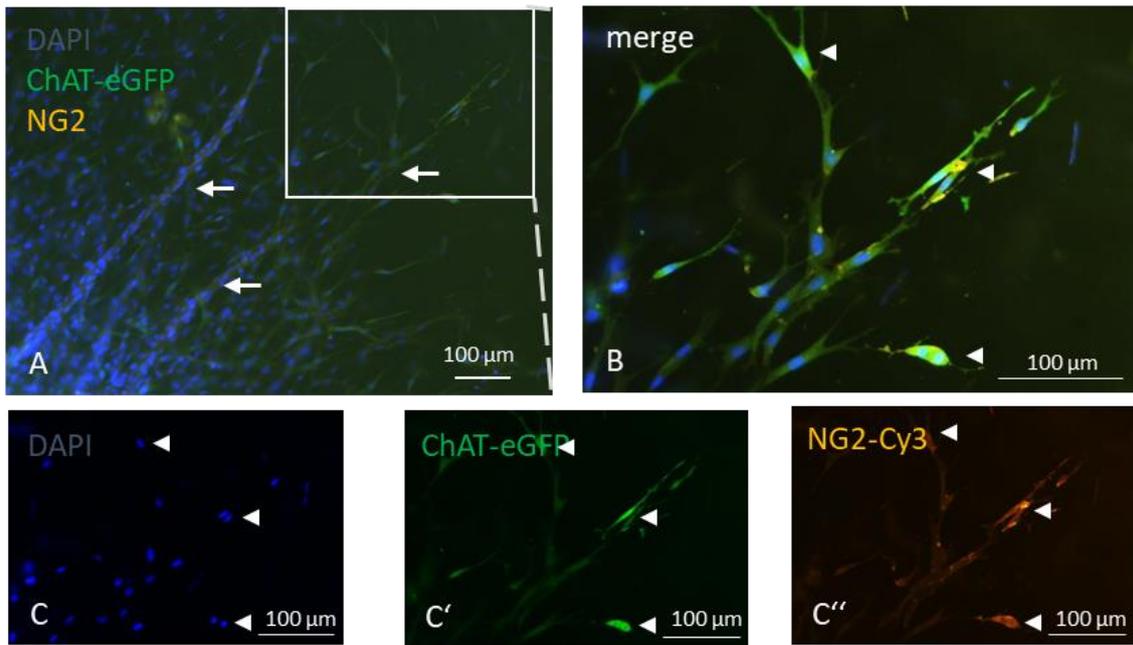


Abb.34. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker NG2. Repräsentative Darstellung. A: Aussprossungen (→) enthalten Zellen, die positiv für den Perizytenmarker NG2 (orange) und positiv für ChAT-eGFP (grün) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶ : ChAT-Zellen mit Perizytencharakter-Lokalisation. Maßstab: 100 μm.

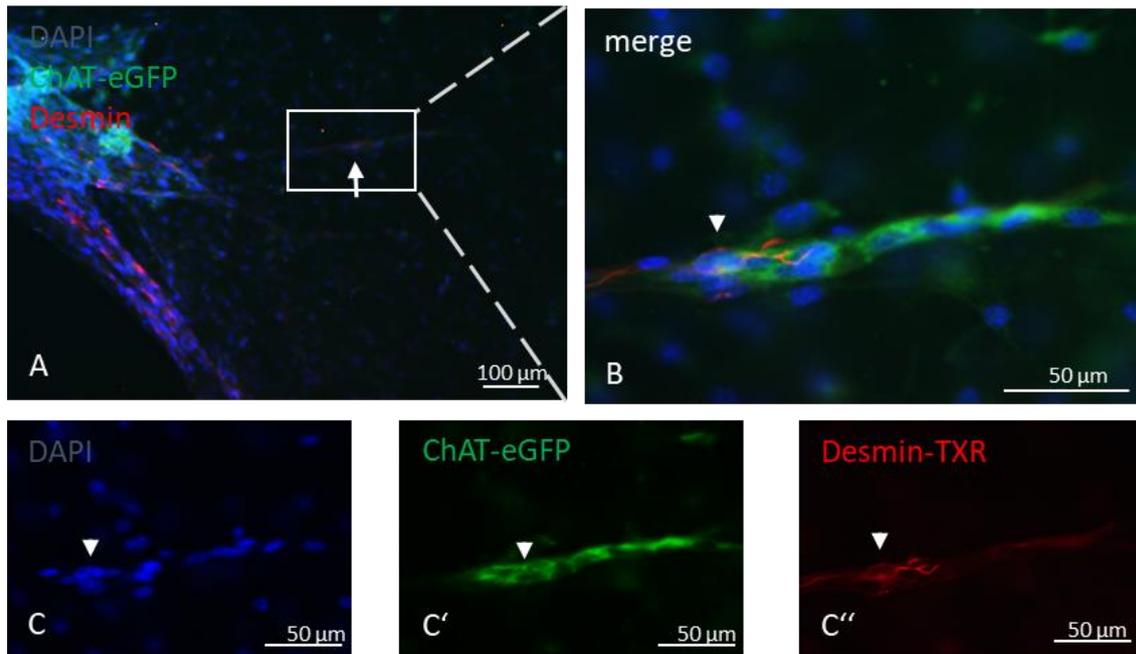


Abb. 35. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Perizytenmarker Desmin. Repräsentative Darstellung. A: Aussprossungen (→) enthalten Zellen, die positiv für den Perizytenmarker Desmin (rot) und positiv für ChAT-eGFP (grün) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶: ChAT-Zellen mit Perizytencharakter-Lokalisation. Maßstab: A: 100 μm , B-C'': 50 μm .

3.3.2. Zelltyp der ChAT-positiven Zellen nach Carbacholstimulation

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob eine Stimulation mit Carbachol zur Ausbildung von ChAT-positiven Zellen mit Perizytencharakter führt. Bei der immunhistologischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass es sich bei den ChAT-exprimierenden Zellen nicht um Endothelzellen und Glattmuskelzellen handeln konnte. Es kam bei den Endothelzellen und Glattmuskelzellen zu keiner Immunreaktivität mittels ChAT-Marker (Abb. 36, 37). Bei Färbungen mit den Perizytenmarkern NG2 und Desmin konnte eine Doppelmarkierung nachgewiesen werden (Abb. 38, 39). Bei den potentesten Carbacholkonzentrationen (1 μM -100 nM) konnten Zellen gefunden werden, die gleichzeitig ChAT- und Perizytencharakter aufwiesen. Lokalisieren ließen sich diese Zellen in der Mitte und am Ende eines neu gebildeten Gefäßes. Bei ChAT-

Zellen die von außen Kontakt mit dem neu gebildeten Gefäß aufnehmen oder sich an der Basis des Gefäßes befanden, ließ sich kein Perizytencharakter feststellen. Eventuell bildete das ACh eine Leitschiene für das neu entstehende Gefäß. Höchstwahrscheinlich führte es zu einer gerichteten Aussprossung von Gefäßen und zu ihrer Stabilisierung durch die Ausdifferenzierung von Perizyten aus ACh-produzierenden Vorläuferzellen.

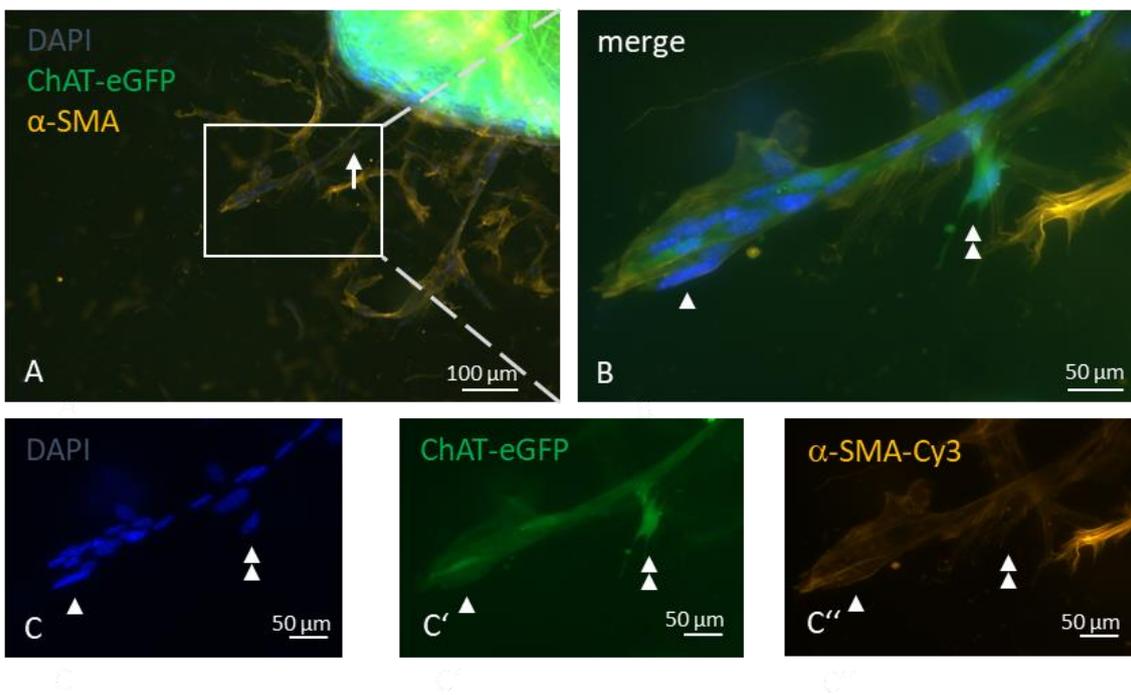


Abb. 36. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation am Tag 5. Glattmuskelzellmarker α -SMA. Repräsentative Darstellung. A: Aussprossungen (\rightarrow) enthalten Zellen, die positiv für den Glattmuskelzellmarker α -SMA (orange), aber nicht positiv für ChAT-eGFP (grün) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. \blacktriangleright : Glattmuskelzellen-Lokalisation. $\blacktriangleright\blacktriangleright$: ChAT-Zellen-Lokalisation Maßstab: A: 100 μ m, B-C'': 50 μ m.

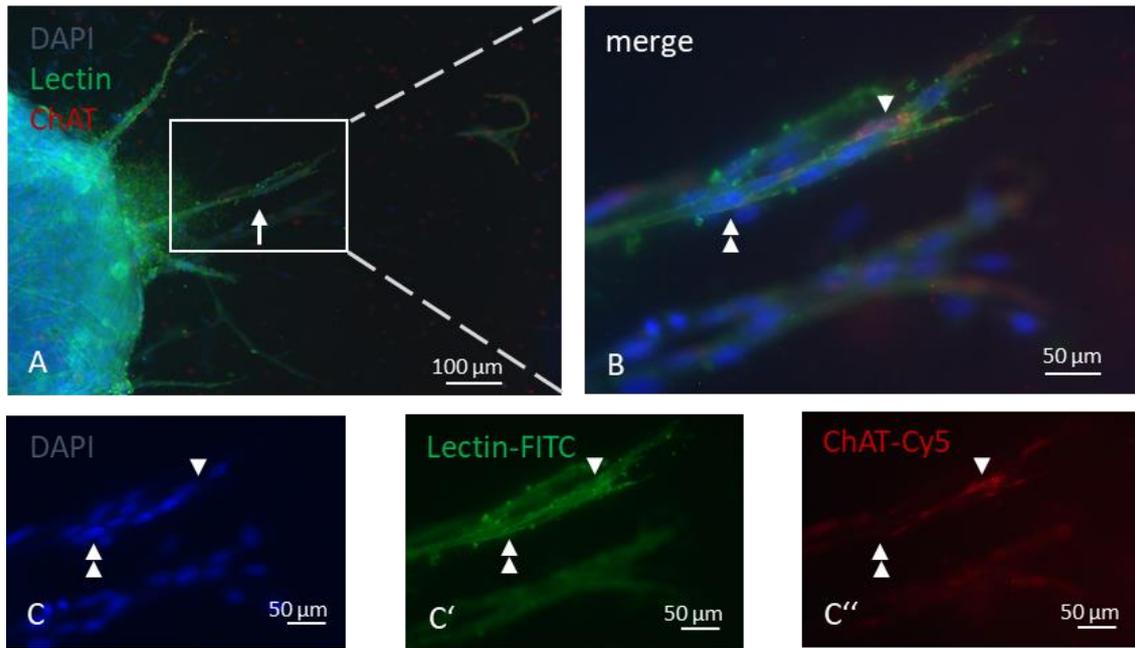


Abb. 37. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation am Tag 5. ChAT-Zellen-Marker ChAT. Repräsentative Darstellung. A: Aussprossungen (→) enthalten Zellen, die positiv für den ChAT-Zellen-Marker ChAT (rot), aber nicht positiv für Endothelzellen (grün) sind. B, C-C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. ▶ : Lokalisation der ChAT-positiven Zelle. ▶▶ : Endothelzellen-Lokalisation Maßstab: A: 100 μm , B-C'': 50 μm .

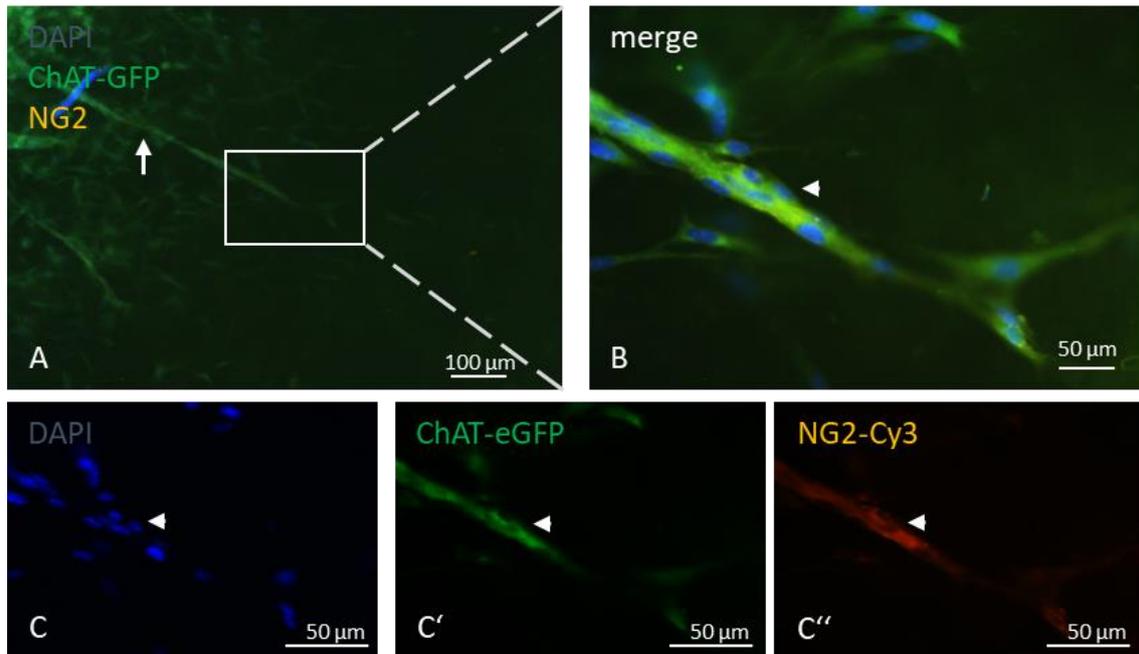


Abb. 38. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation (100 nM) am Tag 5. Perizytenmarker NG2. Repräsentative Darstellung. A: Aussprossungen (\rightarrow) enthalten Zellen, die positiv für den Perizytenmarker NG2 (orange) und für ChAT-eGFP (grün) sind. **B, C- C'':** vergrößerter Ausschnitt aus A. **B:** Overlay von C-C''. **C-C'':** Einzelkanaldarstellung. \blacktriangleright : Lokalisation eines Perizyten mit ChAT-Aktivität. Maßstab: A: 100 μm , B-C'': 50 μm .

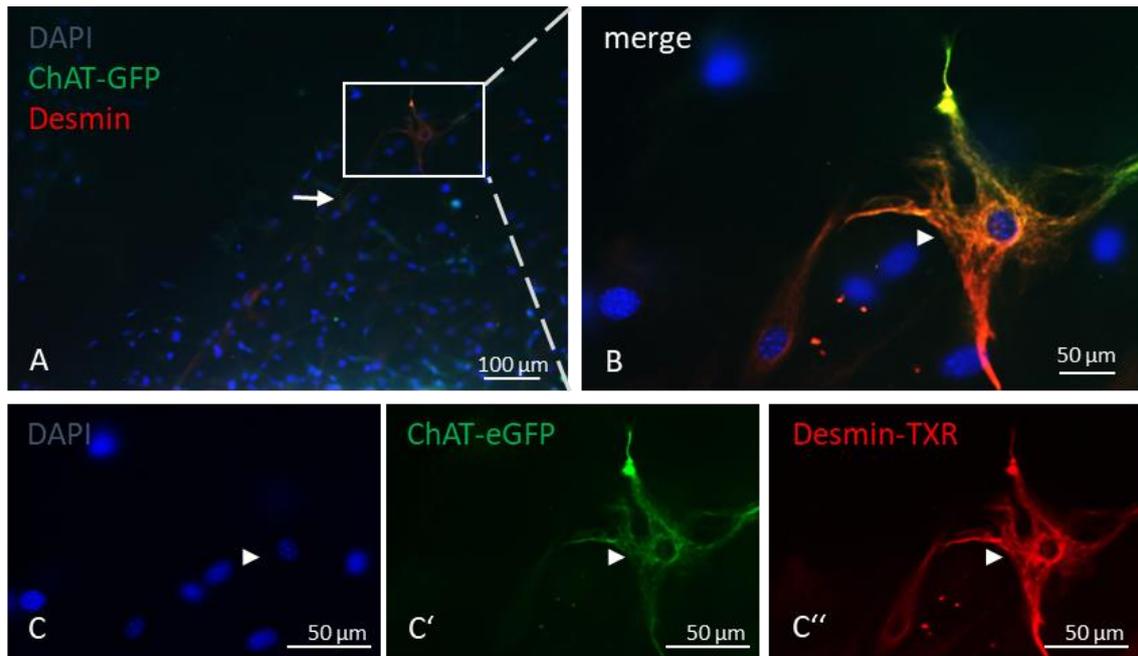


Abb. 39. Whole-mount Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen bei Carbacholstimulation ($1 \mu\text{M}$) am Tag 5. Perizytenmarker Desmin. Repräsentative Darstellung. A: Aussprossungen (\rightarrow) enthalten Zellen, die positiv für den Perizytenmarker Desmin (rot) und für ChAT-eGFP (grün) sind. B, C- C'': vergrößerter Ausschnitt aus A. B: Overlay von C-C''. C-C'': Einzelkanaldarstellung. \blacktriangleright : Lokalisation eines Perizyten mit ChAT-Aktivität. Maßstab: A: $100 \mu\text{m}$, B-C'': $50 \mu\text{m}$.

3.3.3. Herkunft der aussprossenden Zellen

Für diesen Versuch wurde mit verschiedenen Markern für Gefäßvorläuferzellen gefärbt. CD44 ist ein Zelloberflächenmarker für multipotente Stammzellen (S. Chen et al., 2013). CD34 stellt einen Marker für endotheliale und hämatopoetische Stammzellen dar (Sidney et al., 2014). F4/80 gilt als Makrophagenmarker (Terry et al., 2015). CD34 positive Zellen ließen sich bei VEGF- und bei den potentesten Carbacholstimulationen $1 \mu\text{M}$ - 100nM subendothelial, in der Adventitia und in der Basis und Länge des neu gebildeten Gefäßes lokalisieren (Abb. 40). Das gleiche Ergebnis konnte man bei den mit CD44 gefärbten Aortenringen feststellen (Abb. 41). Bei den Ringen die man mit dem Makrophagenmarker inkubierte, wurden positive Zellen bei einer VEGF- und

Carbacholstimulation nur in der Basis und Länge der Aussprossung gefunden (Abb. 42). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Aufgrund der Lokalisation der positiv gefärbten Zellen könnte man annehmen, dass es sich bei einigen Stammzellen in der vasculogenen Zone um ACh-produzierende Vorläuferzellen handelt, die sich in Perizyten ausdifferenzieren könnten. Da die Marker für ChAT-Zellen und für die Stammzellen verschiedenen Inkubationsbedingungen unterliegen und somit eine Doppelfärbung nicht möglich ist, bleibt dieser Zusammenhang eine Vermutung und weiterführende Forschungen müssten folgen.

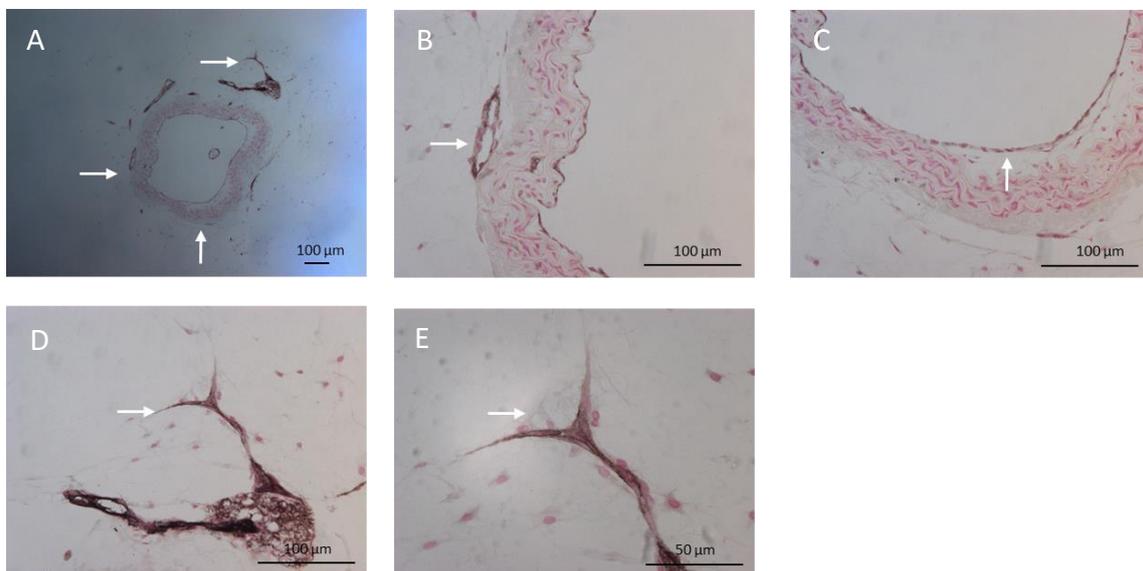


Abb. 40. DAB Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Stammzellmarker CD34. Repräsentative Darstellung. A: Aortenring und Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den Marker für endotheliale und hämatopoetische Stammzellen CD34 sind. B-D: vergrößerter Ausschnitt aus A. E: vergrößerter Ausschnitt aus D. → : Lokalisation von CD34 positiven Stammzellen. Maßstab: A-D: 100 µm, E: 50 µm.

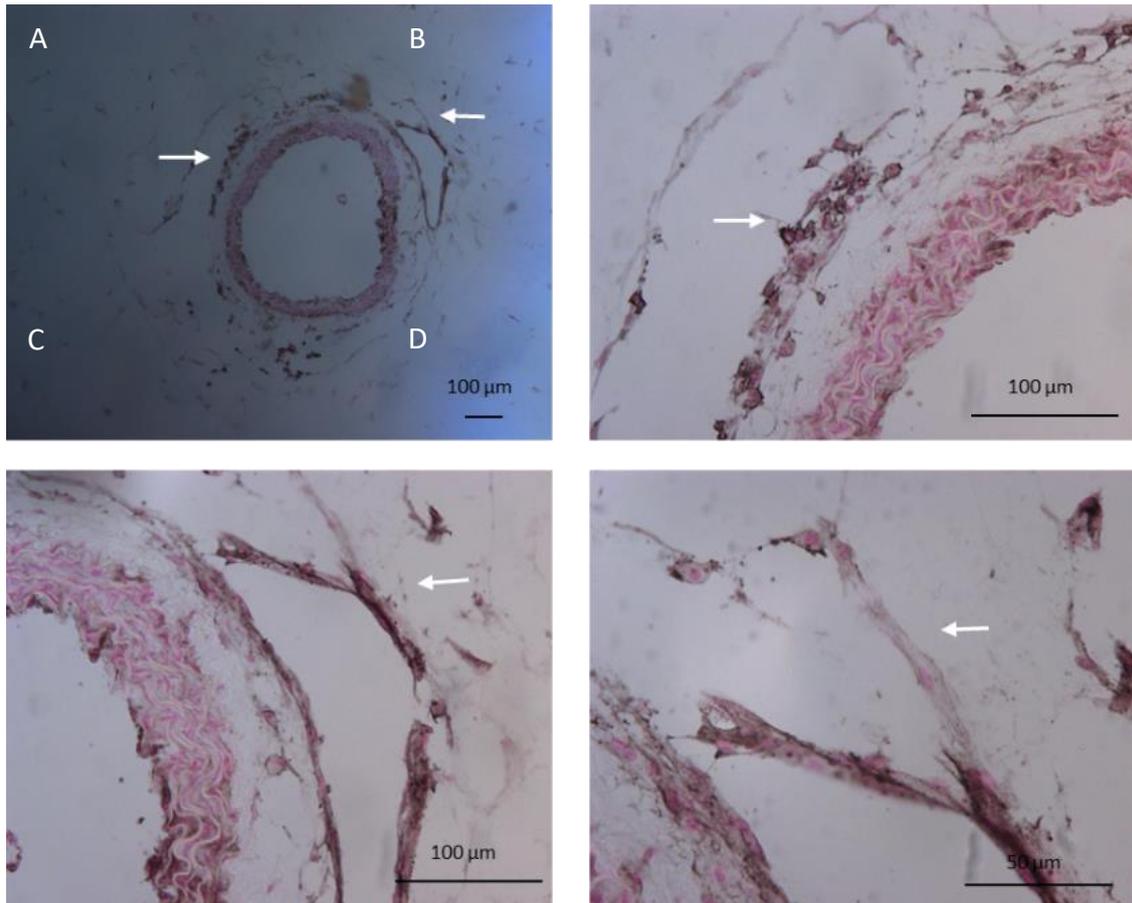


Abb. 41. DAB Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Stammzellmarker CD44. Repräsentative Darstellung. A: Aortenring und Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den Marker multipotenter Stammzellen CD44 sind. B und C: vergrößerter Ausschnitt aus A. D: vergrößerter Ausschnitt aus C. → : Lokalisation von CD44 positiven Stammzellen. Maßstab: A-C: 100 µm, D: 50 µm.

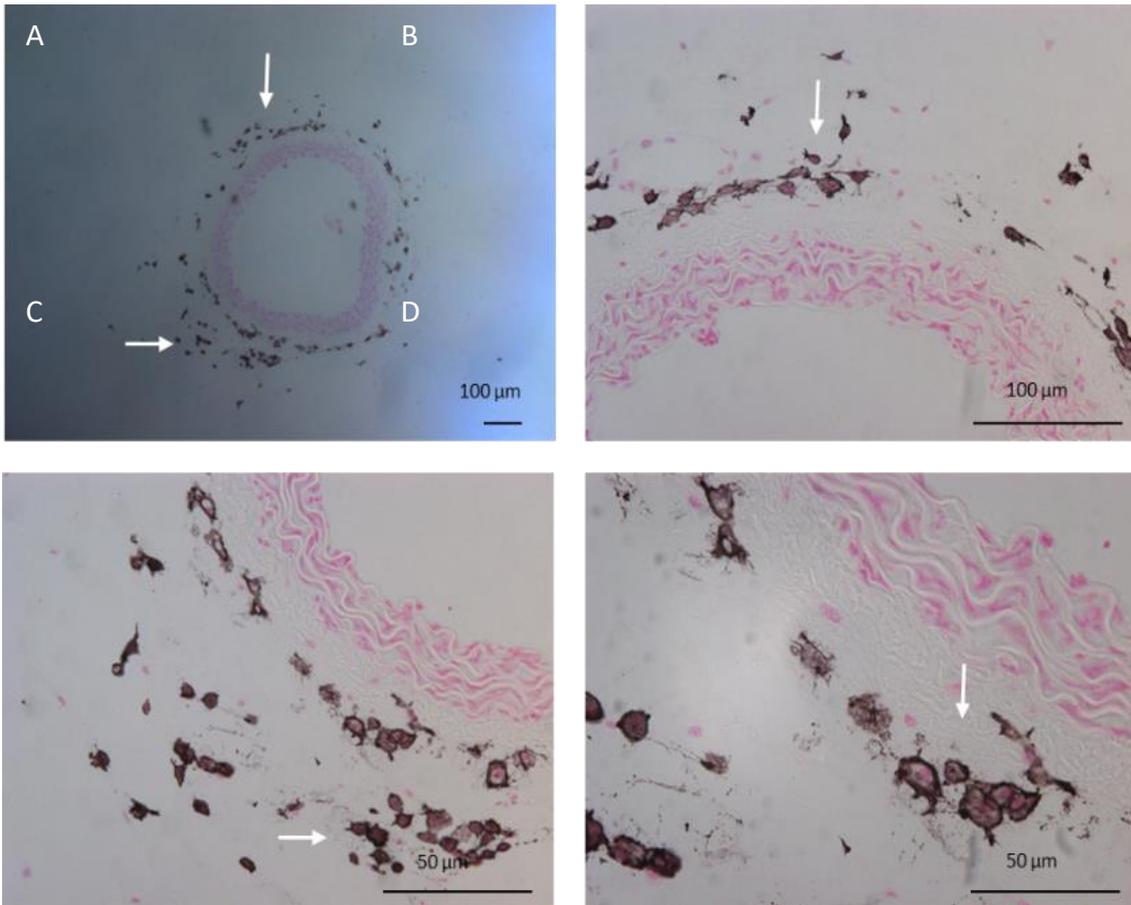


Abb. 42. DAB Immunhistochemie mit kultivierten Aortenringen am Tag 5. Makrophagenmarker F4/80. Repräsentative Darstellung. A: Aortenring und Aussprossungen enthalten Zellen, die positiv für den Makrophagenmarker F4/80 sind. B und C: vergrößerter Ausschnitt aus A. D: vergrößerter Ausschnitt aus C. → : Lokalisation von F4/80 positiven Makrophagen. Maßstab: A-C: 100 µm, D: 50 µm.

Anti-körper	Bedingung	Sub-endothelial	Adventitia	Aussprossung Basis	Aussprossung Länge
CD34	FCS	x	x		
	VEGF	x	x	x	x
	C 1µM	x	x	x	x
	C 500 nM	x	x	x	x
	C 100 nM	x	x	x	x
F4/80	FCS		x		
	VEGF			x	x
	C 1µM			x	x
	C 500 nM			x	x
	100 nM			x	x
CD44	FCS	x			
	VEGF	x	x	x	x
	C 1 µM	x	x	x	x
	C 500 nM	x	x	x	x
	C 100 nM	x	x	x	x

Tabelle 8. Zusammenfassung der CD34-, CD44- und F4/80- positiven Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.

x: positive Zellen

4. Diskussion

Dass der klassische Neurotransmitter ACh auch im nicht-neuronalen System eine bedeutende Rolle spielt, wurde schon in vielen Publikationen diskutiert. Bereits untersucht worden ist das Vorhandensein von ChAT-Zellen in Organen, wie zum Beispiel dem Herzen und dem Thymus. Lymphozyten sollen die meisten Komponenten des cholinergen Systems, einschließlich ACh, mAChR und nAChR, ChAT, Hochaffinitäts-Cholin-Transporter und AChE, exprimieren. Es scheint wahrscheinlich, dass ein lokales lymphozytäres cholinerges System an der Regulierung der Immunfunktion beteiligt ist (Kawashima et al., 2004). Auch im Herzen kann das cholinerge System neuronalen oder nicht-neuronalen Ursprungs sein. Das nicht-neuronale cholinerge System besteht aus Kardiomyozyten, die über eine vollständige Ausrüstung für die Synthese und Sekretion von ACh verfügen. Derzeitige Erkenntnisse legen nahe, dass das nicht-neuronale cholinerge System im Herzen die Regulation des Herzens während der sympathischen Aktivierung beeinflusst (Kucera et al., 2015). Die Bedeutung bei der Tumorangiogenese ist Teil vieler Studien (Sales et al., 2018; Abdel-Hamid et al., 2019). Ein Lungenkarzinom zum Beispiel exprimiert eine autokrine cholinerge Schleife, in der sekretiertes ACh das Tumorstadium sowohl über den nAChR als auch über den mAChR stimulieren kann (Spindel, 2016). Ob und inwiefern ACh auch einen Einfluss auf die physiologische Angiogenese hat, wurde noch nicht genauer untersucht und wurde somit zum Thema dieser Doktorarbeit gewählt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ACh und das cholinerge Signalling einen stimulierenden Einfluss auf die physiologische Angiogenese besitzt. Anhand des durchgeführten Aortenringassays als Angiogenesemodell (s. 4.1.), wurde der Einfluss des Carbachols, einem Strukturderivat des ACh, untersucht. Es konnte eindeutig bewiesen werden, dass es sich um einen Angiogenese-Stimulator handelt. Des Weiteren wurde untersucht, um welchen Zelltyp es sich bei den ChAT-positiven Zellen handelt. Die immunhistologischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass es sich am wahrscheinlichsten um Perizyten handelt, die eine ChAT-

Aktivität besitzen. Ihre Aufgabe liegt eventuell in der gerichteten Wachstumsförderung und Stabilisation der neu gebildeten Gefäße. Weitere Untersuchungen zur Herkunft der gefäßaussprossenden Zellen ergaben, dass es sich aufgrund ihrer Lokalisation in der Gefäßwand möglicherweise um die in der Adventitia der Aortenwand residierenden ChAT-positiven Zellen handeln könnte. Diese besitzen offensichtlich Vorläuferkapazität und können sich nach der Aktivierung durch das Sprouting-Assay in weitere reifere Zelltypen differenzieren.

4.1. Auswahl des Aortenringassays

Der Einfluss des ACh auf die Angiogenese wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit mit Hilfe des Aortenassays untersucht. Das Aortenringassay nach Baker ermöglicht die Analyse der zellulären Proliferation, Migration, Gefäßneubildung, Mikroverzweigung, perivaskulären Rekrutierung und Remodellierung (Baker et al., 2012). Es liefert ein physiologisch relevantes *in-vitro* Modell für die Untersuchungen zur Angiogenese, da die Gefäße, die aus dem Aortenringen herauswachsen, *in-vivo* Gefäßen anatomisch ähnlich sind. Sie rekrutieren glatte Muskelzellen, Perizyten und Endothelzellen. Ein anderes *in-vitro* Assay ist das Metatarsalassay der Maus. Hierbei werden Mittelfußknochen aus embryonalen Mäusen isoliert und auf Gewebekulturkunststoff ausplattiert. Das Gefäßwachstum ist robust und beruht auf der Knochenmikrovaskulatur, die für die Angiogenese *in-vivo* typischer ist als das Wachstum eines Hauptgefäßes wie die Aorta. Trotzdem haben wir uns für das Aortenringassay entschieden, da es sehr zeitaufwendig ist den embryonalen Mittelfußknochen zu isolieren (Goodwin, 2007). Nicosia und Ottinetti waren die Ersten, die im Jahr 1990 den Aortenringtest an der Ratte entwickelten. Es wurde die Angiogenese in einem *ex-vivo* Modell untersucht, das die Lücke zwischen den bestehenden *in-vitro* und *in-vivo* Technologien schließen sollte. Allerdings sind transgene Maustechnologien heutzutage viel leichter verfügbar und kosteneffizienter, als solche auf Rattenbasis. Daher sind mausbasierte Aorten-Ring-Assays eine deutliche Verbesserung gegenüber dem ursprünglichen rattenbasierten Modell (Baker et al., 2012). Weitere Vorteile des Aortenringassays stellt die schnelle zeitliche Durchführbarkeit dar. Viele Ringe sind von wenigen Tieren nutzbar. In Anbetracht

der Bemühungen die Anzahl von Tierversuchen nach dem sogenannten 3R-Prinzip (reduce, refine, replace) zu reduzieren, ist das ein wichtiges Pro-Argument (Ozelsel et al., 2019). Außerdem sind Tubulusstrukturen deutlich sichtbar, lumenisiert und entwickeln sich über einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie *in vivo*. Eine besondere Stärke des Aortenringassays ist die Leichtigkeit, mit der er sich an verschiedene Anwendungen anpasst, beispielsweise die Wirkung von Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Wirkstoffen. Die Nachteile des Aortenringassays liegen in dem Erfordernis frischen Mausegewebes, dem Fehlen einer Beteiligung von nicht-aortalem Gewebe, am Mangel an Flüssigkeitsströmung und in der Regression der Gefäße im Laufe der Zeit, was ein begrenztes Zeitfenster für die Analyse gibt (Baker et al., 2012). Trotz immer gleichbleibenden Alters der Tiere, Geschlechts und der Breite der geschnittenen Ringe variieren aber die Versuchsbedingungen immer minimal. Das Umsetzen und Einbetten der Aortenringe stimuliert auch schon im geringen Maße das Wachstum neuer Gefäße. Auch das Basismedium PBS und FCS, welches verwendet werden muss, um die Lebensfähigkeit der Explantate aufrecht zu erhalten, setzt einen gewissen Wachstumsreiz aus (Goodwin, 2007). Ähnlichen Einfluss haben wir beim Verwenden des Assays beim Auswerten der Länge der Aussprossungen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. *In-vivo* Analysen der Angiogenese umfassen derzeit zum Beispiel das Modell der Tumorangio-genese (Reynolds et al., 2010; Hu et al., 2016), Wachstumsfaktor-stimulierte Angiogenese-Assays unter Verwendung von subkutan implantierten Schwämmen, Hühnerembryo-Chorioallantois-Membran-Test oder DIVAA (der *in-vivo* Angiogenese-Test von Amsbio) (Gale et al., 2002; Oehler et al., 2002; Seo et al., 2003; Lee et al., 2007; Ribatti, 2008; da Silva et al., 2010; Tavora et al., 2010), Retinoangiogenese Assays (Silvestre et al., 2000; Gale et al., 2002; Reynolds et al., 2002; da Silva et al., 2010; Pitulescu et al., 2010; Tavora et al., 2010) und Ischämie-Modelle, wie Frühgeborenen-Retinopathie und Hinterbein-Ischämie. Es wurde auch die Verwendung von Zebrafischen zur Analyse der molekularen Grundlagen der Entwicklungs- und Tumorangio-genese untersucht (Lawson et al., 2002; Norrby, 2006; Rouhi et al., 2010). Der offensichtliche Vorteil der Untersuchung der Angiogenese *in-vivo* besteht darin, dass der Prozess

mehrere Zelltypen und ein komplexes Gleichgewicht von pro- und antiangiogenen Faktoren, die zusammen vorkommen und Einfluss auf die Blutgefäßbildung nehmen, umfasst. Die Hauptnachteile sind jedoch, dass *in-vivo* Experimente relativ teuer sind. Die Beteiligung von Entzündungszellen und anderer Zelltypen (das heißt nicht Blutgefäßzellen) in angiogenen Prozessen kann es schwierig machen, zwischen Reaktionen von Blutgefäßzellen und der parakrinen Wirkung anderer Gewebe zu unterscheiden (Baker et al., 2012). Nach umfassender Betrachtung der Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Untersuchung angiogener Prozesse, haben wir uns für das *in-vitro* Aorteringassay entschieden, welches hinsichtlich unserer Fragestellung am besten umzusetzen wäre.

4.2. Der Einfluss des Acetylcholins auf die Angiogenese

Der Nachweis einer ACh-Synthese in nicht-neuronalen Zellen wie zum Beispiel in Epithelzellen in den Atemwegen (Kummer et al., 2014), im Urothel (Lips et al., 2007), im Darm (Bader et al., 2014) oder der Haut (Kurzen et al., 2007) und auch in Endothelzellen (Zhang et al., 2014), Immunzellen (Fujii et al., 2017), mesothelialen (Trombino et al., 2004) und mesenchymalen Zellen (Zablotni et al., 2015) konnte schon in vorhergehenden Studien nachgewiesen werden. Nach Untersuchungen am Thymus (Kawashima et al., 2004) und am Herzen (Kucera et al., 2015) wurde der nicht-neuronale Einfluss des ACh auf das System weiterhin bestärkt. Die immunhistologischen Untersuchungen der Thoraxorgane einer ChAT-eGFP-Maus zeigten eindeutig, dass sich neben in den schon untersuchten Organen auch in der Aortenwand ChAT-positive Zellen finden ließen. Diese Erkenntnis führte zu der Hypothese, dass das ACh eine Rolle bei der Gefäßneubildung spielen könnte. Zur Analyse des Einflusses vom ACh auf die Angiogenese wurde das Aortenringassay nach Baker durchgeführt. Baker verwendete VEGF als Angiogenesestimulator in seinen Studien. Bekannt ist, dass VEGF für das Wachstum und die Differenzierung von Endothelzellen während der Embryonalentwicklung als auch unter physiologischen und pathologischen Zuständen in den Gefäßen des adulten Organismus von besonderer Bedeutung ist (Kalka et al., 2000). VEGF stellte in den vorliegenden

Untersuchungen die Positivkontrolle dar und diente dem Vergleich einer ACh-Stimulation. Nach Auswertung der Ergebnisse konnte man feststellen, dass es sich bei ACh um einen ähnlich potenten Angiogenese-Stimulator wie VEGF handelte. Unter Stimulation mit ACh bildeten sich neue stabile Gefäße ausgehend von einem Aortenring. Dabei spielten Mausstamm und Geschlecht keine Rolle. Um zu überprüfen, ob die cholinerge Wirkung auf die Aktivierung ähnlicher Mechanismen wie bei einer VEGF-Stimulation basiert, wurde ein Inhibitorversuch mit Lenvatinib durchgeführt. Lenvatinib zählt zu den kleinmolekularen Tyrosinkinasehemmern. Es hat antitumorale, antiproliferative und antiangiogenetische Eigenschaften. Die Effekte beruhen unter anderen auf der Hemmung der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptoren 1-3 (VEGFR 1-3). Außerdem zielt Lenvatinib auch noch auf die FGF-Rezeptoren 1-4 und auf den PDGF- α -Rezeptor (Cabanillas et al., 2016). Wie VEGF ermöglicht die Kopplung von FGF und PDGF an seine Rezeptoren nachgeschaltete Signalübertragungswege, die die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen regulieren (Cross et al., 2001). Durch die Tyrosinkinasehemmung kam es bei den stimulierten Ringen trotz Zugabe von VEGF zu keiner Ausbildung von neuen Gefäßen. Aber auch bei den mit Carbachol-stimulierten Ringen kam es zu keiner Gefäßbildung. In einer Studie mit der Meeresschnecke *Aplysia* wurde herausgefunden, dass durch Hemmung der Tyrosinasen der cholinerge Strom verringert wird. Das ACh kann dann an seinem Rezeptor keine Aktionspotentiale mehr auslösen (White et al., 2018). Eventuell ist das die Erklärung dafür, dass auch bei Carbachol-stimulierten Ringen ein Tyrosinkinasehemmer zur Inhibition der Angiogenese führte. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, ob das ACh in diesem Teil des nicht-neuronalen Systems über den mAChR oder nAChR Rezeptor wirkt. Dafür wurden Mecamylamin, ein Antagonist des nAChR (Nickell et al., 2013), und Atropin, ein Antagonist des mAChR (Perera et al., 2017), eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Carbachol-Stimulation der Ringe mit und ohne Inhibition im durchgeführten Aortenringassay. Es ist bekannt, dass Mecamylamin an alle Subtypen des nAChR bindet (Nickell et al., 2013) und auch Atropin die muskarinen Subtypen M1-M5 gleichermaßen

hemmt (Lakstygala et al., 2019). Somit konnte nicht abschließend geklärt werden, über welchen Rezeptorentyp das nicht-neuronale ACh auf die Angiogenese Einfluss nimmt. Überlegungen müssten weiterhin in Richtung Konzentrationseinfluss der verwendeten Inhibitoren gemacht werden. Eventuell sind die hier eingesetzten Konzentrationen zu niedrig gewählt worden. Man könnte mit höheren Konzentrationen einen besseren Erfolg erzielen. In den nächsten Untersuchungen konzentrierte man sich auf die Art der neu gebildeten Gefäße hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes und der eingesetzten Konzentration des Carbachols. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass Carbachol, eingesetzt in einer Konzentration von 100 μM , zu hoch konzentriert scheint. Es konnte sogar antiangiogenetisch wirken. Am ehesten mit dem VEGF-Vergleichsmodell ähnlich potent, zeigte sich die eingesetzte Carbachol-Konzentration von 1 μM . Hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung bildeten sich in den ersten 5 Tagen stabile Primär- und davon ausgehende Sekundäraussprossungen. Erstere zeigten sich im direkten Vergleich signifikant länger. Im weiteren Versuchsablauf zeigte sich eine Veränderung hinsichtlich der Formation der gebildeten Gefäße. Nach Tag 7 bildete sich ein großes stabiles Gefäß ringartig um die Aorta, von dem nun die Sekundäraussprossungen ausgingen. Die weitere zeitliche Entwicklung der Ringe war nicht beurteilbar, da die neu gebildeten Zellen sich bis zum Rand des Wells ausgebreitet hatten. Es gab somit eine räumliche Begrenzung, die das korrekte wissenschaftliche Auswerten unmöglich machte. Auch die Verwendung von Platten mit größeren Durchmessern der Wells würde bei diesem Umstand nicht helfen. Würde man einen Aortenring in ein größeres Well einbetten, müsste man mehr Collagen verwenden und anschließend auch mehr Medium. Diese Umstände würden die Konzentration von dem exprimierten ACh herabsetzen, sich negativ auf die Angiogenese auswirken und die Versuche nicht auswertbar machen. Das Volumen ist entscheidend für die Konzentration von Stoffen, die von dem Gewebe produziert und freigesetzt wird. Auch andere Wachstumsfaktoren wie das VEGF sind konzentrationsabhängig und wirken erst ab bestimmten Konzentrationen angiogenesestimulierend (Hoeben et al., 2004). Schon vorangegangene Studien haben bewiesen, dass die Signalübertragung über die nAChR zum Wachstum, Fortschreiten und Metastasierung einer Vielzahl

von Krebsarten beiträgt. Sie führt zu einer erhöhten Zellproliferation, Zellüberlebensrate und Angiogenese in Tumoren. Mit der Hemmung dieses Rezeptors wird auch die Angiogenese und somit das Tumorwachstum signifikant gehemmt (S. Singh et al., 2011). Ebenfalls bekannt, dass die Aktivierung von mAChR durch Carbachol die Proliferation von Tumorzellen in Brustadenokarzinomen konzentrationsabhängig erhöht. Die Aktivierung führt zu einer Neovaskularisation und somit zum Wachstum des Tumors (Espanol et al., 2007). Morphologisch gesehen unterscheidet sich jedoch die Tumorangio-genese in einigen Merkmalen von der physiologischen. Sie ist eine chaotische Mischung aus abnormalen, unorganisierten Gefäßen, die sich hinsichtlich Organisation, Struktur und Funktion von denen normaler Gewebe unterscheidet. Neben kontraktilen Wandkomponenten fehlen häufig Perizyten, was die Tumorgefäße brüchig und undicht macht (Hlushchuk et al., 2016). Doch die Tumor- und die physiologische Angiogenese haben auch viele Gemeinsamkeiten. Die Tumorzellen verschieben in Reaktion auf Hypoxie das Gleichgewicht in Richtung proangiogener Faktoren wie VEGF und Angiopoietin, um die Neovaskularisation zu erleichtern. Dies führt auch hier zur Aktivierung von Endothelzellen, zum Abbau der extrazellulären Matrix durch verschiedene proteolytische Enzyme und schließlich zur Bildung gefäßähnlicher Strukturen. Durch die anschließende Hemmung des Endothelwachstums und die Rekrutierung von Perizyten und Glattmuskelzellen kommt es zur Reifung der Gefäße. Obwohl die Gefäße unorganisiert sind, können sie die wachsenden Tumormassen mit den benötigten Nährstoffen und Metaboliten versorgen (Khorshidi et al., 2016). Nach diesen Erkenntnissen zusammen mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, kann man annehmen, dass das ACh neben den schon vorher bekannten Eigenschaften im nicht-neuronalen System auch eine wesentliche Rolle in der physiologischen Angiogenese spielt. Es handelt sich, ähnlich seiner Rolle im Tumorwachstum, um einen Angiogenesestimulator.

4.3. Cholinerge Zellen in der Angiogenese

Die immunhistologischen Färbungen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass cholinerge Zellen während der physiologischen Angiogenese vorhanden sind. Lokalisieren konnte man sie entlang des sich neu ausgebildeten Gefäßes. Nach der mikroskopischen Auswertung der angewendeten Immunfluoreszenz-doppelfärbungen, konnte man Fibroblasten und Endothelzellen aufgrund ihrer Lokalisation und Glattmuskelzellen aufgrund ihrer fehlenden Überlappung mit den cholinergen Zellen, als solche ausschließen. Die einzige Zellart die ChAT exprimieren könnte, stellt der reife Perizyt dar. Perizyten sind langgestreckte Gefäßwand-unterstützende Zellen in der Wand der Mikrogefäße, insbesondere der Kapillaren, die sich außen den Endothelzellen anlagern. Im Jahre 1873, von dem französischen Physiologen und Anatomen Charles-Marie-Benjamin Rouget entdeckt und „Rouget-Zellen“ genannt, sind Perizyten in jedem vaskularisierten Gewebe im Körper vorhanden (Kelly-Goss et al., 2014). Diese Zellen werden um Blutkapillaren, präkapillare Arteriolen, postkapillare Venolen und Venen gefunden (Allt et al., 2001). Sie sind so angeordnet, dass sie die Zellkommunikation erleichtern und integrieren. Perizyten sind über spezialisierte Kontakte mit mehreren Endothelzellen verbunden und können so benachbarte Endothelzellantworten koordinieren. Die Abdeckung des Endothels durch Perizyten beträgt je nach Gefäßbett etwa 10-50%. Die höchste Abdeckung befindet sich im ZNS. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass Perizyten an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (Armulik et al., 2005). Die typische Form eines Perizyten ist abgeflacht und länglich, sternförmig mit mehreren zytoplasmatischen Verlängerungen (Attwell et al., 2016). Bekannt ist, dass die mikrovaskuläre Stabilität und die Regulierung des Kapillartonus durch Perizyten und ihrer Wechselwirkung mit Endothelzellen reguliert wird (Durham et al., 2014). Sie sind vaskuläre Wandzellen, die auf der vaskulären Basalmembran von Blutgefäßen aufliegen, wo sie einen spezifischen Kontakt mit dem Endothel eingehen (Armulik et al., 2005). In den letzten Jahren bekamen sie mehr und mehr Bedeutung als Regulatoren der vaskulären Entwicklung, Stabilisation, Reifung und Remodellierung zugesprochen (Armulik et al., 2011). Perizyten spielen ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Physiologie und Pathologie. In der

Netzhaut, im Kleinhirn und in der Großhirnrinde verändern Perizyten den Kapillardurchmesser als Reaktion auf Depolarisation, Neurotransmitterwirkung oder neuronale Aktivität (Peppiatt et al., 2006; Hall et al., 2014). Bei Ischämie verengen sich die Kapillaren durch Perizyten, wodurch eine mikrozirkulatorische Reperfusion nach Entfernung der Blutgerinnsel beim Schlaganfall verhindert wird (Attwell et al., 2016). Ein Großteil der Erkenntnisse über die Signalübertragung zwischen Endothelzellen und Perizyten stammt aus der Analyse genetischer Mausmodelle. Eine wichtige Erkenntnis aus diesen Studien ist, dass die beiden vaskulären Zelltypen voneinander abhängig sind. Primäre Defekte bei einem der Zelltypen haben verheerende Konsequenzen auf den anderen (Armulik et al., 2005). Es ist bekannt, dass der Angiopoietin-Tie-2- Signalweg auch an der wechselseitigen Kommunikation zwischen Endothelzellen und Perizyten beteiligt ist. Angiopoietin1 soll ein parakrines Signal, ausgehend von den Perizyten, für das Endothel sein (Armulik et al., 2005). Genetische Funktionsverluste dieses Signalweges führen zu einer verminderten Gefäßreifung und -stabilisierung. Angiopoietin1 oder Tie-2- Knockout-Mäuse sterben in der Mitte der Schwangerschaft an Herz- Kreislaufversagen. Diese Embryonen zeigen eine fehlerhafte Angiogenese und ihre Blutgefäße haben eine verringerte Abdeckung durch Perizyten (Suri et al., 1996). Perizyten tragen auch zur Endothelzellstabilisierung durch Zell-Zell-Kontakte und durch Sekretion von Überlebensfaktoren wie VEGF bei (Liu et al., 2002). In der Lunge konnte eindeutig festgestellt werden, dass Lungenperizyten einen stimulierenden Einfluss auf Endothelzellen und herausragenden Einfluss auf die mikrovaskuläre Morphologie, Permeabilität, Vasokonstriktion und die Langzeitstabilität in einem *in vitro* mikrovaskulärem System haben (Bichsel et al., 2015). Aufgrund dieser Erkenntnisse und den Ergebnissen dieser Arbeit könnte man annehmen, dass Perizyten eventuell eine stimulierende Wirkung auf neu entstandene Endothelzellen haben. Die neu gebildeten Gefäße können sich weiter entwickeln und stabilisieren. Eine weitere Überlegung wäre, dass dieser positive Einfluss der Perizyten, durch das ACh ausgelöst wird. Es ist bis jetzt noch nicht klar, wie Perizyten Gefäße in den späten Stadien der physiologischen Angiogenese stabilisieren und warum dieser Prozess in Tumorgefäßen versagt (Armulik et al.,

2011). Hier könnte wieder das nicht-neuronale ACh eine gewisse Rolle spielen. Schon bekannte Studien haben gezeigt, dass Perizyten den Neurotransmitter Glutamat freisetzen. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von Botenstoffen, die die Kapillare im Gehirn erweitern können (Hall et al., 2014). Dieser Aspekt gibt einen Hinweis darauf, dass auch ein weiterer Neurotransmitter, wie das ACh, von Perizyten freigesetzt werden könnte.

Perizyten werden als "Angioregulatoren" angesehen, da sie die Angiogenese sowohl stabilisieren, als auch fördern können (Ribatti et al., 2011). Ihre Bedeutung für die Angiogenese zeigt sich zum Beispiel im Tumorwachstum. Hypoxie fördert die Sekretion von VEGF durch Perizyten. Dies fördert die Entwicklung von Tumorgefäßen (Z. Chen et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass die Dynamik von Perizyten während der Angiogenese, Veränderungen in den Zell-Zell-Kontakten mit Endothelzellen, Migration, Wachstumsfaktorpräsentation, Proliferation und extrazelluläre Matrixmodulation umfasst (Gerhardt et al., 2003; Armulik et al., 2011). In früheren Studien wurde gezeigt, dass Perizyten entlang von Kapillarsprossen vorhanden sind und dass sie Endothelzellen an der Gefäßspitze sowohl naheilen als auch führen können (Ponce et al., 2003). In einigen Fällen können Perizyten sogar die Lücken zwischen zwei austreibenden Endothelzellsegmenten überbrücken (Ozerdem et al., 2001). Den vollständigen Umfang der Kommunikation zwischen Perizyten und Endothelzellen, gilt es noch zu klären und die Annahme dieser Arbeit das ACh dabei eine Rolle spielt gilt es weiter zu beweisen. Um das Wissen voranzutreiben, müsste man herausfinden, wie und wann sich das Perizytenverhalten in ruhenden und angiogenen Bedingungen ändert. Dies beinhaltet nicht nur eine Beschreibung ihrer räumlichen und zeitlichen Dynamik, sondern auch eine prospektive Methode zur Identifizierung von möglichen Subpopulationen von Perizyten. Es ist bekannt, dass Perizyten eine Vielfalt verschiedener Proteine exprimieren, die unter Verwendung von Standard-Antikörpern ihre Identifikation möglich machen. Leider wird die Expression von anderen Zelltypen geteilt, die eine ähnliche Lokalisation in Geweben einnehmen. Das macht die Unterscheidung von Perizyten von Nicht-Perizyten zu einer Herausforderung (Kelly-Goss et al., 2014). Zu den am meisten verwendeten Perizyten-Markern gehören SMA , Desmin,

NG2 und der von Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktor (PDGFR- β) (Gerhardt et al., 2003). Desmin und PDGFR- β werden von reifen SMCs und interstitiellen Fibroblasten exprimiert. SMA identifiziert vaskuläre SMCs und Myofibroblasten. Der gebräuchlichste Marker, der in den letzten Jahren zur Identifizierung von Perizyten verwendet wurde, ist das NG2. Aber wie andere Perizytenmarker ist NG2 nicht exklusiv perizytenspezifisch (Kelly-Goss et al., 2014). Er kann Makrophagen, Gliazellen und verschiedene Arten von Tumorzellen identifizieren (Stapor et al., 2014). Die Expression der verschiedenen Marker ist je nach Art, Gewebe und sogar Entwicklungsstadium unterschiedlich und erschwert das Problem der Perizytenidentifikation. Zum Beispiel färben sich Perizyten, lokalisiert auf Mikrogefäßen in einem sich entwickelnden Hühnerembryo positiv für SMA aber Perizyten in der Maus-Retina nicht (Gerhardt et al., 2003). Klasse-III- β -Tubulin, das wie NG2 als ein Marker von neuronalen Vorläuferzellen im ZNS und peripheren Nerven bei Erwachsenen ist, stellt einen weiteren Perizytenmarker dar. Im Gegensatz zu anderen Markern könnte Klasse-III-Tubulin einen zeitlichen und räumlichen Marker für angiogene Perizyten *in vivo* bieten. In Gefäßen, die zur Angiogenese angeregt wurden, wird Klasse-III-Tubulin durch Perizyten entlang dieser Gefäße hochreguliert und anschließend, nach Kapillarsprossung, auf das nicht stimulierte Niveau herunterreguliert (Kelly-Goss et al., 2014). Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde mit Desmin und NG2 als Perizytenmarker gearbeitet. Da diese Marker, wie bereits erwähnt, auch andere Zellen wie reife SMAs, Fibroblasten oder Makrophagen, identifizieren können, könnte die Annahme, dass Perizyten ChAT exprimieren und so Einfluss auf die Angiogenese nehmen, sich als nicht korrekt erweisen. Die Aufnahme von weiteren Markern, wie zum Beispiel dem Klasse-III-Tubulin, könnte die Identifikation der ChAT-Zellen weiter eingrenzen. Das Carbachol eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese hat, konnte in Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Das Vorhandensein von ChAT bei der Gefäßentwicklung zeigt, dass es möglicherweise zu einer physiologischen ACh-Bildung und Freisetzung bei der Angiogenese kommt. Ob es sich bei den ACh-exprimierenden Zellen um Perizyten handeln könnte, müsste noch weiter untersucht werden.

4.4. Herkunft der Perizyten

Der Ursprung der Perizyten ist noch nicht hundertprozentig sicher geklärt. Sie können mehrere Ursprünge haben. Ein mesodermaler Ursprung wurde für Wandzellen vorgeschlagen, die sich um die neu bildenden Gefäße herum entwickeln (Armulik et al., 2005). Perizyten werden im Allgemeinen als Zellen mesenchymalen Ursprungs angesehen. Aber auch eine Entwicklung aus Endothelzellen wird diskutiert (Armulik et al., 2011). Es wurden ebenfalls Hinweise auf einen Knochenmarksursprung während der Angiogenese vorgeschlagen (Armulik et al., 2005). Auf die Frage, ob sich Perizyten in andere Zelltypen differenzieren können, muss man nach neusten Erkenntnissen hin zustimmen. Ein mutmaßlicher Mechanismus beruht auf einem gemeinsamen Vorläufertyp, der multipotente Differenzierungsmöglichkeiten aufweist: die mesenchymale Stammzelle (MSC). G.Paul et al. isolierten und charakterisierten im Jahr 2012 eine Vorläuferpopulation aus der Ventrikelwand und dem Neokortex im menschlichen Gehirn. Sie zeigten, dass diese Zellen Marker für MSCs und Perizyten *in vivo* und *in vitro* exprimieren und einen mesodermalen als auch neuroektodermale Phänotypen haben können. Es ist faszinierend, dass das Gehirn eine Zellpopulation beherbergt, die sowohl als Perizyten die Angiogenese modulieren und als neurale Vorläuferzellen neurale Gewebe regenerieren können (Kelly-Goss et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben, dass sich ChAT-Zellen während der Angiogenese in der Mitte und am Ende des neu gebildeten Gefäßes lokalisieren ließen. Andere Perizyten, die gerade Kontakt mit einem Gefäß aufnahmen oder sich an der Gefäßbasis befanden, wiesen keine ChAT-Aktivität auf. Ausgehend von den bisher gewonnenen Ergebnissen, könnte man annehmen, dass nicht alle Perizyten ChAT exprimieren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sie im Laufe der Angiogenese eine ChAT-Aktivität entwickeln, da sie sich in einen anderen Zellsubtypen umwandeln. Bis vor einigen Jahren wurde gedacht, dass Knochenmarkzellen und Endothelzellen, die das Lumen des ruhenden Blutgefäßes auskleiden, die einzigen Quellen für die Bereitstellung von Gefäßvorläuferzellen sind. Vor kurzem wurde in der Wand der erwachsenen Blutgefäße eine Nische für Stammzellen identifiziert, die sogenannte "vasculogene Zone". Diese, in der menschlichen Gefäßwand

residente CD44+ multipotenten Stammzellen, sind in der Lage sich in Perizyten und Zellen der glatten Muskulatur zu differenzieren (Klein et al., 2011). Außerdem steht die Differenzierung zu Makrophagen zur Diskussion (Zengin et al., 2006). Innerhalb der letzten 10 Jahre haben eine Reihe von Studien gezeigt, dass MSCs und Perizyten innerhalb der vasculogenen Zone kolokalisiert sind und viele identische Marker wie zum Beispiel CD 34, CD146, CD 45 oder CD56 exprimieren (Kelly-Goss et al., 2014). Mit der Annahme, dass die vasculogene Zone als systemisches Reservoir von gewebsresidenten Stammzellen dienen kann (Tilki et al., 2009), wurden eine Reihe von provokativen Fragen rund um das Thema MSC- und Perizytenidentität und -abstammung sowie deren mögliche Überlappung aufgeworfen. Ursprünglich aus dem Knochenmark isoliert, wurden MSCs von der *International Society for Cellular Therapy* als eine Zellpopulation definiert, die nach Entfernung aus dem Gewebe eine Reihe von definierter Oberflächenmarker (CD73, CD90 und CD105) exprimieren und die Fähigkeit besitzen, sich zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren zu können (Dominici et al., 2006). Einige Erkenntnisse bestätigen das Vorhandensein von MSCs in der vasculogenen Zone in einer Vielzahl von Geweben im gesamten Körper, einschließlich Fett, Muskeln, Knochen und Gehirn (Shi et al., 2003; Sacchetti et al., 2007; Lin et al., 2008; Tang et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Peault und Kollegen waren die ersten, die verschiedene MSC-Populationen aus dem Gefäßsystem mehrerer menschlicher Organe identifizierten, reinigten und charakterisierten (C. W. Chen et al., 2012). MSCs in der vasculogenen Zone wurden in Untergruppen wie Perizyten, adventielle Zellen und myogene Endothelzellen eingeteilt. Jede Untergruppe kann Adipogenese, Osteogenese und Chondrogenese in Kultur durchlaufen (Kelly-Goss et al., 2014). Das Ausmaß, in dem Perizyten eine gemeinsame Identität oder Linie mit MSCs teilen, kann sich von Gewebe zu Gewebe unterscheiden und von den Bedingungen (Ruhestatus vs. Stimulation) abhängen. In einer Studie wurden MSCs, die aus dem Knochenmark von GFP-transgenen Mäusen (C57BL/6, β -Actin-Promotor) entstammten, Mäusen mit Hautwunden intravenös injiziert. GFP-positive Knochenmarkszellen in der Wunde exprimierten den Perizytenmarker (Sasaki et al., 2008). Eine andere Studie zeigte, dass NG2 exprimierende

Perizyten aus dem Knochenmark rekrutiert werden, wenn die Mauskornea mit bFGF behandelt wird. So wird eine Angiogenese induziert (Ozerdem et al., 2004). Über 90% dieser isolierten und kultivierten Perizyten exprimierten CD45 oder CD11b, was auf eine hämatopoetische Herkunft und mesenchymale Linienüberlappung hinwies (Kelly-Goss et al., 2014). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde auch der Ursprung der Zellen, die ChAT exprimieren untersucht. Mit dem Hintergrundwissen aus früheren Studien (Zengin et al., 2006), dass sich in der vasculogenen Zone multipotente Stammzellen befinden, die sich in Perizyten differenzieren können, wurden die Aortenringe mit den Stammzellmarkern CD34, CD44 und dem Makrophagenmarker F4/80 angefärbt. Das Versuchsergebnis zeigte, dass sich Stammzellen in der Aortenwand befinden. Aber lediglich aufgrund der Lokalisation könnte man auf eine Übereinstimmung mit den ChAT-Zellen schließen. ChAT zeigt sich grün-fluoreszierend unter dem Fluoreszenzmikroskop, während die Stammzellmarker nur nach einer enzymatischen DAB-Reaktion zu erkennen waren. Da die Marker für ChAT-Zellen und für die Stammzellen verschiedenen Inkubationsbedingungen unterliegen ist eine Doppelfärbung nicht möglich. Die DAB-Reaktion führt zu einem Verlust der GFP-Fluoreszenz. Auf Grund dessen ist die Annahme, dass sich die ChAT-exprimierenden Zellen aus Stammzellen der Aortenwand entwickeln, nicht eindeutig belegt und müsste weiter untersucht werden. Wenn sich ein geeigneter Antikörper finden lassen würde, der eine solche Doppelfärbung zulässt, wäre es lohnenswert diese Versuche durchzuführen.

4.5. Ausblick in Therapieideen

Diese Arbeit hatte zum Ziel die Mechanismen der Angiogenese weiter zu entschlüsseln. Die gelenkte oder die verhinderte Bildung neuer Blutgefäße ist von großem wissenschaftlichem Interesse, da sie zu neuen Therapiemöglichkeiten führen könnte. Angiogenese-abhängige Erkrankungen wurden erstmals 1971 von Judah Folkman beschrieben. Er berichtete, dass die Blockierung der Blutgefäßbildung in Tumorzellen, zur Unterdrückung des Wachstums und der Metastasierung von Krebszellen führt (Folkman, 2007). Die anti-angiogene

Therapie ist ein neuartiger und wirksamer Ansatz zur Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen wie Krebs, diabetischer Retinopathie und altersbedingter Makuladegeneration (Fallah et al., 2019). Tumore müssen schnell ein neues Gefäßnetzwerk entwickeln, um die hohe Proliferationsrate von Krebszellen zu unterstützen (Viallard et al., 2017). Tumorgefäße sind unreif und ihre Funktionalität ist beeinträchtigt (Carmeliet et al., 2011b). Die Ursache der fehlerhaften Entwicklung liegt zum Teil an dem Einfluss von abnormalen Wachstumsfaktoren wie VEGF, Angiopoietine, PDGF- β oder TGF- β (Carmeliet et al., 2011a). Die hypoxische Mikroumgebung, die durch die beeinträchtigte Tumorperfusion beeinträchtigt wird, kann die tumorabtötende Wirkung von Immunzellen behindern und auch die Diffusion von Chemotherapeutika und Strahlentherapieeffizienz herabsetzen (Viallard et al., 2017). Hier hat sich die Normalisierung der Gefäße in Tumoren als Therapieziel herausgestellt. Eine sorgfältige Dosierung von VEGF-Inhibitoren kann das Niveau angiogener Signale in den Tumoren wiederherstellen. Dies führt zu einer geringeren Permeabilität, indem die Zell-Zell-Kontakte verstärkt und die Perizyten aktiv rekrutiert werden. Es kommt zu einer erhöhten Tumorperfusion und so zu einer höheren Wirksamkeit beim Einsatz von Chemotherapeutika und der Strahlentherapie (Tolaney et al., 2015). Andere Forschungen konzentrieren sich auf die Anti-Angiogenese-Therapie. Zweck ist es die Sauerstoffversorgung von Krebszellen zu blockieren (Fallah et al., 2019). Dies wird momentan durch monoklonale Antikörper, MicroRNAs, Aptamere, Gentherapie, kleine Inhibitor-Moleküle, Endostatin und Zelltherapie mit chimären Antigenrezeptor-T-Zellen versucht (Abdalla et al., 2018). Die molekularen Mechanismen der Angiogenese sind hervorragende Angriffspunkte für eine gezielte Krebstherapie (Ferrara et al., 2004). Es wurde herausgefunden, dass die Anti-angiogene-Therapie, die auf VEGF abzielt, Antikrebswirkung durch Induktion des Zelltods in Krebszellen ausübt (Folkman, 2007). Die anti-angiogenen monoklonalen Antikörper binden an das VEGF-Protein, dem VEGFR oder an Signalmolekülen des VEGF-Signaltransduktionsweges (Fallah et al., 2019). Es wird Bevacizumab verwendet, der die Angiogenese hemmt, indem er die VEGF-A165-Isoform blockiert, die an den VEGFR-2 bindet (Ferrara et al., 2004). Auch Ramucirumab ist ein

monoklonaler Antikörper, der an VEGFR-2 bindet und die VEGF-A stimulierende Proliferation und Migration von Endothelzellen blockiert, was zur Unterdrückung der Tumorangiogenese führt (A. D. Singh et al., 2015). Da anzunehmen ist, dass ACh über seine Rezeptoren ähnlich auf die Angiogenese wirkt wie VEGF über VEGFR, ist es sinnvoll, weitere Forschungen in Richtung einer verminderten Ausschüttung von ACh vorzunehmen. Es könnte zu einer erfolgreichen Anti-Angiogenese beitragen. Dies wäre von Bedeutung, da diese Therapie schon klinische und präklinische Erfolge bei Krebs und anderen Krankheiten gezeigt hat. Das therapeutische Hauptziel ist die Unterdrückung der Metastasierung bei Hochrisikopatienten und die Verhinderung des Wiederauftretens zusätzlicher Metastasen bei Krebspatienten (Fallah et al., 2019). Die Anti-angiogene-Therapie wird normalerweise in Kombination mit einer Chemotherapie angewendet, um die Überlebensrate zu steigern (Fleetwood et al., 2014). Bei nicht-kleinzelligen Lungenkrebspatienten konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Bevacizumab in Kombination mit Erlotinib zu einem besseren klinischen Ansprechen als eine Monotherapie führt (Herbst et al., 2007). Anti-VEGF/VEGFR-Antikörper werden erfolgreich zur Behandlung von Darmkrebs eingesetzt. Bevacizumab wird in Kombination mit 5-Fluoruracil als Erstbehandlung bei metastasierenden Darmkrebs verwendet (Ferrara, 2016). Eine weitere Studie berichtet über den Erfolg der Genterapie bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (Deng et al., 2017). Nicht nur bei der Krebsforschung, sondern auch bei anderen Erkrankungen führt die Anti-Angiogenese-Therapie zum Erfolg. Die altersbedingte Makuladegeneration ist eine altersabhängige degenerative Erkrankung (Fallah et al., 2019). Sie wird in den frühen, mittleren und späten Typen eingeteilt (Bandello et al., 2017). Der späte Typ wird nochmals in den feuchten, angiogenese-abhängigen und in den trockenen, angiogenese-unabhängigen Typen unterteilt (Ambati et al., 2012). Beim späten feuchten Typen hat die anti-angiogene Therapie gegen VEGF-A bei vielen Patienten zu einer Verbesserung des zentralen Sehens geführt (Fritsche et al., 2013). Aktuell wird die Anti-VEGF-Therapie als Standardtherapie für die neovaskuläre altersbedingte Makuladegeneration eingesetzt. Aflibercept und Ranibizumab zeigten gute klinische Ergebnisse. Es führte zur Abnahme der

Sehstörungen aufgrund von Netzhautvenenverschlüssen (Almuhtaseb et al., 2017). Eine weitere Erkrankung, bei der die anti-angiogene Therapie eingesetzt wird, ist die diabetische Retinopathie. Die pathologische Angiogenese ist hier durch zerbrechliche Blutgefäße, die Durchblutungsstörungen aufweisen, gekennzeichnet. Dadurch bekommen die Augenzellen weniger Sauerstoff und Nährstoffe (Duh et al., 2017). Es führt zu fleckigen oder trüben Sehen und ist weltweit die häufigste Nebenwirkung bei Diabetes mellitus (Safi et al., 2014). Neben einer Behandlung mit Laserphotokoagulation, intravitrealem Steroiden oder Vitrektomie kann die diabetische Retinopathie auch im fortgeschrittenen Stadium mit einer Anti-VEGF-Therapie therapiert werden (Nirmal et al., 2016). Trotz Visusverlust bei einigen Patienten nach der Anti-VEGF-Therapie wurden zwei monoklonale Antikörper (Aflibercept und Ranibizumab) zur Behandlung zugelassen (Semeraro et al., 2013). Trotz aller Fortschritte bei der Entwicklung von anti-angiogenen Wirkstoffen, bleibt die nicht zielgerichtete Wirkung dieser Wirkstoffe bei der Unterdrückung der Angiogenese in gesunden Geweben eine große Herausforderung für die klinische Verwendung (Fallah et al., 2019).

Auch die Perizyten rücken weiter in den Fokus der Forschung angiogeneseabhängiger Erkrankungen. Aktuelle Studien zeigen, dass Perizyten, durch Induktion der Angiogenese und des Metastasierungsprozesses, zum Fortschreiten des Tumors beitragen (Hosaka et al., 2016). Perizyten von Tumorgefäßen weisen eine ungeordnete Anordnung, aberrante Zellformen, veränderte Morphologien und eine lockerere Gefäßanbindung auf (Ferland-McCollough et al., 2017). Perizyten die aufgrund von PDGF- β rekrutiert werden, setzen verschiedene angiogene Faktoren frei. Darunter sind VEGF, Ang-2 und MMP (Ferland-McCollough et al., 2017). Vielleicht wird auch das ACh von Perizyten exprimiert. Weiterführende Forschungen in diese Richtung würden dem Verständnis der Tumorangiogenese helfen.

Neben der Suche von Angiogenesehemmern ist auch die pro-angiogenetische Therapie von größtem Interesse. Ältere Menschen leiden meist unter Alterserscheinungen wie Muskelschwäche, Kälteintoleranz Gedächtnisstörungen, Hautfalten und unter einer langsamen Heilung von Hautverletzungen (Ambrose, 2016). Diese Beschwerden haben eine gemeinsame vaskuläre

Ursache (Ambrose, 2017). Die Zahl der Kapillaren und die Menge an angiogenen Wachstumsfaktoren sinken signifikant (Ambrose, 2017). Es konnte gezeigt werden, dass angiogene Faktoren innerhalb weniger Tage eine neue Kapillarbildung in ischämischen und normoxischen Geweben induzieren können (Ambrose, 2017). Trotz erheblicher medizinischer Fortschritte sind Myokardischämie und periphere arterielle Verschlusskrankheiten zwei Hauptursachen für die Morbidität und Mortalität von Menschen (Uccelli et al., 2019). Langsam wachsende atherosklerotische Plaques verursachen eine fortschreitende Obstruktion der Arterien. Ihr plötzlicher Riss mit anschließender Thrombose führt zu Ereignissen wie einem Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Uccelli et al., 2019). Die therapeutische Angiogenese zielt darauf ab, eine ausreichende Durchblutung des ischämischen Gewebes durch die Erzeugung neuer Gefäßnetzwerke wiederherzustellen. Dies geschieht durch die Abgabe spezifischer Wachstumsfaktoren. VEGF ist der grundlegende Regulator des Gefäßwachstums und auch hier das Hauptziel therapeutischer Angiogeneseansätze (Uccelli et al., 2019). Es konnte herausgefunden werden, dass eine VEGF-Stimulation, die kürzer als 4 Wochen ist, nicht ausreicht, um die neu gebildeten Gefäße stabil zu halten. Das Verständnis der Mechanismen der Gefäßstabilisierung, vor allem der Rekrutierung von Perizyten und der Herstellung eines Zell-Zell-Kontakts zwischen ihnen und dem Endothel, ist entscheidend (Uccelli et al., 2019). Ziel dieser Arbeit war es, die Angiogenese mit ihren Mechanismen noch genauer zu verstehen. Es konnte gezeigt werden, dass ACh, wie VEGF, als Angiogenese-Stimulator angesehen werden kann und somit auch Aufmerksamkeit in weiteren Forschungen verdient.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des ACh und des cholinergen Signallings in der Angiogenese. Neben der klassischen Rolle des AChs im neuronalen System, konnten es in den letzten Jahren auch in nicht-neuronal innerviertem Gewebe festgestellt werden. In dieser Arbeit konzentrierte man sich auf beobachtete cholinerge Zellen in der Aortenwand einer ChAT-eGFP-Maus und in davon ausgehenden neu gebildeten Gefäßen. Nach Durchführung des Aortenringassays nach Baker konnte zunächst nachgewiesen werden, dass es sich bei ACh um einen Angiogenese-Stimulator handelt. Mit Carbachol stimulierte Aortenringe bildeten neue stabile Gefäße aus. Als Vergleichsmodell wurden hierbei mit VEGF, einem bekannten angiogenen Wachstumsfaktor, stimulierte Ringe genutzt. Eine Carbacholkonzentration von 1 μM erwies sich als bester Angiogenesestimulator. Der Inhibitorversuch mit Lenvatinib, einem Hemmer des VEGFR, zeigte, dass die cholinerge Wirkung zur Aktivierung ähnlicher angiogeneseseinhibierenden Mechanismen, wie bei einer VEGF-Stimulation führt. Bei der zeitlichen Weiterverfolgung des Versuchs konnte man feststellen, dass sich die Gefäßformation mit Dauer des Versuches ändert. Nach Tag 5 kam es zu einer gerichteten Aussprossung von primären und sekundären Gefäßen. Nach Tag 7 hatte sich ein großes stabiles ringartiges Gefäß um den Aortenring gebildet, von dem nun die sekundären Gefäße abgingen. Ab Versuchstag 11 ließen sich auch Zellen bis hin zum Rand des Wells finden.

Bei der immunhistologischen Analyse der neu gebildeten Gefäße wurde am ehesten eine Überlappung der ChAT-Zellen mit Zellen gefunden, die sich positiv für die Perizytenmarker NG2 und Desmin zeigten. Zu keiner Überlappung kam es bei Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 und Lectin, dem Glattmuskelzellmarker SMA und mit dem Fibroblastenmarker α -Vimentin. Es ist anzunehmen, dass das ACh, exprimiert von einigen Perizyten, eine Leitschiene für das sich neu bildende Gefäß bietet und zu einem gerichteten Wachstum führt. Vor Kurzem wurde in der Wand erwachsener Blutgefäße eine Nische für

Stammzellen identifiziert. Um zu untersuchen ob die ChAT-Zellen dort ihren Ursprung haben, wurde mit Stammzellmarkern wie CD34, CD44 und dem Makrophagenmarker F4/80 weiterführend gearbeitet. Da die Marker für ChAT-Zellen und für Stammzellen verschiedenen Inkubationsbedingungen unterliegen, war eine Doppelfärbung nicht möglich. Es wird vermutet, dass sich ChAT-Zellen aus Stammzellen dieser Nische entwickeln. Diese Arbeit liefert mit ihren Ergebnissen eine signifikante Grundlage für weiterführende Studien.

6. Literaturverzeichnis

- Abdalla, A. M. E., Xiao, L., Ullah, M. W., Yu, M., Ouyang, C., & Yang, G. (2018). Current Challenges of Cancer Anti-angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics. *Theranostics*, 8(2), 533-548. doi:10.7150/thno.21674
- Abdel-Hamid, N. M., & Abdullah, A. H. (2019). Serum histamine and acetylcholine variations as new noninvasive biochemical markers in staging of experimental hepatocellular carcinoma. *Clinical and Experimental Medicine*, 19(1), 115-120. doi:10.1007/s10238-018-0537-y
- Acevedo, M. (1994). Effect of acetyl choline on ion transport in sheep tracheal epithelium. *Pflugers Arch*, 427(5-6), 543-546.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 89(1), 73-120. doi:10.1152/physrev.00015.2008
- Allt, G., & Lawrenson, J. G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*, 169(1), 1-11. doi:10.1159/000047855
- Almuhtaseb, H., Kanavati, S., Rufai, S. R., & Lotery, A. J. (2017). One-year real-world outcomes in patients receiving fixed-dosing aflibercept for neovascular age related macular degeneration. *Eye*, 31(6), 878-883. doi:10.1038/eye.2017.6
- Ambati, J., & Fowler, B. J. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, 75(1), 26-39. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.018
- Ambrose, C. T. (2016). The Role of Capillaries in the Lesser Ailments of Old Age and in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: The Potential of Pro-Therapeutic Angiogenesis. *Journal of Alzheimers Disease*, 54(1), 31-43. doi:10.3233/Jad-160303
- Ambrose, C. T. (2017). Pro-Angiogenesis Therapy and Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, 63(5), 393-400. doi:10.1159/000477402

- Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, *97*(6), 512-523.
doi:10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7
- Armulik, A., Genove, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental Cell*, *21*(2), 193-215. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., & Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *36*(2), 451-455. doi:10.1177/0271678x15610340
- Augustin, H. G. (2001). Tubes, branches, and pillars: the many ways of forming a new vasculature. *Circ Res*, *89*(8), 645-647.
- Bader, S., Klein, J., & Diener, M. (2014). Choline acetyltransferase and organic cation transporters are responsible for synthesis and propionate-induced release of acetylcholine in colon epithelium. *Eur J Pharmacol*, *733*, 23-33. doi:10.1016/j.ejphar.2014.03.036
- Baker, M., Robinson, S. D., Lechertier, T., Barber, P. R., Tavora, B., D'Amico, G., . . . Hodivala-Dilke, K. (2012). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature Protocols*, *7*(1), 89-104.
doi:10.1038/nprot.2011.435
- Bandello, F., Sacconi, R., Querques, L., Corbelli, E., Cicinelli, M. V., & Querques, G. (2017). Recent advances in the management of dry age-related macular degeneration: A review. *F1000Res*, *6*, 245.
doi:10.12688/f1000research.10664.1
- Bao, L., Meng, Q., Li, Y., Deng, S., Yu, Z., Liu, Z., . . . Fan, H. (2017). C-Kit Positive Cardiac Stem Cells and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Synergistically Enhance Angiogenesis and Improve Cardiac Function After Myocardial Infarction in a Paracrine Manner. *J Card Fail*, *23*(5), 403-415. doi:10.1016/j.cardfail.2017.03.002
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., . . . Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, *2*(10), 737-744.
doi:10.1038/35036374

- Bichsel, C. A., Hall, S. R., Schmid, R. A., Guenat, O. T., & Geiser, T. (2015). Primary Human Lung Pericytes Support and Stabilize In Vitro Perfusable Microvessels. *Tissue Eng Part A*, 21(15-16), 2166-2176. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0545
- Cabanillas, M. E., & Habra, M. A. (2016). Lenvatinib: Role in thyroid cancer and other solid tumors. *Cancer Treat Rev*, 42, 47-55. doi:10.1016/j.ctrv.2015.11.003
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389-395. doi:10.1038/74651
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., . . . Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435-439. doi:10.1038/380435a0
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257. doi:10.1038/35025220
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011a). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi:10.1038/nature10144
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011b). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6), 417-427. doi:10.1038/nrd3455
- Carmeliet, P., & Luttun, A. (2001). The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost*, 86(1), 289-297.
- Chen, C. W., Corselli, M., Peault, B., & Huard, J. (2012). Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 597439. doi:10.1155/2012/597439
- Chen, S., Hou, J. H., Feng, X. Y., Zhang, X. S., Zhou, Z. W., Yun, J. P., . . . Cai, M. Y. (2013). Clinicopathologic significance of putative stem cell marker, CD44 and CD133, in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol*, 107(8), 799-806. doi:10.1002/jso.23337

- Chen, Z., Xu, X. H., & Hu, J. (2016). Role of pericytes in angiogenesis: focus on cancer angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Neoplasma*, 63(2), 173-182. doi:10.4149/201_150704N369
- Cooke, J. P. (2007). Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci*, 80(24-25), 2347-2351. doi:10.1016/j.lfs.2007.01.061
- Cross, M. J., & Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 201-207. doi:10.1016/S0165-6147(00)01676-X
- da Silva, R. G., Tavora, B., Robinson, S. D., Reynolds, L. E., Szekeres, C., Lamar, J., . . . Hodivala-Dilke, K. M. (2010). Endothelial alpha3beta1-integrin represses pathological angiogenesis and sustains endothelial-VEGF. *Am J Pathol*, 177(3), 1534-1548. doi:10.2353/ajpath.2010.100043
- Darden, J., Payne, L. B., Zhao, H., & Chappell, J. C. (2018). Excess vascular endothelial growth factor-A disrupts pericyte recruitment during blood vessel formation. *Angiogenesis*. doi:10.1007/s10456-018-9648-z
- de Jonge, W. J., & Ulloa, L. (2007). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*, 151(7), 915-929. doi:10.1038/sj.bjp.0707264
- Dellas, Claudia. (2015). *Last Minute Pharmakologie* Urban & Fischer
- Deng, H. X., Wang, Y., Ding, Q. R., Li, D. L., & Wei, Y. Q. (2017). Gene therapy research in Asia. *Gene Ther*, 24(9), 572-577. doi:10.1038/gt.2017.62
- Dimova, I., Popivanov, G., & Djonov, V. (2014). Angiogenesis in cancer - general pathways and their therapeutic implications. *Journal of Buon*, 19(1), 15-21.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905

- Duh, E. J., Sun, J. K., & Stitt, A. W. (2017). Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*, 2(14). doi:10.1172/jci.insight.93751
- Durham, J. T., Surks, H. K., Dulmovits, B. M., & Herman, I. M. (2014). Pericyte contractility controls endothelial cell cycle progression and sprouting: insights into angiogenic switch mechanics. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(9), C878-892. doi:10.1152/ajpcell.00185.2014
- Eelen, G., de Zeeuw, P., Treppe, L., Harjes, U., Wong, B. W., & Carmeliet, P. (2018). Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev*, 98(1), 3-58. doi:10.1152/physrev.00001.2017
- Ehrmann, R. L., & Knoth, M. (1968). Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst*, 41(6), 1329-1341.
- Espanol, A. J., de la Torre, E., Fiszman, G. L., & Sales, M. E. (2007). Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression. *Life Sci*, 80(24-25), 2281-2285. doi:10.1016/j.lfs.2006.12.017
- Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H. R., Bradaran, B., . . . Molavi, O. (2019). Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomed Pharmacother*, 110, 775-785. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.022
- Ferland-McCollough, D., Slater, S., Richard, J., Reni, C., & Mangialardi, G. (2017). Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology. *Pharmacol Ther*, 171, 30-42. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.11.008
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2(10), 795-803. doi:10.1038/nrc909
- Ferrara, N. (2016). VEGF and Intraocular Neovascularization: From Discovery to Therapy. *Translational Vision Science & Technology*, 5(2). doi:ARTN 10
10.1167/tvst.5.2.10
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669-676. doi:10.1038/nm0603-669

- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., & Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(5), 391-400. doi:10.1038/nrd1381
- Fleetwood, F., Klint, S., Hanze, M., Gunneriusson, E., Frejd, F. Y., Stah, S., & Lofblom, J. (2014). Simultaneous targeting of two ligand-binding sites on VEGFR2 using biparatopic Affibody molecules results in dramatically improved affinity. *Scientific Reports*, 4. doi:ARTN 7518
10.1038/srep07518
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 6(4), 273-286. doi:10.1038/nrd2115
- Folkman, J., Bach, M., Rowe, J. W., Davidoff, F., Lambert, P., Hirsch, C., . . . Henshaw, E. (1971). Tumor Angiogenesis - Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182-&
- Friedman, J. R., Richbart, S. D., Merritt, J. C., Brown, K. C., Nolan, N. A., Akers, A. T., . . . Dasgupta, P. (2019). Acetylcholine signaling system in progression of lung cancers. *Pharmacol Ther*, 194, 222-254. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.10.002
- Fritsche, L. G., Chen, W., Schu, M., Yaspan, B. L., Yu, Y., Thorleifsson, G., . . . Consortium, AMD Gene. (2013). Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics*, 45(4), 433-439. doi:10.1038/ng.2578
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., & Kawashima, K. (2017). Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci*, 134(1), 1-21. doi:10.1016/j.jphs.2017.05.002
- Fujii, T., Takada-Takatori, Y., & Kawashima, K. (2012). Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells. *Life Sci*, 91(21-22), 981-985. doi:10.1016/j.lfs.2012.04.031
- Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., . . . Yancopoulos, G. D. (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued

- by angiopoietin-1. *Developmental Cell*, 3(3), 411-423. doi:10.1016/S1534-5807(02)00217-4
- Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 314(1), 15-23. doi:10.1007/s00441-003-0745-x
- Goldmann, E. (1908). The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System. *Proc R Soc Med*, 1(Surg Sect), 1-13.
- Goodwin, A. M. (2007). In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular Research*, 74(2-3), 172-183. doi:10.1016/j.mvr.2007.05.006
- Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*, 74(6), 363-396. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006
- Grando, S. A., Pittelkow, M. R., & Schallreuter, K. U. (2006). Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(9), 1948-1965. doi:10.1038/sj.jid.5700151
- Greenblatt, M., & Shubi, P. (1968). Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst*, 41(1), 111-124.
- Groppa, E., Brkic, S., Uccelli, A., Wirth, G., Korpisalo-Pirinen, P., Filippova, M., . . . Banfi, A. (2018). EphrinB2/EphB4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by VEGF. *EMBO Rep*, 19(5). doi:10.15252/embr.201745054
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., . . . Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55-60. doi:10.1038/nature13165
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

- Heeschen, C., Weis, M., Aicher, A., Dimmeler, S., & Cooke, J. P. (2002). A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest*, *110*(4), 527-536. doi:10.1172/JCI14676
- Heeschen, C., Weis, M., & Cooke, J. P. (2003). Nicotine promotes arteriogenesis. *J Am Coll Cardiol*, *41*(3), 489-496.
- Herbst, R. S., O'Neill, V. J., Fehrenbacher, L., Belani, C. P., Bonomi, P. D., Hart, L., . . . Sandler, A. (2007). Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, *25*(30), 4743-4750. doi:10.1200/JCO.2007.12.3026
- Hlushchuk, R., Barre, S., & Djonov, V. (2016). Morphological Aspects of Tumor Angiogenesis. *Methods Mol Biol*, *1464*, 13-24. doi:10.1007/978-1-4939-3999-2_2
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., & De Bruijn, E. A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, *56*(4), 549-580. doi:10.1124/pr.56.4.3
- Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Fischer, C., Dubey, O., Fredlund, E., . . . Cao, Y. (2016). Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(38), E5618-5627. doi:10.1073/pnas.1608384113
- Houdebine, L. M. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods Mol Biol*, *360*, 163-202. doi:10.1385/1-59745-165-7:163
- Hu, Q., Wang, X. Y., Kang, L. K., Wei, H. M., Xu, C. M., Wang, T., & Wen, Z. H. (2016). RGD-Targeted Ultrasound Contrast Agent for Longitudinal Assessment of Hep-2 Tumor Angiogenesis In Vivo. *PLoS One*, *11*(2), e0149075. doi:10.1371/journal.pone.0149075
- Joussen, A. M., Kirchhof, B., & Gottstein, C. (2003). [Molecular mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis. What regulates vascular growth?]. *Ophthalmologe*, *100*(4), 284-291. doi:10.1007/s00347-003-0799-x

- Kalka, C., Asahara, T., Krone, W., & Isner, J. M. (2000). [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz*, 25(6), 611-622.
- Kalka, C., & Isner, JM. (2002). Kardiale und vaskuläre Gentherapie in der Kardiologie Derzeitiger Stand und Ausblick. *Der Internist*, 43(1), S66-S75.
- Kawashima, K., & Fujii, T. (2004). Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci*, 9, 2063-2085.
- Kelly-Goss, M. R., Sweat, R. S., Stapor, P. C., Peirce, S. M., & Murfee, W. L. (2014). Targeting pericytes for angiogenic therapies. *Microcirculation*, 21(4), 345-357. doi:10.1111/micc.12107
- Khorshidi, A., Dhaliwal, P., & Yang, B. B. (2016). Noncoding RNAs in Tumor Angiogenesis. *Long and Short Noncoding Rnas in Cancer Biology*, 927, 217-241. doi:10.1007/978-981-10-1498-7_8
- Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., . . . Esumi, H. (2000). Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, 95(1), 189-197.
- Klapproth, H., Reinheimer, T., Metzen, J., Munch, M., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., . . . Wessler, I. (1997). Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 355(4), 515-523.
- Klein, D., Weisshardt, P., Kleff, V., Jastrow, H., Jakob, H. G., & Ergun, S. (2011). Vascular wall-resident CD44+ multipotent stem cells give rise to pericytes and smooth muscle cells and contribute to new vessel maturation. *PLoS One*, 6(5), e20540. doi:10.1371/journal.pone.0020540
- Koepsell, H., Lips, K., & Volk, C. (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*, 24(7), 1227-1251. doi:10.1007/s11095-007-9254-z

- Kroll, J., & Waltenberger, J. (2000). [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z Kardiol*, 89(3), 206-218.
- Kucera, M., & Hrabovska, A. (2015). [Cholinergic system of the heart]. *Ceska Slov Farm*, 64(6), 254-263.
- Kummer, W., & Krasteva-Christ, G. (2014). Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Curr Opin Pharmacol*, 16, 43-49.
doi:10.1016/j.coph.2014.03.001
- Kummer, W., Lips, K. S., & Pfeil, U. (2008). The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol*, 130(2), 219-234. doi:10.1007/s00418-008-0455-2
- Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., Kawashima, K., & Grando, S. A. (2007). The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res*, 39(2), 125-135. doi:10.1055/s-2007-961816
- Lakstygala, A. M., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Zabegalov, K. N., Volgin, A. D., Demin, K. A., . . . Kalueff, A. V. (2019). DARK Classics in Chemical Neuroscience: Atropine, Scopolamine, and Other Anticholinergic Deliriant Hallucinogens. *ACS Chem Neurosci*, 10(5), 2144-2159. doi:10.1021/acchemneuro.8b00615
- Lawson, N. D., & Weinstein, B. M. (2002). In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, 248(2), 307-318. doi:10.1006/dbio.2002.0711
- Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., . . . Iruela-Arispe, M. L. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, 130(4), 691-703.
doi:10.1016/j.cell.2007.06.054
- Lin, G., Garcia, M., Ning, H., Banie, L., Guo, Y. L., Lue, T. F., & Lin, C. S. (2008). Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells and Development*, 17(6), 1053-1063. doi:10.1089/scd.2008.0117
- Lips, K. S., Wunsch, J., Zarghooni, S., Bschiepfer, T., Schukowski, K., Weidner, W., . . . Kummer, W. (2007). Acetylcholine and molecular

- components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol*, 51(4), 1042-1053. doi:10.1016/j.eururo.2006.10.028
- Liu, W. B., Reinmuth, N., Stoeltzing, O., Parikh, A. A., Fan, F., Ahmad, S. A., . . . Ellis, L. M. (2002). Antiangiogenic therapy targeting factors that enhance endothelial cell survival. *Seminars in Oncology*, 29(3), 96-103. doi:10.1053/sonc.2002.34061
- Lüllmann-Rauch, Renate (2012). *Histologie* (Thieme Ed. 4 ed.). Stuttgart
- Matsui, T., Nakata, T., & Kobayashi, Y. (2016). Localization of organic cation transporter 2 (OCT2) in monoaminergic and cholinergic axon terminals of the mouse brain. *Neurosci Lett*, 633, 118-124. doi:10.1016/j.neulet.2016.09.025
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., & Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*, 18(5), 1135-1149.
- Nickell, J. R., Grinevich, V. P., Siripurapu, K. B., Smith, A. M., & Dvoskin, L. P. (2013). Potential therapeutic uses of mecamylamine and its stereoisomers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 108, 28-43. doi:10.1016/j.pbb.2013.04.005
- Nirmal, J., Radhakrishnan, K., Moreno, M., Natarajan, J. V., Laude, A., Lim, T. H., . . . Agrawal, R. (2016). Drug, delivery and devices for diabetic retinopathy (3Ds in DR). *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(11), 1625-1637. doi:10.1080/17425247.2016.1188800
- Nomura, J., Hosoi, T., Okuma, Y., & Nomura, Y. (2003). The presence and functions of muscarinic receptors in human T cells: the involvement in IL-2 and IL-2 receptor system. *Life Sci*, 72(18-19), 2121-2126.
- Norrby, K. (2006). In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 10(3), 588-612.
- Oehler, M. K., Hague, S., Rees, M. C., & Bicknell, R. (2002). Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis. *Oncogene*, 21(18), 2815-2821. doi:10.1038/sj.onc.1205374

- Oreilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., . . . Folkman, J. (1994). Angiostatin - a Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung-Carcinoma. *Cell*, *79*(2), 315-328. doi:Doi 10.1016/0092-8674(94)90200-3
- Ozelsel, T. J., Sondekoppam, R. V., Ip, V. H. Y., & Tsui, B. C. H. (2019). Re-defining the 3R's (reduce, refine, and replace) of sustainability to minimize the environmental impact of inhalational anesthetic agents. *Can J Anaesth*, *66*(3), 249-254. doi:10.1007/s12630-018-01279-3
- Ozerdem, U., Grako, K. A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., & Stallcup, W. B. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental Dynamics*, *222*(2), 218-227. doi:DOI 10.1002/dvdy.1200
- Ozerdem, U., & Stallcup, W. B. (2004). Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis*, *7*(3), 269-276. doi:10.1007/s10456-004-4182-6
- Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P., & Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, *443*(7112), 700-704. doi:10.1038/nature05193
- Perera, R. K., Fischer, T. H., Wagner, M., Dewenter, M., Vettel, C., Bork, N. I., . . . Nikolaev, V. O. (2017). Atropine augments cardiac contractility by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase type 4. *Sci Rep*, *7*(1), 15222. doi:10.1038/s41598-017-15632-x
- Pfeil, U., Vollerthun, R., Kummer, W., & Lips, K. S. (2004). Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta. *Histochem Cell Biol*, *122*(2), 121-130. doi:10.1007/s00418-004-0687-8
- Pitulescu, M. E., Schmidt, I., Benedito, R., & Adams, R. H. (2010). Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nature Protocols*, *5*(9), 1518-1534. doi:10.1038/nprot.2010.113
- Polverini, P. J. (2002). Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ*, *66*(8), 962-975.

- Ponce, A. M., & Price, R. J. (2003). Angiogenic stimulus determines the positioning of pericytes within capillary sprouts in vivo. *Microvascular Research*, 65(1), 45-48. doi:Pii S0026-2862(02)00014-6
Doi 10.1016/S0026286202000146
- Prado, V. F., Roy, A., Kolisnyk, B., Gros, R., & Prado, M. A. (2013). Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem J*, 450(2), 265-274. doi:10.1042/BJ20121662
- Proskocil, B. J., Sekhon, H. S., Jia, Y. B., Savchenko, V., Blakely, R. D., Lindstrom, J., & Spindel, E. R. (2004). Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology*, 145(5), 2498-2506. doi:10.1210/en.2003-1728
- Rassow, Joachim; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer. (2008). *Biochemie Duale Reihe* (2. Auflage ed.): Thieme
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H., & Verfaillie, C. M. (2008). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow (vol 109, pg 337, 2002). *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3813-3813. doi:10.1172/Jci14327
- Reynolds, L. E., Watson, A. R., Baker, M., Jones, T. A., D'Amico, G., Robinson, S. D., . . . Hodivala-Dilke, K. M. (2010). Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature*, 465(7299), 813-813. doi:10.1038/nature09106
- Reynolds, L. E., Wyder, L., Lively, J. C., Taverna, D., Robinson, S. D., Huang, X., . . . Hodivala-Dilke, K. M. (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nature Medicine*, 8(1), 27-34. doi:10.1038/nm0102-27
- Ribatti, D. (2008). Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Useful Tool to Study Angiogenesis. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 270, 270, 181-224. doi:10.1016/S1937-6448(08)01405-6
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental Biology*, 372(2), 157-165. doi:10.1016/j.ydbio.2012.09.018

- Ribatti, D., Nico, B., & Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol*, *55*(3), 261-268. doi:10.1387/ijdb.103167dr
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., & Vacca, A. (2007). The structure of the vascular network of tumors. *Cancer Lett*, *248*(1), 18-23. doi:10.1016/j.canlet.2006.06.007
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, *386*(6626), 671-674. doi:10.1038/386671a0
- Rouhi, P., Jensen, L. D., Cao, Z., Hosaka, K., Lanne, T., Wahlberg, E., . . . Cao, Y. (2010). Hypoxia-induced metastasis model in embryonic zebrafish. *Nature Protocols*, *5*(12), 1911-1918. doi:10.1038/nprot.2010.150
- Rouwkema, J., & Khademhosseini, A. (2016). Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. *Trends Biotechnol*, *34*(9), 733-745. doi:10.1016/j.tibtech.2016.03.002
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., . . . Bianco, P. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, *131*(2), 324-336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025
- Safi, S. Z., Qvist, R., Kumar, S., Batumalaie, K., & Bin Ismail, I. S. (2014). Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets. *Biomed Research International*. doi:Artn 801269
10.1155/2014/801269
- Sales, M. E., Espanol, A. J., Salem, A. R., Martinez, P. P., Sanchez, Y., & Sanchez, F. (2018). Role of muscarinic acetylcholine receptors in Breast Cancer. Design of metronomic chemotherapy. *Curr Clin Pharmacol*. doi:10.2174/1574884714666181203095437
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., & Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology*, *180*(4), 2581-2587. doi:DOI
10.4049/jimmunol.180.4.2581

- Schaper, W. (2009). Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol*, 104(1), 5-21. doi:10.1007/s00395-008-0760-x
- Semeraro, F., Morescalchi, F., Duse, S., Parmeggiani, F., Gambicorti, E., & Costagliola, C. (2013). Aflibercept in wet AMD: specific role and optimal use. *Drug Design Development and Therapy*, 7, 711-722. doi:10.2147/Dddt.S40215
- Seo, D. W., Li, H., Guedez, L., Wingfield, P. T., Diaz, T., Salloum, R., . . . Stetler-Stevenson, W. G. (2003). TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell*, 114(2), 171-180.
- Shafei, A. E., Ali, M. A., Ghanem, H. G., Shehata, A. I., Abdelgawad, A. A., Handal, H. R., . . . El-Shal, A. S. (2017). Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction. *J Gene Med*, 19(12). doi:10.1002/jgm.2995
- Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 18(4), 696-704. doi:10.1359/jbmr.2003.18.4.696
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, 32(6), 1380-1389. doi:10.1002/stem.1661
- Silvestre, J. S., Mallat, Z., Duriez, M., Tamarat, R., Bureau, M. F., Scherman, D., . . . Levy, B. I. (2000). Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res*, 87(6), 448-452.
- Singh, A. D., & Parmar, S. (2015). Ramucirumab (Cyramza): A Breakthrough Treatment for Gastric Cancer. *P T*, 40(7), 430-468.
- Singh, S., Pillai, S., & Chellappan, S. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *J Oncol*, 2011, 456743. doi:10.1155/2011/456743
- Skok, M. V., Grailhe, R., Agenes, F., & Changeux, J. P. (2007). The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. *Life Sci*, 80(24-25), 2334-2336. doi:10.1016/j.lfs.2007.02.005

- Spindel, E. R. (2016). Cholinergic Targets in Lung Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 22(14), 2152-2159.
doi:10.2174/1381612822666160127114237
- Stapor, P. C., Sweat, R. S., Dashti, D. C., Betancourt, A. M., & Murfee, W. L. (2014). Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *J Vasc Res*, 51(3), 163-174. doi:10.1159/000362276
- Strassheim, D., May, L. G., Varker, K. A., Puhl, H. L., Phelps, S. H., Porter, R. A., . . . Williams, C. L. (1999). M3 muscarinic acetylcholine receptors regulate cytoplasmic myosin by a process involving RhoA and requiring conventional protein kinase C isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18675-18685.
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., . . . Yancopoulos, G. D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87(7), 1171-1180. doi:10.1016/s0092-8674(00)81813-9
- Tallini, Y. N., Shui, B., Greene, K. S., Deng, K. Y., Doran, R., Fisher, P. J., . . . Kotlikoff, M. I. (2006). BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiol Genomics*, 27(3), 391-397. doi:10.1152/physiolgenomics.00092.2006
- Tang, W., Zeve, D., Suh, J. M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R. E., . . . Graff, J. M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*, 322(5901), 583-586. doi:10.1126/science.1156232
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., . . . Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 3(3), 279-288.
doi:10.1016/j.stem.2008.07.025
- Tavora, B., Batista, S., Reynolds, L. E., Jadeja, S., Robinson, S., Kostourou, V., . . . Hodivala-Dilke, K. M. (2010). Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis. *Embo Molecular Medicine*, 2(12), 516-528.
doi:10.1002/emmm.201000106
- Terry, S. Y., Boerman, O. C., Gerrits, D., Franssen, G. M., Metselaar, J. M., Lehmann, S., . . . Abiraj, K. (2015). (1)(1)(1)In-anti-F4/80-A3-1 antibody:

- a novel tracer to image macrophages. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 42(9), 1430-1438. doi:10.1007/s00259-015-3084-8
- Tilki, D., Hohn, H. P., Ergun, B., Rafii, S., & Ergun, S. (2009). Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends Mol Med*, 15(11), 501-509. doi:10.1016/j.molmed.2009.09.004
- Tilki, D., Kilic, N., Sevinc, S., Zywiets, F., Stief, C. G., & Ergun, S. (2007). Zone-specific remodeling of tumor blood vessels affects tumor growth. *Cancer*, 110(10), 2347-2362. doi:10.1002/cncr.23024
- Tolaney, S. M., Boucher, Y., Duda, D. G., Martin, J. D., Seano, G., Ancukiewicz, M., . . . Jain, R. K. (2015). Role of vascular density and normalization in response to neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy in breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(46), 14325-14330. doi:10.1073/pnas.1518808112
- Tournier, J. M., Maouche, K., Coraux, C., Zahm, J. M., Cloez-Tayarani, I., Nawrocki-Raby, B., . . . Birembaut, P. (2006). alpha3alpha5beta2-Nicotinic acetylcholine receptor contributes to the wound repair of the respiratory epithelium by modulating intracellular calcium in migrating cells. *Am J Pathol*, 168(1), 55-68.
- Trombino, S., Bisio, A., Catassi, A., Cesario, A., Falugi, C., & Russo, P. (2004). Role of the non-neuronal human cholinergic system in lung cancer and mesothelioma: possibility of new therapeutic strategies. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 4(6), 535-542.
- Tucker, W. D., & Mahajan, K. (2018). Anatomy, Blood Vessels. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Uccelli, A., Wolff, T., Valente, P., Di Maggio, N., Pellegrino, M., Gurke, L., . . . Gianni-Barrera, R. (2019). Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis. *Swiss Med Wkly*, 149, w20011. doi:10.4414/smw.2019.20011
- Viallard, C., & Larrivee, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426. doi:10.1007/s10456-017-9562-9

- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., . . . Consor, Mouse Genome Sequencing. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520-562. doi:10.1038/nature01262
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R., & Kirkpatrick, C. J. (2003a). The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci*, *72*(18-19), 2055-2061.
- Wessler, I., & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*, *154*(8), 1558-1571. doi:10.1038/bjp.2008.185
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., & Racke, K. (1999). The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *26*(3), 198-205.
- Wessler, I., Reinheimer, T., Kilbinger, H., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Saloga, J., & Knop, J. (2003b). Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci*, *72*(18-19), 2169-2172.
- White, S. H., Sturgeon, R. M., Gu, Y. L., Nensi, A., & Magoski, N. S. (2018). Tyrosine Phosphorylation Determines Afterdischarge Initiation by Regulating an Ionotropic Cholinergic Receptor. *Neuroscience*, *372*, 273-288. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.12.049
- Wolf-Johnston, A. S., Hanna-Mitchell, A. T., Buffington, C. A., Shinde, S., Roppolo, J. R., Mayer, E., & Birder, L. A. (2012). Alterations in the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in esophageal epithelium. *Life Sci*, *91*(21-22), 1065-1069. doi:10.1016/j.lfs.2012.04.028
- Yla-Herttuala, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I., & Hartikainen, J. (2007). Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, *49*(10), 1015-1026. doi:10.1016/j.jacc.2006.09.053
- Zablotni, A., Dakischew, O., Trinkaus, K., Hartmann, S., Szalay, G., Heiss, C., & Lips, K. S. (2015). Regulation of acetylcholine receptors during differentiation of bone mesenchymal stem cells harvested from human

reaming debris. *Int Immunopharmacol*, 29(1), 119-126.

doi:10.1016/j.intimp.2015.07.021

Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U. M., Ito, W. D., Treede, H., Lauke, H., . . .

Ergun, S. (2006). Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*, 133(8), 1543-1551.

doi:10.1242/dev.02315

Zhang, Y. Y., Shen, W., Zhang, L. C., Pan, Z. Y., Long, C. L., Cui, W. Y., . . .

Wang, H. (2014). Proteomics reveals potential non-neuronal cholinergic receptor-effectors in endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin*, 35(9), 1137-1149. doi:10.1038/aps.2014.38

doi:10.1038/aps.2014.38

Zimring, J. C., Kapp, L. M., Yamada, M., Wess, J., & Kapp, J. A. (2005).

Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. *J Neuroimmunol*, 164(1-2), 66-75.

doi:10.1016/j.jneuroim.2005.03.018

Danksagungen

Hiermit bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Süleyman Ergün, Leiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg, für die Möglichkeit dieser Arbeit unter seiner Direktion durchführen zu dürfen sowie die Hilfe und Ratschläge während der Erarbeitung meiner Dissertation.

Ganz besonderen Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. med. vet. Gabriela Krasteva-Christ für die Themenstellung, die tolle Betreuung und vielseitige Unterstützung während meiner Labor- und Schreibaarbeit.

Auch möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern der Anatomie, besonders bei Dr. Nicole Wagner für die Unterstützung bei der Arbeit am konfokalen Mikroskop und bei Lisa, Ursula und Erna für die Hilfe und Ratschläge bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ich danke meinen Eltern, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Danke an meinen Mann, der mir bei zahlreichen Kämpfen an dem Computer geholfen hat.