

Klinik für Gefäßchirurgie am Klinikum Rechts der Isar  
der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein)

***Optimierung der Differenzierung humaner Monozyten zu Endothelzellen  
sowie deren Wachstumsbeschleunigung und Charakterisierung***

Wajima Safi

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. J. Pelisek
2. Univ.-Prof. Dr. U. Protzer

Die Dissertation wurde am 10.10.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2013 angenommen.

*Meiner Familie in Liebe gewidmet*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1.	<b>Monozyten und Makrophagen.....</b>	<b>2</b>
1.2.	<b>Die Endothelzelle.....</b>	<b>3</b>
1.3.	<b>Die Differenzierung von Monozyten zu Endothelzellen.....</b>	<b>4</b>
1.4.	<b>Die Kultivierung monozytärer Zellen.....</b>	<b>5</b>
1.5.	<b>Die Problematik der Kultivierung monozytärer Zellen.....</b>	<b>6</b>
1.6.	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>8</b>
2.1.	<b>Geräte (alphabetisch).....</b>	<b>8</b>
2.2.	<b>Chemikalien, Medien und Kits (alphabetisch).....</b>	<b>9</b>
2.3.	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>11</b>
2.4.	<b>Antikörper.....</b>	<b>13</b>
2.4.1.	Antikörper für die Immunhistochemie.....	13
2.4.2.	Antikörper für das Western Blotting.....	13
2.5.	<b>Primer.....</b>	<b>13</b>
2.6.	<b>Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>14</b>
2.7.	<b>Zellkultur.....</b>	<b>14</b>
2.7.1.	Der MTT- Zytotoxizitätstest.....	14
2.7.2.	Standardbedingungen für die Arbeit mit Zellen.....	15
2.7.3.	Gewinnung und Kultivierung der Zellen.....	15
2.7.4.	Herstellung verschiedener Medien.....	17
2.7.5.	Fixierung der Zellen für histochemische Färbungen.....	18
2.7.6.	Konservierung der Zellproteine für das Westernblotverfahren.....	18
2.8.	<b>Histochemie.....</b>	<b>19</b>
2.8.1.	Die LSAB – HRP Färbung.....	19
2.8.2.	Die Hämatoxylin Färbung.....	21
2.8.3.	Die Ölrot Färbung zum Nachweis von Fettzellen.....	21
2.8.4.	Die Van Kossa Färbung zum Nachweis osteogener Zellen.....	21
2.9.	<b>Das Westernblotverfahren .....</b>	<b>22</b>
2.9.1	Bestimmung des Proteingehalts der Proben.....	22
2.9.2.	Prinzip und Durchführung des Westernblotverfahrens.....	22

<b>2.10.</b>	<b>Die Polymerase Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>26</b>
2.10.1.	Prinzip der PCR.....	26
2.10.2.	Die Präparation von RNA aus Zellen.....	27
2.10.3.	Die Synthese von copyDNA (cDNA).....	27
2.10.4.	Die Reverse Transkriptase (RT)- PCR .....	28
<b>2.11.</b>	<b>Statistische Analyse.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellproliferation.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.</b>	<b>Zellidentifizierung.....</b>	<b>34</b>
3.2.1.	Die Expression immunhistochemischer Marker gezüchteter Zellen....	34
3.2.2.	Der makroskopische Phänotyp.....	38
3.2.3.	Die Expression von Oberflächenmarkern im Westernblot.....	39
<b>3.3.</b>	<b>Der Einfluss von C-type natriuretic peptide (CNP) auf Wachstum und Proliferation.....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>46</b>
4.1.	Zellproliferation.....	46
4.2.	Zellidentifizierung.....	48
4.3.	Der Einfluss von CNP auf Zellwachstum und Differenzierung.....	51
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>61</b>

## 1 EINLEITUNG

Weltweit sind mit zunehmendem Durchschnittsalter der Bevölkerung die erworbenen Pathologien des Herz- und Gefäßsystems als die bedeutendsten Erkrankungen zu werten. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind global gesehen die Todesursache Nummer eins: es sterben jährlich mehr Menschen an Erkrankungen des Herz- und Gefäßsystems als an irgendeiner anderen Erkrankung. 2008 starben 17,8 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, was 30% aller weltweiten Todesursachen ausmacht. Geschätzte 7,3 Millionen Todesfälle waren auf eine koronare Herzkrankheit und 6,3 Millionen auf einen Schlaganfall zurückzuführen. Länder mit einem niedrigen bis mittleren Einkommen pro Kopf sind überproportional häufig betroffen: über 80% aller durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursachten Tode ereignen sich in den besagten Ländern und treten bei Frauen und Männern gleich häufig auf. Bis 2030 werden fast 23,6 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen sterben, hauptsächlich an Herzerkrankungen und Schlaganfällen. Diese werden somit die führenden Todesursachen bleiben [28].

Als häufige Konsequenz eines Diabetes oder eines jahrelangen Zigarettenkonsums, kommt es bei vielen Patienten aufgrund der aus diesen Erkrankungen resultierenden Schäden an Gefäßen zu schweren Durchblutungsstörungen und so genannten chronischen Ulcera, bevorzugt im Unterschenkelbereich [7, 32]. Ebenso wird bei Patienten mit vorbestehend schlechtem Gefäßstatus eine verzögerte oder gar nicht einsetzende Wundheilung beobachtet. Dieses Patientengut ist sowohl aus ärztlicher als auch aus Sicht der Krankenkassen ein kompliziertes Problem [8, 32, 47]. Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, den Betroffenen Transplantate aus Spalthaut anzubieten. Diese Möglichkeit ist zwar ästhetisch zufriedenstellend und für die Patienten sicherlich eine psychische Entlastung. Das Einsetzen von Spalthaut erfordert jedoch einen adäquaten Wundgrund mit ausreichender mikro- und makrovaskulärer Versorgung. Diese Voraussetzungen erfüllt nur ein Teil der Patienten. [7]. Des Weiteren bedeutet das Einsetzen von Spalthaut eine Operation, die eine Belastung darstellt, der viele der Erkrankten aufgrund ihres fortgeschrittenen Alters und ihrer Nebendiagnosen häufig nicht gewachsen sind.

Diese Problematik bietet jedoch auch sehr viel Potential für neue Therapieansätze. So gibt es unter Umständen die Möglichkeit, dass man in Zukunft Patienten mit Mikro- oder Makroangiopathien venöses Blut entnehmen und aus diesem vaskularisierte Gewebetransplantate züchten könnte [42, 43]. Vor der Züchtung von ganzen Transplantaten steht jedoch zunächst die Herausforderung, periphere Blutstammzellen so zu stimulieren, dass diese möglichst schnell und gezielt in die jeweils gewünschten Zellarten differenzieren.

Monozyten, als noch nicht voll differenzierte Zellen, besitzen unter bestimmten Bedingungen die Fähigkeit in andere Zellarten als die für sie üblichen Makrophagen zu reifen, wenn sie entsprechend behandelt werden [13, 20, 22, 23, 35]. Eventuell sind sogar Zellen, die bisher als Angioblasten [3], i. e. Endothelvorläuferzellen, identifiziert wurden, in Wahrheit den Endothelzellen ähnliche Zellen, die von zirkulierenden Monozyten abstammen [34, 49]. Es gilt nun die Bedingungen für die Züchtung von Monozyten zu untersuchen und zu optimieren.

### 1.1. Monozyten und Makrophagen

Sämtliche menschliche Blutzellen finden ihren Ursprung in pluripotenten Stammzellen [54]. Diese besitzen das Potential in myelozytäre Stammzellen zu differenzieren, aus denen sich Thrombozyten, Makrophagen und Monozyten ableiten. Der Vorgang der Proliferation und Differenzierung ist komplex und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Nachweislich stimuliert das Zytokin Interleukin 3 (IL 3) myelo-poetische Stammzellen zur Differenzierung in die gemeinsame Vorläuferzelle der Monozyten und neutrophilen Granulozyten [54]. Der koloniestimulierende Faktor der Makrophagen- Reihe (*macrophage colony stimulating factor*, M-CSF), ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 bis 100 Kilodalton (Kd), regt wiederum die Entwicklung dieser Monoblasten zu Monozyten an. M-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der neben der Differenzierung auch das Überleben, die Proliferation, und Funktion mononuklearer Zellen kontrolliert [41, 45].

Monozytäre Zellen selbst besitzen als eine der wenigen Zellarten der peripheren Blutzellen das Potential zur weiteren Differenzierung. Monozyten, die die Blutbahn für gewöhnlich auf einen chemotaktischen Reiz (z.B. durch Prostaglandine, Leukotriene u.a.) hin verlassen, reifen entweder zu wandernden Makrophagen oder Gewebemakrophagen. Im Gewebe kommen sie z.B. in der Niere als Mesangium- Zellen, im ZNS als Mikroglia, in der Lunge als Alveolarmakrophagen oder in der Leber als Kupffer- Zellen vor [20, 37]. Als besonders bedeutsam auch in der Entwicklung der Monozyten zu Makropagen hat sich das M-CSF erwiesen. M-CSF wird neben einer Vielzahl anderer Zellen unter anderem von den Makrophagen selbst produziert, um im Rahmen eines entzündlichen Geschehens Monozyten zur Differenzierung zu Makrophagen anzuregen [45].

Aufgaben des Monozyten- Makrophagen Systems sind die Antigenpräsentation und Aktivierung der T-Zellen. Makrophagen haben Einfluss auf die Gewebshomöostase und sind essentiell für die akute inflammatorische Antwort auf Pathogene [54]. So führt eine eingeschränkte Funktion der Makrophagen z. B. durch Mutation seiner Oberflächenproteine

zu Allergien und chronischen Entzündungen wie z.B. Parodontose oder Colitis ulcerosa [24, 33, 52]. Die mikrobielle Invasion wird durch spezifische Rezeptoren, wie zum Beispiel durch Identifikation des Lipopolysaccharids (LPS) gramnegativer Keime mit Hilfe des Oberflächenproteins *cluster of differentiation* (CD) 14 der Monozyten erkannt [10]. Das sogenannte LPS-binding Protein, ein lösliches Akute-Phase Protein, bindet hierfür das LPS und präsentiert es, so dass LPS besser an u. a. CD 14 binden und eine Immunantwort hervorrufen kann [26].

Das Expressionsmuster spezieller Oberflächenproteine liefert wichtige Hinweise auf die Zellart oder erlaubt gar die genaue Identifikation der Zellen. So werden CD14, CD68 oder auch CD31 Antikörper als Marker zur Erkennung von Monozyten oder Makrophagen eingesetzt [14, 46].

### 1.2. Die Endothelzelle

Das Lumen aller menschlichen Gefäße, z.B. der Arterien und Venen, wird vom sog. Endothel, dem größten Organ des Körpers ausgekleidet, das durch ca. 10 Milliarden Endothelzellen gebildet wird. Seine Gesamtoberfläche beträgt ca. 4000-7000 m<sup>2</sup>. Das Endothel fungiert nicht nur als „intelligente“ Barriere, die selektiv Substanzen durchlässt, sondern ist daneben auch als stoffwechselaktives Organ zu verstehen. So bildet das Endothel Substanzen, die das Anheften von Thrombozyten und die Blutgerinnung hemmen, es antwortet durch Regulation des Gefäßtonus auf den Blutstrom und vermittelt v. a. im Rahmen entzündlicher Prozesse, indem es Adhäsionsmoleküle freisetzt, die das Anheften weißer Blutzellen an postkapilläre Venolen bedingen. Zudem wirkt es regulierend auf die Immunantwort, indem es eine Reihe von Zytokinen und Entzündungsmediatoren freisetzt [38].

Somit wird deutlich, dass für die Züchtung vaskularisierter Transplantate die Züchtung von Endothelzellen unabdingbare Voraussetzung ist.

Diese Zellen sind zwischen 1 und 2 µm breit und haben einen Durchmesser von ca. 10-20 µm. Charakteristischerweise finden sich in deren Zytoplasma häufig so genannte Weibel-Palade Körper, i. e. Transzytosevesikel, die den von Willebrand-Faktor enthalten. Dieses Glykoprotein spielt eine Schlüsselrolle bei der Thrombozytenaggregation und dem Verschluss von verletzten Stellen im Endothel [54].

Das Endothel fungiert somit nicht nur als Barriere zwischen Blut und Gewebe, sondern ist an einer Reihe von Vorgängen beteiligt, wie z.B. auch an der Regulation des Gefäßtonus oder an

diversen Entzündungs- und Wundheilungsprozessen. Aufgrund der Komplexität ihrer Aufgaben sind diese Zellen unabdingbar für menschliche Gefäße.

Auch diese Zellen exprimieren ein charakteristisches Muster an Oberflächenproteinen, wie z.B. CD144, CD106 und den Vascular endothelial growth factor receptor 1 und 2 (VEGFR1 und 2) [11].

### **1.3. Die Differenzierung von Monozyten zu Endothelzellen**

Bereits seit einiger Zeit ist bekannt, dass Monozyten nicht nur zu phagozytierenden Zellen wie den erwähnten Makrophagen differenzieren, sondern unter bestimmten Bedingungen auch das Potential besitzen, zu einer ganzen Reihe unterschiedlicher Zellarten wie z.B. Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems, Osteoklasten oder Hepatozyten zu reifen [19, 20, 24, 37]. Auch zirkulierende Zellen, die zunächst als endotheliale Vorläuferzellen bzw. Angioblasten bezeichnet wurden und wegen ihrer Fähigkeit zur Neovaskulogenese bei Erwachsenen Aufmerksamkeit erregten, können monozytären Ursprungs sein. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten nach Behandlung mit angiogenetischen Faktoren, ebenfalls Endothelzellmarker exprimieren können [11, 36].

Durch entsprechende Kultivierung CD14-positiver, aus peripherem Blut gewonnener Monozyten entstehen sogenannte *programmable cells of monocytic origin* (PCMO) oder auch *monocyte-derived multipotential cells* (MOMC) [22, 23, 35]. Diese Zellen exprimieren neben einer Reihe von Markern der Monozytenreihe, wie z.B. CD14, die als Hinweise auf ihren Ursprung gedeutet werden, auch endothelzelltypische Oberflächenproteine wie CD144 oder VEGFR 2. Auch von der Expression von CD34 als typischen Marker von Stammzellen der Blutzellreihe wurde berichtet [13, 22]. Insbesondere letztgenannter Marker verdeutlicht die noch vorhandene Plastizität und Differenzierungsfähigkeit dieser MOMCs, da hämatopoetische Stammzellen die Fähigkeit besitzen in alle Zellarten der hämatopoetischen Reihe zu differenzieren. Somit besitzen diese Zellen nicht nur verschiedenste phänotypische und morphologische Eigenschaften endothelialer und monozytärer Zellen, sondern auch die von Stammzellen.

## 1.4. Die Kultivierung monozytärer Zellen

Es wird angenommen, dass nach siebentägiger Kultivierung peripherer Monozyten in kommerziell erhältlichem Medium (z.B. Dulbecco's RPMI 1640 VLE) mit 10%igem Anteil an fetalem bovines Serum (FBS) und insgesamt 1%igem Anteil von 50 U/ml Penicillin und 50µg Streptomycin (P/S), diese sich zu PCMOs dedifferenzieren [22]. Die so erhaltenen Zellen können nach sieben weiteren Tagen in Kultur mit einem speziell mit Angiogenesefaktoren wie VEGF angereicherten Medium zu Zellen differenzieren, die Endothelzellmarker wie z.B. CD144, VEGF oder VEGF-R1 exprimieren und auch phänotypisch an Endothelzellen erinnern oder gar Weibel Palade Körperchen enthalten. Die Züchtung hepatischer Zellen aus Monozyten ist mit dem Zusatz von IL-3 mit M-CSF zum Kulturmedium wegen derer bereits beschriebenen Wirkungen auf Monozyten gelungen [35]. Kuwana et al. wiesen nach, dass neben dem Zusatz von FBS zu dem Nährmedium der Monozyten, die Platten, auf denen die Zellen gezüchtet werden, zuvor mit Fibronectinbeschichtung notwendig ist [22, 23].

Im Rahmen eines zusätzlichen Pilotprojekts wurde das Medium, in dem die Monozyten/Makrophagen kultiviert wurden, neben den oben erwähnten Bestandteilen mit weiteren Zusätzen angereichert. Im Speziellen handelte es sich hierbei um bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) sowie das natriuretische Peptid Typ-C (*c-type natriuretic peptide*, CNP). Die Wirkung dieser Substanzen auf die Zellproliferation auch im Vergleich zu Medium ohne weitere Zusätze war von besonderem Interesse.

CNP als drittes in der Reihe der natriuretischen Peptide ist neben dem atrialen (*atrial natriuretic peptide*, ANP) und dem BNP (*brain-like natriuretic peptide*, BNP) bisher vor allem für seine parakrine, vasodilatierende Wirkung bekannt[39]. Das Peptid wurde 1990 von Sudoh et al. erstmalig beschrieben [44]. Das 22 Aminosäuren lange Peptid ist ein spezifischer Ligand für den natriuretischen Peptidrezeptor B (NPR-B), dessen Expression und Regulation eine Aussage über die Sensitivität von Zellen gegenüber CNP sagen lässt. Der NPR-B Rezeptor wird vor allem auf glatten Muskelzellen gefunden, wobei hier CNP vor allem antimitogen wirkt. Der NPR 2 Rezeptor führt über eine Erhöhung des intrazellulären cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) zu einer Aktivierung der cGMP abhängigen Kinase [29]. Gleichzeitig bindet CNP auch an NPR 3, das die Proteinkinase A durch eine G-Protein gekoppelte Hemmung der Adenylatzyklase deaktiviert [1]. CNP hat hierdurch antiproliferative und antiinflammatorische Eigenschaften [30]. Neben CNP wurde eine weitere Substanz, das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) als Zusatz zu reinem Medium untersucht. LPS ist eine Verbindung von fettähnlichen Bestandteilen und Zuckern, die sich in der äußeren

Membran gramnegativer Bakterien befindet. LPS bindet an das Oberflächenprotein CD14 humaner Monozyten und induziert in diesen die Freisetzung von entzündungsaktiven Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) oder IL 1 beta (IL1 $\beta$ ) [10]. Eine Untersuchung von LPS auf das Proliferationspotential und die Expression monozytärer Oberflächenproteine im Rahmen der für diese Dissertation kultivierten Zellen konnte wichtige Hinweise für die Wirkung von LPS auf diese Zellen geben.

### **1.5 Die Problematik der Kultivierung monozytärer Zellen**

Monozyten über einige Tage zu kultivieren birgt Schwierigkeiten. So lassen sie sich nur schwer isolieren, da nahezu immer Monozytenkulturen von lymphoiden Zellen kontaminiert werden [4]. Längst ist bekannt, dass die Art von Oberfläche, an die Monozyten während ihrer Kultivierung haften und das Medium, in dem sie kultiviert werden, die Ausbeute der Zellen maßgeblich beeinflusst [21]. Verschiedenste Methoden sind bisher getestet worden, um die Monozytenkulturen zu vergrößern, jedoch z. T. vergeblich. Die Ausbeute monozytärer Zellen bleibt auch hier oft hinter den Erwartungen zurück [16, 27, 31]. Oftmals sind in Kultur gehaltene Monozyten nur schwer als solche zu identifizieren, weil sie nicht lange überleben und andere Zellarten widerstandsfähiger sind. Zudem haben monozytäre Zellen spezielle Bedürfnisse bezüglich der von ihnen gebrauchten Zusätze zu ihrer Erhaltung in Kultur, so dass kommerziell erhältliche Zusätze wie z.B. FBS hochgradig variable Erfolge in der Kultivierung eben jener Zellen erzielen [2].

Auch finden sich nach einigen Tagen in Kultur offensichtlich an Stelle von Monozyten Makrophagen, was dafür spricht, dass der Vorgang der Differenzierung und ein anschließendes Zugrundegehen dieser Zellen wie selbstverständlich abläuft, so dass optimale Kultivierungsbedingungen gefunden werden müssen.

## **1.6 Zielsetzung**

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Möglichkeit der Züchtung endothelialer Zellen aus im peripheren Blut vorkommenden Monozyten. Es sollen sowohl die optimalen Bedingungen zur Kultivierung und Vermehrung der Monozyten als auch deren Möglichkeit der Differenzierung zu Endothelzellen erforscht werden.

Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Medien und Zusätzen bzw. mit und ohne Fibronectin gezüchtet. In Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit wurde im Einzelnen besonderes Augenmerk auf folgende Fragestellungen und Themen gelegt:

- Welchen Einfluss haben verschiedene Zellkulturmedien auf das Wachstum und die Kultivierung humaner peripherer Monozyten?
- Wie lässt sich das Differenzierungspotential monozytärer Zellen zu endothelialen Zellen genauer nachweisen?
- Welchen Einfluss hat CNP auf das Wachstum und die Kultivierung humaner Monozyten?
- Welchen Einfluss hat CNP auf das Differenzierungspotential von Monozyten zu Endothelzellen?

Die genauere Erläuterung der einzelnen Probleme und die Erforschung dieser Fragen werden im Folgenden geschildert.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Geräte

#### 2.1.2. Geräte (alphabetisch)

Analysenwaage Cubis	Sartorius, Goettingen
Centrifuge 4K15	Sigma-Aldrich, München
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Glass cover slipper Promounter® RCM 2000	Medite, Burgdorf
Entwicklermaschine SRX 101A	KonicaMinolta, Langenhagen
Thermocycler GeneAmp 7700	Applied Biosystems, Darmstadt
Gefrierschrank	Siemens, München
HeraSafe Laminar Flow Werkbank	Heraeus, Hanau
HeraCell Inkubator	Heraeus, Hanau
Kamera AxioCam Icm1	Zeiss, Jena
Laborwaage TE	Sartorius, Goettingen
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axio Observer A1	Zeiss, Jena
Mikroplattenreader Expert Plus	Biochrom Asys, Cambridge, UK
Mini- Protean Tetra Cell®	Bio- Rad, München
MSI Mini- Shaker Vortex Gerät	IKA, Staufen
PCR-Maschine Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
pH Messgerät PCE-228	PCE, Meschede
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt
Power Pac HC	Bio- Rad, München
iQ5 real-time PCR-Cycler	Bio- Rad, München
Semi-dry Transfer Cell	Bio- Rad, München
Schüttler MTS	IKA, Staufen
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Westernblot Kammer/ Glasplatten	Bio- Rad, München

Weitere für den Versuch relevante Geräte werden im jeweiligen Versuchsaufbau beschrieben.

## 2.2. Chemikalien, Medien und Kits (alphabetisch)

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid, 30%	Sigma- Aldrich, München
Alkohol, 100 %	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
APS, 10%	Sigma- Aldrich, München
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
enthält:	
• BCA Reagenz A	
• BCA Reagenz B	
• Albumin Standardampullen	
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA	Sigma-Aldrich, München
Complete (Proteinase Inhibitor Cocktail)	Roche, Basel
DMSO	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's RPMI 1640 VLE	Biochrom, Berlin
Dulbecco's MEM	Biochrom, Berlin
Endothelial cell growth medium, advanced	Provitro, Berlin
Essigsäure	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
FBS	Biochrom, Berlin
Fibronectin	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl, 30%	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Histopaque 1077	Sigma- Aldrich, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

LSAB- HRP Kit

Dako, Hamburg

enthält:

- Peroxidase Block
- Biotinylierte Verbindung
- Streptavidin- HRP
- DAB Substrat Puffer
- DAB Chromogen

Milchpulver

Nestle, Frankfurt/Main

NaCl 0,9%

Fresenius Kabi, Bad Homburg

NaF

Sigma-Aldrich, München

Natriumdesoxycholat

Roth, Karlsruhe

Natriumthiosulphat

Roth, Karlsruhe

Ölrot

Merck, Darmstadt

QuantiFast SYBR Green PCR KIT

Qiagen, Hilden

PBS Dulbecco

Biochrom, Berlin

Penicillin

Sigma-Aldrich, München

Peptatin A

Sigma-Aldrich, München

Streptomycin

Sigma-Aldrich, München

RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit Fermentas, Leon-Rot

enthält:

- RevertAid™ Premium Enzyme Mix (RNase Inhibitor)
- Reverse Transkriptase Puffer
- 10mM dNTP Mix
- Oligo(dT18)Primer
- nukleasefreies Wasser

RNeasy Protect Cell Mini Kit

Qiagen, Hilden

enthält:

- Reaktionsgefäße
- RLT- Puffer
- RW1- Puffer
- RPE- Puffer

- RNEasy Mini- Spinsäulen
- RNase – freies Wasser

SDS	Sigma-Aldrich, München
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate enthält:	ThermoFisher Scientific, Schwerte
<ul style="list-style-type: none"><li>• Supersignal WestPico Luminol/ Enhancer Lösung</li><li>• Supersignal WestPico Stable Peroxidase Lösung</li></ul>	
TEMED, 99%	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trizma (TRIS) Base, minimum, 99,9% titration	Sigma-Aldrich, München
TWEEN	Sigma-Aldrich, München
Wasser (destilliert)/ Aqua dest.	Braun, Berlin
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, München

### **2.3. Puffer und Lösungen**

#### 1,50 TRIS- Cl (pH 8,8)

18,15 g TRIS- Base, 700 ml destilliertes Wasser, pH mit HCl einstellen

#### 0,50 TRIS Cl (pH 6,8)

6,0 g TRIS-Base, 80 ml destilliertes Wasser, pH mit HCl einstellen

#### Elektrophoresepuffer

30 g TRIS-Base, 144 g Glycin, 10 g SDS, bidestilliertes Wasser

#### Ladepuffer

3,25 ml deionisiertes Wasser, 1,25 ml TRIS-Cl mit pH 6,8, 3,0 ml Glycerin, 2,0 ml SDS 10%,  
0,5 ml Bromphenolblau

10 x Transferpuffer

30,3 g TRIS-Base, 144 g Glycin, 1 Liter Wasser

10x TBS Puffer (pH 7,6)

24,2 g TRIS-Base, 80 g NaCl, 800 ml destilliertes Wasser, je nach pH HCl, 1 Liter Wasser

Blocking Puffer

1x TBS, 0,1 Tween-20 (Sigma), 5 % Milchpulver

Waschpuffer für das Westernblotting

90 ml Wasser, 10 ml 10x TBS, 100 µl Tween-20 (Sigma)

Waschpuffer/TRIS Puffer für die Immunhistochemie

1,8 g TRIS-Base, 13,7 g TRIS-HCl, 17,5 g NaCl, pH 7,4 mit HCl einstellen und mit destilliertem Wasser auf 2 L auffüllen

Lysepuffer

10 ml RIPA, 400 µl Complete Proteaseinhibitor (1 Tablette in 2 ml Wasser), 2µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Pepstatin A, 5-10mM NaF, 1mM Orthovandat Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM EDTA

MTT Stocklösung

5 mg/ ml (w/v) 3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphentyltetrazoliumbromid Thiazylblau (M2128)

MTT Stopplösung

99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure, 10 g SDS

RIPA Lysispuffer

50mM TRIS-HCL (pH=7,5, alternativ 8,0 mit HCl einstellen), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat

## 2.4. Antikörper

### 2.4.1. Antikörper für die Immunhistochemie

CD 14	Dako, Hamburg
CD 34	Dako, Hamburg
CD 68	Dako, Hamburg
VEGF	Dako, Hamburg
VEGFR- 2	Dako, Hamburg

### 2.4.2. Antikörper für das Western Blotting

CD 14	R&D Systems, Wiesbaden
CD 31	R&D Systems, Wiesbaden
CD 68	R&D Systems, Wiesbaden
CD 106	R&D Systems, Wiesbaden
CD 144	R&D Systems, Wiesbaden
GAPDH	abcam®, Cambridge, UK
Peroxidase- conjugated Goat- Anti- Mouse IgG	ThermoFisher Scientific, Schwerte
VEGF	ThermoFisher Scientific, Schwerte

## 2.5. Primer

Hs_NPPC_1_SG für CNP (#QT00211946)	Qiagen, Hilden
Hs_NPR2_1_SG für NPR2 (#QT00013727)	Qiagen, Hilden
Hs_NPR3_1_SG für NPR3 (#QT00047250)	Qiagen, Hilden
Hs_TNF_3_SG für TNF alpha (QT01079561)	Qiagen, Hilden
Hs_IL1B_1_SG für IL1 beta (QT00021385)	Qiagen, Hilden
Hs_IL6_1_SG für IL6 (QT00083720)	Qiagen, Hilden

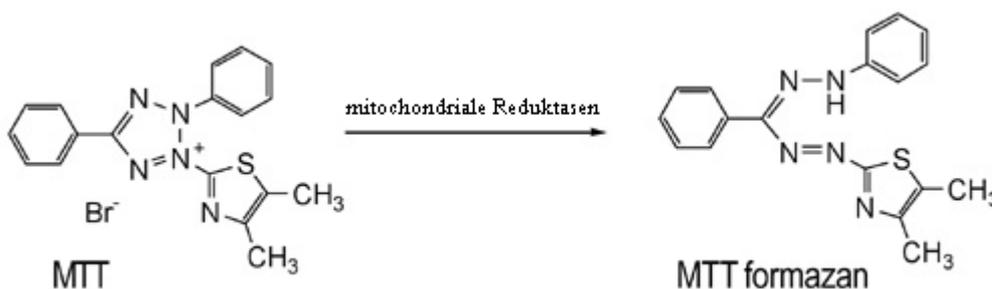
## 2.6. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturplatten, Röhrchen, Falcons und Pipettenspitzen wurden von den Firmen TPP (Trasadingen, Schweiz), Eppendorf (Hamburg) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Bei anderweitiger Herkunft wurde das im laufenden Text vermerkt.

## 2.7. Zellkultur

### 2.7.1 Der MTT Zytotoxizitätstest

Das MTT Assay ist ein vielfach verwendeter Test zur Bestimmung der Zellproliferation und Zytotoxizität. Hierbei wird das neongelbe Monotetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT) zum violetten Formazan reduziert (Abbildung 1). Gemeinhin wird angenommen, dass diese Reduktion abhängig von mitochondrialen Succinatdehydrogenasen lebender Zellen ist und somit ein Indikator für das Vorhandensein bzw. die Proliferation metabolisch aktiver, vitaler Zellen [6, 25].



**Abbildung 1:** Spaltung des wasserlöslichen MTT durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen und Bildung des wasserunlöslichen, violetten Formazans

In die Kavitäten einer 96 Wellplatte wurde zu 100 µl unterschiedlich zusammengesetzten Zellsuspensionen jeweils 10µl MTT Stocklösung (5mg/ml) pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 0,5µg/ml resultierte. Die Platte wurde 1,5 Stunden bei 37° und 5%

CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert und anschließend mit der zehnfachen Menge MTT Stopplösung behandelt, um die enzymatische Reaktion zu einem definierten Zeitpunkt anzuhalten. Letzteres gewährleistet die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Dann wurde die Platte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert unter dezentem Schütteln, um das Entstehen kleiner Kristalle zu verhindern. Im Anschluss daran wurde die optische Dichte (OD) der formazanhaltigen Zellsuspension in den Wells der 96 Wellplatte in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 590 nm ohne Referenz gemessen. Da sich das Formazan proportional zur Stoffwechselaktivität lebender Zellen verhält, lässt sich somit beim Vergleich von Platten, deren Zellsuspensionen eine unterschiedliche Anzahl an Tagen alt sind, ein Rückschluss auf die Zellproliferation schließen [25].

### **2.7.2. Standardbedingungen für die Arbeit mit Zellen**

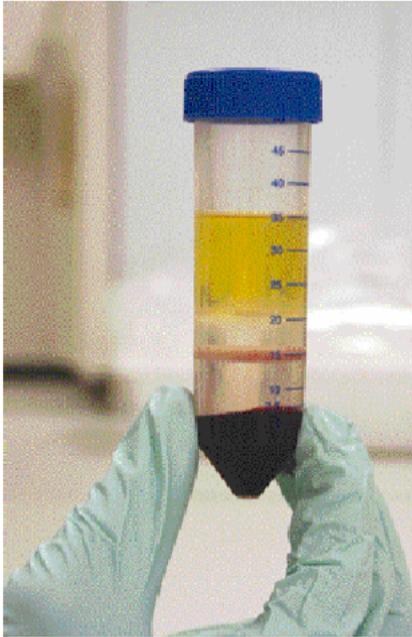
Zellen wurden stets unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar- Flow Werkbank behandelt und in einem 37° warmen Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) bei 95% Luftfeuchtigkeit über einen exakt definierten Zeitraum inkubiert.

### **2.7.3. Gewinnung und Kultivierung der Zellen**

Soweit nicht ausdrücklich anders beschrieben wurden humane Zellen für die folgenden Versuche verwendet.

Zur Gewinnung der Zellen wurde im Rahmen dieser Dissertation erwachsenen, gesunden Probanden peripheres, venöses Blut mittels einer Butterfly® Kanüle (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen und in NH<sub>3</sub> beschichtete Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt.

Dieses Blut wurde wiederum in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Je die Hälfte des auf diese Art behandelten Bluts wurde in Falcons, in die zuvor je 25 ml Histopaque- Lösung pipettiert worden war, überführt, ohne dass sich Blut und Histopaque vermischen sollten. Die beiden Falcons wurden bei 1000 g vorsichtig bei Raumtemperatur für 20 Minuten zentrifugiert. In den zentrifugierten Röhrchen trennten sich die verschiedenen Blutbestandteile gemäß ihrem Dichtegradienten auf, so dass eine Zellschicht mit peripher monozytärer Zellen die sich zwischen Histopaque und Serum bildete, abgesaugt werden konnte (Abb. 2) [9, 23].



**Abbildung 2:** Falcon mit Histopaque und Blut nach Zentrifugation. Zelluläre Blutbestandteile von den löslichen entsprechend ihres Dichtegradientens getrennt. So lagern sich in der untersten Schicht Erythrozyten ab, darüber das durchsichtige Histopaque und wiederum darüber die gelbe Schicht autologen Serums. Eine schmale, trübe Schicht zwischen Histopaque und Serum wird sichtbar. Diese enthält die für diese Dissertation relevanten Monozyten.

Die Zellen wurden in Abhängigkeit der Versuchsreihe in verschiedenen Medium suspendiert, in die Kavitäten von 96, 24 oder 6 Wellplatten pipettiert und anschließend in einem Brutschrank inkubiert. In die 96-Wellplatten wurde immer jeweils 100µl der Zellsuspension ausgesät, in 24-Well Platten 1 ml und in 6-Well Platten 3 ml. Wenn die Zellen anders als oben erwähnt ausgezählt wurden, wird dies für den jeweiligen Versuch explizit erwähnt. Pro Medium wurden mindestens 6 Wells der 96 Well Platte, mindestens 6 Wells der 24 Well Platte und mindestens 2 Wells der 6 Loch Platte mit einer Sorte Medium befüllt.

Nach einem Tag wurde das Medium in allen Wells abgesaugt, um alle nicht haftenden Zellarten wie z. B. lymphozytäre Zellen, die Teil der o. g. Fraktion peripherer monozytärer Zellen sind, zu entfernen und weiterhin nur die am Boden der Zellkulturplatten haftenden Monozyten zu kultivieren. Kultivierte Zellen wurden zumeist an Tag 1, 3, 7 und 14 gewonnen. Falls eine Entdifferenzierung zu Endothelzellen beabsichtigt war, wurden die gezüchteten Zellen ab dem siebten Tag, unabhängig davon in welcher Sorte Medium sie zuvor kultiviert worden waren, für weitere sieben Tage in Endothelzellmedium kultiviert und anschließend isoliert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Zur Untersuchung des Einflusses von CNP und LPS auf die kultivierten Zellen wurde der Versuchsansatz insofern verändert, als dass zunächst die gewonnenen Zellen in einem gewählten Medium in einer Zellkulturflasche für 24 Stunden inkubiert wurden. Nach 24

Stunden wurden auf jede Well einer 96-Well Platte 1 Million Zellen ausgesät, die mit Hilfe einer Fuchs- Rosenthal Kammer zuvor ausgezählt wurden. Die Zellen wurden für insgesamt weitere 3, 5 oder 7 Tage in vier weiteren unterschiedlichen Medien kultiviert.

Die Gewinnung der Zellen an den unterschiedlichen Tagen sowie deren weitergehende Behandlung werden in den entsprechenden Kapiteln behandelt.

#### **2.7.4. Herstellung verschiedener Medien**

Es wurden für die Zellkultur im Wesentlichen vier verschiedene Medien hergestellt. Weitere vier Medien wurden für die Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses von CNP und LPS auf die Zellen angemischt. Grundbestandteil jedes Mediums war RPMI 1640 VLE mit einem Prozent Penicillin und Streptomycin (P/S). Das Medium, das weiterhin als FBS Medium bezeichnet wird, bestand aus dem Grundmedium mit einem Zusatz von 10% FBS. Autologes (AU/ Auto) Serum wurde aus RPMI, P/S und zu 10% aus humanem Serum angemischt. Hierbei war das humane Serum immer identisch mit dem der Person, die die zu kultivierenden Zellen gespendet hatte. Gewonnen wurde das Serum durch Absaugen der obersten Phase aus demselben Falcon, aus dem die Monozytenschicht nach dem Zentrifugieren mit Histopaque entstanden war. Das menschliche Serum wurde stets bei 57° für fünf Minuten inaktiviert bevor es dem Medium beigefügt wurde.

Das Medium FBS WF wurde durch Anreicherung des Grundmediums mit 10% FBS, sowie den Wachstumsfaktoren Il-3 und M- CSF hergestellt. Hierzu wurden 500 ml Medium 500µl M- CSF und 20µl Il-3 zugesetzt.

Das Medium AU WF bestand aus RPMI, P/ S, zu 10% aus autologem Spenderserum und den Wachstumsfaktoren M-CSF und Il- 3 in denselben Konzentrationen wie bei FBS WF.

Alternativ zu RPMI 1640 VLE wurde im Rahmen eines einzelnen Versuchs auch DMEM mit identischen Zusätzen und unter gleichen Bedingungen getestet.

So genanntes Endothelzellmedium zur Entdifferenzierung der kultivierten Zellen wurde nicht eigens angemischt, sondern erworben.

Zur Untersuchung des Einflusses von CNP und LPS auf die kultivierten Zellen wurden entweder autologes Medium oder autologes Medium mit dem Zusatz von entweder M-CSF alleine oder CNP oder LPS oder CNP + LPS verwendet. Die gewählten Konzentrationen waren für M-CSF 0,05 µg/ml, 10 µg/ml für CNP und 0,01 µg/ml für LPS. Hierfür wurden die Zellen nach 24ständiger Adhäsion in autologem Serum ohne Wachstumsfaktoren auf

verschiedene, vorbereitete Medien aufgeteilt. Es wurde ein Medium „CNP“ angemischt, das neben dem Medium „Auto“ zusätzlich eine CNP Konzentration von 10 µg/ml aufwies. Als Medium LPS wurde autologes Medium mit einer LPS Konzentration von 0,01 µg/ml bezeichnet. Das Medium LPS+CNP enthielt beide Substanzen in den oben erwähnten Konzentrationen. Es wurden sowohl Messungen mittels MTT Test an den Tagen 3, 5 und 7 gemacht als auch jeweils Zellen derselben Charge für die PCR isoliert.

### **2.7.5. Fixierung der Zellen für histochemische Färbungen**

Die meist auf 24 bzw. 6 Well Zellkulturplatten gezüchteten Zellen wurden nach einer festgesetzten Zeitspanne entweder auf Objektträger fixiert oder anderweitig konserviert.

Für eine histochemische Behandlung gezüchteter Zellen war es zunächst notwendig diese mechanisch durch Abkratzen mit einem Schaber aus den Kavitäten der in der Regel 24 Well umfassenden Platten zu lösen. Die so entstandene Zell- Medium Suspension wurde in 15 ml Röhren überführt, wobei die Inhalte der Wells mit derselben Sorte von Medium in dasselbe Röhren gefüllt und somit zusammengefügt wurden. Dann wurde die Suspension bei 300g in der Eppendorf Zentrifuge fünf Minuten lang zentrifugiert. Auf diese Weise konnte man erreichen, dass sich die Zellen in Form eines Pellets am Boden des Behälters absetzten und das Medium als Überstand sich von den Zellen trennte. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das auf dem Grund des Fläschchens entstandene Zellpellet in 100µl PBS resuspendiert. Diese Lösung konnte nun zu je zwei 10µl großen Tropfen auf die beiden Enden eines Objektträgers aufgebracht werden. Nach Eintrocknen der Zellsuspension auf den Objektträgern wurde diese mit je 100µl Aceton fixiert und bis zur Färbung bei -40° in einem Gefrierschrank eingefroren.

### **2.7.6. Konservierung der Zellproteine für das Westernblotverfahren**

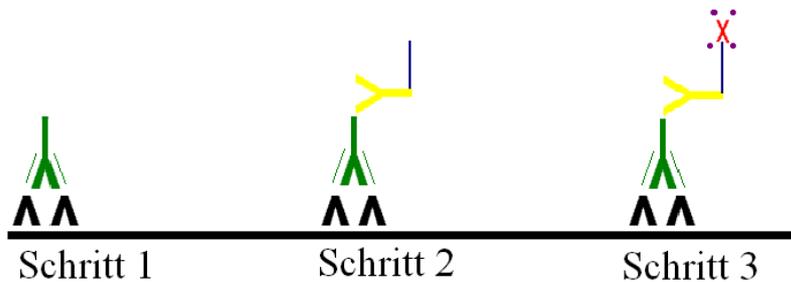
Für die Durchführung eines Westernblots war es notwendig Proteine aus in der Regel auf 6 Well Zellkulturplatten gezüchteten Zellen zu gewinnen. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums in PBS gewaschen und ebenfalls mechanisch mit einem Schaber von der Platte gelöst. Die Suspension aus Zellen und PBS wurde in 15 ml Falcons überführt und bei 500g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 1ml abgesaugt. Die Zellen konnten

in dem Milliliter des verbliebenen Überstands resuspendiert und in 1,5 ml fassende Eppendorf Röhren (Eppi) überführt werden. Diese Suspension wurde ein weiteres Mal bei 500g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des neu entstandenen Überstands wurde das Pellet in 50 µl RIPA Lysispuffer aufgelöst und ein letztes Mal bei 15000g und 4° für 20 Minuten zentrifugiert. Der bei diesem letzten Schritt gewonnene Überstand war das für Durchführung eines Westernblots notwendige Proteinextrakt. Es wurde bei -40° eingefroren bis zur weiteren Verwendung.

## **2.8. Histochemie**

### **2.8.1. Die Labelled Streptavidin-Biotin-Horseradish Peroxidase (LSAB-HRP) Färbung**

Für die immunhistochemische Färbung der auf Objektträgern fixierten Zellen wurde ausschließlich die Labelled Streptavidin- Biotin - Horseradish Peroxidase Färbung (LSAB-HRP) mit dem Dako LSAB-HRP Kit durchgeführt. Ziel dieser Färbung war es, bestimmte Proteine der Zelloberfläche durch verschiedene, monoklonale Antikörper nachzuweisen und somit eine Charakterisierung von Zellen anhand ihrer spezifischen Expression von Oberflächenproteinen zu ermöglichen. Prinzip dieser sogenannten „indirekten“ Färbung ist, dass ein Antikörper (AK) an der Zelloberfläche möglichst spezifisch an dem gewünschten und für die Versuchreihe interessanten Antigen bindet. Im Rahmen dieser Dissertation wurden speziell CD14 und CD68 Maus- Anti- Human AK als Marker für Monozyten bzw. Makrophagen Antigen und VEGF sowie VEGFR 2 als Endothelzellmarker verwendet. An diesen je nach Bedarf gewählten Primärantikörpern bindet ein biotinylierter Anti- Maus Brückenantikörper (Abb. 3). Zuletzt wird das Präparat mit einem Streptavidin, das an das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiert ist, inkubiert. Dieses Streptavidin-Enzymkonjugat setzt nach Bindung an den Sekundärantikörper und Zugabe von einem entsprechenden Substrat dieses um, was letztendlich zu einer Braunfärbung der markierten Zellen führt.



**Abbildung 3:** In drei verschiedenen Schritten binden nacheinander der gewählte Antikörper (grün), dann der biotinylierte Sekundärantikörper (gelb) und anschließend das Streptavidin (rot) mit dem konjugierten HRP (violett).

Bei der praktischen Durchführung wurden die gefrorenen Objektträger nach Auftauen für fünf Minuten mit Aceton behandelt. Anschließend wurde die endogene Wasserstoffperoxidase der Zellen geblockt, um eine unspezifische Färbung zu verhindern. Hierzu wurden die Schnitte eine halbe Stunde mit einer Lösung aus 50 ml destilliertem Wasser und 150 µl 0,3%igem Wasserstoffperoxid bedeckt. Dann wurden die Präparate mit verschiedenen Antikörpern in den unten genannten Verdünnungen behandelt (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Verdünnung der Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung
CD 68	1: 10 000
CD 14	1: 500
VEGF	1: 50
VEGFR 2	1: 100
CD 34	1: 15

Pro Präparat wurde stets nur ein Primärantikörper verwendet. Nach mehreren Waschschritten mit TRIS Puffer wurde ein Tropfen des Sekundär- AKs für 30 Minuten und des Streptavidins ebenfalls für 30 Minuten sowie letztendlich das Chromogen Substrat für fünf Minuten auf die Objektträger aufgetragen. Auch hier wurde vor Auftragen eines neuen Antikörpers oder Reagenzes ausreichend mit TRIS Puffer gewaschen. Bei dem Auftragen der einzelnen AK und Substrate sowie deren Aufbewahrung wurden die Empfehlungen des Herstellers befolgt.

### **2.8.2. Die Hämatoxylin Färbung**

Dieser Färbung wurde standardmäßig jeder zuvor immunhistochemisch behandelte Objektträger unterzogen, um die braungefärbten positiven Zellen von den negativen Zellen abzugrenzen. Die Zellkerne aller negativen Zellen stellen sich nach einer Färbung mit Hämalaun blau dar. Hierzu wurden die Schnitte für ca. fünf Minuten mit Meyer's Hämalaun Lösung bedeckt. Danach wurde das Hämalaun mehrere Minuten mit lauwarmem aqua dest. abgewaschen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert und in der Deckmaschine mit einem dünnen Glasplättchen eingedeckt.

### **2.8.3. Die Ölrot Färbung zum Nachweis von Fettzellen**

Bei diesem Verfahren färbt sich Fett in Zellen rot an. Hierzu wurden die aufgetauten Objektträger mit 200µl Ölrot Gebrauchslösung bedeckt. Die Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung hergestellt, für die 0,7 g Ölrot O in 200ml Isopropanol aufgelöst wurde. Aus sechs Teilen der Stammlösung mit vier Teilen Aqua dest. wurde die Gebrauchslösung hergestellt. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Ölrot Lösung mit Aqua dest. abgewaschen. Die auf diese Weise gefärbten Schnitte wurden nicht eingedeckt, da die Alkoholreihe das Ölrot abgewaschen hätte, sondern lediglich mit Wasser bedeckt und dann unter dem Mikroskop ausgewertet.

### **2.8.4. Die van Kossa Färbung zum Nachweis osteogener Zellen**

Anhand der van Kossa Färbung können morphologisch Verkalkungen in Zellen bzw. eine damit einhergehende eventuelle osteogene Differenzierung nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Präparate mit einer 5%igen Silbernitratlösung benetzt, die sich bei Vorhandensein von kalzifiziertem Gewebe in dieses einbauen würde, um es schwarz zu färben. Die Objektträger wurden bei Tageslicht für eine Stunde inkubiert und anschließend das überschüssige Silbernitrat zunächst mit destilliertem Wasser abgewaschen. Zur kompletten Entfernung des nicht reagierenden Silbernitrats wurde bei Bedarf noch ein Behandlungsschritt mit 2%igem Natriumthiosulphat für fünf Minuten eingelegt. Anschließend wurden die Objektträger mit Wasser gewaschen und in gewohnter Weise eingedeckt.

## 2.9. Das Westernblotverfahren

### 2.9.1. Bestimmung des Proteingehalts der Proben

Für das Western Blotting ist es notwendig Proben mit einer definierten Gesamtmenge (z.B. 50 µg) an Protein zu verwenden, um einen Vergleich der Proben eines Gels zu gewährleisten.

Die im Rahmen dieser Dissertation verwandte Methode beruhte darauf, dass durch das Erstellen einer Eichgeraden mit definierten Standards der Proteingehalt der Proben mittels photometrischer Messung bestimmt werden konnte.

Hierfür wurden die gefrorenen Proben zunächst aufgetaut und je 10µl einer Probe auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Diesen 10µl wurde jeweils 200µl *bicinchoninic acid* (BCA) Reagenz zugefügt und die Platte bei 37° eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion, die dieses Reagenz hervorruft, beruht darauf, dass zunächst Cu<sup>2+</sup> Ionen des Proteins zu Cu<sup>+</sup> Ionen reduziert werden. An diese reduzierten Kupferionen bindet spezifisch Bichinonsäure, die bei 592 nm ihre stärkste Absorption hat und gemessen werden kann [40].

Um eine Aussage über den absoluten Proteingehalt einer Probe treffen zu können, wurde eine lineare Standardkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt, dessen Proben aufsteigend von 0 bis 20µl Protein enthielten. Orientierend an die durch diese bekannten Proteinmengen verursachten linearen Absorptionskurve, konnten die Proteinmengen der Proben aus deren Absorptionen durch Umformung der Gleichung  $y = mx + t$  ausgerechnet werden.

### 2.9.2. Prinzip und Durchführung des Westernblotverfahrens

Das Prinzip des Western Blot (auch *Immunoblot*) beruht darauf, dass von Zellen gewonnene Proteine zunächst elektrophoretisch auf einem Gel aufgetrennt werden. Hierfür werden die Proteine in Taschen des Gels aufgetragen und durch Anlage eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Dann werden die so entstandenen Proteinbanden von dem Gel auf eine Nitrozellulose- Membran transferiert. Das Prinzip der elektrophoretischen Proteinauftrennung beruht darauf, dass nach Anlage eines elektrischen Feldes an Gele, die SDS enthalten, Proteine zum Pluspol wandern und die Eiweiße dabei entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden [48].

Die Übertragung erfolgt ebenfalls durch Anlage eines elektrischen Feldes, diesmal senkrecht zur o. g. Laufrichtung, sodass die Proteine von dem Gel auf die Membran wandern können.

Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung überträgt sich auf die Membran, auf der die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Abhängig von dem gewählten AK färben sich die Proteinbanden auf einer bestimmten Höhe an, so dass in der Regel nachgewiesen werden kann, ob dieses Antigen von den Zellen exprimiert wurde oder nicht. Beim Auftragen mehrerer Banden auf einem Gel lässt sich auch – unter der Prämisse, dass alle Banden die gleiche absolute Proteinmenge enthalten eine Aussage über die Quantität der Proteinexpression im Vergleich treffen.

Im Rahmen der Versuche für diese Dissertation wurden zunächst die erforderlichen Gele nach folgendem Schema gegossen (Tabelle 2):

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Gele

Reagenzien	Trenngel/ 1x	Sammelgel/ 1x
Wasser	4,100 ml	2750 ml
1,50 M Tris- Cl (pH 8,8)	2,500 ml	-
0,50 M Tris- Cl (pH 6,8)	-	1,250 ml
Acrylamidlösung, 30%	3,300 ml	0,850 ml
10% SDS	0,100 ml	0,050 ml
APS, 10%	0,050 ml	0,025 lm
TEMED	0,005 ml	0,005 ml

Die in der Tabelle 2 erwähnten Reagenzien wurden in den entsprechenden Mengen in der beschriebenen Reihenfolge nacheinander in je ein Falcon-Röhrchen mit einem Volumen von 15 ml gefüllt. Die Prozedur ergab ein 10%iges Trenngel und ein 5%iges Sammelgel. Zehnprozentiges Trenngel eignet sich besonders zur Auftrennung von Proteinen in der Größenordnung von 30- 120 kDa. Das in diesem Fall verwendete so genannte SDS Gel wird von Proteinen gebunden und diese im Rahmen des Bindungsprozesses von SDS denaturiert. Somit werden Protein-Protein Wechselwirkungen unterbunden. Zunächst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten der Gelkammer gefüllt. Direkt auf das Gel wurde 100%iger Alkohol gegossen, der sich in der Regel nicht mit dem Gel vermischt, sondern auf diesem liegen bleibt, es somit beschwert und einen glatten oberen Gelrand erzeugt. Nach 15-30 Minuten war das Gel bei Raumtemperatur in der Regel soweit polymerisiert, dass der Alkohol abgegossen werden und das Sammelgel darauf geschichtet werden konnte. In das Sammelgel wurde ein

Plastikkamm (BioRad, München) eingefügt, der Taschen in das Gel schnitt. Nach weiteren 15- 30 Minuten war es möglich den Kamm zu entfernen und die Taschen des bis dahin polymerisierten Sammelgels mit Protein zu befüllen.

In die erste Tasche des Sammelgels wurde bei jedem Versuch der Proteinmarker gefüllt, der bei korrekter Durchführung des Blotting Verfahrens immer sichtbar werden sollte. Nachfolgend wurden alle weiteren Taschen mit den Proben in den zuvor mit Hilfe der Eichkurve berechneten Mengen befüllt, die zu gleichen Teilen aus Ladepuffer und Proteinprobe bestanden. Die Proben waren zuvor 5 Minuten bei 95° Grad gekocht worden, um alle Proteine der Probe vollständig aufzulösen und die Ausbildung von Tertiärstrukturen zu unterbinden. Soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden Proben mit einer absoluten Proteinmenge von 5µg verwendet.

Die Probe in der Gelkammer lief nach Anlage eines elektrischen Feldes zunächst von den Taschen des Sammelgels bis an die Trennlinie zum Trenngel und sammelte sich dort. Von dort lief das Protein dann das gesamte Trenngel hinunter bis an den unteren Rand und trennt sich hierbei auf. Hierfür wurde die Gelkammer im BioRad Power Pac, das zuvor mit Elektrophoresepuffer gefüllt worden war, an 100 Volt (ca. 60mA) für 20 Minuten angeschlossen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine auf den Gelen wurden dieselben für eine halbe Stunde in Transferpuffer equilibriert. Gleichzeitig wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran in derselben Größe wie das Geld vorbereitet, indem sie nach kurzem Eintauchen in Methanol, ebenfalls für 15- 20 Minuten in Transferpuffer equilibriert worden war. PVDF Membranen wurden im Rahmen dieser Dissertation insbesondere aufgrund ihrer mechanischen und chemischen Stabilität gewählt.

Der sogenannte Semi- Dry Blot wurde zusammengesetzt indem auf eine Schicht Filterpapier eine ebenfalls in Transferpuffer equilibrierte PVDF Membran gelegt wurde, auf diese das Gel und abschließend ein letztes Blatt Filterpapier. Dieser Blot wurde in das Biorad Trans Blot gelegt und der Proteintransfer von dem Gel auf die adsorbierende Membran 40 Minuten lang bei 15 Volt durchgeführt. Die Membran wurde nach Beendigung des Transfers eine Stunde lang in eine Box mit Tweenhaltigem Blockpuffer gelegt. Durch das Blocken konnten die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran gesättigt werden. Anschließend war es möglich die geblockten Membranen mit den geblotteten Antigenen mit diversen AK zu inkubieren. Im Rahmen dieser Versuche wurden Primär- AK gegen CD14, CD 31, CD68, CD106, CD144, VEGFR2, GAPDH und der Peroxidase konjugierte Zweitantikörper Goat-Anti- Mouse in folgenden vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen verwendet (Tab. 3):

**Tabelle 3:** Verdünnungen der AK für das Westernblot- Verfahren

Antikörper	Verdünnung
CD 14	1: 1000
CD 31	1: 500
CD 68	1: 500
CD 106	1: 1000
CD 144	1: 100
GAPDH	1: 5000
Goat- Anti- Mouse- HRP	1: 5000
VEGFR 2	1: 500

Die Primärantikörper wurden stets in Blockpuffer verdünnt. Nach Inkubation über Nacht bei 4° Grad wurde nach ausreichenden Waschschritten mit Waschpuffer der mit Peroxidase markierte zweite AK (immer *Goat- Anti- Mouse- HRP*), ebenfalls in Blockpuffer verdünnt, zugegeben. Die an den zweiten AK gebundene Peroxidase löst nach Bindung an den gebundenen Erstantikörper durch Oxidation von Luminol eine Chemilumineszenz aus. Nach einstündiger Inkubation und ausreichenden Waschschritten wurde die Membran mit der Detektionslösung Supersignal west Pico behandelt. Anschließend wurde auf die PVDF Membran ein Film gelegt, der die Chemilumineszenz messen half, und die Membran in einer Entwicklungskassette platziert. Je nach AK wurden unterschiedlich lange Zeiten gewählt, in denen der Film auf der Membran verließ bevor er entwickelt wurde. Erfahrungsgemäß variieren die unterschiedlichen AK in der Intensität ihrer Bandenkennzeichnung und brauchen somit länger bzw. kürzer, um eine sichtbare Anfärbung der Proteinbanden zu verursachen. Wie lange der Film genau auf der Membran gelegen hat, wird bei jedem erwähnten Versuch separat erläutert. Die Banden wurden mittels Photoshop 6.0 (Adobe, München) digitalisiert und ausgewertet. Gleichzeitig konnte im Rahmen der Auswertung eine Quantifizierung der positiven Banden mit dem besagten Programm erfolgen. Die Ergebnisse werden als Säulendiagramme im Ergebnisteil dargestellt.

Bei allen Versuchen wurde die Membran nach ausreichenden Waschschritten mit einem in Blockpuffer in einem Verhältnis von 1 zu 5000 verdünnten Primärantikörper gegen GAPDH inkubiert, wiederum gewaschen, mit dem Zweitantikörper inkubiert und entwickelt. GAPDH

wird als so genanntes *house keeping protein* erfahrungsgemäß von allen Zellen konstant exprimiert und sollte bei korrekter Durchführung des Blottings immer sichtbar werden.

## 2.10. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### 2.10.1. Prinzip der PCR

Die PCR ist eine Methode, die die Vermehrung geringer DNA Mengen ermöglicht, so dass diese näher analysiert werden können. Für die PCR wird die Proben DNA zunächst bei 94° denaturiert, so dass sich die beiden DNA Stränge trennen. Anschließend werden der Probe ausreichend Oligonukleotide zugefügt, wobei die Temperatur der Proben auf 55° heruntergekühlt wird, so dass sich diese Oligonukleotide an die aufgetrennten DNA Stränge anfügen können. Dieser Vorgang wird als *annealing* bezeichnet. Die Temperatur der Probe wird wieder auf 72° angehoben, um optimale Arbeitsbedingungen für die Taq Polymerase, einer aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* isolierten Polymerase, zu schaffen. Die Taq Polymerase hat ihr Aktivitätsmaximum bei 74°. Aufgabe dieses Enzyms ist es die Oligonukleotide mit der einzelsträngigen DNA zu einer doppelsträngigen DNA zusammenzufügen. Somit verdoppelt sich bei einem Zyklus dieser Reaktion die Anzahl der DNA-Stränge. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde vor allem die Anwendungsmöglichkeit der PCR verwendet, die als Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion (RT- PCR) bezeichnet wird. Hier wird aus einer RNA mithilfe einer reversen Transkriptase und ausreichend Nukleotiden und Primern (Oligonukleotide, die als Startpunkt für DNA replizierende Enzymen dienen) eine sog. *copyDNA* (cDNA) synthetisiert, die wiederum die Proben DNA für die PCR darstellt. Bei einer RT-PCR ist es im Gegensatz zu PCR wichtig, dass die Primer innerhalb der transkribierten Region liegen und innerhalb der sogenannten Exons (transkribierbare DNA-Regionen), die der mRNA und damit der Expression der einzelnen Gene entsprechen.

### **2.10.2. Die Präparation von RNA aus Zellen**

Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37° inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Medium abgeschabt und die Zellsuspension weiterverarbeitet.

Für die Gewinnung von RNA aus den kultivierten Zellen wurden diese aus den Zellkulturflaschen in ihrem jeweiligen Medium abgekratzt, dann der Zellsuspension zur Stabilisierung der RNA das Fünffache an RNA Protect Zellreagenz des RNeasy Protect Mini Kits beigefügt und alles gut gemischt. Anschließend wurde das Gemisch bei 5000g für fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Zellpellet je nach Anzahl der gewonnenen Zellen entweder in 350 µl ( $< 5 \times 10^6$ ) oder 600µl ( $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ) RLT Plus Puffer resuspendiert. Nach Entfernung von DNA durch Zentrifugation wurde in einem Röhrchen mit einer Säule zum Abfangen von DNA, wurde die Säule verworfen und das Lysat mit einem gleichen Anteil (entweder 350µl oder 600µl) an Ethanol (70%) gemischt. Das Gemisch wurde in einem Röhrchen mit einer Säule zum Abfangen von RNA bei 8000g für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Lysat wurde verworfen und die Säule mit der RNA in einem sterilen 2 ml Röhrchen nacheinander mit 700 µl RW1 Puffer bei 8000g für 15 Sekunden, mit 500 µl RPE Puffer für 15 Sekunden und nochmals 500 µl RPE Puffer für zwei Minuten zentrifugiert. Die Röhrchen mit dem Durchlauf wurden nach jedem Zyklus verworfen und die Säule in ein neues Röhrchen überführt bevor sie neu befüllt wurde. Zuletzt wurde ein leeres Röhrchen mit der Säule für eine Minute bei 12 000g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 30-50 µl RNase freiem Wasser des Kits befüllt und für eine Minute bei 8000g zentrifugiert, um die RNA aus der Membran der Säule zu eluieren. Die gewonnene RNA wurde zur Synthese von cDNA verwendet.

### **2.10.3. Die Synthese von copyDNA (cDNA)**

Zur Analyse auf RNA- Ebene wurde aus der *messenger RNA* (mRNA) eine zugehörige cDNA synthetisiert, die mittels RT-PCR untersucht wurde. Es wurden hierfür 0,2 µg -2 µg RNA auf 11µl mit destilliertem Wasser in einem 1,5 ml Röhrchen aufgefüllt. Dann wurde dem Röhrchen noch 1 µl Oligo(dT18)Primer (Oligonukleotide mit 12 bis 18 Thymidinen) zugegeben. Dieser Primer bindet selektiv an den Poly- A Schwanz der mRNA und ermöglicht als Startpunkt so die cDNA Synthese. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Röhrchen bei

65° für fünf Minuten inkubiert. Danach wurde das Röhrchen sofort auf Eis gelegt. Anschließend wurde dem Ansatz 8 µl der nach Empfehlung des Herstellers (Fermentas, Leon-Rot) gemischten Lösung [4 µl Reverse Transkriptase Puffer (5x), 1 µl RNase Inhibitor, 2 µl dNTP (10mM) und 1 µl Reverse Transkriptase (M-MuLV)] des Kits beigefügt. Danach wurden die Proben nochmals gemischt, kurz anzentrifugiert und für eine Stunde bei 43° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzung auf 70° für fünf Minuten gestoppt. Die auf diese Art gewonnene cDNA wurde bei -20° bis zur Analyse aufbewahrt.

#### **2.10.4. Die Reverse Transkriptase (RT) - PCR**

Die quantitative PCR ermöglicht die Quantifizierung bzw. die genaue Bestimmung der amplifizierten Menge an DNA. Bei dieser Methode erfolgt eine Fluoreszenz-Messung, die während eines jeden PCR-Zyklus erfasst wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines PCR-Laufs wird dann anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Für die PCR-Durchführung wurde das SYBR Green Kit von Qiagen verwendet. Dieser Mix enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen, RNase freies Wasser, Taq- Polymerase und dNTPs und ist für die quantitative PCR optimiert. Es wurden jeweils 25 µL Ansätze verwendet. Alle Reaktionen wurden in speziellen 96-PCR-Platten (Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt, die mit einer Klebefolie abgedeckt und versiegelt wurden (Sarstedt, Nümbrecht). Der Ansatz für die PCR Reaktion wurde aus 12,5µl SYBRGreen- Mix, 8,5µl RNase freiem Wasser, 2,0µl der unter 2.5. beschriebenen Primer und 2,0µl cDNA hergestellt.

Ein PCR Zyklus wurde wie folgt durchgeführt:

- 5 Minuten bei 95°C (Aktivierungsschritt)

Dieser Schritt erfolgt nur einmalig, die unten beschriebenen drei weiteren Schritte mehrfach.

- 10 Sekunden bei 95°C (Denaturierung)
- 30 Sekunden bei 60°C (Anheftung der Nukleotide und Elongation)
- 10 Sekunden bei 72°C (Amplifizierung, Elongation)

Es wurden insgesamt 35 Zyklen durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde wegen der Einfachheit und der Vielfalt an verschiedenen Faktoren die interkalierende Methode mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen verwendet. Diese Farbstoffe lagern sich in die DNA ein, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der gesuchten DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz bei jedem PCR-Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Für die Quantifizierung wurde als Referenz das GAPDH-Gen herangezogen, um einen relativen Menge-Vergleich durchführen zu können. Weil jedoch keine absolute Menge an DNA gemessen wurde, handelt es sich in dieser Arbeit um eine sog. relative Quantifizierung; d.h. die Quantifizierung erfolgte im Vergleich zu dem *housekeeping* Gen GAPDH. Die Auswertung erfolgte im exponentiellen Anstieg der Zyklen. Für den Anfang der exponentiellen Phase wurde der Ct-Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) bzw. der Cp-Wert (engl. Crossing Point) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Effizienz, d.h. die Vermehrung der Amplifikate pro Zyklus, wurde dann wie folgt berechnet:

$$\Delta CP = CP (\text{Zielgen}) - CP (\text{Kontrollgen GAPDH})$$

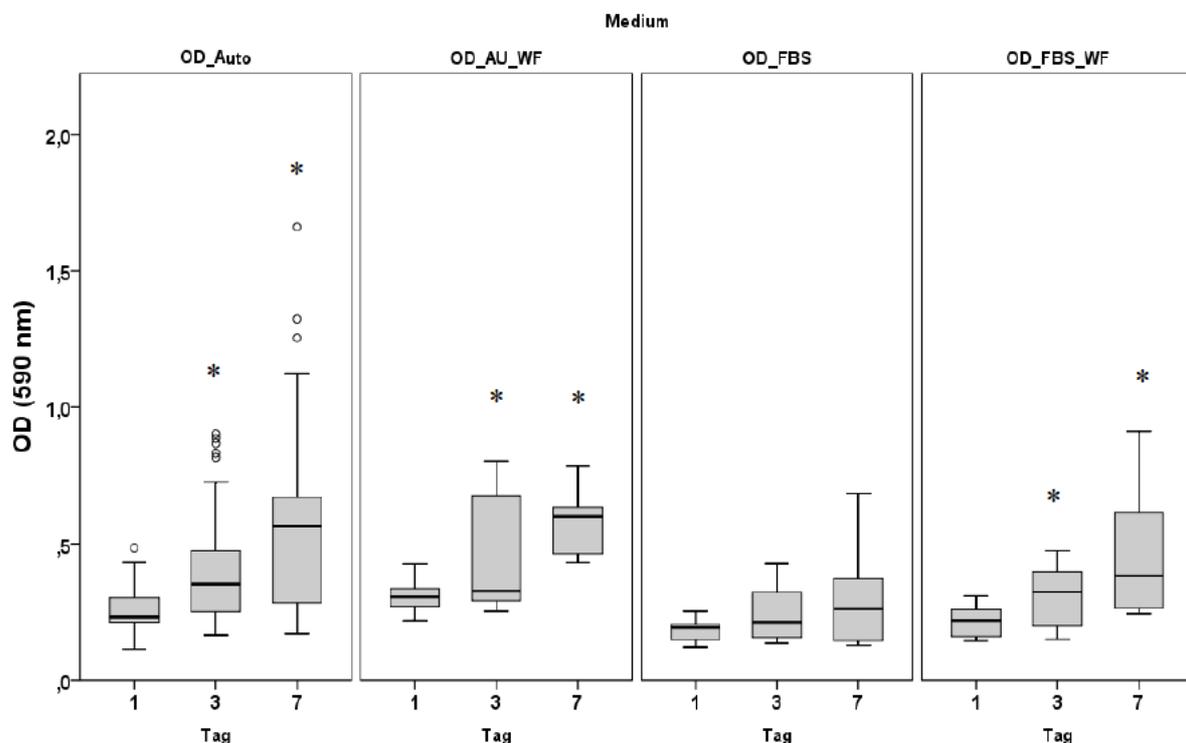
## 2.11. Statistische Analyse

Alle ausgezählten Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Mittelwerte beruhen stets auf Mehrfachbestimmungen. Die statistische Analyse erfolgte mittels der Kovarianzanalyse (ANCOVA). Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ( $p < 0,05$ ) festgelegt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1. Zellproliferation

Es wurde der Einfluss verschiedener Medien auf die Zellvermehrung mittels des MTT Zytotoxizitätstest getestet (Abb. 4). Die Zellen zeigten bei drei der vier getesteten Medien eine signifikante Zunahme der Umsetzung des MTT zu Formazan von Tag 1 nach 7. Die absolute Zunahme fiel unterschiedlich stark aus, war aber am größten in Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren, jedoch nicht signifikant größer im Vergleich zu dem Medium Auto. Im direkten Vergleich aller vier Medien zeigte sich, dass das Medium mit dem Zusatz von autologem Serum und den Wachstumsfaktoren IL 3 und M – CSF an Tag 7 zu der stärksten, absoluten Zunahme geführt hatte. Im Vergleich der beiden Medien ohne Wachstumsfaktoren zeigt sich eine Zunahme der Formazanumsetzung in dem Medium mit autologem Serum, bei nicht signifikantem Anstieg unter dem Einfluss von FBS ohne weitere Zusätze.



**Abbildung 4:** Es zeigt sich eine signifikante Zunahme (\*) der Absorption im MTT Test in den Medien Auto, AU WF und FBS WF, FBS alleine ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren kann keinen signifikanten Anstieg der Absorption erreichen. Die breiteste Streuung der Absorptionsmessungen der einzelnen Tage zeigt sich in dem Medium Auto.

**Tabelle 4** Die getesteten Medien im Vergleich.

Medium	Quelle	Typ III Summe der Quadrate	Df	Mittelwert	F	Signifikanz
OD_Auto	Korrigiertes Model	3,599	3	1,200	27,703	,000
	Intercept	,021	1	,021	,491	,485
	Tag	1,926	2	,963	22,240	,000
	Baseline	1,673	1	1,673	38,630	,000
	Irrtum	4,763	110	,043		
	Gesamt	28,037	114			
	Korrigierte Gesamtheit	8,362	113			
OD_AU_WF	Korrigiertes Model	,965	3	,322	24,835	,000
	Intercept	,001	1	,001	,076	,784
	Tag	,662	2	,331	25,577	,000
	Baseline	,302	1	,302	23,350	,000
	Irrtum	,647	50	,013		
	Gesamt	12,190	54			
	Korrigierte Gesamtheit	1,612	53			
OD_FBS	Korrigiertes Model	,218	3	,073	7,801	,000
	Intercept	,160	1	,160	17,178	,000
	Tag	,213	2	,107	11,466	,000
	Baseline	,004	1	,004	,472	,493
	Irrtum	1,023	110	,009		
	Gesamt	7,666	114			
	Korrigierte Gesamtheit	1,240	113			
OD_FBS_WF	Korrigiertes Model	,931	3	,310	24,110	,000
	Intercept	,000	1	,000	,007	,932
	Tag	,541	2	,270	20,999	,000
	Baseline	,391	1	,391	30,332	,000
	Irrtum	,644	50	,013		
	Gesamt	7,338	54			
	Korrigierte Gesamtheit	1,575	53			

Die höchste prozentuale Zunahme der Zellvitalität, ausgehend von dem Ausgangswert, konnte in dem Medium mit dem Zusatz von autologem Serum ohne Wachstumsfaktoren gesehen werden, jedoch war die Absorption zu Tag 7 nicht signifikant höher im Vergleich zu den Medien AU WF und FBS WF (Tab. 4). Zudem fällt in der Auswertung auf, dass dieses Medium die stärkste Streuung der Einzelresultate aufweist (Abb. 4).

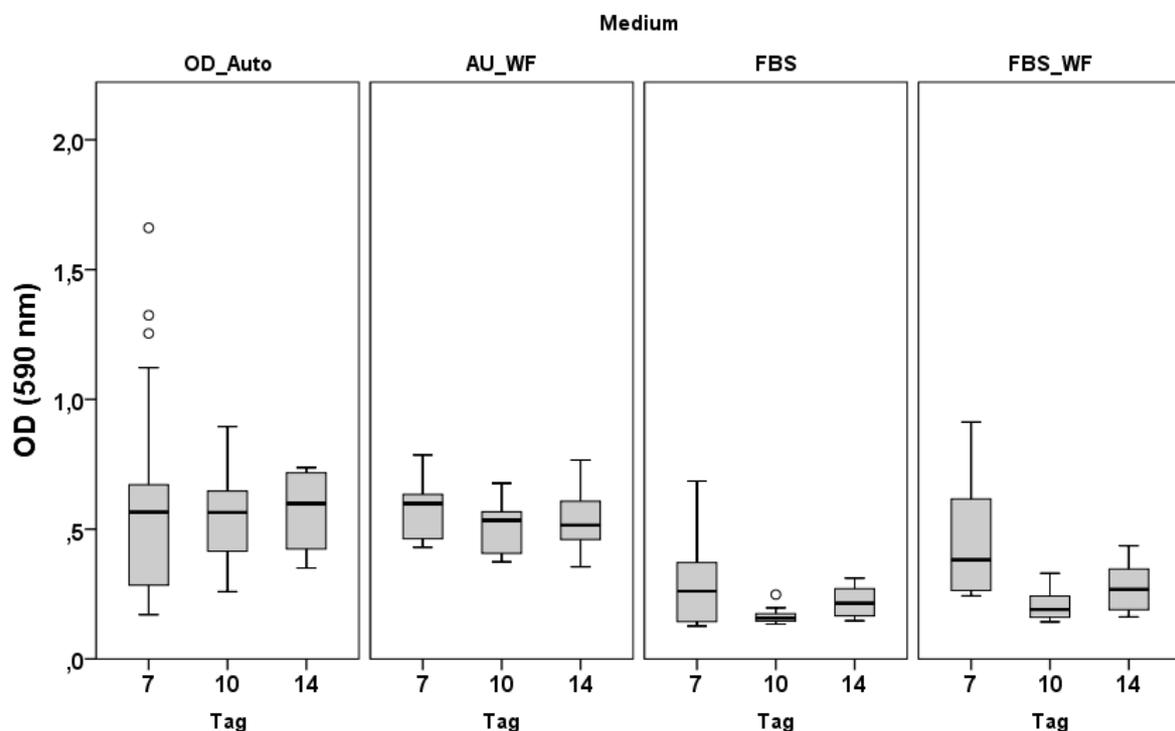
Trotz fehlender Signifikanz zeigen die Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren ähnlich

gute Resultate in Hinblick auf die Zellproliferation an Tag 7, obwohl der Anstieg der Proliferation nicht in der Geschwindigkeit erfolgt wie in dem Medium Auto (Tab. 5).

**Tabelle 5:** Den schnellsten Anstieg in der Zellproliferation zeigt das Medium Auto.

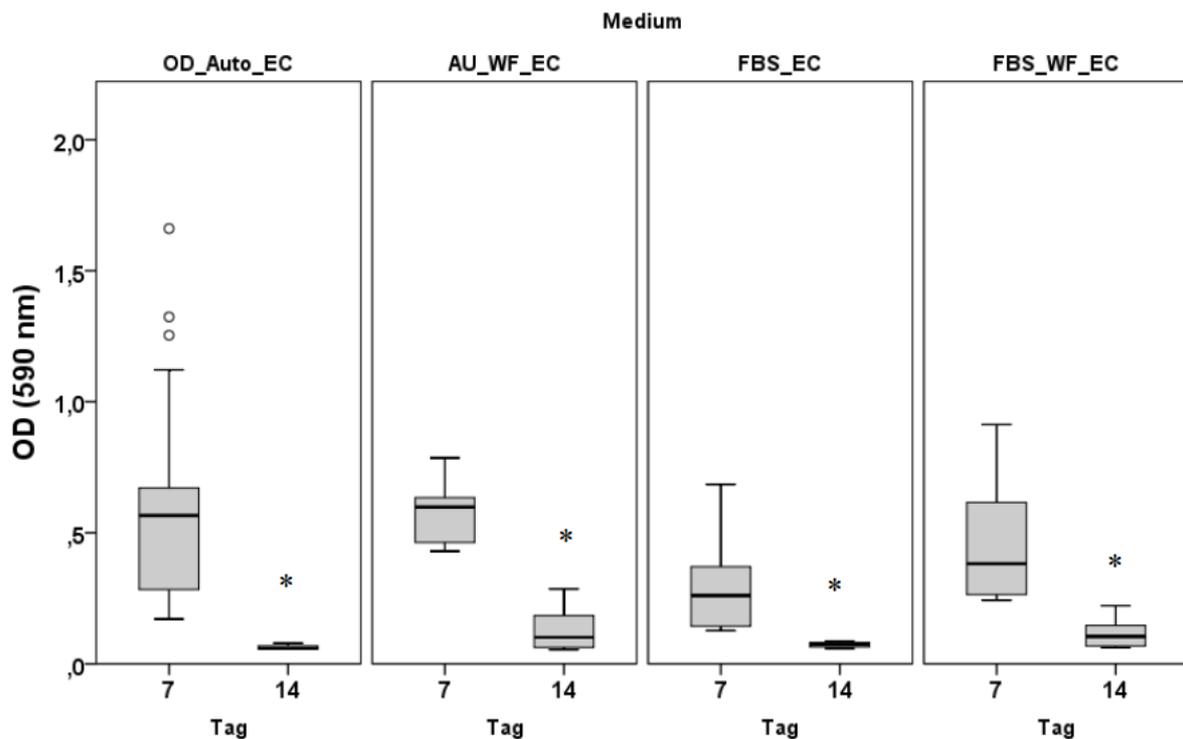
Medium	Mittelwert	95% KF Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
OD_Auto	0,381	0,352	0,41
OD_AU_WF	0,343	0,297	0,389
OD_FBS	0,308	0,276	0,339
OD_FBS_WF	0,351	0,309	0,392

Unter Beibehaltung der Kulturbedingungen und Verlängerung des Versuchs auf 10 und 14 Tage zeigte sich in allen vier untersuchten Medien kein weiterer Anstieg der Zellvitalität, so dass kein Zugewinn durch eine Verlängerung der Kultivierung erreicht werden konnte (Abb. 5). Eine Verlängerung der Kultur führt entweder zu einem Sistieren der Zellvitalität auf ungefähr dem Niveau des Tags 7 bzw. zu einem Rückgang der Zellproliferation, der noch nicht signifikant ist.



**Abbildung 5:** Eine Verlängerung der Kultivierung über sieben Tage auf 10 und 14 führt in keinem der untersuchten Medien zu einer weiteren Erhöhung der Zellaktivität im MTT Test unter Beibehaltung des zu Tag 1 gewählten Mediums.

Nach Umstellung der Kulturbedingungen an Tag 7 durch Austausch der bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Medien durch Endothelzellmedium, zeigte sich in allen vier Medien ein signifikanter Abfall der Zellaktivität in den nächsten sieben Tagen auf nahezu das Niveau des ersten Tages (Abb. 6). Es spielte hierbei keine Rolle, welches der vier Medien in den ersten sieben Tagen des insgesamt 14 tägigen Versuchs verwendet worden war. In der Absorption an Tag 14 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der einzelnen Medien, sie sind nahezu gleich groß.



**Abbildung 6:** Es zeigt sich ein signifikanter Abfall (\*) der Zellproliferation von Tag 7 nach Tag 14 nach Austausch des zuvor verwendeten Medium durch kommerziell erhältliches Endothelzellmedium an Tag 7. Das Niveau, auf das die Zellabsorption abfällt ist gleich niedrig und nahezu vergleichbar mit dem Niveau an Tag 1. Es wird hierbei kein Unterschied gesehen, welches Medium in der ersten Woche des Versuchs zur Kultivierung verwendet worden war.

Die vorherige Beschichtung der Platten, auf denen die Zellen später gezüchtet wurden, mit Fibronectin hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis (nicht graphisch dargestellt), es zeigten sich dieselben Resultate in derselben Intensität wie auf den Platten ohne Fibronectin, so dass weiterhin auf eine Beschichtung verzichtet wurde.

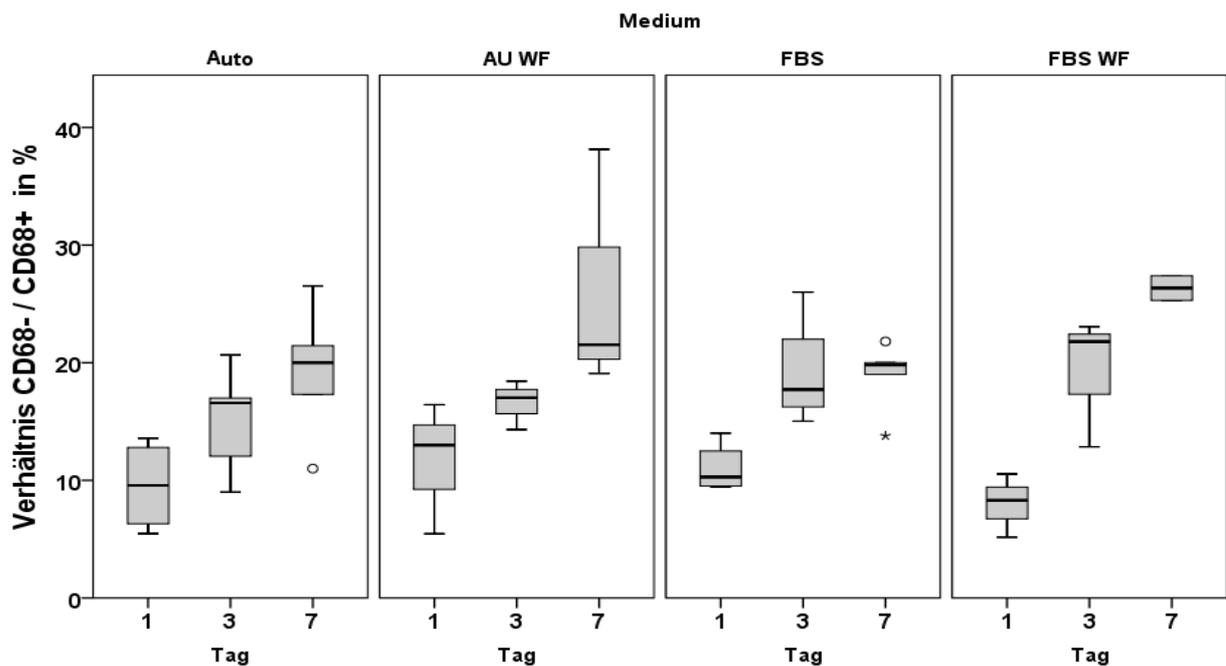
## **2.2. Zellidentifizierung**

### **3.2.1. Die Expression immunhistochemischer Marker gezüchteter Zellen**

Parallel zu dem MTT Assay waren Zellen derselben Charge für immunhistochemische Untersuchungen isoliert worden, um eine genauere Aussage über die Art der gezüchteten Zellen treffen zu können. Die Färbung der Zellen mit CD68 an den Tagen 1, 3 und 7 zeigte eine Zunahme der CD68 positiven Zellen im Verhältnis zu CD68 negativen in allen vier untersuchten Medien (Abb. 7).

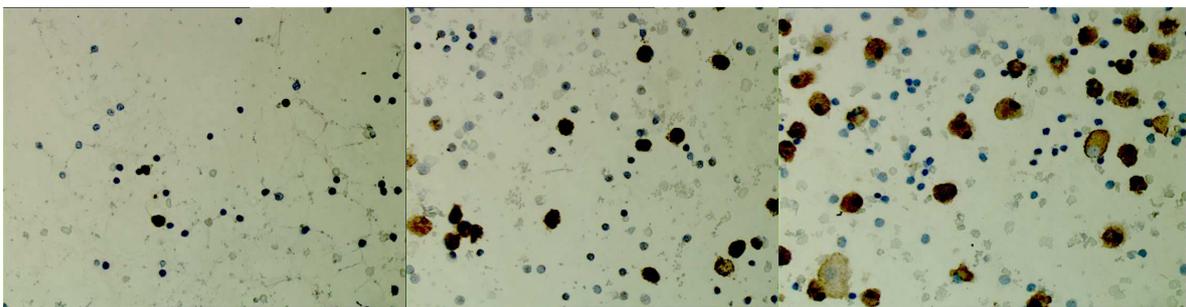
Die stärkste Zunahme zeigten hier Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren. Medium mit FBS erzielte die geringste Zunahme CD68 positiver Zellen, autologes Medium ohne weitere Zusätze zeigte eine signifikante Zunahme CD68 positiver Zellen von Tag 1 bis 7, erbrachte aber nicht die höchste Zunahme ausgehend vom Ausgangswert (Abb.7).

Prinzipiell wurden alle Präparate mit der LSAB-HRP Methode gefärbt. Hierbei zeigte sich bei allen Präparaten unabhängig von dem Medium, in dem die Zellen zunächst gezüchtet worden waren, eine prozentuale Zunahme CD68 positiver Zellen von Tag 1 nach Tag 7. Lediglich Präparate minderer Qualität mit zu wenigen Zellen zeigten eine Inkonsistenz in der Progredienz ihrer Vermehrung, so dass ein Cut- Off von 300 Zellen gewählt wurde. Objektträger, auf denen weniger als 300 Zellen fixiert werden konnten, wurden verworfen.



**Abbildung 7:** Ausgehend vom Ausgangswert CD68 positiver Zellen (100%) zeigt sich in allen getesteten Medien eine Zunahme CD68 positiver Zellen, den stärksten relativen Zuwachs zeigt Medium mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren (AU WF/ FBS WF). Medium mit dem Zusatz von FBS ohne Wachstumsfaktoren (FBS) zeigt den schwächsten Anstieg im Anteil CD 68 positiver Zellen.

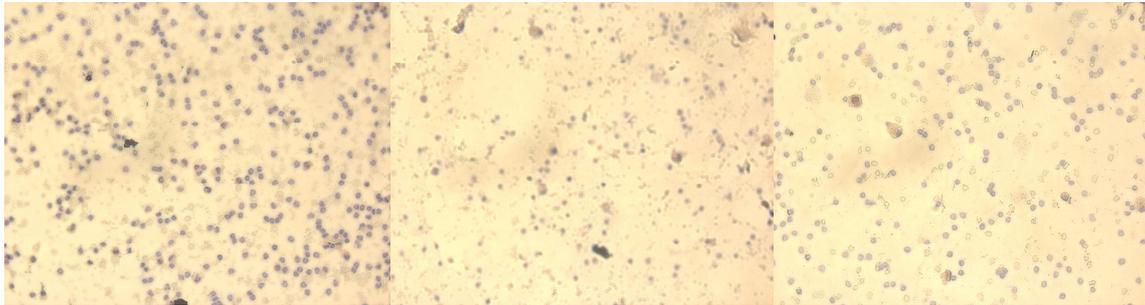
Eine Zunahme der CD68 positiven Zellen lässt sich bereits ab einer Vergrößerung von 4fach unter dem Mikroskop erkennen (Abb.8).



**Abbildung 8:** In FBS mit Wachstumsfaktoren gezüchtete Zellen an den Tagen 1, 3 und 7 auf einem Objektträger in 10facher Vergrößerung. CD68 positive Zellen stellen sich braun dar, die CD68 negative Zellen auf dem Objektträger sind blau. Eine Zunahme CD 68 + Zellen makroskopisch erkannt werden.

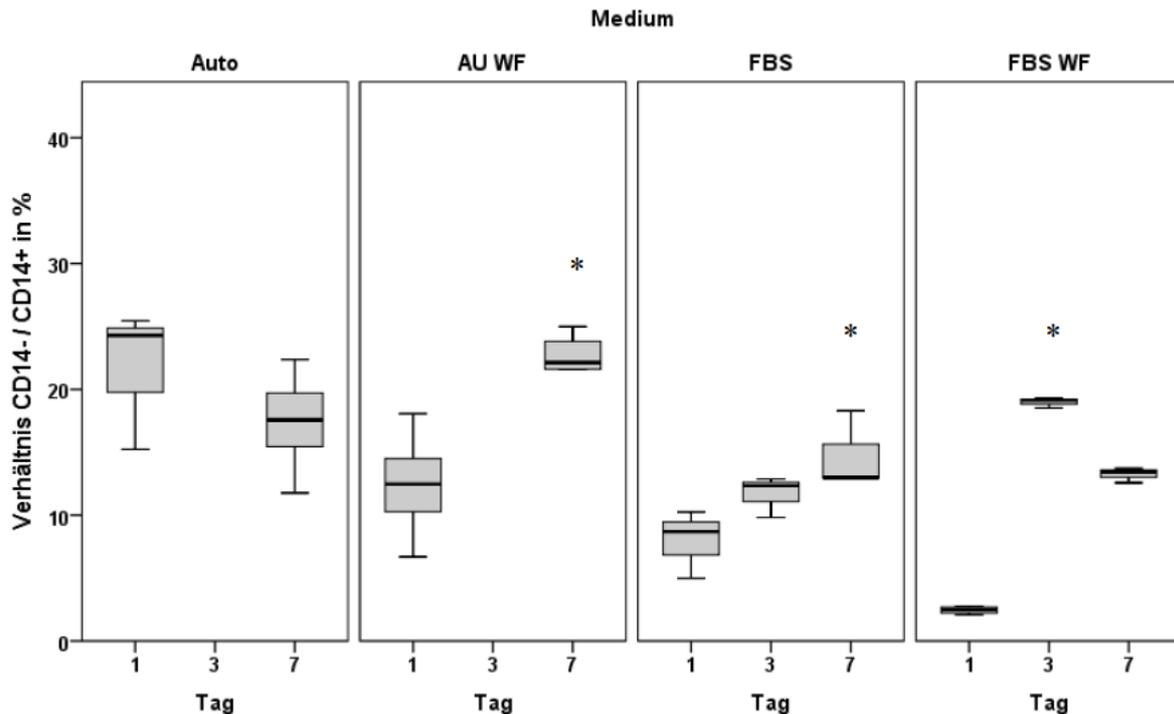
Es ließen sich im Gegensatz zu CD68 keine Expression von CD34, VEGF, VEGFR2, CD144, CD31 oder CD106 nachweisen. Es zeigte sich lediglich eine unspezifische Färbung einzelner

Zellen auf dem Objektträger, nahezu alle Zellen zu jedem der untersuchten Tage (1, 3, 7) waren Antikörper negativ (Abb.9).



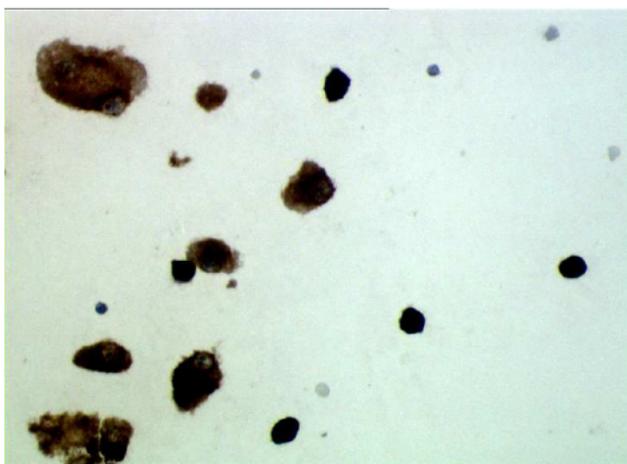
**Abbildung 9:** Mit Antikörper gegen VEGF gefärbte Objektträger an den Tagen 1, 3 und 7 in 4facher Vergrößerung. Es zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein relevanter Anteil an VEGF positiven Zellen. Vereinzelt lässt sich eine unspezifische Braunfärbung erkennen.

Die Färbung der auf Objektträger fixierten Zellen mit CD14 Antikörpern zeigte eine Zunahme der CD14 positiven Zellen im Verhältnis zu CD14 negativen Zellen. Lediglich in dem Medium mit dem Zusatz von autologem Serum ohne Wachstumsfaktoren zeigte sich keine signifikante Zunahme (Abb.10). Es konnte bei allen der drei anderen getesteten Medien eine Zunahme der CD14 Expression insbesondere im Vergleich Tag 1 und 7 gesehen werden, das Medium FBS WF zeigte zu Tag 7 im Vergleich zu Tag 3 einen nicht signifikanten Abfall der CD14 Expression (Abb.10).



**Abbildung 10:** Die relative Expression CD14 positiver Zellen zu CD14 negativen nimmt in allen getesteten Medien außer dem Medium mit Zusatz autologen Serums ohne Wachstumsfaktoren („Auto“) von Tag 1 nach Tag 7 signifikant (\*) zu. In dem Medium FBS WF kommt es von Tag 3 nach 7 zu einem nicht signifikanten Abfall der CD14 Expression.

Die immunhistochemische Färbung von Zellen, die 14 Tage lang in Kultur gehalten worden waren, die letzten sieben davon in Endothelzellmedium, zeigte eine Färbung aller noch auf dem Objektträger verbliebenen Zellen für jeden gewählten Antikörper (CD68, VEGF, VEGFR2, CD144, CD106). Auf den Objektträgern waren unabhängig von dem verwendeten Antikörper keine antikörpernegativen mehr Zellen nachweisbar. Zudem ließ sich feststellen, dass konform zu dem Ergebnis des MTT Zytotoxizitätstests lediglich wenige Zellen auf den Objektträgern verblieben waren (Abb.11).

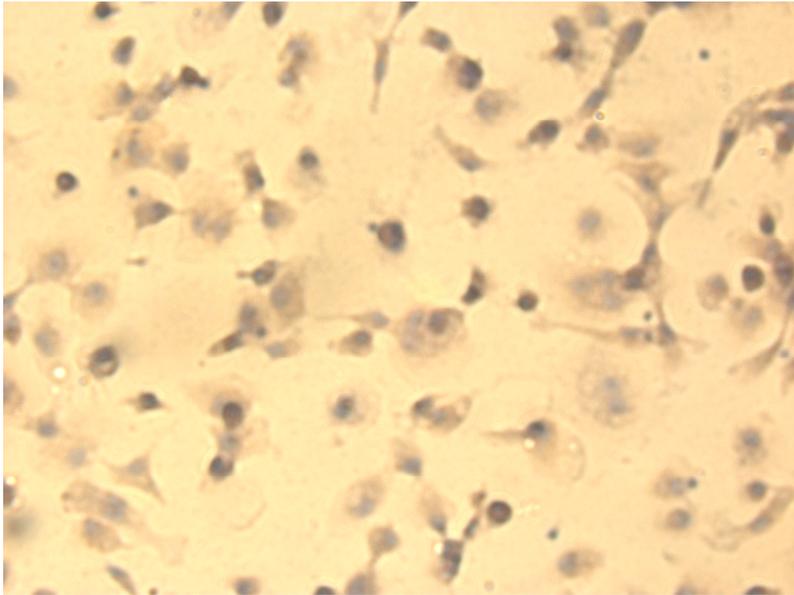


**Abbildung 11:** Auf dem Objektträger sind nach 14 Tagen, davon die ersten sieben in Medium mit autologem Serum und Wachstumsfaktoren („AU WF“) und die letzten sieben in Endothelzellmedium insgesamt wenige Zellen verblieben (Vergrößerung vierfach). Diese sind positiv für VEGFR2. Im rechten Oberrand des Bildes sind vereinzelt VEGFR2 negative Zellen in Blau zu erkennen.

In der Ölrot und in der van Kossa Färbung ließen sich in keinem Medium zu keinem Zeitpunkt positive Zellen nachweisen, so dass keine Differenzierung zu Fettzellen oder osteogenen Zellen zu sehen war.

### **3.2.2. Der makroskopische Phänotyp**

In der ersten Betrachtung unter dem Mikroskop zeigte sich, dass die Zellen je länger sie in Medium gehalten wurden ihren Phänotyp änderten. Wie in Abbildung 8 und 11 zu erkennen ist verändern die zunächst kompakten, runden Zellen ihr Aussehen hin zu einem plumperen, runderen und größeren Zelltyp hin nach Tag 7 bzw. 14. Die Zellen wurden zudem in Chambersildes gezüchtet, um deren natürliches Wachstumsmuster zu erhalten und nicht durch Abschaben von der Oberfläche, wie es für die anderen beschriebenen Verfahren notwendig war, zu zerstören. Hier zeigte sich, dass vereinzelt Zellen sich spindelförmig dehnten wie es von Endothelzellen zu erwarten war, jedoch zeigte sich auch hier vorherrschend der runde, plumpe Zelltyp, vgl. hierfür Abbildung 12.

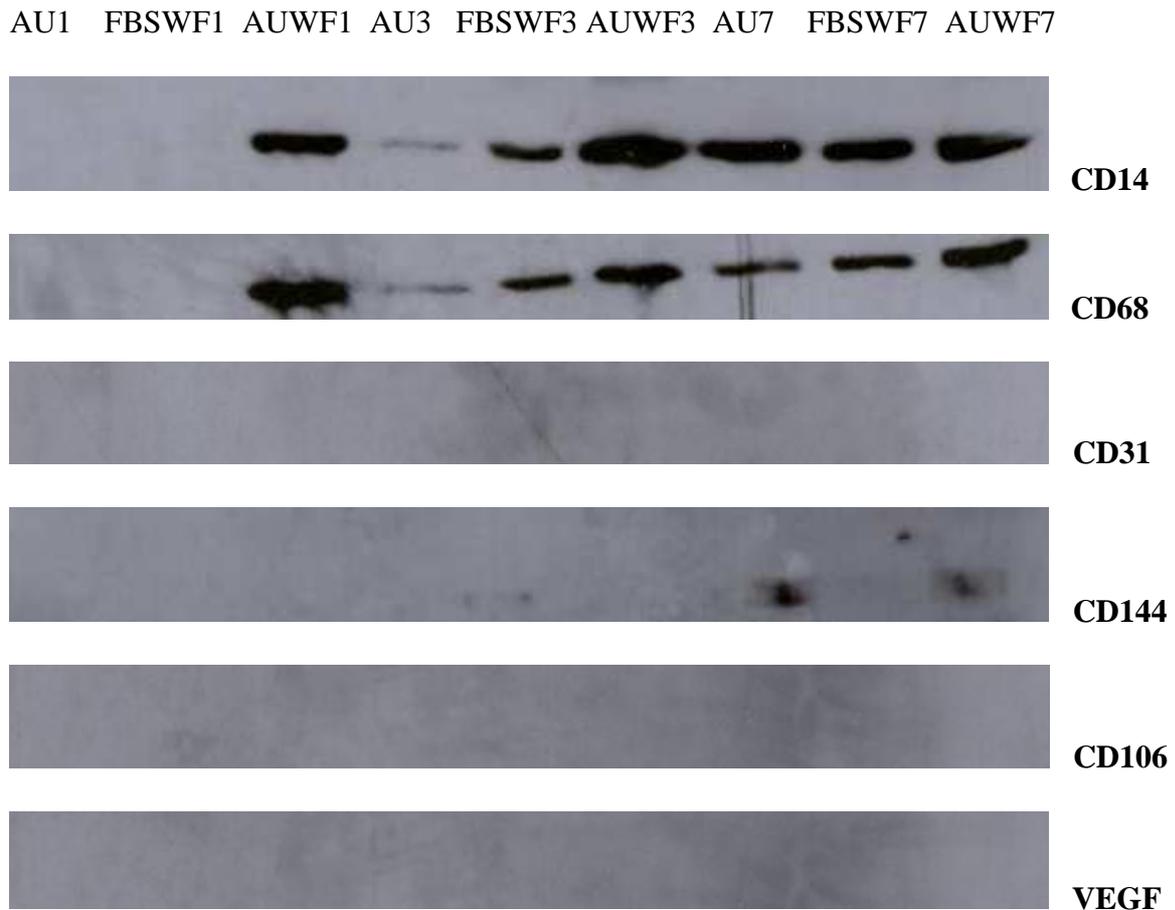


**Abbildung 12:** In AU WF gezüchtete Zellen nach sieben Tagen auf einem Chambersilde. Es zeigt sich eine spindelförmige Dehnung vereinzelter Zellen, aber genauso ein plumper, runder Zelltyp zentral im Bild.

### 3.2.3. Die Expression von Oberflächenmarkern im Westernblot

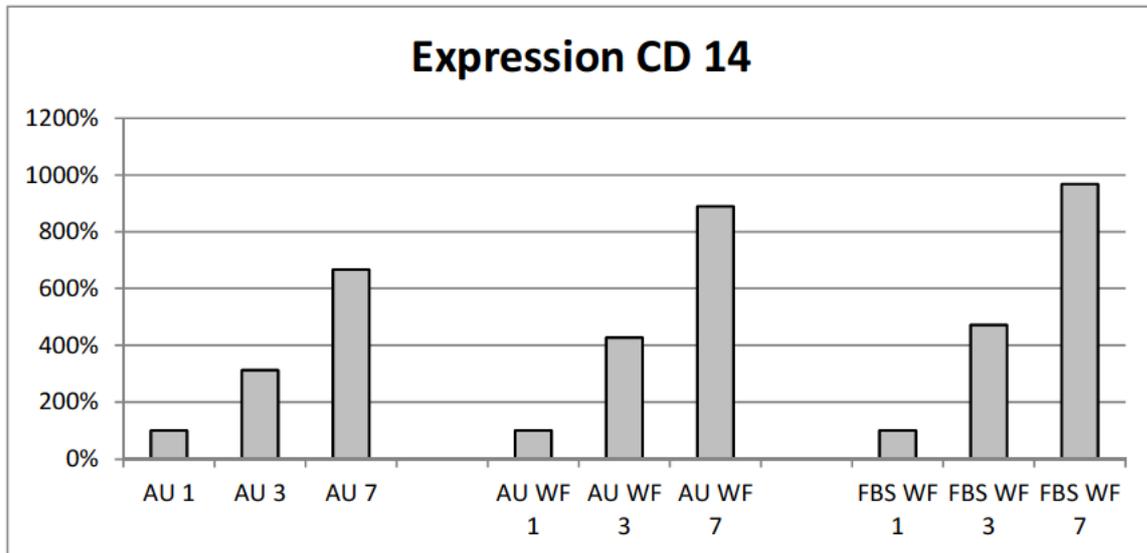
Im Westernblotverfahren zeigte sich zunächst eine ausreichende Gewinnung von Protein, da GAPDH für jede gewonnene Probe quantitativ in unterschiedlicher Menge nachweisbar war. Eine Normalisierung gegen GAPDH erfolgte nicht, da bereits zuvor standardmäßig 5 µg Protein für jede Probe verwendet wurden.

Es wurden Proteine wiederum für alle Medien außer Medium mit dem Zusatz von FBS alleine („FBS“) gewonnen und aus diesen Proben die Expression der zuvor mittels Immunhistochemie untersuchten Antikörper CD68, CD14, VEGF, CD144, CD106 und CD31 untersucht. Hier gelang ebenfalls lediglich der Nachweis von CD14 und CD68 zuverlässig, alle anderen erwähnten Antikörper konnten für keines der getesteten Medien nachgewiesen werden (Abb.13). Es erfolgten dieselben Untersuchungen an Zellen, die nach einer Woche Kultur weitere 7 Tage in Endothelzellmedium kultiviert worden waren, hier konnte keiner der verwendeten Antikörper nachgewiesen werden.

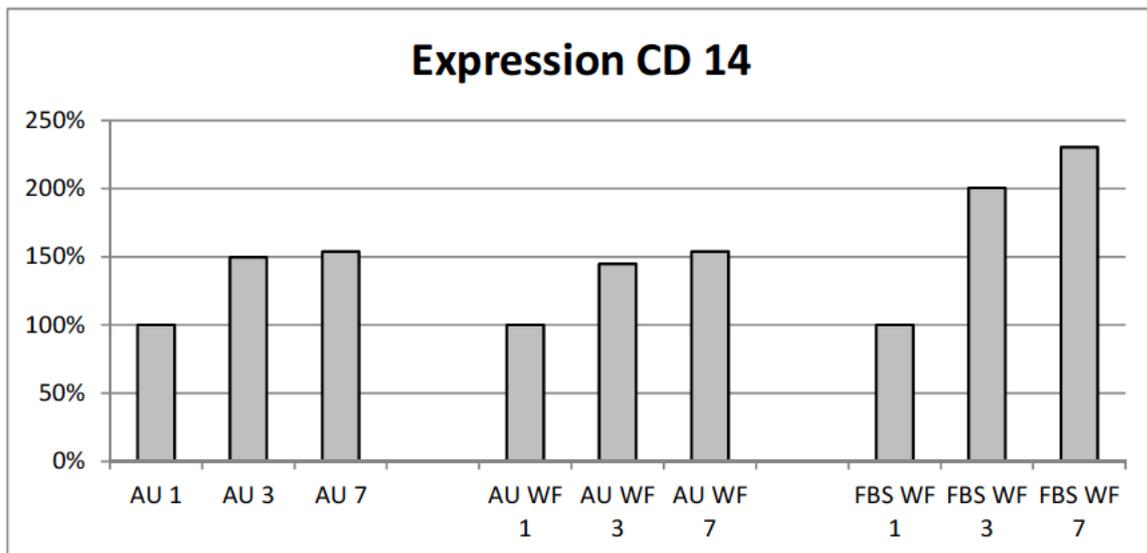


**Abbildung 13:** Die Expressionen von CD 68 und CD 14 in allen drei getesteten Medien zeigen einen deutlichen Anstieg von Tag 1 nach 7. Keines der anderen untersuchten Antikörper lässt sich zu keinem Zeitpunkt für kein Medium nachweisen trotz ausreichender Menge an Gesamtprotein.

Es zeigte sich auch hier eine relative Zunahme der Expression von CD14 und auch CD68 von Tag 1 nach 7 in allen getesteten Medien (Abb. 14). Es zeigt sich ausgehend vom Ausgangswert (100%) eine deutlich stärkere Zunahme der CD14 Expression an Tag 7 in den Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren in einem von zwei unabhängigen Versuchen, in dem zweiten bestätigt sich dies vor allem für das Medium FBS WF (Abb. 14 und 15).



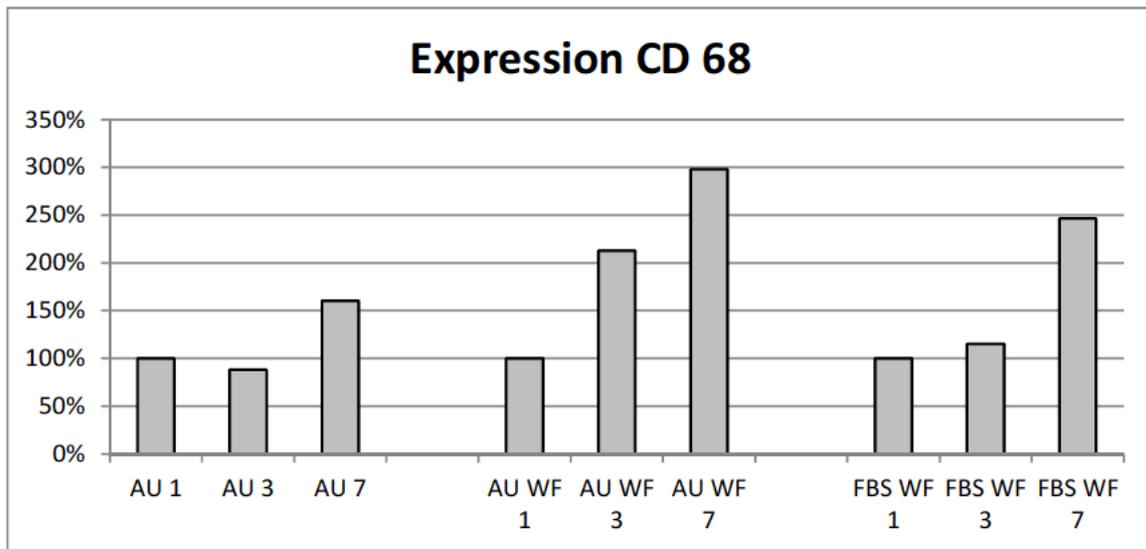
**Abbildung 14:** Die relative CD14 Expression von Tag 1 nach 7. Es zeigt sich eine deutlich stärkere Zunahme der Antigenexpression in den Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren.



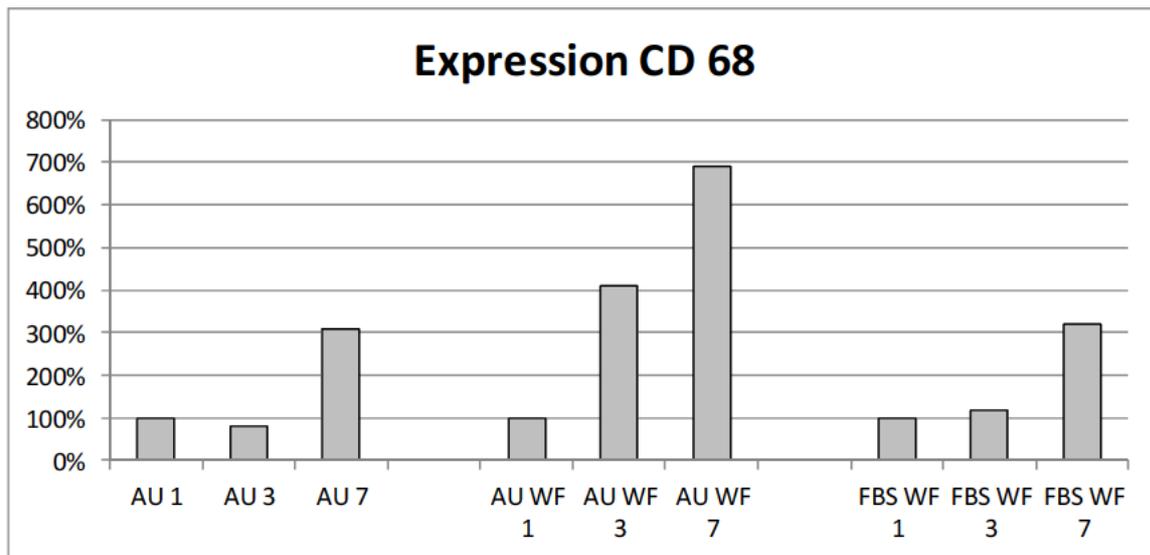
**Abbildung 15:** In einem zweiten unabhängigen Versuch bestätigt sich die Zunahme der Expression für alle Medien, die stärkste prozentuale Zunahme ausgehend vom Ausgangswert bestätigt sich insbesondere für das Medium AU WF.

Auch die Zunahme der CD68 Expression von Tag 1 nach 7 kann in beiden Versuchen bestätigt werden (Abb.16). Hier bleibt ebenfalls das Medium Auto im ersten Versuch im Vergleich zu den Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren deutlich zurück.

In einem zweiten unabhängigen Versuch bestätigt sich dies vor allem für das Medium AU WF (Abb.17).



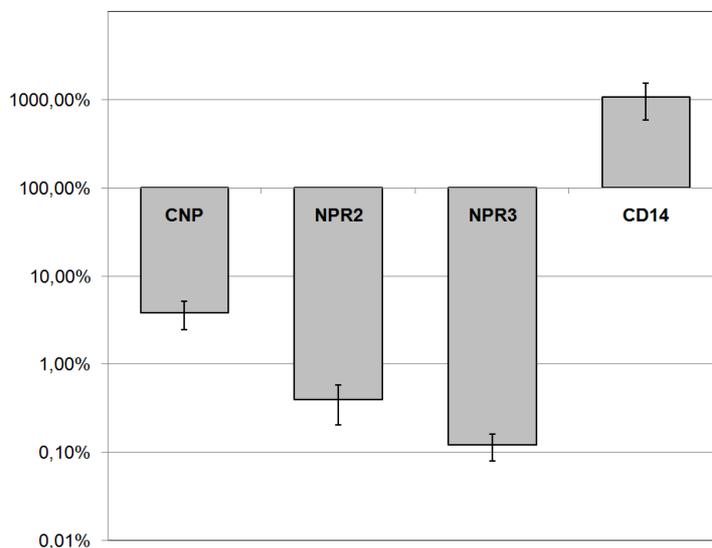
**Abbildung 16:** Die relative CD69 Expression von Tag 1 nach 7. Es zeigt sich hier in einem ersten Versuch eine deutliche Zunahme der Expression von Tag 1 nach 7. Die stärkste Zunahme kann in den Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden.



**Abbildung 17:** es zeigt sich eine Zunahme der CD68 Expression von Tag 1 nach 7. In Versuch 1 erzielen beide Medien mit Wachstumsfaktoren eine deutlich stärkere Zunahme der CD68 Expression, im zweiten Versuch bestätigt sich dies insbesondere für das Medium AU WF.

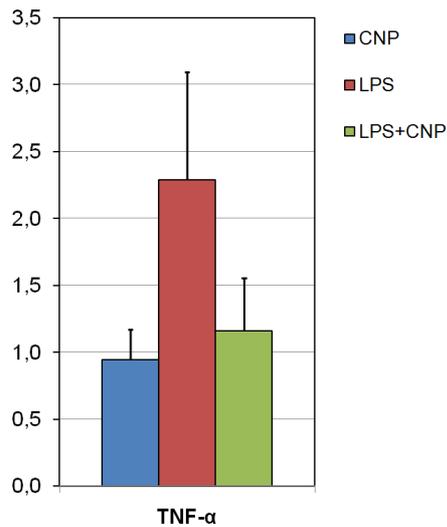
### 3.3. Der Einfluss von CNP auf Wachstum und Zelldifferenzierung

Es wurden zunächst nach 24stündiger Adhäsion humaner Monozyten die Ausgangsexpressionen von CNP und seinen Rezeptoren NPR2 und NPR3 sowie die Ausgangsexpression des Monozytenmarkers CD14 mittels PCR in Vergleich zu GAPDH bestimmt (Abb. 18). Hier zeigt sich zunächst wie erwartet ein deutlicher Nachweis von CD14 bei geringem Nachweis der anderen untersuchten Rezeptoren.

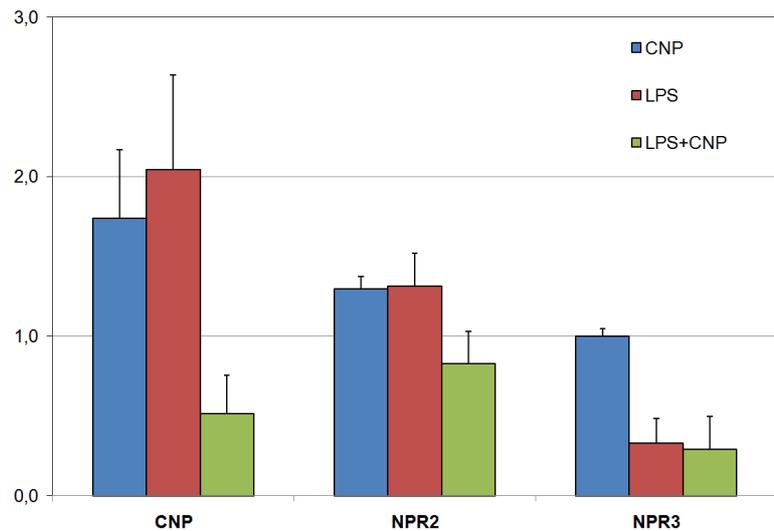


**Abbildung 18:** An Tag 0 vor Stimulation der Monozyten zeigt sich eine Expression des Monozytenmarkers CD14, jedoch nur eine geringe Menge von CNP, NPR2 oder NPR3 messenger RNA.

Es wurden dann wie bereits in Material und Methoden beschrieben verschiedene Medien getestet und anschließend die Expression verschiedener Rezeptoren des CNP getestet. Es zeigt sich, dass sich nach sieben Tagen in Kultur und Stimulation mit LPS eine deutliche Zunahme von TNF- $\alpha$  als inflammatorischer Marker nachweisen lässt, unter dem alleinigen Einfluss von CNP zeigt sich eher eine Reduktion der TNF- $\alpha$  messenger RNA. Bei Zusatz von CNP zu LPS zeigt sich ebenfalls eine Reduktion der TNF- $\alpha$  Expression (Abb. 19).

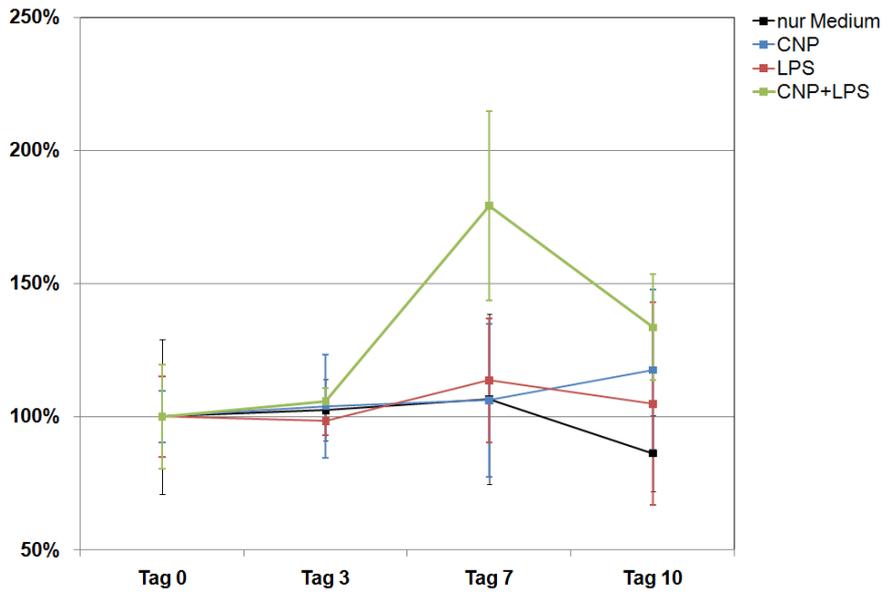


**Abbildung 19:** Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der TNF- $\alpha$  Expression nach sechs Tagen unter dem Einfluss von LPS, ein zusätzlicher Zusatz von CNP zu dem Medium verringert die TNF- $\alpha$  Produktion deutlich. CNP alleine reduziert die TNF- $\alpha$  Produktion nach sechs Tagen, alle Werte unter 1,0 sind als Reduktion unter Normalwert zu verstehen.



**Abbildung 20:** Unter dem Einfluss von jeweils CNP und LPS alleine zeigt sich nach sechs Tagen in Kultur eine deutliche Zunahme der messenger RNA Produktion von CNP und NPR2, unter dem Einfluss von CNP und LPS zusammen kann hingegen eine Reduktion der messenger RNA für beide Rezeptoren gesehen werden. Die Expression des NPR3 Rezeptors lässt sich mit keinem der gewählten Zusätze suffizient vermehren, es zeigt sich sogar eine Reduktion der Expression unter LPS oder LPS+ CNP, CNP alleine führt zu keiner bedeutenden Zunahme.

Es kann unter LPS mono oder CNP mono eine deutliche Zunahme der CNP und NPR2 Produktion gesehen werden. Zellen, die hingegen in Medium, das beide Zusätze enthielt (LPS+CNP), kultiviert wurden, weisen eine Reduktion der Expression sowohl von CNP als auch NPR2 auf. NPR 3 lässt sich mit keinem der gewählten Medien suffizient stimulieren (Abb.20). Auch Interleukin 1 Beta als auch Interleukin 6 werden unter dem Einfluss von LPS vermehrt exprimiert, der Zusatz von CNP reduziert die Expression, CNP alleine bewirkt keine relevante Expression. Parallel zur Untersuchung des Expressionsmusters der Zellen mittels PCR wurden Monozyten nach 24 stündiger Adhäsion in dem Medium AU WF anschließend für weitere 3, 7 und 10 Tage in Medium bestehend aus RPMI 1640 und Antibiotika (in der Grafik als „nur Medium“ bezeichnet), Medium mit dem Zusatz von M-CSF, Medium mit CNP, Medium mit LPS oder in Medium mit CNP+LPS gezüchtet. Unter Beibehaltung der bisher gängigen Konzentrationen für die Zusätze zeigt sich, dass lediglich Medium mit Zusatz von LPS und CNP einen starken Anstieg der Zellproliferation zu Tag 7 zeigt. Ab Tag 7 kommt es konform zu den Versuchen mit den in unter 3.1. beschriebenen Medien zu einer Abnahme bzw. leichten Schwankungen der Zellvitalität nach Tag 10 hin (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Die Medien CNP, LPS und das Medium ohne Zusätze zeigen keine wesentliche Zunahme der Zellvitalität zu Tag 7 hin. Medium mit dem Zusatz von sowohl CNP als auch LPS hingegen zeigt eine signifikante Zunahme bis zu Tag 7, danach erfolgt keine weitere Zunahme der Zellvitalität mehr.

## **4 Diskussion**

Monozyten bergen aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit ein großes Potential für eine Reihe von Therapien. Ein Ansatz ist ihre Differenzierungsfähigkeit zu optimieren und in eine gewünschte Richtung zu lenken, so dass Zellen der mesenchymalen, neuronalen oder -wie in dieser Arbeit untersucht- endothelialen Linie gewonnen werden können [22]. Die Bedingungen unter denen eine erfolgreiche Differenzierung erfolgen kann bedürfen einer näheren Erforschung. Die Optimierung der Kultivierung humaner Monozyten könnte einen wichtigen Baustein auf dem Weg zur Herstellung autologer, menschlicher Transplantate darstellen. So könnte in Zukunft das Problem großflächiger Ulzerationen vermutlich zufriedenstellend mit autologen, vaskularisierten Gewebetransplantaten angegangen werden [42]. Hierzu werden jedoch mehr Erkenntnisse über das Verhalten von Monozyten in Kultur benötigt.

### **4.1. Zellproliferation**

Die Kultivierung von Monozyten wurde bisher von einigen Untersuchern [22, 23] auf mit Fibronectin beschichteten Platten in dem Medium FBS durchgeführt. Dies war ein essentieller Schritt in der Züchtung dieser Zellen. Zunächst kann basierend auf unseren Ergebnissen von einer Beschichtung der Platten mit Fibronectin abgesehen werden, da keinerlei Unterschiede zwischen Versuchen mit oder ohne Fibronectin beschichteten Platten gesehen wurden. Offensichtlich ist eine Kombination von Zentrifugation der Zellen mit anschließender Möglichkeit zur Adhärenz in Plastik wie bereits von Bennett et al. und anderen Untersuchern beschrieben [5, 15] ausreichend, um monozytäre Zellen zu säen und zu kultivieren. Eine Zunahme der Zellvitalität von Tag 1 nach 7 verdeutlicht, dass die gewählten Bedingungen für die ausgesäten Zellen durchaus ausreichend waren, es galt eine Optimierung zu finden. Unser Augenmerk lag vor allem in der näheren Erforschung der Medien, in denen die Zellen gezüchtet wurden.

Man kann eine deutliche Verbesserung der Ausbeute an Zellen in Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren, deren Effekte auf Monozyten wie z.B. einer Verstärkung ihrer Migration [53] von vorherigen Untersuchern bereits beschrieben wurde, erzielen. Jedoch zeigt autologes Serum den stärksten prozentualen Anstieg der Zellproliferation verglichen zum Ausgangswert. Somit wurden drei neue Medien mit einer höheren Zellausbeute als das bisher gängige Medium FBS, das z.B. von Kuwana et al. [22] verwendet wurde, gefunden. Die höchste

absolute Ausbeute konnte in den Medien mit Wachstumsfaktoren erzielt werden. Insgesamt war der Unterschied in der Ausbeute an Tag 7 nicht signifikant, die kann jedoch durch die noch zu geringe Anzahl an Versuchen erklärt werden. Man kann somit davon ausgehen, dass die Wachstumsfaktoren nicht nur einen Einfluss auf die Reifung der Zellen haben, sondern offensichtlich auch deren Vermehrung maßgeblich beeinflussen. Die starke Verbesserung der Zellproliferation durch autologes Serum ist am ehesten durch die darin enthaltenen Faktoren wie Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsproteinen und anderen für die Zellentwicklung und -wachstum wichtigen Faktoren zu erklären [5]. Insbesondere im Vergleich zu Medium FBS alleine, wie es bisher von den meisten Untersuchern verwendet wurde [22, 23], das keinen signifikanten Anstieg der Zellproliferation zeigt, wird deutlich, dass der Zusatz von autologem Serum mit seinen oben beschriebenen Anteilen bedeutend ist in der Optimierung der Kulturbedingungen humaner Monozyten. Somit konnte ein potenter Zusatz zu den bisher verwendeten Medien gefunden werden, obwohl bisher einige Untersucher keinen Effekt von serumhaltigen bzw. serumfreien Medium auf das Wachstum von Monozyten oder Makrophagen sehen konnten [50]. Konform zu diesem Ergebnis zeigt sich auch eine stärkste absolute Zunahme bei Medium mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren und autologem Serum. Die größere Streuung der Resultate und deren Abweichung von einem Mittelwert in den Medien mit autologem Serum kann durch den Zusatz von autologem Serum verschiedener humaner Spender verursacht worden sein, so dass womöglich die Quantität einzelner Serumbestandteile eines jeden Spenders einen individuellen Einfluss haben könnten. Dies würde auch die These, dass lösliche, spendereigene Faktoren in autologem Mediumzusatz einen Einfluss auf die Zellproliferation haben untermauern [4]. Auch der Unterschied der Zellvitalität innerhalb der vier getesteten Medien zu Tag 1 kann in allen im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Versuchen neben einem bereits beginnenden Effekt durch die Kultivierung durch den Unterschied in der Zellausbeute der einzelnen Spender verursacht worden sein.

Die Tatsache, dass sich die stärkste prozentuale Zunahme der Zellvitalität in dem Medium AU zeigt, spricht dafür, dass das autologe Serum vor allem die Zellproliferation beeinflusst wohingegen die Wachstumsfaktoren zwar auch einen deutlich stärkeren Anstieg der Zellvitalität gewährleisten, aber offensichtlich den Effekt des autologen Serums nicht potenzieren können, sonst wäre die stärkste Zunahme in dem Medium AU WF zu erwarten gewesen. Dies würde die bisherigen Resultate anderer Untersucher, dass die von uns verwendeten Wachstumsfaktoren vornehmlich die Differenzierung monozytärer Zellen begünstigen, untermauern [41].

So konnte gesehen werden, dass auch die Dauer der Kultivierung neben der Art der Kultivierung durchaus auch einen Einfluss auf die Ausbeute an Zellen hat. Im Zuge dessen ist auch aus unserer Sicht eine weitere Prozessierung der Zellen z.B. Isolierung für den Westernblot an Tag 7 wie bei einigen Untersuchern berichtet [22, 35] durchaus gerechtfertigt, denn eine Verlängerung der reinen Kultivierung in Medium auf 10 und 14 Tage brachte keinen weiteren Zugewinn an Zellvitalität im MTT Test. So ist möglicherweise ein Sistieren der Absorption nicht nur auf das Vorhandensein vitaler Zellen nach Tag 7 zurückzuführen, sondern möglicherweise auch durch eine Überlagerung und Akkumulation von Substanzen, die durch den Mediumwechsel nicht vollständig von den untersuchten Wells abgetragen werden konnten, bedingt, so dass eine Prozessierung der Zellen bis zu dem Tag (Tag 7), an dem ein Plateau erreicht wird, aus unserer Sicht nicht nur gerechtfertigt, sondern durchaus zu empfehlen.

In dieser Arbeit wurde der Versuch einer Kultivierung zu Endothelzellen versucht, so dass ab Tag 7 die gezüchteten Zellen in Endothelzellmedium für weitere sieben Tage gezüchtet wurden. Frühere Studien zeigten bereits, dass zirkulierende Monozyten endotheliale Marker exprimieren können und dass sie auch eine entscheidende Rolle in der Neovaskularisation einnehmen [49]. Eine der aktuellen Arbeiten zeigt, dass endothelzellähnliche Zellen des peripheren Bluts von Monozyten bzw. Makrophagen abstammen [34]. In unseren Untersuchungen fiel die Zellvitalität der eine Woche lang gezüchteten Zellen nach sieben Tagen in Endothelzellmedium nahezu auf das Niveau des ersten Tages ab, ohne dass signifikante Unterschiede in Abhängigkeit des Kulturmediums der ersten sieben Tage gesehen werden konnten. Es ist somit davon auszugehen, dass nur wenige Zellen ein Potential zur Differenzierung zu endothelzell-ähnlichen Zellen, insofern eine erfolgt war, aufwiesen.

## **4.2. Zellidentifizierung**

In der weiteren Identifizierung der Zellen und um die Rolle der Wachstumsfaktoren näher zu erforschen wurde eine Färbung der Zellen mit verschiedenen Antikörpern zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Es zeigt sich eine Hochregulierung des CD68 Antikörpers in den untersuchten Medien, insbesondere in Medium mit Wachstumsfaktoren. CD68 wurde bisher von verschiedenen Untersuchern zur Identifizierung von Makrophagen verwendet [14]. Insbesondere da im Gegensatz zu dem Medium FBS oder insbesondere dem Medium Auto/ AU, die beide keine derartige Vermehrung der immunhistochemisch

nachweisbaren CD68 Expression erbrachte, ist davon auszugehen, dass die Wachstumsfaktoren den entscheidenden Einfluss in der Differenzierung der zunächst ausgesäten Zellen zu Makrophagen spielen [41]. Konform zu dem Ergebnis des MTT Vitalitätstests, der bereits zeigt, dass die Wachstumsfaktoren keinen additiven Effekt zu dem autologen Serum aufwiesen, sondern möglicherweise eine andere Rolle in der Entwicklung der Zellen aufwiesen, kann hier ein Effekt des M-CSF und IL 3 aufgedeckt werden. Auch in der Zelldifferenzierung bleibt das Medium FBS wieder hinter den Medien mit Zusätzen zurück, so dass im Vergleich zu den bisherigen Untersuchern [26, 27] mit dem autologen Serum sowie den Wachstumsfaktoren eine Beschleunigung und Steigerung der Antigenexpression der Zellen erzielt werden konnte.

Es konnte an den Tagen 1 bis 7 zu keinem Zeitpunkt eine positive Färbung des Stammzellmarkers CD34 oder einer der endothelialen Marker VEGF, VEGFR2, CD 144, CD31 oder CD106 gesehen werden, so dass womöglich keine Dedifferenzierung zu einer multipotenten Vorgängerzelle wie von einigen Untersuchern postuliert [26, 27] stattfinden konnte. Möglicherweise ist ein Nachweis vereinzelter dedifferenzierter Zellen mit einer sensitiveren Methode als der im Rahmen dieser Dissertation gewählten durchaus möglich. Hierfür spricht auch, dass in der Auswertung kultivierter Chamberslides sich vereinzelt gestreckte entfernt an Endothelzellen erinnernde Zellen gesehen werden konnten. Diese waren jedoch in einer derart niedrigen Zahl vorhanden, dass ein Nachweis ihrer Oberflächenantigene definitiv nicht gelingen konnte.

Es zeigt sich aber eine Zunahme der Expression des Markers CD14 in den untersuchten Medien, dies in Zusammenschau mit der steigenden CD68 Expression entspricht dem Expressionsmuster von Makrophagen. Auch bei der Expression des CD14 Antikörpers zeigt sich, dass die Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren die höchsten sowohl prozentualen als auch absoluten Zellzahlen positiver CD14 Zellen erbringen. Das Medium AU zeigt hingegen einen Abfall und das Medium FBS WF von einem sehr hohen Tag 3 Niveau einen Abfall hin zu Tag 7. Diese Inkonsistenz der Ergebnisse ist durch die Qualität der Präparate zu erklären. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Methode der immunhistochemischen Färbung von kultivierten und fixierten Zellen getestet und etabliert. So zeigte sich, dass die Aussagekraft der immunhistochemischen Präparate eng mit der Gesamtzahl der fixierten Zellen korreliert. So lieferten Objektträger mit weniger als insgesamt 300 Zellen in acht willkürlich ausgewählten Gesichtsfeldern inkonsistente Ergebnisse, wohingegen Präparate mit 400 Zellen und mehr reproduzierbare, konsistente Ergebnisse erbrachten. Die Gesamtheit der untersuchten Präparate an Tag 7 für das Medium

AU als auch die Gesamtheit der Präparate an Tag 7 für das Medium FBS WF wies einen erhöhten Anteil an minderwertigen Präparaten auf, wodurch ein scheinbarer Abfall der CD14 Expression dargestellt wird.

Somit ist in Zusammenschau der Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt nicht davon auszugehen, dass eine Dedifferenzierung der Zellen hin zu eine hämatopoetischen Vorläuferzelle in brauchbaren Mengen wie bisher von einzelnen Untersuchern angenommen [22, 23, 35, 36] stattfinden konnte. Auch der zu jedem untersuchten Zeitpunkt fehlende Nachweis von Stammzellmarkern wie CD34, der in vorherigen Untersuchungen beschrieben wurde [22], erhärtet den Befund. Folglich war auch keine Differenzierung der Zellen zu Endothelzellen oder Hepatozyten wie z.B. bei Ruhnke et al. [35] zu erwarten.

Immunhistochemisch zeigten sich positive Färbungen der auf den Objektträgern verbliebenen Zellen nach sieben Tagen in Endothelzellmedium mit jedem gewählten Antikörper in jeder beliebigen Konzentration, so dass dieses Verfahren keine geeigneten Nachweise erbringen konnte. Die Färbungen nach 7 Tagen in Endothelzellmedium und somit insgesamt nach 14 Tagen in Kultur sind als unspezifisch zu werten. Diese Färbungen zeigen ein weiteres Problem der Kultivierung für eine Woche in Endothelzellmedium: es sind keine antikörpernegativen Zellen verblieben und es lassen sich nur vereinzelt Zellen auf dem Objektträger fixieren, so dass auch hier erneut vermutlich weiterführenden Ergebnisse ein deutliches Problem der Zellquantität im Wege steht. So lassen sich nach 14 Tagen trotz der verbesserten und gesteigerten Zellproliferation in der ersten Woche der Kultivierung nicht genügend Zellen an Tag 14 gewinnen, so dass nachfolgende Ergebnisse vermutlich auch negativ ausfallen, weil die geringe Zellzahl sensitiverer Untersuchungsmethoden bedarf. Hiermit lässt sich neben einem möglichen Fehlen dedifferenzierter Zellen bzw. Endothelzellen die fehlende Proteinexpression im Westernblot für Zellen an Tag 14 erklären. Eine Färbung der Zellen sowohl mittels der Ölrot als auch der van Kossa Färbung wie bereits von Kuwana et al. [22, 23] untersucht von Tag 1 bis Tag 14 erbrachte jedoch ebenfalls keinen Nachweis von Fettzellen oder osteogenen Zellen, so dass eine Differenzierung zu einer dieser Zelllinien anscheinend ebenfalls zu keinem Zeitpunkt erfolgt war.

Im Westernblotverfahren konnten hingegen zuverlässig CD14 und CD68 für die Tage 1 bis 7 detektiert werden, aber nicht Marker endothelialer Zellen wie z.B. VEGFR2, CD31, CD106 oder CD144 wie in Anbetracht der Studien der Voruntersucher zu erwarten gewesen wäre, so dass nicht davon auszugehen ist, dass diese Zellen gezüchtet werden konnten. Dies kann – neben den oben erwähnten möglichen Ursachen- durch die fehlende Dedifferenzierung der anfänglich ausgesäten Zellen und ihre anschließende Differenzierung zu Makrophagen hin

erklärt werden. So sind Makrophagen aus heutiger Sicht vollausdifferenzierte Zellen und beherbergen im Gegensatz zu Monozyten kein Differenzierungspotential [12]. Auch die Untersuchung der Zellen mittels des Westernblot Verfahrens bestätigt eine Zunahme von sowohl CD14 als auch CD68. So bestätigt sich hierbei auch der bei der immunhistochemischen Untersuchung gefundene Hinweis auf einen stärkeren Einfluss der Wachstumsfaktoren in Bezug auf die Differenzierung als auf die Zellvermehrung: Sowohl für CD14 als auch CD68 zeigt sich eine höhere Proteinexpression in den Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren im Vergleich zu dem Medium AU.

Bei mikroskopischer Sichtung der auf Objektträgern fixierten Zellen zeigt sich eine Veränderung der zunächst kompakten Zellen nach sieben Tagen in Kultur hin zu einem ausladenden, runden Zelltyp, der makroskopisch stark an einen Makrophagen erinnert. Es konnte keine Konfluenz der Zellen oder die Bildung von Zellverbänden nachgewiesen werden wie von Kuwana et al. [22, 23] postuliert, ebenso wenig konnte eine deutliche Veränderung der Zellen zu Endothelzellen gesehen werden. Hier wäre eine Streckung der Monozyten in die Länge zu erwarten gewesen [23], die höchstens vereinzelt nachgewiesen werden konnte inmitten des vorherrschenden runden, makrophagenähnlichen Zelltyps. So erklärt sich dies vermutlich auch aus dem fehlenden Gewinn von Endothelzellen.

### **4.3 Der Einfluss von CNP auf Zellwachstum und Differenzierung**

Zunächst konnte eine Basisexpression der unstimulierten Monozyten bzgl. der weiterhin zu untersuchenden Rezeptoren bestimmt werden, so zeigt sich hier eine hohe Expression des monozytären CD14 bei niedrigen Expressionen von CNP sowie den CNP Rezeptoren NPR 2 und 3.

Unter Stimulation durch LPS kommt es zu einer Hochregulation des inflammatorischen Mediators TNFalpha, welche unter dem Einfluss von CNP alleine ausbleibt. Die Reduktion der TNFalpha Hochregulation in Medium mit dem Zusatz von CNP und LPS im Vergleich zu LPS alleine könnte durch einen ähnlichen Mechanismus wie das immunmodulatorische Potential von ANP zustande kommen. So inhibiert ANP durch Bindung an NPR-A das TNFalpha, weiterhin steigert es Phagozytose und Apoptose von Makrophagen, wodurch die TNFalpha Produktion verringert wird [17, 51]. So ist bereits das antiinflammatorische Potential von CNP von anderen Untersuchern beschrieben [18]. Es könnte auch hiermit die Hochregulation von CNP und seinem Rezeptor NPR 2 als antiinflammatorisches

Gegengewicht durch LPS erklärt werden. Ebenso scheint CNP die CNP Produktion als auch die Expression seines Rezeptors NPR 2 in den Zellen zu stimulieren. Eine Reduktion der CNP und der NPR 2 Expression in Medium mit dem Zusatz von CNP und LPS ist aktuell nicht ausreichend zu erklären, eine Schädigung der Zellen durch die beiden Zusätze in den im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Konzentrationen wäre denkbar.

Wie bereits vorbeschrieben können Makrophagen durch ein Polysaccharid wie LPS stimuliert werden [28]. Ein gegenseitig sich verstärkender Prozess verursacht möglicherweise die starke Stimulation der Zellen durch Medium, das beide Zusätze enthält. Dieser Effekt fehlt in dem Medium mit einem einzelnen Zusatz, sodass entsprechend keine nennenswerte Stimulation der Zellproliferation von Tag 1 nach 7 im Vergleich zu Standardmedium erfolgt.

Diese Ergebnisse können bis dato nur soweit diskutiert werden, da sie Vorversuche darstellen und weiterer Erforschung, die nicht mehr im Rahmen dieser Dissertation erfolgen können, bedürfen.

## 5 Zusammenfassung

Die Anwendung autologer, vaskularisierter, humaner Transplantate könnte für eine Reihe von Erkrankungen einen deutlichen Vorteil zu den bisher gängigen Verfahren bringen. Am Anfang eines solchen Unterfangens steht die Züchtung geeigneter vaskulärer Zellen. Die Problematik liegt jedoch in der Gewinnung solcher Patienten-eigener Zellen. Eine vielversprechende Möglichkeit ist die Differenzierung der gewünschten Endothelzellen aus geeigneten Vorläuferzellen, die leicht zu erwerben sind. Hier stellen zum Beispiel Monozyten aus dem peripheren Blut eine einfache Quelle dar. Neben den Vorteilen, die sie als körpereigene Zellen bringen, sind sie noch nicht vollständig ausdifferenziert und beherbergen somit ein erhöhtes Differenzierungspotential durch das sie in andere Zellen, wie z.B. Endothelzellen, ausdifferenzieren können. Es existieren bereits eine Reihe von publizierten Methoden die gewünschten Monozyten aus den peripheren Blutzellen zu gewinnen. Doch stellt sich die Kultivierung und Differenzierung von Monozyten schwierig dar und es gibt bisher keine etablierte Methode diese Zellen in Kultur zu halten. Das Ziel dieser Doktorarbeit war neben Erforschung optimaler Kulturbedingungen dieser Zellen und deren Vermehrung auch das Testen der Ausdifferenzierung in Zellen anderer Zellreihen wie Endothelzellen. Hierfür wurden die Zellen in unterschiedlichen Medien und Zusätzen gezüchtet, um tiefere Erkenntnisse insbesondere über den Einfluss verschiedener Zusätze auf das Wachstum und das Differenzierungspotential der gewünschten Zellen zu erlangen. Zusätzlich als besonderer Zusatz in diesem Zusammenhang CNP getestet und im Rahmen der Doktorarbeit ebenfalls die optimalen Methoden zu Bestimmung von CNP in menschlichem Blut näher erforscht.

Zu diesem Zweck wurden monozytäre Zellen aus dem Blut menschlicher Probanden mittels Zentrifugation mit Histopaque gewonnen und anschließend in einem kommerziell erhältlichen Standardmedium kultiviert. Diesem Medium wurden Zusätze mit vermeintlichem Einfluss auf monozytäre Zellen zugefügt: im Einzelnen handelte es sich hierbei um die Wachstumsfaktoren IL-3 und M-CSF, autologem Serum des Monozytenspenders, FBS, das bakterielle Polysaccharid LPS sowie CNP. Im Anschluss an eine siebentägige Kultivierungsphase in einem gewählten Medium wurde eine Differenzierung vorgenommen, indem die Zellen in ebenfalls kommerziell erhältliches Endothelzellmedium überführt wurden. Die Messung der Zellvitalität und damit der Vermehrung der Zellen erfolgte durch den MTT Vitalitätstest, der an bestimmten Zeitpunkten (z.B. Tag 1, 3 und 7) durchgeführt wurde, um eine Vermehrungskurve erstellen zu können. Zellen derselben Charge wurde mittels Immunhistochemie, Westernblot und real-time PCR näher charakterisiert, indem ein

Nachweis monozytärer Oberflächenproteine wie CD14 und CD68 als auch der Proteine endothelialer Zellen wie VEGF, CD144, CD106 –soweit exprimiert- versucht wurde. Ebenso wurden in den Versuchen, die CNP oder LPS beinhalten, neben der Expression monozytärer Oberflächenproteine wie CD14 auch die Expression CNP relevanter Rezeptoren sowie die Expression von Zytokinen untersucht. Im Rahmen eines Nebenversuchs wurde auch eine optimale Bestimmungsmethode des CNP in menschlichem Blut durch den ELISA Test gesucht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass zwar durch verschiedene Zusätze zu den bisher verwendeten Medien eine Zunahme der gewonnenen Zellzahlen erzielt werden kann. Insgesamt wurden drei neue Medien, die deutlich höhere Zellausbeuten als das bisher von den meisten Untersuchern verwendete Medium erzielen konnten, gefunden. Gleichzeitig zeigte sich aber, dass –ob mit oder ohne Zusätze- eine Dedifferenzierung und gleichzeitige Verhinderung der Differenzierung der Monozyten mit den hier untersuchten Medien und Methoden kaum gelingt. Durch Verbesserung der Zellausbeute können vielleicht in Zukunft an dieser Stelle weitere Ansätze zu einer Dedifferenzierung der Monozyten versucht werden. Zudem erfolgte eine erfolgreiche Identifikation der Oberflächenproteine der mit den bisher gängigen Methoden gezüchteten Zellen. Aktuell ist anhand der gewonnenen Hinweise davon auszugehen, dass es sich hierbei vornehmlich um Makrophagen und nicht um dedifferenzierte Zellen mit weitreichendem Differenzierungspotential wie bisher vermutet handelt.

Weiterhin konnten Einflüsse des CNP und LPS auf Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden, so zeigt sich eine deutliche Stimulation inflammatorischer Mediatoren sowie CNP assoziierter Rezeptoren mit Hinweisen auf einen immunmodulatorischen Einfluss des CNP.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AG	Antigen
ANP	atriales natriuretisches Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AU	Medium mit Zusatz von autologem Serum
AU WF	Medium mit dem Zusatz von autologem Serum und Wachstumsfaktoren
Auto	Medium mit dem Zusatz von autologem Serum
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> / Bicinchoninsäure
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNP	<i>c-type natriuretic peptide</i>
DMEM	Dulbecco's modified eagles's medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EC	endothelial cell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	fetales bovines Serum
FBS WF	Medium mit dem Zusatz von fetalem bovinem Serum und Wachstumsfaktoren
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin- Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
KD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB- HRP	<i>labelled streptavidin- biotin system, horseradish peroxidase</i>

Mak	Makrophagen
M- CSF	<i>makrophage- colony stimulating factor</i>
MG	Molekulargewicht
mM	Millimol
M-MuLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MOMC	<i>monocyte- derived multipotential cell</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromid
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NPR-B	natriuretischer Peptidrezeptor B
PCMO	<i>programmable cell of monocytic origin</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPM	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	Reverse- Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SA- HRP	<i>streptavidin- horseradish peroxidase</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF Alpha	Tumornekrosefaktor Alpha
TEMED	<i>tetramethylethylendiamine</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
VEGEF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGEF-R	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WB	Westernblot
WF	Wachstumsfaktoren

## 7 Literaturverzeichnis

1. Anand-Srivastava MB (2005) Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* 26:1044-1059
2. Andreesen R, Picht J, Lohr GW (1983) Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes. *Journal of immunological methods* 56:295-304
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967
4. Bennett S, Breit SN (1994) Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *Journal of leukocyte biology* 56:236-240
5. Bennett WE, Cohn ZA (1966) The isolation and selected properties of blood monocytes. *The Journal of experimental medicine* 123:145-160
6. Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics* 303:474-482
7. Blakytyn R, Jude E (2006) The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 23:594-608
8. Braakenburg A, Obdeijn MC, Feitz R, van Rooij IA, van Griethuysen AJ, Klinkenbijn JH (2006) The clinical efficacy and cost effectiveness of the vacuum-assisted closure technique in the management of acute and chronic wounds: a randomized controlled trial. *Plastic and reconstructive surgery* 118:390-397; discussion 398-400
9. Feldman DL, Mogelesky TC (1987) Use of Histopaque for isolating mononuclear cells from rabbit blood. *Journal of immunological methods* 102:243-249
10. Fenton MJ, Golenbock DT (1998) LPS-binding proteins and receptors. *Journal of leukocyte biology* 64:25-32
11. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsasser HP, Muller R, Havemann K (2000) Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation; research in biological diversity* 65:287-300
12. Gordon S (1986) Biology of the macrophage. *Journal of cell science Supplement* 4:267-286
13. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC (2001) CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem cells* 19:304-312
14. Holness CL, Simmons DL (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81:1607-1613
15. Johnson WD, Jr., Mei B, Cohn ZA (1977) The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. *The Journal of experimental medicine* 146:1613-1626
16. Jones BM, Nicholson JK, Holman RC, Hubbard M (1989) Comparison of monocyte separation methods using flow cytometric analysis. *Journal of immunological methods* 125:41-47
17. Kiemer AK, Hartung T, Vollmar AM (2000) cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *Journal of immunology* 165:175-181
18. Kiemer AK, Lehner MD, Hartung T, Vollmar AM (2002) Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 143:846-852

19. Kodama H, Inoue T, Watanabe R, Yasuoka H, Kawakami Y, Ogawa S, Ikeda Y, Mikoshiba K, Kuwana M (2005) Cardiomyogenic potential of mesenchymal progenitors derived from human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes. *Stem cells and development* 14:676-686
20. Kodama H, Inoue T, Watanabe R, Yasutomi D, Kawakami Y, Ogawa S, Mikoshiba K, Ikeda Y, Kuwana M (2006) Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes. *Immunology and cell biology* 84:209-217
21. Koller CA, King GW, Hurtubise PE, Sagone AL, LoBuglio AF (1973) Characterization of glass adherent human mononuclear cells. *Journal of immunology* 111:1610-1612
22. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y, Ikeda Y (2003) Human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *Journal of leukocyte biology* 74:833-845
23. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Satoh T, Kawakami Y, Ikeda Y (2006) Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells. *Stem cells* 24:2733-2743
24. Miyamoto T, Ohneda O, Arai F, Iwamoto K, Okada S, Takagi K, Anderson DM, Suda T (2001) Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* 98:2544-2554
25. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65:55-63
26. Muta T, Takeshige K (2001) Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *European journal of biochemistry / FEBS* 268:4580-4589
27. Navarro S, Debili N, Bernaudin JF, Vainchenker W, Doly J (1989) Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *Journal of immunology* 142:4339-4345
28. Organization WH (September 2011) Cardiovascular Diseases.
29. Pagel-Langenickel I, Buttgerit J, Bader M, Langenickel TH (2007) Natriuretic peptide receptor B signaling in the cardiovascular system: protection from cardiac hypertrophy. *Journal of molecular medicine* 85:797-810
30. Pelisek J, Kuehnl A, Rolland PH, Mekkaoui C, Fuchs A, Walker GF, Ogris M, Wagner E, Nikol S (2004) Functional analysis of genomic DNA, cDNA, and nucleotide sequence of the mature C-type natriuretic peptide gene in vascular cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:1646-1651
31. Pellegrino MA, Ferrone S, Dierich MP, Reisfeld RA (1975) Enhancement of sheep red blood cell human lymphocyte rosette formation by the sulfhydryl compound 2-amino ethylisothiuronium bromide. *Clinical immunology and immunopathology* 3:324-333
32. Purwins S, Herberger K, Debus ES, Rustenbach SJ, Pelzer P, Rabe E, Schafer E, Stadler R, Augustin M (2010) Cost-of-illness of chronic leg ulcers in Germany. *International wound journal* 7:97-102
33. Raunio T, Knuutila M, Karttunen R, Vainio O, Tervonen T (2009) Serum sCD14, polymorphism of CD14(-260) and periodontal infection. *Oral diseases* 15:484-489
34. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL (2003) Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107:1164-1169
35. Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fandrich F (2005) Differentiation of in vitro-modified human peripheral

- blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128:1774-1786
36. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG (2001) Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovascular research* 49:671-680
  37. Servet-Delprat C, Arnaud S, Jurdic P, Nataf S, Grasset MF, Soulas C, Domenget C, Destaing O, Rivollier A, Perret M, Dumontel C, Hanau D, Gilmore GL, Belin MF, Rabourdin-Combe C, Mouchiroud G (2002) Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC immunology* 3:15
  38. Silbernagl RKuS (2001) *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart
  39. Simon A, Harrington EO, Liu GX, Koren G, Choudhary G (2009) Mechanism of C-type natriuretic peptide-induced endothelial cell hyperpolarization. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 296:L248-256
  40. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150:76-85
  41. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG (1997) Biology and action of colony--stimulating factor-1. *Molecular reproduction and development* 46:4-10
  42. Stosich MS, Bastian B, Marion NW, Clark PA, Reilly G, Mao JJ (2007) Vascularized adipose tissue grafts from human mesenchymal stem cells with bioactive cues and microchannel conduits. *Tissue engineering* 13:2881-2890
  43. Street CN, Rajotte RV, Korbitt GS (2003) Stem cells: a promising source of pancreatic islets for transplantation in type 1 diabetes. *Current topics in developmental biology* 58:111-136
  44. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and biophysical research communications* 168:863-870
  45. Sweet MJ, Hume DA (2003) CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 51:169-177
  46. Tekstra J, Tuk CW, Beelen RH (1996) Detection of CD 14 on migrated monocytes by specific antibody: a possible quantification for blood monocyte chemotaxis. *Immunobiology* 195:491-498
  47. Thomas S (2006) Cost of managing chronic wounds in the U.K., with particular emphasis on maggot debridement therapy. *Journal of wound care* 15:465-469
  48. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354
  49. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 108:2511-2516
  50. Vogel SN, Perera PY, Hogan MM, Majde JA (1988) Use of serum-free, compositionally defined medium for analysis of macrophage differentiation in vitro. *Journal of leukocyte biology* 44:136-142
  51. Vollmar AM, Forster R, Schulz R (1997) Effects of atrial natriuretic peptide on phagocytosis and respiratory burst in murine macrophages. *European journal of pharmacology* 319:279-285
  52. Wang F, Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Fujita H, Iwata M, Kamiya Y, Nagasaka M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H (2007) Genetic

- polymorphisms of CD14 and Toll-like receptor-2 (TLR2) in patients with ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 22:925-929
53. Wang JM, Griffin JD, Rambaldi A, Chen ZG, Mantovani A (1988) Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology* 141:575-579
54. Welsch U (2003) *Lehrbuch Histologie*, 1.Auflage edn. Urban & Fischer Verlag München, Jena

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]						
[REDACTED]						
[REDACTED]						

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

## **9 Danksagung**

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckstein für die Möglichkeit in seiner Klinik mit einem derart interessanten Projekt zu promovieren sowie für seine umfassende Unterstützung. Ebenso danke ich Herrn Dr. Kühnl für seinen Einsatz und seine Betreuung der Dissertation bis zum Ende hin.

Weiterhin danke ich Frau Renate Hegenloh und Herrn PD Dr. Pelisek für ihre Unterstützung und Beratung bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Dissertation. Ich möchte mich insbesondere bei Herrn PD Dr. Pelisek für Engagement, Betreuung und Zeiteinsatz bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner Mutter Scheima Safi von Herzen dafür danken, dass sie in schwierigen Momenten immer da war und mich in meinem Entschluss diese Doktorarbeit zu vollenden, unermüdlich unterstützte.