

AUS DER
MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK
TÜBINGEN
ABTEILUNG INNERE MEDIZIN III
SCHWERPUNKT: KARDIOLOGIE UND ANGIOLOGIE

Die Rolle dendritischer Zellen (DCs) für die Modulation der
Angiogenese. Charakterisierung der molekularen
Mechanismen in der Beeinflussung der Angiogenese

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Mezger, Matthias Reiner

2019

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Langer
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Autenrieth

Tag der Disputation: 26.07.2019

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG	4
1.1 Was ist Angiogenese?	4
1.2 Dendritische Zellen (DCs)	5
1.3 Die einzelnen Subtypen der Dendritischen Zellen	6
1.4 Die zelluläre Entwicklung der Dendritischen Zellen	7
1.5 Dendritische Zellen und Immunität.....	9
1.6 Dendritische Zellen und Neovaskularisation	10
1.7 Hypoxie und Hypoxie induzierbarer Faktor (HIF).....	12
1.8 Dendritische Zellen und Hypoxie	13
1.9 Fragestellung	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 Zellkultur mit murinen Herzendothelzellen	16
2.1.1 Prinzipien der Zellkultur mit adhärennten Endothelzellen	16
2.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer	17
2.2 Versuchstiere	17
2.3 Zellkultur mit primären murinen dendritischen Zellen	18
2.3.1 Isolation von Knochenmark aus Mäusen.....	18
2.3.2 Zellkultur mit primären murinen Knochenmarkszellen.....	19
2.3.3 Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS).....	20
2.3.4 Zellkultur von murinen DCs unter Hypoxie	20
2.4 In vitro Assays zur Untersuchung von Angiogenese.....	20
2.4.1 In vitro Proliferations Assay	21
2.4.2 In vitro Migrations Assay	22
2.4.3 In vitro Tube Formation Assay.....	23
2.5 Molekularbiologie und Proteinbiochemie	25
2.5.1 Herstellung von Zelllysaten	25
2.5.2 Proteome Profiling	25
2.5.3 Konventioneller ELISA.....	26
2.5.4 RNA- Isolation	26
2.5.5 Real- Time- PCR (Qiagen RT2 Profiler PCR Array).....	27
2.6 In vivo Assays zur Untersuchung von Angiogenese.....	28
2.6.1 In vivo Matrigel Assay.....	29

2.6.2	In vivo Hind Limb Ischämie.....	31
2.7	Histologische Methoden zur Untersuchung von Angiogenese.....	33
2.7.1	Hämatoxylin Eosin (H.E.) Färbung	33
2.7.2	Planimetrische Analyse der Matrigel- Plugs am Mikroskop.....	34
3	ERGEBNISSE.....	35
3.1	DCs und Hypoxie getriggerte Angiogenese in vivo.....	35
3.1.1	DCs führen zu mehr Angiogenese in der Hypoxie- getriggerten Angiogenese im Hindlimb Ischämie Modell	35
3.2	Die Rolle von DCs für die Wachstumsfaktor induzierte Angiogenese	37
3.2.1	DCs führen zu mehr Angiogenese in einem Modell der Wachstumsfaktor induzierten Angiogenese.....	37
3.3	In vitro Experimente	40
3.3.1	Unreife dendritische Zellen führen zu mehr Proliferation von Endothelzellen	40
3.3.2	Unreife Dendritische Zellen führen zu einer gesteigerten endothelialen Migration.....	42
3.3.3	Unreife DCs haben eine Tendenz die Tube Formation von Endothelzellen zu fördern	45
3.4	Proteome Profil von DCs.....	47
3.4.1	Dendritische Zellen und konditioniertes Zellkulturmedium von Dendritischen Zellen enthalten verschiedene pro- und antiangiogen wirkende Faktoren.....	47
3.5	Real- Time PCR Array	55
3.6	ELISA.....	63
3.6.1	CXCL10- ELISA.....	64
3.6.2	FLT-1 ELISA.....	65
4	DISKUSSION.....	66
4.1	Die Rolle von DCs für die Angiogenese in vivo.....	66
4.2	Die Rolle von DCs in vitro	69
	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
	LITERATURVERZEICHNIS.....	77
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	86
	TABELLENVERZEICHNIS	88
	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BrdU	Bromdesoxyuridin
cDCs	konventionelle DCs
CXCR3	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 3
CXCR4	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCL10	C-X-C Motiv Chemokin 10
DCs	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
ELISA	Enzyme linkend immunosorbent Assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
FLT-1	FMS ähnliche Tyrosinkinase 1 (Synonym mit VEGFR-1)
FLT3	FMS ähnliche Tyrosinkinase 3
GM-CSF	Granulozyten, Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
HUVECS	Humane Nabelvenen Endothelzellen
HIF1	Hypoxie induzierbarer Faktor
H.E.	Hämatoxylin/Eosin Färbung
IL6	Interleukin 6
IP10	Interferon Gamma induziertes Protein 10 (Synonym zu CXCL10)
LDH	Laktat Dehydrogenase
LPS	Lipopolysacharid
MHEC5-T	Transformierte Herzendothelzellen der Maus
M-CSF	Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDCs	plasmazytoide DCs
PF4	Plättchenfaktor 4
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Spezielles kommerziell erhältliches Zellkulturmedium
Th-1	T- Helferzellen von Typ 1
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TLR	Toll like Rezeptor
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VHL	Von Hippel Lindau Protein
VEGFR-1	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 1

1 EINLEITUNG

1.1 WAS IST ANGIOGENESE?

Der Prozess der Angiogenese beschreibt die Bildung von neuen Blutgefäßen ausgehend von einem bereits bestehenden Gefäßnetzwerk und ist damit für eine Vielzahl von pathologischen und physiologischen Zuständen von großer Bedeutung [1]. Unter anderem spielt Angiogenese bei den wichtigsten Zivilisationskrankheiten eine entscheidende Rolle. Wichtige Krankheitsbilder, die durch einen Mangel von Angiogenese charakterisiert werden können, sind Krankheitsentitäten wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit, der Myokardinfarkt oder der ischämische Schlaganfall [1, 2]. Auf der anderen Seite existieren auch Krankheitsbilder, die durch exzessive Angiogenese hervorgerufen werden können oder sich in ihrem Verlauf durch eine pathologische Angiogenese ungünstiger entwickeln können. Hierzu lassen sich beispielsweise Erkrankungen wie Tumoren, inflammatorische Erkrankungen sowie die altersabhängige Makuladegeneration zählen [1, 2]. Bei einem so komplexen biologischen Prozess wie der Angiogenese spielt die zielgerichtete Interaktion von verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, Leukozyten, Perizyten, glatten Muskelzellen untereinander sowie die Interaktion mit der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle [1]. Bestimmte Proteine der extrazellulären Matrix können dabei antiangiogene Effekte bewirken [3]. Darüber hinaus müssen auch bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, damit Angiogenese stattfinden kann. Beispielsweise müssen sich Endothelzellen zunächst teilen, um dann anschließend durch Migration und Adhäsion untereinander sowie mit der extrazellulären Matrix neue Gefäßstrukturen auszubilden [4]. Bei diesen Prozessen sind sowohl Zytokine als auch Zell- Zell Interaktionen entscheidend beteiligt. Es existiert eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die sich durch pro- oder antiangiogene Effekte auszeichnen können [5]. Einer der bekanntesten proangiogen wirkenden Faktoren ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF [5]. Ein weiterer bekannter und wichtiger Faktor ist bFGF [5, 6]. Als antiangiogen wirkende Faktoren sind beispielsweise PF4 oder CXCL10 bekannt [5]. Außer den bereits genannten

Faktoren existieren selbstverständlich noch wesentlich mehr Faktoren, die pro- oder antiangiogen wirken können. Einige der bekannten Angiogenese modulierenden Faktoren werden mittlerweile im Rahmen von zielgerichteten Therapien, beispielsweise im Rahmen von modernen Chemotherapieregimes zur Bekämpfung von malignen Tumoren therapeutisch beeinflusst [5]. Am bekanntesten ist hier sicherlich die zielgerichtete Therapie gegen VEGF durch Antikörper oder Tyrosinkinase- Inhibitoren bei malignen Erkrankungen wie beispielsweise dem Nierenzellkarzinom oder dem kolorektalen Karzinom [7, 8]. Darüber hinaus wird beispielsweise Avastin als monoklonaler Antikörper gegen VEGF auch bei nicht malignen Erkrankungen wie der altersabhängigen Makuladegeneration eingesetzt [9].

1.2 DENDRITISCHE ZELLEN (DCs)

Dendritische Zellen (DCs) sind spezialisierte Entzündungszellen, die an einer entscheidenden Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität stehen. Sie wurden erstmals von Ralph Steinman und Zanvil Cohn in den 1970er Jahren des vergangenen Jahrtausends beschrieben [10, 11]. Ein morphologisches Charakteristikum dieser Zellen ist ihr sternförmiges Aussehen in der Zellkultur [10]. Weitere experimentelle Forschungsarbeiten, die sich mit der Funktion dieser Zellen beschäftigt haben, konnten im Verlauf zeigen, dass sie von herausragender Bedeutung für das Immunsystem sind. Eine wesentliche Beteiligung an der Erforschung der DCs hatten verschiedene transgene Tiermodelle, die eine Depletion der DCs in vivo beziehungsweise von einzelnen DC- Subtypen ermöglicht haben [12, 13]. DCs als Zellen, die zur Phagozytose befähigt sind, ähneln in dieser Hinsicht den Makrophagen. Teilweise wird die Existenz einer eigenen Zelllinie der dendritischen Zellen auch angezweifelt und sie werden von kritischen Autoren der Makrophagen- Monozyten- Zelllinie zugeordnet [14]. Insgesamt werden die DCs jedoch von der Mehrzahl der Autoren einer eigenen Zelllinie zugeordnet, die unabhängig von den Makrophagen existiert.

1.3 DIE EINZELNEN SUBTYPEN DER DENDRITISCHEN ZELLEN

Unter dem Überbegriff dendritische Zellen fasst man mehrere verschiedene Populationen von Zellen zusammen, die sowohl in lymphatischem als auch in nicht- lymphatischem Gewebe vorkommen können. Man unterscheidet zunächst einmal grundsätzlich plasmazytoide (pDCs) und konventionelle dendritische Zellen (cDCs) sowie inflammatorische, von Monozyten abstammende DCs [15-17]. Schon bald, nachdem die DCs als oberflächenadhärente Zellen entdeckt worden waren, wurde als gemeinsamer Marker aller DCs die Expression der Antigene MHC II und CD11c entdeckt [11, 15]. Weitere Arbeiten, die sich mit den dendritischen Zellen auseinandergesetzt haben konnten dann zeigen, dass die MHC II und CD11c positiven Zellen in lymphatischem Gewebe wiederum Unterpopulationen zeigen. Dabei existieren im lymphatischen Gewebe DCs die entweder CD11b exprimieren oder eine Expression von CD8a zeigen [15, 16, 18]. Darüber hinaus gibt es im peripheren Gewebe, wie beispielsweise in der Dermis oder der Lunge DCs die durch Expression von CD103 charakterisiert sind. Weiterhin existieren dort auch CD11b positive DCs. Die CD103 positiven Zellen entsprechen in ihrer Funktion in vielerlei Hinsicht den CD8a positiven DCs im lymphatischen Gewebe [18, 19]. Darüber hinaus gibt es eine Gruppe von DCs, die plasmazytoiden dendritischen Zellen, die morphologisch durch ein plasmazellartiges Aussehen ohne die typischen Dendriten charakterisiert sind [15, 16]. Nach Stimulation mit Interleukin 3 kommt es bei dieser Zellpopulation zur Ausbildung von langen Dendriten und Hochregulation von CD11c und MHC II [15, 20]. Darüber hinaus können plasmazytoide dendritische Zellen durch proinflammatorische Stimuli wie beispielsweise CXCL10 in Lymphknoten rekrutiert werden, wo sie große Mengen an Typ- 1- Interferon produzieren [21]. Weiterhin ist bekannt, dass sich im Rahmen von inflammatorischen Prozessen DCs aus einer monozytären Vorläuferzelle entwickeln können. In diesem Zusammenhang spricht man dann von inflammatorischen oder monozytären DCs [22]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit Leishmaniose Monozyten in die Dermis rekrutiert werden, die sich wiederum in der Dermis zu DCs differenzieren und entscheidend an der Th-1 Abwehr der Leishmania- Infektion beteiligt sind [22].

1.4 DIE ZELLULÄRE ENTWICKLUNG DER DENDRITISCHEN ZELLEN

Die Entwicklung der DCs geht von einer gemeinsamen Vorläuferzelle (MDP), welche die DCs gemeinsam mit Monozyten und Makrophagen im Knochenmark besitzen, aus [15, 23]. Aus dieser Vorläuferzelle können sich also auf der einen Seite DCs entwickeln, andererseits können sich hieraus auch Monozyten und Makrophagen entwickeln [23]. In der weiteren Entwicklung der monozytären Zellreihe wurde eine gemeinsame monozytäre Vorläuferzelle beschrieben, die sich nur noch weiter in Monozyten differenzieren kann [24]. Darüber hinaus existiert parallel auch eine Zellpopulation, die sich entsprechend nur noch in die verschiedenen Arten von DCs weiter differenzieren kann (CDP) [25, 26]. Aus dieser Zelle wiederum können sich Vorläuferzellen für cDCs sowie für pDCs entwickeln [27, 28]. Die Entwicklung bis zur gemeinsamen Vorläuferzelle für die pDCs sowie die cDCs verläuft im Knochenmark. Diese Vorläuferzellen (preDCs) verlassen dann das Knochenmark und wandern in periphere Gewebe ein [29]. Im lymphatischen Gewebe, also beispielsweise in den Lymphknoten oder in der Milz existieren dann zum einen CD8a positive cDCs [18]. Darüber hinaus gibt es dort dann auch cDCs, die CD11b exprimieren [18]. Die CD8a positive DC Population spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer Th-1 Zellantwort durch zytotoxische T- Zellen, da hier exogen aufgenommene Antigene über MHC-I Moleküle präsentiert werden können [19, 30]. Die CD11b positive DC Population wiederum kann Antigene über MHC- II präsentieren [31]. Darüber hinaus existiert im nichtlymphatischen Gewebe eine CD103- positive Zellpopulation von DCs die ebenfalls die Eigenschaft verfügt, exogen aufgenommene Antigene über MHC I zu präsentieren [19, 32]. Insofern haben die CD8a positiven DCs und die CD103 positiven DCs ähnliche Eigenschaften. Die CD8a positiven Zellen und die CD103 positiven Zellen werden auch als cDC1 bezeichnet [33]. Die CD11b positiven Zellen auch als cDC2 [33]. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Zuordnung zur jeweiligen Subpopulation von DCs bereits im Knochenmark erfolgt und nicht erst im peripheren Gewebe [33]. Ab dem zellulären Entwicklungsstadium der gemeinsamen dendritischen Vorläuferzelle (Common Dendritic Precursor, CDP) ist diese Zuordnung zu einer der beiden Zelllinien der konventionellen

dendritischen Zellen erkennbar [33]. Interessanterweise scheint es auch so zu sein, dass sich die Vorläuferzellen sowohl im Hinblick auf die Antigene, die an der Zelloberfläche exprimiert werden, als auch im Hinblick auf das Transkriptom unterscheiden [33]. Darüber hinaus scheint es eine enge Koppelung von Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu geben [33].

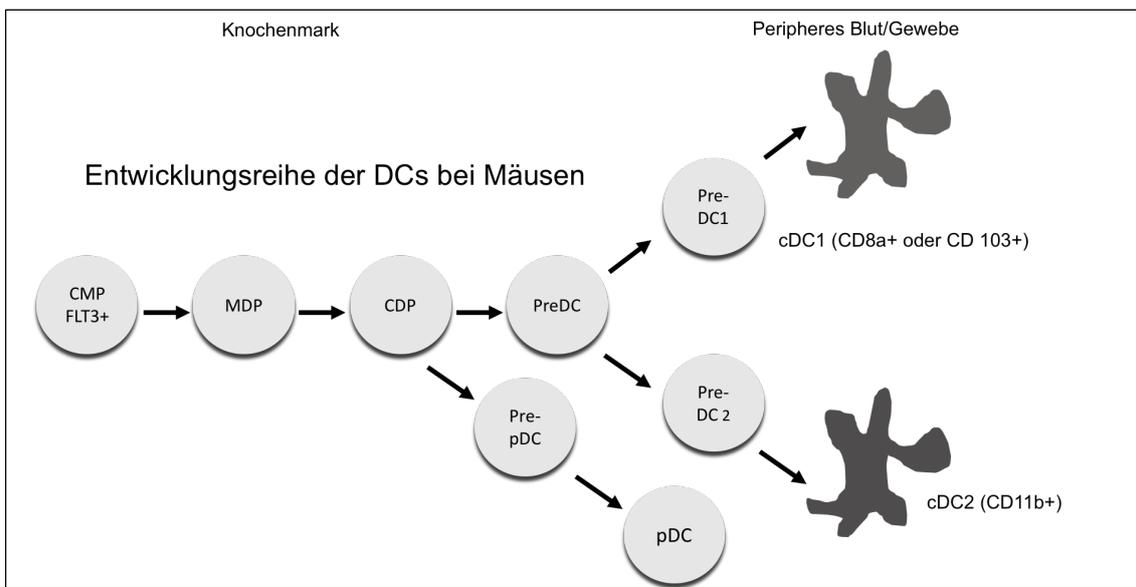


Abbildung 1: Überblick über die verschiedenen DC Subtypen der Maus und ihre Entwicklung (Nach S. Puhr et al. 2015 [15])

Ein wesentlicher Faktor für die Entwicklung der DCs unter steady-state Bedingungen ist FLT3 [34, 35]. Unter inflammatorischen Bedingungen scheint darüber hinaus auch der Granulozyten, Monozyten Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF) von großer Relevanz zu sein [36]. Mäusen mit einem durch Knockout hervorgerufenen FLT3 Mangel fallen phänotypisch zum einen sowohl durch einen Mangel an myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark auf, zum anderen aber auch durch eine Veränderung der zellulären Zusammensetzung im peripheren Blut sowie in Lymphknoten und der Milz [37]. Dabei sind auch die Populationen von cDC1 und cDC2 vermindert [37]. Aufgrund der Komplexität der DCs und der wechselseitigen Beziehungen der Zellen zueinander beziehungsweise der Entwicklung der Zellpopulationen aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle, ist die Erforschung der DC

Entwicklungslinie nach wie vor Gegenstand aktueller Forschungsprojekte weltweit.

1.5 DENDRITISCHE ZELLEN UND IMMUNITÄT

Experimentell können DCs sowohl aus humanem Blut als auch aus murinem Knochenmark mittels Zellkulturtechniken isoliert werden [36, 38, 39]. Die aus dem Knochenmark der Maus isolierten DCs werden auch als so genannte Bone marrow derived DCs (BM- DCs) bezeichnet [38, 40]. Grundsätzlich ähneln diese Zellen, die in den meisten publizierten Studien untersucht wurden am ehesten den inflammatorischen, von monozytären Vorläuferzellen abgeleiteten DCs. In den letzten Jahren konnte vor allem mittels zielgerichteter Depletion von Subpopulationen von DCs in verschiedenen Tiermodellen, insbesondere in der Maus, die jeweilige Rolle der Zellpopulationen im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen präzisiert werden [41]. Unter steady- state Bedingungen werden Antigene im Gewebe von CD103+ DCs aufgenommen. Mit der Lymphflüssigkeit gelangen die beladenen DCs in die Lymphknoten [19]. Dort können die entsprechenden Antigene dann, nachdem diese durch MHC II- Moleküle präsentiert wurden, durch T- Zellen erkannt werden [19]. Daraufhin kommt es schließlich zur Aktivierung einer adaptiven Immunantwort mit nachgeschalteter Produktion von Antikörpern durch B- Zellen. Darüber hinaus können die CD103+ DCs ihre aufgenommenen Antigene auch an CD8a+ DCs weitergeben, wie in einem experimentellen Setting mit per Inhalation in die Lunge aufgenommenen Fremdanitigenen gezeigt werden konnte [19]. Die CD103+ DCs haben die einzigartige Eigenschaft, Antigene auch über MHC-I Moleküle präsentieren zu können [19]. Daraufhin können dann zytotoxische T- Lymphozyten aktiviert werden. Plasmazytoide DCs können durch ihre TLR Rezeptoren pathogene Muster wie doppelsträngige RNA oder CpG beinhaltende DNA Abschnitte erkennen, die ein Charakteristikum von viralen Pathogenen darstellen. Hierauf können sie durch Produktion großer Mengen an Interferon Gamma reagieren [42]. Darüber hinaus kommt es dann zur Ausbildung der für den Namen der Zellen ausschlaggebenden zellulären Fortsätze (Dendriten) sowie zur Hochregulation von MHC Rezeptoren und kostimulatorischen Molekülen der T- Zell Aktivierung [20]. Im entzündeten Gewebe werden die

Endothelzellen der dort vorhandenen Blutgefäße aktiviert, wodurch diese zur Rekrutierung von Leukozyten ins entzündete Gewebe beitragen. Hierbei werden Monozyten rekrutiert, die sich im Gewebe zu so genannten inflammatorischen DCs entwickeln können [22]. Bei Untersuchungen im Dünndarm und Dickdarm konnte gezeigt werden, dass die CD11b+ DCs an der Abwehr von parasitären Infektionen beteiligt sind. Beispielsweise wurde eine tierexperimentelle Studie durchgeführt, bei der eine Infektion der Versuchstiere mit *Schistosoma mansoni* stattfand. Entscheidend für die Entwicklung einer Immunantwort waren hier CD11b+ DCs [43]. In einer anderen Studie, bei der das Augenmerk auf der Ausbildung einer allergischen Reaktion nach Kontakt zu Hausstaub lag, fand sich im Lungengewebe ebenfalls die vorbeschriebene CD11b+ DC Population, welche für die Ausbildung einer allergischen Th-2 Antwort entscheidend war, wie in einem Experiment, bei dem Mäuse mit Hausstaub behandelt worden sind und die allergische Antwort hierauf gemessen wurde, herausgefunden werden konnte [44].

1.6 DENDRITISCHE ZELLEN UND NEOVASKULARISATION

Neben den bereits bekannten Funktionen von dendritischen Zellen im Zusammenhang mit Inflammation konnten neuere Arbeiten auch zeigen, dass DCs einen Einfluss auf die Neubildung von Blutgefäßen haben können. Die meisten Autoren haben hier mit DCs gearbeitet, die aus murinem Knochenmark isoliert worden sind und mittels GM-CSF behandelt wurden. Das heißt, bei diesen Untersuchungen wurde vor allem mit inflammatorischen, von Monozyten abstammenden DCs gearbeitet. So wurde unter anderem im Maus-Modell gezeigt, dass schnell wachsende und gut vaskularisierte Tumoren mehr unreife DCs enthalten [45]. Ergänzend konnte durch dieselbe Gruppe von Wissenschaftlern ebenfalls gezeigt werden, dass die Implantation von Tumoren, die mit unreifen DCs versetzt worden waren, im Mausmodell zu schneller wachsenden Tumoren führte. Außerdem konnte in einem Modell der Wachstumsfaktor induzierten Angiogenese (Matrigel) demonstriert werden, dass die unreifen DCs zu mehr Angiogenese führen [45]. Weitere Arbeiten, die sich mit der Rolle von DCs bei Brustkrebs beschäftigt haben, konnten darlegen, dass mehr reife DCs im Primärtumor sowohl zu längerem progressionsfreiem

Überleben als auch längerem Gesamtüberleben der Patientinnen führten [46]. Ähnliche Beobachtungen konnten in Mausmodellen von anderen Erkrankungen gemacht werden, die ebenfalls mit Angiogenese assoziiert sind. Zum Beispiel wurde die Rolle von DCs für die Angiogenese in einem Tiermodell für die feuchte altersbedingte Makuladegeneration (choroidales Neovaskularisationsmodell in der Maus) untersucht. Dabei wurden mittels eines Lasers subretinale Läsionen induziert, in denen die Neovaskularisation beobachtet und analysiert wurde. In den zuvor induzierten Läsionen konnte eine Infiltration von DCs beobachtet werden, nachdem Fluoreszenz markierte DCs in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert worden waren [47]. Im Bereich der Reproduktion spielt Angiogenese ebenfalls eine wichtige Rolle. Ein Beispiel hierfür ist die Regeneration des Endometriums im monatlichen Zyklus der Frau. Darüber hinaus existiert die Endometriose als Erkrankung, deren Grundlage versprengtes Endometrium ist. Beispielsweise konnte demonstriert werden, dass DCs in einem Mausmodell der Endometriose dazu führen können, dass die Endometrioseherde sowohl schneller wachsen, als auch insgesamt größer werden [48]. Dazu passt auch, dass in vitro gezeigt werden konnte, dass DCs die Migration von Endothelzellen fördern können [48]. In einem Mausmodell der Embryo-Implantation konnte die Bedeutung von uterinen DCs für die erfolgreiche Embryo-Implantation gezeigt werden [49]. Dabei wurden Depletionsversuche durchgeführt, um die Rolle von uterinen DCs für die Embryo-Implantation zu untersuchen. Nach Depletion der uterinen DCs kam eine erfolgreiche Embryo-Implantation nicht mehr zustande [49]. Dies, so konnten die Autoren zeigen, lag nicht an einer fehlenden Immuntoleranz, sondern an einer gestörten Angiogenese [49]. Eine andere Arbeitsgruppe die sich ebenfalls mit der Rolle von DCs für die Angiogenese im Zusammenhang mit Reproduktion beschäftigt hat konnte zeigen, dass eine Subpopulation von DCs, die den CXCR4 Rezeptor exprimiert, für die Angiogenese in der Plazenta bedeutend ist [50]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass unreife myeloische Zellen eine wichtige Rolle in der Modulation der Angiogenese in der Plazenta bei Menschen [51] und bei Mäusen [52] spielen.

1.7 HYPOXIE UND HYPOXIE INDUZIERBARER FAKTOR (HIF)

Ein Mangel an Sauerstoff wird in der Medizin und Biochemie als Hypoxie bezeichnet. Normalerweise ist dies ein absolutes Notfallsignal für Zellen, da Sauerstoff lebensnotwendig ist für die Aufrechterhaltung einer zellulären Homöostase [53]. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist HIF1 [54]. HIF1 ist ein Transkriptionsfaktor, der sich aus HIF1A und HIF1B zusammensetzt [53, 54]. HIF1A ist sauerstoffsensibel. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1A hydroxyliert und ubiquitinyliert. Das führt dazu, dass HIF1A durch das Proteasom abgebaut wird [54]. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zur Stabilisierung von HIF1A. Dadurch können HIF1A und HIF1B einen Dimer bilden und die Transkription von Genen, die für das Überleben unter hypoxischen Bedingungen essenziell sind, bewirken [53]. Dazu zählen vor allem Gene, die für Stoffwechselprozesse wie Glykolyse verantwortlich sind und Gene, die für die Angiogenese beziehungsweise die Erythropoese bedeutsam sind [54]. Experimente mit myeloischen Zellen konnten darüber hinaus zeigen, dass HIF1 von entscheidender Bedeutung für die Infiltration von myeloischen Zellen in entzündetes Gewebe ist [55]. Dies konnte beispielsweise im Tierversuch mit einem kutanen Inflammationsmodell gezeigt werden. Hier konnte man bei HIF1A null Mäusen eine deutlich geringere Infiltration von myeloischen Zellen in die Haut beobachten [55]. Ähnliche Ergebnisse waren auch in einem Mausmodell für Arthritis sichtbar [55]. Diese geringere Infiltration war unabhängig von der Expression von VEGF. Passend zu diesen Beobachtungen kam es beim Fehlen des Von- Hippel- Lindau- (VHL) Proteins, das entscheidend am Abbau des hydroxylierten HIF1A beteiligt ist, zu einer deutlichen Verstärkung der inflammatorischen Antwort [55]. Klinisch- praktische Konsequenzen haben sich aus der Kenntnis des Zusammenspiels von HIF, dem VHL Protein und VEGF für die Therapie des Nierenzellkarzinoms ergeben, bei dem eine therapeutische Beeinflussung von proangiogenen Signalwegen mittlerweile als medikamentöse Tumorthherapie etabliert ist [56]. Beim klarzelligen Nierenzellkarzinom liegt eine Mutation im VHL- Gen vor. Daraus ergibt sich als Folge, dass HIF, welches normalerweise unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert beziehungsweise ubiquitinyliert wird sowie anschließend durch das Proteasom abgebaut wird, nun

eben nicht mehr abgebaut wird, sondern konstitutiv aktiv bleibt. Daraufhin kann sich im Zellkern eine Dimerisierung von HIF1A und dem konstitutionell aktiven HIF1B ausbilden, die zur nachgeschalteten Transkription von Genen für die Angiogenese, wie beispielsweise VEGF, führt [56]. Als Resultat entstehen sehr gut vaskularisierte Tumoren in der Niere.

1.8 DENDRITISCHE ZELLEN UND HYPOXIE

In entzündeten Geweben herrscht aufgrund der dort ablaufenden biochemischen Reaktionen ein niedriger Sauerstoffpartialdruck. Dadurch kommt es zu einer Gewebshypoxie [53]. DCs wandern in entzündetes Gewebe ein und nehmen dort Antigene auf, um diese im Verlauf an ihrer Oberfläche mittels MHC Rezeptoren zu präsentieren, damit T- Lymphozyten diese erkennen können um dann weitere immunologische Abwehrvorgänge einleiten zu können [57]. Ein wichtiger Faktor für die Stimulation von DCs ist bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), das in der Zellmembran von gramnegativen Bakterien vorkommt. LPS führt dazu, dass DCs vermehrt MHC Moleküle an der Zelloberfläche exprimieren [58]. Dadurch werden T- Zellen aktiviert und Mechanismen der erworbenen Abwehr, wie beispielsweise die Produktion von Antikörpern durch B- Lymphozyten können induziert werden [57]. Darüber hinaus können DCs auch auf Hypoxie reagieren [59-61]. Dabei spielt unter anderem der Transkriptionsfaktor HIF1A eine entscheidende Rolle [61]. Im Hinblick auf die Aktivierung von T- Lymphozyten führte die Behandlung von DCs mit LPS und Hypoxie als Kombination im Vergleich zur Behandlung der DCs nur mit LPS zu einer stärkeren Expression von kostimulatorischen Molekülen, einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Mediatoren sowie zu mehr Lymphozyten- Proliferation [59]. Beispielsweise führte die Stimulation von DCs mit LPS zu einem stärkeren Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL6 und TNF [59]. Mittels Durchflusszytometrie war darüber hinaus auch ein Anstieg der MHC- II Expression an der Zelloberfläche sowie eine vermehrte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bei Stimulation mit LPS und Hypoxie im Vergleich zur Simulation mit LPS alleine nachweisbar [59]. Ergänzend wurde auch untersucht, welchen Effekt DCs, die mittels LPS oder Hypoxie beziehungsweise LPS und Hypoxie stimuliert wurden, auf die Proliferation von Splenozyten haben. Hierbei wurde

beobachtet, dass die Stimulation mit Hypoxie allein einen proliferationshemmenden Effekt hat [59]. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit LPS zu mehr Proliferation der Splenozyten [59]. Die Kombination von beidem, sprich LPS und Hypoxie hatte noch deutlichere proliferationsfördernde Effekte [59]. Im Hinblick auf Stoffwechselprodukte waren ähnliche Effekte beobachtbar. Interessanterweise führte die Stimulation mit LPS oder Hypoxie zu einer vergleichbaren Abnahme der Glucose- Konzentration im Zellkulturüberstand [59]. Im Gegensatz dazu kam es zu einem vergleichbaren Anstieg von Laktat, LDH und ATP in den Überständen [59]. Die beschriebenen Effekte waren bei Stimulation mit LPS und Hypoxie noch deutlicher ausgeprägt [59]. Im Hinblick auf die HIF1A Expression fiel auf, dass LPS allein zu mehr HIF1A mRNA führt. Im Gegensatz dazu ist aber nur bei Kombination von LPS und Hypoxie mehr HIF1A Proteinexpression nachweisbar [59]. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass durch die Aktivierung von Toll Like Rezeptoren (TLR) der DCs durch LPS und die Stimulation von DCs durch Hypoxie, intrazellulär unterschiedliche biochemische Signalwege angesteuert werden. Die Stimulation mit LPS führt zu einer von MYD88 beeinflussten Stimulation des NFκB Signalwegs. Dadurch wird die Expression von HIF1A abhängigen pro-inflammatorischen Genen gesteuert [60]. Diese können durch Hypoxie alleine nicht ausreichend induziert werden [60]. Beispiele für TLR induzierte, inflammatorische HIF1A abhängige Gene sind PTGS2 und NOS2 [60]. Beispiele für Hypoxie und TLR induzierte HIF1A abhängige Gene sind GLUT1 und PGK1 [60]. DCs scheinen also sowohl auf Hypoxie, als auch auf eine Stimulation mit maturations- fördernden Substanzen wie LPS mit einer starken Veränderung der zellulären Homöostase zu reagieren.

1.9 FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle von DCs für die Angiogenese zu untersuchen. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Rolle von Hypoxie und LPS auf die durch DCs beeinflusste Angiogenese gelegt. Hypoxie als Variable wurde deshalb gewählt, weil Hypoxie einen entscheidenden Trigger für Angiogenese unter physiologischen und pathologischen Zuständen darstellt. LPS wurde gewählt, weil es als anerkannter Faktor gilt, der die Ausreifung von DCs fördert. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen mittels in vitro Verfahren in der Zellkultur untersucht, inwieweit endotheliale Funktionen wie Proliferation, Migration sowie Tube Formation von Dendritischen Zellen beeinflusst werden. Zum anderen wurden mittels Proteome Profiling, ELISA und Real- Time- PCR Faktoren identifiziert, die hierbei potenziell eine Rolle spielen. Außerdem wurde die Rolle von DCs in zwei in vivo Versuchen der Angiogenese evaluiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLKULTUR MIT MURINEN HERZENDOTHELZELLEN

MHEC5-T (Mouse Heart Endothelial Cell Clone 5 Transformed) Zellen wurden als immortalisierte Endothelzellen für in vitro Versuche verwendet. Mithilfe dieser Zellen wurden in vitro Zellproliferation, Zellmigration und die Fähigkeit zur Bildung primitiver Röhrenstrukturen (2D Tube Formation) untersucht. Diese Zelllinie ist für in vitro Endothelzellassays etabliert [62].

2.1.1 PRINZIPIEN DER ZELLKULTUR MIT ADHÄRENTEN ENDOTHELZELLEN

Nach der Entnahme aus dem -150°C Gefrierschrank wurden die Zellen rasch in 37°C warmem Wasser aufgetaut. Parallel wurden in einem 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) 7 ml MHEC Medium, bestehend aus DMEM high Glucose (Dulbeccos modified Eagle Medium) (Gibco, Paisley, UK), mit 10% FCS (Gibco, New York, USA), sowie 1% Penicillin/ Streptomycin (Gibco, St. Louis, USA) und 1% L-Glutamin (Gibco, Paisley, UK), vorgelegt. Sobald kein Eis mehr im Kryoröhrchen sichtbar war, wurde die Zellsuspension mit 1-3 Millionen Endothelzellen in 1-2 Milliliter Einfriermedium, welches im Wesentlichen MHEC Medium entspricht, aber mehr FCS (20%) und zusätzlich 10% DMSO (Applichem, Darmstadt, Deutschland) enthält, zu den 7 ml MHEC Medium langsam hinzugegeben. Anschließend wurde mit 365 g für 5 Minuten zentrifugiert (Hereaus Multifuge 3S+). Dann wurden in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche (Corning, USA) 13 ml MHEC Medium vorgelegt. Der Überstand aus dem 50 ml Falcon wurde mit der Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml MHEC Medium resuspendiert und die Suspension wurde in die vorbereitete 75 cm^2 Zellkulturflasche gegeben. Die Zellkultur wurde jeden zweiten bis dritten Tag gesplittet. Dabei wurde ein Teil der Zellen für Experimente verwendet. Eine neue 75 cm^2 Zellkulturflasche (Corning, USA) mit 14ml MHEC Medium und 10^6 Endothelzellen wurde für die Weiterführung der Kultur jeweils neu angelegt. Beim Splitten der Zellkultur wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde das MHEC Medium aus der 75 cm^2 Zellkulturflasche (Corning, USA) mit der Stangenpipette entfernt und verworfen. Anschließend wurde mit 10 ml PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gewaschen. Danach wurden 2 ml

Trypsin EDTA (Gibco, Paisley, UK) hinzugegeben und die Flasche wurde für 3 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 8 ml MHEC Medium hinzugegeben, um das Trypsin zu neutralisieren. Es wurde mehrmals kräftig mit der Pipette resuspendiert, um eventuell noch vorhandene Zellklumpen aufzulösen. Dann wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Vor der Zentrifugation mit 365 g für 5 Minuten wurden noch 10 µl Suspension für die hämocyto-metrische Zellzählung (C-Chip DHC-N01 Digital Bio, NanoEnTek Inc., Korea) entnommen. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet so mit Zellkulturmedium resuspendiert, dass eine Zellkonzentration von 10⁶ Zellen pro Milliliter vorlag und dann, wie beschrieben, neu ausgesät.

2.1.2 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL MIT DER ZÄHLKAMMER

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10µl Zellsuspension entnommen und zu einer Einmal- Neubauer- Zählkammer (C-Chip DHC-N01 Digital Bio, NanoEnTek Inc., Korea) hinzugegeben. Die Bestimmung der Zellzahl x erfolgte durch die Formel:

$$x = y \times 10\,000 \times v$$

y : ausgezählte Zellzahl

v : Gesamtvolumen

2.2 VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden gesunde Black Six Mäuse C57/BL/6J aus Eigenzucht verwendet. Die Tiere wurden in der Tierhaltung unter SPF Bedingungen gehalten. Die Zucht und Versorgung der Tiere erfolgte durch die Tierpflegerinnen und Tierpfleger der Einrichtung sowie durch die MTA-L unserer Arbeitsgruppe. Die C57/BL/6J Mäuse wurden für die Isolation von Knochenmark sowie für die Durchführung von Matrigel Experimenten verwendet. Für die Hindlimb- Ischämie- Experimente wurden gesunde DTR- Mäuse aus Eigenzucht (NOD.FVB-Tg (Itgax-DTR/EGFP)57/Lan/JdkJ (NOD.DC11c-DTR) verwendet. Die Versuche

wurden gemäß den Vorgaben und Richtlinien für Tierversuche des Tierärztlichen Dienstes der Universität Tübingen sowie des Regierungspräsidiums Tübingen durchgeführt (Tierversuchs- Antrags- Nr. M4/18).

2.3 ZELLKULTUR MIT PRIMÄREN MURINEN DENDRITISCHEN ZELLEN

2.3.1 ISOLATION VON KNOCHENMARK AUS MÄUSEN

Um dendritische Zellen zu isolieren, wurden gesunde Black Six Mäuse C57/BL/6J aus Eigenzucht verwendet. Die Mäuse wurden durch cervicale Dislokation getötet. Dann wurde das Fell gründlich mit Ethanol (B.Braun, Melsungen, Deutschland) besprüht. Anschließend wurde, mithilfe von Schere und Pinzette, vom unteren Abdomen ausgehend, das Fell subcutan bis zum Rippenbogen nach oben und der Längsachse beider Beine folgend nach unten abpräpariert. Die nun freiliegende Muskulatur, sowie die Fibulae, wurden an beiden Beinen entfernt. Dann wurde auf jeder Seite das komplette Paket aus Femur und Tibia herausgelöst und anschließend von noch anliegendem Weichteilgewebe befreit. Beide Knochen wurden vorsichtig und ohne die Epiphyse zu eröffnen voneinander getrennt und sofort in ein auf Eis gelagerten 1,5 ml Eppendorf Cup mit 1 ml eiskaltem Zellkulturmedium, bestehend aus 500 ml RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK) mit 10% FCS (Gibco, New York, USA), 1% Hepes (PAA, Österreich), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, St. Louis, USA) und 1,8 µl 2-Mercapto-Ethanol (Gibco, Paisley, UK), überführt. Um das Knochenmark aus den entnommenen Knochen weiter zu isolieren, wurden die Knochen unter der Sterilbank aus dem 1,5 ml Eppendorf Cup mit einer zuvor in Ethanol desinfizierten Pinzette in eine 6-Well-Platte (Corning, USA) überführt. Dabei wurden sie zunächst einmal in einem ersten Well in 3 ml 100% Ethanol (VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden sie in ein Well mit 3 ml DC Kulturmedium überführt. In einem weiteren Well mit 3 ml DC Kulturmedium wurden dann die beiden Enden der Knochen mit einem Skalpell steril und möglichst weit distal abgetrennt. Aus einem mit sterilem DC Kulturmedium gefüllten 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) wurde eine 20 ml Spritze (B.Braun, Melsungen, Deutschland) mit DC Kulturmedium aufgezogen. Auf die Spritze wurde eine 26 G Injektionskanüle (BD Biosciences, Irland) aufgesetzt und jeder Knochen wurde mit jeweils 5 ml

sterilem Kulturmedium gespült. Das in sterilem DC Kulturmedium gelöste Knochenmark aller vier aus einer Maus entnommenen Knochen wurde in einem 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) gesammelt. Anschließend wurde die aus dem Knochenmark isolierte Zellsuspension durch einen 70 µm Nylon Filter (Corning, New York, USA) in einen neuen 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) filtriert. Dann wurde mit 336 g für 5 Minuten zentrifugiert (Hereaus Multifuge 3S+). Das Medium wurde mit der Pipette entfernt und es wurde 1 ml Ammoniumchlorid (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) für 5 Minuten zum Pellet hinzugegeben, um die Erythrozyten zu lysieren. Dabei wurde der Falcon während dieser 5 Minuten immer wieder sanft hin- und hergeschwenkt. Anschließend wurde das Ammoniumchlorid durch Zugabe von 10 ml sterilem DC Kulturmedium neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 336 g für 5 Minuten (Hereaus Multifuge 3S+) wurde der Überstand nochmals verworfen und das Pellet wurde mit 10 ml frischem DC Kulturmedium resuspendiert und anschließend erneut durch einen 70 µm Nylon Filter (Corning, New York, USA) in einen neuen 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) filtriert. Es wurde wieder mit 336 g für 5 Minuten zentrifugiert (Hereaus Multifuge 3S+). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 18 ml DC Kulturmedium mit 20 ng mGMCSF (PeproTech, Rocky Hill, USA) pro Milliliter DC Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension wurde à 3 ml Flüssigkeitsvolumen pro Well in eine 6-Well- Platte (Corning, USA) ausgesät.

2.3.2 ZELLKULTUR MIT PRIMÄREN MURINEN KNOCHENMARKSZELLEN

Die Platte wurde im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ für eine Woche inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht, indem die Flüssigkeit in jedem Well vorsichtig unter der Sterilbank mit der Stangenpipette abgenommen wurde und anschließend 3 ml neues, 37°C warmes DC Medium, mit 20 ng mGMCSF (Pepro Tech, Rocky Hill, USA) pro Milliliter Kulturmedium, in jedes Well hinzugegeben wurden. Am Tag sechs nach der Isolation der dendritischen Zellen wurde erneut ein Medienwechsel durchgeführt. Dazu wurden, wie schon beschrieben, pro Well der 6- Well- Platte, 3 ml Zellkulturmedium mit 20 ng mGMCSF (PeproTech, Rocky Hill, USA)

hinzugegeben. Darüber hinaus wurden die Zellen auf verschiedene Art und Weise stimuliert oder andernfalls unstimuliert belassen.

2.3.3 STIMULATION MIT BAKTERIELLEM LIPOPOLYSACCHARID (LPS)

Zur Stimulation wurde LPS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Zunächst einmal wurde das pulverförmige LPS mit PBS in einer Konzentration von 1 µg/ml gelöst und à 30 µl in 100 µl Eppendorf Cups bei -20°C gelagert. Vor dem Experiment wurden die Aliquots aufgetaut und im Experiment verwendet. Dabei wurden die Knochenmarkszellen mit einer Konzentration von 1 µg/ml stimuliert.

2.3.4 ZELLKULTUR VON MURINEN DCs UNTER HYPOXIE

Um den Effekt von Hypoxie auf dendritische Zellen zu untersuchen, wurde die 6-Well-Platte, in der das entnommene Knochenmark kultiviert wurde, unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank in eine Hypoxie Kammer (Brincubator, Billups Rothenberg, USA) gebracht. Zusätzlich wurde noch eine Petrischale mit 10 ml PBS in die Hypoxie Kammer gestellt, um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit in der Hypoxie Kammer herzustellen und das Verdunsten des Zellkulturmediums zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen in der Hypoxie Kammer für 10 Minuten mit einem Gasgemisch (Westfahlengas, Deutschland) aus 98% Stickstoff und 2% Sauerstoff mit einer Flussrate von 15 Litern pro Minute begast. Danach wurde die Hypoxie Kammer im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Nach der 24- stündigen Inkubation wurde die Zellsuspension unter der Sterilbank mittels Stangenpipette geerntet und in 50 ml Falcons überführt. Nach Zentrifugation mit 336 g für 5 Minuten wurden die Überstände abgenommen und aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung für Experimente bei -20°C gelagert.

2.4 IN VITRO ASSAYS ZUR UNTERSUCHUNG VON ANGIOGENESE

Für die Neubildung von Blutgefäßen müssen sich Endothelzellen sowohl teilen, als auch sich durch Migration zu neuen Blutgefäßen zusammenlagern. Dies kann in vitro mithilfe von Zellproliferations-, Zellmigrations- und Tube- Formation-Assays untersucht werden. Im Folgenden sind die einzelnen im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden genauer beschrieben.

2.4.1 *IN VITRO* PROLIFERATIONS ASSAY

Die Zellproliferation wurde mithilfe eines ELISA Kits (BrdU Proliferations ELISA Kit Roche, Mannheim, Deutschland) untersucht (Cat. No. 11 647 229 001). Das Prinzip basiert darauf, dass sich teilende Zellen neue DNA synthetisieren müssen und sich Bromdesoxyuridin (BrdU) als Pyrimidinanalogon ebenfalls als DNA Baustein eignet. Anschließend können BrdU positive Zellen mithilfe einer Antigen- Antikörper- Reaktion nachgewiesen werden und deren Menge kann quantifiziert werden. Dabei wurde nach der Beschreibung im Handbuch zum ELISA vorgegangen. Zunächst wurde die MHEC5-T Zellkultur wie bereits im Abschnitt 2.1.1 beschrieben gesplittet und so resuspendiert, dass 5000 MHEC5-T Endothelzellen in 100 µl MHEC Kulturmedium vorhanden waren. In eine 96-Well- Mikrotiterplatte (Corning, USA) wurden dann 100 µl Suspension pro Well vorgelegt. Dazu wurden 100 µl Überstände von dendritischen Zellen (DCs) gegeben. Diese wurden vor dem Versuch aus dem -20°C Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Überstände wurde die 96-Well- Platte 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubationsschrank inkubiert. Anschließend wurde BrdU Labelling Reagenz hinzugegeben und die Platte noch einmal für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubationsschrank inkubiert. Vor der Zugabe wurde das BrdU Labelling Reagenz mit dem Faktor 1:100 mit sterilem MHEC Kulturmedium verdünnt. Als Leerwert wurden 100 µl steriles Kulturmedium verwendet. Zum Leerwert wurden 10 µl BrdU Labelling Reagenz pro Well hinzugegeben, zu den Ansätzen jeweils 20 µl BrdU Labelling Reagenz pro Well. Nach der 6- stündigen Inkubation wurde die Flüssigkeit von der 96-Well Mikrotiterplatte geklopft und die Platte über Nacht bei 8°C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Denaturierungslösung (Fix Denat, BrdU Kit Roche, Mannheim Deutschland) pro Well denaturiert, um eine optimale Nachweisreaktion des in die DNA eingelagerten BrdUs zu bekommen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Denaturierungslösung wieder gründlich durch Abklopfen der 96-Well Mikrotiterplatte entfernt. Dann wurden 100 µl BrdU POD working solution (BrdU Kit Roche, Mannheim, Deutschland) pro Well hinzugegeben und die 96- Well- Mikrotiterplatte wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit wieder durch gründliches Abklopfen aus der 96- Well- Mikrotiterplatte entfernt. Nun wurde die 96- Well- Mikrotiterplatte dreimal mit jeweils 300 µl Washing Solution (BrdU Kit Roche, Mannheim, Deutschland) pro Well gewaschen. Anschließend wurde nach gründlichem Abklopfen der Platte 100 µl Substrate Solution (BrdU Kit Roche, Mannheim, Deutschland) pro Well hinzugegeben. Die 96- Well- Mikrotiterplatte wurde anschließend 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 25 µl H₂SO₄ Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) (Konzentration: 1Mol/l) pro Well abgestoppt und die Farbreaktion innerhalb von 5 Minuten im ELISA Reader (BioRad Model 550) registriert. Zur Auswertung wurde eine Excel Tabelle angelegt und von allen Messwerten der Leerwert abgezogen. In der grafischen Auswertung, die ebenfalls in Excel durchgeführt wurde, wurden die Ansätze auf der Abszisse und die Werte der optischen Dichte (OD) auf der Ordinate aufgetragen und ein Balkendiagramm erstellt.

2.4.2 IN VITRO MIGRATIONS ASSAY

Eine elegante und einfache Methode um zelluläre Migration zu messen, stellt der so-geannte Scratch Assay dar [63] [64]. Das Prinzip besteht darin Zellen so auszusäen, sodass sie einen konfluenten Zellrasen bilden. Anschließend wird dieser Zellrasen mit einer 200 µl Pipettenspitze „verletzt“. Dadurch entsteht ein linienförmiger zellfreier Bereich. Ähnlich, wie bei einer natürlichen Wundheilung in vivo, verursacht diese Entfernung von Zellen in vitro, dass die unmittelbar an den zellfreien Bereich angrenzenden Zellen beginnen, in diesen zellfreien Bereich zu wandern. Um die Migration zu untersuchen, wurden MHEC5-T Endothelzellen in einer 24-Well- Platte (Corning, USA) in einer Menge von 150.000 Zellen pro Well in 1 ml MHEC- Kulturmedium ausgesät und für 24 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor dem Aussäen der Endothelzellen wurde auf der Unterseite der 24- Well- Platte mit wasserfestem Markierungsstift eine Markierung angebracht, die als schwarze Linie in der Mitte aller Wells sichtbar war. Nach dem Aussäen der Endothelzellen und der 24- stündigen- Inkubation der 24- Well- Platte im Inkubationsschrank, wurde die 24- Well- Platte unter dem Mikroskop angeschaut, um zu überprüfen,

ob der Zellrasen konfluent ist. Anschließend wurde der Scratch durchgeführt, indem eine 200 µl Pipettenspitze senkrecht zur schwarzen Markierung über den Zellrasen gezogen wurde. Dann wurde jedes Well einmal mit 1 ml PBS (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gewaschen. Nun wurden Überstände von dendritischen Zellen (DCs) und MHEC Medium in einem Verhältnis von 75% Überstand und 25% MHEC Medium zu den Endothelzellen hinzugegeben. Anschließend wurden Bilder am Mikroskop (Zeiss Axiovert 200) direkt nach Zugabe von MHEC Medium und Überständen von dendritischen Zellen zum Zeitpunkt 0, sowie nach mehreren Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ gemacht. Der späteste Zeitpunkt, an dem Bilder gemacht wurden war nach 8 Stunden. Es wurde das 2,5 x Objektiv verwendet. Als Orientierung für die Bilder diente die schwarze Linie auf der Unterseite der 24- Well- Platte, die in der Mitte der Wells sichtbar war. Pro Well wurden jeweils mehrere Bilder (Zeiss AxioCam MRm) aufgenommen. Ausgewertet wurden die Bilder mithilfe der Zeiss Axiovision Software (Axio Vs40 V 4.8.2.0), die auch für die Aufnahme der Bilder verwendet wurde. Bei der Auswertung wurde ausgehend von der schwarzen Linie auf der Unterseite der Wells eine Fläche mit 1000 µm Längsdurchmesser ausgemessen. Anschließend wurde die Flächen-differenz bestimmt und mithilfe einer Excel Tabelle berechnet. Das Ergebnis wurde grafisch in Excel als Balkendiagramm dargestellt, mit den einzelnen Ansätzen auf der Abszisse und der überwachsenen Fläche in % der Kontrolle auf der Ordinate. Als Kontrolle diente Zellkulturmedium für DCs.

2.4.3 IN VITRO TUBE FORMATION ASSAY

Ein Charakteristikum von Endothelzellen besteht darin, dass sie spontan beginnen röhrenförmige Strukturen (Tubes) zu bilden, wenn sie auf eine rekonstituierte extrazelluläre Matrix (Matrigel) ausgesät werden [65]. Dabei treten die ersten Tubes schon nach 1-2 Stunden Inkubation auf und finden je nach Art der Endothelzellen nach ungefähr 24 Stunden ihre endgültige Gestalt [65]. Besonders viele extrazelluläre Matrixproteine sind in der extrazellulären Matrix des Engelbrecht Holm Swarm Maus Sarkoms enthalten [66], die kommerziell als Matrigel erworben werden kann. Beim 2D in vitro Tube Formation Assay wurde folgendermaßen vorgegangen: Matrigel (Corning/BD Biosciences, Bedford,

USA) wurde über Nacht auf Eis in einer mit Eis gefüllten Styroporbox im Kühlraum bei 4°C Umgebungstemperatur aufgetaut. Für weitere Versuche wurde beim ersten Auftauen das Matrigel aliquotiert und die Aliquots bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Mindestens 30 Minuten vor dem Versuch wurden eine 48- Well- Platte (Corning, USA), sowie 1000 µl Pipettenspitzen bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Für den Versuch wurde die 48- Well- Platte aus dem Gefrierschrank auf eine zuvor unter die Sterilbank gebrachte Styroporbox mit Eis gebracht, sodass sie ständig gekühlt wurde. Unter der Sterilbank wurde sie steril aus der Verpackung entnommen und direkt auf das Eis gestellt. Anschließend wurde das über Nacht aufgetaute Matrigel ebenfalls unter die Sterilbank gebracht und dort auf Eis gelagert. Jeweils 150 µl Matrigel wurde pro Well der 48-Well-Platte hinzugegeben. Im Matrigel vorhandene Luftblasen wurden vorsichtig mit einer 100 µl Pipette entfernt. Anschließend wurde die 48- Well- Platte bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubationsschrank für mindestens 30 Minuten gelagert. Währenddessen wurde die Zellkultur mit MHEC5-T Endothelzellen gesplittet (Siehe Abschnitt 2.2.1). Nach dem Zentrifugieren wurde mit MHEC5-T Medium mit 1% FCS (Gibco, New York, USA), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, St. Louis, USA) und 1% L-Glutamin (Gibco, Paisley, UK) resuspendiert, sodass 10⁶ Endothelzellen pro Milliliter Medium vorhanden waren. Anschließend wurden in einem neuen 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) 6 ml MHEC Medium mit 1% FCS vorgelegt. 1 Milliliter Suspension, also 10⁶ MHEC5-T Zellen wurden zu den 6 Millilitern hinzugegeben. Dann wurde die Endothelzellsuspension, beziehungsweise die Überstände zum Matrigel hinzugegeben. Dazu wurden pro Well 75% DC Überstand (210 µl) und 25% Endothelzellsuspension (70 µl) hinzupipettiert. Am Mikroskop (Zeiss Axiovert 200) wurden mit dem 2,5 x Objektiv zu verschiedenen Zeitpunkten Bilder aufgenommen (Zeiss AxioCam MRm). Die Auswertung erfolgte in ImageJ (NIH), indem die Länge der einzelnen Tubes vermessen wurde. Dazu wurde zunächst einmal die Skalierung in ImageJ eingetragen. Da die Bilder mit dem 2,5 x Objektiv aufgenommen wurden, entsprechen 2,41 µm einem Pixel. Anschließend wurden mithilfe des ROI Managers alle Tubes der Länge nach vermessen. Danach wurde eine Datentabelle mit den Messwerten der Einzelmessungen erzeugt. Die Daten

der Einzelmessungen wurden in eine Excel Tabelle kopiert und die Gesamtlänge aller Tubes ermittelt. Das Ergebnis wurde grafisch in Excel als Balkendiagramm dargestellt mit den Ansätzen auf der Abszisse und der Gesamtlänge aller Tubes (Total Tube Length) in μm auf der Ordinate.

2.5 MOLEKULARBIOLOGIE UND PROTEINBIOCHEMIE

Darüber hinaus wurde das konditionierte Zellkulturmedium der Zellkultur mit DCs sowie die DCs selbst auch im Hinblick auf verschiedene potenziell in der Angiogenese relevante Proteine untersucht. Hierzu wurde zum einen ein Proteome Profiling durchgeführt. Darüber hinaus wurden aber auch konventionelle ELISAs durchgeführt. Weiterhin wurde mittels Real- Time- PCR untersucht welche mRNAs potenziell eine Rolle bei der DC vermittelten Angiogenese spielen können. Hierzu wurde RNA aus den auf verschiedene Art und Weise stimulierten DCs zunächst isoliert und dann im weiteren Verlauf in cDNA transkribiert und mittels PCR amplifiziert und analysiert.

2.5.1 HERSTELLUNG VON ZELLLYSATEN

Die Herstellung von Zelllysaten erfolgte, indem zunächst einmal die Knochenmarkszellen geerntet und dann als nächstes zentrifugiert wurden. Die Zentrifugation erfolgte mit 450 g für 5 Minuten bei 4°C. Anschließend wurde das Zellkulturmedium verworfen und das Pellet in eiskaltem PBS resuspendiert. Dann erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt mit 450 g für 5 Minuten bei 4°C. Als nächster Schritt wurden die Zellen lysiert. Hierzu wurde ein Cell Extraction Buffer hinzugegeben (100 μl pro 500.000 Zellen). Die Lysate wurden dann in neue Eppis überführt. Anschließend wurde einmal gevortext. Dann wurden die Lysate für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Behandlung mittels Ultraschall (2 x 8 Sekunden). Dann erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (13.000 g für 10 Minuten bei 4°C). Die Lysate wurden dann in neue Eppis überführt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

2.5.2 PROTEOME PROFILING

Beim Proteome Profiling wurde auf ein kommerziell erhältliches Kit von RnD-Systems zurückgegriffen (Proteome Profiler Array, Mouse Angiogenesis Array Kit, Cat No. ARY015). Das Vorgehen war wie in der Herstelleranleitung

beschrieben. Wie stark ein bestimmtes Protein in einem bestimmten Versuchsansatz vorhanden war, wurde mittels Pixeldichte analysiert. Anhand der Untersuchungsergebnisse beziehungsweise der Expression der verschiedenen Proteine wurden dann wiederum stark regulierte Proteine ausgesucht, die weiter mittels konventionellem ELISA untersucht wurden. Beim Proteome Profiling wurden sowohl Zellkulturüberstände von DCs als auch Lysate von DCs verwendet. Dabei wurden sowohl normoxische als auch hypoxische DCs untersucht. Außerdem wurden unstimulierte und LPS stimulierte DCs untersucht.

2.5.3 KONVENTIONELLER ELISA

Zwei im Proteome Profiling beziehungsweise in der Real- Time- PCR auffällig stark regulierte Proteine, FLT-1 sowie CXCL10 wurden weiter mittels konventionellem ELISA untersucht. Das Vorgehen war dabei wie in der Herstelleranleitung beschrieben. Beim FLT-1 ELISA wurde ein konventionell erhältliches Kit von RND- Systems verwendet, dass FLT-1 mittels Sandwich-ELISA detektieren konnte (Cat. No. MVR 100). Beim CXCL10- ELISA wurde ein konventionell erhältliches Kit von Thermo Fisher (Mouse CRG-2 (CXCL10) ELISA Kit, Kat No. EMCXCL10) verwendet. Auch hier erfolgte die Detektion des CXCL-10 mittels Sandwich- ELISA. In beiden Fällen erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm in Excel mit den Ansätzen auf der Abszisse und der Proteinkonzentration auf der Ordinate.

2.5.4 RNA- ISOLATION

Die RNA Isolation erfolgte mittels konventionell erhältlichem Isolations- Kit von Qiagen. Zunächst wurden die Knochenmarkszellen mit der Pipette geerntet und mittels Zählkammer gezählt (C-Chip DHC-N01 Digital Bio, NanoEnTek Inc., Korea). Dann wurden die Zellen zentrifugiert (300 g für 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und zum Zellpellet wurde ein spezieller Puffer (RLT, Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Empfehlung des Herstellers hinzugegeben. Dann wurden die Zellen mittels Aspiration durch eine feine Injektionsnadel (27 G B.Braun, Melsungen, Deutschland) unter mechanischen Stress gesetzt. Dann wurde dasselbe Volumen 70% Ethanol (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) wie Puffer zu den Zellen hinzugegeben und in ein spezielles Röhrchen (RNeasy Mini spin column) gegeben. Dann erfolgte die

Zentrifugation mit 8000 g für 15 Sekunden. Im Anschluss erfolgte ein Aufreinigungsschritt. Hierzu wurde 350 µl Puffer RW1 (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Röhrchen hinzugeben. Dann wurde für 15 Sekunden mit 8000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden 10 µl DNase (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 70 µl Puffer RDD (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Ansatz hinzugegeben. Dann erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 350 µl Puffer RW1 (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Ansatz hinzugegeben und dann für 15 Sekunden mit 8000 g zentrifugiert. Dann erfolgte die Zugabe von 500 µl RPE Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie eine erneute Zentrifugation. Diesmal mit 8000 g für 2 Minuten. Dann erfolgte ein Zentrifugationsschritt um die Silikatmembran des speziellen RNA-Isolationsröhrchens zu trocknen. Hierzu wurde mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Ablösung der RNA durch Zugabe von 30 µl RNase freiem Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie einem erneuten Zentrifugationsschritt mit 8000 g für 1 Minute. Die RNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Eine Überprüfung der RNA Qualität fand mittels Nano-Drop (Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland) statt. Für die weiteren Experimente wurde, wie in der Herstelleranleitung von Qiagen für das Proteome Profiling empfohlen, nur qualitativ hochwertige RNA mit einem 260/280 nm Absorptionsverhalten von 1,8- 2 sowie einem 260/230 nm Absorptionsverhalten von > 1,7 verwendet. Außerdem wurden die RNA- Proben noch in die Abteilung für Humangenetik geschickt zur Bestimmung der RNA- Integrität. Es wurde nur RNA mit einer RNA Integrität > 7 verwendet, wie ebenfalls in der Herstelleranleitung von Qiagen empfohlen.

2.5.5 REAL- TIME- PCR (QIAGEN RT2 PROFILER PCR ARRAY)

Bei der Real- Time- PCR wurde exakt nach den Angaben in der Anleitung von Qiagen zum RT2- Array vorgegangen (Cat No. 330171, CLAM 23203). Es wurden ausschließlich die von Qiagen empfohlenen Reagenzien und Chemikalien, die mit dem Array mitgeliefert wurden, verwendet. Zunächst wurde aus der isolierten RNA eine cDNA hergestellt. Hierzu wurden die Reagenzien des RT2 First- Strand- Kit aufgetaut. Insgesamt wurde pro Ansatz 1 µg RNA eingesetzt. Dann wurde in einem ersten Schritt die genomische DNA eliminiert.

Zusätzlich wurde pro Ansatz 2 µl Puffer GE hinzugefügt. Das restliche Volumen wurde mit RNase freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Dann wurde der DNA-Eliminations- Mix für 5 Minuten bei 42°C inkubiert. Im Anschluss fand eine reverse Transkription der vorhandenen RNA in DNA statt. Hierzu wurden pro Ansatz 10 µl Reverse Transkriptase Mix bestehend aus 4 µl Puffer BC3, 1 µl Kontrolle P2, 2 µl Reverse Transkriptase Mix und 3 µl RNase freiem Wasser hinzugegeben. Dann wurde zu den 10 µl Reverse Transkriptase Mix 10 µl des DNA- Eliminations- Mix hinzugegeben. Im Anschluss wurde dann bei 42°C für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten abgestoppt. Dann wurden 91 µl RNase freies Wasser hinzugegeben und alles wurde bis zur Durchführung der PCR bei -20°C gelagert. Für die eigentliche PCR-Reaktion wurde der RT2- Mastermix aufgetaut und zusammen mit der cDNA sowie RNase freiem Wasser zu den einzelnen Wells des RT-2 Assays hinzugegeben. Jeweils 10 µl Gesamtvolumen wurde pro Well hinzugegeben. Insgesamt wurde mit 384- Well- Platten gearbeitet. Dann wurden die 384- Well-Platten auf Eis gelagert bis zur weiteren Verwendung im Cyclyer. Dort wurde ein Programm ausgewählt mit initial 10- minütiger Inkubation bei 95°C mit daraufhin folgenden 45 Zyklen die aus 15 Sekunden Inkubation bei 95°C im Wechsel mit jeweils einer Minute bei 60°C bestanden. Die Analyse erfolgte mittels der von Qiagen im Internet bereitgestellten Webbrowser basierten Analyseplattform. Zuvor wurde mittels Roche Light- Cyclyer Software eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

2.6 IN VIVO ASSAYS ZUR UNTERSUCHUNG VON ANGIOGENESE

Da sich in einem in vitro Setting zusammenhängende und komplexe Vorgänge wie Angiogenese nur unvollständig und als Einzelschritte untersuchen lassen, sind in vivo Versuche unabdingbar, wenn in vitro gewonnene Daten überprüft werden sollen, oder der gesamte Mechanismus als solcher untersucht werden soll. Daher wurde zur genaueren Untersuchung der Rolle von dendritischen Zellen für die Angiogenese zwei in vivo Versuche durchgeführt. Zum einen wurde durch den Matrigel Assay ein Versuch, der die Wachstumsfaktor- induzierte Angiogenese untersucht, eingesetzt. Darüber hinaus wurde auch die Hypoxie

getriggerte Angiogenese mit der Hind Limb Ischämie untersucht. Das Vorgehen war dabei wie im Folgenden genauer erläutert wird.

2.6.1 IN VIVO MATRIGEL ASSAY

Beim in vivo Matrigel Assay macht man sich die Tatsache zunutze, dass Matrigel, die Extrazellulärschicht des Engelbrecht-Holm-Schwarm-Maus-Sarkoms, bei -20°C fest ist, bei 4°C flüssig und bei Temperaturen über 20°C wiederum fest wird [67]. Sobald einmal Temperaturen von > 4°C erreicht werden, kommt es zur irreversiblen Verfestigung des Matrigels. Ein wesentlicher Vorteil des in vivo Matrigel Assay gegenüber vielen anderen in vivo Angiogenese Assays ist, neben der Einfachheit der Durchführung, die Möglichkeit, verschiedenste pro- oder antiangiogene Stimuli, wie beispielsweise Proteine, Peptide, Zellen oder Hormone hinsichtlich ihres Effekts auf Angiogenese zu untersuchen. In diesem Fall wurden dazu dendritische Zellen zum Matrigel hinzugegeben. Als Kontrollgruppe diente Kulturmedium für dendritische Zellen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Die dendritischen Zellen wurden eine Woche vor der Injektion des Matrigels aus dem Knochenmark von gesunden C57/BL/6J Mäusen isoliert. Das Vorgehen dabei war, wie bereits oben beschrieben. Das Zellkulturmedium in der 6-Well-Platte (Corning, USA) wurde jeden zweiten Tag erneuert. Am Tag 6 wurden die Zellen durch kräftiges Abspülen mit dem auf der Platte befindlichen Kulturmedium geerntet. Die Suspension wurde in einen 50 ml Falcon (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) überführt. 10 µl wurden zu einer Zählkammer (C-Chip DHC-N01 Digital Bio, NanoEnTek Inc., Korea) gegeben und die Zellen wurden am Mikroskop ausgezählt. Der 50 ml Falcon mit der Zellsuspension wurde mit 336 g für 5 Minuten zentrifugiert (Hereaus Multifuge 3S+). Das Zellpellet wurde so resuspendiert, dass 1 Million Zellen pro Milliliter vorhanden waren. Die Zellsuspension wurde in einem Volumen von 2-3 ml pro Well in eine neue 6-Well-Platte (Corning, USA) ausgesät. Die Hälfte der Wells wurde mit 1 µg LPS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) pro Milliliter Kulturmedium stimuliert, die andere Hälfte wurde unstimuliert belassen. Die 6-Well-Platte wurde für 24 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder, wie beschrieben, mit der Pipette geerntet und die Zellsuspension in einen 50 ml Falcon (Greiner Bio One,

Frickenhausen, Deutschland) überführt. Es wurde wieder mithilfe von Trypanblau und der Zählkammer (C-Chip DHC-N01 Digital Bio, NanoEnTek Inc., Korea) die Anzahl an dendritischen Zellen bestimmt. Nach der Zentrifugation mit 336 g für 5 min (Hereaus Multifuge 3S+) wurde das Zellpellet so resuspendiert, dass 2 Millionen dendritische Zellen pro 100 µl Zellkulturmedium vorhanden waren. Für die Matrigel Injektionen wurde eine 10 ml Flasche Matrigel (Corning/BD Biosciences, Bedford, USA) wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben aufgetaut, in 1,25 ml Eppendorf Cups aliquotiert und bei -20°C bis zum Abend vor dem Versuch gelagert. Die für einen Versuch benötigten Aliquots wurden, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, über Nacht aufgetaut. Die für die Matrigel Injektion benötigten 2 ml Spritzen (B.Braun, Melsungen, Deutschland), sowie die Injektionskanülen (BD Biosciences, Irland) wurden ebenfalls mindestens 30 Minuten bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Injektion wurden die auf Eis in einer Styroporbox gelagerten Aliquots unter die Sterilbank gebracht und dort geöffnet. Zu jedem Aliquot wurden 1,25 µl Heparin (10.000U/ml) (B.Braun, Melsungen, Deutschland) sowie entweder 100 µl Zellsuspension mit stimulierten oder unstimulierten dendritischen Zellen hinzugegeben. Als Kontrolle wurden 100 µl Kulturmedium für dendritische Zellen zum Matrigel hinzugegeben. Anschließend wurden die Eppendorf Cups verschlossen und mehrfach invertiert, um eine gute Durchmischung von Matrigel, Heparin und Zellsuspension respektive Kulturmedium für dendritische Zellen zu bekommen. Mithilfe einer 20G Nadel (BD Biosciences, Spanien) wurde das Matrigel langsam in die 2 ml Spritzen aufgezogen. Falls Luftblasen vorhanden waren, wurden diese sorgfältig durch Entlüften der Spritzen entfernt. Dann wurden die Spritzen auf Eis gekühlt in einer Styroporbox gelagert und zu den Tieren gebracht. Als Versuchstiere wurden 6-9 Wochen alte C57/BL/6J Mäuse verwendet. Die Tiere wurden mit Isofluran (CP Pharma, Burgdorf, Deutschland) in Narkose versetzt. Anschließend wurde mithilfe von Enthaarungscreme (Veet Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland) ein von Fell befreites, circa 1x1 cm langes quadratisches Fenster an der Bauchseite geschaffen. Dazu wurde die Creme mit Wattestäbchen aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 3-4 Minuten wurde die Creme durch kreisende Bewegungen mit dem Wattestäbchen entfernt. Anschließend wurde

die Narkosetiefe überprüft. Nur wenn die Tiere keine Reflexe mehr zeigten, wurde das Matrigel injiziert. Für die Injektion wurden die Matrigel gefüllten Spritzen vom Eis genommen und eine 27G Injektionskanüle (BD Biosciences, Irland) aufgesetzt. Anschließend wurde von medial und kaudal eingestochen und die Injektionskanüle nach kranial und lateral vorgeschoben. Die Nadel wurde dabei subcutan circa 0,5 cm vorgeschoben. Dann wurde das Matrigel langsam subcutan injiziert. Pro Tier wurden zwei Plugs mit jeweils 500 µl injiziert. Nach der Injektion wurden die Tiere wieder in ihre Käfige zurückgesetzt. Eine Woche nach der Injektion wurden die Tiere durch cervicale Dislokation getötet. Die Plugs wurden folgendermaßen entfernt: Von medial und kaudal kommend wurde mit der Schere bis in die Abdominalhöhle präpariert. Die Plugs wurden dabei vorsichtig ohne dabei eröffnet zu werden, umschnitten. Die Plugs samt umgebendem Gewebe wurden mit 20G Kanülen (BD Biosciences, Spanien) auf einer Styroporplatte festgepinnt. Anschließend wurde das die Plugs umgebende Gewebe mit der Schere entfernt. Die Plugs wurden mit OCT (Tissue Tek Sakura, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und mithilfe von Flüssigstickstoff für 5-10 Minuten eingefroren. Anschließend wurden sie bei -80°C gelagert. Am Kryotom (Leica) wurden 5 µm Schnitte von den Matrigel Plugs angefertigt. Dabei wurden insgesamt 24 Schnitte pro Plug angefertigt. Jeweils 3 konsekutive Schnitte pro Objektträger bei insgesamt 8 Objektträgern. Die Schnitte wurden bei -80°C bis zur Färbung gelagert.

2.6.2 IN VIVO HIND LIMB ISCHÄMIE

Mithilfe der Hind Limb Ischämie kann man Hypoxie getriggerte Angiogenese untersuchen. Dazu wird bei Mäusen ein operativer Eingriff durchgeführt, bei dem die Arteria femoralis communis vor Abgang der Arteria femoralis profunda ligiert wird. Am Versuchstag selbst wurden die Mäuse mittel Injektion eines Narkosecocktails aus Dexmedetomidin (Ratiopharm, Ulm), Midazolam (B.Braun, Melsungen) und Fentanyl (Rotexmedia, Trittau) betäubt. Die Dosis wurde gewichtsadaptiert gewählt. Anschließend fand die Enthaarung beider Hinterläufe mittels Enthaarungscreme (Veet Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland) statt. Als nächstes wurden die Mäuse für 5 Minuten auf einer Wärmeunterlage gelagert um sich der Umgebungstemperatur anzupassen, beziehungsweise, um

nicht auszukühlen. Dann wurden die Versuchstiere mittels Lasers Doppler Imaging (Moore LDI, Köln Deutschland) gescannt, um die Durchblutung der Hinterläufe zu evaluieren. Als nächster Schritt wurde dann nach oberflächlicher Desinfektion der Haut mit alkoholischem Desinfektionsspray (Softasept N, B. Braun, Melsungen) ein kleiner Hautschnitt im Bereich des enthaarten linken Hinterlaufs durchgeführt. Auch während der Operation wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert, um ein Auskühlen zu verhindern. Zum Schutz der Augen vor dem Austrocknen wurde Augensalbe (Pepanthen, Bayer, Leverkusen) auf die Augen aufgebracht. Nach dem Hautschnitt wurde die Wunde durch Spreizen mit der Schere stumpf erweitert. Die weitere Präparation erfolgte mittels feiner Pinzetten. Es wurde das die Gefäß- Nervenscheide umhüllende Bindegewebe stumpf zur Seite gedrängt. Dabei wurde gewebsschonend vorgegangen, sodass eine möglichst geringe Traumatisierung der Umgebungsstrukturen erfolgte. Ein besonderes Augenmerk wurde darauf verwendet das Gefäß- Nervenbündel zu schonen. Darüber hinaus wurde dann ebenfalls stumpf mit der Pinzette die Arterie vom parallel verlaufenden Nerven sowie der parallel verlaufenden Vene getrennt. Als nächstes erfolgte die Ligatur der Arterie mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene 8-0, Johnson&Johnson). Dann erfolgte nach gründlichem Spülen der Wunde mittels isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Deutschland) ein Hautverschluss mittels Einzelknopfnähten mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene 6-0, Johnson&Johnson). Dann erfolgte eine erneute Messung der Durchblutung im Bereich der Hinterläufe mittels Laser-Doppler- Flussmessung (Moore LDI, Köln, Deutschland). Hierzu wurden die Tiere erneut für 5 Minuten auf der Wärmematte gelagert. Dann wurde die Durchblutung der Hinterläufe mittels nichtinvasivem Laser- Doppler- Imaging (Moore LDI, Köln, Deutschland) untersucht. Nach Durchführung der nichtinvasiven Messungen wurde die Narkose durch gewichtsadaptierte Injektion eines Antagonisierungscocktails mit Flumazenil (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und Atipamazole (Le Vet B.V, Niederlande) aufgehoben. Zur Vermeidung von postoperativen Schmerzen wurde Buprenorphin (Indivior, Berkshire, UK) injiziert. Der perioperative Flüssigkeitsverlust wurde durch subkutane Injektion von 500 µl 0,9 % NaCl (Fresenius Kabi, Deutschland) und 5 % Glucose (Fresenius Kabi,

Deutschland) im Verhältnis 1:1 ausgeglichen. Nach dem Aufwachen aus der Narkose und nach genauer Inspektion der Mäuse um Belastungen festzustellen, wurden die Tiere wieder in die Haltungsräume zurückgebracht. Im weiteren Verlauf wurden die Tiere täglich gewogen. Darüber hinaus wurden Verlaufsuntersuchungen mittels Laser- Doppler- Scanner (Moore LDI, Köln, Deutschland) durchgeführt. Hierbei fanden Untersuchungen an den ersten vier Tagen nach der Operation statt. Nach vier Tagen wurden die Tiere getötet und die Muskeln, sowie Milz und Knochen asserviert und für weitere Analysen mittels Histologie und PCR eingefroren.

2.7 HISTOLOGISCHE METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON ANGIOGENESE

2.7.1 HÄMATOXYLIN EOSIN (H.E.) FÄRBUNG

Die Gewebsschnitte der Matrigel Plugs wurden mit einer Hämatoxylin- Eosin-Färbung gefärbt. Insgesamt wurden 5 Objektträger mit jeweils 3 konsekutiven Schnitten gefärbt. Zwischen den 3 konsekutiven Schnitten eines Objektträgers und den 3 konsekutiven Schnitten des nächsten Objektträgers wurde am Cryotom (Leica) ein Abstand von 500 µm im Matrigel Plug eingehalten. Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst für 30 Minuten unter den Abzug gelegt, damit die Schnitte auftauen und antrocknen können. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten in 4% Formalinlösung (Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Deutschland) fixiert. Dann wurden die Schnitte für 10 Minuten in Hämalaun (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt, nach einmaligem Spülen in Leitungswasser, wurde für 20 Minuten in fließendem Wasser gebläut, gefolgt von einem 3 Minuten andauernden Färbeschritt in Eosin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser folgten mehrere Entwässerungsschnitte. Dazu wurden die Schnitte jeweils für 5 Sekunden in 70%, 80%, 90% Ethanol (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) entwässert. Anschließend folgten zwei längere Entwässerungsschnitte, bei denen die Gewebsschnitte für 2 x 5 Minuten in 100% Ethanol (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) gehalten wurden. Abschließend wurden die Schnitte noch für 3 Minuten in Roti-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gebracht und danach mit Roti Histokit (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt.

2.7.2 PLANIMETRISCHE ANALYSE DER MATRIGEL- PLUGS AM MIKROSKOP

Die Auswertung der H.E. gefärbten Matrigel- Schnitte erfolgte am Lichtmikroskop (Nikon Optishot-2) mit einem 2 x Objektiv, einer Digital Sight DS-U1 Kamera und Nikon BR 3.2 Software mit ausgeklapptem Kondensator und ND4 Filter. Um die gesamte Schnittfläche des Matrigel Plugs aufzunehmen, wurde ein Bild aus mehreren Teilbildern am Computer zusammengesetzt. Die Auswertung erfolgte wie bereits in der Literatur beschrieben [68]. In der Bildanalyse wurde durch Definieren eines Schwellenwertes zwischen den im Matrigel Plug blau angefärbten Endothelzellen und dem aus Extrazellulärsubstanz bestehenden restlichen Matrigel Plug, beziehungsweise dem umgebenden Muskel- sowie Bindegewebe unterschieden. Die Schnittfläche des Matrigel Plugs wurde planimetrisch in der Nikon BR 3.2 Software vom restlichen Gewebe abgegrenzt. Anschließend wurde der prozentuelle Anteil blau gefärbter Zellen an der Querschnittsfläche des Plugs mithilfe der Nikon Software berechnet. Es wurde jeweils der qualitativ beste Gewebsschnitt jedes Objektträgers analysiert. Insgesamt wurden bei 5 Objektträgern Gewebsschnitte über eine Längsausdehnung von 2500 µm im Matrigel Plug analysiert, um zuverlässige Daten zur Angiogenese im Matrigel Plug zu bekommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 DCs UND HYPOXIE GETRIGGERTE ANGIOGENESE IN VIVO

3.1.1 DCs FÜHREN ZU MEHR ANGIOGENESE IN DER HYPOXIE-GETRIGGERTEN ANGIOGENESE IM HINDLIMB ISCHÄMIE MODELL

Um die Rolle von dendritischen Zellen für die Hypoxie- getriggerte Angiogenese zu untersuchen, wurde das so genannte Hindlimb Ischämie Modell gewählt. Als Mausmodell diente das DTR- Mausmodell, bei dem durch Injektion von Diphtherietoxin (DT) eine Depletion von CD11c positiven Zellen erzielt werden kann. Bei diesem Mausmodell wird der DT- Rezeptor vom Affen, der eine höhere Affinität zum Diphtherietoxin aufweist als der murine DT- Rezeptor, in allen CD11c tragenden Zellen exprimiert. Dadurch kommt es nach Injektion von Diphtherietoxin zu einer Zelldepletion der CD11c positiven Zellen in der Maus. Die Durchführung des operativen Eingriffs mit Ligatur der Femoralarterie ist bereits im Material- und Methoden- Teil beschrieben worden. Zusätzlich wurde am Tag nach dem operativen Eingriff eine Injektion von Diphtherietoxin bei allen Versuchstieren durchgeführt. Jeder Maus wurde gewichtsadaptiert Diphtherietoxin injiziert, jeweils 3 ng Diphtherietoxin pro Gramm Mausgewicht. Am Tag des operativen Eingriffs sowie an den Folgetagen wurden die Versuchstiere mittels Laser- Doppler- Scan untersucht. Als Kontrollgruppe dienten die Geschwistertiere der DTR positiven Tiere, die folglich den DT- Rezeptor nicht exprimieren. Allen Tieren, sowohl der Versuchsgruppe, als auch der Kontrollgruppe, wurde Diphtherietoxin injiziert. Zur Analyse wurde die Durchblutung im operierten Bein im Verhältnis zur Durchblutung im nicht operierten Bein gesetzt. Beim Vergleich der Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe fiel auf, dass in der Versuchsgruppe die Durchblutung im operierten Bein signifikant schlechter war als in der Kontrollgruppe. Ein deutlicher Effekt war bereits an Tag eins erkennbar, dieser Effekt war an den darauffolgenden Tagen noch weiter verstärkt. An Tag vier war der Unterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe statistisch signifikant. Aufgrund der im Experiment beobachteten Suszeptibilität der Tiere gegenüber Diphtherietoxin, trotz der vorbeschriebenen geringen systemischen Toxizität von Diphtherietoxin bei Mäusen, konnte der Versuch nur für insgesamt

vier Tage durchgeführt werden, weil im Anschluss die Belastung der Versuchstiere durch die Depletionsbehandlung zu groß wurde und der Versuch deshalb nach vier Tagen beendet werden musste. Als Schlussfolgerung lässt sich aus dem durchgeführten Experiment festhalten, dass DCs in der Hypoxie getriggerten Angiogenese im Hindlimb Ischämie Modell Angiogenese fördern können.

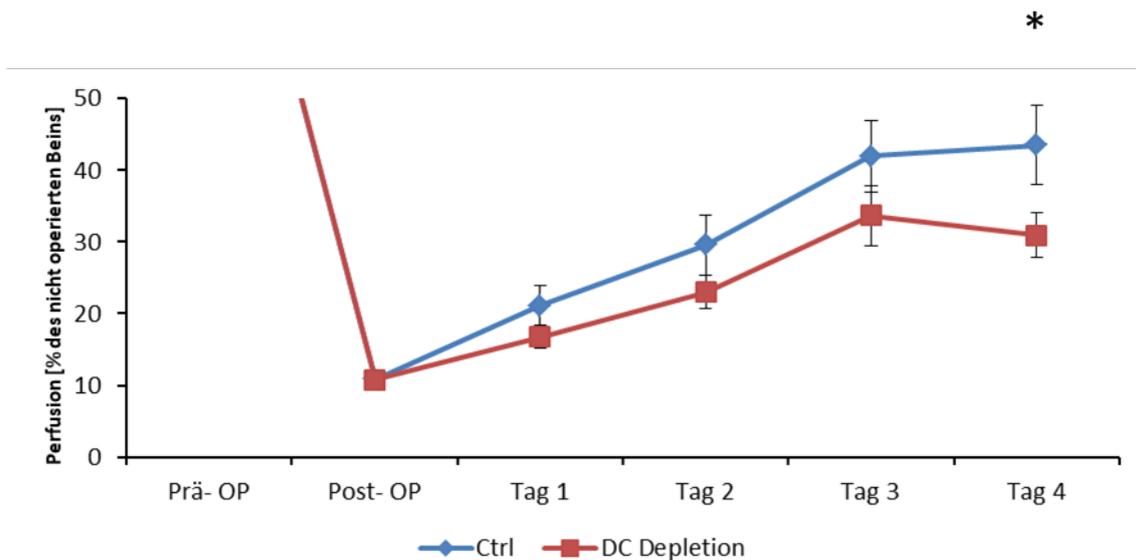


Abbildung 2: Laser Doppler Analyse aus dem Modell der Hind- Limb- operierten Mäuse.

Mäuse, die den DTR- Rezeptor auf CD11c positiven Zellen exprimieren, erhielten eine Ligatur im Bereich der Femoralarterie vor Abgang der Arteria profunda femoris. Die Durchblutung im Bereich der Hinterläufe wurde mittels Laser- Doppler gemessen. Es wurde die Durchblutung im operierten im Vergleich zum nicht operierten Bein dargestellt. Am Tag 1 nach der Operation erfolgte eine Injektion mit Diphtherietoxin (3 ng/g Maus) Dabei führte die Depletion von DCs zu einer signifikant schlechteren Durchblutung im operierten Bein in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (N= 11-12, *p < 0,05). Als Kontrollgruppe dienten die Geschwistertiere der DTR- Rezeptor exprimierenden Mäuse, die den Rezeptor nicht exprimieren.

Tabelle 1: Laser Doppler Analyse der Hindlimb- operierten Mäuse. Tabellarische Übersicht der mittels nichtinvasivem Laser- Doppler gemessenen Durchblutung am operierten Bein im Verhältnis zum nicht operierten Bein.

	Prä- OP	Post- OP	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
Kontrollgruppe	98,97	10,88	21,12	29,59	41,94	43,51
Standardabweichung	3,65	3,71	9,00	13,97	16,55	18,17
Standardabweichung des Mittelwertes	1,10	1,12	2,72	4,21	4,99	5,48
DC Depletion	99,44	10,81	16,76	23,00	33,67	30,89
Standardabweichung	5,31	4,22	5,00	7,58	13,85	10,40
Standardabweichung des Mittelwertes	1,60	1,27	1,51	2,29	4,18	3,13

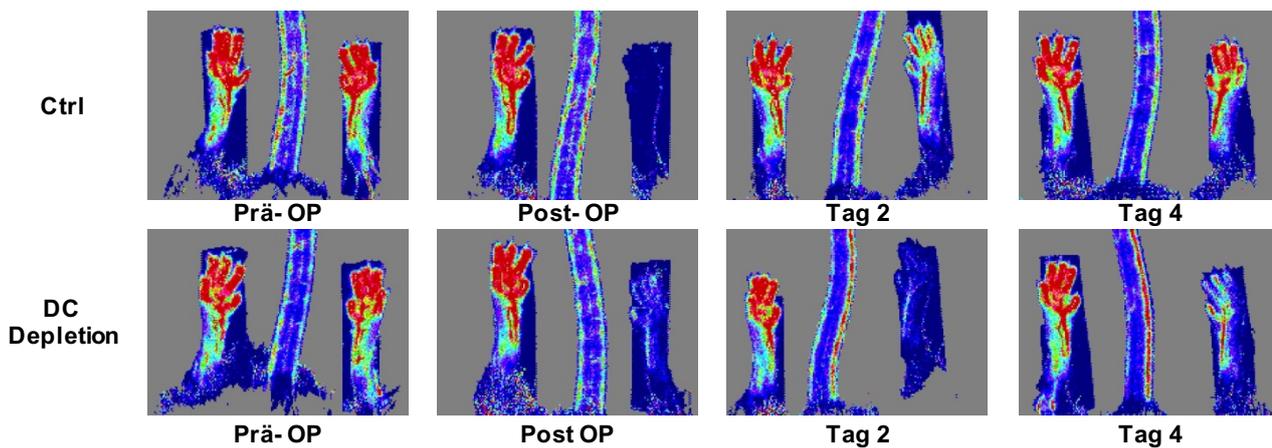


Abbildung 3: Repräsentative Bilder der nichtinvasiven Durchblutungsmessungen mittels Laser Doppler der Versuchsgruppe sowie der Kontrollgruppe.

3.2 DIE ROLLE VON DCs FÜR DIE WACHSTUMSFAKTOR INDUZIERTER ANGIOGENESE

3.2.1 DCs FÜHREN ZU MEHR ANGIOGENESE IN EINEM MODELL DER WACHSTUMSFAKTOR INDUZIERTEN ANGIOGENESE

Neben dem Hindlimb Ischämie Modell wurde die Rolle von DCs für die Angiogenese noch in einem zweiten in vivo Modell untersucht. Hierbei wurde das Matrigel- Modell gewählt. Die Durchführung war wie im Material- und Methoden- Teil beschrieben. Zum Matrigel wurden entweder Zellkulturmedium oder DCs

gegeben. Die Versuchstiere, denen Matrigel zusammen mit Zellkulturmedium injiziert wurde, dienten als Kontrollgruppe. Insgesamt wurden 10^6 DCs pro Matrigel- Plug injiziert. Zum Ausreifen der Zellen wurden diese zuvor für insgesamt 24 Stunden mit LPS ($1\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Eine Woche nach Injektion des Matrigels wurden die Versuchstiere getötet und die Matrigel- Plugs entnommen und histologisch aufbereitet. Es erfolgte eine Färbung der histologischen Schnitte. Die Analyse erfolgte, nachdem am Mikroskop Bilder angefertigt worden waren, standardisiert, mittels Computersoftware. Dabei wurde der Anteil der Endothelzellen pro Matrigel- Plug quantifiziert. Beim Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe fiel auf, dass die Zugabe von unreifen DCs zur signifikanten Erhöhung des Anteils an Endothelzellen führte. Für die Zugabe von reifen DCs konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die unreifen DCs für die beobachteten proangiogenen Effekte verantwortlich sind.

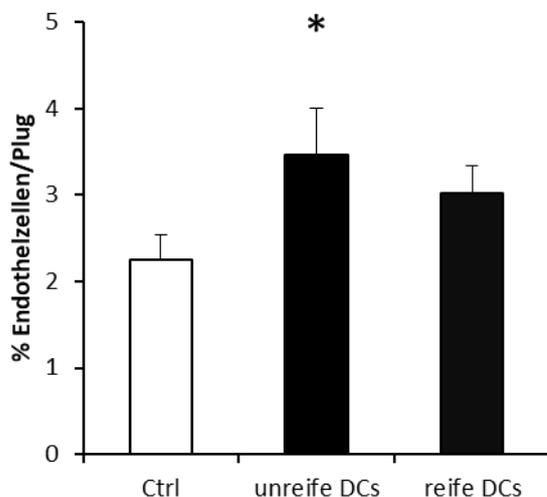
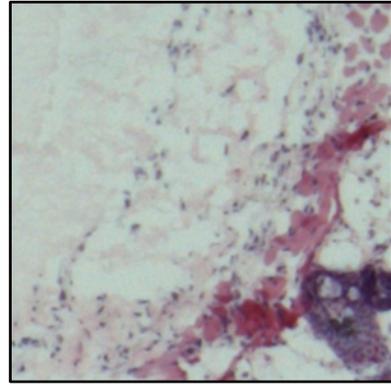
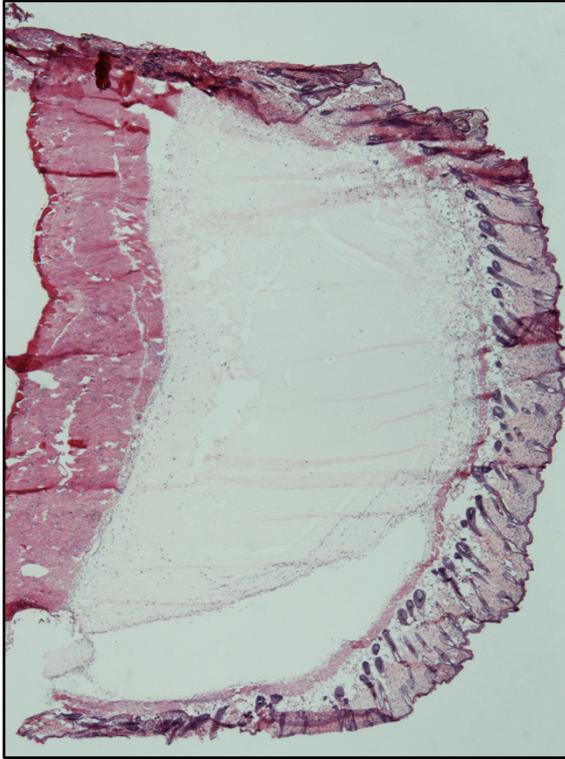


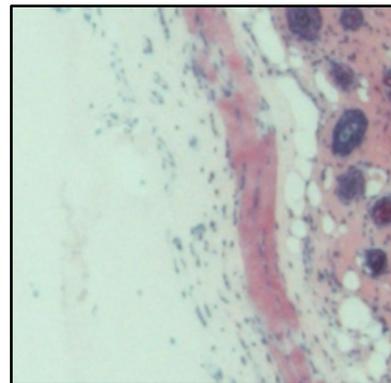
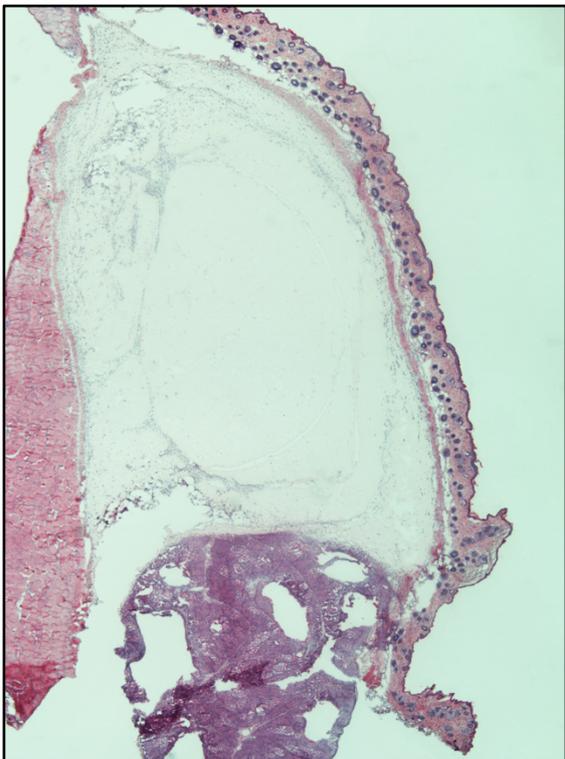
Abbildung 4: Unreife DCs führten zu einer signifikanten Zunahme von Endothelzellen im Matrigel.

Gesunden Versuchstieren (C57BL6) wurde Matrigel im Bereich der Bauchhaut injiziert. Zum Matrigel wurden zuvor entweder 10^6 unreife oder 10^6 reife, LPS stimulierte DCs, hinzugegeben. Die Matrigel Plugs wurden nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen aus den Mäusen, nachdem diese getötet worden waren, entnommen und histologisch analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Endothelzellen im Matrigel Plug nach 7 Tagen Inkubationszeit, wenn unreife DCs zum Matrigel hinzugegeben worden waren ($N= 9-11$, $*p < 0,05$). Als Kontrollgruppe diente DC- Zellkulturmedium.

A)



B)



C)

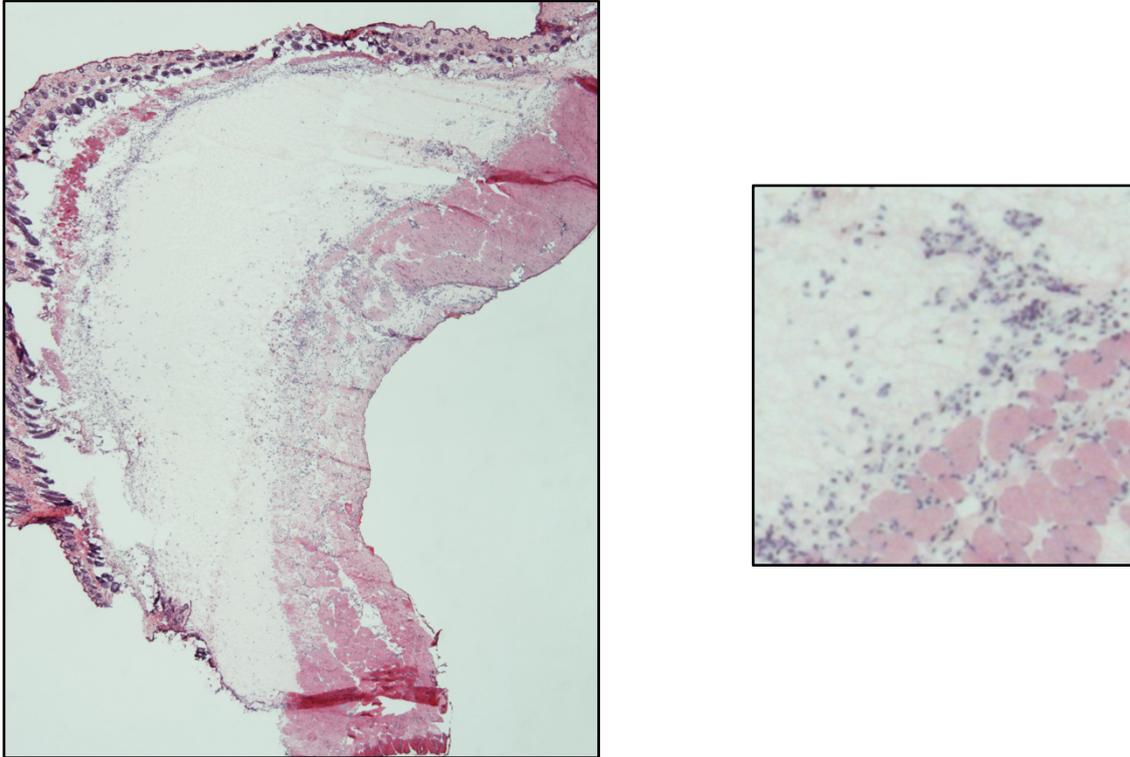


Abbildung 5: Beispielbilder der analysierten Matrigel- Plugs.

Die Auswertung erfolgte nach einem standartisierten computerbasierten Vorgehen. A) Zugabe von Zellkulturmedium zum Matrigel. B) Zugabe von einer Million unreifer DCs zum Matrigel. C) Zugabe von einer Million reifen DCs zum Matrigel

3.3 IN VITRO EXPERIMENTE

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der in vivo beobachteten proangiogenen Effekte von DCs zu untersuchen, wurden ergänzende in vitro Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Rolle von DCs auf die Proliferation, Migration und Tube Formation von Endothelzellen untersucht. Als Endothelzelllinie wurden MHEC5-T Zellen verwendet.

3.3.1 UNREIFE DENDRITISCHE ZELLEN FÜHREN ZU MEHR PROLIFERATION VON ENDOTHELZELLEN

Um zu untersuchen, ob DCs Proteine sezernieren können, die modulierend auf die Angiogenese einwirken können, wurde als nächstes der Effekt von konditioniertem Zellkulturmedium von DCs auf die Proliferation von Endothelzellen untersucht. Hierzu wurden die DCs zum einen unstimuliert belassen. Zum anderen wurde ein Teil der DCs unter hypoxischen

Kulturbedingungen kultiviert, da Hypoxie einen starken Trigger für Angiogenese darstellt [69]. Darüber hinaus wurde ein Teil der DCs zusätzlich für 24 Stunden mit LPS stimuliert, um die Ausreifung der Zellen zu fördern. Das konditionierte Zellkulturmedium wurde dann zu den Endothelzellen hinzugegeben, um mittels BrdU- Proliferations- ELISA die Proliferation der Endothelzellen zu untersuchen. Insgesamt wurden die Endothelzellen für 24 Stunden mit konditioniertem Zellkulturmedium von DCs inkubiert. Nach 24 Stunden wurde dann die Proliferation der Endothelzellen untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Proliferation von Endothelzellen in der Gruppe, die mit konditioniertem Zellkulturmedium von unreifen DCs koinkubiert worden war. Das konditionierte Zellkulturmedium von unreifen dendritischen Zellen, die zusätzlich mit Hypoxie behandelt worden waren, hatte keinen additiven Proliferationsfördernden Effekt zur Folge. Als Kontrollgruppen diente DC- Zellkulturmedium beziehungsweise DC- Zellkulturmedium mit LPS als Maturationsförderndem Faktor.

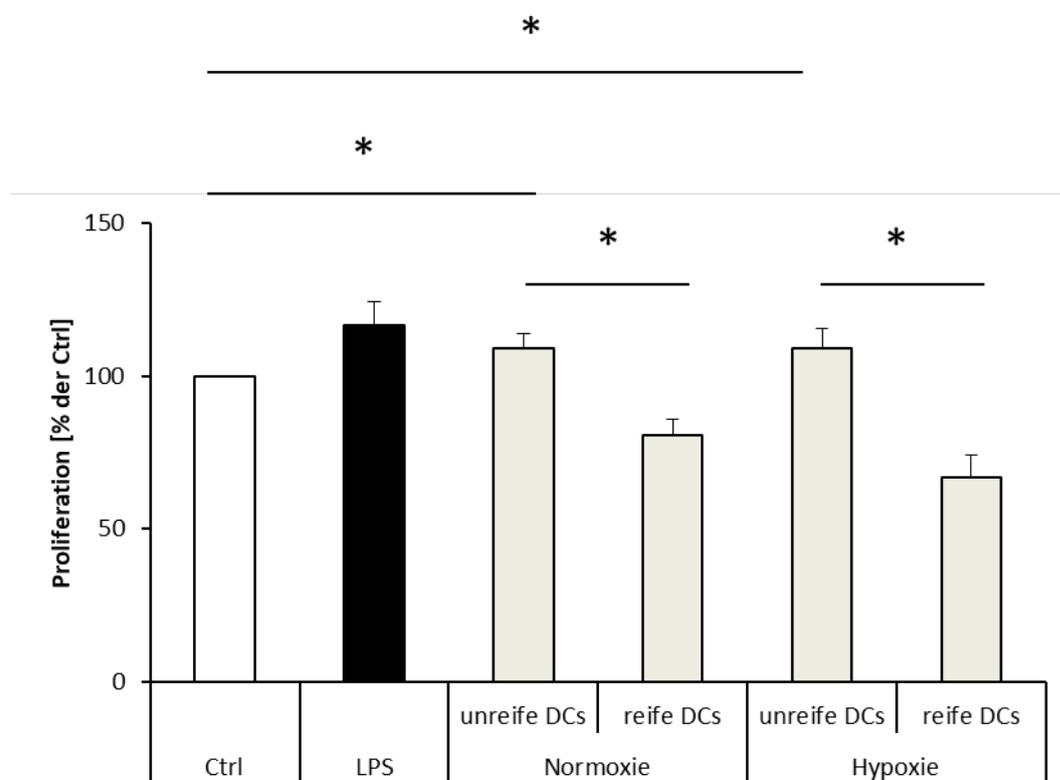


Abbildung 6: Zellkulturüberstand von unreifen DCs führt zu signifikant mehr Proliferation von Endothelzellen.

Konditioniertes Zellkulturmedium von murinen dendritischen Zellen, die entweder unstimuliert belassen wurden oder für 24 Stunden mit LPS (1 µg/ml) stimuliert worden sind, wurde zu murinen Herendothelzellen (MHEC 5- T) hinzugegeben. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich für 24 Stunden unter hypoxischen Umgebungsbedingungen kultiviert. Nach Zugabe des konditionierten Zellkulturmediums wurde die Proliferation der Endothelzellen nach insgesamt 24- stündiger Inkubation zusammen mit dem konditionierten Zellkulturmedium mittels BrdU- Proliferations-ELISA gemessen. Dabei fiel eine signifikante stärkere Endothelzellproliferation nach Zugabe von konditioniertem Zellkulturmedium von unreifen DCs auf. Die Zugabe von konditioniertem Zellkulturmedium von reifen DCs führte zu einer Abnahme der Endothelzellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als Kontrollgruppe diente Zellkulturmedium von murinen DCs (N= 7, *p < 0,05).

3.3.2 UNREIFE DENDRITISCHE ZELLEN FÜHREN ZU EINER GESTEIGERTEN ENDOTHELIALEN MIGRATION

Als weiteres in vitro Experiment wurde die Rolle von konditioniertem Zellkulturmedium von DCs auf die Migration von Endothelzellen untersucht. Als experimentelles Setting wurde der so genannte Scratch Assay verwendet. Dabei wurde, wie im Methodik- Teil beschrieben vorgegangen. Die Endothelzellen wurden insgesamt für 8 Stunden zusammen mit dem konditionierten Medium der DCs stimuliert. Es wurden dieselben Gruppen gewählt, wie im Proliferations-Experiment. Es wurde der Effekt von konditioniertem Zellkulturmedium von unreifen DCs und reifen DCs auf die Migration von Endothelzellen untersucht. Darüber hinaus wurde, wie zuvor bei der Untersuchung der Endothelzell-Proliferation beschrieben, als weitere Versuchsvariable ein Teil der DCs zuvor für 24 Stunden unter hypoxischen Umgebungsbedingungen kultiviert. Bei diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass das konditionierte Zellkulturmedium von unreifen DCs eine signifikante Verstärkung der Endothelzellmigration bewirkt.

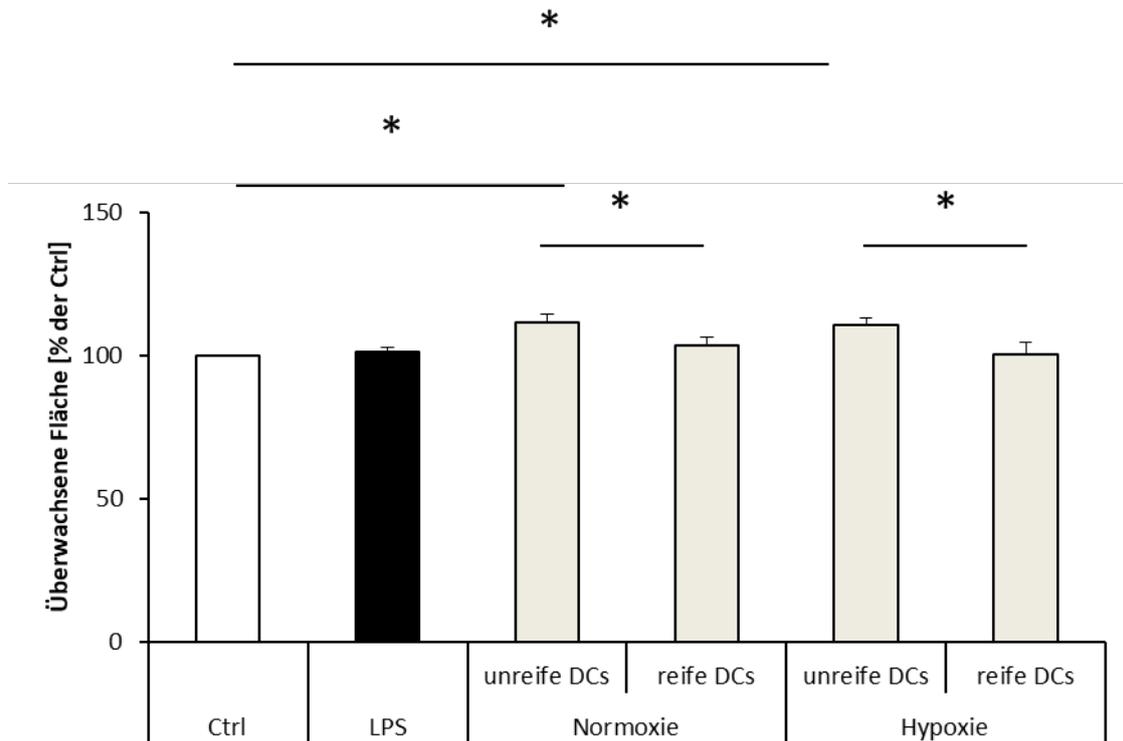


Abbildung 7: Zellkulturüberstand von unreifen DCs führt zu einer signifikanten Steigerung der Migration von Endothelzellen.

Murine Endothelzellen wurden in einer 24- Well- Platte ausgesät und inkubiert, bis ein konfluenter Zellrasen zu erkennen war. Dann wurde mit einer Pipettenspitze eine Wunde „Scratch“ im Zellrasen verursacht. Danach erfolgte die Zugabe von konditioniertem Zellkulturmedium von unreifen und reifen, LPS stimulierten DCs (Stimulation mit 1µg/ml LPS für 24 Stunden). Ein Teil der DCs wurde zusätzlich mit Hypoxie behandelt. Nach 8- stündiger Inkubation wurden Bilder gemacht und der Anteil der überwachsenen Fläche quantifiziert. Dabei konnte ein Migrationsfördernder Effekt der unreifen DCs beobachtet werden (N= 6-7, *p < 0,05)

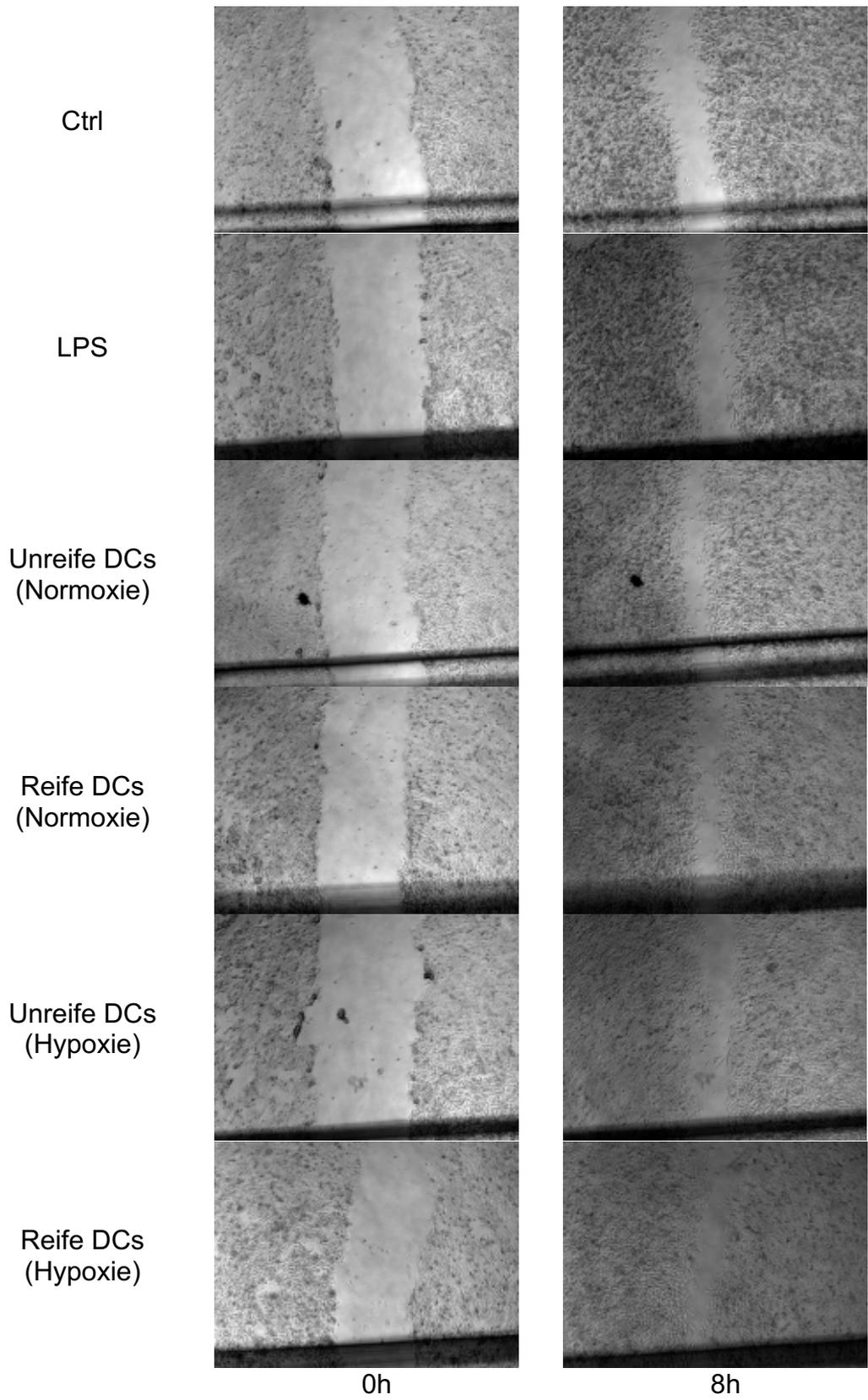


Abbildung 8: Repräsentative Bilder des Scratch Assays am Anfangszeitpunkt sowie nach 8-stündiger Inkubation mit den angegebenen Zellkulturüberständen von DCs.

3.3.3 UNREIFE DCs HABEN EINE TENDENZ DIE TUBE FORMATION VON ENDOTHELZELLEN ZU FÖRDERN

Darüber hinaus wurde auch untersucht, welchen Einfluss das konditionierte Zellkulturmedium von dendritischen Zellen auf die Tube Formation von Endothelzellen hat. Bezüglich der Versuchsgruppen wurde, wie bei der Untersuchung der Endothelzellproliferation und Endothelzellmigration bereits mehrfach beschrieben, vorgegangen. Bei diesem Experiment zeigte sich eine Tendenz, dass das konditionierte Zellkulturmedium von unreifen DCs die Tube Formation von Endothelzellen verstärkt, wenngleich der Effekt statistisch nicht signifikant war.

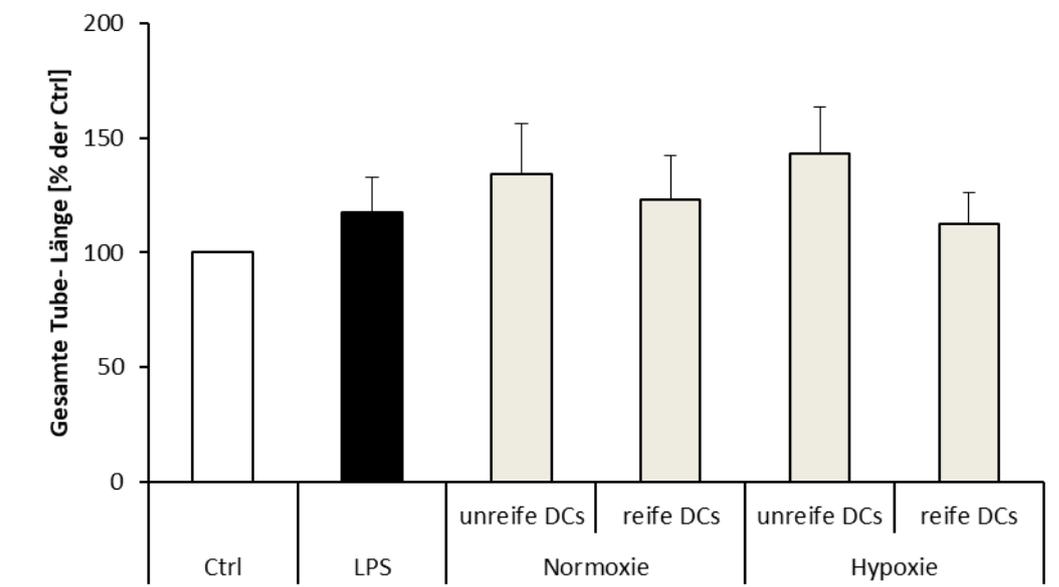


Abbildung 9: Unreife DCs haben eine Tendenz die Tube Formation von Endothelzellen zu fördern.

Matrigel wurde in vitro auf Eis in eine 48- Well- Platte gebracht. Dann wurden 30.000 murine Endothelzellen (MHEC 5-T) pro Well hinzugegeben. Darüber hinaus wurde konditioniertes Zellkulturmedium von murinen DCs die entweder unstimuliert belassen wurden oder zuvor für 24 Stunden mit LPS (1µg/ml) behandelt worden sind hinzugegeben. Ein Teil der DCs wurde außerdem zuvor unter hypoxischen Kulturbedingungen inkubiert. Nach 12 Stunden wurden Bilder am Mikroskop gemacht und die Länge der Tubes wurde gemessen (N= 6).

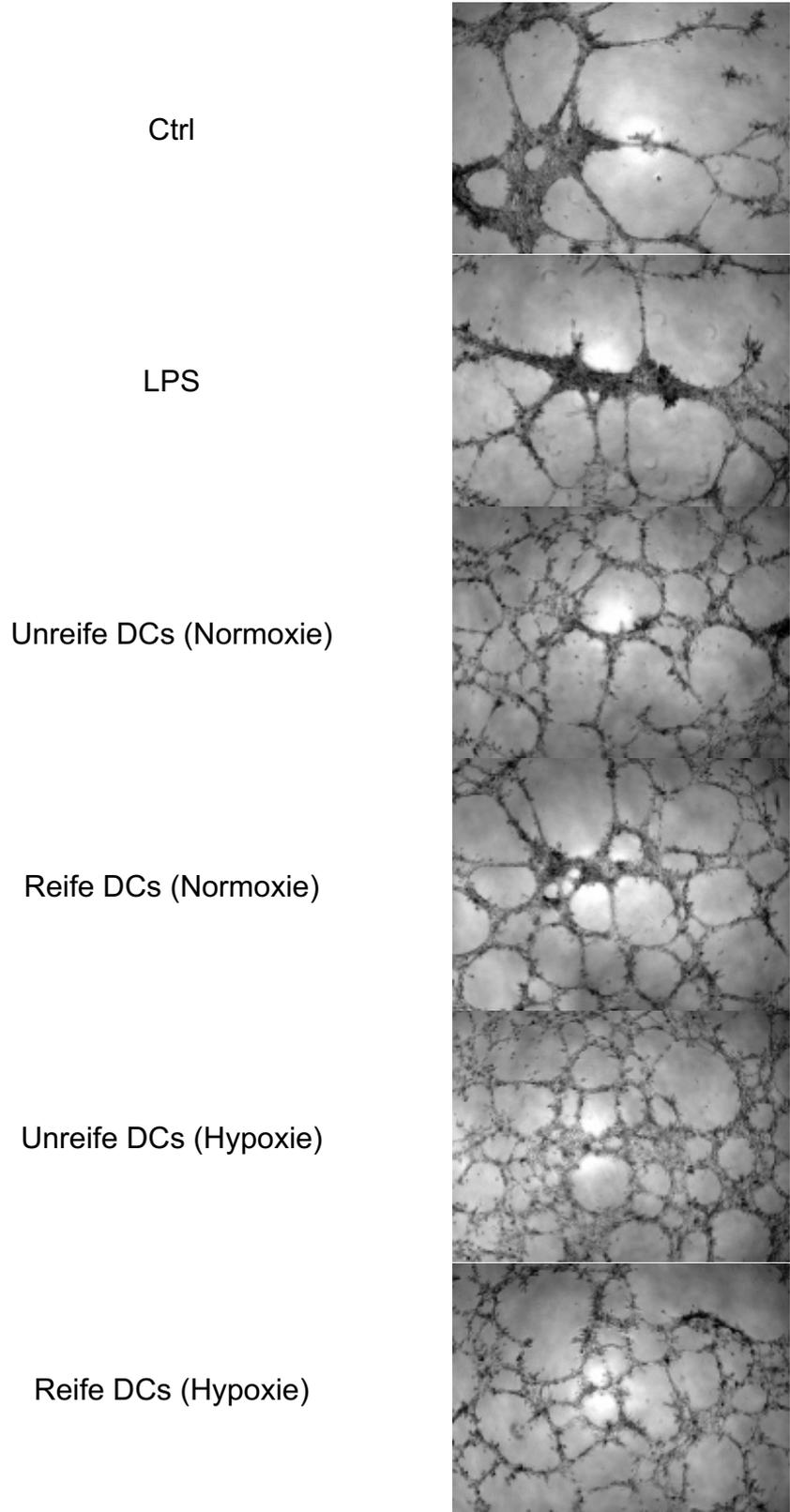


Abbildung 10: Repräsentative Bilder der Tube Formation nach 12- stündiger Inkubation mit den angegebenen Zellkulturüberständen von DCs.

3.4 PROTEOME PROFIL VON DCs

Als nächster Schritt wurde untersucht, welche Proteine bei den beobachteten Effekten beteiligt sein könnten. Hierzu wurde mittels eines konventionell erhältlichen Kits, welches ein Panel an pro- oder antiangiogen wirkenden Proteinen mittels semiquantitativem ELISA nachweisen kann, das konditionierte Zellkulturmedium und die Lysate der unstimulierten beziehungsweise LPS stimulierten DCs, die unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert worden waren, untersucht. Die Fragestellung, die in diesem Experiment untersucht werden sollte war, welche pro- oder antiangiogen wirkenden Faktoren von DCs in Abhängigkeit von der Stimulation ausgeschüttet werden.

3.4.1 DENDRITISCHE ZELLEN UND KONDITIONIERTES ZELLKULTURMEDIUM VON DENDRITISCHEN ZELLEN ENTHALTEN VERSCHIEDENE PRO- UND ANTIANGIOGEN WIRKENDE FAKTOREN

Um ein möglichst genaues Abbild zu bekommen, welche pro- und antiangiogenen Faktoren für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten wurden sowohl das konditionierte Zellkulturmedium als auch die Lysate der DCs untersucht. Es wurden die gleichen Versuchsgruppen wie in den zuvor beschriebenen Experimenten mit den Endothelzellen verwendet. Zum einen wurde konditioniertes Zellkulturmedium von DCs untersucht. Die DCs wurden entweder unstimuliert belassen oder, um eine Ausreifung der Zellen zu erzielen, für 24 Stunden mittels LPS (1µg/ml) stimuliert. Darüber hinaus wurde ein Teil der Zellen für 24 Stunden unter hypoxischen Umgebungsbedingungen (98% Stickstoff, 2% Sauerstoff) kultiviert. Anschließend wurden sowohl das konditionierte Zellkulturmedium als auch die Lysate auf pro- und antiangiogen wirkende Proteine hin untersucht. Die Auswertung des ELISAs erfolgte, indem die Pixeldichte pro jeweiligem Versuchsansatz gemessen wurde. Dies erfolgte computerbasiert und semiquantitativ. Je höher die Pixeldichte registriert wurde, desto mehr vom jeweiligen Protein wurde mittels ELISA detektiert. Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über die analysierten Proteine im Zellkulturüberstand beziehungsweise in den Lysaten.

Tabelle 2: Übersicht der Pixeldichte der einzelnen für die Angiogenese relevanten Proteine im DC Überstand im Proteom Profiler (N=2).

Protein	Normoxie		Hypoxie	
	unreife DCs	reife DCs	unreife DCs	reife DCs
ADAMTS1	10912,5	10578,5	10567,5	10623
Amphiregulin	12527,5	13408	11216	12613,5
Angiogenin	12667,5	12570,5	12055,5	12603,5
Angiopoietin- 1	11972,5	11055,5	11157,5	10921
Angiopoietin- 3	11300	10607	10615	10657,5
Coagulation Factor III	18825,5	12062	12357	12469
CXCL16	23178,5	22036,5	23092,5	22115
Cyr61	11316	10587	10784,5	10653
DLL4	11091	10524,5	10496,5	10797
DPPIV	13169,5	11627	13573	13023,5
EGF	11324	10545,5	10775,5	10678,5
Endoglin	11625,5	10799,5	11365,5	11024,5
Endostatin/ Collagen XVIII	13060	11618	12474	11674
Endothelin- 1	20697	20755	14554,5	19033,5
FGF acidic	12153,5	11336,5	11576	11704
FGF basic	13674	12058	11785	12387
KGF	12134,5	10908,5	11197	11528
Fractalkine	13842,5	12074,5	11656	14364,5
GM- CSF	24481,5	23628,5	23582	24258,5
HB-EGF	15803,5	12435,5	13601	13191,5
HGF	15476,5	11808	15867,5	13236
IGFBP- 1	12329,5	11215,5	12333,5	11604
IGFBP- 2	12204,5	11523,5	11211	11659
IGFBP- 3	11765	11034,5	11314	11134,5
IL1- alpha	12822,5	22196	11775	21692
IL1- beta	11858,5	13695	10903,5	15200,5

IL- 10	12468	13133	11618	14034,5
IP- 10	20521,5	23785,5	15392	23807,5
KC	16392	24559,5	14259	24088
Leptin	13276	12026	12398	12710,5
MCP- 1	23785,5	20187,5	23952,5	23012
MIP- 1a	22507,5	20267	23446	22753,5
MMP 3	11327,5	11664,5	11087,5	12326,5
MMP 8	19728,5	12930,5	18184,5	12965,5
MMP 9	22004	18437,5	18894	19381
NOV	22923	22160	22536	21259,5
Aosteopontin	22348,5	21626	22157	22351,5
PD-ECGF	13632	13632	12342	14818,5
PDGF- AA	18359,5	14220,5	16000,5	15317
PDGF- AB/PDGF- BB	18909	13693,5	16034,5	13846,5
Pentraxin- 3	24065,5	21568	23064,5	22077
platelet factor 4	24675,5	22465,5	23556,5	22898
PIGF- 2	23170,5	23170,5	21342,5	22434
Porlactin	12022	11386	11564,5	11280,5
Proliferin	12346,5	11038	11218	11755,5
SDF- 1	14216,5	12780,5	13234,5	14254,5
Srpin E1	23649,5	23734,5	21534	23319
Serpin F1	11121,5	11121,5	10589,5	10979
Thrombospondin- 2	11853	11069,5	10684,5	11247
TIMP- 1	18098,5	17590,5	13981	17262
TIMP_ 4	11914,5	11126,5	11089	11388
VEGF	10959	10905	10506,5	10940,5
VEGF-beta	10694,5	10550	10255,5	10187

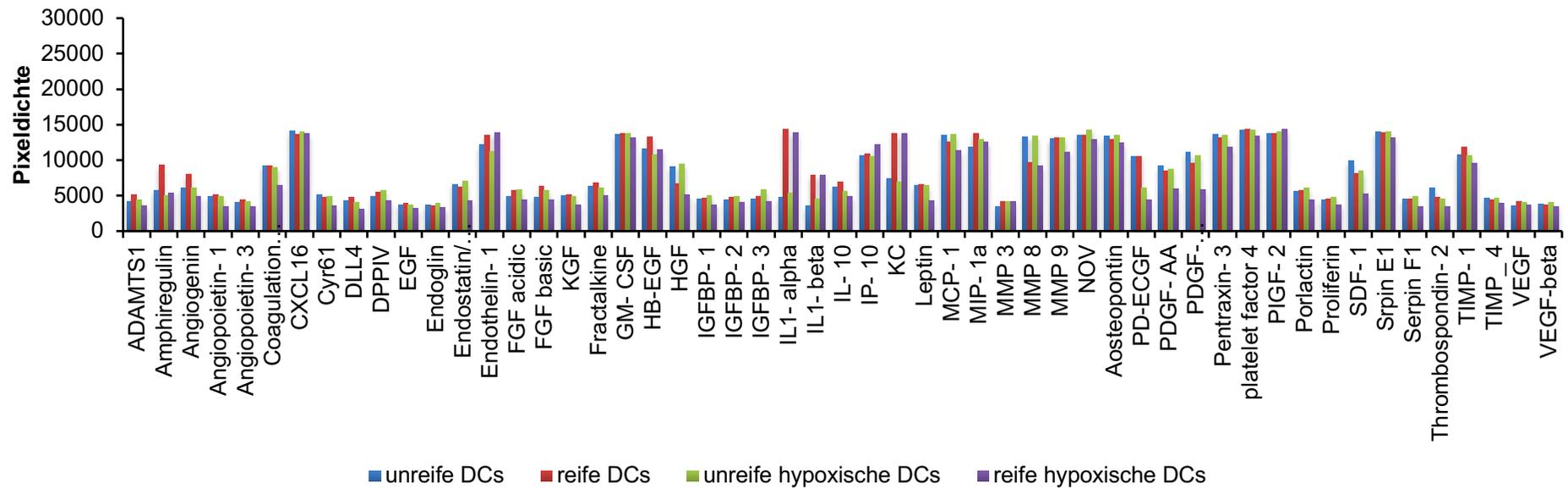


Abbildung 11: Im konditionierten Zellkulturmedium von dendritischen Zellen sind verschiedene pro- und antiangiogene Faktoren enthalte

Tabelle 3: Übersicht der Pixeldichte der einzelnen für die Angiogenese relevanten Proteine in den Lysaten der DC im Proteom Profiler (N=2).

	Normoxie		Hypoxie	
	unreife DCs	reife DCs	unreife DCs	reife DCs
ADAMTS1	10436	10531	10512	10309,5
Amphiregulin	9839	10093	10263	10169
Angiogenin	9828	9887	10653,5	10037,5
Angiopoietin- 1	10727	10690	10381	10669
Angiopoietin- 3	10204,5	10255	10111,5	10215
Coagulation Factor III	10015,5	10091,5	10294,5	11009,5
CXCL16	15578,5	16087,5	15791,5	16694,5
Cyr61	10342,5	10169	10180,5	10472
DLL4	10068,5	10138,5	9946,5	10227,5
DPPIV	14463,5	14966	14511,5	14447,5
EGF	9429	9425	9829,5	9547
Endoglin	9810	9916,5	9718	9911,5
Endostatin/ Collagen XVIII	10696,5	10846	10653,5	10605,5
Endothelin- 1	10374,5	10692	10761	11335
FGF acidic	10671,5	11597	10497	11158,5
FGF basic	11112	11089	10807	11498
KGF	10252,5	10092	10318,5	10660
Fractalkine	10143	10305,5	10114,5	10622
GM- CSF	13110,5	10846	11951	11028,5
HB-EGF	9959	10049	10275	10341
HGF	10674	10536	10772	10493
IGFBP- 1	10371	10411	10252,5	10516,5
IGFBP- 2	10137	10118,5	10065,5	10338,5
IGFBP- 3	9765	9876,5	9824	10095
IL1- alpha	14921	19674	14524,5	19409
IL1- beta	9678,5	12746	9693	13772

IL- 10	11018,5	10564	11275,5	11232
IP- 10	10408	13856,5	10119,5	16782,5
KC	9507,5	10689	9653	11602
Leptin	10168	10150	10316,5	10517
MCP- 1	15933,5	16601	15418	15458,5
MIP- 1a	15638,5	17209	15972,5	16799
MMP 3	9348	9402	9444,5	9510
MMP 8	10250	10228,5	10611,5	10434
MMP 9	16374,5	11891	16364	12221,5
NOV	15243	10427	13394,5	11175
Aosteopontin	19206,5	18376	20154	18559,5
PD-ECGF	14127	14127	10576	10931,5
PDGF- AA	10484	10540	10688	10734
PDGF- AB/PDGF- BB	10274,5	10247	10577	10604,5
Pentraxin- 3	11981	14303,5	12223,5	14678
platelet factor 4	17578	17053	18532,5	16277
PIGF- 2	10750	10750	10538,5	11220
Porlactin	10116,5	10064	10012,5	10412
Proliferin	10354	10305,5	10492	10680,5
SDF- 1	11413,5	11286	11737,5	12373
Srpin E1	10521,5	13255,5	11312	15586
Serpin F1	10333,5	10333,5	10591	10558,5
Thrombospondin- 2	9833,5	9698,5	9900,5	9955,5
TIMP- 1	10518,5	11471	10993	11836
TIMP_ 4	9896,5	9920,5	9905,5	10061
VEGF	9464,5	9564	9528,5	9643
VEGF-beta	10127,5	10254,5	10038	10135,5

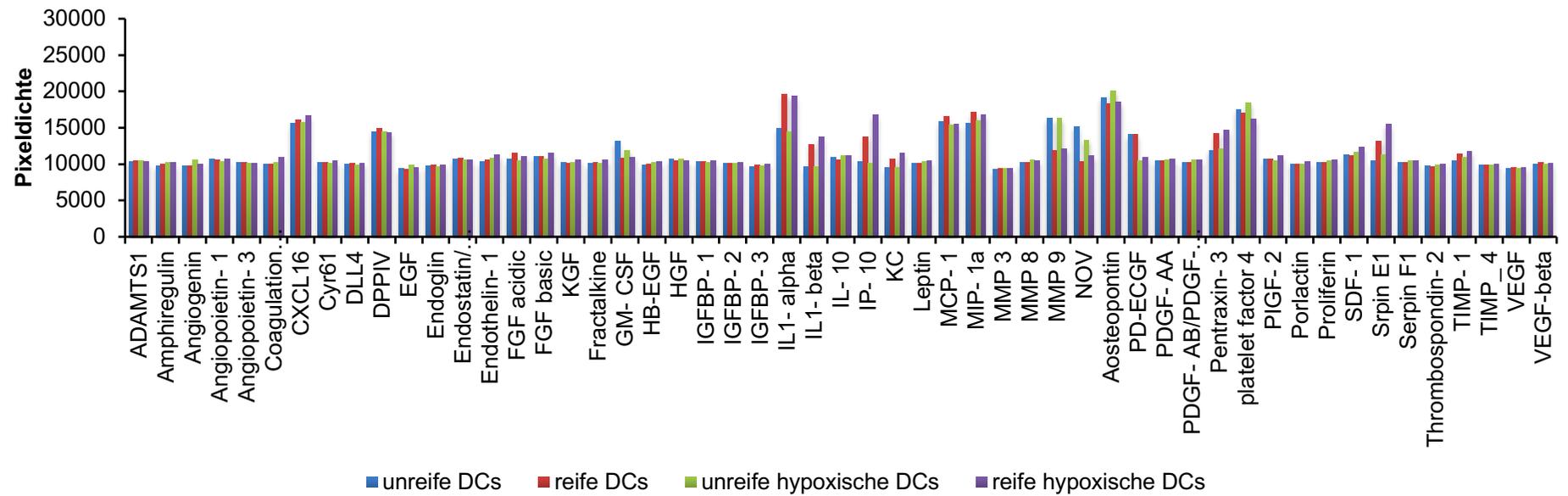


Abbildung 12: In den Lysaten von dendritischen Zellen sind verschiedene pro- und antiangiogene Faktoren enthalten

Im Zellkulturüberstand der unstimulierten DCs, wo sich ja nach Zugabe zu Endothelzellen eine Zunahme von Endothelzellproliferation und Migration gezeigt hatte, fand sich vermehrt HGF sowie MMP 8. HGF, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor ist ein bekannter proangiogener Faktor [70]. Matrixmetalloproteinase 8 ist ebenfalls ein potenter proangiogen wirkender Faktor. So war in einer experimentellen Studie die Proliferationsfähigkeit ebenso wie die Fähigkeit der Migration und Tube Formation nach Knockdown von MMP8 in HUVECS deutlich reduziert [71]. Passend hierzu fand sich auch in vivo eine deutliche Reduktion der Angiogenese [71]. Darüber hinaus fand sich hier auch eine vermehrte Expression von Endothelin 1, einem Protein, dem proangiogene Eigenschaften zugeschrieben werden [72]. Außerdem konnte IP 10 vermehrt im konditionierten Zellkulturmedium von reifen, LPS stimulierten DCs nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte unter hypoxischen Bedingungen eine Abnahme von IP10 im konditionierten Zellkulturmedium von unstimulierten DCs beobachtet werden. Thrombospondin hingegen war weder im konditionierten Zellkulturmedium noch in den Lysaten der LPS stimulierten DCs im Vergleich zu den unstimulierten DCs vermehrt vorhanden. Beiden Proteinen werden antiangiogene Eigenschaften zugeschrieben [73, 74]. Insbesondere bei IP10 ist bekannt, dass dieser Faktor ein sehr stark antiangiogen wirkendes Chemokin ist [75, 76]. Weiterhin war sowohl in den Zellkulturüberständen als auch in den Lysaten der LPS stimulierten reifen DCs eine vermehrte Expression von Interleukin 1- alpha und Interleukin 1- beta nachweisbar. Beiden Proteinen werden proinflammatorische und proangiogene Effekte zugeschrieben [77, 78]. Außerdem fand sich in den Lysaten in der Gruppe der unstimulierten DCs eine vermehrte Expression von MMP 9. MMP 9 spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Pankreaskarzinomen und wird im Verlauf der Karzinomentstehung vermehrt exprimiert [79]. Hierdurch kommt es dann zu mehr VEGF Bildung in den Inselzellen des Pankreasgewebes und damit zu proangiogenen Effekten [79]. Die folgende Tabelle soll nochmals einen tabellarischen Überblick über die vermehrt exprimierten pro- und antiangiogen wirkenden Proteine geben.

Tabelle 4: Im Proteome Profiling vermehrt in den Lysaten und im Zellkulturüberstand nachgewiesene Proteine

Protein	Name	Pro (+)/Antiangiogen (-)	Quelle
HGF	Hepatocyte-growth factor	(+)	[70]
MMP 8	Matrixmetalloproteinase 8	(+)	[71]
ET 1	Endothelin 1	(+)	[72]
IP10/CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	(-)	[73]
IL1 alpha	Interleukin 1 alpha	(+)	[77]
IL 1 beta	Interleukin 1 beta	(+)	[78]
MMP 9	Matrixmetalloproteinase 8	(+)	[79]

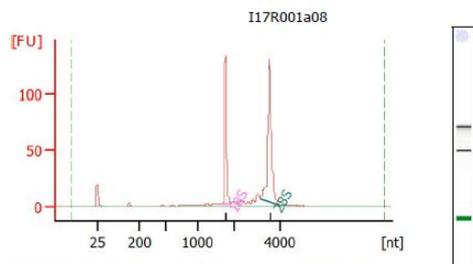
Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde dann weiter mittels Real- Time- PCR Array untersucht, wie sich die Expression von pro- und antiangiogen wirkenden Faktoren auf RNA Ebene zwischen den einzelnen Versuchsgruppen unterscheidet.

3.5 REAL- TIME PCR ARRAY

Darüber hinaus wurde neben dem Zellkulturüberstand und den Lysaten auch die mRNA der DCs untersucht. Die zu untersuchenden mRNAs wurden nach eingehender Literaturrecherche in PubMed identifiziert. Die Versuchsgruppen entsprachen den zuvor bei den anderen in vitro Versuchen verwendeten Gruppen. Im Vergleich der verschiedenen Gruppen untereinander fiel auf, dass die Stimulation mit LPS einen Einfluss auf eine Vielzahl von verschiedenen mRNAs hat. Interessanterweise waren im Vergleich der unstimulierten DCs und der hypoxischen unstimulierten DCs vor allem zwei mRNAs in der Gruppe der hypoxischen unstimulierten DCs verstärkt exprimiert, nämlich FGF1 und VEGFR-1 (FLT-1). Mittels konventionellem ELISA wurde dann FLT-1 im Zellkulturüberstand weiter untersucht.

Tabelle 5: Übersicht über die RNA Qualitäten der für die Real- Time- PCR verwendeten RNAs

Ansätze	1	2	3	4
	Normoxie		Hypoxie	
	unreife DCs	reife DCs	unreife DCs	reife DCs
Bezeichnung med. Genetik	I17R001a08	I17R001a09	I17R001a10	I17R001a11
A 260/280	2,11	2,08	2,08	2,09
A 260/230	2,01	1,98	2,07	1,96
RIN	9,7	10	9,8	9,8

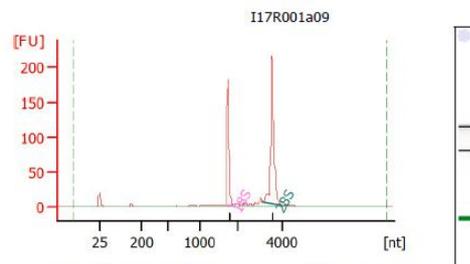


Overall Results for sample 4 : I17R001a08

RNA Area: 384.1
 RNA Concentration: 169 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.70

Fragment table for sample 4 : I17R001a08

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,704	1,912	99.0	25.8
28S	3,139	4,027	159.9	41.6



Overall Results for sample 5 : I17R001a09

RNA Area: 504.0
 RNA Concentration: 221 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10

Fragment table for sample 5 : I17R001a09

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,697	1,905	139.4	27.6
28S	3,138	4,010	251.9	50.0

Abbildung 13: RNA Qualitäten (RIN) in der Analyse durch die Abteilung für medizinische Genetik.

Normoxische DCs. Sample 4 = unreife DCs, Sample 5 = reife DCs). Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Abteilung für medizinische Genetik.

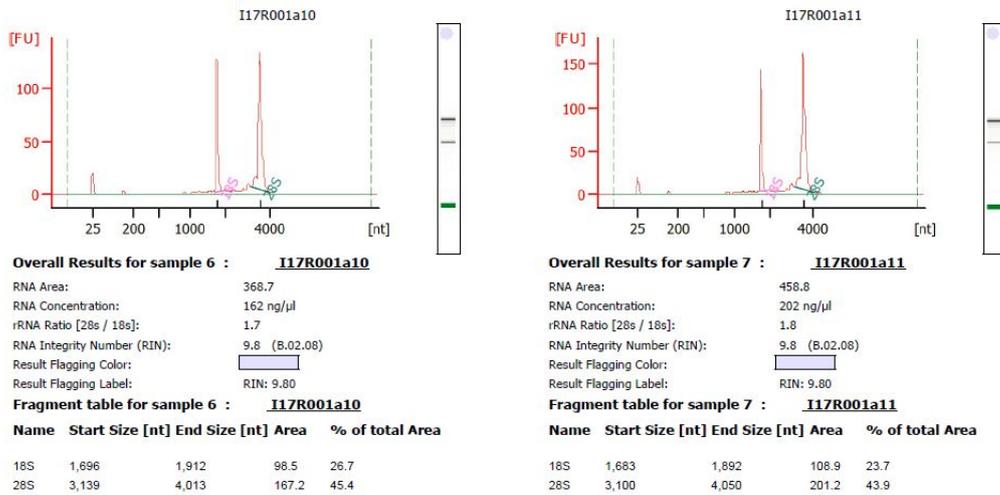


Abbildung 14: RNA Qualitäten (RIN) in der Analyse durch die Abteilung für medizinische Genetik.

Hypoxische DCs. Sample 6 = unreife DCs, Sample 7 = reife DCs). Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Abteilung für medizinische Genetik.

Tabelle 6: Übersicht über die mittels RT- PCR analysierten RNAs.

Abkürzung	Protein	Abkürzung	Protein
Akt1	Thymoma viral proto- oncogene 1	Smad5	MAD homolog 5 (Drosophila)
Ang	Angiogenin ribonuclease, RNase A family, 5	Sphk1	Sphingosine kinase 1
Angpt1	Angiopoetin 1	Tbx1	T- box 1
Angpt2	Angiopoetin 2	Tek	Endothelial- specific receptor tyrosine kinase
Anpep	Alanyl (membrane) aminopeptidase	Tgfa	Transforming growth factor alpha
Bai1	Brain- specific angiogenesis inhibitor 1	Tgfb1	Transforming growth factor beta 1
Ccl11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	Tgfb2	Transforming growth factor beta 2
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Tgfb3	Transforming growth factor beta 3
Cdh5	Cadherin 5	Tgfr1	Transforming growth factor beta receptor 1
Col18a1	Cooagen, type XVIII, alpha 1	Thbs1	Thrombospondin 1
Col4a3	Collagen, type IV, alpha 3	Thbs2	Thrombospondin 2

Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Tie1	Tyrosine kinase with immunoglobuline- like and EGF- like domains 1
Ctgf	Connective tissue growth factor	Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Tnf	Tumor necrosis factor
Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	Tnfsf12	Tumor necrosis factor, beta receptor I
Edn1	Endothelin 1	Tymp	Thymidine phosphorylase
Efna1	Ephrin A1	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A
Efnb2	Ephrin B2	Vegfb	Vascular endothelial growth factor B
Egf	Epidermal growth factor	Vegfc	Vascular endothelial growth factor C
Eng	Endoglin	Adm	Adrenomedullin
Epas1	Endothelial PAS domain protein 1	Ctsc	Cathepsin C
Ephb4	Eph receptor B4	Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
ErbB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
F2	Coagulation factor II	Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
F3	Coagulation factor III	Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8
Fgf1	Fibroblast growth factor 1	Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3
Fgf6	Fibroblast growth factor 6	Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
Fgfr3	Fibroblast growth factor receptor 3	Ccr7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
Figf	C- fos induced growth factor	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte- macrophage)
Flt1	FMS like tyrosine kinase 1	Cx3cr1	Chemokine (C-X3-C) receptor 1
Fn1	Fibronectin 1	Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11

Hgf	Hepatocyte growth factor	Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Hif1a	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Cxcl13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Ifnγ	Interferon gamma	Cxcl3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
Igf1	Insulin like growth factor 1	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Il1b	Interleukin 1 beta	Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Il6	Interleukin 6	Flt4	FMS like tyrosine kinase 4
Itgav	Integrin alpha V	Ifnar1	Interferon (alpha and beta) receptor 1
Itgb3	Integrin beta 3	Il10	Interleukin 10
Jag1	Jagged 1	Il12a	Interleukin 12 A
Kdr	Kinase insert domain protein receptor	Il12b	Interleukin 12 B
Lect1	Leucocyte cell derived chemotaxin 1	Il18	Interleukin 18
Lep	Leptin	Il18bp	Interleukin 18 binding protein
Mapk14	Mitogen- activated protein kinase 14	Mif	Macrophage migration inhibitory factor
Mdk	Midkine	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1
Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membran- inserted)	Rgs1	Regulator of G- protein signaling 1
Mmp19	Matrix metalloproteinase 19	Spp1	Secreted phosphoprotein 1
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	Ptx3	Pentraxin related gene
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9	Dusp1	Dual specificity phosphatase 1
Nos3	Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	Oas1b	2'-5' oligoadenylate synthetase 1 B
Nrp1	Neuropilin 1	Oas1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1 G
Nrp2	Neuropilin 2	Cd40lg	CD40 ligand
Pdgfa	Platelet/endothelial derived growth factor, alpha	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Cd209b	CD 209b antigen
Pgf	Placental growth factor	Gusb	Glucuronidase, beta

Plau	Plasminogen activator, urokinase	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase
Plg	Plasminogen	Actb	Actin, beta
Ptgs1	Prostaglandin- endoperoxide synthase 1	Hsp90ab1	Heat shock preotein 90 alpha (cytosolic) class B member 1
Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	B2m	Beta-2 microglobulin
S1pr1	Sphingosine-1- phosphate receptor 1	Serpinf1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1
Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1		

Tabelle 7: Vermehrt exprimierte RNAs der LPS stimulierten DCs im Vergleich zu den unstimulierten DCs

Position	Gene Symbol	Fold Regulation	p-Value
114	Ptx3	433.28	0.000547
104	Ifnar1	375.24	0.010232
101	Cxcl9	233.81	0.008509
30	Fgfr3	181.54	0.001523
46	Mapk14	156.41	0.003101
74	Thbs1	130.61	0.000003
14	Cxcl1	115.29	0.005587
82	Vegfa	115.09	0.002376
47	Mdk	112.53	0.001323
85	Adm	107.20	0.011029
50	Mmp2	105.36	0.002431
111	Pgk1	100.37	0.000008
27	Fgf1	99.33	0.013339
28	Fgf2	84.11	0.000908
63	Serpine1	80.12	0.000191
32	Flt1	62.65	0.002127
105	Il10	52.50	0.000904
75	Thbs2	51.24	0.022760
61	Ptk2	40.62	0.005261

Tabelle 8: Vermehrt exprimierte RNAs der unstimulierten hypoxischen DCs im Vergleich zu den unstimulierten DCs

Position	Gene Symbol	Fold Regulation	p-Value
32	Flt1	37.40	0.005547
27	Fgf1	21.74	0.004834
75	Thbs2	9.51	0.000120

Tabelle 9: vermehrt exprimierte RNAs der LPS stimulierten hypoxischen DCs im Vergleich zu den unstimulierten DCs

Position	Gene Symbol	Fold Regulation	p-Value
50	Mmp2	893.85	0.000038
101	Cxcl9	409.12	0.001012
46	Mapk14	336.75	0.004322
30	Fgfr3	326.41	0.003519
14	Cxcl1	283.50	0.000202
104	Ifnar1	249.82	0.000015
108	Il18	160.87	0.022916
82	Vegfa	145.91	0.001935
85	Adm	138.67	0.005491
47	Mdk	98.23	0.002566
32	Flt1	81.04	0.000144
31	Figf	65.07	0.000005
27	Fgf1	64.10	0.008800
111	Pgk1	55.51	0.000020
75	Thbs2	52.67	0.000001
114	Ptx3	46.44	0.003383
126	GDC	39.34	0.021790
74	Thbs1	37.31	0.006396
98	Cxcl12	35.91	0.008462

Bei der Analyse der Real- Time- PCR Daten zeigte sich eine Regulation von verschiedenen pro- und antiangiogen wirksamen Faktoren. Teilweise fand sich eine deutliche Veränderung der Regulation der Faktoren nach Stimulation mit LPS beziehungsweise nach Kultur unter hypoxischen Bedingungen. Die folgende Tabelle soll einen Überblick über die pro- und antiangiogen wirksamen Faktoren geben, die nach Stimulation mit LPS beziehungsweise Kultur unter hypoxischen Umgebungsbedingungen eine veränderte Expression gezeigt haben. Beim Real- Time- PCR Array wurden als Ausgangsmaterial, wie in Tabelle 4 aufgeführt, nur qualitativ hochwertige RNAs verwendet.

Tabelle 10: Übersicht über die in den verschiedenen Versuchsgruppen im Angiogenese Array vermehrt exprimierten Faktoren sowie die in der Literatur beschriebenen Effekte auf die Angiogenese.

Gen/Faktor	Name	Pro (+) /Antiangiogen (-)	Quelle
PTX 3	Pentraxin 3	(-)	[80]
CXCL 9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	(-)	[81]
FGFR 3	Fibroblast growth factor receptor 3	(+)	[82]
MAPK 14 (p38)	Mitogen- activated protein kinase 14	(+)	[83]
THSB 1/THSB 2	Thrombospondin 1/2	(-)	[84]
CXCL 1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	(+)	[85]
VEGF A	Vascular endothelial growth factor A	(+)	[86]
MdK	Midkine	(-)	[87]
Adm	Adrenomedullin	(+)	[88]
MMP 2	Matrix metalloproteinase 2	(+)	[89]
PGK 1	Phosphoglycerate kinase 1	(-)	[90]
FGF 1	Fibroblast growth factor 1	(+)	[91]
FGF 2	Fibroblast growth factor 2	(+)	[92]
Serpin 1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	(-)	[93]
FLT 1	FMS like tyrosine kinase 1	(-)	[94]
IL 10	Interleukin 10	(-)	[95]
PTK 2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	(+)	[96]
CXCL 12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	(+)	[97]
IL 18	Interleukin 18	(+)	[98]
FIGF	C- fos induced growth factor	(+)	[99]

Interessanterweise zeigte sich sowohl bei den pro- als auch antiangiogen wirkenden Faktoren eine veränderte Expression nach Stimulation mit LPS beziehungsweise nach Kultur unter Hypoxie. Beim Vergleich von unstimulierten hypoxischen DCs mit unstimulierten DCs fiel auf, dass in der Gruppe der zusätzlich mit Hypoxie behandelten DCs eine vermehrte Expression vom proangiogen wirkendem FGF 1 auftrat [91]. Außerdem waren auch zwei antiangiogen wirkende Faktoren, nämlich Thrombospondin 2 und FLT 1 vermehrt exprimiert [84, 94]. Beim Vergleich der LPS stimulierten DCs mit den unstimulierten DCs beziehungsweise beim Vergleich der LPS stimulierten hypoxischen DCs mit den unstimulierten DCs waren diverse Faktoren nach LPS Stimulation vermehrt exprimiert. Hypoxie zusätzlich zur LPS Stimulation bewirkt eine vermehrte Expression des proangiogen wirkenden IL 18 [98]. Außerdem wird auch mehr proangiogen wirkendes FIGF sowie CXCL12 exprimiert [97, 99]. Im Gegensatz dazu sind bei den LPS stimulierten normoxischen DCs das antiangiogen wirkende Serpin 1 sowie das antiangiogen wirkende IL 10 vermehrt exprimiert [93, 95].

3.6 ELISA

Um die mittels Proteome- Profiling und Real- Time- PCR identifizierten Kandidaten weiter zu untersuchen, wurden konventionelle ELISA- Experimente durchgeführt. Zum einen wurde CXCL-10 weiter mittels konventionellem ELISA untersucht, da sich im Proteome Profiling in der Gruppe der LPS stimulierten DCs, die in vitro weniger Proliferation, Migration und Tube Formation gezeigt hatten, vermehrt CXCL-10 hatte nachweisen lassen. VEGFR-1 (FLT-1), dass eine verstärkte Expression in der Gruppe der hypoxischen unstimulierten DCs gezeigt hatte, wurde ebenfalls weiter mittels konventionellem ELISA untersucht.

FLT-1 wurde auch deshalb weiter mittels ELISA untersucht, da bei FLT-1 eigentlich antiangiogene Effekte vorbeschrieben sind [94]. Interessanterweise fand sich gerade in der Gruppe der hypoxischen unstimulierten DCs, die proangiogene Effekte in vitro gezeigt hatten, eine deutliche Verstärkung der FLT-1 Expression. Daher war ein Ziel zu untersuchen, welche Effekte diese im Real-Time- PCR Array festgestellte vermehrte Expression von FLT-1 in der Gruppe

der unstimulierten hypoxischen DCs auf die Sekretion von FLT-1 in das konditionierte Zellkulturmedium hat.

3.6.1 CXCL10- ELISA

Im CXCL10- ELISA konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit LPS zu signifikant mehr CXCL10- Sekretion im konditionierten Zellkulturmedium führt. Darüber hinaus war nur eine sehr geringe Konzentration von CXCL10 in der Gruppe der unstimulierten DCs vorhanden. Hypoxie selbst führte zu einer niedrigeren CXCL10 Konzentration in der Gruppe der LPS stimulierten DCs, wengleich der Effekt statistisch nicht signifikant war. Als ELISA wurde ein kommerziell erhältliches Kit (EMCXCL10) von Thermo Fisher Scientific verwendet.

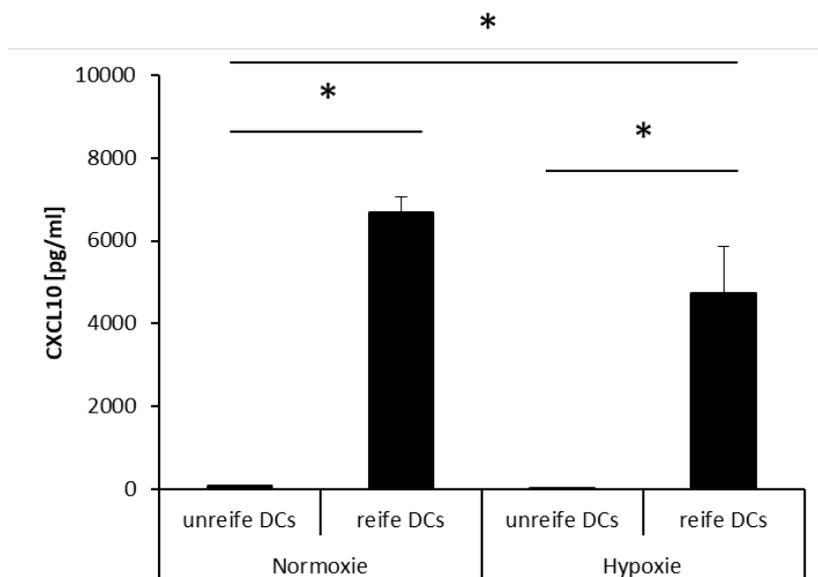


Abbildung 15: LPS Stimulation führt zu einer signifikanten Steigerung der CXCL10 Konzentration im konditionierten Zellkulturmedium der DCs.

Es wurde konditioniertes Zellkulturmedium von DCs verwendet und mittels konventionellem ELISA analysiert. Dabei fiel auf, dass eine Stimulation der DCs mit LPS zu einer signifikanten Steigerung der CXCL10 Konzentration im konditionierten Zellkulturmedium führte. Eine zusätzliche Stimulation der LPS stimulierten DCs (1µg/ml) mit Hypoxie bewirkte eine Abnahme der CXCL10 Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zum Zellkulturüberstand normoxischen DCs, wengleich der Unterschied nicht signifikant war (N= 6, *p< 0,05).

3.6.2 FLT-1 ELISA

Darüber hinaus wurde als nächstes das konditionierte Zellkulturmedium mittels FLT-1 ELISA untersucht. Hierbei wurde ein kommerziell erhältliches ELISA Kit von RnD Systems (MVR 100) verwendet. Dabei zeigte sich, dass im konditionierten Zellkultur-medium von unreifen DCs signifikant mehr FLT-1 vorhanden ist als im konditionierten Zellkulturmedium von reifen DCs oder hypoxischen DCs.

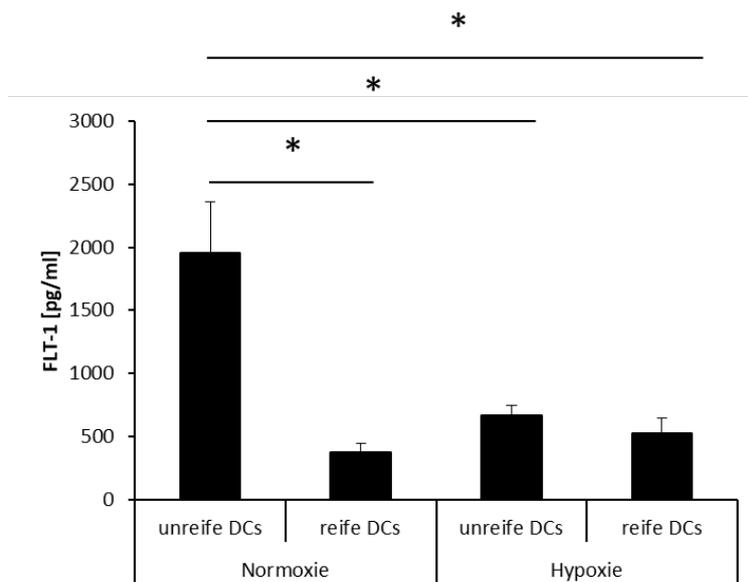


Abbildung 16: Das konditionierte Zellkulturmedium von unreifen DCs enthält signifikant mehr FLT-1 als das konditionierte Zellkulturmedium von reifen DCs oder von hypoxischen DCs.

Es wurde konditioniertes Zellkulturmedium von unreifen und reifen LPS (1 µg/ml) stimulierten DCs verwendet und die Konzentration von FLT-1 im konditionierten Zellkulturmedium der DCs mittels ELISA analysiert. Ein Teil der DCs wurde zuvor unter normoxischen Umgebungsbedingungen, ein anderer Teil der DCs wurde zuvor unter hypoxischen Umgebungsbedingungen kultiviert. Eine Stimulation mit LPS oder Hypoxie bewirkte eine Abnahme der FLT-1 Konzentration im konditionierten Zellkulturmedium. Der Effekt war dabei sowohl für LPS als auch für Hypoxie deutlich ausgeprägt (N= 8, * p < 0,05).

4 DISKUSSION

4.1 DIE ROLLE VON DCs FÜR DIE ANGIOGENESE IN VIVO.

In der vorliegenden Arbeit konnte in zwei in vivo Modellen der Angiogenese gezeigt werden, dass DCs Angiogenese fördern können. Darüber hinaus fiel in verschiedenen in vitro Versuchen der Angiogenese auf, dass DCs Endothelzellfunktionen wie Proliferation, Migration und Tube Formation beeinflussen können. Bei der Untersuchung der hierbei involvierten Faktoren mittels Real- Time- PCR und Proteome- Profiling konnte nachgewiesen werden, dass auf RNA Ebene sowie auf Ebene der Proteine sowohl im Zellkulturüberstand als auch in den Zelllysaten der DCs eine Vielzahl potenter pro- und antiangiogen wirksamer Faktoren vorhanden sind.

In vivo wurde mithilfe von zwei etablierten Experimenten die Rolle von DCs untersucht. Zunächst wurde das Hindlimb Ischämie Modell als etabliertes und akzeptiertes Modell zur Untersuchung der Hypoxie- getriggerten Angiogenese verwendet [100]. Hierbei ließ sich zum einen mittels gezielter Depletion von DCs durch Applikation von Diphtherietoxin im DTR- Mausmodell nachweisen, dass die Hypoxie- getriggerte Angiogenese in diesem Modell von den DCs gefördert wird. Dieser Befund wurde insbesondere dadurch deutlich, dass in der Versuchsgruppe, in der mittels Applikation von Diphtherietoxin die Zelldepletion der DCs erzielt wurde, eine signifikante Abnahme der Durchblutung mittels Laser- Doppler- Imaging in der nichtinvasiven Messung nachweisbar war.

Interessanterweise ist das DTR- Mausmodell bereits von einer anderen Arbeitsgruppe zur Untersuchung von Angiogenese im Matrigel- Modell verwendet worden [45]. Das Vorgehen war dabei folgendermaßen: Zunächst wurde bFGF als Wachstumsfaktor zum Matrigel hinzugegeben. Dann erfolgte eine systemische Depletion von DCs durch Applikation von Diphtherietoxin am lebenden Tier während der Inkubationszeit der Matrigel- Plugs für insgesamt eine Woche. Im Anschluss wurden die Versuchstiere getötet und es fand nach Explantation der Plugs eine Analyse der Zellen im Matrigel mittels Durchflusszytometrie statt [45]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die Zahl

an Endothelzellen in den mittels Durchflusszytometrie analysierten Matrigel-Plugs zwischen der Versuchsgruppe sowie der Kontrollgruppe nicht unterschieden [45]. Auffällig war jedoch, dass nach Applikation von Diphtherietoxin in der Mikroskopie eine Zerstörung der Gefäßarchitektur im Matrigel-Plug zu sehen war [45]. Eine Quantifizierung der mikroskopischen Analysen, sprich beispielsweise eine Messung der Anzahl an Gefäßen, fand in diesen Untersuchungen nicht statt.

Die in der vorliegenden Arbeit in der Hindlimb Ischämie erzielten Erkenntnisse untermauern die Bedeutung von DCs für die Angiogenese, da in der Gruppe der DC-Depletion eine verminderte Angiogenese in der Laser-Doppler-Messung erkennbar war. Darüber hinaus konnte mit der Analyse der Durchblutung mittels Laser-Doppler Imaging auch die physiologische Relevanz der DCs für die Angiogenese bestätigt werden, da hier physiologische Daten direkt am lebenden Tier generiert werden konnten und nicht nur morphologische Daten, wie beispielsweise bei histologischen Untersuchungen, ausgewertet wurden.

Neben dem Hindlimb Ischämie Modell wurde die Rolle von DCs für die Angiogenese auch mittels in vivo Matrigel-Modell untersucht. Das Matrigel-Modell ist ein Modell der Wachstumsfaktor-getriggerten Angiogenese. In der vorliegenden Arbeit wurde das Matrigel-Modell dazu verwendet um zu untersuchen, welchen Einfluss der Reifungsgrad der DCs, genauer gesagt welchen Einfluss reife oder unreife DCs auf die Möglichkeit Angiogenese zu beeinflussen, haben. Hierbei fiel auf, dass sowohl unreife als auch reife DCs zu mehr Angiogenese in den Matrigel-Plugs führen. Eine statistisch signifikant messbare Zunahme der Angiogenese tritt jedoch nur auf, wenn unreife DCs im Matrigel vorhanden sind.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Fainaru et al. Diese Arbeitsgruppe konzentrierte sich auf die Rolle von DCs für die Angiogenese in verschiedenen Tumormodellen. Hierbei fiel zum einen auf, dass unreife DCs zu stärker vaskularisierten und auch insgesamt schwereren Tumoren führten [45]. Dies konnte in Tiermodellen für mehrere verschiedene Tumormodelle wie beispielsweise Lungenkrebs oder malignes Melanom gezeigt

werden [45]. Darüber hinaus wurde hier auch Angiogenese mittels in vivo Matrigel- Modell untersucht. Dabei wurden nach Injektion des Matrigels nach einer Woche Wartezeit die Matrigel Plugs entfernt. Im Anschluss erfolgten eine enzymatische Lyse der Plugs sowie eine Analyse mittels Durchflusszytometrie. Hierbei fiel auf, dass signifikant mehr CD31 positive Zellen in den Plugs, die unreife DCs enthalten hatten, vorhanden waren [45]. CD31 ist ein Endothelzellmarker, weshalb die Autoren aus den Analysen die Schlussfolgerung gezogen haben, dass unreife DCs zu mehr Angiogenese führen [45, 101]. Eine histologische Auswertung der Matrigel Plugs fand in dieser Arbeit nicht statt.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gibt es neben malignen Erkrankungen auch noch weitere Erkrankungen mit großer volkswirtschaftlicher Bedeutung, die durch eine pathologische Angiogenese charakterisiert sind. Eine dieser Erkrankungen stellt die altersabhängige Makuladegeneration dar, die maßgeblich durch eine fehlgeleitete Angiogenese charakterisiert ist. Im Mausmodell lässt sich die Erkrankung experimentell durch eine Verletzung der Retina mittels Applikation von Laserstrahlen modellieren.

Die Rolle von DCs für diese Erkrankung wurde ebenfalls von einer Gruppe von Wissenschaftlern untersucht. Hierbei wurde mittels Laser eine Läsion im Bereich der Netzhaut gesetzt. Hier fand sich in den mittels Laser induzierten Läsionen in der Netzhaut, in denen Neovaskularisation zu beobachten war, eine verstärkte Rekrutierung von DCs [47]. Darüber hinaus konnten mittels Fluoreszenz markierte DCs, nachdem diese in die Schwanzvene der Mäuse nach Induktion der Läsionen injiziert worden sind, im Bereich der Läsionen in der Retina nachgewiesen werden [47]. Außerdem fand sich hier auch eine deutlich messbare Zunahme der Angiogenese [47]. Interessanterweise fand sich vor allem nach Injektion von unreifen DCs eine Zunahme der Angiogenese im Bereich der Retina. Wenn hingegen reife DCs oder PBS injiziert worden sind, kam es zu keiner deutlichen Zunahme der Angiogenese [47].

Angesichts der erhobenen in vivo Befunde sowie der vorbeschriebenen in vivo Befunde wurde in der vorliegenden Arbeit im weiteren Verlauf die Rolle von DCs für die Angiogenese in weiteren in vitro Experimenten untersucht. Ein explizites

Ziel bestand darin, herauszufinden, welchen Einfluss reife und unreife DCs auf endotheliale Funktionen, die für die Angiogenese relevant sind, wie Proliferation, Migration und Tube Formation, haben. Ein weiteres Ziel bestand darin, zu evaluieren, welche für die Angiogenese relevanten Faktoren auf RNA- und Proteinebene von DCs produziert werden, beziehungsweise ausgeschüttet werden.

4.2 DIE ROLLE VON DCs IN VITRO

Zunächst wurde *in vitro* untersucht, welchen Einfluss das konditionierte Zellkulturmedium von DCs auf die Proliferation, Migration und Tube Formation von DCs hat. Konditioniertes Zellkulturmedium wurde deshalb gewählt, weil bekannt ist, dass Angiogenese durch sezernierte pro- und antiangiogen wirkende Faktoren gesteuert wird [1, 5]. DCs sind sekretorisch aktive Zellen [102]. Diese Tatsache spielt vor allem im Zusammenhang mit der Interaktion sowie Aktivierung von T-Lymphozyten eine Rolle. Hier spielen beispielsweise bestimmte von DCs ausgeschüttete Chemokine wie Interleukin 12 eine Rolle [103].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DCs wurden nach einem etablierten und anerkannten Verfahren aus dem Knochenmark von Mäusen generiert [45, 48, 104]. Für die Ausreifung der DCs wurde LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, verwendet. Darüber hinaus wurde ein Teil der DCs auch für 24 Stunden unter hypoxischen Kulturbedingungen inkubiert.

Dabei zeigte sich, dass das konditionierte Zellkulturmedium von unreifen DCs zu signifikant mehr Zellproliferation von Endothelzellen führt. Für die reifen DCs war dieser Effekt nicht nachweisbar. Interessanterweise führte die Behandlung der DCs mit Hypoxie für 24 Stunden nicht dazu, dass der Zellkulturüberstand der hypoxischen DCs eine signifikante zusätzliche Steigerung der Proliferation der Endothelzellen im Vergleich zu unbehandelten DCs bewirkte. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass eine Inkubation der DCs mit LPS als etabliertem Faktor für die Generation von reifen DCs *in vitro* dazu führt, dass die Endothelzellen nach Inkubation mit dem konditionierten Zellkulturmedium dieser

Zellen mit einer Abnahme der Endothelzellproliferation reagieren. Bekannt ist, dass DCs unter Hypoxie als einem sehr stark in die Gen- und Proteinregulation von Zellen eingreifenden Faktor, mit einer deutlichen Veränderung der zellulären Transkription und Translation reagieren [59, 60, 105, 106]. Insbesondere der Hypoxie induzierbare Faktor HIF 1A spielt an dieser Stelle eine entscheidende Rolle [60]. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass LPS prinzipiell mit Hypoxie synergistisch wirken kann und damit ebenfalls eine Steigerung der HIF-1A Menge bewirkt [60]. HIF 1A wiederum führt zu einer Steigerung der Transkription von beispielsweise VEGF A, einem der Hauptfaktoren, die relevant für die Angiogenese sind [107].

Daher bestand der nächste Schritt darin, die Faktoren zu identifizieren, die für die beobachteten Effekte verantwortlich sein können. Hierzu wurde zum einen ein Proteome Profiling, mit dem ein Panel an pro- oder antiangiogen wirkenden Faktoren identifiziert werden kann sowohl von den Zellkulturüberständen als auch den Lysaten der DCs durchgeführt. Außerdem wurde mittels Real- Time-PCR Array untersucht, welche Veränderungen auf RNA- Ebene detektiert werden können. Hierbei fand sich im Proteome Profiling zum Beispiel vermehrt nachweisbar CXCL-10, nachdem eine Stimulation der DCs mit LPS erfolgt war.

Im experimentellen Setting mit humanen DCs wurde bereits der Einfluss von Hypoxie und LPS auf die Proteinsynthese beziehungsweise mRNA Expression von DCs untersucht. Dabei fiel auf, dass sich unter Stimulation mit LPS und Hypoxie beispielsweise eine vermehrte Produktion von VEGF mRNA nachweisen ließ [108]. Darüber hinaus fand sich unter Stimulation mit LPS eine vermehrte Produktion von CXCL10 mRNA und CXCL10 Protein [108]. Hypoxie selbst bewirkte eine Abnahme der CXCL10 Protein- Produktion [108]. Dieser Effekt einer verminderten CXCL10- Produktion nach Stimulation mit Hypoxie konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls im ELISA gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde CXCL10 jedoch nur auf Proteinebene und nicht auf mRNA Ebene untersucht. CXCL10 werden wie zuvor bereits ausgeführt antiangiogene Eigenschaften zugeschrieben. Daher ist es plausibel, dass CXCL10 einer der Faktoren sein könnte, die eine Abnahme der

Endothelzellproliferation nach Zugabe von konditioniertem Zellkulturmedium von LPS- stimulierten DCs bewirken, zumal Untersuchungen mit verschiedenen humanen und murinen Endothelzelllinien nachweisen konnten, dass CXCL-10 einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von verschiedenen Endothelzellen in vitro hat [109]. Interessanterweise scheint es so zu sein, dass dieser inhibitorische Effekt nicht nur durch den CXCR-3 Rezeptor, der den Bindungspartner des Liganden CXCL10 darstellt, vermittelt wird [109]. Vielmehr haben sich Hinweise darauf ergeben, dass der inhibitorische Effekt auf die Endothelzellproliferation auch durch Interaktion von CXCL10 mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen zustande kommt [109]. Entscheidend ist in Zukunft mittels Zugabe von Anti- CXCL10 Antikörper zu untersuchen, welchen Effekt die Zugabe eines Anti- CXCL10 Antikörpers auf die Proliferation von Endothelzellen hat, wenn diese mit konditioniertem Zellkulturmedium von LPS stimulierten normoxischen und hypoxischen DCs inkubiert werden. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass auch ein nicht Rezeptor abhängiger Effekt von CXCL10 durch Interaktion mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen vorbeschrieben ist [109].

Bei der Untersuchung der Migration von Endothelzellen mittels „Scratch Assay“ konnte eine signifikante Zunahme der Endothelzellmigration nach Inkubation der Endothelzellen mit konditioniertem Zellkulturmedium von unreifen DCs beobachtet werden. Dabei fiel auf, dass eine Behandlung der DCs zusätzlich mit Hypoxie vor der Zugabe des konditionierten Zellkulturmediums zu den Endothelzellen keinen zusätzlichen Migrations- steigernden Effekt hatte. Ähnliche Effekte konnten von einer anderen Arbeitsgruppe, die sich mit der Rolle von DCs für die Endometriose beschäftigt hat, beobachtet werden. Hierbei wurde die Migration von humanen mikrovaskulären Endothelzellen in einer modifizierten Boyden Kammer untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von unreifen DCs zu einer verstärkten Migration von humanen mikrovaskulären Endothelzellen führte [48]. Die DCs wurden in diesen Experimenten jedoch nicht mit Hypoxie behandelt, sodass hier nur ein Vergleich zwischen unreifen und reifen DCs stattfand. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit auch untersucht, welchen Einfluss DCs auf die endotheliale Tube Formation haben.

Hierbei wurde, wie bei den zuvor beschriebenen Experimenten, konditioniertes Zellkulturmedium von DCs verwendet. Dabei zeigte sich, dass unreife DCs die endotheliale Tube Formation verstärken. Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant. Ähnliche Experimente wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen mit humanen DCs durchgeführt und publiziert. Dabei wurde bereits untersucht, welchen Effekt eine Stimulation der DCs mit verschiedenen Maturations- fördernden Chemokinen bewirkt. Dazu fanden unter anderem Untersuchungen von humanen DCs in vitro statt, die mittels verschiedener Chemokine zur Ausreifung gebracht wurden. Hier fiel eine unterschiedliche Produktion von VEGFR-1 beziehungsweise VEGF nach Stimulation auf [110]. Interessanterweise bewirkte das konditionierte Zellkulturmedium von LPS stimulierten DCs eine Zunahme der Tube Formation [110]. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit TNF alpha oder CD40 Ligand zusammen mit INF Gamma zu einer Abnahme der Tube Formation [110]. Für den proangiogenen Effekt war vor allem das Verhältnis von löslichem VEGFR-1 zu VEGF relevant [110]. Ein Überwiegen von VEGFR-1 über VEGF im konditionierten Zellkulturmedium der DCs bewirkte eine Reduktion der Tube Formation [110]. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass eine Stimulation von humanen Monozyten mit GM-CSF eine Zunahme der VEGFR-1 Menge im konditionierten Zellkulturmedium bewirkt [111]. Damit einhergehend fand sich eine Reduktion der endothelialen Tube Formation von HUVECS sowie eine Reduktion der Migration von HUVECS [111]. Außerdem konnte in vivo im Matrigel Assay gezeigt werden, dass eine Zugabe von GM-CSF zum Matrigel Plug zu weniger Angiogenese in den histologisch untersuchten Matrigel- Plugs führte [111]. Im Gegensatz dazu ließ sich nach Stimulation von humanen Monozyten mit M- CSF eine Zunahme der Produktion von VEGF nachweisen [112]. Dies zeigte sich darüber hinaus auch in vitro durch eine deutliche Zunahme der endothelialen Tube Formation von HUVECS nach Koinkubation von Endothelzellen mit konditioniertem Zellkulturmedium von Monozyten, die zuvor mittels M- CSF behandelt worden sind [112]. Interessanterweise war in der Real- Time- PCR VEGFR-1 einer der Faktoren, die nach LPS Stimulation oder Exposition gegenüber Hypoxie eine veränderte Expression zeigten. Insbesondere LPS

Stimulation scheint eine vermehrte Expression von FLT-1 zu bewirken. Wenn zusätzlich zur LPS Stimulation noch hypoxische Umgebungsbedingungen vorhanden sind, so kommt es in der vorliegenden Arbeit zur Reduktion der Menge an FLT-1 RNA. Demgegenüber fand sich im ELISA die höchste Konzentration von FLT-1 in der Gruppe der unreifen normoxischen DCs. Sowohl LPS als auch Hypoxie bewirkten eine Abnahme von FLT-1 im konditionierten Zellkulturmedium von DCs.

Hypoxie ist einer der entscheidenden Faktoren, der zur Entstehung von neuen Blutgefäßen und damit zur Angiogenese beiträgt [69]. Hierbei spielt insbesondere das HIF- System mit den verschiedenen Hypoxie- induzierten Faktoren eine wichtige Rolle [54, 69]. Diese Faktoren wiederum führen durch eine Steigerung der zellulären Transkription und Translation zu einer veränderten Genexpression und damit zu einer Veränderung der Proteinexpression [54, 60, 69]. Dabei spielt als einer der wesentlichen hier beteiligten Faktoren auch Hypoxie eine Rolle bei der Regulation von FLT-1 (VEGFR1). FLT-1 zeigte wie bereits aufgeführt sowohl in der Real- Time- PCR als auch im ELISA eine veränderte Regulation nach LPS Stimulation sowie nach Inkubation unter hypoxischen Umgebungsbedingungen. Darüber hinaus konnte bei Untersuchungen mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen gezeigt werden, dass es unter Hypoxie zu einer Herunterregulation von löslichem FLT-1 kommt [94]. Gleichzeitig zeigen sich jedoch keine Veränderungen des membrangebundenen FLT-1 [94]. Weiterhin führte eine verstärkte Expression von löslichem FLT-1 bei humanen mikrovaskulären Endothelzellen dazu, dass die Endothelzellproliferation nach Exposition mit VEGF deutlich geringer ausfiel und FLT-1 in Kombination mit VEGF den proliferationsfördernden Effekte von VEGF antagonisieren konnte [94]. Einer der wichtigsten Liganden für FLT-1 (VEGFR1) ist VEGF [113]. VEGF kann an verschiedene Rezeptoren binden. Zwei der wichtigsten VEGF Rezeptoren sind der VEGFR-1 sowie der VEGFR-2 [113]. Im Zellkulturmodell konnte mittels HUVECS gezeigt werden, dass eine Stimulation mit VEGF-A zu einer Zunahme der FLT-1 mRNA führt [114]. Damit einhergehend kommt es auch zu einer Zunahme von löslichem FLT-1 im konditionierten Zellkulturmedium [114]. Darüber hinaus führt eine experimentell mittels viralem Vektor induzierte

vermehrte Expression von FLT-1 zu einer veränderten Phosphorylierung des VEGFR-2 und damit zu einer verminderten Proliferation und Migration von HUVECSs im Zellkulturmodell [114]. Eine wichtige Erkrankung, die mit pathologischer Angiogenese in Verbindung gebracht wird, ist die Präeklampsie [115]. Interessanterweise fand sich in analysiertem Plazentagewebe von präeklampsischen Patientinnen eine verminderte Phosphorylierung von VEGFR-2 [114]. Gleichzeitig sind hier auch die Serumkonzentrationen von FLT-1 erhöht [115]. Wie bereits erwähnt, existieren vom VEGFR-1 zwei Formen. Einerseits kann der VEGFR-1 membrangebunden vorliegen [113]. Darüber hinaus existiert auch eine lösliche Form [113]. In vivo konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die Tyrosinkinaseaktivität der membrangebundenen Form des VEGFR-1 wichtig für die Angiogenese in der Hindlimb Ischämie ist [116]. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, dass Mäuse mit einem genetischen Defekt in der Tyrosinkinaseaktivität weniger Angiogenese im operierten Bein im Vergleich zum nicht operierten Bein aufweisen als der Wildtyp [116]. Aufgrund dieser engen Verzahnung von VEGF und VEGFR-1 wurde dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit weiter in vitro untersucht. Im ELISA des Zellkulturüberstands von unreifen normoxischen DCs sowie unreifen hypoxischen DCs fand sich die höchste Konzentration von FLT-1. Nach Stimulation mit LPS war eine deutliche Reduktion der Konzentration von FLT-1 im Zellkulturüberstand zu beobachten. Darüber hinaus bewirkten auch hypoxische Zellkulturbedingungen, dass sich eine Abnahme der FLT-1 Konzentration im konditionierten Zellkulturmedium zeigte. Demgegenüber war FLT-1 im Real- Time- PCR Array in der Gruppe der unreifen hypoxischen DCs ebenso wie in der Gruppe der LPS stimulierten reifen normoxischen und hypoxischen DCs im Vergleich zu den unreifen DCs vermehrt exprimiert. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der FLT-1 Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von hypoxischen beziehungsweise LPS stimulierten DCs wäre, dass unter Hypoxie beziehungsweise LPS Stimulation vermehrt VEGF mRNA intrazellulär beziehungsweise vermehrt VEGF im Zellkulturüberstand vorhanden ist. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl im Real- Time- PCR Array als auch im Proteome Profiling gemacht werden. Damit lässt sich aufgrund der Interaktion von VEGF

mit FLT-1 weniger freies FLT-1 im ELISA nachweisen. Damit hängt der Netto-Effekt auf die Angiogenese von der feinen Balance zwischen den vermehrt beziehungsweise vermindert exprimierten pro- und antiangiogen wirkenden Faktoren ab. Ob sich letztendlich ein pro- oder antiangiogener Effekt abzeichnet hängt schlussendlich davon ab, welche Faktoren insgesamt überwiegen. In der Gruppe der unreifen DCs scheinen dies die proangiogenen Faktoren zu sein, da diese Zellpopulation sowohl in vitro als auch in vivo sowohl in der Literatur als auch in der vorliegenden Arbeit eine vermehrte Angiogenese gezeigt haben.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von dendritischen Zellen für die Angiogenese untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag darauf, zu untersuchen, welchen Effekt unreife und reife Dendritische Zellen auf die Angiogenese haben. Darüber hinaus lag ein weiterer Schwerpunkt darauf, die Rolle von Hypoxie auf die DC- getriggerte Angiogenese zu untersuchen. Folgende Erkenntnisse konnten dabei gewonnen werden: Erstens können unreife DCs eine signifikante Zunahme der Angiogenese in vivo bewirken. Diese Beobachtung konnte in zwei verschiedenen in vivo Modellen der Angiogenese gemacht werden. Einerseits konnte im Hindlimb- Ischämie Modell, einem Modell der Hypoxie- induzierten Angiogenese, beobachtet werden, dass die Depletion von DCs zu einer signifikanten Abnahme der Angiogenese im operierten Bein führt im Vergleich zum Wildtyp, bei dem keine Depletion durchgeführt worden war. Darüber hinaus konnte in einem Wachstumsfaktor getriggerten Modell der Angiogenese, dem Matrigel- Modell ebenfalls eine deutliche Zunahme der Angiogenese nach Zugabe von konditioniertem Zellkulturmedium von unreifen DCs beobachtet werden. Zweitens konnten weitere in vitro Untersuchungen von Endothelzellfunktionen wie Proliferation, Migration und Tube Formation zeigen, dass unreife DCs eine signifikante Zunahme der Proliferation und Migration von Endothelzellen bewirken. Außerdem zeigen unreife DCs eine Tendenz, die Fähigkeit von Endothelzellen, endotheliale Tubes zu bilden, zu verstärken. Drittens wurde mittels Analysen auf RNA- und Proteinebene untersucht, welche von DCs produzierten Faktoren für die Modulation der Angiogenese eine Rolle spielen könnten. Dabei fanden sich in den Untersuchungen mittels Proteome Profiling, ELISA und Real- Time- PCR mehrere mögliche Kandidaten. Zum Beispiel fand sich im Proteome Profiling CXCL10 als antiangiogen wirkendes Protein, dass vor allem von reifen DCs produziert wird. Andererseits fand sich in der Real- Time- PCR eine vermehrte Expression von FLT-1 in der Gruppe der unreifen DCs. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle der identifizierten Faktoren in der durch DCs getriggerten Angiogenese zu untersuchen.

LITERATURVERZICHNIS

1. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
2. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 932-6.
3. Yi, M., et al., Antiangiogenic proteins require plasma fibronectin or vitronectin for in vivo activity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11435-8.
4. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-93.
5. Rüegg, C., et al., *Antiangiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs*. Biochimica et biophysica acta, 2006. **1765**(2): p. 155-177.
6. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(4): p. 201-7.
7. Yang, J.C., et al., A Randomized Trial of Bevacizumab, an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody, for Metastatic Renal Cancer. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(5): p. 427-434.
8. Saltz, L.B., et al., Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 2013-9.
9. Jyothi, S., et al., Intravitreal bevacizumab (Avastin) for age-related macular degeneration: a critical analysis of literature. Eye (Lond), 2010. **24**(5): p. 816-24.
10. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE : I. MORPHOLOGY, QUANTITATION, TISSUE DISTRIBUTION. The Journal of Experimental Medicine, 1973. **137**(5): p. 1142-1162.
11. Steinman, R.M., et al., Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. J Exp Med, 1979. **149**(1): p. 1-16.
12. Durai, V. and K.M. Murphy, *Functions of Murine Dendritic Cells*. Immunity, 2016. **45**(4): p. 719-736.
13. Jung, S., et al., In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
14. Hume, D.A., *Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(9): p. 5829-5835.

15. Pühr, S., et al., *Dendritic cell development—History, advances, and open questions*. *Seminars in Immunology*, 2015. **27**(6): p. 388-396.
16. Merad, M., et al., The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 563-604.
17. Heath, W.R. and F.R. Carbone, Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol*, 2009. **10**(12): p. 1237-44.
18. Vremec, D., et al., *CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen*. *The Journal of Immunology*, 2000. **164**(6): p. 2978-2986.
19. del Rio, M.-L., et al., CD103⁻ and CD103⁺ Bronchial Lymph Node Dendritic Cells Are Specialized in Presenting and Cross-Presenting Innocuous Antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, 2007. **178**(11): p. 6861-6866.
20. Grouard, G., et al., The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand. *The Journal of Experimental Medicine*, 1997. **185**(6): p. 1101-1112.
21. Cella, M., et al., Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*, 1999. **5**(8): p. 919-23.
22. Leon, B., M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 519-31.
23. Fogg, D.K., et al., A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*, 2006. **311**(5757): p. 83-87.
24. Hettinger, J., et al., *Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor*. *Nature Immunology*, 2013. **14**: p. 821.
25. Onai, N., et al., Identification of clonogenic common Flt3⁺M-CSFR⁺ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol*, 2007. **8**(11): p. 1207-16.
26. Naik, S.H., et al., Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol*, 2007. **8**(11): p. 1217-26.
27. Onai, N., et al., A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity*, 2013. **38**(5): p. 943-957.
28. Naik, S.H., et al., Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nature Immunology*, 2006. **7**: p. 663.

29. Liu, K., et al., In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*, 2009. **324**(5925): p. 392-7.
30. Lundie, R.J., et al., Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8⁺ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 α ⁺ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(38): p. 14509-14514.
31. Mount, A.M., et al., Multiple Dendritic Cell Populations Activate CD4⁺ T Cells after Viral Stimulation. *PLOS ONE*, 2008. **3**(2): p. e1691.
32. Bedoui, S., et al., Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells. *Nature Immunology*, 2009. **10**: p. 488.
33. Schlitzer, A., et al., Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat Immunol*, 2015. **16**(7): p. 718-28.
34. Maraskovsky, E., et al., Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996. **184**(5): p. 1953-1962.
35. Karsunky, H., et al., Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 2003. **198**(2): p. 305-13.
36. Lutz, M.B., et al., Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(7): p. 1813-22.
37. McKenna, H.J., et al., Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*, 2000. **95**(11): p. 3489-97.
38. Lutz, M.B., et al., An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, 1999. **223**(1): p. 77-92.
39. Inaba, K., et al., Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 1992. **176**(6): p. 1693-1702.
40. Strioga, M., et al., *Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance*. *Innate Immun*, 2013. **19**(1): p. 98-111.
41. Jung, S., et al., In Vivo Depletion of CD11c⁺ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8⁺ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity*, 2002. **17**(2): p. 211-220.

42. Asselin-Paturel, C., et al., Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol*, 2001. **2**(12): p. 1144-50.
43. Mayer, J.U., et al., Different populations of CD11b+ dendritic cells drive Th2 responses in the small intestine and colon. *Nature Communications*, 2017. **8**: p. 15820.
44. Plantinga, M., et al., Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 322-335.
45. Fainaru, O., et al., Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells. *FASEB J*, 2010. **24**(5): p. 1411-8.
46. Iwamoto, M., et al., Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*, 2003. **104**(1): p. 92-7.
47. Nakai, K., et al., *Dendritic cells augment choroidal neovascularization*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(8): p. 3666-70.
48. Fainaru, O., et al., Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J*, 2008. **22**(2): p. 522-9.
49. Plaks, V., et al., Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest*, 2008. **118**(12): p. 3954-65.
50. Barrientos, G., et al., CXCR4(+) dendritic cells promote angiogenesis during embryo implantation in mice. *Angiogenesis*, 2013. **16**(2): p. 417-27.
51. Mei-Dan, E., et al., Proangiogenic immature myeloid cells populate the human placenta and their presence correlates with placental and birthweight. *Am J Obstet Gynecol*, 2012. **207**(2): p. 141.e1-5.
52. Fainaru, O., S. Hantisteanu, and M. Hallak, *Immature myeloid cells accumulate in mouse placenta and promote angiogenesis*. *Am J Obstet Gynecol*, 2011. **204**(6): p. 544.e18-23.
53. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(1): p. 38-47.
54. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 677-84.
55. Cramer, T., et al., HIF-1 α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. *Cell*, 2003. **112**(5): p. 645-657.
56. Barata, P.C. and B.I. Rini, *Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions*. *CA Cancer J Clin*, 2017. **67**(6): p. 507-524.
57. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-252.

58. Granucci, F., et al., *Early events in dendritic cell maturation induced by LPS*. *Microbes Infect*, 1999. **1**(13): p. 1079-84.
59. Jantsch, J., et al., Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4697-705.
60. Jantsch, J., et al., Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 2011. **90**(3): p. 551-562.
61. Winning, S. and J. Fandrey, Dendritic Cells under Hypoxia: How Oxygen Shortage Affects the Linkage between Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res*, 2016. **2016**: p. 5134329.
62. Plendl, J., F. Sinowatz, and R. Auerbach, A transformed murine myocardial vascular endothelial cell clone: characterization of cells in vitro and of tumours derived from clone in situ. *Virchows Arch*, 1995. **426**(6): p. 619-28.
63. Liang, C.-C., A.Y. Park, and J.-L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protocols*, 2007. **2**(2): p. 329-333.
64. Rodriguez, L., X. Wu, and J.-L. Guan, *Wound-Healing Assay*, in *Cell Migration*, J.-L. Guan, Editor. 2005, Humana Press. p. 23-29.
65. Kubota, Y., et al., Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, 1988. **107**(4): p. 1589-98.
66. Kleinman, H.K., et al., Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 1982. **21**(24): p. 6188-93.
67. Arnaoutova, I. and H.K. Kleinman, In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protocols*, 2010. **5**(4): p. 628-635.
68. Langer, H.F., et al., Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood*, 2010. **116**(22): p. 4395-403.
69. Krock, B.L., N. Skuli, and M.C. Simon, *Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil*. *Genes & Cancer*, 2011. **2**(12): p. 1117-1133.
70. Xin, X., et al., Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol*, 2001. **158**(3): p. 1111-20.
71. Fang, C., et al., An important role of matrix metalloproteinase-8 in angiogenesis in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res*, 2013. **99**(1): p. 146-55.

72. Wu, M.H., et al., Endothelin-1 promotes vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Oncogene*, 2014. **33**(13): p. 1725-35.
73. Bodnar, R.J., et al., *IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels*. *Journal of Cell Science*, 2009. **122**(12): p. 2064-2077.
74. Simantov, R., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biol*, 2005. **24**(1): p. 27-34.
75. Hueso, L., et al., Upregulation of angiostatic chemokines IP-10/CXCL10 and I-TAC/CXCL11 in human obesity and their implication for adipose tissue angiogenesis. *International Journal of Obesity*, 2018. **42**(8): p. 1406-1417.
76. Gotsch, F., et al., *CXCL10/IP-10: A MISSING LINK BETWEEN INFLAMMATION AND ANTI-ANGIOGENESIS IN PREECLAMPSIA?* The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians, 2007. **20**(11): p. 777-792.
77. Salven, P., et al., Interleukin-1 α promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *The FASEB Journal*, 2002. **16**(11): p. 1471-1473.
78. Saijo, Y., et al., Proinflammatory Cytokine IL-1 β Promotes Tumor Growth of Lewis Lung Carcinoma by Induction of Angiogenic Factors: In Vivo Analysis of Tumor-Stromal Interaction. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(1): p. 469.
79. Bergers, G., et al., Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(10): p. 737-44.
80. Rusnati, M., et al., Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*, 2004. **104**(1): p. 92-9.
81. Sahin, H., et al., Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis-associated angiogenesis in mice. *Hepatology*, 2012. **55**(5): p. 1610-1619.
82. Liu, X., et al., FGFR3 promotes angiogenesis-dependent metastasis of hepatocellular carcinoma via facilitating MCP-1-mediated vascular formation. *Medical Oncology*, 2016. **33**(5): p. 46.
83. Leelahavanichkul, K., et al., A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Molecular Oncology*, 2014. **8**(1): p. 105-118.
84. Good, D.J., et al., A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(17): p. 6624.

85. Miyake, M., et al., Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. *Laboratory Investigation*, 2013. **93**: p. 768.
86. Lee, S., et al., Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell*, 2007. **130**(4): p. 691-703.
87. van der Horst, E.H., et al., *The Growth Factor Midkine Antagonizes VEGF Signaling In Vitro and In Vivo*. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 2008. **10**(4): p. 340-346.
88. Zhang, Y., et al., Adrenomedullin promotes angiogenesis in epithelial ovarian cancer through upregulating hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor. *Scientific Reports*, 2017. **7**: p. 40524.
89. Rojiani, M.V., et al., *Expression of MMP-2 correlates with increased angiogenesis in CNS metastasis of lung carcinoma*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2010. **3**(8): p. 775-781.
90. Wang, J., et al., A Glycolytic Mechanism Regulating an Angiogenic Switch in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 2007. **67**(1): p. 149.
91. Pandit, A.S., et al., Stimulation of angiogenesis by FGF-1 delivered through a modified fibrin scaffold. *Growth Factors*, 1998. **15**(2): p. 113-23.
92. Sahni, A., et al., FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 126.
93. Richardson, M., et al., Viral serpin, Serp-1, inhibits endogenous angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Cardiovascular Pathology*, 2007. **16**(4): p. 191-202.
94. Ikeda, T., et al., Hypoxia down-regulates sFlt-1 (sVEGFR-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mRNA alternative processing. *Biochemical Journal*, 2011. **436**(2): p. 399-407.
95. Silvestre, J.S., et al., Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res*, 2000. **87**(6): p. 448-52.
96. Haskell, H., et al., Focal Adhesion Kinase Is Expressed in the Angiogenic Blood Vessels of Malignant Astrocytic Tumors &in vivo& and Promotes Capillary Tube Formation of Brain Microvascular Endothelial Cells. *Clinical Cancer Research*, 2003. **9**(6): p. 2157.
97. Zhang, M., et al., CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Scientific Reports*, 2017. **7**: p. 8289.
98. Amin, M.A., et al., Interleukin 18 induces angiogenesis in vitro and in vivo via Src and Jnk kinases. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(12): p. 2204-12.

99. Marconcini, L., et al., *c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(17): p. 9671-9676.
100. Limbourg, A., et al., Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc*, 2009. **4**(12): p. 1737-46.
101. DeLisser, H.M., et al., *Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis*. *The American Journal of Pathology*, 1997. **151**(3): p. 671-677.
102. Gundacker, N.C., et al., Cytoplasmic proteome and secretome profiles of differently stimulated human dendritic cells. *J Proteome Res*, 2009. **8**(6): p. 2799-811.
103. Macatonia, S.E., et al., Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *The Journal of Immunology*, 1995. **154**(10): p. 5071-5079.
104. Winzler, C., et al., *Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor-dependent Long-Term Cultures*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1997. **185**(2): p. 317-328.
105. Blengio, F., et al., The hypoxic environment reprograms the cytokine/chemokine expression profile of human mature dendritic cells. *Immunobiology*, 2013. **218**(1): p. 76-89.
106. Bosco, M.C., et al., Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology*, 2008. **213**(9-10): p. 733-749.
107. Elia, A.R., et al., Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(6): p. 1472-82.
108. Mancino, A., et al., *Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions*. *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3723-34.
109. Campanella, G.S.V., R.A. Colvin, and A.D. Luster, *CXCL10 Can Inhibit Endothelial Cell Proliferation Independently of CXCR3*. *PLOS ONE*, 2010. **5**(9): p. e12700.
110. Kishuku, M., et al., Expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in human monocyte-derived mature dendritic cells contributes to their antiangiogenic property. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 8176-85.
111. Eubank, T.D., et al., GM-CSF Induces Expression of Soluble VEGF Receptor-1 from Human Monocytes and Inhibits Angiogenesis in Mice. *Immunity*, 2004. **21**(6): p. 831-842.

112. Eubank, T.D., et al., M-CSF Induces Vascular Endothelial Growth Factor Production and Angiogenic Activity From Human Monocytes. *The Journal of Immunology*, 2003. **171**(5): p. 2637-2643.
113. Shibuya, M., Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer*, 2011. **2**(12): p. 1097-1105.
114. Ahmad, S., et al., Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis. *Vascular Cell*, 2011(1): p. 15%V 3.
115. Levine, R.J., et al., *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(7): p. 672-83.
116. Amano, H., et al., The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Signaling in the Recovery from Ischemia. *PLOS ONE*, 2015. **10**(7): p. e0131445.
117. Mezger, M., et al., *Platelets and vascular inflammation of the brain*. *Hamostaseologie*, 2015. **35**(3): p. 244-51.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Überblick über die verschiedenen DC Subtypen der Maus und ihre Entwicklung (Nach S. Puhr et al. 2015 [15]).....	8
Abbildung 2: Laser Doppler Analyse aus dem Modell der Hind- Limb- operierten Mäuse.....	36
Abbildung 3: Repräsentative Bilder der nichtinvasiven Durchblutungsmessungen mittels Laser Doppler der Versuchsgruppe sowie der Kontrollgruppe.	37
Abbildung 4: Unreife DCs führten zu einer signifikanten Zunahme von Endothelzellen im Matrigel.	38
Abbildung 5: Beispielbilder der analysierten Matrigel- Plugs.....	40
Abbildung 6: Zellkulturüberstand von unreifen DCs führt zu signifikant mehr Proliferation von Endothelzellen.	41
Abbildung 7: Zellkulturüberstand von unreifen DCs führt zu einer signifikanten Steigerung der Migration von Endothelzellen.....	43
Abbildung 8: Repräsentative Bilder des Scratch Assays am Anfangszeitpunkt sowie nach 8- stündiger Inkubation mit den angegebenen Zellkulturüberständen von DCs.....	44
Abbildung 9: Unreife DCs haben eine Tendenz die Tube Formation von Endothelzellen zu fördern.....	45
Abbildung 10: Repräsentative Bilder der Tube Formation nach 12- stündiger Inkubation mit den angegebenen Zellkulturüberständen von DCs.....	46
Abbildung 11: Im konditionierten Zellkulturmedium von dendritischen Zellen sind verschiedene pro- und antiangiogene Faktoren enthalte	50
Abbildung 12: In den Lysaten von dendritischen Zellen sind verschiedene pro- und antiangiogene Faktoren enthalten	53
Abbildung 13: RNA Qualitäten (RIN) in der Analyse durch die Abteilung für medizinische Genetik.	56
Abbildung 14: RNA Qualitäten (RIN) in der Analyse durch die Abteilung für medizinische Genetik.	57
Abbildung 15: LPS Stimulation führt zu einer signifikanten Steigerung der CXCL10 Konzentration im konditionierten Zelkulturmedium der DCs.....	64

Abbildung 16: Das konditionierte Zellkulturmedium von unreifen DCs enthält signifikant mehr FLT-1 als das konditionierte Zellkulturmedium von reifen DCs oder von hypoxischen DCs.....65

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Laser Doppler Analyse der Hindlimb- operierten Mäuse. Tabellarische Übersicht der mittels nichtinvasivem Laser- Doppler gemessenen Durchblutung am operierten Bein im Verhältnis zum nicht operiertem Bein.....	37
Tabelle 2: Übersicht der Pixeldichte der einzelnen für die Angiogenese relevanten Proteine im DC Überstand im Proteom Profiler (N=2).....	48
Tabelle 3: Übersicht der Pixeldichte der einzelnen für die Angiogenese relevanten Proteine in den Lysaten der DC im Proteom Profiler (N=2).....	51
Tabelle 4: Im Proteome Profiling vermehrt in den Lysaten und im Zellkulturüberstand nachgewiesene Proteine.....	55
Tabelle 5: Übersicht über die RNA Qualitäten der für die Real- Time- PCR verwendeten RNAs.....	56
Tabelle 6: Übersicht über die mittels RT- PCR analysierten RNAs.....	57
Tabelle 7: Vermehrt exprimierte RNAs der LPS stimulierten DCs im Vergleich zu den unstimulierten DCs	60
Tabelle 8: Vermehrt exprimierte RNAs der unstimulierten hypoxischen DCs im Vergleich zu den unstimulierten DCs	60
Tabelle 9: vermehrt exprimierte RNAs der LPS stimulierten hypoxischen DCs im Vergleich zu den unstimulierten DCs	61
Tabelle 10: Übersicht über die in den verschiedenen Versuchsgruppen im Angiogenese Array vermehrt exprimierten Faktoren sowie die in der Literatur beschriebenen Effekte auf die Angiogenese.....	62

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig angefertigt zu haben und nur die erlaubten Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kardiologie unter Betreuung von Professor Dr. Harald Langer durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Dr. Harald Langer und Dr. Henry Nording.

Sämtliche Experimente wurden von mir nach gründlicher und sorgfältiger Einarbeitung durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe eigenständig durchgeführt. Die Tierversuche wurden durch mich nach erfolgreichem Bestehen des versuchstierkundlichen Privatissimums sowie nach Genehmigung der Anträge an der Universität Tübingen durchgeführt.

Ebenso erfolgte die Auswertung der Experimente sowie die statistische Analyse der Daten durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Schönaich, den 15.10.2018

Matthias Mezger