

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Einfluss von verschiedenen strukturierten 3D-Poly(2-oxazolin) Scaffolds
auf die Proteinexpression humaner Makrophagen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Robin Fernández González
aus Schefflenz

Würzburg, November 2019



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2020

Der Promovend ist Zahnarzt

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

—

dafür, dass ihr mir so viel ermöglicht habt

„Da steh ich nun, ich armer Tor!
Und bin so klug als wie zuvor;“

Johann Wolfgang von Goethe – Faust I

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Monozyten und Makrophagen.....	2
1.1.2 M1- & M2- Makrophagen und deren Unterschiede	3
1.2 Fremdkörperreaktionen bei Biomaterialien.....	6
1.2.1 Möglichkeiten der Beeinflussung von Makrophagen in Bezug auf Fremdkörperreaktionen	7
1.3 Poly(2-oxazolin)	9
1.3.1 POx und seine biologischen Eigenschaften.....	10
1.3.2 Melt Electro Writing	12
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Material	15
2.1.1 Technische Geräte und verwendete Hilfsmittel.....	15
2.1.2 Verwendete Chemikalien	17
2.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
2.1.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.5 Verwendete Kits.....	23
2.1.6 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	26
2.1.7 Statistik	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Vorbehandlung der PnPrOx-Scaffolds.....	28
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.2.1 Isolation von PBMCs aus Buffy-Coat.....	28
2.2.2.2 Isolation von Monozyten durch Negativselektion.....	29
2.2.2.3 Kultivierung humaner Monozyten auf PnPrOx-Oberflächen.....	30

2.2.3	Western Blot.....	30
2.2.3.1	Proteinisolierung	31
2.2.3.2	Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.....	31
2.2.3.3	Durchführung der SDS-PAGE	32
2.2.3.4	Proteintransfer	32
2.2.3.5	Proteinnachweis mittels Immundetektion	33
2.2.3.6	Auswertung der Western Blot Filme.....	34
2.2.4	ELISA.....	34
2.2.4.1	Bestimmung des DNA-Gehalts	35
2.2.4.2	Durchführung der ELISAs.....	36
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Messung des DNA-Gehalts	38
3.2	Zytokinsekretions-Profil von Makrophagen nach Kultivierung auf verschiedenen PnPrOx-Oberflächen	39
3.2.1	Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-1 β	39
3.2.2	Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-6	40
3.2.3	Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-8	42
3.2.4	Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-10	43
3.3	Expression spezifischer M2-Makrophagen Oberflächenmarker nach Kultivierung auf verschiedenen PnPrOx-Oberflächen	45
3.3.1	Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Expression von CD163 ..	45
3.3.2	Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Expression von CD206 ..	47
4	DISKUSSION	49
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	LITERATURVERZEICHNIS	59

APPENDIX

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	alpha
β	beta
γ	gamma
A	Ampere
ACC	Beschleunigung (engl. acceleration)
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
Da	Dalton
DEC	Abbremsung (engl. deceleration)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBR	Fremdkörperreaktion (engl. foreign body reaction)
Fisher-LSD	Fisher - Least Significant Difference
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagenkolonien-stimulierenden Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
KCl	Kaliumchlorid

LCST	untere kritische Lösungstemperatur (engl. lower critical solution temperature)
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Masse
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor
MEW	Melt Electro Writing
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
PBMC	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cell)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBuOx	Poly(2-butyl-2-oxazolin)
PcycloPrOx	Poly(2-cyclopropyl-2-oxazolin)
PEG	Poly(ethylenglykol)
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PEtOx	Poly(2-ethyl-2-oxazolin)
pH	negativ-dekadischer Logarithmus d. Protonenkonzentration
PnPrOx	Poly(2-n-propyl-2-oxazolin)
POx	Poly(2-oxazolin)
PPrOx	Poly(2-propyl-2-oxazolin)
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute - 1640
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20

TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
W	Watt
wt %	Gewichtsprozent (engl. weight percent)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zellen	15
Tabelle 2: Übersicht verwendeter Arbeitsgeräte und sonstiger Hilfsmittel	15
Tabelle 3: Übersicht verwendeter Chemikalien	17
Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels	20
Tabelle 5: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 6: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 7: Übersicht verwendeter Kits.....	23
Tabelle 8: Übersicht verwendeter Primärantikörper	26
Tabelle 9: Übersicht aller verwendeter Sekundärantikörper.....	26
Tabelle 10: Verdünnungen der Proben für die jeweiligen ELISA-Kits	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung von Monozyten.	2
Abbildung 2: Polarisierung von Makrophagen.	4
Abbildung 3: Strukturformel von Poly(2-oxazolin).....	10
Abbildung 4: Die Strukturähnlichkeit von PEG, POx und natürlich vorkommenden Polypeptiden.	10
Abbildung 5: verschiedene stereo-/rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PnPrOx-Scaffolds.	13
Abbildung 6: DNA-Menge pro Probe.	38
Abbildung 7: IL-1 β pro DNA.....	40
Abbildung 8: IL-6 pro DNA.....	41
Abbildung 9: IL-8 pro DNA.....	43
Abbildung 10: IL-10 pro DNA.....	44
Abbildung 11: relative Expression von CD163.	46
Abbildung 12: repräsentative Proteinbanden des Immunoblots von CD163. ...	46
Abbildung 13: relative Expression von CD206.	47
Abbildung 14: repräsentative Proteinbanden des Immunoblots von CD206 ...	48
Abbildung 15: REM-Aufnahmen nach sieben Tagen der Kultivierung von Monozyten/Makrophagen auf unterschiedlichen PnPrOx-Oberflächen.....	56

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem (lat. immunis – unberührt, rein) dient dem Schutz und der Integrität des Organismus. Es bewahrt den Körper zum einen vor äußeren Einflüssen wie Viren, Bakterien oder anderen Fremdstoffen, zum anderen schützt es den Organismus vor endogenen Gefahren, wie z.B. körpereigenen, maligne entarteten Zellen. Wichtige Voraussetzung für diesen effektiven Schutz ist die Fähigkeit des Immunsystems, infektiös verändertes oder entartetes Körpergewebe, sowie körperfremde Mikroorganismen zu erkennen und gezielt zu beseitigen, ohne dabei gesundes Körpergewebe zu beschädigen [1].

Funktionell wird das Immunsystem in das angeborene und das erworbene Immunsystem unterteilt. Das angeborene Immunsystem ist aus verschiedenen Proteinen und Zelltypen aufgebaut, wie z.B. Komplement-Proteinen, Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen, welche Schutz gegen eindringende Erreger oder Fremdkörper gewährleisten. Diese Zellen sind innerhalb weniger Sekunden für eine rasche Immunreaktion nach Kontakt mit einem Mikroorganismus oder Fremdkörper verantwortlich, nachdem natürliche Barrieren wie Schleimhäute oder Epithelien durchdrungen wurden. Unter anderem sind Neutrophile Granulozyten die ersten Zellen, die in Kontakt mit Fremdstoffen treten. Sie phagozytieren ihn und begehen anschließend Apoptose. Dabei werden Signale freigesetzt, welche weitere Zellen wie Makrophagen zur Entzündungsstelle locken. Bei unbekanntem Erregern können Makrophagen Mediatoren freisetzen, wodurch ebenfalls das erworbene Immunsystem aktiviert werden kann [2].

Das erworbene Immunsystem, zu welchem hauptsächlich B- und T-Zellen zählen, erzeugt einen auf den Krankheitserreger spezifischen Antigen-Antikörper-Schutz. So können z.B. zytotoxische T-Zellen Erreger oder von Mikroorganismen befallene Körperzellen direkt abtöten, indem sie spezifisch an diesen binden und den programmierten Zelltod in der Zielzelle auslösen. Andere T-Zellen binden Erreger und aktivieren dadurch B-Zellen, welche daraufhin zu Plasmazellen differenzieren und gegen den Erreger spezifische Antikörper

produzieren und freisetzen. Diese Antikörper können an das Pathogen binden und es dadurch neutralisieren oder deren Phagozytose durch Granulozyten oder Makrophagen verstärken. Einige B- und T-Zellen werden dabei zu Gedächtniszellen, welche bei einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger eine schnellere Immunreaktion gewährleisten. Der Schutz des erworbenen Immunsystems ist somit spezifisch und langlebig [3].

1.1.1 Monozyten und Makrophagen

Phagozytische Monozyten sind Teil des angeborenen Immunsystems und entstehen aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) aus dem Knochenmark [4]. Die HSCs entwickeln sich nach Kontakt mit spezifischen Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem Granulozyten/Makrophagenkolonien-stimulierenden Faktor (GM-CSF) oder dem Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF), zu Monoblasten und Promonozyten, die eine Vorstufe von Monozyten darstellen [5]. Anschließend verlassen Monozyten das Knochenmark und treten in den Blutkreislauf ein, dort haben sie eine Lebensdauer von ein bis drei Tagen (Abb. 1) [6].

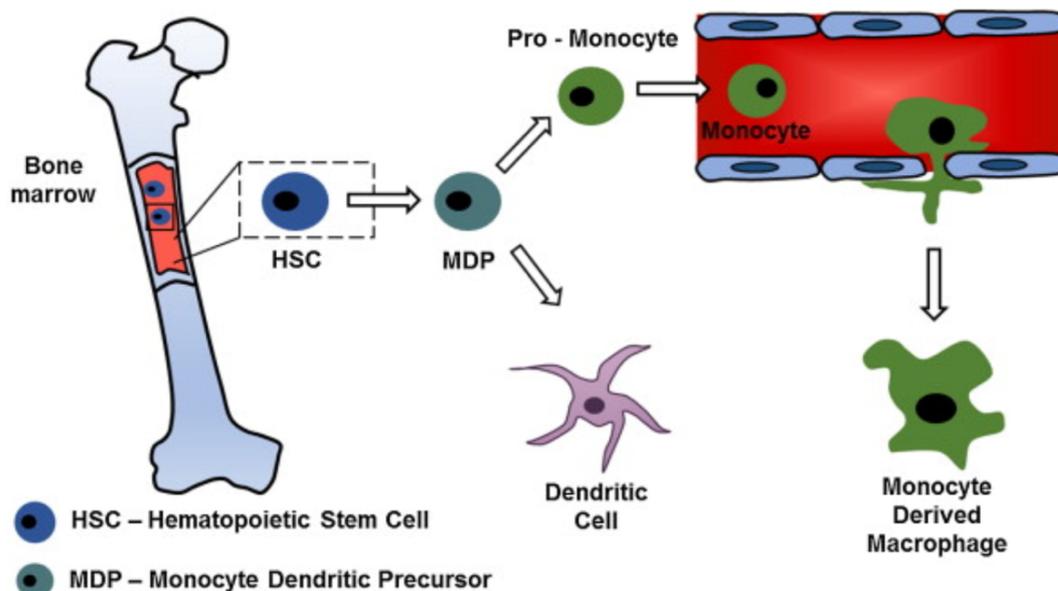


Abbildung 1: Entwicklung von Monozyten. Die im Knochenmark gebildeten HSCs entwickeln sich über mehrere Vorstufen, darunter MDPs, zu Dendritischen Zellen oder Promonozyten. Nach Entwicklung von Promonozyten in Monozyten können diese in den Blutstrom eintreten und sich anschließend durch Einwanderung in Gewebe zu Makrophagen differenzieren. (modifiziert nach Sridharan *et al.* [7]) (Nutzung mit Erlaubnis des Elsevier Verlags)

Bei entzündlichen Reaktionen wandern Monozyten, induziert durch die Bildung und Freisetzung chemotaktischer Moleküle, aus dem Blut in das betroffene Gewebe ein. Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen und lösen eine Immunreaktion aus [6, 8]. Somit bilden Makrophagen eine Abwehrlinie gegen Mikroorganismen und sorgen als Immuneffektorzellen dafür, dass weitere Immunzellen an den Ort der Entzündung gelockt werden: Durch Phagozytose der Pathogene und der Präsentation dieser auf ihrer Zelloberfläche setzen sie auch das erworbene Immunsystem in Gang. Folglich sind Makrophagen auch ein wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem [2]. Zusätzlich gehören sie zu den sekretorisch aktivsten Zellen des Immunsystems und sind für die Freisetzung vieler biologisch aktiver Substanzen verantwortlich, wodurch sie die Fähigkeit besitzen, immunologische Prozesse in eine bestimmte Richtung zu lenken. Sobald die pathogenen Stoffe bekämpft sind, können sie sowohl die Immunantwort herunterregulieren, um gesundes Gewebe zu schützen, als auch die Wundheilung und die Angiogenese initiieren und fördern [9].

1.1.2 M1- & M2- Makrophagen und deren Unterschiede

Jede Art von Trauma, welches zu lokalen Gewebeveränderungen führt, hat eine schnelle Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut und dadurch eine Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen zur Folge [10, 11]. Makrophagen weisen eine sehr hohe Zellplastizität auf, reagieren überaus empfindlich auf verschiedene Mediatoren wie Chemokine, Zytokine oder Oberflächenrezeptoren und sind aufgrund ihrer Heterogenität und ihres Differenzierungspotenzials schwer einzugrenzen. Grundsätzlich lassen sich Makrophagen in zwei Typen unterscheiden: Auf der einen Seite befinden sich die klassisch aktivierten M1-Makrophagen und auf der anderen Seite die alternativ aktivierten M2-Makrophagen (Abb. 2) [12, 13]. M1- und M2-Makrophagen bilden jedoch keine final ausdifferenzierten Endstadien ihrer Entwicklung, sondern können, je nach ihrer Umgebungsstruktur und dem biochemischen Umfeld, ihre Form und Funktion ändern [14, 15]. Diese beiden Aktivierungswege spiegeln

daher wohl nur die entferntesten Positionen des Differenzierungspotentials von Makrophagen wieder [16].

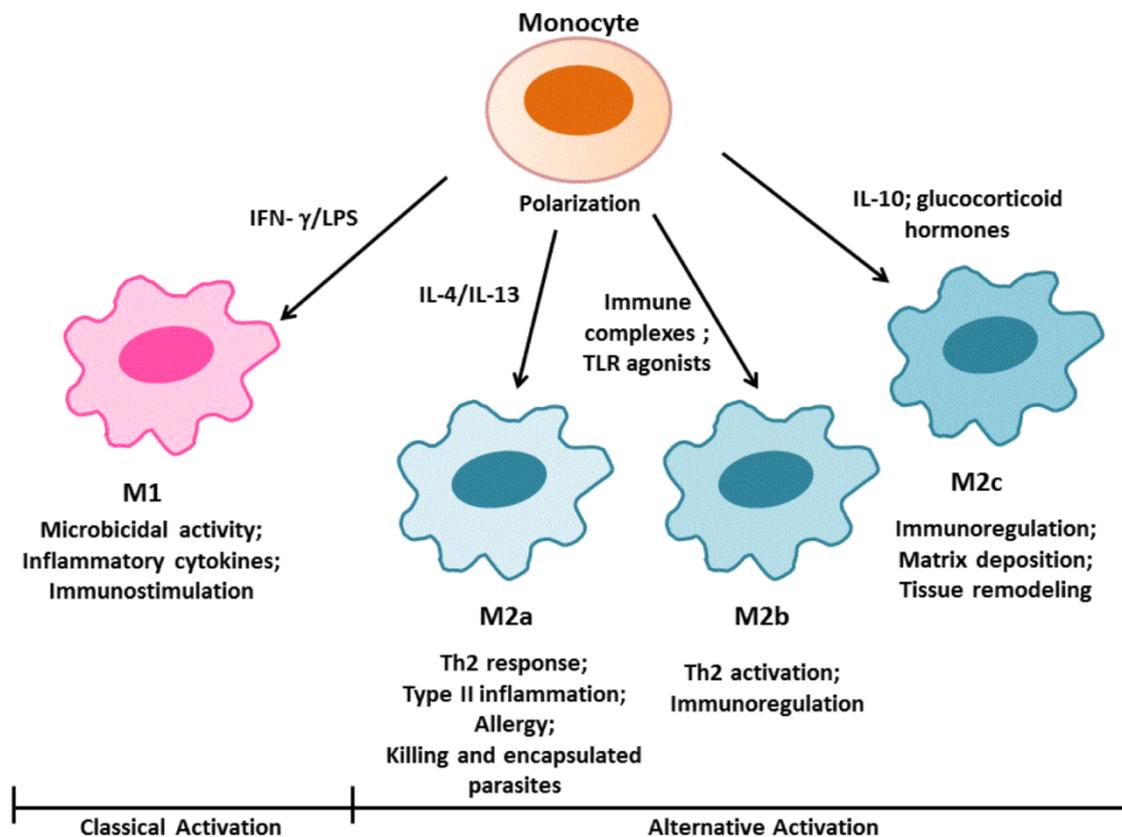


Abbildung 2: Polarisierung von Makrophagen. Makrophagen polarisieren sich je nach Stimulus in den entzündungsfördernden M1-Typ oder den entzündungshemmenden M2-Typ. Der M2-Typ kann in weitere Subtypen unterteilt werden. (modifiziert nach Zanlucchi *et al.* [17]) (freie Nutzung dank CC-BY Lizenz; Urheber: Zanlucchi NG, *et al.*)

Die wesentliche Aufgabe von M1-Makrophagen ist neben der Abwehr von Mikroorganismen eine erhöhte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Sie werden daher als entzündungsfördernd bezeichnet. Die Differenzierung in diesen Typ kann durch den Kontakt mit Interferon- γ (IFN- γ), einem immunstimulierenden Zytokin [18], oder Lipopolysacchariden (LPS) [19], einer endotoxischen Zucker-Lipidverbindung in bakteriellen Zellwänden, erfolgen. Kennzeichnend für M1-Makrophagen ist eine erhöhte Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie bspw. des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 und die Expression spezifischer Oberflächenmarker, wie z.B. der Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II), das Cluster of Differentiation (CD)

80 und CD86 [20-22]. Sie besitzen die Fähigkeit, intrazelluläres Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikale zu produzieren, um auf diese Weise potentiell gefährliche Pathogene direkt abzutöten, können dabei allerdings bei einer überhöhten Reaktion umliegendes, gesundes Gewebe schädigen [19, 20, 23].

M2-Makrophagen hingegen wirken immunsuppressiv und entzündungshemmend. Sie fördern zudem, z.B. nach einer überstandenen Infektion, die Wundheilung und die Angiogenese [24, 25]. Der anti-inflammatorische M2-Makrophagentyp kann in weitere Subpopulationen mit jeweils spezifischen Eigenschaften und Aufgaben unterteilt werden: u.a. in den M2a-, M2b- und M2c-Typ [11, 26, 27]. M2a-Makrophagen, induziert durch IL-4 und / oder IL-13, bekämpfen Parasiten und treten bei allergischen Reaktionen auf [28]. M2b-Makrophagen, induziert durch bspw. Immunkomplexe und / oder LPS, können mit B-Zellen des erworbenen Immunsystems interagieren [22], haben sowohl pro- (u.a. Sekretion von TNF- α) als auch anti-inflammatorische (u.a. Sekretion von IL-10) Funktionen und können daher immunregulatorisch wirken [26, 29, 30]. M2c-Makrophagen, induziert durch den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) oder IL-10, wirken immunsuppressiv und spielen eine wichtige Rolle für den Umbau der extrazellulären Matrix. Sie können eine entzündliche Reaktion eindämmen, indem sie TGF- β und IL-10 sezernieren [26, 27]. Ein grundlegender Unterschied des M2-Typs zu den M1-Makrophagen ist die deutlich erhöhte Sekretion anti-inflammatorischer Mediatoren, wie IL-4, IL-10 und TGF- β [20, 31, 32]. Außerdem sind M2-Makrophagen durch eine gesteigerte Expression der beiden Oberflächenmarker CD163 (Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor) und CD206 (Mannose-Rezeptor) gekennzeichnet [33-35]. Die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und IL-6, wird bei M2-Makrophagen deutlich herunterreguliert [20].

Zusätzlich werden zur heterogenen Gruppe der M2-Makrophagen der M2d-Typ, induziert durch IL-6, atypische Makrophagen, induziert durch IL-33, tumor-assoziierte sowie ortsständige Makrophagen gezählt [35]. Diese ortsständigen Makrophagen sind in Morphologie und Funktion an ihre jeweilige Umgebung angepasst. Folglich hat das umliegende Gewebe einen großen Einfluss auf die

Polarisierung von Makrophagen [36]. So weisen Alveolarmakrophagen in der Lunge eine hohe Expression des Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor CD163 auf und sind darauf spezialisiert, exogene Substanzen wie Fremdpartikel, Bakterien oder Viren zu beseitigen [37]. Osteoklasten, ortsständige Makrophagen im Knochengewebe, sind u.a. in der Lage, Knochenstrukturen umzubauen [38]. Ortsständige Makrophagen können im Gewebe Wochen bis mehrere Jahre überleben [6].

1.2 Fremdkörperreaktionen bei Biomaterialien

Ein Biomaterial ist ein Stoff oder eine Substanz, welche entwickelt wurde, damit diese, alleine oder als Teil eines komplexen Systems, die physiologischen Funktionen und Eigenschaften von zerstörtem oder degeneriertem Gewebe im menschlichen Körper wiederherstellt oder in einen dem Ursprung gleichwertigen Zustand bringt, z.B. in Form eines Zahnimplantates zur Wiederherstellung der physiologischen Kaufunktion. Dabei soll es, aus diagnostischer und therapeutischer Sicht betrachtet, den Genesungsprozess voranbringen, indem es nach seiner Implantation die biologischen Prozesse, wie z.B. die Immunantwort des Patienten, beeinflussen und dabei positiv verändern kann [7, 39].

Eine Fremdkörperreaktion (engl. foreign body reaction - FBR) ist die Immunantwort eines Wirts auf ein Biomaterial, z.B. ein Polymer, welches mehr oder weniger resistent gegen seinen Abbau durch Immunzellen ist [40]. Nach Implantation eines Biomaterials in vaskularisiertes Gewebe bildet sich auf dessen Oberfläche innerhalb weniger Minuten eine provisorische Matrix, die aus adsorbierten Proteinen des Komplementsystems, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Blutbestandteilen und chemotaktischen Molekülen besteht. In Kombination mit Fibrin und Thrombozyten bildet diese provisorische Matrix einen Thrombus, der die Grenzfläche zwischen dem frisch implantierten Biomaterial und dem körpereigenen Gewebe bildet [41]. Durch die Anwesenheit von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen in der Matrix kommt es zur Einwanderung von Zellen des Immunsystems, wie bspw. Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten, die daraufhin eine

akute Entzündungsreaktion auslösen. Weiterhin kennzeichnend für eine akute Entzündungsreaktion ist eine erhöhte Ausschüttung von Histamin am Ort der Verletzung durch Mastzellen, wodurch sich die Gefäße erweitern und die Blutversorgung am Ort der Entzündung gesteigert wird [42, 43]. An die Phase der akuten Entzündung, die sich für gewöhnlich rasch auflöst, schließt sich eine kurze Phase der chronischen Entzündung an, für die die Anwesenheit von Lymphozyten und Plasmazellen charakteristisch ist. Nachdem sich die Entzündung aufgelöst hat, entsteht durch Neovaskularisation und die Einwanderung von Fibroblasten Granulationsgewebe. Am Ende der Einheilungsphase hat sich zwischen Biomaterial bzw. Implantat und Granulationsgewebe eine fibröse Kapsel gebildet [41, 44].

Makrophagen spielen bei einer FBR eine zentrale Rolle, da sie einen großen Einfluss auf die Einheilung des Biomaterials haben. Überwiegen proinflammatorische M1-Makrophagen, kann sich die Phase der chronischen Entzündungsreaktion deutlich verlängern, was mit einer erhöhten Fibrosierung und Narbenbildung einhergeht, sowie zu einer anschließenden Entfernung des Biomaterials führen kann [40]. Für die Einheilung als positiv zu betrachten ist dagegen eine erhöhte Anwesenheit entzündungshemmender und geweberegenerierender M2-Makrophagen [44-46].

1.2.1 Möglichkeiten der Beeinflussung von Makrophagen in Bezug auf Fremdkörperreaktionen

Da Makrophagen ein breites Erscheinungs- und Aufgabenspektrum aufweisen und bei der Immunantwort eine wesentliche Rolle spielen, stellt die Modulation ihrer Polarisierung eine aussichtsreiche Möglichkeit dar, eine FBR im weiteren Verlauf positiv zu beeinflussen.

Für die Beeinflussung von Makrophagen, und im weiteren Sinne einer FBR, können die physikalischen und chemischen Stimuli entscheidend sein, welche die Immunzellen von einem Biomaterial erhalten [47]. So können bspw. die physikalischen Eigenschaften eines Biomaterials wie seine Topographie, seine Steifheit oder seine inhärenten Materialeigenschaften das Verhalten von Zellen beeinflussen [48, 49]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen aus

dem Knochenmark von Mäusen steife Polyacrylamide im Vergleich zu weichen Polyacrylamiden mit den gleichen chemischen Eigenschaften bevorzugt phagozytierten [50]. Ähnliches konnte in einer weiteren Studie nachgewiesen werden: die Funktion von menschlichen Makrophagen konnte auch hier durch die Änderung der Steifigkeit des Polyacrylamidgels beeinflusst werden. Dabei zeigte sich auch hier, dass eine Erhöhung der Steifigkeit des Materials mit einer erhöhten Phagozytose des Polyacrylamidgels durch die Makrophagen einherging [51]. Eine erhöhte Phagozytoseaktivität tritt dann auf, nachdem Makrophagen in Kontakt mit den M1-typischen Markern LPS [52] oder INF- γ [53] getreten sind. Bakterien und andere Erreger mit Zellwänden sind für gewöhnlich steifer als das umliegende, körpereigene Gewebe, in welches sie eingedrungen sind [54, 55] und die Sensitivität der Makrophagen auf eine erhöhte Steifigkeit unterstützt die physiologische Phagozytose dieser pathogenen Stoffe [50]. Weiche Polyacrylamide könnten bei gleicher chemischer Struktur bei einer FBR dementsprechend eher unerkant bleiben und könnten sich daher besser als Biomaterial eignen, da hier die Makrophagen aufgrund der niedrigeren Festigkeit des Materials in geringerem Ausmaß darauf reagierten.

Auch die Topographie eines Biomaterials kann einen Einfluss auf das Verhalten von Makrophagen haben. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass Oberflächenvermittelte Reize die Zellmorphologie sowie die Zytokinfreisetzung von Makrophagen beeinflussen: sie haben sich durch die Topographie verlängert und der Oberfläche entsprechend ausgerichtet und die Zytokinsekretion geweberegenerierender Marker wie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) stieg in den ersten 48 h an [56]. In Studien von McWhorter *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass die Topographie eines Biomaterials Einfluss auf die Polarisierung von Makrophagen hat: dabei konnte ein form-vermittelter Zellmechanismus identifiziert werden, bei welchem festgestellt wurde, dass M1-Makrophagen eine runde, „Pfannkuchen-ähnliche“ Form, M2-Makrophagen eine längliche, zylindrische Form annahmen. Durch die Elongation und die damit einhergehende M2-Polarisierung der Makrophagen stieg die Freisetzung und Expression M2-typischer Marker (IL-4, IL-13, CD206) und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (induzierbare

Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS), IFN- γ) sank. Außerdem wirkten die Oberflächen-vermittelte Elongation der Makrophagen und die M2-typischen Zytokine IL-4 und IL-13 zusammen synergistisch und verstärkten den Effekt der Polarisierung in M2-Makrophagen. In Versuchen mit M1-typischen Stimuli (LPS und IFN- γ) schwächte die Oberflächen-vermittelte Elongation die Wirkung der beiden pro-inflammatorischen Zytokinen ab. Es zeigte sich, dass die Oberflächen-vermittelte Elongation die Makrophagen vor einer Polarisierung in ihren M1-Typ durch LPS und IFN- γ abschwächte [57]. Ferner wurden Makrophagen auf Scaffolds mit diagonalen und orthogonalen dreidimensionalen Porenstrukturen hinsichtlich ihrer morphologischen Unterschiede untersucht [58]. Auf den diagonalen Scaffolds entwickelten sich im Vergleich zu den orthogonalen Scaffolds mehr elongierte Makrophagen. Zudem zeigten diese eine verringerte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, was sich annähernd mit den Ergebnissen der Studie von McWhorter *et al.* deckt.

1.3 Poly(2-oxazolin)

Poly(2-oxazoline) (POx) (Abb. 3) sind peptid-ähnliche Polymerstrukturen. Polymere sind ein unverzichtbarer Bestandteil unseres Lebens, welche aus repetitiven Untereinheiten bestehen und synthetisch hergestellt werden können. In der Natur kommen sie als Biopolymere z.B. in Form von Enzymen, Stärkemolekülen oder Zellulose vor [59]. In den letzten Jahrzehnten haben vor allem synthetische Polymerstrukturen das Interesse der Wissenschaft geweckt, da sie sich für die verschiedensten Anwendungen, wie bspw. in der Biomedizin zur gezielten Wirkstoffabgabe von Arzneimitteln, eignen [60]. POx wurde bereits in den 1960er Jahren von vier verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt und beschrieben [61-64], seine chemische Synthese erfolgt hierbei durch eine kationische ringöffnende Polymerisation des Monomers 2-oxazolin [65]. Nachdem in den letzten Jahren Polyethylenglycol (PEG) Wegbereiter neuer biomedizinisch nutzbarer Polymerstrukturen war, rücken nun vielversprechende Alternativen wie POx in den Fokus der Forschung [66].

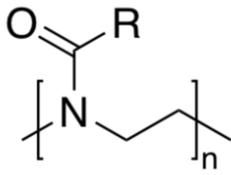


Abbildung 3: Strukturformel von Poly(2-oxazolin). (R ≠ H)

1.3.1 POx und seine biologischen Eigenschaften

Biomaterialien und ihr damit verbundener Einsatz in der regenerativen Medizin und im Bereich des Tissue Engineering müssen hohe Anforderungen erfüllen. So dürfen diese nicht toxisch, mutagen oder allergen sein. Sie müssen zudem biokompatibel und inert sein und die für die jeweilige Situation geeigneten Materialeigenschaften wie Härte, Plastizität und Elastizität aufweisen.

POx mit kurzen Seitenketten weisen eine dem bereits als Biomaterial etablierten PEG gleichwertige Biokompatibilität und einen ähnlichen Abschirmungsgrad (engl. stealth behavior) auf [66-70]. Ferner ist POx nicht toxisch [71] und besitzt eine sehr geringe Immunogenität [72]. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass POx und PEG eine strukturelle Ähnlichkeit zu natürlich vorkommenden Polypeptiden aufweisen (Abb. 4) [73]. Folglich wird die Aktivierung von Thrombozyten, die die Blutgerinnung fördern, und die Adsorption von Fibrinogen und weiteren Proteinen des Immunsystems, welche an der Immunantwort beteiligt sind, bei PEG und POx verhindert [74, 75].

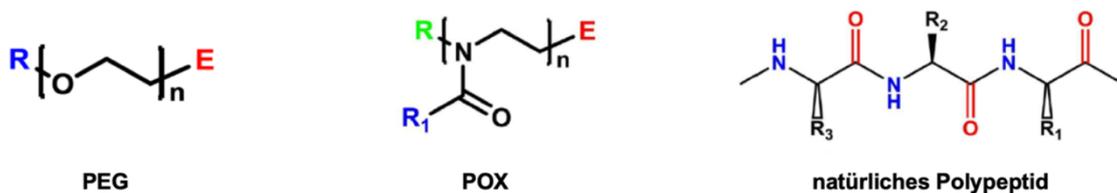


Abbildung 4: Die Strukturähnlichkeit von PEG, POx und natürlich vorkommenden Polypeptiden. (inhaltlich nach Sedlacek et al. [73]) (eigene Darstellung)

Dadurch können von POx oder PEG gebundene Wirkstoffe vom Immunsystem erschwert als Fremdstoff erkannt werden, wodurch sich ihre Wirkungsdauer im Blut verlängert [76]. Außerdem reichert sich POx kaum in Gewebestrukturen und Organen an, sondern wird vom Körper ausgeschieden [77].

Im Vergleich zu dem bereits vielseitig eingesetzten PEG besitzt POx eine bessere Stabilität sowie eine einfachere Abstimbarkeit seiner chemischen Eigenschaften [78], so hat POx eine niedrigere Molmassenverteilung und lässt sich durch leicht veränderbare Eigenschaften wie Löslichkeit, chemische Funktionalität und die strukturelle Größe des Moleküls gegenüber anderen Biomaterialien besser für biomedizinische Anwendungen nutzbar machen [79-82]. Dies wird dadurch ermöglicht, dass die Seitenketten von POx (s. R₁ in Abb. 4) leicht modifizierbar sind [66]. Durch Zufügen kurzer Seitenketten, wie z.B. einer Methyl- oder Ethyl-Gruppe, ähnelt es PEG hinsichtlich Hydrophilie, Proteinadsorption und Verbergungsgrad [69]. Beim Hinzufügen von längeren Seitenketten zeigt POx ein thermoresponsives Verhalten in wässriger Lösung, demnach eine Veränderung seiner physikalischen Eigenschaften bei Temperaturunterschieden mit einer einhergehenden Senkung der kritischen Lösungstemperatur (LCST). Die LCST für Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (PEtOx) liegt bei ca. 70°C und für Poly(2-propyl-2-oxazolin) (PPrOx) bei etwa 25°C. Poly(2-butyl-2-oxazolin) (PBuOx) und POx mit noch längeren Seitenketten hingegen bleiben, unabhängig von der Temperatur, in Wasser unlöslich [83]. Die modifizierbare Hydrophilie/-phobie von POx kann daher genutzt werden, um auf diese Weise z.B. einen hydrophoben Wirkstoff im Blut löslich zu machen [76]. Aufgrund der aufgeführten, für biomedizinische Anwendungen hervorragenden biochemischen Eigenschaften wird bereits seit 2017 SER-214, ein POx-Rotigotin-Konjugat, in einer klinischen Studie für die Behandlung der Parkinson-Erkrankung untersucht [84].

POx wird ebenfalls, wie auch in dieser Arbeit, in der Biofabrikation zur Herstellung dreidimensionaler Scaffolds verwendet, um in *in vitro* Experimenten dessen Einfluss auf menschliche Immunzellen zu untersuchen.

1.3.2 Melt Electro Writing

Die dreidimensionalen Poly(2-oxazolin)-Scaffolds für diese Arbeit wurden per Melt Electro Writing (MEW) hergestellt. Bei diesem Verfahren werden die dreidimensionalen Gerüststrukturen aus organischen Polymerschmelzen hergestellt. Dabei wird das Polymer, das eine hohe Viskosität und eine niedrige Leitfähigkeit besitzt, durch hochpräzises Spinnen in einen geraden Schmelzfluss umgewandelt [85-88]. Dieser geschmolzene, elektrisierte Strahl verfestigt sich beim Abkühlen in einer gezielt programmierten Anordnung. Somit können die Polymerfasern exakt abgelegt werden [85] und es entsteht eine mehrschichtige, dreidimensionale Gerüststruktur (sog. Scaffold) (Abb. 5, A). Ein Vorteil dieses Verfahrens ist der geringe Faserdurchmesser von bis zu unter 1 μm [89], wodurch Zellen besser mit dem Scaffold interagieren können als bei Scaffolds mit einem größeren Faserdurchmesser [90].

Wie neue Untersuchungen am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Universität Würzburg ergaben, kann der Einsatz eines Blends aus Poly(2-n-propyl-2-oxazolin) (PnPrOx) und Poly(2-cyclopropyl-2-oxazolin) (PcycloPrOx) zur Nano- bzw. Mikrostrukturierung der Faseroberfläche führen: das hergestellte Blend-Scaffold mit noch glatter Oberfläche wird hierfür bei erhöhter Temperatur ausgelagert, was zur Kristallisation von PnPrOx und damit zum Verlust der Löslichkeit und des Schwellverhaltens in wässriger Lösung führt. Die hitzeinduzierte Kristallisation kann nicht beim amorphen PcycloPrOx beobachtet werden, so dass sich dieses in Wasser auflöst. Dies führt zur Freilegung von gebündelten, kristallisierten PnPrOx-Strukturen (Abb. 5, B), MEW-Scaffolds aus reinem PnPrOx hingegen besitzen eine glatte Oberfläche (Abb. 5, C) [91].

Dieses Verfahren wurde für die Herstellung der Scaffolds in vorliegender Arbeit genutzt, zudem wurde eine zweidimensionale PnPrOx-Beschichtung (Abb. 5, D) verwendet, um den Materialeinfluss zu untersuchen.

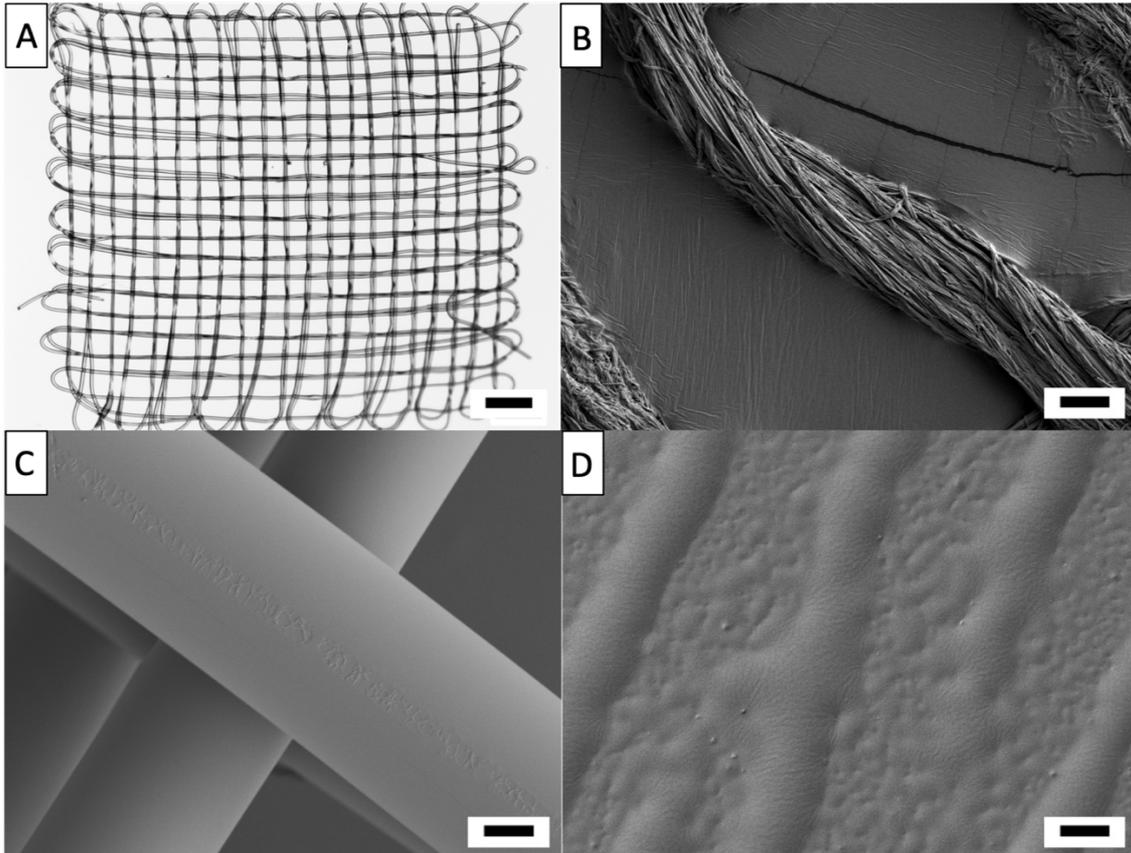


Abbildung 5: verschiedene stereo-/rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PnPrOx-Scaffolds. A: Stereomikroskopische Aufnahme eines dreidimensionalen PnPrOx-Scaffolds. **B:** rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Fibrillen-Scaffolds aus PnPrOx. **C:** rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Kontroll-Scaffolds aus PnPrOx. **D:** rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche der Beschichtung aus PnPrOx. (Maßstabsbalken: A: 1.000 μm ; B, C und D: 20 μm) (mit freundlicher Genehmigung von Matthias Ryma und Tina Tylek)

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Dissertationsarbeit soll der Einfluss von MEW-gedruckten Scaffolds aus dem synthetischen Polymer PnPrOx, einem Poly(2-oxazolin), mit verschiedenen Oberflächenstrukturen (fibrillär, glatt) auf die Proteinexpression menschlicher Makrophagen untersucht werden. Dabei soll überprüft werden, inwiefern die Beschaffenheit der Oberflächenstruktur des Polymers die Polarisierung von Makrophagen auf Proteinebene beeinflussen kann.

Dabei sollen primäre, humane, aus Monozyten differenzierte Makrophagen auf drei verschiedenen PnPrOx-Oberflächen (zweidimensionale Beschichtung, dreidimensionale glatte (Kontrolle) und dreidimensionale fibrilläre (Fibrillen-) Scaffolds) für 24 Stunden (d1), drei (d3) und sieben (d7) Tage kultiviert werden. Anhand der Proteinanalyse spezifischer M1- (IL-1 β , IL-6, IL-8) und M2- (CD163, CD206, IL-10) Marker kann die spontane Differenzierung der Makrophagen auf den verschiedenen Oberflächen untersucht und beurteilt werden. Als Nachweismethode für die Freisetzung der Interleukine sollen ELISAs verwendet werden und die Analyse der beiden Oberflächenmarker soll mittels Western Blot durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die für diese Arbeit verwendeten dreidimensionalen Gerüststrukturen, auch Scaffolds genannt, aus PnPrOx wurden am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Universität Würzburg mit freundlicher Unterstützung von Matthias Ryma über das MEW-Verfahren [85] produziert und für die Versuche dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Tabelle 1 gibt die für diese Arbeit verwendeten Zelltypen wieder.

Tabelle 1: Verwendete Zellen

Zelltyp	bezogen von / Herkunft
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)	Selektion aus Buffy-Coats, Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Wiesentheid (D)
Monozyten	Selektion aus PBMCs, restliche PBMCs wurden verworfen

2.1.1 Technische Geräte und verwendete Hilfsmittel

Die verwendeten Geräte und Hilfsmittel sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Arbeitsgeräte und sonstiger Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt (D)
Bechergläser	Schott AG, Mainz (D)
Brutschrank HERAcell 150 CO ₂ Inkubator	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Destillierapparat	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel (D)
Eismaschine	Scotsman Ice Srl., Mailand (I)
Filmentwickler Cawomat 2000 IR	CAWO Photochemische Fabrik GmbH, Schrobenhausen (D)

Filmkassette	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Glaskolben und -zylinder	Schott AG, Mainz (D)
Glasflaschen	Schott AG, Mainz (D)
Glasküvetten	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Glasplatten, Glasschalen, Abstandhalter aus Kunststoff, Halteklammern, Kunststoffkamm	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Inkubator	Thermo Electron LED, Langenselbold (D)
Kühl-Gefrierkombination	Bosch GmbH, München (D)
Magnetrührer	IKA GmbH & Co. KG, Staufen (D)
Magnetrührer CombiMag RET	IKA Werke GmbH, Staufen (D)
Magnetrührstäbchen	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Microplate Reader Infinite® 200 Pro NanoQuant	Tecan Group AG, Männedorf (CH)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Ofen	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
pH-Meter inoLab Multi Level 1	WTW GmbH & Co. KG, Tuttlingen (D)
Pinzette	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Plastikringe zur Beschwerung	Eigenbau FMZ
Röntgenkassette	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Rotlichtlampe	PEHA med. Geräte GmbH, Sulzbach (D)
Spannungsquelle	Cambridge Scientific Corp., Watertown (USA)
Sterilarbeitsbank Nuair	Integra Biosciences GmbH, Biebertal (D)
Tischzentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt (D)

Trans-Blot Turbo Blotting System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
UV-Lampe	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Vortexe REAX 1R.	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kehlheim (D)
Wägeschale	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
Wippschüttler Rocker-Shaker PMR-100	Keison Products, Essex (UK)
Zentrifuge	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)

2.1.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3 führt die für die Versuche verwendeten Chemikalien auf. In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels für die Gelelektrophorese wiedergegeben.

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
0,1 % Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
0,3 M Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Penicillin-Streptomycin (10.000 Units/mL Pen, 10.000 µg/ml Strep)	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe (D)
10 % humanes Thrombozytenlysat	PL Bioscience, Aachen (D)
30 % Acrylamide/Bis Solution 29:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)

Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Coomassie brilliant blue	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
DL-Norleucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
Entwicklerlösung	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Ethanol, absolut (99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Fixierlösung	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Isopropanol	Apotheke des Klinikums, Universität Würzburg (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt (D)

Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Pancoll, human (1,077g/l)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach (D)
peqGold TriFast™	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
p-Hydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Precision Plus Protein™ Standard – Dual Color	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Reinstwasser	Destillierapparat (s. 2.1.1 Geräte und Hilfsmittel)
RPMI-1640	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane- Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
-----------	---

Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

Sammelgel (4 %)	5,085 ml	Trenngel (10 %)	20,02 ml
30% Acrylamide/Bis Solution	0,67 ml	30% Acrylamide/Bis Solution	6,60 ml
0,5 M Trizma Base		1,5 M Trizma Base	
0,4% SDS		0,4% SDS	
pH 6,8	1,25 ml	pH 8,8	5,00 ml
destilliertes H ₂ O	3,10 ml	destilliertes H ₂ O	8,30 ml
Bromphenolblau	5 µl	10% APS	100 µl
10% APS	50 µl	TEMED	20 µl
TEMED	10 µl		

2.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Absättigungslösung 5%	95ml TBST 5g Milchpulver
Enhanced Chemiluminescence (ECL) - Solution A	0,1M Tris-HCl pH 8,6 50mg Luminol
Enhanced Chemiluminescence (ECL) - Solution B	11mg p-Hydroxycumarinsäure 10ml DMSO
Enhanced Chemiluminescence (ECL) - Lösung	ECL - Solution A ECL - Solution B H ₂ O ₂

Elektrophoresepuffer	25mM Trizma Base 192mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3
Entfärbelösung	20% Methanol 7,5% Essigsäure
Färbelösung	0,1% Coomassie brilliant blue 20% Methanol 7,5% Essigsäure
Graphitblotpuffer 1	25mM Trizma Base – pH 10,4 20% Methanol
Graphitblotpuffer 2	300mM Trizma Base – pH 10,4 20% Methanol
Graphitblotpuffer 3	25mM Trizma Base – pH 9,4 40mM DL-Norleucin 20% Methanol
Isolationspuffer für Negativselektion	0,5% BSA 2mM EDTA gelöst in PBS
Lysepuffer	PBS 0,1 % Triton X-100
Monozyten-Medium	500 ml RPMI-1640 Pen (100 IU/ml) und Strep (100 µg/ml) für Kultivierung zusätzlich: 10% humanes Thrombozytenlysat
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	8 g/l NaCl 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ 2,8 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,2 g/l KCl gelöst in destilliertem H ₂ O

Probenpuffer	62,5mM Trizma Base 10% Glycerin pH 6,8 einstellen 5% β -Mercaptoethanol
Stripping-Puffer	20% SDS 100mM Trizma Base pH – 6,7 β -Mercaptoethanol gelöst in destilliertem H ₂ O
Tris(hydroxymethyl)aminomethan- gepufferte Salzlösung (TBS)	140mM NaCl 10mM Trizma Base – pH 7,4
Tris(hydroxymethyl)aminomethan- gepufferte Salzlösung mit TWEEN® 20 (TBST)	TBS – pH 8,0 einstellen dann 0,05% TWEEN® 20 zugeben

2.1.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6 führt die verwendeten Verbrauchsmaterialien auf.

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Melitta, Minden (D)
Blotting Papier Whatman	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Cellophanfolie	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Einmalpipetten (2,5; 5; 10; 25ml)	Corning GmbH, Bodenheim (D)
Filterspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht (D)
Frischhaltefolie	Lidl Stiftung & Co. KG, Würzburg (D)
Gefrierbeutel	Fipp Handelsmarken GmbH, Hamburg (D)
Latexhandschuhe, puderfrei	Zentrallager des Universitätsklinikums Würzburg

Magnetsäulen LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (D)
Medizinische Röntgenfilme	Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Nitrozellulose Transfermembran	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (D)
Parafilm	Bemis Company Inc., Braine L'Alleud (BE)
Pasteurpipetten	Scherf GmbH, Meiningen (D)
Pipette mit Spitze (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen (D)
Reaktionsgefäß mit Deckel (1,5; 2ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht (D)
Unbehandelte Well Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Corning Incorporated, Wiesbaden (D)
Zentrifugenröhrchen (15; 50ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen (D)

2.1.5 Verwendete Kits

In Tabelle 7 sind die verwendeten Kits aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Kits

Bezeichnung	Bestandteile	Hersteller
Pan Monocyte Isolation Kit, human	<ul style="list-style-type: none"> • FcR Blockreagenz: human Ig (1 ml) • Pan Monocyte Biotin-Antibody-Cocktail, human: Mixtur aus Biotin gekoppelten monoklonalen anti-Mensch Antikörpern gegen Antigene, die nicht von humanen Monozyten exprimiert werden (1 ml) 	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (D)

	<ul style="list-style-type: none"> • anti-Biotin MicroBeads: MicroBeads gekoppelt an monoklonalen anti-Biotin Antikörper (isotype: mouse IgG1) (2 ml) 	
Pierce® BCA Assay Kit	<ul style="list-style-type: none"> • BCA Reagent A (2 x 500 ml) • BCA Reagent B (25 ml) • Albumin Standard - 2 mg/ml (10 ml) 	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	<ul style="list-style-type: none"> • Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagenz (Component A) (1 ml) • 20x TE (Component B) (25 ml) • λ-DNA Standard (Component C) (1 ml) 	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Single Analyte ELISArray™ Kit – Human IL1b	<ul style="list-style-type: none"> • Antigen Standard - 1 µg/ml (1,5 ml) • Detection Antibody (1,5 ml) • Avidin-HRP Conjugate (1,5 ml) • 10 % BSA (15 ml) • Donkey Serum (15 ml) • Pre-coated Capture Antibody 8-well strips (1x 96-well plate) • Sample Dilution Buffer Stock (60 ml) • Assay Buffer Stock (60 ml) • Wash Buffer (10x Concentrate) (125 ml) • Development Solution (25 ml) • Stop Solution (60 ml) 	Qiagen GmbH, Hilden (D)
Single Analyte ELISArray™ Kit – Human IL6	<ul style="list-style-type: none"> • Antigen Standard - 1 µg/ml (1,5 ml) • Detection Antibody (1,5 ml) • Avidin-HRP Conjugate (1,5 ml) • 10 % BSA (15 ml) • Donkey Serum (15 ml) 	Qiagen GmbH, Hilden (D)

	<ul style="list-style-type: none"> • Pre-coated Capture Antibody 8-well strips (1x 96-well plate) • Sample Dilution Buffer Stock (60 ml) • Assay Buffer Stock (60 ml) • Wash Buffer (10x Concentrate) (125 ml) • Development Solution (25 ml) • Stop Solution (60 ml) 	
Single Analyte ELISArray™ Kit – Human IL8	<ul style="list-style-type: none"> • Antigen Standard - 1 µg/ml (1,5 ml) • Detection Antibody (1,5 ml) • Avidin-HRP Conjugate (1,5 ml) • 10 % BSA (15 ml) • Donkey Serum (15 ml) • Pre-coated Capture Antibody 8-well strips (1x 96-well plate) • Sample Dilution Buffer Stock (60 ml) • Assay Buffer Stock (60 ml) • Wash Buffer (10x Concentrate) (125 ml) • Development Solution (25 ml) • Stop Solution (60 ml) 	Qiagen GmbH, Hilden (D)
Single Analyte ELISArray™ Kit – Human IL10	<ul style="list-style-type: none"> • Antigen Standard - 1 µg/ml (1,5 ml) • Detection Antibody (1,5 ml) • Avidin-HRP Conjugate (1,5 ml) • 10 % BSA (15 ml) • Donkey Serum (15 ml) • Pre-coated Capture Antibody 8-well strips (1x 96-well plate) • Sample Dilution Buffer Stock (60 ml) • Assay Buffer Stock (60 ml) • Wash Buffer (10x Concentrate) 	Qiagen GmbH, Hilden (D)

	(125 ml)	
	<ul style="list-style-type: none"> • Development Solution (25 ml) • Stop Solution (60 ml) 	

2.1.6 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 8 dargestellt, die verwendeten Sekundärantikörper werden in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung und Inkubationsdauer	Belichtungszeit in Filmkassette
Anti-CD163 Monoklonal - IgG	OriGene Technologies Inc., Rockville (USA)	1:500 Inkubation über Nacht bei 4°C	2 min
Anti-CD206 Polyklonal - IgG	Abcam Ltd., Cambridge (UK)	1:1000 Inkubation über Nacht bei 4°C	10 sec
Anti-GAPDH Monoklonal - IgG	Merck KGaA, Darmstadt (D)	1:1000 Inkubation 2 h bei RT	20 sec

Tabelle 9: Übersicht aller verwendeter Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung und Inkubationsdauer
Anti-Maus Peroxidase-gekoppelt Polyklonal - IgG+IgM	Jackson ImmunoResearch Ltd., Ely (UK)	1:5000 60 min bei RT
Anti-Hase Peroxidase-gekoppelt Polyklonal - IgG	Jackson ImmunoResearch Ltd., Ely (UK)	1:5000 60 min bei RT

2.1.7 Statistik

Zur Statistikanalyse wurde die Software „Statistica“ (Version 13) genutzt. Sowohl bei den Western Blots als auch bei den ELISAs wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Statistische Signifikanzen wurden mithilfe eines Fischer-LSD post-hoc Tests bestimmt. Ergebnisse mit einem Wert von $p < 0,05$ wurden als signifikant, mit einem Wert von $p < 0,01$ als hoch signifikant und mit einem Wert von $p < 0,001$ als höchst signifikant angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbehandlung der PnPrOx-Scaffolds

Zur Sterilisation der Scaffolds wurden diese für 15 min mit UV-Licht (254nm) bestrahlt. Die Fibrillen-Scaffolds wurden hergestellt, indem diese in je eine Vertiefung einer 24-Well Zellkulturplatte mit 37°C vorgewärmten PBS überführt wurden, bis diese vollständig überdeckt waren. Ein steriler Plastikring wurde zur Beschwerung auf jedes Scaffold gelegt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ mit nachfolgender Inkubation für 15 min bei 4°C. Das PBS wurde ausgetauscht und der Vorgang dreimal wiederholt. Dieser Vorgang war nötig, damit sich das wasserlösliche PcyCloPrOx auflöst und die fibrillären Strukturen des kristallinen PnPrOx freigelegt werden. Anschließend wurden die Fibrillen-Scaffolds bis zu ihrer Verwendung am selben Tag in frischem PBS bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert. Die Kontrollen-Scaffolds aus PnPrOx mit ihrer glatten Oberfläche konnten direkt nach der Sterilisation verwendet werden.

Die Beschichtungen wurden mittels einer in Reinstwasser gelösten 0,1 wt% PnPrOx-Lösung hergestellt. Dafür wurden 0,2 ml dieser Lösung in je eine Vertiefung einer 24-Well Zellkulturplatte gegeben, welche anschließend bei 60°C in einem Ofen getrocknet wurde, bis das Wasser komplett verdampft war und sich das PnPrOx am Boden der Zellkulturplatte abgelagert hatte [91]. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt, sodass eine gleichmäßig glatte, zweidimensionale PnPrOx-Beschichtung am Boden der Zellkulturplatte entstand.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von PBMCs aus Buffy-Coat

Alle Versuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden laut E-Mail der Ethik-Kommission Würzburg vom 26. April 2013 als unbedenklich eingestuft, es gab keine Einwände bezüglich der Verwendung der Buffy-Coats, ein gesonderter Antrag musste hierfür nicht gestellt werden. Die Buffy-Coats wurden von der Blutbank des Bayerischen Roten Kreuzes in 97353 Wiesentheid bezogen.

Ein Buffy-Coat ist die entstehende, mittlere Grenzschicht des Vollblutes, nachdem dieses durch Zugabe von Gerinnungshemmern und Zentrifugation

aufbereitet wurde. In der oberen Schicht befindet sich das Blutplasma, in der unteren die Erythrozyten. Ein Buffy-Coat enthielt im Durchschnitt 35 ml Gesamtvolumen, welches mit PBS im Verhältnis 1:1 vermischt wurde. Anschließend wurde dieses auf Pancoll im Verhältnis 3:4 geschichtet. Es folgte eine Dichtegradientenzentrifugation (1600 rpm, 20°C, 40 min, ACC 3, DEC 0), wonach vier Schichten entstanden: Plasma/PBS-, PBMC-, Pancoll- und Erythrozyten-Schicht (von oben nach unten). Die PBMC-Schicht wurde abgenommen und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gelagert. Hierbei war darauf zu achten, dass möglichst keine Pancoll-Lösung mit abgenommen wurde, da diese zellschädigend auf die PBMCs wirken kann. Es folgte eine weitere Zentrifugation (1500 rpm, 4°C, 5 min, ACC 9, DEC 9). Das daraus entstandene Zellpellet wurde zweimal mit 50 ml PBS durch Resuspendierung und Zentrifugation (900 rpm, 4°C, 5 min, ACC 9, DEC 9) gewaschen, um die Kontamination durch Thrombozyten und Pancoll-Lösung zu verringern.

2.2.2.2 Isolation von Monozyten durch Negativselektion

Die Negativselektion von Monozyten ist eine Methode, um diese von den restlichen Zelltypen der PBMCs zu selektieren. Dabei werden zellspezifische Antigene der PBMCs, die von Monozyten nicht exprimiert werden, mit magnetisch gekoppelten Antikörpern markiert. Anschließend werden die Zellen über eine magnetische Säule gegeben, wobei die Antikörper-gekoppelten Zellen am Durchfluss gehindert werden. Allein die ungebundenen Monozyten können ungehindert durchfließen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben des verwendeten Kits.

Die Proben wurden zur Generierung der geeigneten Zellzahl zentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 5 min). Die folgenden Angaben gelten für eine Zellzahl von 1×10^7 . Das Zellpellet wurde mit 30 µl frisch angesetztem Isolationspuffer resuspendiert. Anschließend folgte die Zugabe von je 10 µl „FcR Blockreagenz“ und „Pan Monocyte Biotin-Antibody-Cocktail“. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 4°C inkubiert bevor sie mit 30 µl Isolationspuffer durchmischt wurden und die Zugabe von 20 µl „anti-Biotin MicroBeads“ erfolgte. Nach 10-minütiger Inkubation

bei 4°C wurde die Zellsuspension auf die vorher mit 3 ml Isolationspuffer gespülten, magnetischen Säulen gegeben. Der Durchfluss, der die Monozyten enthielt, wurde aufgefangen. Die restlichen, markierten PBMCs blieben in der magnetischen Säule. Die Säule wurde nach Durchfluss der Zelllösung dreimal mit je 3 ml Isolationspuffer gewaschen, um die Zellausbeute zu erhöhen. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen wurden abschließend zentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 5 min) und der Überstand vollständig entfernt.

2.2.2.3 Kultivierung humaner Monozyten auf PnPrOx-Oberflächen

Die isolierten, undifferenzierten Monozyten wurden im folgenden Schritt zu den vorbehandelten, sterilisierten Kontrollen- und Fibrillen-Scaffolds und den Beschichtungen hinzugegeben. Dabei wurden 50 µl Zellsuspension ($0,75 \times 10^7$ Zellen) auf je ein Scaffold bzw. eine Beschichtung gegeben und 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 1 ml Monozyten-Medium hinzugegeben.

Die Kultivierung erfolgte für 24 h (d1), drei Tage (d3) und sieben Tage (d7) bei 37°C, 5 % CO₂ und befeuchteter Luft in einem Brutschrank. Sofern nicht anders angegeben, wurde über diese Dauer kein Medienwechsel durchgeführt.

2.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Auftrennung und Bestimmung einzelner Proteine in einer Probe [92, 93]. Das Verfahren basiert auf einer Gelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, kurz SDS-PAGE), bei der die negativ-geladenen, denaturierten Proteine in Richtung des positiven Pols wandern und dadurch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. In einem elektrischen Feld ist die Laufgeschwindigkeit von Molekülen daher proportional zur Gesamtladung und antiproportional zur Masse. Im nächsten Schritt werden die Proteine von dem Gel auf eine Membran transferiert, worauf der Nachweis spezifischer Proteine erfolgt [94]. In dieser Arbeit wurde der Western Blot genutzt, um die Oberflächenmarker CD163 und CD206 nachzuweisen. Als Haushaltsprotein diente GAPDH [95].

2.2.3.1 Proteinisolierung

Nach erfolgter Kultivierungsdauer von 24 h, drei und sieben Tagen wurde das Medium von den auf Scaffolds und der Beschichtung befindlichen Zellen entfernt und durch Zugabe von je 400 µl peqGold TriFast™ durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vollständig lysiert.

Durch Verwendung von peqGold TriFast™ ist es möglich, aus einer Probe RNA, DNA und Proteine zu isolieren. Im Folgenden wird ausschließlich auf die Methode der Proteinisolierung eingegangen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Jede Probe wurde in ein separates 2 ml Reaktionsgefäß überführt und nach kurzem Vortexen für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (12000 x g, 4°C, 10 min), wodurch ein milchig-weißes Proteinpellet am Boden des Reaktionsgefäßes entstand. Der Überstand wurde entfernt und jedes Pellet dreimal durch Zugabe von 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol, 20-minütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (7500 x g, 4°C, 5 min) gewaschen. Nachfolgend wurden die Proben in 2 ml 100 % Ethanol für 20 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert (7500 x g, 4°C, 5 min). Das Ethanol wurde vollständig entfernt und das Proteinpellet an der Luft für 5-10 min getrocknet. Um das vollständige Lösen der Quartär- und Tertiärstruktur der denaturierten Proteine zu gewährleisten, wurden zu jedem Pellet je 30 µl 4 % SDS gegeben [96]. Um den Vorgang der Proteinauflösung zu unterstützen, wurden die Reaktionsgefäße zusätzlich für 5-10 min bei 95°C im Heizblock inkubiert. SDS überdeckt mit seiner stark-negativen Ladung die Eigenladung der Proteine, sodass zuletzt alle Proteinteile in negativ-geladener Form vorlagen und im nächsten Schritt, der Gelelektrophorese, nach Ladung aufgetrennt werden konnten [96]. Sobald sich alle festen Bestandteile vollständig gelöst hatten, wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce® BCA Assay Kit verwendet. Der BCA (Bicinchoninsäure) Assay beruht auf der Biuret-Reaktion, welche in alkalischer Lösung durch die Anwesenheit von Aminosäuren die

Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} bewirkt und auf einer konzentrationsabhängigen Erfassung von monovalenten Cu^{1+} Ionen basiert. Bicinchoninsäure, ein chromogener Stoff, geht mit dem reduzierten Kupfer über Chelatbildung einen Komplex ein und führt im Mikroplatten-Reader zu einer starken Absorption des Lichts bei 562 nm [97].

Eine BSA-Verdünnungsreihe, welche mit dem im Kit des Herstellers enthaltenen „Albumin Standards“ hergestellt wurde, diente der Berechnung einer Standardkurve. Es wurden 25 μl jeder Verdünnung der BSA-Standardreihe und 25 μl jeder zu untersuchender Probe (Verdünnung 1:6 in PBS) in eine 96-Well Zellkulturplatte transferiert. Es folgte die Zugabe von 200 μl des im Kit enthaltenen Reagenzstoffes („BCA Reagent A“ und „BCA Reagent B“ im Verhältnis 50:1) in jede Vertiefung der Zellkulturplatte. Daraufhin wurde die Zellkulturplatte für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt. Die Absorption wurde bei 570 nm im Mikroplatten-Reader gemessen. Die Proteinkonzentrationen konnten mit Hilfe der erhaltenen Standardkurve berechnet werden.

2.2.3.3 Durchführung der SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Stoffgemische in ihre Bestandteile der Molekülmasse nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Dafür erfolgte zunächst die Herstellung eines Sammel- und eines Trenngels (Tab. 4). Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurden 14 der 15 Geltaschen mit 20 μl Probe beladen (Proteinprobe mit 20 μg Protein im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer, danach mit destilliertem Wasser auf 20 μl Gesamtvolumen aufgefüllt). Die 15. Geltasche wurde mit 3 μl eines Protein-Markers zur Bestimmung der Größe (kDa) der Proteinbanden beladen. Nach Anschluss einer Spannungsquelle (200 V, 500 mA, 150 W, 45min) erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekularmasse.

2.2.3.4 Proteintransfer

Der Proteintransfer und -nachweis erfolgte nach Khyse-Andersen [94]. Dazu wurden das Blotting-Papier, die Nitrozellulosemembran sowie das SDS-Gel in

verschiedene Graphitblotpuffer getränkt. Danach wurde der Reihe nach Blotting Papier, die Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und weiteres Blotting Papier (von unten nach oben) luftblasenfrei in einer Blotkassette übereinandergeschichtet.

Durch ein angelegtes Spannungsfeld (25 V, 1 A, 30 min) wurden die Proteinbanden von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die durch das SDS negativ-geladenen Proteine bewegten sich in Richtung Anode und wurden dabei von der Nitrozellulosemembran gestoppt, wodurch es zum Transfer der Proteine in exakt der gleichen Ausrichtung auf die Membran führte. Anschließend wurden die Gele mit Färbelösung für 5 min angefärbt. Die Färbelösung wurde folgend durch Entfärbelösung ausgetauscht und das Gel für 4 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, bis sich das Gel vollständig entfärbte und durch Trocknung in Cellophanfolie archiviert werden konnte.

Die Nitrozellulosemembran wurde für 2 min bei RT in Ponceau-S Lösung inkubiert und danach mit destilliertem Wasser gewaschen. Dadurch waren nach erfolgreichem Blotting die Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran sichtbar.

2.2.3.5 Proteinnachweis mittels Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran bei RT für 1 h in Absättigungslösung auf dem Wippschüttler geblockt. Danach wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tab. 8) inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreimal für je 10 min in TBST auf dem Wippschüttler gewaschen, bevor der jeweils entsprechende HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (Tab. 9) verdünnt und die Membran damit für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBST für je 10 min auf dem Wippschüttler gewaschen. Anschließend wurde ECL-Lösung hinzugegeben und die Membran für 2 min inkubiert. Danach wurde sie in Frischhaltefolie verpackt und in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde unter vollständigem Lichtausschluss ein unbelichteter Film auf die Nitrozellulosemembran gelegt und die sichtbaren Banden des Protein Standards

auf dem Film markiert. Nach der jeweiligen Belichtungsdauer (Tab. 8) in der geschlossenen Filmkassette wurde der Film aus der Filmkassette entnommen und in den Filmentwickler gelegt. Die gesuchten, durch die ECL-Lösung aktivierten und immunoreaktiven Proteine wurden durch Chemolumineszenz im Filmentwickler sichtbar.

Die Membran wurde danach für 30 min bei 50°C in Stripping Puffer inkubiert, wodurch alle Antikörper von der Membran gelöst wurden. Es folgte ein dreimal wiederholter Waschschrift für 10 min in TBST auf dem Wippschüttler mit anschließender Inkubation für 1 h bei RT in Absättigungslösung. Danach konnte die Membran für den Nachweis eines weiteren Primärantikörpers genutzt werden. Zur Archivierung wurden die Nitrozellulosemembrane in ein mit TBST-gefülltes 50 ml Zentrifugationsröhrchen gelegt und im Kühlschrank verwahrt.

2.2.3.6 Auswertung der Western Blot Filme

Nachdem die Röntgenfilme der Western Blots im Durchlicht abfotografiert und in digitaler Form gespeichert wurden, konnten sie mit dem Programm „Fiji“ densitometrisch ausgewertet werden [98]. Dazu wurde jeweils die Fläche um die geschwärzte Proteinbande markiert und das Programm stellte diese Schwärzung als Kurve dar. Die Höhe dieser Kurve entsprach dabei der Schwärzung, je dunkler umso höher die Kurve, und die Breite der Kurve entsprach der Breite der Proteinbande. Die Kurve wurde nach unten durch eine eingefügte Basislinie abgegrenzt, wodurch der Flächeninhalt jeder Kurve berechnet werden konnte. Alle Proben wurden auf das Haushaltsprotein GAPDH normiert, d.h. die Densität jeder Probe wurde in Relation zu der Densität der dazugehörigen Probe des Haushaltsproteins GAPDH gesetzt. Dieser relative Wert diente der Darstellung in den Säulendiagrammen.

2.2.4 ELISA

Ein „enzyme-linked immunosorbent assay“, abgekürzt ELISA, ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert [99, 100]. In dieser Arbeit wurden die Proben mittels Sandwich-ELISA auf die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 untersucht.

Beim Sandwich-ELISA werden zwei primäre Antikörper genutzt, die an zwei verschiedenen Bindungsstellen an das gesuchte Antigen binden. Durch Inkubation in einer Entwicklerlösung kommt es zu einer messbaren, enzymatischen Farbreaktion.

2.2.4.1 Bestimmung des DNA-Gehalts

Der Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay wird verwendet, um doppelsträngige Nukleinsäuren einer Probe zu quantifizieren. Dabei bindet ein inaktiver Farbstoff in der PicoGreen-Gebrauchslösung an doppelsträngige Nukleinsäuren. Durch die Bindung an doppelsträngige Nukleinsäuren beginnt der Farbstoff zu fluoreszieren [101]. Diese Fluoreszenz kann daraufhin im Microplate Reader gemessen werden. Anhand einer vom Hersteller mitgelieferten DNA-Standardreihe können die DNA-Mengen jeder Probe mittels Fluoreszenz bestimmt werden.

Dieser Assay wurde nach Herstellerangaben nach ein-, drei- und sieben-tägiger Kultivierung von Monozyten/Makrophagen angewendet. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und danach mit je 400 µl Lysepuffer versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Hierbei lösten sich die Zellen in ihre Bestandteile auf. Das Zelllysate wurde daraufhin in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und, falls nicht sofort verwendet, bei -20°C gelagert. Zur Herstellung einer Standardreihe wurde eine Stocklösung mit 1 µg/ml „λ-DNA Standard“ angesetzt. Die Konzentrationen der Standardreihe lagen im Bereich von 0 – 500 ng/ml dsDNA. In eine schwarze 96-Well Zellkulturplatte wurden je 100 µl des Standards, der Zelllysate und des Lysepuffers (Probenblank) in Duplikaten pipettiert. Zu den Standards, den Proben und dem Probenblank wurden zuletzt je 100 µl des im Kit enthaltenen, in „1xTE-Puffer“ 1:200 verdünntem „PicoGreen dsDNA Reagenz“ gegeben und für 2 min unter Lichtausschluss auf dem Wippschüttler inkubiert. Danach wurden die Proben bei 485 nm angeregt und die Intensität der Fluoreszenzemission konnte bei 538 nm im Microplate Reader gemessen werden.

2.2.4.2 Durchführung der ELISAs

Die Proben wurden auf die Zytokinfreisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 untersucht. Die Versuche wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei den Proben, die drei und sieben Tage inkubiert wurden, wurde jeweils 24 h vor Beendigung der Inkubationsdauer das Medium gewechselt, um die Sekretion der Makrophagen der letzten 24 h bestimmen zu können.

Im Vorfeld wurden die Proben in verschiedenen Verdünnungsreihen getestet, um sicher zu stellen, dass die Ergebnisse im Bereich der Standardreihen des Herstellers lagen. In Tabelle 10 sind die ermittelten Verdünnungswerte angegeben.

Tabelle 10: Verdünnungen der Proben für die jeweiligen ELISA-Kits

Proben für	Verdünnung
ELISArray™ Kit - IL1b	1:10
ELISArray™ Kit - IL6	1:200
ELISArray™ Kit - IL8	1:1000
ELISArray™ Kit - IL10	unverdünnt

Im folgenden Schritt wurde die Standardreihe über acht Stufen (0 – 2000 pg/ml) in 1,5 ml Reaktionsgefäße angesetzt. Die Verdünnung der Proben (Tab. 10) und der Standardreihe erfolgte durch Zugabe des mitgelieferten „Sample Dilution Buffer“.

In jede Vertiefung wurden 50 μ l „Assay Buffer“ vorgelegt, wozu 50 μ l des jeweiligen Standards oder der Probe hinzugegeben wurden. Der Standard, die Proben sowie eine Negativkontrolle (Monozyten-Medium) wurden in Duplikaten pipettiert. Es folgte eine Inkubation der 96-Well Zellkulturplatte für 2 h bei RT. Danach wurde die Zellkulturplatte dreimal mittels Zugabe von je 300 μ l „Wash Buffer“ pro Vertiefung und anschließendem Entfernen der Flüssigkeitsrückstände gewaschen. In jede Vertiefung wurden nun 100 μ l des „Detection Antibodies“ gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte. Nach Zugabe von 100 μ l „Avidin-HRP Conjugate“ folgte eine Inkubation von 30 min bei RT unter Lichtausschluss. Anschließend wurde die Zellkulturplatte viermal

gewaschen. Zuletzt wurden 100 µl „Development Solution“ hinzugefügt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Mittels Zugabe einer „Stop Solution“ wurde die Reaktion abgebrochen, was zu einem Farbumschlag von blau zu gelb führte. Die Absorption der Proben wurde innerhalb von 30 min bei 450 nm im Microplate Reader gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Messung des DNA-Gehalts

Der PicoGreen™ Assay diente der Bestimmung der doppelsträngigen DNA der einzelnen Proben. Abbildung 6 zeigt die DNA-Menge in ng/ml auf den beiden Scaffolds (Kontrolle und Fibrillen) sowie der PnPrOx-Beschichtung nach einem, drei und sieben Tagen der Kultivierung mit Monozyten/Makrophagen. Es ist zu erkennen, dass es bei den Mengen an doppelsträngiger DNA weder gegenüber der Zeit noch gegenüber der Oberflächenstruktur signifikante Unterschiede gab. So hatten die Proben an Tag 1 einen DNA-Gehalt von $265,7 \pm 61,6$ ng/ml (Beschichtung), $377,3 \pm 58,5$ ng/ml (Kontrolle) und $351,5 \pm 82,8$ ng/ml (Fibrillen). An Tag 3 wiesen diese einen DNA-Gehalt von $253,1 \pm 75,4$ ng/ml (Beschichtung), $244,3 \pm 75,2$ ng/ml (Kontrolle) und $363,8 \pm 72,5$ ng/ml (Fibrillen) und an Tag 7 einen Wert von $377,5 \pm 175,1$ ng/ml (Beschichtung), $302,7 \pm 131,3$ ng/ml (Kontrolle) und $290,9 \pm 75,8$ ng/ml (Fibrillen) auf.

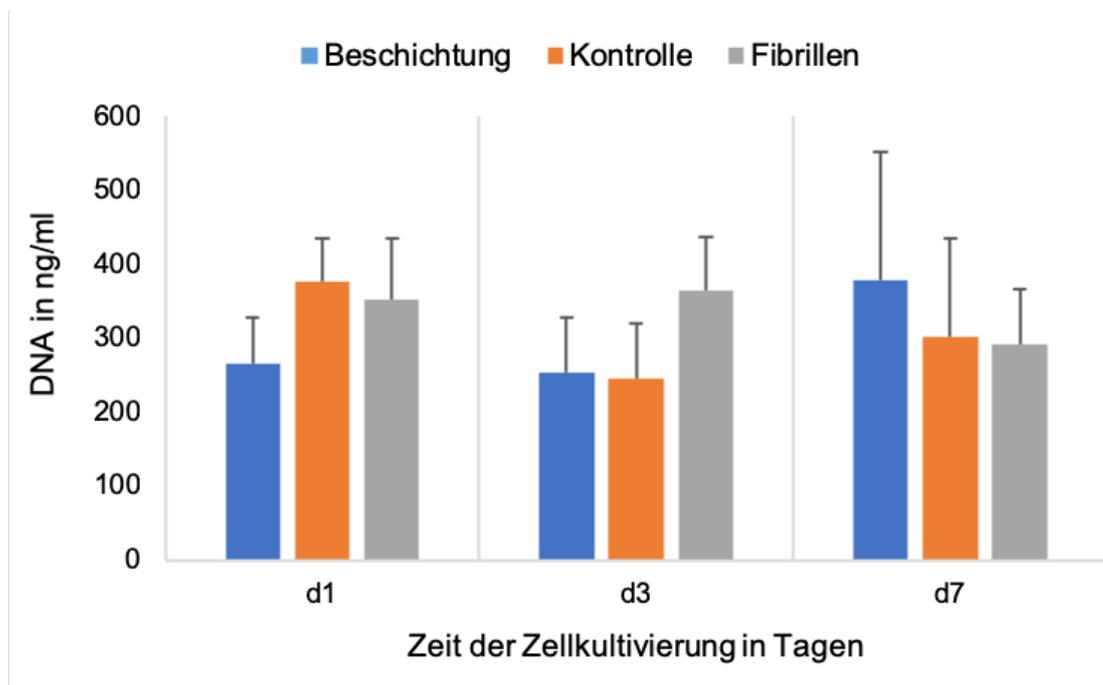


Abbildung 6: DNA-Menge pro Probe. DNA-Mengen in ng/ml der jeweiligen Proben Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) nach einem, drei und sieben Tagen der Monozyten/Makrophagen Kultivierung. (Mittelwerte \pm SD, n=4)

3.2 Zytokinsekretions-Profil von Makrophagen nach Kultivierung auf verschiedenen PnPrOx-Oberflächen

Die Überstände der Proben wurden zum jeweiligen, untersuchten Zeitpunkt entnommen und die Konzentrationen verschiedener Zytokine gemessen. Dadurch sollten Rückschlüsse über den Differenzierungsgrad der adhärenierten Makrophagen gezogen werden können. Die Konzentrationen wurden in Mittelwerten mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Die Säulendiagramme stellen jeweils die Sekretion der vier Zytokine durch Makrophagen der letzten 24 h dar, da zu diesem Zeitpunkt ein Mediumwechsel stattfand.

3.2.1 Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-1 β

Abbildung 7 zeigt die im Überstand befindliche Konzentration von IL-1 β in pg in Relation zur DNA-Menge in ng der gleichen Probe auf den verschiedenen PnPrOx-Oberflächen und der Dauer der Zellkultivierung.

Die Konzentration von IL-1 β in den Proben der Beschichtung erhöhte sich von $54,6 \pm 12,7$ pg an Tag 1 über $63,2 \pm 13,7$ pg an Tag 3 auf $130,9 \pm 29,3$ pg an Tag 7. Dabei war der Anstieg von Tag 1 auf Tag 7, sowie von Tag 3 auf Tag 7 höchst signifikant.

Auf den Kontrollen-Scaffolds kultivierte Makrophagen zeigten an Tag 1 eine Freisetzung von IL-1 β in Höhe von $26,5 \pm 8,6$ pg. Diese wurde im weiteren Verlauf rückläufig, von $22,4 \pm 15,9$ pg an Tag 3 auf $6,6 \pm 2,2$ pg an Tag 7. Die Konzentration auf den Kontrollen-Scaffolds von Tag 3 war gegenüber der Konzentration auf den Beschichtungen und den Fibrillen-Scaffolds an Tag 3 signifikant. Höchst signifikante Werte wurden bei den Kontrollen-Scaffolds an Tag 7 gegenüber den Beschichtungen und Fibrillen-Scaffolds an Tag 7 beobachtet.

Die Sekretion von IL-1 β der Makrophagen auf den Fibrillen-Scaffolds unterlag einer stetigen Steigerung von $47,3 \pm 4,9$ pg an Tag 1 über $57,4 \pm 14,9$ pg an Tag 3 auf $72,7 \pm 13,3$ pg an Tag 7. Höchst signifikant zeigte sich die Konzentration

auf den Fibrillen-Scaffolds verglichen mit der Konzentration auf den Beschichtungen an Tag 7.

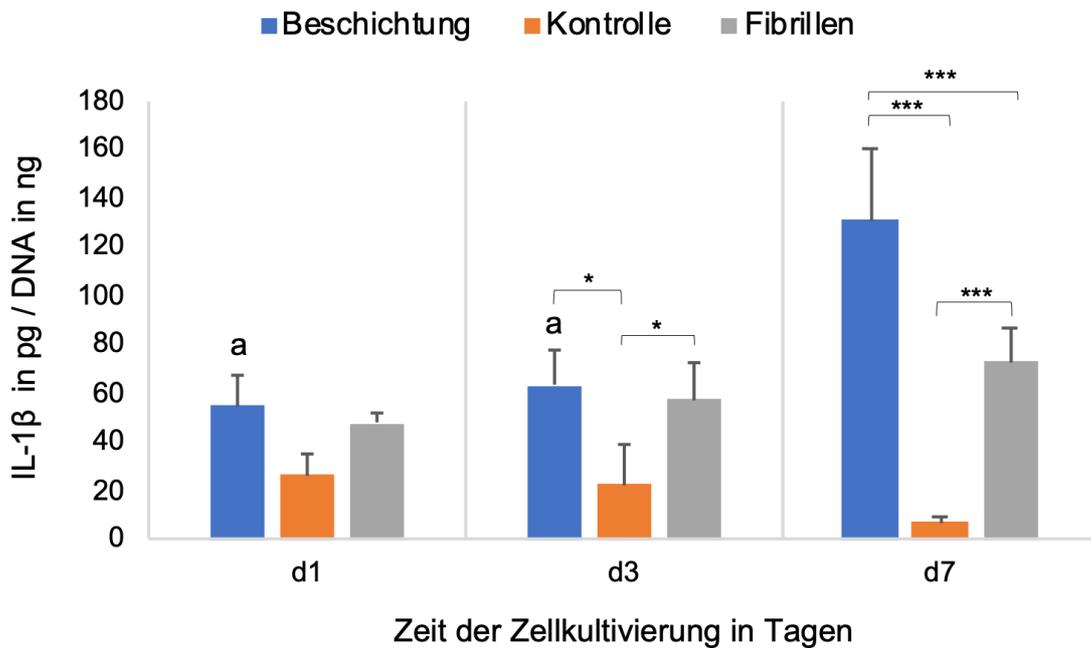


Abbildung 7: IL-1 β pro DNA. Sekretion von IL-1 β in pg normiert auf DNA in ng aus den Überständen der auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) kultivierten Monozyten/Makrophagen nach einem, drei und sieben Tagen. (Mittelwerte \pm SD, n=4), *p<0,05; ***p<0,001; ^ap<0,001 vs. Beschichtung, d7

3.2.2 Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-6

Abbildung 8 zeigt die im Überstand befindliche Konzentration von IL-6 in pg in Relation zur DNA-Menge in ng der gleichen Probe auf den verschiedenen PnPrOx-Oberflächen und der Dauer der Zellkultivierung.

Die Konzentration von IL-6 auf den Beschichtungen an Tag 1 änderte sich mit $436,7 \pm 191,1$ pg kaum gegenüber der Konzentration auf den Beschichtungen an Tag 3 mit einem Wert von $446,5 \pm 82,1$ pg. Gegenüber der Freisetzung auf den Beschichtungen an Tag 7 mit $204,4 \pm 72,2$ pg fand ein deutlicher Rückgang statt. Die Sekretion von IL-6 auf den Beschichtungen an Tag 1 ist sowohl signifikant gegenüber der Freisetzung auf den Beschichtungen an Tag 7 als auch hoch signifikant gegenüber der Konzentration auf den Kontrollen- und Fibrillen-

Scaffolds an Tag 1. Die Konzentration von IL-6 auf den Beschichtungen an Tag 3 ist ebenfalls signifikant gegenüber der Sekretion auf den Beschichtungen an Tag 7. Außerdem ist sie signifikant gegenüber der Zytokin-Freisetzung der Makrophagen auf den Kontrollen- und Fibrillen-Scaffolds an Tag 3.

Auf den Kontrollen-Scaffolds kultivierte Makrophagen zeigten eine Steigerung der Freisetzung von IL-6 von $119,5 \pm 77,7$ pg an Tag 1 auf $237,9 \pm 103,1$ pg an Tag 3. An Tag 7 sank diese dagegen auf $25,9 \pm 0,6$ pg. Die Konzentration auf den Kontrollen-Scaffolds an Tag 7 war signifikant gegenüber der Zytokin-Freisetzung auf den Fibrillen-Scaffolds an Tag 7.

Die Konzentration auf den Fibrillen-Scaffolds unterlag einer stetigen Steigerung von $135,8 \pm 22,4$ pg an Tag 1 über $222,8 \pm 30,7$ pg an Tag 3 bis $290,7 \pm 103,1$ pg an Tag 7.

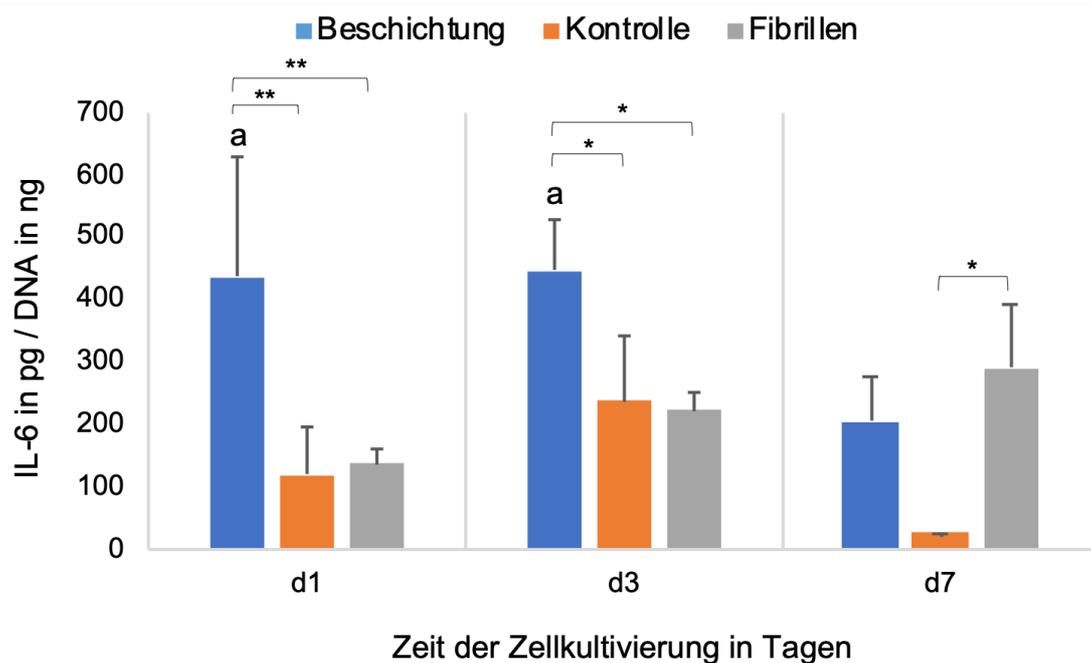


Abbildung 8: IL-6 pro DNA. Sekretion von IL-6 in pg normiert auf DNA in ng aus den Überständen der auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) kultivierten Monozyten/Makrophagen nach einem, drei und sieben Tagen. (Mittelwerte \pm SD, n=4), *p<0,05; **p<0,01; ^ap<0,05 vs. Beschichtung, d7

3.2.3 Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-8

Abbildung 9 zeigt die im Überstand befindliche Konzentration von IL-8 in pg in Relation zur DNA-Menge in ng der gleichen Probe auf den verschiedenen PnPrOx-Oberflächen und der Dauer der Zellkultivierung.

Die Konzentration auf den Beschichtungen unterlag einer stetigen Steigerung von $907,9 \pm 241,9$ pg an Tag 1 über $2.602,7 \pm 317,4$ pg an Tag 3 auf einen Wert von $3.573,1 \pm 2750,8$ pg an Tag 7. Die Freisetzung von IL-8 auf den Beschichtungen von Tag 1 war hoch signifikant gegenüber der Freisetzung der Beschichtung an Tag 7.

Auf den Kontrollen-Scaffolds kultivierte Makrophagen zeigten an Tag 1 eine Zytokin-Freisetzung von IL-6 in Höhe von $422,5 \pm 129,3$ pg. Dieser Wert erhöhte sich auf $1.519,4 \pm 734,7$ pg an Tag 3 und sank an Tag 7 auf $1.003,5 \pm 242,0$ pg. Der Wert der Zytokin-Sekretion auf den Kontrollen-Scaffolds an Tag 7 war sowohl signifikant gegenüber dem Wert auf der Beschichtung an Tag 7 als auch gegenüber dem Wert auf den Fibrillen-Scaffolds an Tag 7.

Die Konzentration von IL-8 auf den Fibrillen-Scaffolds an Tag 1 wies einen Wert von $615,8 \pm 219,1$ pg auf. Dieser erhöhte sich um das 2,9-fache auf $1.789,6 \pm 259,4$ pg an Tag 3 und verdoppelte sich annähernd an Tag 7 auf $3.174,6 \pm 699,1$ pg. Die Zytokin-Freisetzung auf den Fibrillen-Scaffolds an Tag 1 war signifikant gegenüber dem Wert auf den Fibrillen-Scaffolds an Tag 7.

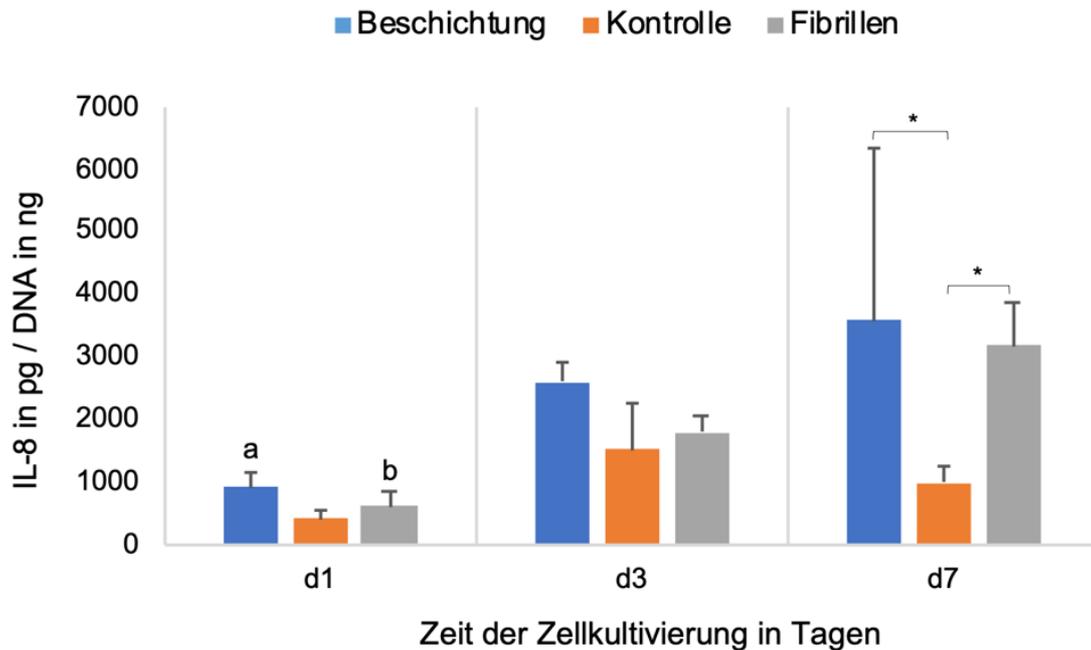


Abbildung 9: IL-8 pro DNA. Sekretion von IL-8 in pg normiert auf DNA in ng aus den Überständen der auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) kultivierten Monozyten/Makrophagen nach einem, drei und sieben Tagen. (Mittelwerte \pm SD, n=4), *p<0,05; ^ap<0,01 vs. Beschichtung, d7; ^bp<0,05 vs. Fibrillen, d7

3.2.4 Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Freisetzung von IL-10

Abbildung 10 zeigt die im Überstand befindliche Konzentration von IL-10 in pg in Relation zur DNA-Menge in ng der gleichen Probe auf den verschiedenen PnPrOx-Oberflächen und der Dauer der Zellkultivierung.

Die Zytokin-Freisetzung von IL-10 auf den Beschichtungen an Tag 1 lag bei $3,7 \pm 2,3$ pg und änderte sich im Vergleich zu dem Wert von $3,9 \pm 1,4$ pg an Tag 3 unwesentlich. An Tag 7 wies sie eine Konzentration von IL-10 in Höhe von $0,6 \pm 0,1$ pg auf.

Die Zytokin-Sekretion von IL-10 auf den Kontrollen-Scaffolds an Tag 1 beschrieben einen Wert von $3,4 \pm 0,4$ pg. Dieser stieg an Tag 3 leicht auf einen Wert von $4,4 \pm 3,2$ pg an. An Tag 7 sank die Konzentration auf den Kontrollen-Scaffolds auf einen Wert von $0,5 \pm 0,1$ pg. Die Sekretion auf den Kontrollen-

Scaffolds an Tag 3 war signifikant gegenüber der Sekretion auf den Kontrollen-Scaffolds an Tag 7.

Die Konzentration von IL-10 auf den Fibrillen-Scaffolds wies an Tag 1 einen Wert von $5,3 \pm 2,0$ pg auf. Dieser Wert sank an Tag 3 auf $3,0 \pm 0,9$ pg. An Tag 7 wiederum zeichnete sich ein Anstieg auf einen Wert von $4,3 \pm 0,5$ pg an.

Signifikant zeigte sich die Zytokin-Freisetzung von IL-10 auf den Fibrillen-Scaffolds an Tag 7 verglichen mit dem Wert auf den Kontrollen-Scaffolds an Tag 7.

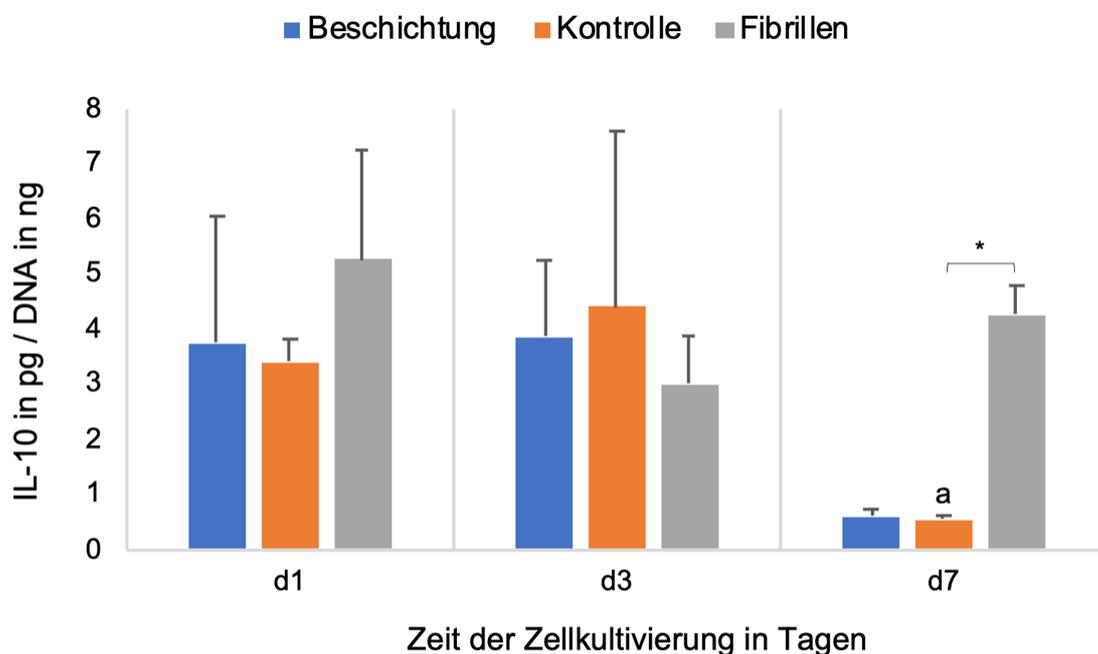


Abbildung 10: IL-10 pro DNA. Sekretion von IL-10 in pg normiert auf DNA in ng aus den Überständen der auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) kultivierten Monozyten/Makrophagen nach einem, drei und sieben Tagen. (Mittelwerte \pm SD, n=4), *p<0,05; ^ap<0,05 vs. Kontrolle, d3

3.3 Expression spezifischer M2-Makrophagen Oberflächenmarker nach Kultivierung auf verschiedenen PnPrOx-Oberflächen

Die auf den verschiedenen PnPrOx-Oberflächen adhärierten Zellen wurden in ihre Bestandteile lysiert und im Western Blot auf die Expression der für M2-Makrophagen spezifischen Oberflächenmarker CD163 und CD2016 untersucht. Dadurch sollten Rückschlüsse über den Differenzierungsgrad der adhärierten Makrophagen gezogen werden können. Die Säulendiagramme stellen jeweils die Expression der beiden Oberflächenmarker nach 24 h und nach sieben Tagen dar.

3.3.1 Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Expression von CD163

Abbildung 11 zeigt die relative Expression von CD163 auf den verschiedenen PnPrOx-Oberflächen und der Dauer der Zellkultivierung. In Abbildung 12 sind die Proteinbanden eines Spenders beispielhaft dargestellt.

Die relative Expression von CD163 auf den Beschichtungen lag an Tag 1 bei $0,9 \pm 0,3$ und änderte sich im Vergleich zu Tag 7 ($0,9 \pm 0,6$) kaum.

Die relative Expression auf den Kontrollen-Scaffolds an Tag 1 zeigte einen Wert von $2,0 \pm 0,8$ und sank an Tag 7 auf $1,0 \pm 0,5$.

Auf den Fibrillen-Scaffolds fand sich eine relative Expression von $2,1 \pm 0,1$ an Tag 1, die sich über den Zeitverlauf bis Tag 7 leicht erhöhte ($2,3 \pm 0,9$).

Die relative Expression von CD163 durch Makrophagen kultiviert auf fibrillären Scaffolds an Tag 7 war signifikant höher gegenüber der Expression durch Makrophagen kultiviert auf den Beschichtungen sowie auf den Kontrollen-Scaffolds an Tag 7.

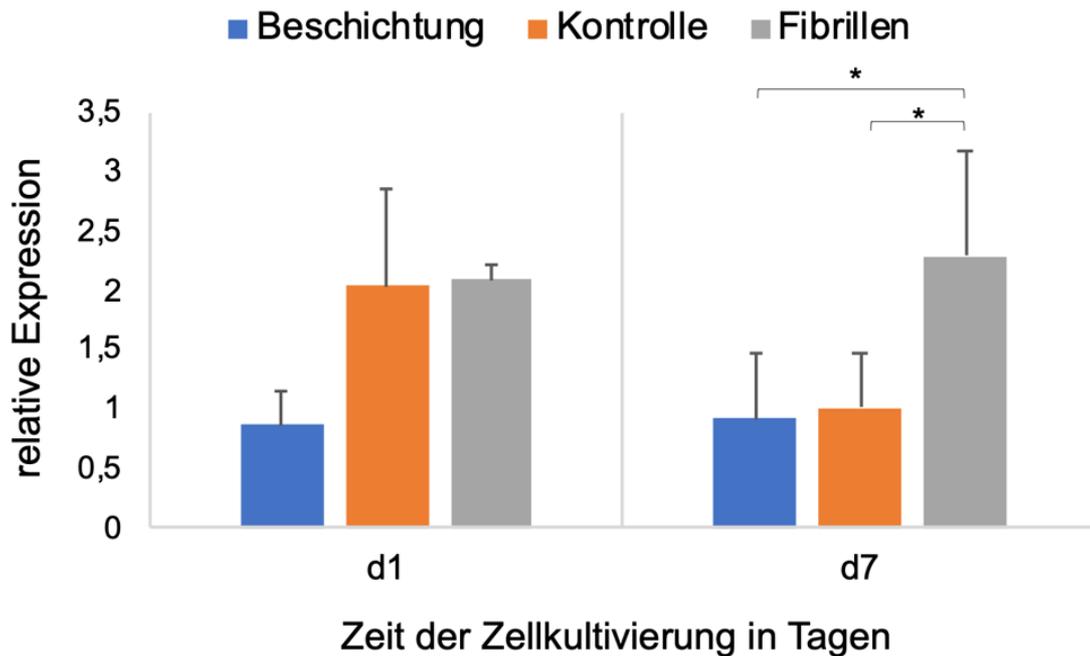


Abbildung 11: relative Expression von CD163. Die relative Expression des Oberflächenmarkers CD163 von Makrophagen, normiert auf GAPDH. Makrophagen wurden auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) kultiviert und nach einem und sieben Tagen auf den Oberflächenmarker CD163 untersucht. Normiert wurden die Werte auf das Haushaltsprotein GAPDH. (Mittelwerte \pm SD, n=4), *p<0,05

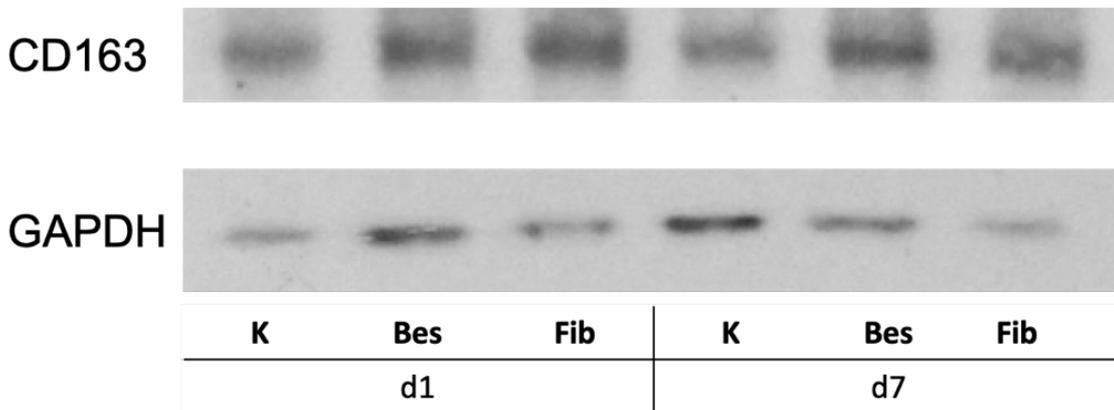


Abbildung 12: repräsentative Proteinbanden des Immunoblots von CD163. Dargestellt sind die Proteinbanden von CD163 und GAPDH eines Spenders auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche) (Bes), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) (K) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) (Fib) nach ein- (d1) und sieben-tägiger (d7) Kultivierung von Monozyten/Makrophagen.

3.3.2 Einfluss verschiedener PnPrOx-Oberflächen auf die Expression von CD206

Abbildung 13 zeigt die relative Expression von CD206 auf den verschiedenen PnPrOx-Oberflächen und der Dauer der Zellkultivierung. In Abbildung 14 sind die Proteinbanden eines Spenders beispielhaft dargestellt.

Die relative Expression von CD206 der Makrophagen auf den Beschichtungen lag an Tag 1 bei $0,4 \pm 0,2$ und verdoppelte sich auf $0,8 \pm 0,1$ an Tag 7.

Der Wert der relativen Expression auf den Kontrollen-Scaffolds erhöhte sich minimal von $0,7 \pm 0,4$ an Tag 1 auf $0,8 \pm 0,1$ an Tag 7.

Die relative Expression auf den Fibrillen-Scaffolds verdoppelte sich von $0,6 \pm 0,3$ an Tag 1 auf $1,2 \pm 0,2$ an Tag 7 an.

Der Wert der relativen Expression von CD206 durch Makrophagen, die auf den Fibrillen-Scaffolds kultiviert wurden, war an Tag 1 signifikant höher gegenüber dem Wert an Tag 7.

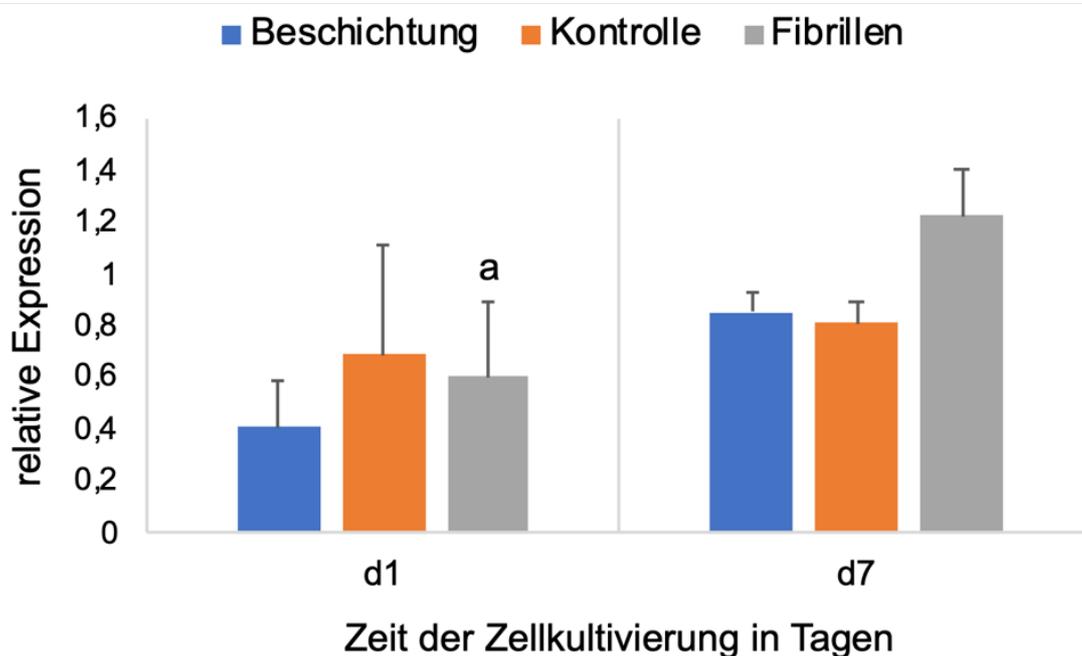


Abbildung 13: relative Expression von CD206. Die relative Expression des Oberflächenmarkers CD206 von Makrophagen, normiert auf GAPDH. Makrophagen wurden auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) kultiviert und nach einem und sieben Tagen auf den Oberflächenmarker CD206 untersucht. Normiert wurden die Werte auf das Haushaltsprotein GAPDH. (Mittelwerte \pm SD, n=4), ^ap<0,05 vs. Fibrillen, d7

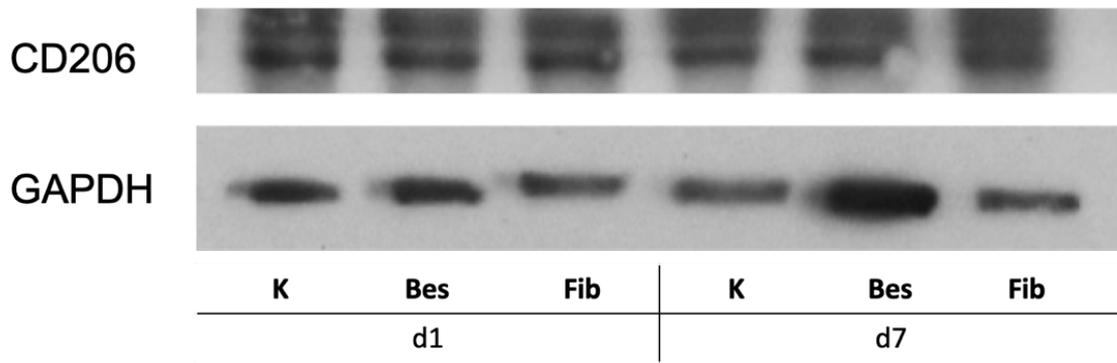


Abbildung 14: repräsentative Proteinbanden des Immunoblots von CD206. Dargestellt sind die Proteinbanden von CD206 und GAPDH eines Spenders auf den PnPrOx-Oberflächen Beschichtung (zweidimensionale, glatte Fläche) (Bes), Kontrolle (dreidimensionales Scaffold mit glatter Oberfläche) (K) und Fibrillen (dreidimensionales Scaffold mit fibrillenartiger Oberfläche) (Fib) nach ein- (d1) und sieben-tägiger (d7) Kultivierung von Monozyten/Makrophagen.

4 Diskussion

Eine typische Reaktion des menschlichen Immunsystems nach Kontakt mit einem Fremdstoff ist eine Abwehrreaktion. Diese ist nützlich und hilfreich, um potenziell gefährliche Fremdkörper zu beseitigen [102]. Bei Biomaterialien und Implantaten ist eine ausgeprägte Abwehrreaktion des Immunsystems allerdings für die Integration hinderlich. Die physiologische Fremdkörperreaktion des Körpers sollte daher dahingehend gelenkt werden, dass eine Entzündungsreaktion möglichst geringgehalten wird und das Biomaterial so entzündungsfrei wie möglich einheilen kann [41]. Dies kann auf verschiedensten Wegen erreicht werden, so können z.B. entzündungshemmende Medikamente wie nicht-steroidale Antirheumatika eingenommen werden, diese wirken allerdings systemisch und können oftmals Nebenwirkungen hervorrufen [103]. Des Weiteren können die Materialeigenschaften von Biomaterialien eine Integration begünstigen, indem sie möglichst inert sind, mit einer antibakteriellen, die Einheilung begünstigenden Zellschicht überzogen sind [104] oder über eine bestimmte Oberflächenbeschaffenheit verfügen, welche Immunzellen beeinflussen können [57].

Makrophagen spielen bei Entzündungsreaktionen eine bedeutende Rolle, da sie mit zu den ersten Immunzellen gehören, welche in Kontakt mit dem Fremdkörper treten, und durch die Expression verschiedenster Mediatoren wesentlichen Einfluss auf die Ausmaße der Abwehrreaktion haben [41]. Je nach Stimulus können sich Makrophagen in verschiedene Subtypen differenzieren, die vom entzündungsfördernden M1-, über verschiedenste Mischformen, bis hin zum entzündungshemmenden M2-Typ reichen [12]. Neben der induzierten Differenzierung durch bspw. Zytokine, LPS, Immunkomplexe, Glukokortikoide oder sonstige chemotaktische Mediatoren, können Makrophagen auch allein durch *in vitro* Kultivierung und Adhärenz [105, 106] oder durch den Kontakt mit der Oberfläche eines Biomaterials spontan differenzieren [107].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Polymer PnPrOx einen Einfluss auf die Proteinexpression von Makrophagen ausübt. So konnten Korrelationen zwischen PnPrOx Proben und der Proteinexpression humaner Makrophagen

allein aufgrund unterschiedlicher Topographien des verwendeten Polymers gezeigt werden.

Bei Betrachtung der DNA-Mengen humaner Monozyten/Makrophagen, die nach der Kultivierung auf den drei unterschiedlichen Proben nachgewiesen wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Proben ermittelt werden. Folglich lässt sich daraus schließen, dass potenzielle Polarisierungsunterschiede nicht in Korrelation zur DNA-Menge stehen.

Interleukinausschüttung

Makrophagen können eine große Bandbreite an biologisch aktiven Stoffen freisetzen, die entzündungshemmend oder -fördernd sein können oder auch beide Funktionen in sich vereinen können [20, 32, 108].

IL-1 β ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches zu Beginn einer Immunantwort gebildet und sezerniert wird und das sowohl die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen stimuliert, wodurch die Körpertemperatur ansteigt, als auch die Sekretion von Histamin fördert, wodurch die Gefäße erweitert und die Entzündungsstelle als solche lokalisiert wird [108]. Das Sekretionsprofil von IL-1 β in dieser Arbeit zeigt an, dass die beiden dreidimensionalen Proben eine deutlich niedrigere Freisetzung von IL-1 β aufweisen als die zweidimensionale Beschichtung. Daher scheint die dreidimensionale Struktur einen positiven Effekt auf die Herabregulierung dieses pro-inflammatorischen Zytokins zu haben.

IL-6 ist in seiner Wirkweise, je nachdem in welchem Umfeld es sich befindet, sowohl als pro- als auch als anti-inflammatorisch einzustufen: so ist es zum einen an Entzündungsreaktionen als auch in regenerativen Prozessen wie der Gewebereparatur beteiligt [108, 109]. Die Zytokin-Freisetzung von IL-6 war zu Beginn der Kultivierung auf den Beschichtungen, verglichen mit den beiden dreidimensionalen Scaffolds, signifikant verstärkt, wodurch auch diesbezüglich ein positiver Einfluss der dreidimensionalen Struktur zu erkennen war. Daraus lässt sich vermuten, dass die pro-inflammatorischen Effekte von IL-6 zu Beginn der Kultivierungsdauer auf den fibrillären Scaffolds, verglichen zu der Beschichtung, abgeschwächt werden und die entzündungshemmenden

Eigenschaften, wie bspw. die Gewebereparatur, gegen Ende der Kultivierungsdauer überwiegen [109].

Ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin ist IL-8, das für die chemotaktische Rekrutierung von Immunzellen in entzündetes Gewebe verantwortlich ist [110]. Allerdings spielt es eine ebenso wichtige Rolle bei der Angiogenese: hier regt es über VEGF Endothelzellen zur Teilung und Migration und somit zur Angiogenese an [110, 111]. Die in dieser Untersuchung beobachtete Hochregulierung von IL-8 auf den fibrillären Scaffolds deuten einen positiven Effekt auf die Angiogenese und somit auch den Gewebeaufbau und die Vaskularisation an. Dies haben auch Tan *et al.* gezeigt, die die Rolle von dreidimensionalen Scaffolds und menschlichen Tumorzellen auf die Angiogenese untersucht und dabei festgestellt haben, dass IL-8 einen großen Einfluss auf die Rekrutierung von Endothelzellen und somit die Neubildung von Gefäßen ausübt [112].

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, welches von M2-Makrophagen freigesetzt wird [27]. Dabei nimmt es eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen ein, da es die Fähigkeit besitzt, die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α von Makrophagen zu hemmen [113, 114]. Ferner zeigen Makrophagen in Anwesenheit von IL-10 eine niedrigere Sensitivität gegenüber IFN- γ und weisen eine verminderte mikrobizide Aktivität auf [115]. Durch diese Eigenschaft könnte die konstante Ausschüttung von IL-10, die den Testergebnissen zufolge signifikant höher auf den fibrillären Scaffolds war, eine Polarisierung von Makrophagen durch IFN- γ in ihren entzündungsfördernden M1-Typ verhindern und entstehende Entzündungsprozesse unterdrücken. Die höhere Ausschüttung von IL-10 auf den fibrillären Strukturen im Vergleich zu den anderen beiden Proben deutet darauf hin, dass die strukturierte Topographie einen positiven Effekt auf die Freisetzung von IL-10 und somit auf die Regulierung der Entzündungsreaktion und ihren anti-inflammatorischen Einfluss hat.

Expression der Oberflächenmarker

Eine weitere Möglichkeit der Zellkommunikation besteht in der Expression verschiedener Oberflächenmarker, die von anderen Immunzellen erkannt werden und, je nach deren Funktion, eine bestimmte Reaktion fördern oder hemmen bzw. hoch- oder herunterregulieren [34]. CD163 ist ein Oberflächenmarker, der verstärkt von M2-Makrophagen als Antwort auf einen entzündungshemmenden Stimulus exprimiert und daher mit anti-inflammatorischen Vorgängen in Verbindung gebracht wird [116, 117]. In Makrophagen, die in Kontakt mit IL-4, IL-6, IL-10 oder Glukokortikoiden kommen, wird die Expression von CD163 erhöht, wohingegen Mediatoren wie IFN- γ , TNF- α und LPS die Expression von CD163 in Makrophagen vermindern [116, 118-120].

CD206, ebenfalls ein Oberflächenmarker, wird von menschlichen M2-Makrophagen exprimiert und mit anti-inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht [118, 119, 121]. Sinkt die Konzentration von CD206, so steigt der Serumspiegel pro-inflammatorischer Proteine, was andeutet, dass CD206 eine Rolle in der Auflösung von Entzündungsreaktionen spielt und dafür sorgt, dass Entzündungsfaktoren aus dem Blut gefiltert werden [122].

Auf den fibrillären Scaffolds, verglichen mit den glatten Scaffolds und den Beschichtungen, war die beobachtete Expression von CD163 in Makrophagen konstant und höher und die Expression von CD206 hochreguliert, was in Kombination mit den Sekretionsprofilen der Zytokine für eine positive Beeinflussung der fibrillären Strukturen in Bezug auf die Immunantwort der Makrophagen auf den Fremdkörper PnPrOx spricht. Ferner konnte bereits nachgewiesen werden, dass menschliche Makrophagen, die auf strukturierten Oberflächen kultiviert wurden, ebenfalls eine erhöhte Expression von CD163 aufwiesen [123]. Des Weiteren konnte bei *in vivo* Versuchen gezeigt werden, dass Makrophagen, die sich in entzündetem Gewebe um eine frisch implantiertes, polymeres Biomaterial befanden, eine erhöhte Expression von CD206 aufgewiesen haben [124].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vier Zytokin-Sekretionsprofile und der beiden Oberflächenmarker, dass die kultivierten Makrophagen von allen drei Oberflächenstrukturen von PnPrOx beeinflusst wurden. Im Vergleich zum Beginn wurden am Ende der Kultivierungsdauer, besonders auf den fibrillären Scaffolds, M1-typische Marker vermindert und gleichzeitig M2-typische Marker vermehrt ausgeschüttet. Brown *et al.* haben in ihrer Studie nachgewiesen, dass dieses Verhältnis, eine hohe Konzentration an M2-Makrophagen und eine niedrige Konzentration an M1-Makrophagen, die Integration und Einheilung implantierter Biomaterialien begünstigt [46]. Des Weiteren haben Badylak *et al.* in ihrer Studie im Rattenmodell gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Polarisierung von Makrophagen und der Einheilung und Integration von Implantaten und Biomaterialien gibt: traten vermehrt M1-Marker auf, so wies das Implantationsumfeld nach 16 Wochen eine chronische Entzündung auf, bei einer erhöhten Konzentration von M2-Markern befand sich das Implantationsumfeld nach demselben Beobachtungszeitraum in einem heilenden Gewebeumbauprozess [44]. In Anbetracht der Ergebnisse unterstreicht dies die positive Eigenschaft von PnPrOx in Bezug auf die Reaktion der Makrophagen, besonders auf den fibrillären Oberflächenstrukturen. Dies deckt sich ebenfalls mit der Studie von Bartneck *et al.*, in welcher gezeigt wurde, dass die Oberflächenbeschaffenheit beim Design von Biomaterialien ein einflussreiches Mittel darstellt, um die Reaktion von Immunzellen zu beeinflussen [109].

Allgemein war die Proteinexpression von M2-Markern durch Makrophagen auf den fibrillären Scaffolds in dieser experimentellen Studie deutlich erhöht, verglichen mit den zweidimensionalen Beschichtungen und gegen Ende der Kultivierungszeit auch mit den unstrukturierten, glatten Scaffolds. Ebenso ist die Sekretion der M1-Marker auf den Beschichtungen stets deutlich höher ausgefallen als auf den dreidimensionalen Scaffolds. Diese Resultate bei den Beschichtungen könnten sich womöglich dadurch erklären lassen, dass eine zweidimensionale Beschichtung deutlich geringer der natürlichen Umgebung von Zellen entspricht als ein dreidimensionales Scaffold, welches aus demselben Biomaterial mit identischen, biochemischen Eigenschaften besteht. Die hier erzielten Ergebnisse mit den Beschichtungen entsprechen annähernd denen

bereits vorausgegangener Studien, die zeigten, dass Untersuchungen mit zweidimensionalen Zellkulturen schlecht vorhersagbare Daten für weiterführende Tests lieferten [125-127]. Versuche auf zweidimensionalen Proben stellten sich oftmals als insuffizient heraus und sind den mittlerweile hohen Anforderungen der zellbiologischen Forschung nicht mehr gewachsen [128, 129].

Studien zu dreidimensionalen Zellkulturen bzw. Scaffolds haben gezeigt, dass Zellen auf dreidimensionalen Zellkulturen eher ihrem *in vivo* Verhalten Gene exprimieren und Botenstoffe sezernieren als auf zweidimensionalen Zellkulturen [130, 131]. Ferner wurde gezeigt, dass bei *in vitro* Untersuchungen mit dreidimensionalen Scaffolds das Zellwachstum, die Zellorganisation und deren Differenzierung begünstigt wurden und deutlich näher an den physiologischen *in vivo* Verhältnissen lagen als bei zweidimensionalen Zellkulturen. Aussagekräftige Rückschlüsse auf deren tatsächliches *in vivo* Verhalten lassen sich daher deutlich fundierter aus Ergebnissen auf dreidimensionalen als auf zweidimensionalen Zellkulturen bzw. Scaffolds ziehen.

Unter den gegebenen Umständen könnten für die Herunterregulierung der M1-Marker auch die Eigenschaften von PnPrOx eine entscheidende Rolle spielen, da dessen Materialeigenschaften eine hohe Biokompatibilität und einen hohen Verbergungsgrad, also die Unfähigkeit des Immunsystems einen Fremdstoff als solchen zu erkennen, aufweisen [66, 78]. Dies würde auch erklären, warum bei den glatten Scaffolds die Sekretion aller Zytokine am Ende der Kultivierungszeit deutlich herunterreguliert wurde. Unter Einbeziehung dieser Eigenschaften von PnPrOx lässt sich vermuten, dass die glatten Scaffolds von den Makrophagen nicht als Fremdkörper angesehen wurden und die typischen M1-Marker herunterreguliert wurden. Auf den fibrillären Scaffolds wurden die M2-Marker hochreguliert, da hier anzunehmen ist, dass allein die Topographie dazu führte, dass sich die Makrophagen in den länglichen M2-Typ polarisierten und dementsprechend M2-Marker exprimierten und sezernierten. Der Versuchsaufbau schloss jegliche andere Differenzierungseinflüsse auf die Makrophagen aus. Die Ergebnisse sind vor allem hinsichtlich der Tatsache zu beachten, dass Makrophagen zu den ersten Immunzellen gehören, die mit einem Fremdkörper, wie z.B. implantierten Biomaterialien, in Kontakt treten und weitere

Immunzellen zum Ort des Geschehens rekrutieren [41]. Somit können sie einen großen Einfluss auf den Verlauf der Einheilung eines Biomaterials nehmen. Daher scheint vielversprechend, dass die Resultate, gemessen anhand der typischen Marker, ein für die Regeneration günstiges Expressionsspektrum aufweisen, welches als prognostisch günstig für die Einheilung und Integration von implantierten Biomaterialien zu bewerten ist [46, 132]. Bei natürlichen Verletzungen oder Entzündungen finden sich im Anfangsstadium (die ersten drei Tage) vermehrt M1-Makrophagen, danach (vom vierten bis zum zehnten Tag) dominieren M2-Makrophagen [133, 134], daher liegt nahe, dass Biomaterialien, die zuerst den M1- und danach den M2-Typ fördern und begünstigen, dem physiologischen Verhalten von Makrophagen während der Wundheilung entsprechen und als günstig für die Vaskularisation und Integration von Biomaterialien und Implantaten zu betrachten sind [135].

Aufnahmen der Scaffolds bzw. der Beschichtung nach sieben Tagen der Kultivierung mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) (Abb. 15, A-C) zeigen die unterschiedlichen Morphologien, welche Makrophagen auf den drei PnPrOx-Oberflächen einnahmen. Kleine, eher rundliche Makrophagen befanden sich sowohl auf der zweidimensionalen Beschichtung (Abb. 15, A) als auch auf den glatten Scaffolds (Abb. 15, B). Auf den fibrillären Strukturen befanden sich eher längliche Makrophagen (Abb. 15, C), die parallel zu den Fasern lagen und deren längliche Form der Literatur zufolge mit entzündungshemmenden M2-Makrophagen assoziiert wird [57]. Die auf den REM Bildern zu beobachtenden, unterschiedlichen Polarisierungen der Makrophagen scheinen Oberflächenvermittelt zu sein. Dies wurde bereits von McWhorter *et al.* für murine Makrophagen beschrieben [57] und die aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse scheinen dies auch für humane Makrophagen zu bestätigen.

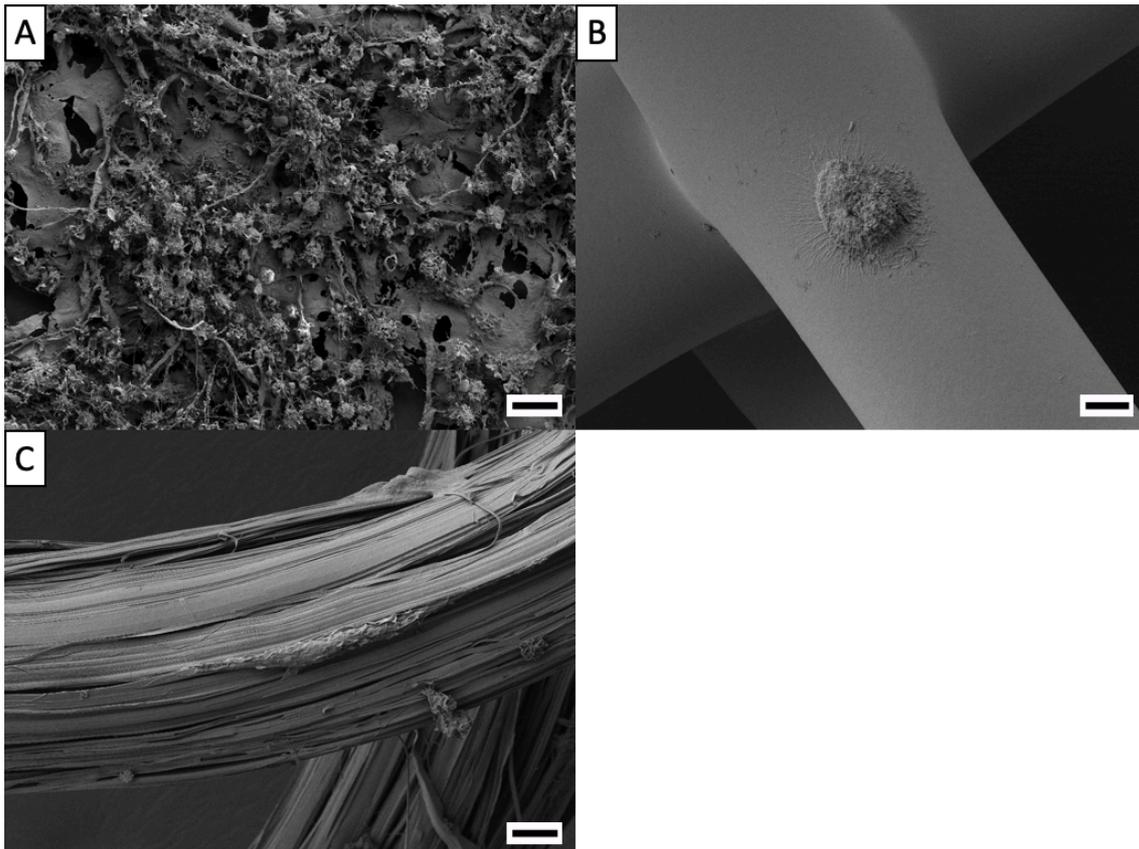


Abbildung 15: REM-Aufnahmen nach sieben Tagen der Kultivierung von Monozyten/Makrophagen auf unterschiedlichen PnPrOx-Oberflächen. A: REM-Aufnahme einer zweidimensionalen Beschichtung. Auf der Beschichtung befinden sich nach sieben Tagen der Kultivierung viele kleine, rundliche Makrophagen, die sich zu aggregierten Bündeln sammeln. **B: REM-Aufnahme eines glatten Scaffolds.** Auf dem glatten Scaffold sind nach sieben Tagen der Kultivierung größere, rundliche, etwas abgeflachte Makrophagen zu finden. **C: REM-Aufnahme eines fibrillären Scaffolds.** Nach sieben Tagen der Kultivierung befinden sich auf dem fibrillären Scaffold längliche Makrophagen, die sich entlang der fibrillären Strukturen des Scaffolds ausrichten und eine Länge von bis zu 50 μm erreichen können. (Maßstabsbalken: A: 20 μm ; B, C: 10 μm) (mit freundlicher Genehmigung von Matthias Ryma und Tina Tylek)

Fazit

Basierend auf den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sich PnPrOx als ein vielversprechendes, biokompatibles Polymer herausstellt und einen entzündungshemmenden Effekt auf Makrophagen ausübt. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Design eines Biomaterials einen beachtlichen Einfluss auf die Immunantwort und damit auch im weiteren Sinne die Differenzierung von Makrophagen hat. Beide dreidimensionalen Scaffolds waren hinsichtlich der M2-Polarisierung der Beschichtung überlegen. Insbesondere Makrophagen auf den Scaffolds mit der fibrillären Oberflächentopographie haben verstärkt entzündungshemmende M2-Mediatoren und deutlich weniger

entzündungsfördernde M1-Marker exprimiert. Die fibrilläre Morphologie der Oberfläche in Kombination mit PnPrOx als biokompatibles Biomaterial scheint einen immunomodulatorischen Effekt auf die menschlichen Makrophagen auszuüben und könnte dabei eine ausgeprägte Entzündungsreaktion abmildern und gleichzeitig einen entzündungshemmenden Effekt haben. Weitere Forschung, die die genauen biochemischen Hintergründe dieses entzündungshemmenden Effekts beleuchtet, könnten den erfolgreichen Weg von PnPrOx in seiner dreidimensionalen, strukturierten Form fortführen. Ein besseres Verständnis dieses Polymers könnten *in vivo* Versuche liefern, um das Oberflächendesign weiterzuentwickeln und dahingehend zu optimieren, die Fremdkörperreaktion im Implantationsumfeld möglichst positiv in Bezug auf Einheilung und Integration des Biomaterials zu gestalten. Da Makrophagen eine ebenso wichtige Rolle bei der Angiogenese und des Gewebeumbaus spielen, könnte sich weiterführende Forschung mit der direkten Vaskularisation von dreidimensionalen Scaffolds ebenfalls als erfolgsversprechend zeigen. Damit öffnet sich mit PnPrOx als Biomaterial in Kombination mit der dreidimensionalen, fibrillären Topographie ein breites Feld für weitere Forschung im Bereich des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin.

5 Zusammenfassung

Biomaterialien führen bei ihrer Implantation unweigerlich zu einer Aktivierung des Immunsystems und somit zu einer Fremdkörperreaktion, wodurch die Funktion des Biomaterials eingeschränkt werden kann und es im ungünstigsten Fall entfernt werden muss.

PnPrOx ist ein synthetisches Polymer, das eine hohe Biokompatibilität aufweist und als Implantations- und Biomaterial in Frage kommt. Durch die Technik Melt Electro Writing ist es möglich, dreidimensionale PnPrOx-Scaffolds mit unterschiedlichen Topographien (fibrillär und glatt) herzustellen. Als zweidimensionale Kontrolle diente eine PnPrOx-Beschichtung. Gegenstand dieser Arbeit war es, den Einfluss dieser drei unterschiedlichen Oberflächen auf die Polarisierung primärer, humaner, aus Monozyten differenzierter Makrophagen hin zu beurteilen. Anhand der Proteinanalysen spezifischer M1- (IL-1 β , IL-6, IL-8) und M2- (CD163, CD206, IL-10) Marker durch Western Blots und ELISAs wurde die Oberflächen-abhängige Differenzierung der Makrophagen untersucht.

Die Proteinexpression und die Zytokin-Freisetzung zeigten einen anti-inflammatorischen Effekt von PnPrOx auf die menschlichen Makrophagen. Dieser Effekt konnte verstärkt auf den fibrillären Scaffolds beobachtet werden. Hier stieg die Expression entzündungshemmender M2-Marker während gleichzeitig die Expression entzündungsfördernder M1-Marker sank.

Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Effekt des Polymers PnPrOx mit seinen unterschiedlichen Topographien auf die Polarisierung von Makrophagen. Die strukturierte, fibrilläre Oberfläche scheint hierbei in seiner Form den entzündungshemmenden M2-Typ zu fördern. Dadurch öffnet sich ein breites Feld für weitere Studien zu Oberflächen-vermittelten Zellreaktionen im Bereich des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin. Weiterführende Forschung im Bereich des Designs von Biomaterialien könnte dazu führen, durch die Topographie eines Biomaterials dessen Verhalten und Interaktion mit Immunzellen positiv zu beeinflussen, um so Entzündungsreaktionen abzuschwächen und gleichzeitig die Einheilung und Integration des Biomaterials zu fördern.

6 Literaturverzeichnis

1. Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Lienau, J., Schulz, N., Hoff, P., Pfaff, M., Schmidt, G., Martin, C., Perka, C., Buttgereit, F., Volk, H. D. and Duda, G., *Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing*. J Tissue Eng Regen Med, 2014. **8**(2): p. 120-30.
2. Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R., *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
3. Parkin, J. and Cohen, B., *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
4. Epelman, S., Lavine, K.J. and Randolph, G.J., *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
5. van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G. and Langevoort, H.L., *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*. Bull World Health Organ, 1972. **46**(6): p. 845-52.
6. Gordon, S. and Taylor, P.R., *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
7. Sridharan, R., Cameron, A.R., Kelly, D.J., Kearney, C.J. and O'Brien, F.J., *Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles*. Materials Today, 2015. **18**(6): p. 313-325.
8. Lewis, C.E. and Pollard, J.W., *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 605-12.
9. Fujiwara, N. and Kobayashi, K., *Macrophages in inflammation*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(3): p. 281-6.
10. Classen, A., Lloberas, J., and Celada, A., *Macrophage activation: classical versus alternative*. Methods Mol Biol, 2009. **531**: p. 29-43.
11. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. and Gordon, S., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
12. Goerdt, S., Politz, O., Schledzewski, K., Birk, R., Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Klemke, C. D., Dippel, E., Kodolja, V. and Orfanos, C. E., *Alternative versus classical activation of macrophages*. Pathobiology, 1999. **67**(5-6): p. 222-6.
13. Leopold Wager, C.M. and Wormley, F.L., Jr., *Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(5): p. 1023-35.
14. Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K. and Suttles, J., *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 342-9.
15. Stout, R.D. and Suttles, J., *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 509-13.
16. Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A. and Locati, M., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 176-85.

17. Zanluqui, N.G., Wowk, P.F., Pinge-Filho, P., *Macrophage Polarization in Chagas Disease*. J Clin Cell Immunol, 2015. **6**: p. 317.
18. Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A. and Stewart, T.A., *Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1739-42.
19. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
20. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
21. Sica, A. and Mantovani, A., *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
22. Martinez, F.O. and Gordon, S., *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
23. Verreck, F.A., de Boer, T., Langenberg, D.M., van der Zanden, L. and Ottenhoff, T.H., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 285-93.
24. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
25. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. and Allavena, P., *Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1065-73.
26. Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A. and Locati, M., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
27. Mosser, D.M. and Edwards, J.P., *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
28. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
29. Gordon, S. and Martinez, F.O., *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
30. Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S., *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
31. Sica, A., Sacconi, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van Damme, J. and Mantovani, A., *Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 762-7.
32. Koh, T.J. and DiPietro, L.A., *Inflammation and wound healing: the role of the macrophage*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. 23.
33. Duffield, J.S., Ware, C.F., Ryffel, B. and Savill, J., *Suppression by apoptotic cells defines tumor necrosis factor-mediated induction of glomerular mesangial cell apoptosis by activated macrophages*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1397-404.

34. Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R. and Girkontaite, I., *Immunosuppressive effects of apoptotic cells*. Nature, 1997. **390**(6658): p. 350-1.
35. Roszer, T., *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 816460.
36. Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M. and Smith, P.D., *Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 66-75.
37. Palecanda, A., Paulauskis, J., Al-Mutairi, E., Imrich, A., Qin, G., Suzuki, H., Kodama, T., Tryggvason, K., Koziel, H. and Kobzik, L., *Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1497-506.
38. Quinn, J.M. and Gillespie, M.T., *Modulation of osteoclast formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(3): p. 739-45.
39. Williams, D.F., *On the nature of biomaterials*. Biomaterials, 2009. **30**(30): p. 5897-909.
40. Klopffleisch, R., *Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers*. Acta Biomater, 2016. **43**: p. 3-13.
41. Anderson, J.M., Rodriguez, A. and Chang, D.T., *Foreign body reaction to biomaterials*. Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 86-100.
42. Tang, L., Jennings, T.A. and Eaton, J.W., *Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8841-6.
43. Zdosek, J., Eaton, J.W. and Tang, L., *Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 31.
44. Badylak, S.F., Valentin, J.E., Ravindra, A.K., McCabe, G.P. and Stewart-Akers, A.M., *Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(11): p. 1835-42.
45. Braga, T.T., Agudelo, J.S. and Camara, N.O., *Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 602.
46. Brown, B.N., Londono, R., Tottey, S., Zhang, L., Kukla, K.A., Wolf, M.T., Daly, K.A., Reing, J.E. and Badylak, S.F., *Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials*. Acta Biomater, 2012. **8**(3): p. 978-87.
47. Adutler-Lieber, S., Zaretsky, I., Platzman, I., Deeg, J., Friedman, N., Spatz, J.P. and Geiger, B., *Engineering of synthetic cellular microenvironments: implications for immunity*. J Autoimmun, 2014. **54**: p. 100-11.
48. Jiang, L., Salao, K., Li, H., Rybicka, J.M., Yates, R.M., Luo, X.W., Shi, X.X., Kuffner, T., Tsai, V.W., Husaini, Y., Wu, L., Brown, D.A., Grewal, T., Brown, L.J., Curmi, P.M. and Breit, S.N., *Intracellular chloride channel protein CLIC1 regulates macrophage function through modulation of phagosomal acidification*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 22): p. 5479-88.

49. Paul, N.E., Skazik, C., Harwardt, M., Bartneck, M., Denecke, B., Klee, D., Salber, J. and Zwadlo-Klarwasser, G., *Topographical control of human macrophages by a regularly microstructured polyvinylidene fluoride surface*. *Biomaterials*, 2008. **29**(30): p. 4056-64.
50. Beningo, K.A. and Wang, Y.L., *Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 4): p. 849-56.
51. Patel, N.R., Bole, M., Chen, C., Hardin, C.C., Kho, A.T., Mih, J., Deng, L., Butler, J., Tschumperlin, D., Fredberg, J.J., Krishnan, R. and Koziel, H., *Cell elasticity determines macrophage function*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e41024.
52. Kong, L., Sun, L., Zhang, H., Liu, Q., Liu, Y., Qin, L., Shi, G., Hu, J.H., Xu, A., Sun, Y.P., Li, D., Shi, Y.F., Zang, J.W., Zhu, J., Chen, Z., Wang, Z.G. and Ge, B.X., *An essential role for RIG-I in toll-like receptor-stimulated phagocytosis*. *Cell Host Microbe*, 2009. **6**(2): p. 150-61.
53. Fertsch, D. and Vogel, S.N., *Recombinant interferons increase macrophage Fc receptor capacity*. *J Immunol*, 1984. **132**(5): p. 2436-9.
54. Doyle, R.J. and Marquis, R.E., *Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties*. *Trends Microbiol*, 1994. **2**(2): p. 57-60.
55. Thwaites, J.J. and Mendelson, N.H., *Mechanical behaviour of bacterial cell walls*. *Adv Microb Physiol*, 1991. **32**: p. 173-222.
56. Chen, S., Jones, J.A., Xu, Y., Low, H.Y., Anderson, J.M. and Leong, K.W., *Characterization of topographical effects on macrophage behavior in a foreign body response model*. *Biomaterials*, 2010. **31**(13): p. 3479-91.
57. McWhorter, F.Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T. and Liu, W.F., *Modulation of macrophage phenotype by cell shape*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(43): p. 17253-8.
58. Almeida, C.R., Serra, T., Oliveira, M.I., Planell, J.A., Barbosa, M.A. and Navarro, M., *Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation*. *Acta Biomater*, 2014. **10**(2): p. 613-22.
59. Lechner M.D., Gehrke, K., Nordmeier E.H. , *Makromolekulare Chemie*. Vol. 3. 2003, Basel: Birkhäuser.
60. Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B.V. and Peppas, N.A., *Polymers for drug delivery systems*. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2010. **1**: p. 149-73.
61. Seeliger, W., Aufderhaar, E., Diepers, W., Feinauer, R., Nehring, R., Thier, W. and Hellmann, H., *Recent syntheses and reactions of cyclic imidic esters*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1966. **5**(10): p. 875-88.
62. Bassiri, T.G., Levy, A. and Litt, M., *Polymerization of Cyclic Imino Ethers .I. Oxazolines*. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters*, 1967. **5**(9pb): p. 871-&.
63. Kagiya, T., Narisawa, S., Maeda, T. and Fukui, K., *Ring-Opening Polymerization of 2-Substituted 2-Oxazolines*. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters*, 1966. **4**(7pb): p. 441-&.
64. Tomalia, D.A. and Sheetz, D.P., *Homopolymerization of 2-Alkyl- and 2-Aryl-2-Oxazolines*. *Journal of Polymer Science Part a-1-Polymer Chemistry*, 1966. **4**(9pa1): p. 2253-&.

65. Chapman, R.G., Ostuni, E., Takayama, S., Holmlin, R.E. and Yan, L., Whitesides, G.M., *Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(34): p. 8303-8304.
66. Hoogenboom, R., *Poly(2-oxazoline)s: a polymer class with numerous potential applications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(43): p. 7978-94.
67. Adams, N. and Schubert, U.S., *Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(15): p. 1504-1520.
68. Mero, A., Pasut, G., Dalla Via, L., Fijten, M.W., Schubert, U.S., Hoogenboom, R. and Veronese, F.M., *Synthesis and characterization of poly(2-ethyl 2-oxazoline)-conjugates with proteins and drugs: Suitable alternatives to PEG-conjugates?* Journal of Controlled Release, 2008. **125**(2): p. 87-95.
69. Pidhatika, B., Rodenstein, M., Chen, Y., Rakhmatullina, E., Muhlebach, A., Acikgoz, C., Textor, M. and Konradi, R., *Comparative Stability Studies of Poly(2-methyl-2-oxazoline) and Poly(ethylene glycol) Brush Coatings*. Biointerphases, 2012. **7**(1-4).
70. Zhang, N., Pompe, T., Amin, I., Luxenhofer, R., Werner, C. and Jordan, R., *Tailored Poly(2-oxazoline) Polymer Brushes to Control Protein Adsorption and Cell Adhesion*. Macromolecular Bioscience, 2012. **12**(7): p. 926-936.
71. Bauer, M., Schroeder, S., Tauhardt, L., Kempe, K., Schubert, U.S. and Fischer, D., *In vitro hemocompatibility and cytotoxicity study of poly(2-methyl-2-oxazoline) for biomedical applications*. Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2013. **51**(8): p. 1816-1821.
72. Kronek, J., Kronekova, Z., Luston, J., Paulovicova, E., Paulovicova, L. and Mendrek, B., *In vitro bio-immunological and cytotoxicity studies of poly(2-oxazolines)*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2011. **22**(7): p. 1725-1734.
73. Sedlacek, O., de la Rosa, V. and Hoogenboom, R., *Poly(2-oxazoline)-protein conjugates*. European Polymer Journal, 2019. **120**.
74. Woodle, M.C., Engbers, C.M. and Zalipsky, S., *New amphipatic polymer-lipid conjugates forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes*. Bioconjug Chem, 1994. **5**(6): p. 493-6.
75. Zalipsky, S., Hansen, C.B., Oaks, J.M. and Allen, T.M., *Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes*. J Pharm Sci, 1996. **85**(2): p. 133-7.
76. Pasut, G. and Veronese, F.M., *Second-Generation Pharmaceutical Proteins-EUFEPS Workshop on Optimizing Biotech Medicines*. IDrugs, 2007. **10**(3): p. 162-4.
77. Gaertner, F.C., Luxenhofer, R., Blechert, B., Jordan, R. and Essler, M., *Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazoline)s*. J Control Release, 2007. **119**(3): p. 291-300.
78. Bauer, M., Lautenschlaeger, C., Kempe, K., Tauhardt, L., Schubert, U.S. and Fischer, D., *Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth*

- polymer poly(ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility*. *Macromol Biosci*, 2012. **12**(7): p. 986-98.
79. Aoi, K. and Okada, M., *Polymerization of oxazolines*. *Progress in Polymer Science*, 1996. **21**(1): p. 151-208.
 80. Luxenhofer, R., Han, Y., Schulz, A., Tong, J., He, Z., Kabanov, A.V. and Jordan, R., *Poly(2-oxazoline)s as Polymer Therapeutics*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2012. **33**(19): p. 1613-1631.
 81. Schlaad, H., Diehl, C., Gress, A., Meyer, M., Demirel, A.L., Nur, Y. and Bertin, A., *Poly(2-oxazoline)s as Smart Bioinspired Polymers*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2010. **31**(6): p. 511-525.
 82. Verbraeken, B., Monnery, B.D., Lava, K. and Hoogenboom, R., *The chemistry of poly(2-oxazoline)s*. *European Polymer Journal*, 2017. **88**: p. 451-469.
 83. Hoogenboom, R. and Schlaad, H., *Thermoresponsive poly(2-oxazoline)s, polypeptoids, and polypeptides*. *Polymer Chemistry*, 2017. **8**(1): p. 24-40.
 84. Moreadith, R.W., Viegas, T.X., Bentley, M.D., Harris, J.M., Fang, Z., Yoon, K., Dizman, B., Weimer, R., Rae, B.P., Li, X., Rader, C., Standaert, D. and Olanow, W., *Clinical development of a poly(2-oxazoline) (POZ) polymer therapeutic for the treatment of Parkinson's disease - Proof of concept of POZ as a versatile polymer platform for drug development in multiple therapeutic indications*. *European Polymer Journal*, 2017. **88**: p. 524-552.
 85. Brown, T.D., Dalton, P.D. and Hutmacher, D.W., *Direct writing by way of melt electrospinning*. *Adv Mater*, 2011. **23**(47): p. 5651-7.
 86. Dalton, P.D., Grafahrend, D., Klinkhammer, K., Klee, D. and Moeller, M., *Electrospinning of polymer melts: Phenomenological observations*. *Polymer*, 2007. **48**(23): p. 6823-6833.
 87. Farrugia, B.L., Brown, T.D., Upton, Z., Hutmacher, D.W., Dalton, P.D. and Dargaville, T.R., *Dermal fibroblast infiltration of poly(epsilon-caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning in a direct writing mode*. *Biofabrication*, 2013. **5**(2).
 88. Mota, C., Puppi, D., Gazzarri, M., Bartolo, P. and Chiellini, F., *Melt electrospinning writing of three-dimensional star poly(epsilon-caprolactone) scaffolds*. *Polymer International*, 2013. **62**(6): p. 893-900.
 89. Hochleitner, G., Jungst, T., Brown, T.D., Hahn, K., Moseke, C., Jakob, F., Dalton, P.D. and Groll, J., *Additive manufacturing of scaffolds with sub-micron filaments via melt electrospinning writing*. *Biofabrication*, 2015. **7**(3): p. 035002.
 90. Bruzauskaite, I., Bironaite, D., Bagdonas, E. and Bernotiene, E., *Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects*. *Cytotechnology*, 2016. **68**(3): p. 355-69.
 91. Ryma, M., Blöbbaum, J., Singh, R., Sancho, A., Matuszak, J., Cicha, I., and Groll, J., *Easy-to-Prepare Coating of Standard Cell Culture Dishes for Cell-Sheet Engineering Using Aqueous Solutions of Poly(2-n-propyl-oxazoline)*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019. **5**(3): p. 1509-1517.
 92. Egger, D. and Bienz, K., *Protein (western) blotting*. *Mol Biotechnol*, 1994. **1**(3): p. 289-305.

93. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
94. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. *J Biochem Biophys Methods*, 1984. **10**(3-4): p. 203-9.
95. She, X., Rohl, C.A., Castle, J.C., Kulkarni, A.V., Johnson, J.M. and Chen, R., *Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes*. *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 269.
96. Reynolds, J.A. and Tanford, C., *Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1970. **66**(3): p. 1002-7.
97. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M., *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. *J Biol Chem*, 1949. **177**(2): p. 751-66.
98. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
99. Engvall, E. and Perlmann, P., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 1971. **8**(9): p. 871-4.
100. Van Weemen, B.K. and Schuurs, A.H., *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. *FEBS Lett*, 1971. **15**(3): p. 232-236.
101. Dragan, A.I., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R.J., Schenerman, M.A. and Geddes, C. D., *Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding*. *Biophys J*, 2010. **99**(9): p. 3010-9.
102. Luttkhuizen, D.T., M.C. Harmsen, and Van Luyn, M.J., *Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(7): p. 1955-70.
103. Paoloni, J.A., Milne, C., Orchard, J. and Hamilton, B., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs in sports medicine: guidelines for practical but sensible use*. *Br J Sports Med*, 2009. **43**(11): p. 863-5.
104. Yu, K., Mei, Y., Hadjesfandiari, N. and Kizhakkedathu, J.N., *Engineering biomaterials surfaces to modulate the host response*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014. **124**: p. 69-79.
105. Eligini, S., Crisci, M., Bono, E., Songia, P., Tremoli, E., Colombo, G.I. and Colli, S., *Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes*. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(7): p. 1464-72.
106. Tylek, T., Schilling, T., Schlegelmilch, K., Ries, M., Rudert, M., Jakob, F. and Groll, J., *Platelet lysate outperforms FCS and human serum for co-culture of primary human macrophages and hMSCs*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 3533.
107. Bota, P.C., Collie, A.M., Puolakkainen, P., Vernon, R.B., Sage, E.H., Ratner, B.D. and Stayton, P.S., *Biomaterial topography alters healing in*

- vivo and monocyte/macrophage activation in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2010. **95**(2): p. 649-57.
108. Arango Duque, G. and Descoteaux, A., *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 491.
 109. Bartneck, M., Heffels, K.H., Pan, Y., Bovi, M., Zwadlo-Klarwasser, G., and Groll, J., *Inducing healing-like human primary macrophage phenotypes by 3D hydrogel coated nanofibres*. Biomaterials, 2012. **33**(16): p. 4136-46.
 110. Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G. and Strieter, R.M., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. Science, 1992. **258**(5089): p. 1798-801.
 111. Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T. and De Bruijn, E.A., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(4): p. 549-80.
 112. Tan, P.H., Chia, S.S., Toh, S.L., Goh, J.C. and Nathan, S.S., *The dominant role of IL-8 as an angiogenic driver in a three-dimensional physiological tumor construct for drug testing*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(11-12): p. 1758-66.
 113. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G. and de Vries, J.E., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
 114. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M. and O'Garra, A., *Pillars Article: IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages*. J. Immunol. 1991. **147**: 3815-3822. J Immunol, 2016. **197**(5): p. 1539-46.
 115. Oswald, I.P., Wynn, T.A., Sher, A. and James, S.L., *Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8676-80.
 116. Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J. and Schmitz, G., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 97-103.
 117. Xu, W., Schlagwein, N., Roos, A., van den Berg, T.K., Daha, M.R. and van Kooten, C., *Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages*. Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1594-9.
 118. Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N. and Wynn, T.A., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
 119. Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A.C., Leone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D. and Gras, G., *Macrophage activation*

- switching: an asset for the resolution of inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): p. 481-9.
120. Van den Heuvel, M.M., Tensen, C.P., van As, J.H., Van den Berg, T.K., Fluitsma, D.M., Dijkstra, C.D., Dopp, E.A., Droste, A., Van Gaalen, F.A., Sorg, C., Hogger, P. and Beelen, R.H., *Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 858-66.
 121. Ezekowitz, R.A. and Gordon, S., *Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens*. Contemp Top Immunobiol, 1984. **13**: p. 33-56.
 122. Lee, S.J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A.F., Risteli, J., Risteli, L., Lee, Y.C., Feizi, T., Langen, H. and Nussenzweig, M.C., *Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1898-901.
 123. Bartneck, M., Schulte, V.A., Paul, N.E., Diez, M., Lensen, M.C. and Zwadlo-Klarwasser, G., *Induction of specific macrophage subtypes by defined micro-patterned structures*. Acta Biomater, 2010. **6**(10): p. 3864-72.
 124. Olingy, C.E., San Emeterio, C.L., Ogle, M.E., Krieger, J.R., Bruce, A.C., Pfau, D.D., Jordan, B.T., Peirce, S.M. and Botchwey, E.A., *Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 447.
 125. Bhadriraju, K. and Chen, C.S., *Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing*. Drug Discov Today, 2002. **7**(11): p. 612-20.
 126. Birgersdotter, A., Sandberg, R. and Ernberg, I., *Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 405-12.
 127. Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damsky, C. and Bissell, M.J., *Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 231-45.
 128. Lee, J., Cuddihy, M.J. and Kotov, N.A., *Three-dimensional cell culture matrices: state of the art*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(1): p. 61-86.
 129. Zietarska, M., Maugard, C.M., Filali-Mouhim, A., Alam-Fahmy, M., Tonin, P.N., Provencher, D.M. and Mes-Masson, A.M., *Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC)*. Mol Carcinog, 2007. **46**(10): p. 872-85.
 130. Baharvand, H., Hashemi, S.M., Kazemi Ashtiani, S. and Farrokhi, A., *Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro*. Int J Dev Biol, 2006. **50**(7): p. 645-52.
 131. Nelson, C.M. and Bissell, M.J., *Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 342-52.
 132. Bryers, J.D., Giachelli, C.M. and Ratner, B.D., *Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts*. Biotechnol Bioeng, 2012. **109**(8): p. 1898-911.

133. Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K. and Chazaud, B., *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
134. Troidl, C., Jung, G., Troidl, K., Hoffmann, J., Mollmann, H., Nef, H., Schaper, W., Hamm, C. W. and Schmitz-Rixen, T., *The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis*. Curr Vasc Pharmacol, 2013. **11**(1): p. 5-12.
135. Spiller, K.L., Nassiri, S., Witherel, C.E., Anfang, R.R., Ng, J., Nakazawa, K.R., Yu, T. and Vunjak-Novakovic, G., *Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds*. Biomaterials, 2015. **37**: p. 194-207.

Appendix

Eigene Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikation

Vorläufiger Titel: Flow and Voltage Induced Phase Separation During Melt Electrowriting of Poly(2-oxazoline) Blend for Elongation-driven Polarization of Human Macrophages

Autorenliste: Matthias Ryma*, Tina Tylek*, Julia Blöhbaum, **Robin Fernandez**, Christoph Böhm, Julia Hümmer, Tatjana Schilling, Katrin Schlegelmilch, Paul D. Dalton, Jürgen Groll

* shared contribution

Status: in Bearbeitung

Konferenzbeitrag

Vortrag

Matthias Ryma, Tina Tylek, Julia Blöhbaum, **Robin Fernandez**, Jürgen Groll
Melt-Electrowritten 3D Scaffolds Based on Aligned Nano-Structured Microfibers for Topography-Mediated Immunomodulation of Human Macrophages. Vorgetragen auf der 30. Jahreskonferenz der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien (ESB) zusammen mit der 26. Jahreskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) am 12. September 2019 in Dresden.

Danksagung

Mein Dank gebührt allen, die mich persönlich und fachlich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Ich danke Prof. Jürgen Groll, Prof. Kathleen Wermke, Dr. Andrea Ewald, Dr. Katrin Schlegelmilch und Tina Tylek für die Möglichkeit der Promotion am Lehrstuhl. Besonderer Dank geht an dieser Stelle an Katrin und Tina, die mir dieses interessante Promotionsthema überhaupt ermöglicht haben.

Ein Dankeschön und ein ganz großes Lob geht an meine Betreuerin Tina Tylek, die mit ihrer organisierten und kompetenten Art ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Du hast dich stets unermüdlich meinen Fragen gestellt und hattest bei Problemen immer einen zuverlässigen Rat. Für deine Unterstützung, das intensive Korrekturlesen und dein Vertrauen in meine Arbeit bin ich ausgesprochen dankbar.

Außerdem möchte ich den Insassen des Interimsgebäudes danken. Da wäre zum einen Matthias Ryma, der mit seiner ironisch witzigen Art viele Male für Aufheiterung gesorgt hat, und der mir freundlicherweise Bildmaterial zur Verfügung gestellt hat, und zum anderen Tatjana Schilling und Thomas Böck, die mir beim Western Blot stets hilfreich und kompetent zur Seite standen. Danke euch allen, dass ihr dafür gesorgt habt, dass ich meiner Arbeit gerne nachgegangen bin und ihr mir die Zeit im Labor unvergesslich gemacht habt.

Herrn Prof. Gbureck danke ich für die Bereitstellung als Referent und Prof. Kübler möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Zu guter Letzt geht ein für mich sehr besonderes Dankeschön an meine Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist. Ihr habt mir immer den Rücken freigehalten und ich kann immer auf eure Unterstützung zählen. Euer grenzenloses Vertrauen in mich hat mich stets motiviert, ich danke euch, dass ihr mir so viel im Leben ermöglicht habt, ich weiß, dass das keine Selbstverständlichkeit ist.

Lebenslauf

Persönliches

Name:	Fernández González
Vorname:	Robin
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Akademische Ausbildung

10/2018 – 08/2019	Arbeit zur Promotion am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde Würzburg
06/2018	Approbation als Zahnarzt
04/2013 - 06/2018	Zahnmedizinstudium Julius-Maximilians Universität Würzburg
04/2011 - 03/2013	Gymnasiales Lehramtsstudium Julius-Maximilians Universität Würzburg Fächerkombination Englisch, Sport und Biologie
09/2000 - 06/2009	Abitur Nicolaus-Kistner-Gymnasium Mosbach

Beruflicher Werdegang

seit 09/2019	Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Kurt Müller in Bad Königshofen im Grabfeld
--------------	---