

**Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. J. Eulert

**Immunmodulation Dendritischer Zellen durch
Sekretionsprodukte mesenchymaler Stammzellen mit
besonderem Fokus auf hCyr61/CCN1**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Constanze Matthes

aus Ulm

Würzburg, Februar 2008

Referent : Prof. Dr. med. F. Jakob

Koreferent: Prof. Dr. med. H.P. Tony

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.Juni 2008

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Interaktion von Mesenchymalen Stammzellen und Zellen des Immunsystems	1
1.2.	Interaktion zwischen Knochen und Zellen des Immunsystems	1
1.2.1.	Dendritische Zellen	3
1.2.2.	Osteoklasten	4
1.3.	Das RANK / RANKL / OPG-System	5
1.3.1.	Bedeutung im Knochenstoffwechsel	7
1.3.2.	Bedeutung für das Immunsystem ⁷	
1.4.	Das cysteinreiche Protein 61 (Cyr 61)	10
1.5.	Klinischer Aspekt der Interaktion zwischen Stroma und DC	12
1.5.1.	Langerhans-Zell-Histiozytose	12
1.5.2.	Rheumatoide Arthritis	12
1.6.	Fragestellung	13
2.	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Zellarten	15
2.1.2	Zellstimulation	16
2.1.3	Oligonukleotide	17
2.1.4	Antikörper	17
2.1.5	Computersoftware	18
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.1.1	hCyr61-Gewinnung aus hFOB-Zellen	18
2.2.1.2	Zellisolation für die FACS-Analyse	18
2.2.1.3	Zellisolation für die RNA-Gewinnung	19
2.2.2	FACS-Analyse	20
2.2.3	SDS-Gelelektrophorese	20

2.2.4	Silberfärbung	22
2.2.5	Reverse Transkription von RNA	23
2.2.6	Qualitative PCR	23
2.2.7	Klonierung von Standards für die quantitative PCR	23
2.2.7.1	Transformation in DH5 α -kompetente Zellen	24
2.2.7.2	Sequenzierung	24
2.2.7.3	DNA-Verdau und –elution	25
2.2.7.4	Standard-Bestimmung	25
2.2.8	Quantitative PCR mittels Real-time PCR	26
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Ergebnisse der FACS-Analyse von reifen DC aus PBMCs unter dem Einfluss von hFOB-Überstand	28
3.1.1.	Nachweis von hCyr61 im Überstand von hFOB-Zellen	28
3.1.2.	Kandidatenanalyse durch Stimulation von PBMC mit RANKL, HFOB-Überstand und hCyr61	29
3.2.	Qualitative Bestimmung der Expression charakteristischer CD-Oberflächenmarker in undifferenzierten PBMC und differenzierten DC mittels konventioneller PCR	31
3.3	Semiquantitativer Nachweis der Expression charakteristischer CD-Oberflächenmoleküle in THP-1 Zellen mittels konventioneller PCR	34
3.4.	Quantitative Bestimmungen der CD-Expression in THP-1 Zellen mittels der Real-time-PCR	38
3.4.1.	Klonierung des Standards für die quantitative PCR	38
3.4.2.	Festlegung der optimalen PCR- Bedingungen bei Verwendung von SYBR- Green	39
3.4.3.	Quantitative Bestimmung der DANN- Kopien anhand des Standards	41
3.4.3.1.	Auswertung der Real-time-Versuche mit Il-4, GM-CSF und hCyr61	41
3.4.3.2.	Auswertung der Real-time-Versuche mit hCyr61 und	44

	hCyr61- Domains	
3.5	Quantitative Bestimmung der CD-Expression in THP1-Zellen mittels FACS- Analyse	49
3.6.	Vergleich der Ergebnisse aus Real-time-PCR und FACS-Analyse	55
3.7.	Vergleich der semiquantitativen konventionellen PCR mit der FACS- Analyse	55
3.8.	Vergleich der CD14-Expression in differenzierten und undifferenzierten THP1-Zellen bei Stimulation mit Cyr als ganzes Molekül	56
3.8.1.	CD14- Expression, konventionelle PCR	56
3.8.2.	CD14- Expression, real- time- PCR	56
3.8.3.	CD14- Expression, FACS- Analyse	56
4.	Diskussion	57
4.1.	Interaktion von mesenchymalen Zellen mit Immunzellen	57
4.2.	Bekannte Systeme in der Interaktion zwischen Mesenchym und Immunsystem: Interleukine, Interferone und TNF- α , RANKL/RANK/OPG	57
4.3.	hCyr61 als neues Verbindungsmolekül zwischen Knochen, Endothel und Immunsystem	58
4.4.	Methodische Probleme	58
4.4.1.	Diskussion der biologischen Aktivität von rekombinantem hCyr61	58
4.4.2.	Einfluss von Fc-Fragmenten auf DCs	59
4.5.	Diskussion der PBMC-Gewinnung	60
4.6.	Diskussion der Auswertung der konventionelle PCR aus PBMC	60
4.7.	Diskussion der Auswertung der THP-Zellen mit der FACS- Analyse	61
4.8.	Diskussion der Auswertung von THP-Zellen mit der Real-time-PCR	61

4.9.	Effekt von hCyr61 auf PBMC und THP-Zellen	62
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literaturverzeichnis	64
7.	Abkürzungen	75
8.	Anhang	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Interaktion von Mesenchymalen Stammzellen und Zellen des Immunsystems

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind das Reservoir im Knochenmark für die ständige Erneuerung verschiedenster Gewebe mesenchymaler Herkunft. In immunregulativen Prozessen wurden MSC von Maccario als „Suppressoren des Immunsystems“ bezeichnet (Maccario et al., 2005). Lösliche Faktoren wurden als verantwortlich für die immunsuppressive Wirkung propagiert. Durch eine veränderte Expression aktivierender Faktoren, durch Beeinflussung antigenspezifischer Proliferation von naiven und Memory-T-Zellen und durch veränderte IFN- γ und IL-4 Produktion kommt es zur Inhibition der T-Zellproliferation. Im engen Zusammenspiel vom MSC und T-Lymphozyten konnte beobachtet werden, dass von aktivierten T-Zellen und Natural Killer-Zellen (NK-Zellen) produziertes Interferon γ (INF- γ) in MSC zu einer vermehrten Produktion von Indoleamin 2,3-dioxygenase führt. Diese wiederum inhibiert die weitere Aktivierung von T- und NK-Zellen (Krampera et al., 2006).

Einige bekannte Effekte von MSC auf Dendritische Zellen sind die Inhibierung von Aktivierung und Maturation in vitro und eine verminderte Sekretion von IL-12. Untersuchungen von Kokulturen zwischen MSC und reifen DC ergaben eine verminderte TNF- α -Sekretion (Tumornekrosefaktor α) und eine erhöhte Sekretion von IL-10, womit eine erhöhte Immuntoleranz erreicht wird (Aggarwal et al. 2005, Zhang et al. 2004). Durch Zell-Zellkontakt zwischen MSC und Monozyten oder DCs konnte in Kultur mit T-Zellpopulationen (CD4+ oder CD8+) eine vermehrte IFN- γ -Sekretion und damit eine Inhibition der T-Zellaktivierung gemessen werden (Beyth et al., 2004).

1.2. Interaktion zwischen Knochen und Zellen des Immunsystems

Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, DC und T-Zellen stehen mit Osteoblasten als Vorläuferzellen der osteogenen Differenzierung aus

mesenchymalen Stammzellen in enger Interaktion. Parakrin wirkende Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von Stromazellen des Knochenmarks und osteogenen Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen sezerniert werden, können Funktion und Entwicklung der Nachbarzellen beeinflussen. Diese parakrinen Interaktionen tragen wesentlich zur osteogenen Differenzierung bei. Einzelne Substanzen dieser interzellulären Kommunikation werden in Zellen des Immunsystems exprimiert: Dendritische Zellen, B- und T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche z. B. den als receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) bezeichneten Rezeptor, der sich ebenfalls auf Osteoklasten findet. Der Ligand an diesem Rezeptor, RANKL, wird vor allem von Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks sezerniert (s. 1.3.). Dadurch ergibt sich eine direkte Verbindung zwischen Zellen des Knochenstoffwechsels und mesenchymalen Stammzellen einerseits und Zellen des Immunsystems andererseits, wobei allerdings die Bedeutung der RANK-Expression auf DC für den Knochenstoffwechsel noch ungeklärt ist. Eine besonders enge Verknüpfung von immunkompetenten Zellen und Zellen des Knochenstoffwechsels ergibt sich aus der Tatsache, dass sich Makrophagen, Dendritische Zellen und Osteoklasten aus einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle entwickeln. Diese auch als monozytär bezeichneten Zellen gelangen mit dem Blutstrom zu verschiedenen Geweben, wo sie sich je nach den Bedingungen des dort herrschenden Mikroenvironment zu unterschiedlichen Zellen ausdifferenzieren, die nachfolgend charakterisiert werden.

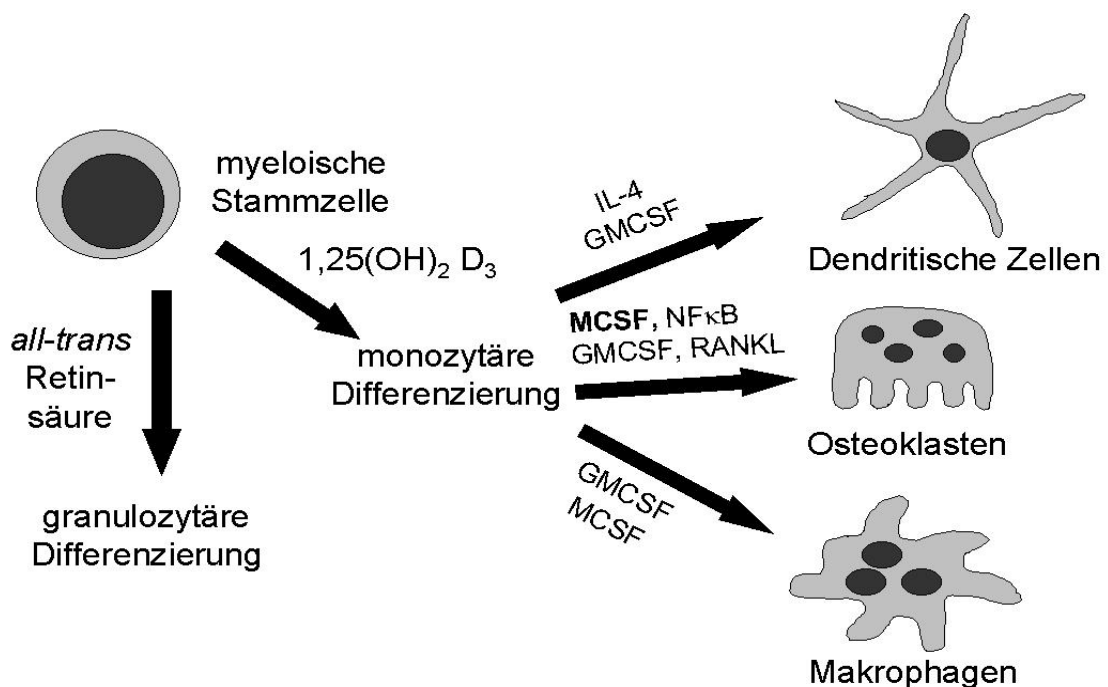


Abb. 1: Myeloische Zelldifferenzierung. Aus myeloischen Vorläuferzellen wird unter dem Einfluss von $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 oder Phorbolestern die monozytäre, unter dem Einfluss von all-trans Retinsäure die granulozytäre Zelldifferenzierung eingeleitet. Aus Monozyten entstehen in Anwesenheit verschiedener Wachstumsfaktoren und koloniestimulierender Faktoren die terminalen Differenzierungsstufen wie Dendritische Zellen, Osteoklasten und Gewebsmakrophagen.

1.2.1. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind potente Antigen-präsentierende Zellen der unspezifischen Immunabwehr, die durch die Expression von MHC-Molekülen der Klassen I und II sowie kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 in der Lage sind, primäre zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren. Außerhalb des lymphatischen Gewebes befinden sich die DC in einem unreifen Zustand, in dem sie die Fähigkeit besitzen, unterschiedliche Antigene (Mikroorganismen, Antigen-Antikörperkomplexe, apoptotische und nekrotische Zellen) aufzunehmen. Diese aufgenommenen antigenen Strukturen werden in der Folge prozessiert und über MHC-Moleküle präsentiert. Gleichzeitig werden die DC aktiviert, was zu einer

beginnenden Reifung und zur Sekretion von Chemokinen führt. Die freigesetzten Chemokine rekrutieren weitere immunkompetente Zellen an den Ort der beginnenden Immunreaktion. Die spezifische Immunabwehr wird aktiviert, indem die reifenden DC in die regionären Lymphknoten wandern, wo sie die antigenen Strukturen den naiven T-Zellen präsentieren. Die Induktion einer spezifischen Immunantwort durch Dendritische Zellen beruht sowohl auf der starken Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86, die mit dem CD28 Liganden auf T-Zellen interagieren, sowie auf deren Sekretion von potenten Zytokinen wie z.B. IL-12 (Wong et al., 1999).

DC können aus verschiedenen Vorläuferzellen differenzieren. Zum einen können aus peripheren Blutmonozyten in vitro unter dem Einfluss des Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierenden Faktors (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) nach 7 bis 11 Tagen DC vom Typ 1 differenzieren (Randolph et al., 1998; Thurner et al., 1999). Zum anderen reifen in vivo nach viraler Stimulation die plasmazytoiden Zellen zu DC vom Typ 2 aus. Werden plasmazytoide Zellen mit CD40L und IL-3 in vitro kultiviert, differenzieren sie ebenfalls zu DC vom Typ 2 (Flores-Romo, 2001). DC Typ 1 induzieren in T-Zellen durch die Kombination von CD80 und IL-12 die Th1-Immunantwort, während DC Typ 2 durch CD 86 und IL-4 die Th2-Immunantwort propagieren.

1.2.2. Osteoklasten

Osteoklasten sind mobile, vielkernige Riesenzellen und stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Ihre unmittelbaren Vorläuferzellen sammeln sich als Monozyten an Orten der Knochenresorption an und verschmelzen bei Bedarf zu Osteoklasten. Die Funktion der Osteoklasten ist der Abbau von Interzellulärschubstanz des Knochengewebes (Knochenmatrix) durch Säure und proteolytische Enzyme. Sie unterliegen vielfältigen Regulationsmechanismen (z.B. auf hormoneller Ebene Hemmung durch Calcitonin, Stimulation durch Parathormon), die Osteoklastendifferenzierung wird dagegen im Wesentlichen von koloniestimulierenden Faktoren wie MCSF und dem RANKL / RANK / OPG-System beeinflusst.

1.3. Das RANK / RANKL / OPG-System

Das in diesem Kontext bislang am besten charakterisierte Signaltransduktionssystem ist RANK/ RANKL/ OPG.

RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B (NF- κ B) ligand), in der Literatur auch als TRANCE (TNF-related activation- induced cytokine) bezeichnet, ist ein TNF-ähnliches Protein mit einem Molekulargewicht von 40-45 kDa, das vor allem auf der Membranoberfläche von Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks (bone marrow derived stromal cells, BMSC) exprimiert wird und dessen Genlocus auf Chromosom 13q14 liegt (Wong et al., 1999). Bisher wurden drei Isoformen isoliert, die in Knochen, Knochenmark, lymphatischem Gewebe (Milz, Thymus), Lunge, Hoden, Plazenta, aber auch in Knochenmarks-Stammzellen (BMSC) und in vitro in präosteoblastären Zellen, exprimiert werden (Horowitz et al., 2001). RANKL fördert über die Auslösung einer Signaltransduktionskaskade die weitere Differenzierung unreifer Osteoklasten, Aktivierung reifer Osteoklasten und die Aktivierung und Steigerung der Überlebenszeit von DCs (Kong et al., 2000).

RANK (receptor activator of NF κ B) ist ein membranständiger Rezeptor für RANKL und ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, dessen Genlocus auf Chromosom 18q22.1 liegt. Er wird auf der Zelloberfläche von reifen und unreifen Osteoklasten exprimiert, sowie in Zellen des Immunsystems, Herz, Lunge, Hirn, Skelettmuskel, Niere, Leber und Haut.

Durch die Ligand-Rezeptor-Interaktion wird der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, der nach Bindung an die DNS die Ausdifferenzierung der Osteoklasten bewirkt. Ebenfalls nimmt er die Schlüsselposition für die Aktivierung der DC-Reifung innerhalb einer Entzündungsreaktion ein (Gosh et al., 1999).

Osteoprotegerin (OPG) ist ein weiterer, löslicher Rezeptor für RANKL. Besonders während der Knochenneubildung wird OPG, ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 110 kDa, exprimiert. Der Genlocus liegt auf Chromosom 8q23–24. Auch in Haut, Lunge, Leber und Herz wird OPG

sezerniert. OPG dient als ein TNF-Rezeptor ähnliches Protein als Decoy-Rezeptor für RANKL. Liegt OPG im Überschuss vor, bindet es freies RANKL und verhindert damit die Aktivierung der Osteoklasten.

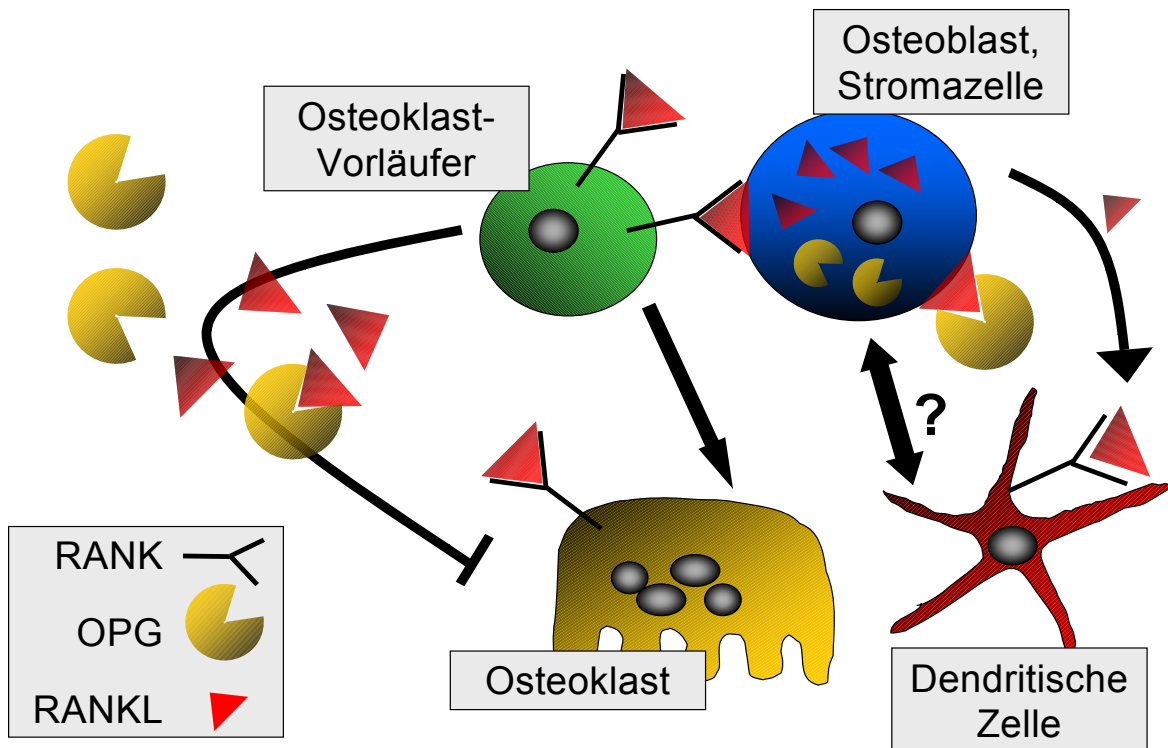


Abb. 2: Das RANKL / RANK / OPG Modell am Beispiel der Osteoklastendifferenzierung. Osteoklasten entwickeln sich unter dem Einfluss von RANKL aus Vorläuferzellen. Freies, an Stromazellen oder Osteoblasten gebundenes RANKL bindet an den RANK Rezeptor und aktiviert durch Zell-Zell-Kontakt den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$. Ein weiterer Rezeptor für RANKL ist Osteoprotegerin (OPG), welcher RANKL bindet und somit eine Osteoklastendifferenzierung verhindert. Dendritische Zellen exprimieren ebenfalls RANK, die Interaktion mit Zellen des Knochenstoffwechsels ist noch ungeklärt.

1.3.1. Bedeutung im Knochenstoffwechsel

Für den Knochenstoffwechsel wird die wichtige Funktion des RANKL / RANK / OPG Systems dadurch verdeutlicht, dass z. B. RANKL-Knockout Mäuse bereits in der vierten Lebenswoche aufgrund fehlender Osteoklastenausreifung eine schwere Osteopetrose entwickeln (Kong et al., 1999).

Bei RANK-Knockout Mäusen ist die Ausbildung der Osteopetrose noch schwerwiegender, da nicht nur die Ausreifung der Osteoklasten gestört ist, sondern bereits die Ausreifung von osteoklastären Vorläuferzellen, d. h. die Osteoklasten fehlen (Li et al., 2000; Dougall et al., 1999).

Diese Tatsache gilt auch für eine Überexpression von OPG, wodurch in transgenen Tieren eine Osteopetrose induziert wird.

Im Gegensatz dazu konnte an OPG-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass zum einen die Zahl der Osteoklasten deutlich zunahm und damit auch die trabekuläre und kortikale Knochensubstanz sich verringerte. Zum anderen wurde auch die Bedeutung der OPG- Produktion in Endothelzellen klar: bereits zwei Wochen alte OPG- Knockout Mäuse zeigten eine primäre Kalzifikation der großen Gefäße ohne vorherige Atherombildung (Horowitz et al., 2001).

Menschliche Endothelzellen exprimieren sowohl RANKL als auch OPG, deren Konzentrationen durch inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ (Tumornekrosefaktor α) und $\text{IL-1}\alpha$ gesteigert werden können. Diese Zytokin-aktivierten Gefäßendothelien fördern die Formierung von Osteoklasten und damit die Knochenresorption. Folglich kann die Produktion von RANKL und OPG im Rahmen von Entzündungsreaktionen zum entzündlich bedingten Verlust von Knochensubstanz beitragen (Collin-Osdoby et al., 2001). Neue Studien zeigen, dass RANKL durch FGF-2 (fibroblast growth factor 2), der in Synoviafibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis reichlich produziert wird, hochreguliert wird und damit zur Knochendestruktion führt (Nakano et al., 2004).

1.3.2. Bedeutung für das Immunsystem

Wie anfangs bereits erwähnt, findet sich RANK sowohl auf Zellen der Monozyten/Makrophagen-Reihe und auf reifen DC, als auch auf T- und B-Zellen. RANK wird als Marker reifer DC gesehen, da er in unreifen DC und in residenten T- und B-Zellen nicht, in frisch aus Lymphknoten isolierten DC nur schwach nachweisbar ist.

Ein wichtiger Effekt von RANK auf reife DC ist die verlängerte Überlebenszeit, wodurch sich auch die Überlebenszeit der T-Zellen verlängert, und die Induktion der Zytokinsekretion (Interleukin 1, 6, 12 und 15 (Wong et al., 1999)). Durch Interleukin 12 und 15 wird die T-Zell-vermittelte Immunantwort moduliert. Vor allem für die Entwicklung von Lymphknoten und Osteoklasten ist RANK ein wichtiger Faktor, da RANK-defiziente Mäuse, wie unter 1.3.1. beschrieben, eine Osteopetrose entwickeln und außer den mukosa-assoziierten Peyerschen Plaques keine peripheren Lymphknoten sowie einen verkleinerten Thymus besitzen. Die Anzahl der B-Zellen in der Milz ist bei diesen Mäusen deutlich vermindert, die Differenzierung von DC und Makrophagen wird hingegen nicht beeinflusst (Dougall et al., 1999).

Darüber hinaus ist RANKL für die Aktivierung von T-Zellen und DC essentiell, da es in vitro Aggregation, Cluster Formation und damit die Fähigkeit, Antigene zu prozessieren und zu präsentieren, steigert (Anderson et al., 1997). RANKL ist ein unverzichtbarer Faktor für Überleben und Funktionieren der DC, für die Entwicklung maturer DC ist er aber nicht essentiell.

RANKL wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert, jedoch findet sich die mRNA auch in Populationen ruhender Th1- und Th2-Memory-Zellen. Reife DC werden durch RANKL aktiviert (Wong et al., 1999). RANKL liegt sowohl in gebundener, als auch in löslicher Form vor (Kong et al., 1999). In vitro konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen und der Überstand dieses Mediums die Ausdifferenzierung von Osteoklasten bewirken. Ebenso wie Endothelzellen können deshalb aktivierte T-Zellen im Rahmen eines Entzündungsprozesses die Zahl der Osteoklasten durch eine gesteigerte RANKL-Produktion erhöhen und zu einem erhöhten Knochenabbau beitragen.

In den folliculären Zentren der Lymphknoten kommt es zu enger Interaktion von antigen-präsentierenden DCs und naiven B-Zellen, wodurch B-Zellen zu spezifischen Plasmazellen bzw. Gedächtniszellen geprägt werden. Ein potenter Stimulus ist CD40, der in B-Zellen und auch in DCs die Expression von Osteoprotegerin (OPG) auslöst. In OPG-Knockout-Mäusen ist insbesondere die Entwicklung von B-Zellen gestört. Dagegen hat die OPG-Überexpression im Mausmodell keinen Einfluss auf das Immunsystem (Yun et al., 1998).

Tabelle 1 zeigt zusammenfassend die Effekte an transgenen bzw. Knockout-Tieren auf deren Knochenphänotyp bzw. deren Immunsystem.

Mausmodell	Knochenphänotyp	Immunsystem	Literatur
NFκB Knockout (beide Protein- Untereinheiten)	Osteopetrose, ausbleibender Zahndurchbruch	Gestörte B-Zell- Differenzierung, reife B- Zellen fehlen, weniger T-Zellen, Funktion reifer Makrophagen eingeschränkt, keine reifen DCs	Franzoso et al., 1997, Burkly et al., 1995
RANK Knockout	Osteopetrose, Osteoklasten fehlen	weniger reife B-Zellen als wt, keine peripheren Lymphknoten, normale DCs und Makrophagen	Dougall et al., 1999 ; Li et al., 2000
RANKL Knockout	Osteopetrose, Osteoklasten fehlen	keine Lymphknoten, gestörte frühe T- und B-Zelldifferenzierung, weniger reife B-Zellen als wt, normale DCs und Makrophagen	Kong et al., 1999
OPG Knockout	Osteoporose	DCs mit größerer T-Zell stimulatorischen Potenz, gestörte B-Zell Entwicklung, pro-B- Zellen erhöhte Proliferation nach IL-7 Gabe	Yun et al., 2001
OPG Transgen	Osteopetrose, Anzahl der Osteoklasten verringert	keinen Einfluß?	Simonet et al., 1997

Tab. 1: Tiermodelle des RANKL / RANK / OPG Systems Knockouts. Aufgeführt

sind die jeweiligen Knockout- bzw. Transgen- Modelle mit dem beobachteten Knochenphänotyp und die Auswirkung auf das Immunsystem.

1.4. Das cysteinreiche Protein 61 (Cyr 61)

Humanes cysteinreiches Protein 61 (hCyr61) wurde Mitte der 90er Jahre entdeckt und gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die als CCN-Familie bezeichnet wird (O'Brien et al., 1992). Dieses Akronym setzt sich aus den als erstes identifizierten Proteinen Cyr (Cystein-reiches Protein, CCN1), CTGF (connectiv tissue growth factor, CCN2) und NOV (nephroblastoma overexpressed, CCN3) zusammen. Weitere bisher identifizierte Mitglieder der wachsenden Familie sind: Wisp-1, -2, -3 (wnt-induced secreted proteins), sowie CCN4, 5 und 6.

Ursprünglich wurde Cyr61 als Produkt eines immediate-early Genes identifiziert, dessen Transkription in Fibroblasten von Wachstumsfaktoren in fetalem Kälberserum aktiviert wird (O'Brien et al., 1990).

Gemeinsame Merkmale dieser Proteinfamilie sind eine Größe von 30-40kDa und ein extrem hoher Cysteingehalt von ca. 10% der Masse (Brigstock, 2003).

Diese Proteine sind für vielfältige zelluläre Vorgänge verantwortlich. Neben Mitosestimulation, Adhäsion und Apoptose sind sie auch an der Produktion der Extrazellulärmatrix beteiligt. Auf Gefäßebene bewirken sie die Aufzweigung und Aussprossung neuer Kapillaren. Plazentation, Implantation, Embryogenese und enchondrale Ossifikation sind ebenfalls CCN-abhängig.

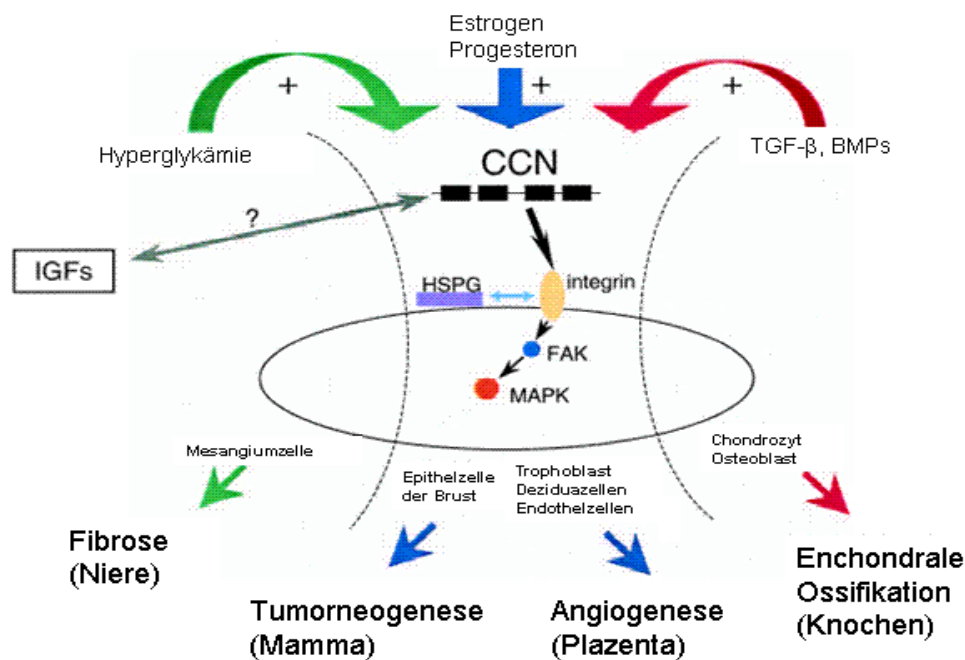


Abb.3: Regulation und Funktion von CCN-Proteinen. Abkürzungen: IGF: insulin-like growth factor; HSPG: heparan sulfate proteoglycan; FAK: focal adhesion kinase; MAPK: mitogen- activated kinase; TGF β : transforming growth factor β . Aus: D.R. Brigstock, *Journal of Endocrinology*, 178 (2003).

Auf Genebene zeigen die Proteine dieser Familie vier konservierte Regionen:

- Modul 1: Insulin-like-Growth-Factor Bindungsdomäne
- Modul 2: von-Willebrand Typ C Domäne
- Modul 3: Thrombospondin-1 Domäne
- Modul 4: C-terminale Domäne mit putativem Cystein knot.

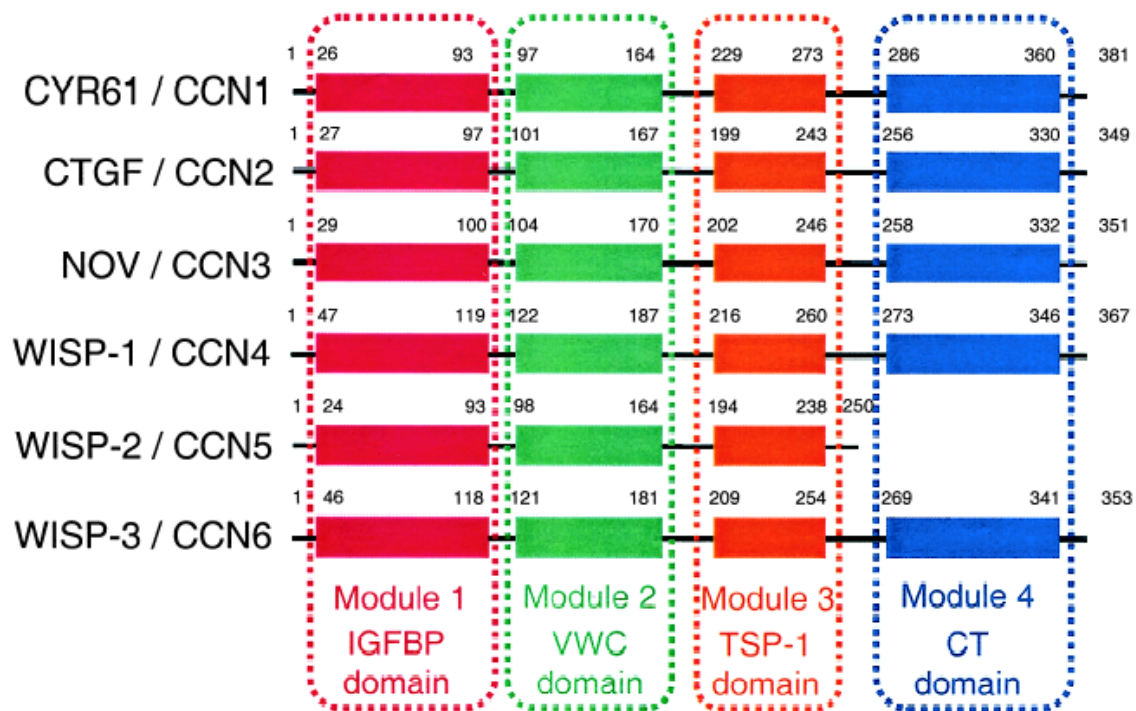


Abb.4: Modulare Struktur der CCN-Familie. Aus: D.R. Brigstock, *Journal of Endocrinology*, 178 (2003)

Die unterschiedlichen Funktionen dieser Proteingruppe kommen durch die strukturelle Heterogenität des modularen Genomaufbaus zustande. So fehlt zum Beispiel in WISP-2/ CCN5 das Modul 4.

Auf molekularer Ebene haben diese Proteine möglicherweise eine Brückenfunktion zwischen Extrazellulärer-Matrix-assoziierten Proteinen und Zelloberflächenmolekülen. Von CCN 1, 2 und 3 ist bekannt, dass sie an Integrine der Zelloberfläche binden und somit intrazelluläre Signalkaskaden auslösen.

Über Cyr61 ist bekannt, dass es östrogeninduzierbar ist und in Östrogen-abhängigen Mammakarzinomen und Tumoren des Uterus überexprimiert wird. In vitro bewirkt Cyr61 die Kollagen- und Knorpelproduktion in Kulturen von Gliedmaßenknospen. Ebenfalls in vitro stimuliert es Chondrogenese, Mitogenese und Adhäsion in mesenchymalen Knochenzellen. In fetalen humanen Osteoblasten wird die Cyr61-Produktion Vitamin D₃-abhängig reguliert (Latinkic et al., 2001; D.R. Brigstock, 2003; Lechner et al., 2000; Schütze et al., 1998). In neuesten Veröffentlichungen konnte eine erhöhte Expression von Cyr61 im Kallus im Verlauf der Frakturheilung nachgewiesen werden (Lienau et al., 2006).

1.5. Klinischer Aspekt der Interaktion zwischen Stroma und DC

1.5.1. Langerhans-Zell-Histiozytose

Über die Pathogenese dieser granulomatösen Erkrankung ist bisher wenig bekannt. Bei den Langerhans-Zellen handelt es sich um eine Subpopulation der DC, die in eosinophilen Granulomen massenhaft in unreifem Zustand vorliegen. Die Krankheitsausdehnung reicht von monolokalem Knochen- oder Gewebefall bis hin zu schwerem Multiorganbefund. In vitro können diese unreifen Zellen durch Triggerung von CD40 in funktionelle DC maturieren. Vermutlich liegt diesem Krankheitsbild eine pathologische Interaktion zwischen mesenchymalen Zellen und DC zugrunde. Rivollier et al. haben entdeckt, dass sich diese unreifen DC in vitro in Osteoklasten transdifferenzieren lassen, wodurch sich der ausgeprägte Knochenbefall erklären lässt (Rivollier et al., 2004).

1.5.2. Rheumatoide Arthritis

Diese chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung bedeutet für die betroffenen Patienten neben der schmerzhaften Bewegungseinschränkung durch die akute Entzündungskomponente vor allem eine Invalidisierung durch die Zerstörung von Knorpel- und Knochensubstanz bedingt durch die chronische Entzündungsaktivität. Osteoklasten, T-Lymphozyten, TNF- α und das RANKL / RANK / OPG-System sind wichtige Beteiligte im Unterhalt des entzündlichen Prozesses.

Die zellfreie Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde auf ihre Cytokin-Zusammensetzung hin analysiert und es fanden sich abnorme Mengen an RANKL, TNF- α , IL-1 α , TGF- β , GM-CSF, IL-18 und IL-6 (Rivollier et al., 2004). Im Zusammenspiel mit RANKL erwies sich TNF- α als extrem potenter Faktor zur Transdifferenzierung von unreifen DC zu Osteoklasten.

Somit erscheint es wahrscheinlich, dass die chronisch entzündliche Umgebung zum einen die Ausreifung und Migration der DC behindert, gleichzeitig aber die Transdifferenzierung zu Osteoklasten propagiert, was zum ausgeprägten Verlust an Knochensubstanz im Skelett dieser Patienten führt (Rivollier et al., 2004).

1.6. Fragestellung

Wie eingangs erwähnt, können Substanzen stromaler Stammzellen die gemeinsame hämatopoietische Vorläuferzelle von Osteoklasten und Monozyten/DC zu unterschiedlicher Ausdifferenzierung triggern.

Unsere Arbeitshypothese lautet, dass andere Sekretionsfaktoren stromaler Stammzellen und osteogen differenzierter Zellen außer dem bereits bekannten RANK/ RANKL/ OPG-System oder den Sekretionsfaktoren TNF- α , IFN- γ und verschiedenen Interleukinen ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung der monozytären Zellen und damit eine immunmodulatorische Wirkung haben. Die Experimente wurden für Screening-Versuche mit Zellkulturüberständen aus humanen fetalen Osteoblasten (hFOB) begonnen und anschließend erfolgte eine Kandidaten-Analyse, da rekombinantes Cyr61 als ein molekularer Bestandteil des Zellkulturüberstands verfügbar wurde. Als readout-Zellen boten sich monozytäre Zellen an, da diese Zellen zum einen ex vivo gewonnen werden konnten, zum anderen standen uns THP-1 Zellen, also klonale monozytäre Vorläuferzellen zur Verfügung. Sowohl die jeweilige Wildtyp-Population als auch aus diesen Zellen ausdifferenzierte dendritische Zellen wurden unter dem Einfluss von Sekretionsprodukten mesenchymaler Zellen sowie unter dem Einfluss von Cyr61 untersucht. Ein Vergleich dieser Zellpopulationen hinsichtlich unterschiedlicher Stimulationsbereitschaft oder Differenzierungsmöglichkeiten stellte einen weiteren Aspekt der Hypothese dar. Zum Zeitpunkt des Designs der hier darzustellenden Experimente war noch nicht bekannt, dass Cyr61 die Differenzierung von monozytären Zellen in Endotheliale Vorläuferzellen sehr effektiv stimulieren kann, was zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Arbeit jedoch eindeutig nachgewiesen scheint (Schenk et al. 2007, in Veröffentlichung befindlich).

2. Material und Methoden

2.1. Material

Plastikwaren wurden von Sarstedt, Falcon, Eppendorf, TPP und Biozym, Chemikalien in p. A.-Qualität von Amersham Biosciences, Roth, Gibco, Braun und Biozym bezogen.

Verwendete Lösungen wurden je nach benötigter Reinheit mit deionisiertem Wasser, doppelt destilliertem deionisiertem Wasser (Aqua bidest) oder RNase-freiem Rotisolv® HPLC- Wasser der Firma Roth angesetzt.

Als Medien wurden für THP-1-Zellen und Monozyten verwendet: RPMI 1640, mit 1% oder 10% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt (beides Firma Gibco), die hFOB- Zellen wurden in serumfreiem DMEM/ HAM`S F-12 Medium der Firma PAA Laboratories (Linz, Österreich) kultiviert.

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem Nucleo Spin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren).

Der TA-Cloning- Kit wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

Für die PCR wurde die Taq-Polymerase der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) und Nukleotide der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet.

Für die Sequenzierung wurde der Cycle Sequencing Kit „BigDye® Terminator v 1.1“ und das Auto- Sequenzierungsset der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet.

2.1.1. Zellarten

- Periphere Blutmonozyten

Monozyten wurden aus venösem Blut erwachsener Spender gewonnen (s. 2.2 Methoden)

- hFOB

hFOB sind humane fetale Osteoblasten, die von Tom Spelsberg (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic, Rochester, USA)

freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden in DMEM/HAM'S F-12 Medium mit 10% FCS bei 34°C und 5% CO₂ kultiviert.

Für die durchgeführten Versuche wurde nur der Überstand der mit TNF α stimulierten hFOB verwendet.

- THP-1

THP-1 sind Suspensionszellen (s. Abb. 1) und wurden aus einem an akuter monozytischer Leukämie erkrankten Kind etabliert. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection, Rockville, USA (ATCC Nummer: TIB-202) bezogen.

ATCC Number: **TIB-202**
Designation: **THP-1**

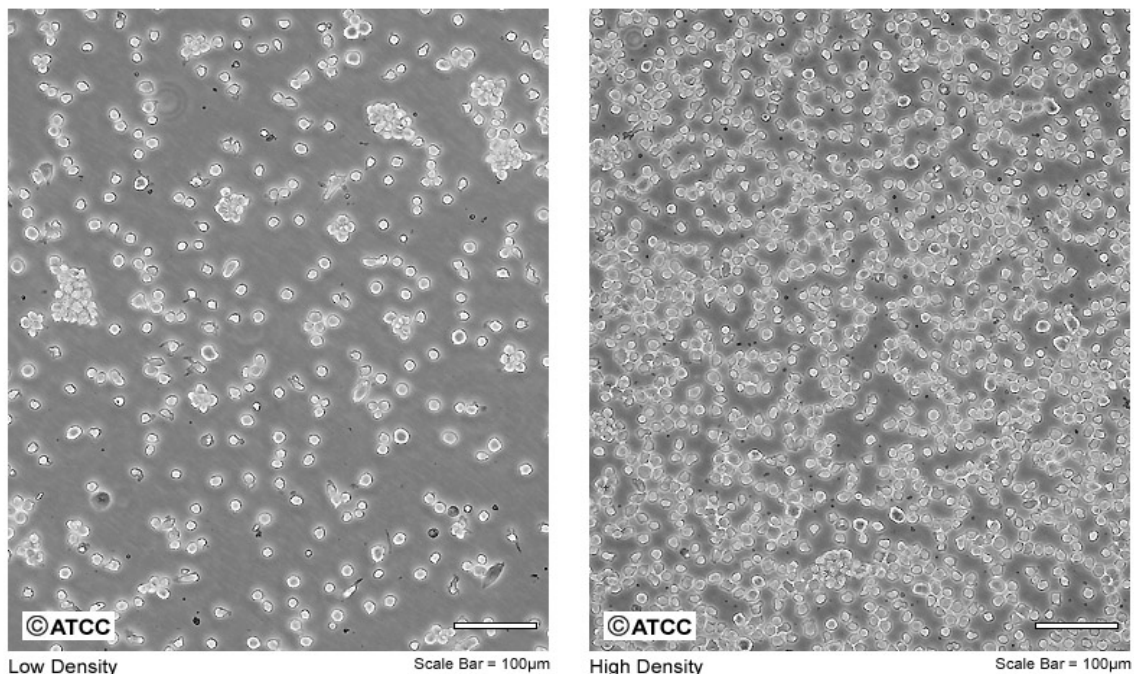


Abb.1 THP-1 Zellen (Quelle: www.lgcpromochem.com/atcc)

2.1.2. Zellstimulation

Für die Stimulation und Ausdifferenzierung wurde Interleukin 4 (IL-4), Granulozyten-Makrophagen-colony-stimulating-factor (GM-CSF) (beides Stratmann Biotech AG, Hamburg) verwendet, sowie humanes Cystein-reiches Protein (hCyr61), das zum einen freundlicherweise von PD Dr. N. Schütze

(Molekulare Orthopädie, Orthopädische Klinik der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurde, zum anderen aus Überstand von hFOB- Zellen gewonnen wurde.

2.1.3. Oligonukleotide

Die Primer für die PCR-Amplifikation wurden von der Firma Roth bezogen und nach Anweisung des Herstellers in HPLC-Wasser gelöst.

Bezeichnung:	Sequenz 5'—————3'	Produktgröße
CD14 sense	CACTTCCAGAGCCTGTCCGGAGC	195bp
CD14 antisense	GAAGGCTCCGGACCAGTCGGGCTG	
CD80 sense	ACTCGCATCTACTGGCAAAGGA	550bp
CD80 antisense	ATGGGAGCAGGTTATCAGGAAAA	
CD83 sense	GCCATGTCGCGCGGCCTCCAGCTTC	449bp
CD83 antisense	GGACAATCTGGGCTCTGTATTTTC	
CD83 antisense "neu"	GGACAATCTCCGCTCTGTATTTTC	
CD83 sense "neu"	TCGCGCGGCCTCCAGCTTCT	
CD 83 sense "kurz"	ATGTCGCGCGGCCTCCAG	
CD83 antisense "kurz"	GGACAATCTCCGCTCTGTATT	
CD86 sense	TGGTGCTGCTCCTCTGAAGATTC	300bp
CD86 antisense	ATCATTCTGTGGGCTTTTTGTG	

Tab. 1: Verwendete Primer für die PCR

2.1.4. Antikörper

FITC und PE markierte Antikörper wurden von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg) und Beckman Coulter GmbH (Krefeld) bezogen.

Als Isotypen wurden IgG1 (FITC), IgG2a (PE) und IgG2a Mouse (FITC), IgM κ Mouse (FITC), IgG1 κ (PE) und CD14 (PE) verwendet.

2.1.5. Computersoftware

Die Arbeit wurde auf einem Computer mit dem Betriebssystem Windows NT erstellt. Für die Erstellung und Berechnung von Graphiken wurde Excel 97 verwendet, als Schreibprogramm diente Word 97. Bilder wurden mit PowerPoint bearbeitet.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. hCyr61-Gewinnung aus hFOB-Zellen

HFOB-Zellen wurden für 48 Stunden mit TNF α (Konzentration: 2 nM) in DMEM/HAM'S F-12 Medium inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und direkt auf die THP-1-Zellen gegeben.

Der hCyr61-Gehalt dieses Überstandes wurde mittels Westernblot verifiziert und als Silbergel abgebildet. Diese Arbeiten wurden von MTA Frau Meißner-Weigl durchgeführt.

2.2.1.2. Zellisolation für die FACS-Analyse

Für die Gewinnung von mononukleären Zellen wurde in Anlehnung an B. Turner et al. (1998) Vollblut von gesunden erwachsenen Probanden mit NaCl (0,9%, Braun), versetzt mit 1% fetalem Kälberserum (FCS; Gibco), im Verhältnis 1:1 gemischt und mittels Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) Dichtegradienten-Zentrifugation (bei 1200 rpm für 20 min) isoliert, gewaschen und gezählt. Anschließend wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium, versetzt

mit 10% fetalem Kälberserum, aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO₂ in 25cm³ Kulturflaschen inkubiert. Die nicht-adhärenente Fraktion wurde entfernt und durch frisches RPMI 1640 + 10% FCS-Medium ersetzt (Tag 0). Nach 24 h (Tag 1) und weiteren 48 h (Tag 3) wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt, um nur lose adhärierende Zellen nicht mit zu entfernen. Dem frischen Medium wurde GM-CSF (0,5 ng/ml) und IL-4 (500 U/ml) zugegeben. Am Tag 5 wurden die Zellen geerntet, gezählt, und in einer Dichte von 5x10⁵ Zellen in RPMI-10% FCS-Medium auf Sixwell-Platten ausgesät. Je zwei wells wurden mit TNF α (1 μ l/ml;), RANKL (0,5 μ l/ml), hCyr61 (1 μ g/ml) und Überstand von MSC und TNF α -stimulierten hFOB (je 1,5 ml) versetzt und über 24 h inkubiert. THP-1-Zellen wurden analog behandelt.

2.2.1.3. Zellisolation für die RNA-Gewinnung

Die mononukleären Zellen wurden, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, mittels Ficoll-Paque-Gradienten isoliert (Tag 0) und in 25cm³ -Gewebekulturflaschen über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre inkubiert. Am Tag 1 wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit hCyr61 (1 μ g/ml) stimuliert oder mit GM-CSF (0,5 ng/ml) und IL-4 (500 U/ml) die dendritische Zelldifferenzierung eingeleitet. Die nur mit hCyr61 stimulierten Zellen wurden am Tag 3 geerntet und die RNA isoliert. Die restlichen Zellen wurden nach erneutem Mediumwechsel wiederum mit GM-CSF und IL-4 weiter differenziert. Am Tag 5 erfolgte nach Mediumwechsel die Stimulation mit hCyr61. Die RNA-Isolation der Zellen erfolgte am Tag 7. THP-1 Zellen wurden nach Aussaat in 25cm³ Gewebekulturflaschen mit GM-CSF und IL-4 stimuliert (Tag 0). An Tag 2 erfolgte nach Mediumwechsel die Stimulation mit GM-CSF und IL-4. Erneuter Mediumwechsel und Stimulation mit hCyr61 erfolgte am Tag 4. Am Tag 6 wurde die RNA isoliert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde nach 1:100 Verdünnung mit Aqua dest. im Eppendorf Biophotometer bestimmt.

2.2.2. FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse wurden die primären monozytären Zellen vorsichtig in PBS am Tag 7 abgekratzt, die THP-1 Zellen wurden abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min), die Pellets in 400µl PBS resuspendiert und mit je 10µl CD14-, CD80-, CD83- und CD86-Antikörpern für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1000 rpm, 5 min) und zweifach mit PBS gewaschen. Die FACS-Analyse wurde im Labor der Medizinischen Klinik II der Universität Würzburg von Frau R. Otthol und Frau A. Koss-Kinziger am FACScan mit dem Programm CellQuest durchgeführt.

2.2.3. SDS-Gelelektrophorese

Das gebräuchlichste Verfahren zur Auftrennung und Reinheitskontrolle von Proteinen ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Folgende Puffer wurden für die SDS-PAGE verwendet:

Trenngel-Puffer: 3 M Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Laufpuffer: 192 mM Glycin

25 mM Tris

0,1 % SDS

Aus folgenden Lösungen wurde in einem Gießstand einer Bioradkammer Trenn- und Sammelgel gegossen (Gelzusammensetzung für 2 Gele: siehe Tabelle 2 und 3):

Trenngel:	12%
Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 40%	3,0 ml
SDS 10%	100 µl
Ammoniumpersulfat 10%	100 µl
TEMED	4 µl
Trenngel-Puffer: 3 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml
H ₂ O	5,55 ml

Tab. 2: Zusammensetzung des Trenngels

Sammelgel:	15%
Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 40%	0,5 ml
SDS 10%	40 µl
Ammoniumpersulfat	40 µl
TEMED	4 µl
Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris-HCl pH	1,0 ml
H ₂ O	2,4 ml

Tab. 3 Zusammensetzung des Sammelgels.

Nach der Polymerisation wurde jeweils pro Spur die gleiche Proteinmenge im gleichen Volumen aufgetragen. Die Proteine wurden 5 min im SDS-PAGE-Probenpuffer 49 (RotiLoad) gekocht, auf Eis gelagert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteinmarker (prestained) von PeqLab (Erlangen) aufgetragen, bestehend aus den Komponenten Lysozym (20,4 kDa), β Laktoglobulin (24,5 kDa), Karboanhydrase (32,0kDa), Ovalbumin (46,8 kDa), Bovines Serum Albumin (81,4 kDa) und β -Galaktosidase(121,6kDa). Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 110 V bis an den unteren Rand des Trenngels (ca. 15 min), anschließend bei einer Spannung von 200 V, bis die Markerbande den unteren Gelrand erreicht hat.

2.2.4. Silberfärbung

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Dafür wurden folgende Reagenzien verwendet:

1. Fixierungsreagenz (40% Methanol; 10% Essigsäure)
2. Waschreagenz (30% Ethanol)
3. Sensibilisierungsreagenz (0,02% Na-thiosulfat)
4. Silberreagenz (0,2% AgNO_3 ; 0,02% Formaldehyd (37%))
5. Entwicklerreagenz (3% Na_2CO_3 ; 0,0005% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05% Formaldehyd (37%))
6. Stopreagenz (0,5% Glycin)
7. Konservierungsreagenz (20% Ethanol; 2% Glycerol)

Das Protokoll wurde wie folgt durchgeführt:

SCHRITT	LÖSUNG	ZEIT
Fixieren	1	60 min
Fixieren	1	30 min
Waschen 2x	2	20 min
Waschen H ₂ O 20	H ₂ O	20 min
Sensibilisierung	3	1 min
Waschen 3x	H ₂ O	20 sec
Silberfärbung	4	20 sec
Waschen 3x	H ₂ O	20 sec
Ag-Reduktion	5	3-5 min
Waschen	H ₂ O	20 sec
Abstoppen	6	5 min
Waschen 3x	H ₂ O	10 min

Tab. 4 Die Schritte einer Silberfärbung

2.2.5. Reverse Transkription von RNA

Für die reverse Transkription wurden 2 µg der isolierten RNA zusammen mit 1 µl Oligo dT (1:4) auf ein Reaktionsvolumen von 12 µl aufgefüllt und dieses für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 4µl MLLV- Puffer 5x, 0,5µl dNTP-Mix (20mM) und 2,5µl H₂O mit 1µl reverser Transkriptase (Promega GmbH) versetzt und für 60min bei 42 °C, 10 min bei 94°C und dann Kühlung auf 12°C in cDNA transkribiert.

2.2.6. Qualitative PCR

Die Intaktheit der cDNA wurde mit Aktin- oder EF1 α -PCR überprüft.

Für die Amplifikation wurden 1 µl der cDNA, jeweils 25 pmol der Primerpaare CD14, 80, 83 und 86 (Tab. 1), 20 mM Desoxynukleotide und 0,5 µl Taq Polymerase in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Bei der CD80- und CD86-PCR wurde zusätzlich 2,5 µmol MgCl₂ zugesetzt. Die Amplifizierung erfolgte bei CD14 und 83 in 35 Zyklen mit folgenden Einstellungen: 1 min bei 94°C, 1 min bei 56°C, und 1 min bei 72°C. Die CD80-PCR lief über 36 Zyklen für 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 55°C und 1 min bei 72°C, die CD86 PCR für 15 sec bei 94°C, 15 sec bei 60°C und 30 sec bei 72°C (modifiziert nach Thurner et al., 1999).

20 µl des Reaktionsvolumens wurden auf ein 1% Agarosegel in Anwesenheit von Ethidiumbromid aufgetragen und unter UV- Licht photographiert. Das verwendete Photoprogramm war Biocapt MW1 der Firma LTF.

2.2.7. Klonierung von Standards für die quantitative PCR

Die Klonierung wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers für den original TA Cloning Kit durchgeführt. Je ein frisches PCR-Produkt von CD14, CD80, CD83 und CD86 wurden eingesetzt.

2.2.8.1. Transformation in DH5 α -kompetente Zellen

Nach der Ligation wurden je 1 μ l Plasmid-DNA zu 50 μ l kompetenter E. coli DH5 α zugegeben, für 30 min auf Eis inkubiert und bei 42°C für 90 sec erhitzt. Nach 2 min. auf Eis wurde 250 μ l SOC-Medium je Probe zugegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde je ein Klon gepickt und über Nacht in 2 ml LB-Amp-Medium bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit dem NucleoBond PC 20 Kit der Firma Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.8.2. Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 5 μ l DNA-Produkt (ca. 500ng) mit je 4 μ l BigDye-Mix und BigDye-Terminator, sowie 1 μ l M13-Primer (5 pmol) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren: 94°C für 3 min, 94°C für 30 sec, 50° für 1 min, 60°C für 3 min, 72°C für 5 min über 30 Zyklen.

Das Produkt wurde auf Auto-Seq G50-Säulen (Amersham Biosciences) aufgetragen und nach Angaben des Herstellers behandelt. Anschließend wurde mit 2 μ l 3M Na- Acetat und 50 μ l Ethanol (96%) je Probe für 10 min. auf Eis die DNA ausgefällt und bei 14000 rpm für 30 min zentrifugiert. Nach einem weiteren Reinigungsschritt mit 70% Ethanol und erneuter Zenrifugation bei 14000 rpm für 20 min wurde das Pellet getrocknet und in 25 μ l Template Surpression Reagent (Applied Biosystems) für 2 min im Wasserbad erhitzt. Die Analyse erfolgte im Sequenzer ABIPrism 310. Die Basensequenzen wurden mit der Gendatenbank im Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ verglichen und verifiziert.

- Maxi Präparation von Plasmid-DNA

Für die Maxi Präparation von Plasmid DNA wurden nach der Sequenzierung 200 ml LB-Amp Medium mit den jeweiligen rekombinanten Klonen angeimpft, über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert und die Plasmid-DNA mit dem

NucleoBond PC 500 Kit (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.8.3. DNA-Verdau und -elution

20 µg DNA aus der Transformation wurden zu 3 µl 10-fach EcoRI-Puffer und 2 µl EcoRI Restriktionsenzym (NEB, Frankfurt) zugegeben, mit HPLC-Wasser auf 30 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt und für 4 h bei 37°C verdaut. Die Produkte wurden auf ein 1% Agarosegel in Anwesenheit von Ethidiumbromid aufgetragen und die entsprechenden Banden anschließend ausgeschnitten. Die sich in den Gelausschnitten befindliche DNA wurde mit dem Nucleo-Trap-Kit der Firma Macherey- Nagel nach Angaben des Herstellers eluiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.8.4. Standard-Bestimmung

Mittels Excel-Programm wurde die genaue Kopienzahl pro µl Probe ermittelt und für jeden CD-Marker eine Verdünnungsreihe 1:10, ausgehend von 1.000.000 Kopien, angelegt.

Für die jeweiligen Produkte wurde das Molekulargewicht anhand der Basenzahl ausgerechnet, auf die Avogadro'sche Konstante bezogen und in Kopien pro µl angegeben.

	CD14	CD80	CD83	CD86
Molekulargewicht	91810	272869	218160	148029
Gewicht pro Kopie [g]	$1,52458 \cdot 10^{-19}$	$4,5312 \cdot 10^{-19}$	$3062272 \cdot 10^{-19}$	$2,45814 \cdot 10^{-19}$
Gewicht pro µl [g]	$1,09 \cdot 10^{-7}$	$3,13 \cdot 10^{-7}$	$1,04 \cdot 10^{-7}$	$0,81 \cdot 10^{-7}$
Kopiezahl pro µl	$7,14953 \cdot 10^{11}$	$6,90766 \cdot 10^{11}$	$2,87077 \cdot 10^{11}$	$3,29518 \cdot 10^{11}$

Tab. 5: Standard-Bestimmung

2.2.9. Quantitative PCR mittels Real-time PCR

Die Real-time PCR lässt eine quantitative Bestimmung der PCR-Produkte zu: SYBR-green (Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf), ein Fluorophor, bindet an Doppelstrang-DNA und sendet in diesem Moment ein Fluoreszenzsignal aus, das durch einen Real-time Thermocycler (Opticon, MJ Research) detektiert werden kann. Die Fluoreszenz korreliert mit den in der exponentiellen Phase der PCR gebildeten Produkten.

Da SYBR-green jedoch zu einer Hemmung der Polymerase führt, musste für jeden CD-Marker die optimale $MgCl_2$ -Konzentration und Reaktionstemperatur mittels Verdünnungsreihe und verschiedenen Temperaturgradienten ermittelt werden.

- Einstellungen für CD14-SYBR-green-PCR:

Inkubation: 94° für 5 min

Annealing: 94°C für 15 sec, 54°C für 1 min, 72°C für 1 min; 36 Zyklen

Denaturierung: 72°C für 7 min

$MgCl_2$ -Konzentration: 2,5 mM

- Einstellungen für CD80-SYBR-green-PCR:

Inkubation: 94°C für 5 min

Annealing: 94°C für 30 sec, 51°C für 30 sec, 72°C für 7 min; 36 Zyklen

Denaturierung: 72° für 7 min

$MgCl_2$ -Konzentration: 4,0 mM

- Einstellungen für CD83-Sybr-green-PCR:

Inkubation: 94°C für 5 min

Annealing: 94°C für 15 sec, 57°C für 1 min, 72°C für 1 min; 36 Zyklen

Denaturierung: 72°C für 7 min

$MgCl_2$ -Konzentration: 3,0 mM

- Einstellungen für CD86-SYBR-green-PCR:

Inkubation: 94°C für 5 min

2. Material und Methoden

Annealing: 94°C für 15 sec, 58°C für 15 sec, 72°C für 30 sec, 77°C für 10 sec;
36 Zyklen

Denaturierung: 72° für 7 min

MgCl₂-Konzentration: 4,0 mM

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der FACS-Analyse von reifen DC aus PBMCS unter dem Einfluss von hFOB-Überstand

3.1.1. Nachweis von hCyr61 im Überstand von hFOB-Zellen

hFOB-Zellen wurden mit 2 nM TNF α für 2 Tage stimuliert, dann das Medium abgenommen, zentrifugiert und der Überstand mittels Western blot analysiert. Dabei zeigten sich eine deutliche Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich sowie einige kleinere immunreaktive Banden, die womöglich Abbauprodukten von Cyr61 entsprechen (Abb. 1).

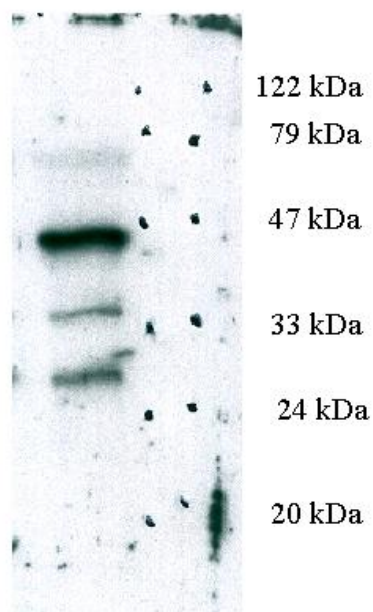


Abb.1: Western blot der Zellkulturüberstände von mit TNF α stimulierten hFOB Zellen

3.1.2. Kandidatenanalyse durch Stimulation von PBMC mit RANKL, HFOB-Überstand und hCyr61

In eigenen Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden die PBMC mit verschiedenen, z. T. bereits als immuninteraktiv bekannten Substanzen stimuliert. Bei den mit IL 4 und GM-CSF vordifferenzierten DC zeigte sich eine deutliche Zunahme des Verhältnisses von CD14-/CD86+ Zellen zu CD14+/CD86- DC von 20:1. Eine Zunahme des Verhältnisses von CD14-/CD86+ zu CD14-/CD86+ DCs auf 90:6 konnte bei Zugabe von hFOB- Überstand erreicht werden. Die Ergebnisse mit RANKL, TNF α oder dem Überstand mesenchymaler Stammzellen als Stimulus waren weniger eindrücklich, sodass diese Substanzen verlassen wurden (s. Abb. 2a). Die aussagekräftigsten Ergebnisse wurden jedoch mit Cyr-haltigem Überstand von humanen fetalen Osteoblasten (hFOB) und rekombinantem hCyr61 erzielt, sodass in Folge unser Augenmerk sich auf diese Substanz und deren Domänen richtete.

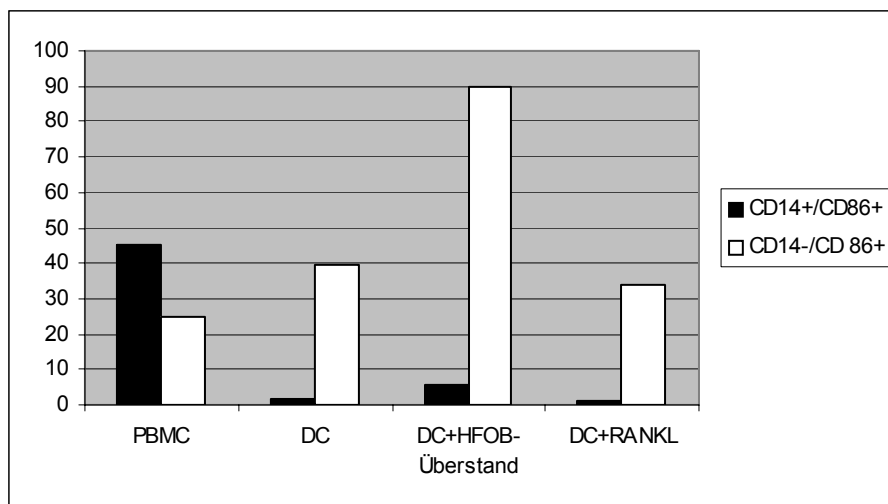


Abb. 2a: FACS-Analyse: Stimulation von PBMC mit dem Überstand von TNF- α stimulierten HFOB und RANKL. PBMC sind unstimulierte Zellen, als DC werden mit IL4 und GM-CSF vorstimulierte Zellen im Sinne einer Ausreifung zu dendritischen Zellen bezeichnet. Die im entsprechenden Gate gezählten Zellen sind in % angegeben.

Nachdem hCyr61 gentechnisch in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurde neben den Versuchen mit dem Überstand der HFOB-Zellen auch eine Experimentreihe mit rekombinantem hCyr61 angelegt.

Das reine Zahlenverhältnis der CD14-/CD86+ Zellen unter hCyr61-Gabe nahm dabei auf 45:2 zu. Im Vergleich lag das Verhältnis von HFOB-Überstand-stimulierten DCs bei 40:10, bei nur mit IL4 und GM-CSF kultivierten DCs war das Verhältnis 30:5 (s. Abb. 2b).

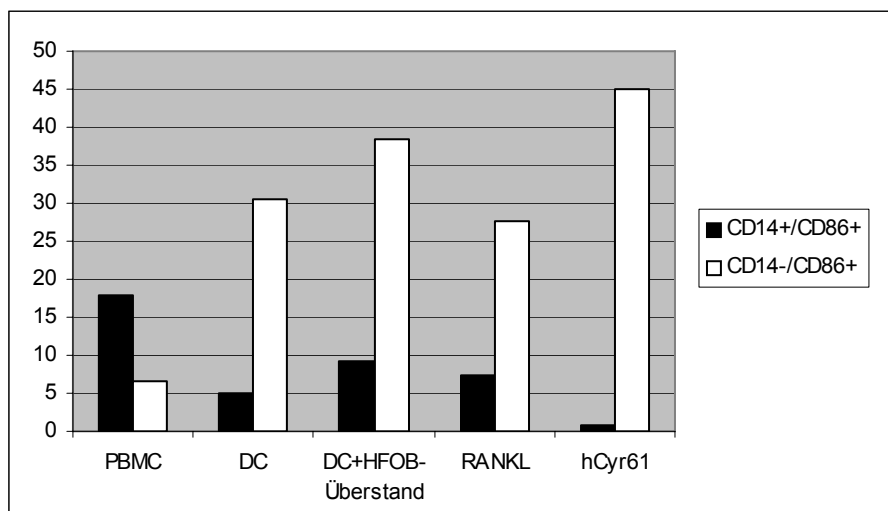


Abb.2b: FACS-Analyse: Stimulation von PBMC mit dem Überstand von TNF- α stimulierten HFOB, RANKL und rekombinantem hCyr61. PBMC sind unstimulierte Zellen, als DC werden mit IL4 und GM-CSF vorstimulierte Zellen im Sinne einer Ausreifung zu dendritischen Zellen bezeichnet. Konzentration von hCyr61: 3 μ g/well. Die im entsprechenden Gate gezählten Zellen sind in % angegeben.

Diese Ergebnisse bestätigten unsere Arbeitshypothese, daß Osteoblasten-Sekretionsprodukte immunmodulatorisch aktiv sind und die noch stärkere Ausreifungstendenz unter hCyr61-Gabe sollte in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

3.2. Qualitative Bestimmung der Expression charakteristischer CD-Oberflächenmarker in undifferenzierten PBMC und differenzierten DC mittels konventioneller PCR

Nach Stimulation der aus peripherem Blut gewonnenen monozytären Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit sense- und antisense-Primern für CD14, 80, 83 oder CD86 mittels konventioneller PCR amplifiziert. Nach Auftrennen des PCR-Produktes auf einem Agarosegel ergaben sich je nach An- oder Abwesenheit von rekombinantem hCyr61 beziehungsweise Interleukin und GM-CSF deutliche Unterschiede der jeweiligen Expressionsbanden für CD-Oberflächenmarker (s. Abb 3-5.). Im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen zeigte die 48-stündige Stimulation mit hCyr61 (bei gleichzeitiger Anwesenheit des DC-Differenzierungs-Cocktails) einmal eine Stimulation der CD14 Expression, in anderen Experimenten zeigte sich kein Effekt. Bei ausdifferenzierten DC und anschließender Stimulation über sieben Tage erfolgte eine Expressionsminderung für CD14 konsistent in allen Experimenten (s. Abb. 3).

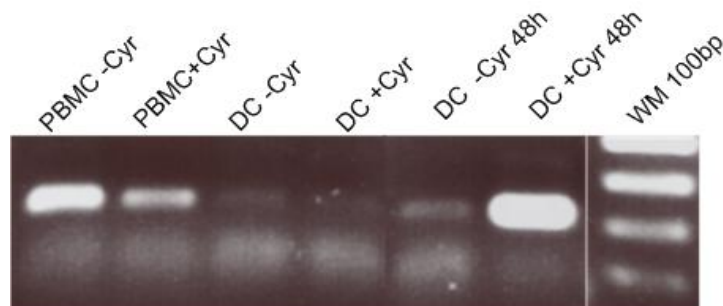


Abb. 3a: RT-PCR Nachweis der Expression von CD14 in PBMC. Die eine Hälfte der monozytären Zellen wurden mit IL-4/GMCSF differenziert und anschließend mit hCyr61 stimuliert ebenso wie undifferenzierte Zellen (Abkürzungen: PBMC: Zellen ohne Zugabe von IL4/GMCSF; DC: Zellen mit Zugabe von IL4/GM-CSF; +/- Cyr: Stimulation mit oder ohne hCyr61). Konzentration von hCYR 3µg. Gezeigt ist ein representatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

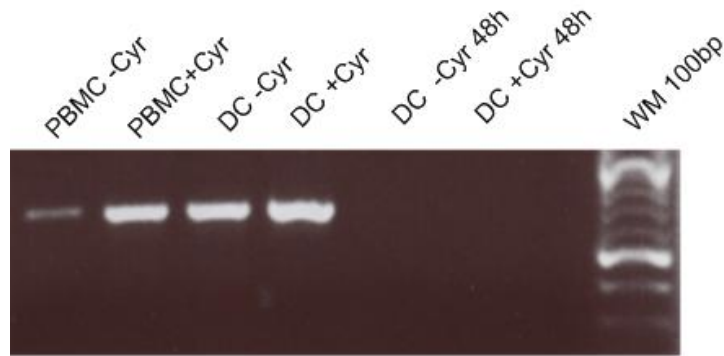


Abb.3b RT-PCR Nachweis der Expression von Aktin in PBMC. Aus nicht geklärten Gründen ließen sich nicht alle Banden darstellen.

Die Expression für CD80 ließ keine eindeutigen Rückschlüsse zu, da die RNA nur unvollständig dargestellt werden konnte. Die erhaltenen Ergebnisse waren nicht stringent reproduzierbar, sodass auf eine Abbildung verzichtet wurde, jedoch war auch hier die Tendenz zu einer vermehrten CD80-Expression unter IL-4, GM-CSF und rekombinantem hCyr61 zu erkennen. Für die CD83-Expression als Marker reifender Monozyten ließ sich tendenziell eine stärkere Bande unter rekombinantem hCyr61, IL-4- und GM-CSF-Stimulation erkennen (s.Abb. 4).

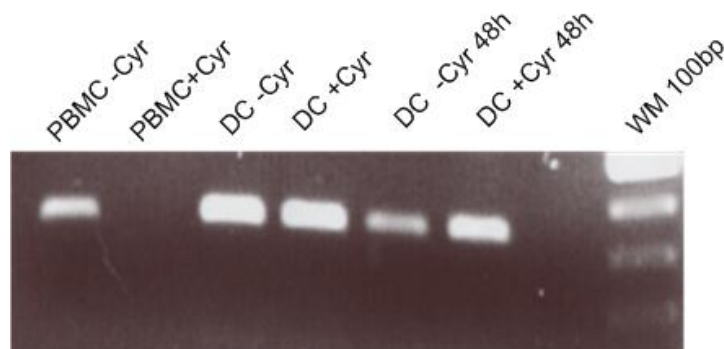


Abb. 4a: Semiquantitative Darstellung der Expression von CD83 mRNA in differenzierten und undifferenzierten PBMC. Die eine Hälfte der monozytären Zellen wurde mit IL-4/GMCSF differenziert und anschließend mit 3µg hCyr61 stimuliert ebenso wie undifferenzierte Zellen (Abkürzungen: PBMC: Zellen

ohne Zugabe von IL4/GMCSF DC: differenziert mit IL4/GMCSF; +/-Cyr: Stimulation mit oder ohne hCyr61).

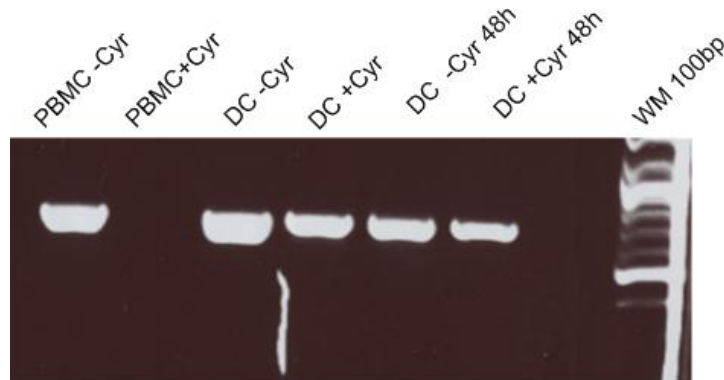


Abb. 4b: RT-PCR Nachweis der Expression von Aktin in PBMC

Die CD86-Expression zeigte eine stärkere Bande unter Stimulation mit hCyr61 für 48 Stunden. Il-4 und GM-CSF ergaben ebenfalls ein stärkeres Bandenmuster, zusätzliche Stimulation mit hCyr61 führte zu einer stärkeren Expression verglichen mit Il-4 und GM-CSF behandelten Zellen (s. Abb. 5a.).

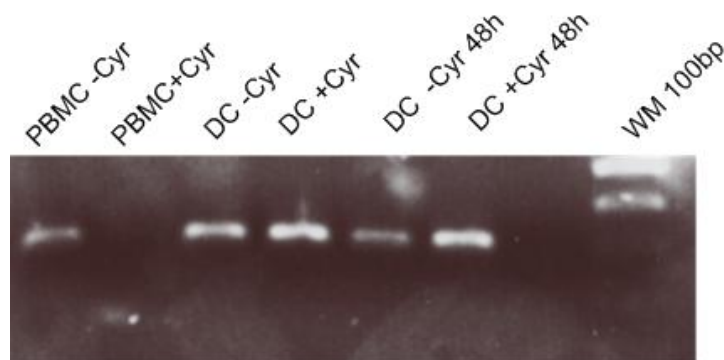


Abb. 5a: RT-PCR Nachweis der Expression von CD86 mRNA in differenzierten und undifferenzierten PBMC Die eine Hälfte der monozytären Zellen wurden mit IL-4/GMCSF differenziert und anschließend mit 3µg hCyr61 stimuliert ebenso wie undifferenzierte Zellen (Abkürzungen: PBMC: Zellen ohne Zugabe von IL4/GMCSF DC: differenziert mit IL4/GMCSF; +/-Cyr: Stimulation mit oder ohne hCyr61).

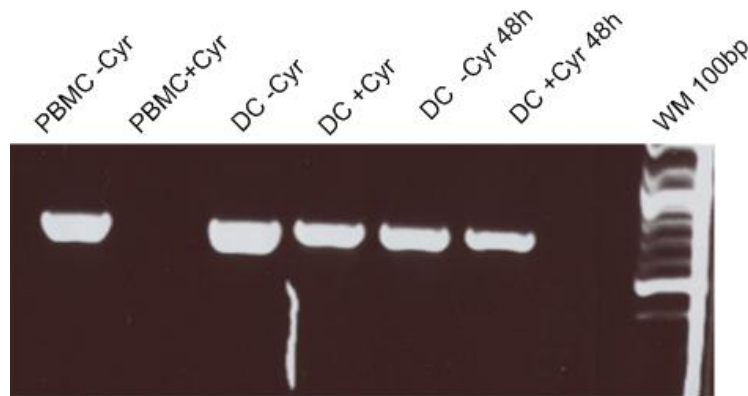


Abb. 5b: RT-PCR Nachweis der Expression von Aktin in PBMC

3.3. Semiquantitativer Nachweis der Expression charakteristischer CD-Oberflächenmoleküle in THP-1 Zellen mittels konventioneller PCR

In gleicher Weise wie die PBMC wurden auch die THP-1-Zellen behandelt, die RNA isoliert und die Expression von Oberflächenantigenen mittels RT-PCR nachgewiesen. Mit den THP-1-Zellen wurde erstmals eine Stimulation zusätzlich mit den einzelnen Domänen des rekombinanten hCyr61 durchgeführt.

In der ersten der drei Versuchsreihen für CD14 zeigte sich bei den differenzierten Zellen eine schwächere CD14-Expression gegenüber den undifferenzierten. Die differenzierten Zellen ohne zusätzliche hCyr61-Stimulation exprimierten am wenigsten CD14. In der zweiten Versuchsreihe resultierte bei differenzierten Zellen sowohl mit, als auch ohne Zugabe von hCyr61 eine verstärkte CD14-Expression. Die dritte Versuchsreihe ergab eine verstärkte CD14-Expression bei mit hCyr61 stimulierten undifferenzierten und differenzierten Zellen.

Die qualitative Darstellung der CD80-Expression zeigte eine in allen drei Versuchsreihen zu beobachtende vermehrte Expression in den mit hCyr61 stimulierten differenzierten Zellen.

Für CD83 ließ sich eine verstärkte Expressionsbande in den differenzierten Zellen nachweisen, besonders bei Zusatz von hCyr61.

Die drei Versuchsreihen der CD86-Expression zeigten eine konstante Mehrexpression der differenzierten Zellen mit einer nochmals stärkeren Bande bei Zugabe von hCyr61.

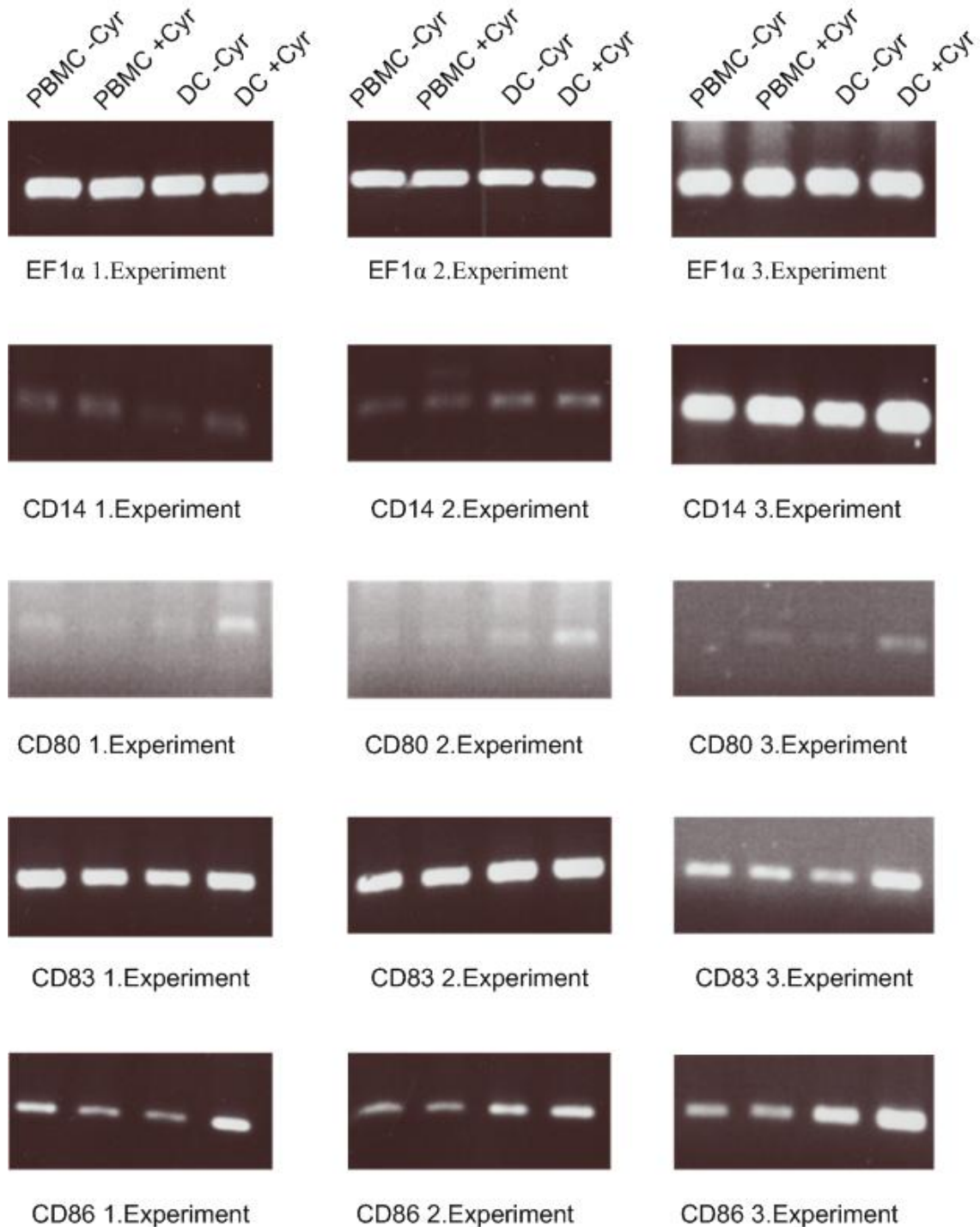


Abb. 6: THP1 Zellen, konventionelle PCR. Nachweis der Expression von EF1 α , CD14, CD80, CD83 und CD86 in THP1. Die eine Hälfte der THP1- Zellen

wurden mit IL-4/GMCSF differenziert und anschließend mit hCyr61 stimuliert, die andere Hälfte wurde ohne IL-4 und GMCSF behandelt (Abkürzungen: DC: differenziert mit IL4/GMCSF; PBMC: ohne IL4/GMCSF; +/-Cyr: Stimulation mit oder ohne hCyr61; mit Experiment 1-3 wurden die einzelnen Versuchsreihen chronologisch bezeichnet).

Die vier Domänen des rekombinanten hCyr61 wurden einzeln als Stimulationssubstanz den Zellen zugegeben. Für CD14 konnte die in Versuchsreihe „Zwei“ (s. mittlere Spalte, Abb. 6) sichtbare Minderung der Expression durch Domäne III nicht reproduziert werden. Die Unterschiede zwischen den restlichen Banden ließen sich mit der konventionellen PCR-Methode nicht näher quantifizieren.

Für CD80 ließ sich in Versuchsreihe „Eins“ (s. linke Spalte, Abb. 6) eine Zunahme der Bandenstärke für Domäne 2 und 3 gegenüber dem kompletten hCyr61-Molekül beobachten, in Versuch drei war die Expression bei dem Gesamtmolekül stärker als bei den Domänen.

Für CD83 resultierte in den ersten beiden Versuchsreihen eine stärkere Bande für Domäne drei und vier gegenüber dem Gesamtmolekül. Im Experiment „Drei“ (s. rechte Spalte, Abb. 6) ließ sich dieses Muster nicht verifizieren.

Bei CD86 war im ersten Experiment kein eindeutiger Unterschied zwischen den Banden auszumachen. Im zweiten und dritten Experiment war unter dem Gesamtmolekül ein stärkeres Bandenmuster zu beobachten gegenüber den ohne Gesamt-Cyr differenzierten Zellen. Die Stimulation mit den einzelnen Domänen hingegen stellte sich gegenläufig dar: zeigt sich in Experiment „Zwei“ unter Domäne 3 eine Verstärkung gegenüber dem Gesamtmolekül, so ist im dritten Experiment eine Abschwächung erkennbar.

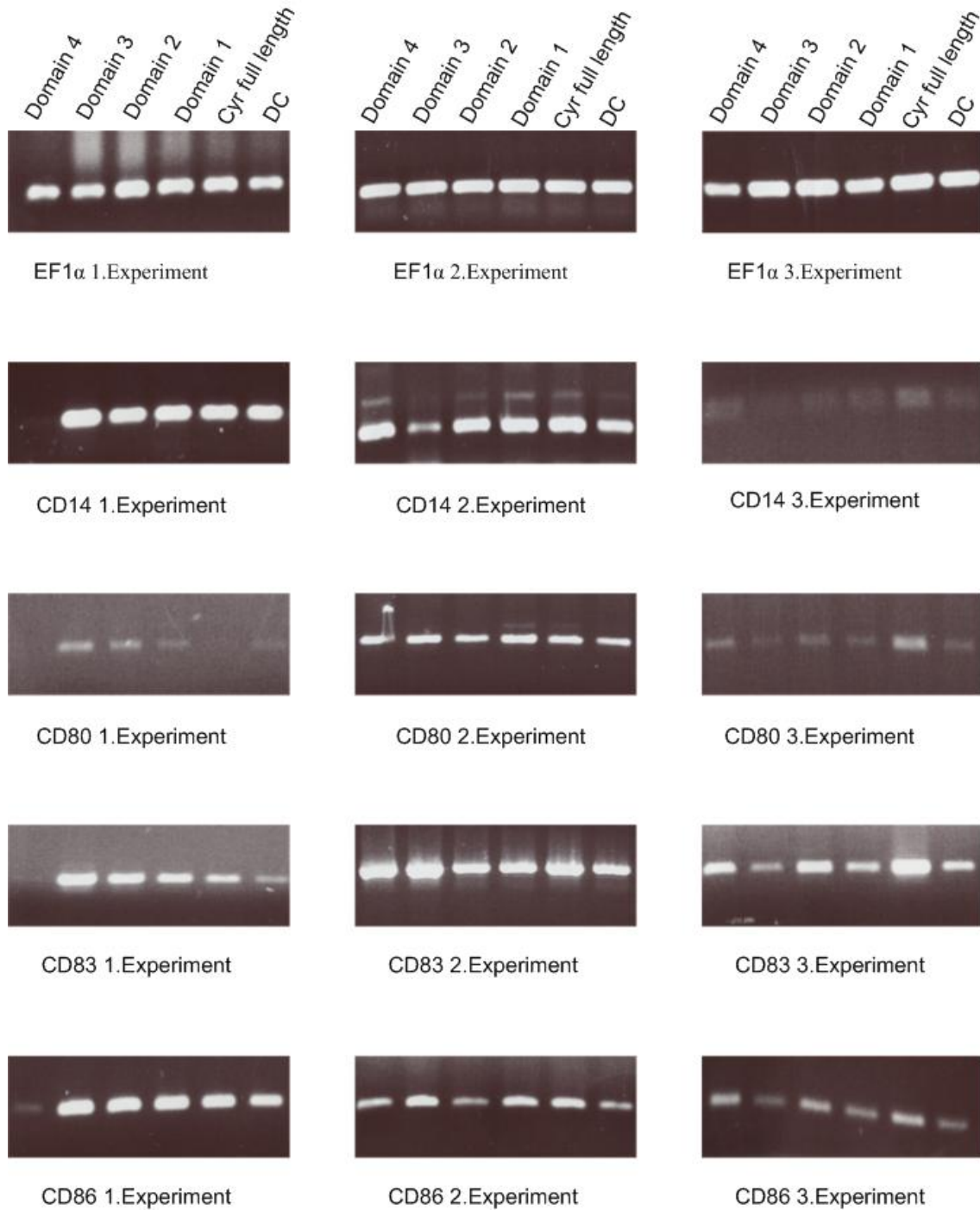


Abb. 7: THP1 Zellen, konventionelle PCR. Nachweis der Expression von EF1 α , CD14, CD80, CD83 und CD86 in THP1. Alle THP1- Zellen wurden mit IL-4/GMCSF differenziert und anschließend mit den verschiedenen Domänen von hCyr61 stimuliert (Abkürzungen: DC: differenziert mit IL4/GMCSF; Cyr full length: hCyr61 als komplettes Molekül; Domain 1-4: die vier verschiedenen

Domänen des Cyr-Moleküls; mit Experiment 1-3 wurden die einzelnen Versuchsreihen chronologisch bezeichnet).

3.4. Quantitative Bestimmungen der CD- Expression in THP-1 Zellen mittels der Real- time- PCR

3.4.1. Klonierung des Standards für die quantitative PCR

Wie im Abschnitt 2.2.7 Material und Methoden beschrieben, wurden Standards für die quantitative PCR kloniert. Abb. 8 zeigt die klonierten PCR- Produkte nach Restriktion mit EcoRI. Die Banden wurden aus dem Gel eluiert und als Template bei der Real-time PCR eingesetzt.

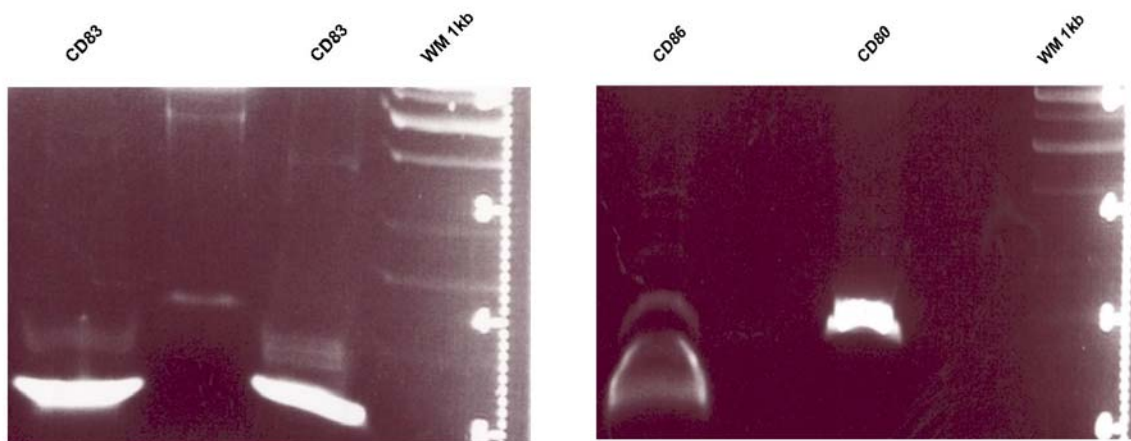


Abb. 8: Standardgel CD14, CD83, CD 80 und CD86 (WM: weightmarker, hier 1kb)

Anhand der bekannten Basenzahl der jeweiligen CD- Marker wurde die exakte Kopienzahl ermittelt und eine Verdünnungsreihe 1:10 ausgehend von 1.000.000 Kopien angelegt.

	CD14	CD80	CD83	CD86
Molekulargewicht	91810	272869	218160	148029
Gewicht pro Kopie [g]	$1,52458 \cdot 10^{-19}$	$4,5312 \cdot 10^{-19}$	$3062272 \cdot 10^{-19}$	$2,45814 \cdot 10^{-19}$
Gewicht pro μl [g]	$1,09 \cdot 10^{-7}$	$3,13 \cdot 10^{-7}$	$1,04 \cdot 10^{-7}$	$0,81 \cdot 10^{-7}$
Kopiezahl pro μl	$7,14953 \cdot 10^{11}$	$6,90766 \cdot 10^{11}$	$2,87077 \cdot 10^{11}$	$3,29518 \cdot 10^{11}$

Tab. 1: Ermittlung der Kopiezahl der CD- Oberflächen-Marker

3.4.2. Festlegung der optimalen PCR-Bedingungen bei Verwendung von SYBR-Green

Da das Reagenz SYBR-Green in gewissem Umfang zu einer Hemmung der Polymerase führt, legten wir für jeden CD-Marker die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Reaktionstemperatur und MgCl_2 -Konzentration fest. Am Ende der Amplifikationsphase wurde die Schmelztemperatur des PCR-Produktes bestimmt. Hierzu wird die Temperatur jeweils um $0,3^\circ\text{C}$ erhöht und die Fluoreszenzintensität gemessen. Ist der Schmelzpunkt erreicht, kommt es zur DNA-Denaturierung und die Fluoreszenzintensität fällt ab. Entsteht ein einzelner Peak wie in den Abb. 9-12 gezeigt, kann auf ein reines PCR-Produkt und eine hohe Spezifität der Reaktion geschlossen werden.

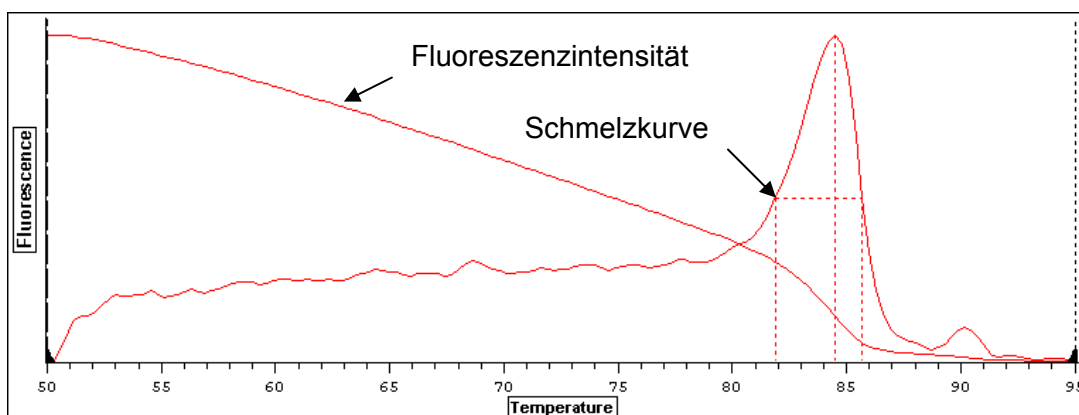


Abb. 9: CD14 Schmelzkurve bei 2,5 mM MgCl₂, 54°C

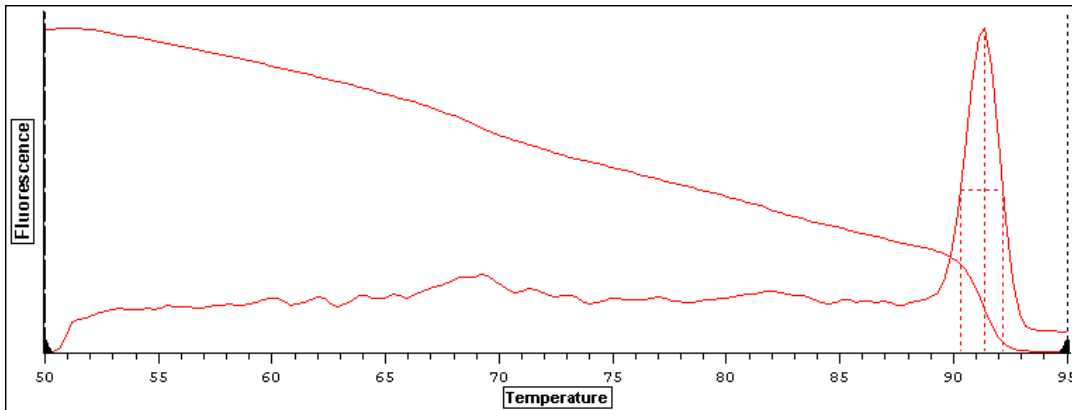


Abb. 10: CD83 Schmelzkurve bei 3 mM MgCl₂, 57°C

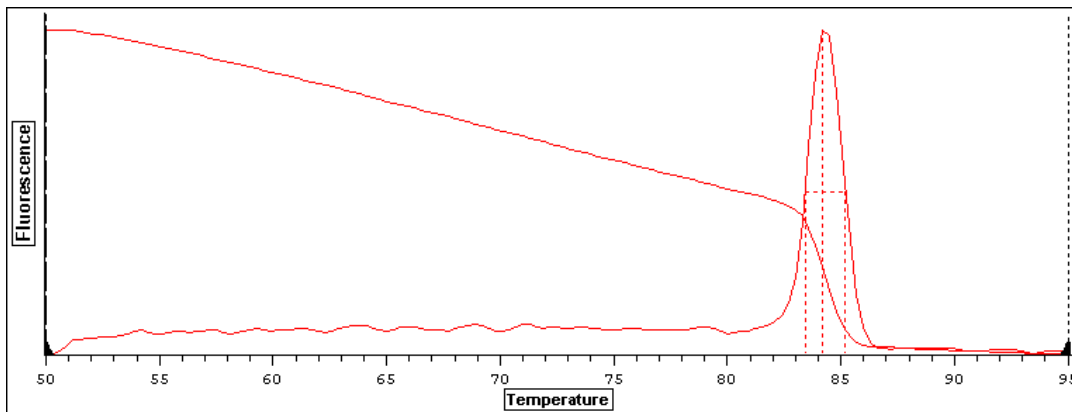


Abb. 11: CD80 Schmelzkurve bei 4,0 mM MgCl₂, 51°C

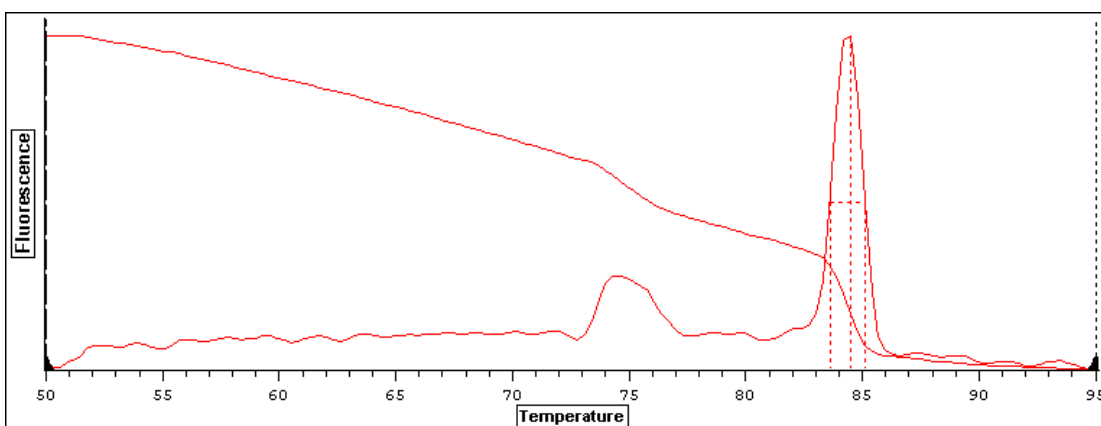


Abb. 12: CD86 Schmelzkurve bei 3,5 mM MgCl₂, 60°C

Abb. 9-12: Bestimmung der optimalen Schmelztemperatur von CD 14, 80, 83 und 86 bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen. Eine abfallende Fluoreszenzintensitätskurve bei einem möglichst steilen peak erlaubt Rückschlüsse auf die Reinheit des Reaktionsproduktes und Spezifität der Reaktion

3.4.3. Quantitative Bestimmung der DNA-Kopien anhand des Standards

Die quantitative PCR wurde unter Verwendung eines Standards für jedes Gen durchgeführt. Die Verwendung eines Standards erlaubt den Rückschluss auf die genaue Kopienzahl der eingesetzten cDNA. Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe des unter 3.4.1 beschriebenen Standards angelegt und in die Real-time-PCR als Template eingesetzt.

Zur Überprüfung der Intaktheit der jeweiligen cDNA wurde für jede Probe eine PCR des als housekeeping-Gen bekannten Elongationsfaktors 1 α durchgeführt. Für EF1 α stand ebenfalls eine Standard-Verdünnungsreihe, hergestellt von Herrn M. Ulmer, zur Verfügung.

Zur Normalisierung wurde die ermittelte Anzahl der Kopien für jeden CD-Marker als Quotient zur EF1 α -Expression gesetzt. Um eine deutliche Aussage zu erhalten, wurden die so erhaltenen Expressionswerte für die CD-Marker auf die Negativkontrolle bezogen. Die so erhaltene Ratio setzte somit immer die Negativkontrolle als Zahlenwert „eins“ fest.

Als biologische Negativkontrolle wurden die Zellen bezeichnet, denen außer dem Nährmedium keine weiteren Substanzen zugesetzt worden waren.

3.4.3.1. Auswertung der real-time-Versuche mit IL-4, GM-CSF und hCyr61

Bei der Auswertung der Real-time-PCR wurde auf die statistische Berechnung verzichtet, da sich bereits bei den Absolutwerten der einzelnen Experimentreihen zum Teil gegensinnige Ergebnisse zeigten. Zudem waren einzelne PCR-Produkte trotz mehrfacher Wiederholung nicht verwertbar.

In zwei von drei durchgeführten Versuchsreihen zeigte sich eine Minderung der CD14-Expression sowohl für die alleinige Differenzierung mit Il-4 und GM-CSF, als auch bei alleiniger Stimulation mit hCyr61. Für beide sank die Expression um fast 50% gegenüber der Negativkontrolle. Bei Stimulation mit hCyr61, Il-4 und GM-CSF zeigte sich neben einer leichten bzw. vierfachen Zunahme der Expression in der dritten Versuchsreihe ein Abfall der Expression um fast 50%. Bei der CD80-Auswertung konnten nicht alle Daten vom Opticon-Gerät detektiert werden. Während sich in einzelnen Reihen unter Il-4 und GM-CSF-Stimulation eine Zunahme um das 1,5-fache, unter hCyr61-Stimulation eine Zunahme auf über das 2,5-fache zeigte, waren bei parallel durchgeführten Zellreihen die Ergebnisse entweder gegenläufig oder zeigten keine Änderung. CD86 ergab für die Stimulation mit Il-4, GM-CSF und hCyr61 die empfindlichste, bis zur siebenfachen Mehrexpression. Bei Einzelstimulation mit hCyr61 nahm die CD86-Expression in einem Experiment auf das 1,5-fach zu, bei Wiederholung sank sie auf ca. die Hälfte ab. Für CD83 konnten keine Werte ermittelt werden. Weder veränderte MgCl₂-Konzentrationen, noch unterschiedliche Temperaturstufen und abgeänderte CD83-Primerkonstellationen führten zu auswertbaren Ergebnissen.

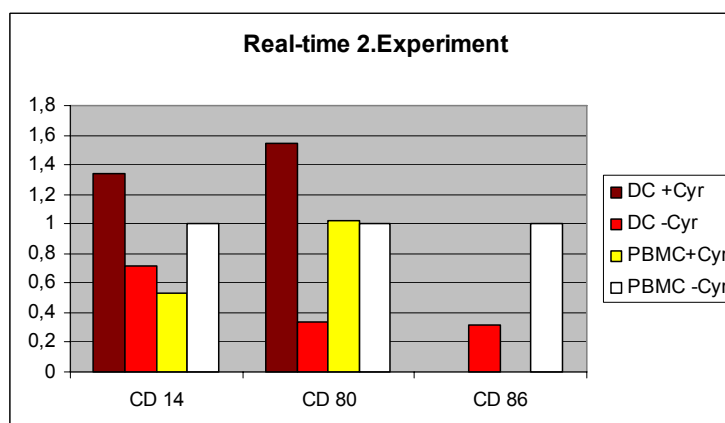
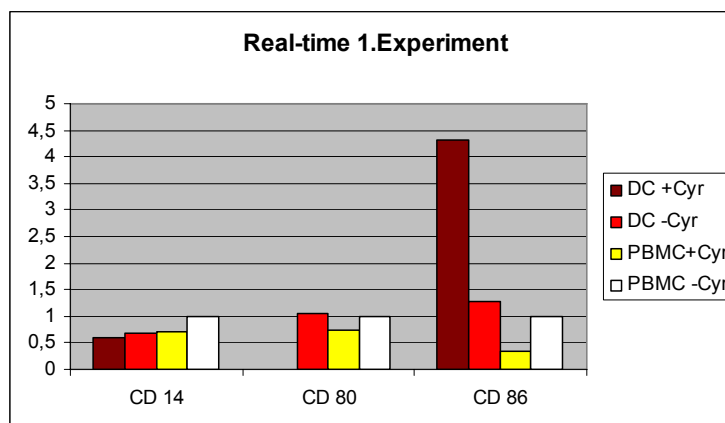
Die biologische Zellpopulation der Experimente zwei und drei muss in Frage gestellt werden, da die differenzierten und mit hCyr61 stimulierten Zellen eine stärkere CD14-Expression aufweisen als die undifferenzierten Zellen.

CD14	Copy-ratio 1.Experiment	Copy-ratio 2.Experiment	Copy-ratio 3.Experiment
DC +hCyr61	0,590153535	1,334900511	4,22698009
DC - hCyr61	0,686249156	0,7135923	2,22980609
PBMC +hCyr61	0,707428766	0,531220525	2,25104144
PBMC - hCyr61	1	1	1
CD80			
DC +hCyr61		1,54183455	
DC - hCyr61	1,05722868	0,33272061	2,77617344

3. Ergebnisse

PBMC +hCyr61	0,73296683	1,02202828	1,45202985
PBMC - hCyr61	1	1	1
CD86			
DC +hCyr61	4,31032101		7,119737095
DC - hCyr61	1,27574712	0,312760434	
PBMC +hCyr61	0,351471818		1,638794117
PBMC - hCyr61	1	1	1

Tab.2: Real-time-PCR; Expressionswerte für die CD-Marker auf die Negativkontrolle bezogen (Abkürzungen: DC: differenziert mit IL4/GMCSF; PBMC: undifferenziert ohne IL4/GMCSF; +/-hCyr61: Stimulation mit oder ohne hCyr61).



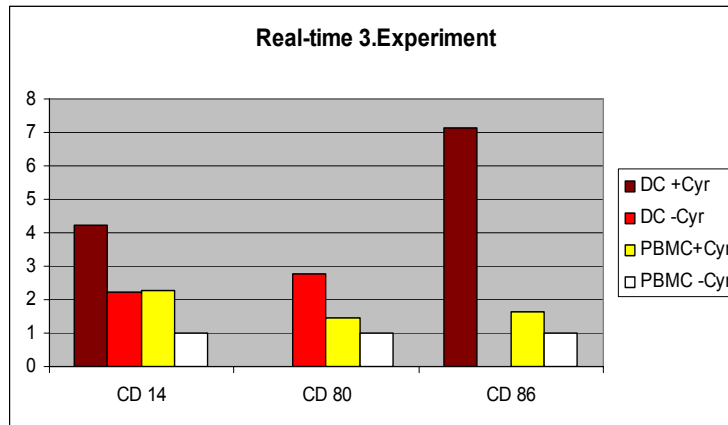


Abb. 13: THP1-Zellen: Ergebnisse der Real-time PCR. Mit Experiment 1-3 ist die chronologische Reihenfolge der Experimente bezeichnet (Abkürzungen: DC: differenziert mit IL4/GMCSF; PBMC: undifferenziert ohne IL4/GMCSF; +/- Cyr: Stimulation mit oder ohne hCyr61).

3.4.3.2. Auswertung der real-time-Versuche mit hCyr61 und hCyr61-Domains

Die Versuchsreihen wurden so angelegt, dass die Wirkung der einzelnen Domänen und des Gesamtproteins hCyr61 getrennt sowohl auf unstimulierte Zellen, als auch auf mit Il-4 und GM-CSF vorbehandelte Zellen beobachtet werden konnte. Die Negativkontrolle waren auch hier die alleinig mit dem Nährmedium behandelten Zellen. Für CD14 erhöhte sich die Expression unter Il-4, GM-CSF und Gesamt-hCyr61 um das acht- bis zehnfache in zwei Versuchsreihen. In der dritten Versuchsreihe war sie auf das 0,2-fache gesunken. Unter Gesamt-hCyr61 als Einzelstimulus waren die Werte um das sechs- bis 13-fache erhöht. Die Domänen 1 bis 4 ohne Vordifferenzierung mit Il-4 und GM-CSF zeigten einen Abfall der Expression auf das bis zu 0,03-fache ohne wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Domänen. Bei den mit Il-4 und GM-CSF differenzierten Zellen sowie bei mit den einzelnen Domänen stimulierten differenzierten Zellen lag die CD14-Expression leicht höher als bei den undifferenzierten Zellen, zwischen den einzelnen Domänen war aber keine deutliche Änderung feststellbar.

CD14	1. Experiment	2. Experiment	3. Experiment
DC +hCyr61	10,06226824	7,887468029	0,27746946
DC –hCyr61	2,589185916	0,755528042	0,326910938
DC+ Domain 1	1,366248103	1,239321705	0,855394839
DC+ Domain 2	0,911973422	0,042408055	0,540155153
DC+ Domain 3	1,296163927	0,824645343	0,365289769
DC+ Domain 4	1,425102218	0,810473175	0,279377028
PBMC+ hCyr61	13,21120329	6,883817376	0,026155577
Negativkontrolle	1	1	1
PBMC+ Domain 1	0,404629376	0,159498196	0,045470785
PBMC+ Domain 2	0,224620829	0,10810998	0,076155953
PBMC+ Domain 3	0,0538362	0,053091867	0,05264727
PBMC+ Domain 4	0,326904691	0,097988563	0,034142607

Tab.3: Real-time PCR; Expressionswerte für die CD-Marker auf die Negativkontrolle bezogen. Abkürzungen: DC: differenziert mit IL4/GMCSF; PBMC: undifferenziert ohne IL4/GMCSF; +/-hCyr61: mit oder ohne hCyr61 stimuliert. Negativkontrolle: undifferenzierte Zellen. Domain 1-4: die vier verschiedenen Domänen des Cyr-Moleküls

Eine 100-fache Mehrexpression von CD80 ergab sich in der ersten Zellreihe unter dem Stimulus von Il4, GM-CSF und Gesamt-hCyr61. In der parallel durchgeführten zweiten Zellreihe war die Expression vervierfacht, in einem dritten Ansatz um das 0,2-fache vermindert. Domäne 1 und 2 zeigten in Kombination mit Il-4 und GM-CSF zweimal eine Vermehrung auf das sieben- bis siebzehnfache, Domäne 3 und 4 bewirkten noch eine Verzwei- bis Verfünffachung. Die Domänen 1 bis 4 ohne Zugabe von Il-4 und GM-CSF zeigten einen Abfall der Expression auf das bis zu 0,01-fache.

CD80	1. Experiment	2. Experiment	3. Experiment
DC +hCyr61	100,6371854	4,10320508	0,1573272
DC –hCyr61	47,38593914	4,291671606	1,05152229

DC+ Domain 1	12,0301558	17,41228366	0,32854146
DC+ Domain 2	7,763231385	15,11817727	0,19644797
DC+ Domain 3	5,216074221	4,882729857	0,94702111
DC+ Domain 4	3,402738853	2,73624355	0,05992844
PBMC+ hCyr61	2,721837887	1,253691012	0,01333977
Negativkontrolle	1	1	1
PBMC+ Domain 1	0,432510345	0,225826442	0,01726947
PBMC+ Domain 2	0,273267073	0,40327353	0,02007751
PBMC+ Domain 3	0,287609459	0,061967442	0,01337968
PBMC+ Domain 4	0,246132387	0,060643439	0,01030613

Tab.4: Ratio der Kopienanzahl. Abkürzungen: DC: differenziert mit IL4/GMCSF; PBMC: undifferenziert ohne IL4/GMCSF; +/-hCyr61: mit oder ohne hCyr61 stimuliert. Negativkontrolle: undifferenzierte Zellen. Domain 1-4: die vier verschiedenen Domänen des Cyr-Moleküls

Für die CD86-Expression ergaben sich unter Il-4, GM-CSF und Gesamt-hCyr61 48-fach bis 10-fach höhere Werte in zwei Versuchsreihen. Die dritte Reihe zeigte keine wesentliche Änderung. Ohne Gesamt-hCyr61 lag die Expression in der ersten Reihe noch bei 10-fach, in der dritten bei 7-fach höheren Werten. Gegenüber der Negativkontrolle war die zweite Versuchsreihe auf die Hälfte abgesunken.

CD86	1. Experiment	2. Experiment	3. Experiment
DC +hCyr61	48,05823042	1,347463126	10,02154104
DC –hCyr61	9,352578901	0,51583925	7,199275787
DC+ Domain 1	1,168673373	2,092979677	3,262624747
DC+ Domain 2	0,789438187	0,277466681	4,055794469
DC+ Domain 3	0,594932723	1,504168456	2,062551609
DC+ Domain 4	0,588831651	0,614451321	0,555578813
PBMC+ hCyr61	1,097692637	0,670385673	0,860284932

Negativkontrolle	1	1	1
PBMC+ Domain 1	0,315476764	0,643790043	0,408722743
PBMC+ Domain 2	1,02440919	1,535984189	0,09898943
PBMC+ Domain 3	0,114356261	0,722771728	kein Wert
PBMC+ Domain 4	1,004465275	0,851481343	1,888956138

Tab.5: Ratio der Kopienanzahl. Abkürzungen: DC: differenziert mit IL4/GMCSF; PBMC: undifferenziert ohne IL4/GMCSF; +/-hCyr61: mit oder ohne hCyr61 stimuliert. Negativkontrolle: undifferenzierte Zellen. Domain 1-4: die vier verschiedenen Domänen des Cyr-Moleküls

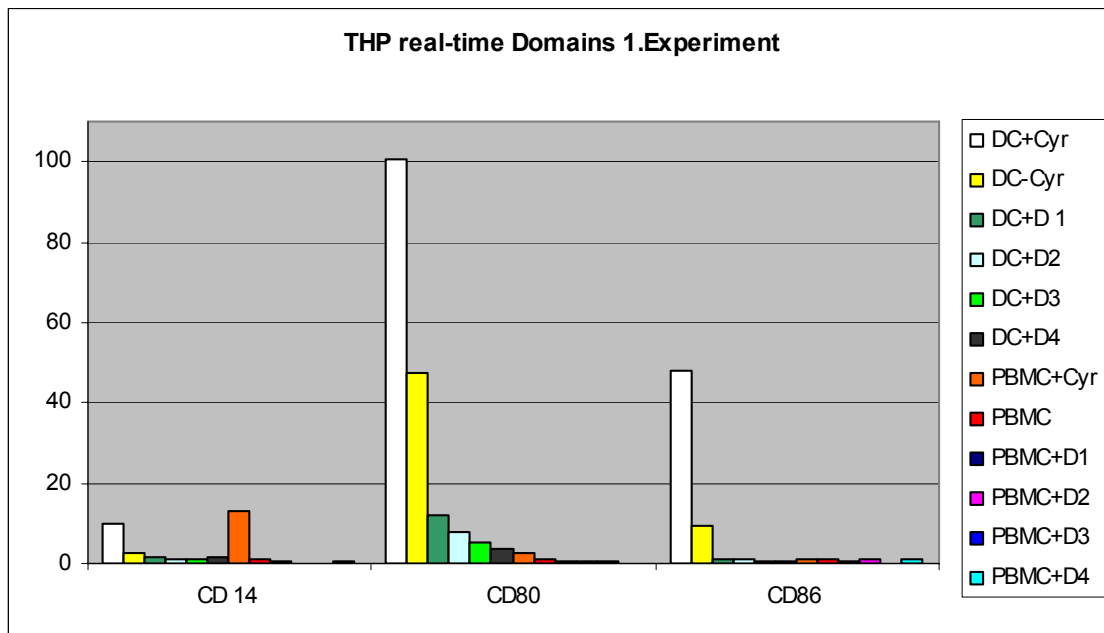


Abb.14: THP-1 Zellen; Auswertung der real-time-PCR; mit D1-D4 sind die vier verschiedenen Cyr-Domänen bezeichnet. PBMC: Zellen ohne IL4 und GM-CSF-Stimulation, DC: Zellen mit IL4 und GM-CSF-Stimulation. Einheit: copy ratio, wie unter 3.4.3. beschrieben.

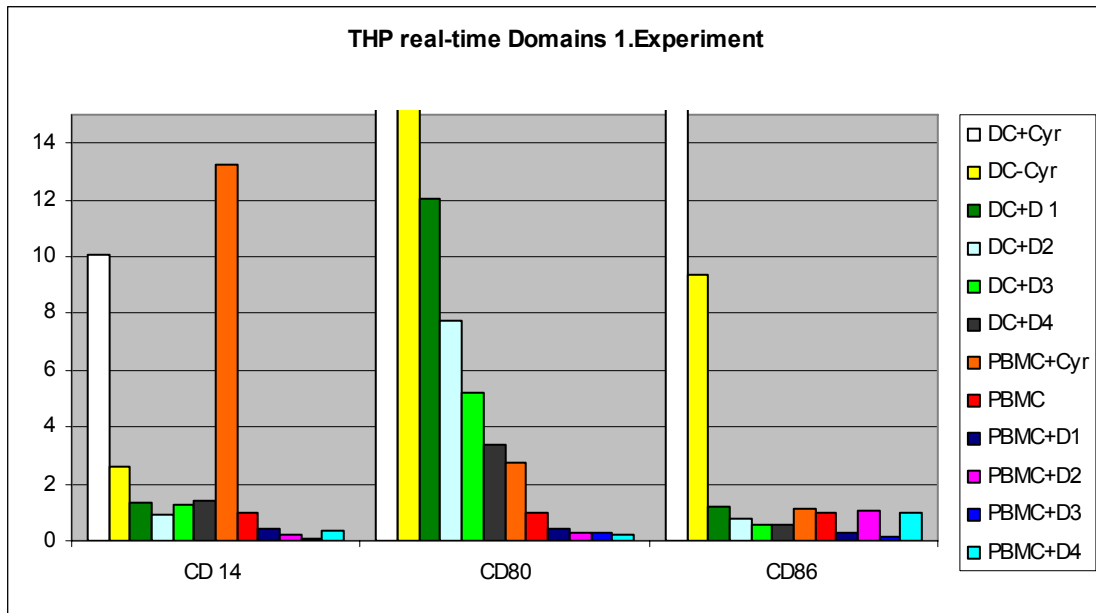


Abb.14a: Ausschnitt aus Abb. 14

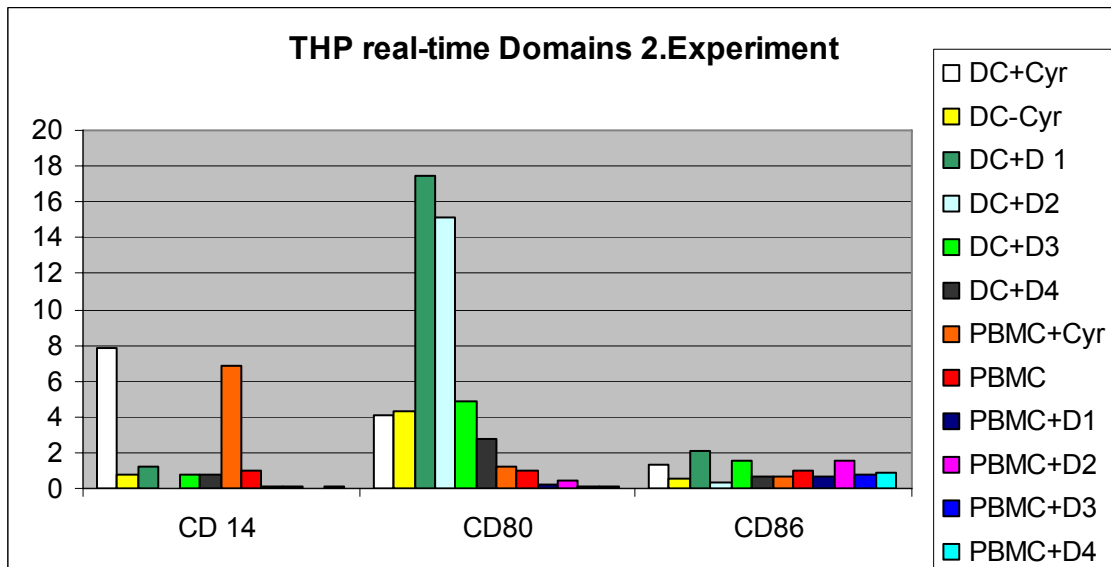


Abb.15 THP-1 Zellen; Auswertung der real-time-PCR; mit D1-D4 sind die vier verschiedenen Cyr-Domänen bezeichnet. PBMC: Zellen ohne Il4 und GM-CSF-Stimulation, DC: Zellen mit Il4 und GM-CSF-Stimulation. Einheit: copy ratio, wie unter 3.4.3 beschrieben.

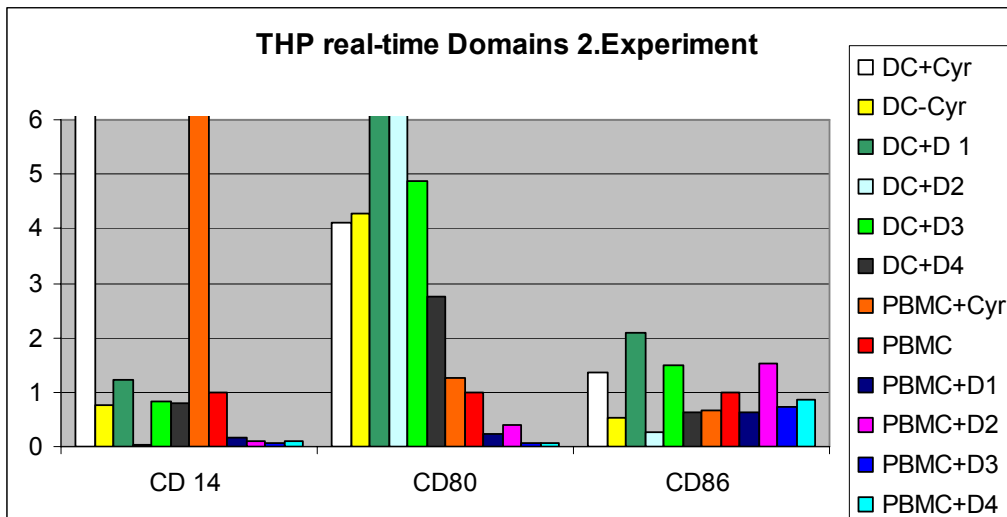


Abb.15a: Ausschnitt aus Abb. 15

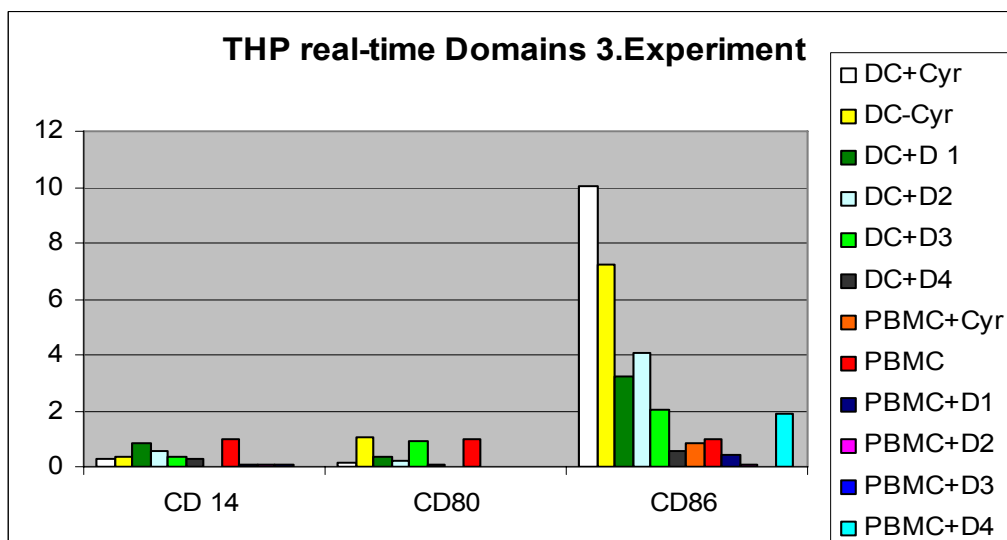


Abb.16 THP-1 Zellen; Auswertung der real-time PCR; mit D1-D4 sind die vier verschiedenen Cyr-Domänen bezeichnet. PBMC: Zellen ohne Il4 und GM-CSF-Stimulation, DC: Zellen mit Il4 und GM-CSF-Stimulation. Einheit: copy ratio, wie unter 3.4.3 beschrieben.

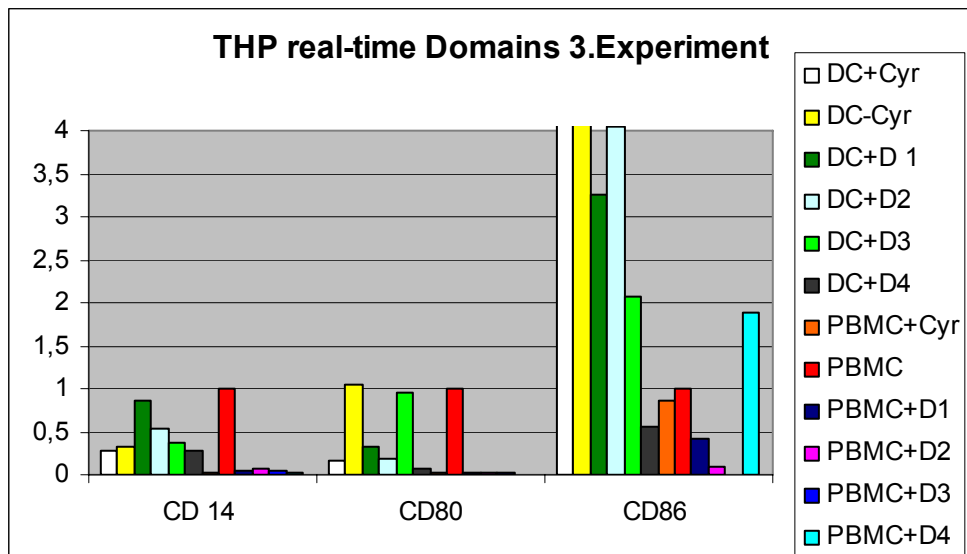


Abb.16a: Ausschnitt aus Abb. 16

Für keinen der drei CD-Marker ergab sich bei Stimulation mit den einzelnen hCyr61-Domänen eine wesentliche Änderung. Die in Experiment „zwei“ beobachtete Expressionszunahme von CD80 unter Stimulation der differenzierten Zellen mit Domäne eins und zwei liess sich in keinem Experiment reproduzieren.

3.5. Quantitative Bestimmung der CD-Expression in THP1-Zellen mittels FACS-Analyse

Die THP1-Zellen wurden nach der in Kapitel 2 beschriebenen Methode stimuliert, mit FITC- bzw. PE-Antikörpern gefärbt und anhand der entsprechenden Isotypenkontrolle ausgewertet. Die Auswertung wurde von Frau MTA R. Ottohal und Frau MTA A. Koss-Kinziger durchgeführt.

THP1 1.Experiment

	CD14	CD83	CD80	CD86
PBMC –hCyr61	83,8	16,1	98,8	0,86
PBMC + hCyr61	63,4	36,6	97,4	2,6
DC–hCyr61	9,1	90,9	96,3	2,6
DC+ hCyr61	3,3	96,7	85,7	13,7

Tab.6: FACS-Ergebnisse der für den jeweiligen CD-Marker positiv erkannten THP-1 Zellen. Die im entsprechenden Gate gezählten Zellen sind in % angegeben.

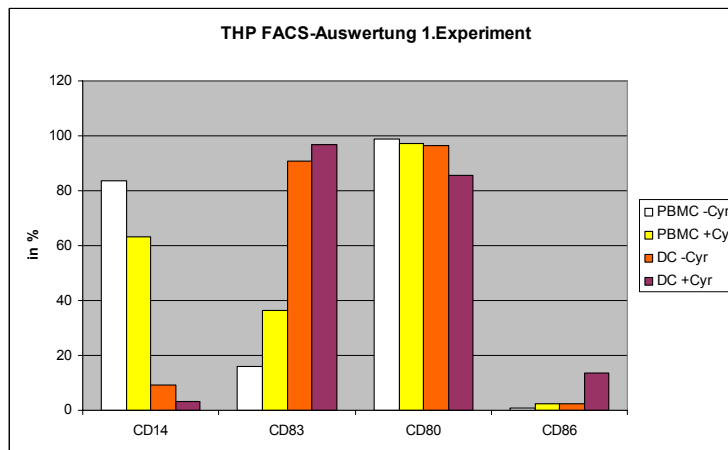


Abb. 17: THP1 FACS-Analyse 1. Experiment. PBMC: Zellen ohne Il4 und GM-CSF-Stimulation, DC: Zellen mit Il4 und GM-CSF-Stimulation; +/-hCyr61: mit/ohne hCyr61

In der ersten Experimentreihe der FACS-Analyse war der Abfall der CD14-Expression der undifferenzierten Zellen von 83% gegenüber den differenzierten und mit hCyr61 stimulierten Zellen mit 3% als ein Zeichen der Reifung der Zellen zu Dendritischen Zellen zu erkennen. CD83 und CD86 als Marker der reiferen dendritischen Zellen ließen ebenfalls eine Ausreifung erkennen: so sind 16% der undifferenzierten Zellen CD83+ und über 96% der differenzierten Zellen CD83+. CD86+ Zellen sind bei undifferenzierten unter 1% nachweisbar, bei differenzierten Zellen über 13%.

Für die Expression von CD80 scheint weder die Differenzierung mit IL4 und GM-CSF, noch die Stimulation mit hCyr61 einen eindeutigen Einfluss zu haben

THP1 2. Experiment

	CD14	CD83	CD80	CD86
PBMC –hCyr61	88,6	0	0,07	0,01
PBMC + hCyr61	43,1	0,1	2,1	5,3
DC–hCyr61	68,4	0	1,1	0,2
DC+ hCyr61	6,6	0,2	2	24,8

Tab.7: FACS- Ergebnisse der für den jeweiligen CD-Marker positiv erkannten THP-1 Zellen. Die im entsprechenden Gate gezählten Zellen sind in % angegeben.

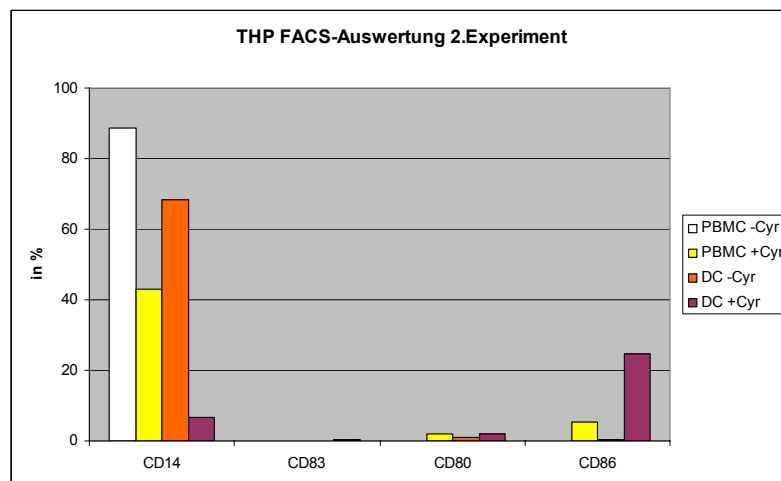


Abb. 18: THP1 Facs-Analyse. PBMC: Zellen ohne IL4 und GM-CSF-Stimulation, DC: Zellen mit IL4 und GM-CSF-Stimulation; +/-hCyr61: mit/ohne hCyr61

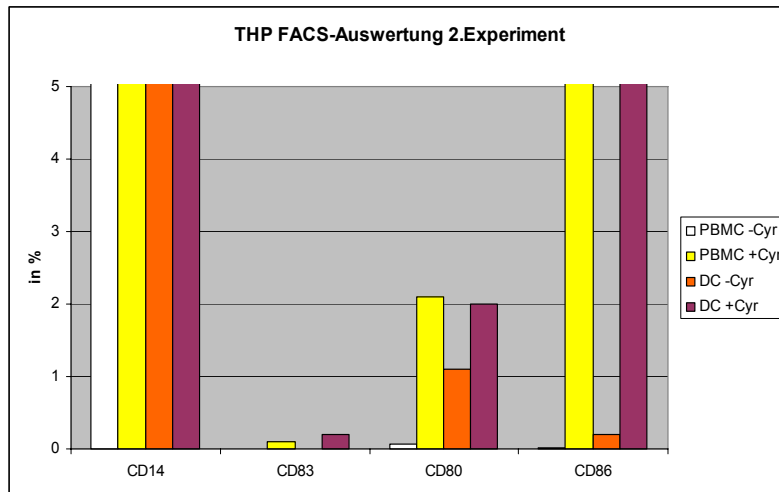


Abb.18a: Vergrößerung von Abb. 18

Die zweite Experimentreihe zeigt 88% der undifferenzierten Zellen als CD14+ und nur 6% CD14+ Zellen nach Differenzierung und Stimulation mit hCyr61. Für CD83 und CD86 waren nicht alle Daten detektierbar. Im Vergleich zu Versuch „eins“ ist die CD83-Induktion von undifferenzierten und differenzierten Zellen, die beide mit hCyr61 stimuliert wurden, bei den differenzierten Zellen nur geringfügig erhöht.

Von den undifferenzierten, nur mit hCyr61 stimulierten Zellen sind 5% CD86+, gegenüber mehr als 24% CD86+Zellen, die mit IL4 und GM-CSF vor hCyr61-Zugabe stimuliert worden waren.

THP1 3. Experiment

	CD14	CD83	CD80	CD86
PBMC –hCyr61	99,77	0,53	0,32	0,11
PBMC + hCyr61	95,95	3,67	0,59	3,83
DC–hCyr61	99,08	20,59	8,38	20,76
DC+ hCyr61	97,15	37,93	9,74	65,79

Tab.8: FACS Ergebnisse der für den jeweiligen CD-Marker positiv erkannten THP-1 Zellen. Die im entsprechenden Gate gezählten Zellen sind in % angegeben.

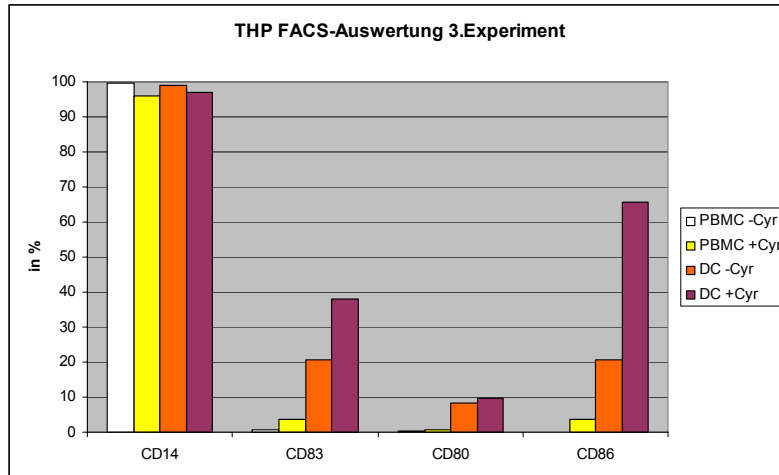


Abb 19: THP1 Facs-Analyse. PBMC: Zellen ohne Il4 und GM-CSF-Stimulation, DC: Zellen mit Il4 und GM-CSF-Stimulation; +/-hCyr61: mit/ohne hCyr61

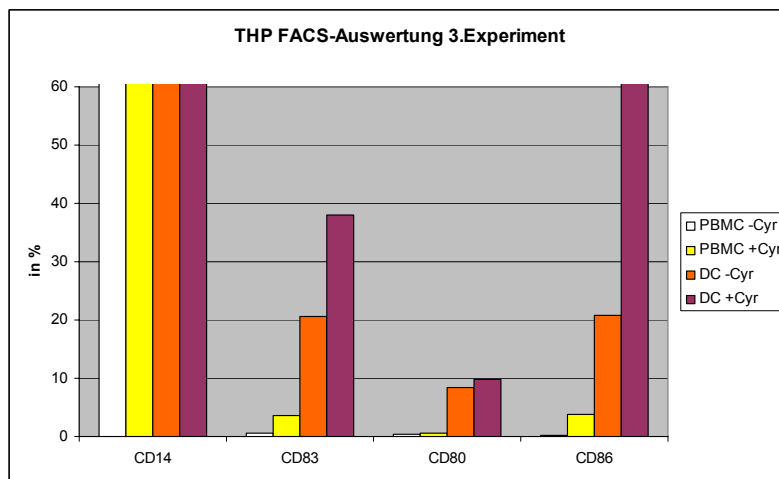


Abb 19a: Vergrößerung von Abb 19

In den Ergebnissen des dritten Experiments kann keine Differenzierung zu dendritischen Zellen stattgefunden haben, denn alle Zellen, unabhängig von der jeweiligen zugefügten Stimulationssubstanz, exprimieren in fast unverändertem Prozentsatz CD14. Aus diesem Grund wurde auf die statistische Auswertung verzichtet.

3.6. Vergleich der Ergebnisse aus real-time-PCR und FACS-Analyse

Die Ergebnisse der CD14⁺ Zellen stimmten in der ersten Versuchsreihe von FACS-Analyse und real-time-PCR überein. Mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Zellen unter Einwirkung von IL4, GM-CSF und hCyr61 nahm die Anzahl der CD14⁺ Zellen ab.

CD86⁺ Zellen zeigten in beiden Versuchsansätzen eine Zunahme bei den differenzierten Zellen, eine weitere Zunahme wurde mit Zugabe von hCyr61 erreicht.

Bei den CD80⁺ Zellen zeigte sich analog zur FACS-Analyse keine wesentliche Veränderung des Expressionsmusters.

Wie bereits unter 3.3.3.1 erwähnt, konnten die beiden weiteren real-time-PCR-Ergebnisse nicht verglichen werden, da die biologische Zellpopulation nicht homogen erschienen.

3.7. Vergleich der semiquantitativen konventionellen PCR mit der FACS-Analyse

Für die semiquantitative Auswertung konnte nur die erkennbare Tendenz als Vergleich hinzugezogen werden.

Im ersten Experiment zeigte sich gegenüber des FACS-Ergebnisses zwar eine Abnahme der Bandenstärke bei den differenzierten, ohne hCyr61 behandelten Zellen, allerdings ist bei den mit hCyr61 behandelten, differenzierten Zellen wiederum eine leicht stärkere Bande zu beobachten. Diese Tatsache widerspricht der in der FACS-Analyse beobachteten kontinuierlichen Abnahme von CD14⁺ Zellen mit Zunahme der Differenzierung. Auch im zweiten und dritten Experiment ließ sich keine Analogie zur FACS-Analyse bilden.

Für CD83 zeigte sich in allen konventionellen PCR-Bildern eine Zunahme der Bandenstärke mit Zunahme der Differenzierung, was mit der FACS-Analyse ebenfalls beobachtet wurde.

Die CD80-Expression ließ in der konventionellen PCR eine Zunahme der Bandenstärke der differenzierten und mit hCyr61 stimulierten Zellen erkennen.

In der FACS-Analyse war keine deutliche Änderung der CD80+ Zellen darstellbar, die differenzierten und mit hCyr61 behandelten Zellen ließen hingegen eine leichte Abnahme erkennen.

CD86+ Zellen zeigten sowohl in der FACS-Analyse, als auch in der konventionellen PCR eine Zunahme der Expression bzw. des Bandenmusters mit zunehmender Differenzierung der Zellen, sodass hier wieder eine Übereinstimmung der Ergebnisse aus beiden Methoden vorliegt.

3.8. Vergleich der CD14-Expression in differenzierten und undifferenzierten THP1-Zellen bei Stimulation mit Cyr als ganzes Molekül

3.8.1. CD14- Expression, konventionelle PCR

In Experiment eins ließ sich gegenüber den undifferenzierten, mit hCyr61 stimulierten Zellen eine leicht Abschwächung der CD14-Bande bei differenzierten, mit hCyr61 stimulierten Zellen feststellen. In den beiden anderen Experimenten ist eher eine Zunahme der Bandendicke unter Zusatz von hCyr61 auf differenzierte Zellen zu sehen.

3.8.2. CD14-Expression, real-time- CR

Im ersten real-time-Experiment zeigte sich eine geringe Änderung der Expression undifferenzierter oder differenzierter Zellen unter Zugabe von hCyr61. (Undifferenziert, + hCyr61: 0,7 copy-ratio; differenziert, +hCyr61 :0,59 copy-ratio)

3.8.3. CD14-Expression, FACS-Analyse

Die Wirkung von hCyr61 auf undifferenzierte Zellen ergab im ersten Experiment 63.4% CD14+ Zellen, bei Zugabe von hCyr61 auf differenzierte Zellen waren noch 3,3% der Zellen CD14+. Im zweiten Experiment waren 43.1% der undifferenzierten Zellen nach hCyr61-Stimulation CD14+ und 6,6% der differenzierten Zellen.

4. Diskussion

4.1. Interaktion von mesenchymalen Zellen mit Immunzellen

Mesenchymale Zellen stehen in enger Interaktion mit dem Immunsystem. Sie sind fähig, über eine veränderte Expression aktivierender Faktoren, durch Beeinflussung antigenspezifischer Proliferation und durch veränderte Produktion von Interleukinen die Immunantwort zu regulieren.

Einerseits kann aus einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren sowohl die osteogene Differenzierung monozytärer Zellen zu Osteoklasten, als auch die Bildung von Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC) erreicht werden. Andererseits können in Gegenwart angiogener Wachstumsfaktoren aus mononukleären Zellen auch Endothel-ähnliche Zellen entstehen (Fernandez Pujol et al. (2000), Schenk et al., 2007, in Veröffentlichung).

4.2. Bekannte Systeme in der Interaktion zwischen Mesenchym und Immunsystem: Interleukine, Interferone und TNF- α , RANKL/RANK/OPG

TNF- α , IFN- γ und verschiedene Interleukine sind bekannte immunmodulierende Signalmoleküle. Im Zusammenspiel von T-Zellen, DCs und mesenchymalen Stammzellen regulieren sie in großem Ausmaß die Immunreaktion.

Als Signaltransduktionssystem fördert die Ligand-Rezeptor-Interaktion von RANK und RANKL die weitere Differenzierung unreifer Osteoklasten, die Aktivierung reifer Osteoklasten und die Aktivierung und Steigerung der Überlebenszeit von DCs. Ebenfalls nimmt es die Schlüsselposition für die Aktivierung der DC-Reifung innerhalb einer Entzündungsreaktion ein. OPG sorgt durch Abfangen / Blockierung der RANKL-Moleküle für eine Hemmung der RANKL-Wirkung und damit der Osteoklastenaktivierung (Kong et al., 2000, Gosh et al., 1999).

4.3. hCyr61 als neues Verbindungsmolekül zwischen Knochen, Endothel und Immunsystem

hCyr61 war in Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Schuetze (Schütze et al., 1998) als ein Vitamin D-responsives Gen identifiziert worden und es konnte gezeigt werden, dass es in Osteoblasten auch durch TNF stimuliert wird. Somit macht es einen großen Bestandteil im Überstand von TNF- α stimulierten hFOB-Zellen aus. Eine mögliche Interaktion dieses Sekretionsproduktes osteoblastärer Zellen mit Zellen des Immunsystems wurde in dieser Arbeit untersucht.

4.4. Methodische Probleme

4.4.1. Diskussion der biologischen Aktivität von rekombinantem hCyr61 (rhCyr61)

Bei der Verwendung von rhCyr aus dem Labor von Dr. N. Schütze wurde von einer über die Zeit stabilen rhCyr-Konzentration ausgegangen. Nach Abschluss der Experimente wurde jedoch bekannt, dass das verwendete rhCyr in Standard-Reaktionsgefäßen einem beträchtlichen und nicht vorhersagbaren Konzentrationsabfall unterliegen kann. Dieser Konzentrationsabfall ist vermutlich durch Proteinpräzipitation bedingt, so dass der Verlust während der Aufbewahrung des rhCyr sehr variabel ist. Eine erneute Durchführung der hier beschriebenen Experimente war aber aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich, sodass eventuell die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse auf Konzentrationsschwankungen des rekombinanten Proteins zurückzuführen sind.

Um keine Vergleiche zwischen inkongruenten Experimenten auszuwerten, wurden die Versuche einzeln ausgewertet und auf eine Statistik verzichtet. Zwar zeigte sich in den verschiedenen Methoden ein durchaus beachtlicher Effekt von hCyr auf die Expression der verschiedenen Marker, doch muss die Konzentrationsabhängigkeit und das Ausmaß des Effekts mit neuen und

standardisierten Proteinpräparationen noch weiter untersucht werden. Es besteht jedoch insgesamt kein Zweifel an der Tatsache, dass die verwendete Präparation von rhCYR61 einen stimulierenden Effekt auf die DC-Populationen besitzt.

4.4.2. Einfluss von Fc-Fragmenten auf DCs

Im Aufreinigungsprozess zur Gewinnung von hCyr sollte das Fc-Fragment vom endgültigen hCyr-Molekül noch mittels Protease geschnitten werden. Dieser Schritt wurde im Labor von Herrn PD Dr. N. Schütze nicht durchgeführt, da in Experimenten mit mesenchymalen Zellen das Fc-Fragment keine Auswirkung auf die Genexpression hatte. Uns stellte sich nun die Frage, ob nicht auch dieses Fc-Fragment einen Einfluss auf die Ausdifferenzierung der untersuchten Zellen haben könnte. Bayry konnte zeigen, dass funktionelle Fc-Rezeptoren auf menschlichen dendritischen Zellen durch Antikörper oder Immunkomplexe inhibiert oder aktiviert werden (J. Bayry et al., 2005). Samsom berichtet, dass für den Fc γ RIIB-Rezeptor defiziente Mäuse keine Mucosa-Toleranz entwickelten. Er konnte die wichtige Rolle dieses Rezeptors für die Modulation der dendritischen Zellen in ihrer Fähigkeit zur Antigen-Präsentation zeigen. In seiner Arbeit wurde von unseren verwendeten Markern nur CD86 erwähnt, der dabei eine vermehrte Expression zeigte (J. Samsom et al., 2005).

Merck untersuchte den als hOSCAR bezeichneten humanen Osteoclast-assoziierten Rezeptor, einen neuen FcR γ -assoziierten Rezeptor, der von myeloischen Zellen exprimiert wird. Sie konnte zeigen, dass aus Blut gewonnene Monocyten und PBMC, die mit hOSCAR in vitro stimuliert wurden, CD 86, 80 und 83 zwar konstant, aber nur leicht verstärkt exprimierten (E. Merck et al., 2005).

In unseren Experimenten bei der Untersuchung der Domänen-Wirkung war auch an den einzelnen Domänen das Fc-Fragment noch vorhanden, es zeigte sich jedoch wiederholt keine Änderung im Expressionsmuster der untersuchten Zellen. Auch sind die CD80-, 83- und CD86-Untersuchungen in allen drei verwendeten Nachweismethoden untereinander stimmig. Des Weiteren konnten

wir in den Vorversuchen mit TNF-stimuliertem Zellkulturüberstand ebenfalls einen Effekt auf die Markerexpression feststellen. Die Spezifität der hier beschriebenen Effekte des mit einem Fc-Tag versehenen rhCYR61 ist zwar höchst wahrscheinlich, vor einer Veröffentlichung dieser Daten muss jedoch ein weiteres Experiment mit dem Fc-Fragment alleine durchgeführt werden. Eine solche Präparation stand im Rahmen dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

4.5. Diskussion der PBMC-Gewinnung

Die Gewinnung der RNA aus PBMC zeigte sich als extrem variabel. Zum einen war die RNA-Ausbeute an sich sehr gering, da physiologischer Weise nur ca. 1-5% der Leukozyten Monozyten sind, zum anderen wurde Blut verschiedener Spender vermischt, sodass sich eine eventuelle Beeinflussung der unterschiedlichen Spender-Monozyten in derselben Probe nicht ausschließen lässt. Letztere Befürchtung erschien uns aber eher vernachlässigbar, nachdem sich auch die RNA-Ausbeute bei nur von einer Spenderperson gewonnenen Monozyten nicht wesentlich erhöhen ließ. Des Weiteren berichtet C. Berges et al., 2005, dass aus Spender-Monocyten kultivierte dendritische Zellen eine breite Variabilität hinsichtlich Phänotyp und Funktionalität aufweisen.

Für unsere als Vorversuche zu wertenden Experimente mit PBMC waren die Ergebnisse trotz dieser Einschränkungen zufriedenstellend.

4.6. Diskussion der Auswertung der konventionelle PCR aus PBMC

Auffallend war, dass mehrfach Amplicons der entweder ohne hCyr für 48h behandelten Zellen oder die derjenigen Zellen, die nur mit hCyr für 7 Tage behandelt wurden, nicht dargestellt werden konnten. Eine Pipettier-Ungenauigkeit konnte ausgeschlossen werden, da auch bei Pipettierung des Experiments durch eine erfahrene MTA die gleichen Banden fehlten. Ein Fehler auf Ebene der cDNA-Herstellung erschien wahrscheinlicher. Die Tatsache, dass in den entsprechenden Proben auch keine Actin-Bande, wohl aber eine EF1 α -Bande auftauchte, kann ein zusätzliches Problem mit der Differenzierung

der monozytären Zellen andeuten, da Actin in monozytären Zellen nach unserer Erfahrung einer ausgeprägten differenzierungsassoziierten Regulation unterliegt. Bei der konventionellen PCR der THP1-Zellen trat dieses Problem nicht auf.

Für beide Zellreihen erwies sich diese semiquantitative Methode als zu ungenau für unsere Zwecke. Da keine eindeutigen Daten erhoben werden konnten, werteten wir die Tendenz der dargestellten Banden und versuchten, mit Real-time-PCR und FACS-Analyse harte Daten zu gewinnen.

4.7. Diskussion der Auswertung der THP-Zellen mit der FACS-Analyse

Eine Schwäche der Experimente mittels FACS-Analyse muss im Nachhinein konzediert werden. Der von uns für die Ermittlung der Negativkontrolle verwendete Antikörper erwies sich im Nachhinein als möglicherweise nicht ausreichend spezifisch. Durch ungewollte intermolekulare Bindungen ergaben sich keine sauber markierten Zellpopulationen, sodass die Negativkontrolle nicht mit der gewünschten Genauigkeit festgelegt werden konnte. Dennoch sind die Ergebnisse der spezifischen Färbungen mit denen der konventionellen und Real-time-PCR übereinstimmend.

4.8. Diskussion der Auswertung von THP-Zellen mit der real-time-PCR

Nachdem sich trotz eindeutiger Schmelzkurvenbestimmung in der real-time-PCR für CD83 wiederholt keine Ergebnisse erzielen ließen, fanden sich nach Abgleichung in der online-Gendatenbank statt der Basen G-G, wie in der Veröffentlichung von Zhou et al., 1995 angegeben, C-C. Allerdings erhielten wir auch nach Verwendung des korrigierten Primers keine verwertbaren Real-time-PCR-Produkte. Weder eine veränderte Primergröße, noch unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen oder veränderte Schmelztemperaturen führten zu brauchbaren Ergebnissen.

Müller-Berghaus wies nach, dass sich in in vitro mit IL4 und GM-CSF generierten dendritischen Zellen nur geringe Mengen an CD80 und CD86

nachweisen lassen und CD83 überhaupt nicht exprimiert wird (Müller-Berghaus et al., 2005). C. Berges et al., 2005 berichtet ebenfalls, dass sich bei aus THP-1 generierten unreifen Dendritischen Zellen kein CD83 nachweisen lässt.

Fernandez Pujol et al., 2000 berichtete, dass aus CD14-positiven mononukleären Zellen in Gegenwart von angiogenen Wachstumsfaktoren endothelähnliche Zellen entstehen, die kein CD83, sondern nur noch CD80 und CD86 exprimieren. Ein möglicher Erklärungsversuch für den nicht gelungenen Nachweis von CD83 ist, dass sich durch die schwankenden hCyr-Konzentrationen eine unreife Zellpopulation bildet, die sich in einem intermediären Differenzierungsstadium befindet.

4.9. Effekt von hCyr61 auf PBMC und THP-Zellen

Der Verlust typischer monozytärer Marker wie CD14 scheint unter Stimulation mit hCyr61 sicher. Gegenüber den THP-Zellen ist der Verlust an CD14 bei PBMC deutlicher, was durch die Erkenntnis erklärt wird, dass hCyr61 monozytäre Zellen möglicherweise in die endotheliale Richtung differenziert (Fernandez Pujol et al., 2000, Schenk et al., in Veröffentlichung). Auch in den letzteren laborinternen, noch nicht veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich THP1-Zellen schon in einer höheren Differenzierungsstufe befinden und damit ihr monozytäres Commitment nicht mehr verlieren.

Trotz der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse durch die schwankende hCyr-Konzentration zeigte die semiquantitative und quantitative PCR Übereinstimmung mit der Proteinexpression.

Aufgrund der mittlerweile verfügbaren Daten über die Wirkung von hCyr61 auf monozytäre Zellen im Sinne der Differenzierung in Richtung endothelialer Vorläuferzellen (EPC) muß man retrospektiv festhalten, dass diese zum damaligen Zeitpunkt völlig unerwartete Wirkung das experimentelle Design der hier beschriebenen Experimente teilweise relativiert. hCyr61 ist offenbar aktiv bei der Differenzierungsinduktion von EPC aus PBMC und bei der Reifung von DC. Die Frage der Transdifferenzierung von DC zu Osteoklasten muss weiter erforscht werden.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass Sekretionsprodukte mesenchymaler Zellen die Differenzierung von DC beeinflussen. Dies konnte durch die Verwendung von Zellkulturüberstand aus fetalen Osteoblasten nach TNF-Stimulation gezeigt werden. Ein Kandidatenmolekül für diesen Effekt ist das unter TNF-Stimulation von Osteoblasten sezernierte CYR61/CCN1. Obwohl in der hier vorgelegten Arbeit einige letztlich beweisende Kontrollexperimente noch nicht durchgeführt werden konnten und eine mit einem Fc-Tag versehene rekombinante Präparation des hCYR61-Moleküls verwendet werden musste, erscheint ein Effekt von hCYR61 auf die Dendritischen Zellen robust nachgewiesen. Der mittlerweile nachgewiesene, überraschend deutliche Effekt von hCYR61 auf die Differenzierung von endothelialen Vorläufern aus monozytären Zellen hat die hier gezeigten Experimente zusätzlich in Durchführung und Interpretation erschwert. Es zeigt sich aber insgesamt ein sehr ausgeprägter Effekt von Sekretionsprodukten mesenchymaler Zellen bzw. Osteoblasten-Vorläufern auf angiogene Prozesse und Modulation von Immunreaktionen. Dies zeigt erneut, dass Knochenzellen wichtige Interaktionspartner für verschiedene Reaktionen anderer Zellsysteme darstellen, sie stehen offenbar im Zentrum bedeutender Interaktion zwischen Osteogenese, Hämatopoese und Immunreaktion. Weitere Experimente müssen zeigen, welche biologische Bedeutung dieser Reaktion in Physiologie und Pathologie unterliegt.

6. Literaturverzeichnis

Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H., Gudmundsson, G.H. (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations

Blood, Vol 96, No.9:3086-93

Aggarwal, S., Pittenger, M. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses

Blood. 2005;105:1815-1822

Ainbinder, E., Revach, M., Wolstein, O., Moshonov, S., Diamant, N., Dikstein, R. (2002) Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor alpha-responsive genes by NF- κ B

Molecular and cellular Biology, 22, No.18:6354-62

Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., Galibert, L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-Cell growth and dendritic-cell function

Nature 390(6656):175-9

Babic, A.M., Kireeva, M.L., Kolesnikova, T.V., Lau, L.F. (1998) CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6355-6360

Berges, C., Naujokat, C., Tinapp, S., Wieczorek, H., Höh, A., Sadeghi, M., Opelz, G., Daniel, V. (2005) A cell line model for the differentiation of human dendritic cells

Biochemical and Biophysical Research Communications 333(2005) 896-907

Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., Rachmilewitz, J. (2005) Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness
Blood.2005;105:2214-2219

Biragyn, A., Ruffini, P.A., Leifer, C.A., Klyushnenkova, E., Shakov, A., Chertov, O., Shirakawa, A.K., Farber, J.M., Segal, D.M., Oppenheim, J.J., Kwak, L.W. (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2
Science 298 (5595):1025-9

Brigstock, D.R. (2003) The CCN family: a new stimulus package
J. of Endocrinology 178, 169-175

Burgess, T.L., Quian, Y., Kaufmann, S., Ring, B.D., Van, G., Capparelli, C., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W.J., Dunstan, C.r., Hu, S., Lacey, D.L. (1999) The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts
J. Cell Biol., Vol. 145, No. 3, 527-538

Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L.A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., Lo, D. (1995) Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells
Nature 373(6514):531-6

Collin-Osdoby, P., Rothe, L., Anderson, F., Nelson, M., Maloney, W., Osdoby, P. (2001) Receptor activator of NF-kappaBeta and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis
J Biol Chem 276(23):20659-20672

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Riso, M., Gualandi, F., Mancardi, G., Pistoia, V., Uccelli, A. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions

Blood.2006;107:367-372

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli

Blood.2002;99:3838-3843

Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D., Jorgensen, C. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favours tumor growth in allogeneic animals

Blood.2003;102:3837-3844

Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J., Schuth, J. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development.

Genes Dev 13(18):2412-24

Fabris, M., Di Poi, E., D'Elia, A., Damante, G., Sinigaglia, L., Ferraccioli, G. (2002) Tumor necrosis factor- α gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis

J of Rheumatology 29(1):29-33

Fellermann, K., Stange, E.F. (2001) Defensins-innate immunity at the epithelial frontier

European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 13:771-776

Flores-Romo, L. (2001) In vivo maturation and migration of dendritic cells

Immunology 102(3):255-62

Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poljak, L., Shores, E.W., Brown, K.D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B.F., Siebenlist, U. (1997) Requirement for NF-kappaB in osteoclasts and B-cell development

Genes Dev 11(24):3482-96

Giulietti, A., Overbergh, I., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001) An overview of Real-Time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression

Methods 25, 386-401

Gosh, S. (1999) Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB

Immunol Res 19(2-3):183-9

Grande, A., Montanari, M., Tagliafico, E., Manfredini, R., Zanocco Marani, T., Siena, M., Tenedini, e., Gallinelli, A., Ferrari, S. (2002) Physiological levels of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors

J. of Leucocyte Biology 71, 641-651

Groh, M., Maitra, B., Szekely, E., Koc, O. (2005) Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells

Experimental Hematology 33 (2005) 928-934

Grotendorst, G.R., Lau, L.F., Perbal, B. (2000) CCN proteins are distinct from and should not be considered members of the insulin-like growth factor-binding protein superfamily

Endocrinology Vol.141 No. 6 2254-2256

Halder, T.M., Blüggel, M., Heinzl, S., Pawelec, G., Meyer, H.E., Kalbacher, H. (2000) Defensins are dominant HLA-DR-associated self-peptides from CD34-

peripheral blood mononuclear cells of different tumor patients (plasmacytoma, chronic myeloid leukemia)

Blood, Vol 95, No. 9:2890-96

Horowitz, M.C., Xi, Y., Wilson, K., Kacena, M.A. (2001) Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands

Cytokine Growth Factor Rev 12(1):9-18

Iezzi, G., Boni, A., Degli'Innocenti, E., Grioni, M., Bertilaccio, M., Bellone, M. (2006) Type 2 cytotoxic T lymphocytes modulate the activity of dendritic cells towards type 2 immune responses

Journal of Immunology, 2006, 177:2131-2137

Jakob, F. (1999) 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ : Das Vitamin D-Hormon

Der Internist 40; 414-430, Springer-Verlag

Jiang, X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S., Wu, Y., Yu, X., Mao, N. (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells

Blood Vol 105, No. 10: 4120-4126

Kaisho, T., Akira, S. (2002) Toll-like receptors as adjuvant receptors

Biochimica et Biophysica Acta 1589 1-13

Kakuri, I.M. Omari, Dorovini-Zis, K. (2001) Expression and function of the costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in an in vitro model of the human blood-brain barrier

J. of Neuroimmunologie 113: 129-141

Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi,

E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2006) Role for Interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells
Stem Cells 2006;24:386-398

Kong, Y.Y., Boyle, W.J., Penninger, J.M. (2000) Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology
Immunol Today 21(10):495-502

Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tarufi, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E.R., Van, G., Ngyen, L.T., Ohashi, P.S., Lacey, D.L., Fish, E., Boyle, W.J., Penniger J.M. (1999) Activated T-cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis trough osteoprotegerin ligand
Nature 402(6759):304-9

Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.j., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.L., Penniger, J.M. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis
Nature 397(6717):315-23

Latinkic, B.V., Mo, F., Greenspan, J.A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Ross, S.R., Lau, L.F. (2001) Promoter function of the angiogenic inducer *cyr61* in transgenic mice: tissue specificity, inducible during wound healing, and role of the serum response element
Endocrinology, 142, No. 6, 2549-2557

Lechner, A., Schütze, N., Siggelkow, H., Seufert, J., Jakob, F. (2000) The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts
Bone, Vol 27, issue 1, 53-60

Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufmann, S., Juan, S.C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J. (2000) RANKL is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism

Proc Natl Acad Sci USA 97(4):1566-1571

Lienau, J., Schell, H., Epari, D. R., Schütze, N., Jakob, F., Duda, G. N., Bail, H. J. (2006) CYR61 (CCN1) Protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability

J Orthop Res 24:254-262, 2006

Maccario, R., Podestà, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., Daud, L., Ibatucci, A., Piaggio, G., Pozzi, S., Frassoni, F., Locatelli, F. (2005) Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype.

Haematologica. 2005;90:516-25.

McClain, K.L. Langerhans cell histiocytosis ; www.utdol.com

Merck, E., De Saint-Vis, B., Scuiller, M., Gaillard, C., Caux, C., Trinchieri, G., Bates, E. (2005) Fc receptor γ -chain activation via hOSCAR induces survival and maturation of dendritic cells and modulates Toll-like receptor responses

Blood. 2005;105:3623-3632

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., Dilloo, D. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation

Blood. 2004;103:4619-4621

Muller-Berghaus, J., Olson, W., Moulton, R., Knapp, W. Schadendorf, D., Storkus, W.(2005) Il-12 production by human monocyte-derived dendritic cells
J Immunother 2005;28:306-313

Nakano, K., Okada, Y., Saito, K., Tanaka, Y. (2004) Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the Binding of Fibroblast Growth Factor 2 to Heparan Sulfate Proteoglycan on Rheumatoid Synovial Fibroblasts
Arthritis and Rheumatism Vol. 50, No. 8, August 2004, pp 2450–2458

O'Brien, T.P., Lau, L.F. (1992) Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development.
Cell Growth Differ. Sep;3(9):645-654

O'Brien, T.P., Yang, G.P., Sanders, L. et al. (1990) Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene.
Mol Cell Biol 10:3569-3577

Provenzano, M., Rossi, C.R., Mocellin, S. (2001) The usefulness of quantitative Real-Time PCR in immunogenetics
ASHI Quarterly, 3/2001

Quinn, J.M.W., Neale, S., Fujikawa, Y., McGee, J.O.D. (1999) Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells
Calcif Tissue Int; 62 (6):527-31

Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinmann, R.M., Muller, W.A. (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking
Science, 282(5388):480-483

Rivollier, A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdi-Combe C, Jurdic P, Servet-Delprat C. (2004) Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment

Blood, Vol. 104, No. 13, pp 4029-4037

Sansom, J., Van Berkel, L., Van Helvoort, J., Unger, W., Jansen, W., Thepen, T., Mebius, R., Verbeek, S., Kraal, G. (2005) FcγRIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells

J Immunol 2005, 174:5279-5287

Saito, M., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Suzuki, K., Sekino, T., Mimori, K., Suzuki, T., Nakajima, H., Katagiri, Y.U., Fujimura, J., Fujita, H., Ishimoto, K., Yamashiro, Y., Fujimoto, J. (2002) Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion

Experimental Hematology 30:1115-1123

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W.J., et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density

Cell 89(2):309-19

Schuetze, N., Lechner, A., Groll, C., Siggelkow, H., Hübner, M., Köhrle, J., Jakob, F. (1998) The human analog of murine cystein rich protein 16 is a 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum

Endocrinology Vol. 139, No.4 1761-1770

Schuetze, N., Kunzi-Rapp, K., Wagemanns, R., Noth, U., Jatzke, S., Jakob, F. (2005) Expression, Purifikation and functional testing of recombinant CYR61/CCN1

Protein Expr Puri 2005 Jul;42(1):219-25

Schuetze, N., Rücker, N., Müller, J., Adamski, J., Jakob, F. (2001) 5' flanking sequence of the human immediate early responsive gene ccn1 (cyr61) and mapping of polymorphic CA repeat sequence motifs in the human ccn1 (cyr61) locus

J Clin Pathol: Mol Pathol 2001; 54:170-175

Thomas, R., Arend, W.P. (2004) Cells involved in autoimmune diseases and inflammation, chap. 7 antigen-presenting cells

<http://www.intl.elsevierhealth.com/e-books/pdf/1101.pdf>

Turner, B., Röder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kämpgen, E., Bender, A., Schuler, G. (1999) Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application

J Immunol Methods 223(1999): 1-15

Wong, B.R., Josien, R., Choi, R. (1999) TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function.

J Leucoc Biol 65:715-724

Yu, X., Huang, Y., Collin-Osdoby, P., Osdoby, P. (2004) CCR1 Chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and the motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts

J Bone Miner Res 19(12):2065-77

Yun, T.J., Chaudhary, P.M., Shu, G.L., Frazer, J.K., Ewings, M.K., Schwartz, S.M., Pascual, V., Hood, L.E., Clark, E.A. (1998) OPG/FDCR-1, a TNF receptor

family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40

J Immunol 161(11):6113-21

Yun, T.J., Tallquist, M.D., Aicher, A., Rafferty, K.L., Marshall, A.J., Moon, J.J., Ewings, M.K., Mohaupt, M., Herring, S.W., Clark, E.A. (2001) Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function

J Immunol. 2001 Feb 1;166(3):1482-91

Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., Zhao, R. (2004) Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells

Stem cells and development 13:263-271 (2004)

Zhou, L.J., Tedder, T.F. (1995) A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells

Blood, Vol. 86, No. 9, pp 3295-3301

Abkürzungen

Aqua dest.	Aqua destillata
BMSC	bone marrow derived stem cells
CD	Cluster of Differentiation
hCyr61	Humanes cysteinreiches Protein 61
CTGF	connectiv tissue growth factor
cDNA	complementary DNA
DC	Dendritische Zellen
EF1 α	eukariotic translation elongation factor 1alpha
FCS	fetales Kälberserum
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc-Fragment	fragment crystalline
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FAK	focal adhesion kinase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-colony-stimulating-factor
HSPG	heparan sulfate proteoglycan
hFOB	humane fetale Osteoblasten
hOSCAR	humane Osteoclast-assoziierten Rezeptor
IGF	insulin-like growth factor
IFN- γ	Interferon gamma
IL-4	Interleukin 4
IL-12	Interleukin 12
kb	kilobase
kDa	Kilo Dalton
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MHC	maior histocompatibility complex
MAPK	mitogen- activated kinase
NF κ B	nuclear transcription factor NF-kappa B
NK-Zellen	Natural Killer-Zellen
NOV	nephroblastoma overexpressed
OPG	Osteoprotegerin

PE	Phycoerythrin
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	ligand of receptor activator of nuclear factor kappa B
RT-PCR	reverse transcription PCR
rhCyr61	rekombinantes hCyr61
rpm	rounds per minute
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRANCE	TNF-related activation- induced cytokine
TGF β	transforming growth factor β
THP-1	humane Myelomonocytozellen
Wisp	wnt-induced secreted proteins
WM	weightmarker

Danksagung

Herrn Prof.. Dr. med. F. Jakob gilt mein Dank für die Überlassung der Dissertation. Seine kritische und freundliche Begleitung der Arbeit war stets eine Motivation.

Frau Dr. rer. nat. R. Ebert, möchte ich herzlich für die Betreuung der Arbeit danken, insbesondere für fruchtbare Diskussionen und kompetente Unterstützung zu jedem Zeitpunkt.

Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Tony danke ich für die fachliche Unterstützung sowie für die Übernahme des Koreferats.

Herrn PD Dr. rer. nat. N. Schütze und seiner Arbeitsgruppe der Orthopädischen Klinik der Universität Würzburg sei für die Bereitstellung des rekombinaten hCyr61 gedankt.

Den MTAs Frau Doris Schneider, Frau Jutta Meißner-Weigl, Frau Sabine Zeck und PTA Frau Martina Regensburger danke ich herzlichst für die geduldige Anleitung in den diversen Labortechniken, die zuverlässigen Hilfestellungen und ganz besonders für die freundschaftliche Aufnahme in ihrem Team.

Den MTAs der Medizinischen Klinik II der Universität Würzburg danke ich für die kompetente Durchführung der FACS-Analysen.

Christian danke ich für seine Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihren uneingeschränkten Rückhalt. Ohne ihre Unterstützung wäre vieles in meinem bisherigen Lebenslauf nicht möglich gewesen.

Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Constanze Matthes

geb. am 10.06.1977 in Ulm

Beruflicher Werdegang:

seit 2007 Assistenzärztin der Allgemein- und Viszeralchirurgie,
St. Theresien- Krankenhaus, Nürnberg

2006 Assistenzärztin der Allgemein- und Unfallchirurgie, Spital
Linth, Uznach, Schweiz

Studium:

11/2005 Drittes Staatsexamen und Approbation als Ärztin

2004/2005 Praktisches Jahr
Chirurgie (Ospedale Italiano, Lugano, Schweiz),
Gynäkologie (Kantonales Frauenspital Fontana, Chur,
Schweiz), Innere Medizin (Kantonsspital Luzern, Schweiz)

8/2004 Zweites Staatsexamen

3/2002 Erstes Staatsexamen

3/2001 Physikum

1999-2005 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg

1998/1999 Studium der Humanmedizin an der Università di Parma,
Italien

1/1998-6/1998 Pflegehelferin im Rehabilitationskrankenhaus Ulm,
Abteilung Neurologie

1997 Studium der Pharmazie an der Universität Würzburg

1996/1997 Sprachaufenthalt in Florenz, Italien

Schulbildung:

1987-1996 Humboldt-Gymnasium Ulm

1996 Allgemeine Hochschulreife

1983-1987 Schönenberg-Grundschule Ulm