

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Orthopädie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Heiko Reichel

**Untersuchungen zur VEGF und PlGF induzierten
Chemotaxis multipotenter Stromazellen des
Knochenmarks**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Frank Martin Leucht
Ehingen

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

Tag der Promotion: 20. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	VASKULÄRE ENDOTHELIALE WACHSTUMSFAKTOREN	2
1.1.1.	VEGF-A	4
1.1.2.	VEGF-B	5
1.1.3.	VEGF-C und -D.....	5
1.1.4.	VEGF-E	6
1.1.5.	PIGF	6
1.2.	REZEPTOREN	8
1.3.	GENREGULATION.....	9
1.4.	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	10
2.	MATERIAL UND METHODIK.....	11
2.1.	MATERIAL	11
2.1.1.	Humane multipotente Stromazellen.....	11
2.1.2.	Gebrauchsartikel, Reagenzien und Kits	12
2.1.3.	Geräte	14
2.1.4.	Zusammensetzung und Herstellung von Lösungen und Medien.....	15
2.2.	METHODEN.....	16
2.2.1.	Präparation der humanen multipotenten Stromazellen.....	16
2.2.2.	Zellkultur humaner multipotenter Stromazellen.....	17
2.2.3.	Osteogene Differenzierung humaner multipotenter Stromazellen	19
2.2.4.	Magnetic Adsorbant Cell Separation	20
2.2.5.	Immunhistochemische Färbungen.....	22
2.2.6.	Chemotaxis	25
2.1.6.1.	Versuchsablauf eines Chemotaxisansatzes.....	27
2.1.6.2.	Reinigung der Chemotaxiskammer	29
2.1.7.	Molekularbiologische Analysen	30
2.1.7.1.	RNA-Isolierung mit DNase-Verdau	32

2.1.7.2.	Reverse Transkription mit Omniscript RT	33
2.1.7.3.	PCR mit HotStarTaq Master Mix	35
2.1.8.	<i>Quantitative PCR mit TaqMan</i>	36
3.	STATISTIK.....	38
3.	ERGEBNISSE.....	39
3.1.	ZELLTYPISIERUNG UND ZELLCHARAKTERISIERUNG	39
3.1.1.	<i>Humane multipotente Stromazellen</i>	39
3.2.	CHEMOTAXIS	43
3.2.1.	<i>Chemotaxis bei VEGF-A stimulierten MSZ</i>	43
3.2.2.	<i>Chemotaxis bei PlGF-1 stimulierten MSZ</i>	45
3.2.3.	<i>Chemotaxis bei VEGF-A stimulierten CD34 positiven Zellen</i>	46
3.2.4.	<i>Chemotaxis bei VEGF-A stimulierten osteogen differenzierten humanen multipotenten Stromazellen</i>	47
3.3.	VEGF REZEPTOREXPRESSION BEI MSZ UND DOB	48
3.3.1.	<i>Analysen der VEGF-Rezeptor Expression</i>	48
3.3.2.	<i>Immunhistologische Färbung mit VEGF-R1/FLT-1</i>	49
3.3.3.	<i>Quantitative PCR mittels “real time PCR” TaqMan</i>	49
4.	DISKUSSION	51
4.1.	CHEMOTAXIS UND ZELLSEPARATION	51
4.2.	GENEXPRESSIONSANALYSE	54
5.	ZUSAMMENFASSUNG	57
6.	LITERATURVERZEICHNIS	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius, Temperaturskala
µg	10^{-6} g
µl	10^{-6} l
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
CD	Cluster of differentiation
CI	Chemotaktischer Index
c-DNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Destillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP-Mix	Desoxyribonukleosidtriphosphat Mix
dOB	in vitro aus MSZ differenzierte Osteoblasten
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	Fetales Kälberserum
FLT	Fetal liver kinase
g	Gramm, Masse von 1 cm^3 Wasser bei 4°C
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphatsdehydrogenase
KDR	Kinase domain region
kg	10^3 g
l	Liter, Volumen von 1 kg Wasser bei 4°C
MACS	Magnetic adsorbant cell separation
ml	10^{-3} l
MSZ	Multipotente Stromazellen
NK	Negativkontrolle
NP	Neuropilin
OB	Osteoblast
OC	Osteokalzin
PCR	Polymerase chain reaction

PDGF	Platelet derived growth factor
PDGF	Plateletderived growth factor
PK	Positivkontrolle
PIGF	Placenta growth factor
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SD	Standard Deviation
SaOS	Osteosarkomzellreihe
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R1 –R2 und –R3	Rezeptoren für VEGF
VPF	Vascular Permeability Factor

Die Abkürzungen der Puffer RW1, RPE, RLT und RT aus dem Extraktionskit „RNeasy“ der Firma Qiagen, Hilden, stammen vom Hersteller. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt.

1. EINLEITUNG

Das Gefäßsystem setzt sich aus zwei unterschiedlichen Systemen zusammen: Den Blut- und den Lymphgefäßen. Dabei dient der Blutkreislauf der Versorgung der Zellen, Gewebe und Organe des Körpers mit Nährstoffen, Sauerstoff, Botenstoffen u. a. sowie dem Abtransport von Stoffwechselprodukten. Das Lymphgefäßsystem dient der Drainage überflüssiger interstitieller Flüssigkeit und übernimmt durch die Zwischenschaltung von Lymphknoten immunologische Aufgaben. Blutgefäße umfassen Arterien, Venen und Kapillaren. Aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Anforderungen weisen sie entsprechend angepasste Wandveränderungen auf. Allen gemeinsam ist die Auskleidung des Gefäßlumens mit einschichtigem Endothel.

Das Wachstum neuer Blutgefäße aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem wird als Angiogenese bezeichnet und kommt durch Ausstülpung und Verzweigung von bereits vorhandenen Gefäßen zustande. Im Gegensatz hierzu steht die Vaskulogenese, welche die Gefäßneubildung aus endothelialen Vorläuferzellen beschreibt und die hauptsächlich während der Embryonalentwicklung abläuft. Im gesunden adulten Organismus befinden sich die Gefäße größtenteils in einem Ruhezustand, in dem kaum Angiogenese stattfindet. Nur während der Wundheilung und in den weiblichen Reproduktionsorganen (Ovarien, Uterus und Plazenta) findet eine zeitlich begrenzte Kapillarneubildung statt [Reynolds et al., 1992]. Außerdem ist die Angiogenese an einer Reihe pathologischer Situationen beteiligt, z. B. diabetischer Retinopathie, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Tumorwachstum [Carmeliet, 2003].

Die Angiogenese und Vaskulogenese sind von zentraler Bedeutung für das Tissue Engineering und den Einsatz großer Stücke synthetischer Bioersatzmaterialien in der rekonstruktiven Medizin. Um ein Einwachsen und Überleben von Zellen in ein 3-dimensionales Ersatzmaterial zu ermöglichen, muss das Konstrukt mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und ein Abtransport von Abbauprodukten gewährleistet werden.

Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der durch pro- und anti-angiogenen Faktoren einer sehr strengen Regulation unterliegt [Folkman and Klagsbrun, 1987]. Essentiell für die Aktivierung der Endothelzellen und Rekrutierung weiterer für den Umbau benötigter Zellen ist der vaskulären Endothelzellwachstumsfaktor (VEGF) siehe

Abbildung 1 am Beispiel von Tumorwachstum. Im Folgenden werden die einzelnen Formen des VEGF im Detail beschrieben.

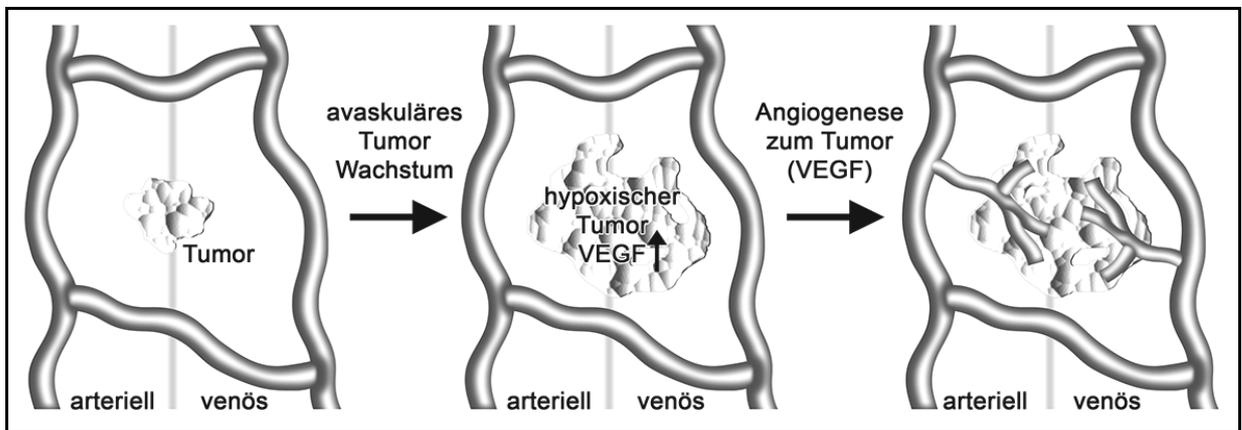


Abb. 1: Schematische Darstellung der Angiogenese. (VEGF Vascular Endothelial Growth Factor)

1.1. Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren

Verschiedene Wachstumsfaktoren sind für die Gefäßentwicklung sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen von Bedeutung.

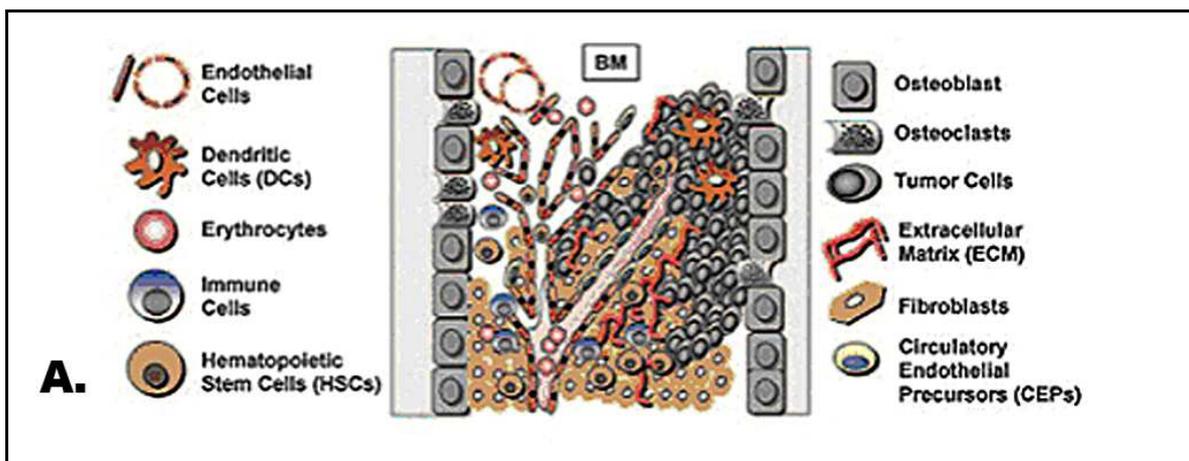
Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (engl.: **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor, VEGF) ist ein angiogener Faktor, stimuliert die Teilung von Endothelzellen und induziert das Einsprossen neuer Gefäße in das Gewebe.

VEGF wurde erstmals in den 80igern von zwei unterschiedlichen Forschungsgruppen entdeckt. Nach der Erstbeschreibung durch Senger et al., 1983, der das Protein aus konditioniertem Medium einer Meerschweichtumor-Zelllinie isolierte, bezeichnete man VEGF, aufgrund seiner Eigenschaft eine Gefäßleckage auf der Haut auszulösen, zunächst als **V**ascular **P**ermeability **F**actor (VPF) [Senger et al., 1983]. Sechs Jahre später entdeckte Ferrara et al., 1989, ein Protein, welches eine bedeutsame Rolle in der Angiogenese spielt. Er bezeichnete es als VEGF, um die hohe Effektorzellspezifität darzustellen [Ferrara, 1989]. Mittels molekularbiologische Analysen von VEGF [Leung et al., 1989] und VPF [Keck et al., 1989] konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den „zwei“ Proteinen um ein und dasselbe Protein handelt und das vom gleichen Gen kodiert wird.

Da VEGF primär in Zusammenspiel mit endothelialen Zellen beschrieben war, wurde die These aufgestellt, VEGF könnte eine bedeutende Rolle sowohl für physiologische als auch für pathologische Gefäßprozesse spielen. Aufgrund dieser Ereignisse ist das Protein nicht nur unter der Bezeichnung VEGF sondern auch als VEGF/VPF oder als VPF bekannt.

Strukturell gehört VEGF mit PDGF (**Platelet**derived **Growth Factor**) zur VEGF-PDGF-Superfamilie. Bei VEGF handelt es sich um ein homodimerisches Glykoprotein mit 45 kDa [Ferrara, 1989]. Es sind sechs strukturverwandte Formen von VEGF bekannt: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und Placenta Growth Factor (PlGF). Durch alternatives Splicen ergeben sich sowohl weitere VEGF Subtypen (siehe Abbildung 3, Seite 5) als auch unterschiedliche PlGF Isoformen: PlGF-1 (PlGF₁₃₁), PlGF-2 (PlGF₁₅₂), PlGF-3 (PlGF₂₀₃) und PlGF-4 (PlGF₂₂₄) [Maglione et al., 1993], [Cao et al., 1997] und [Yang et al., 2003].

Zusammenfassend spielen die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren nicht nur während der physiologischen Angiogenese sondern auch in pathologischen Prozessen und bei Änderungen der Gefäßpermeabilität eine zentrale Rolle (Abbildung 2).



Fortsetzung von Abbildung 2 siehe Seite 4.

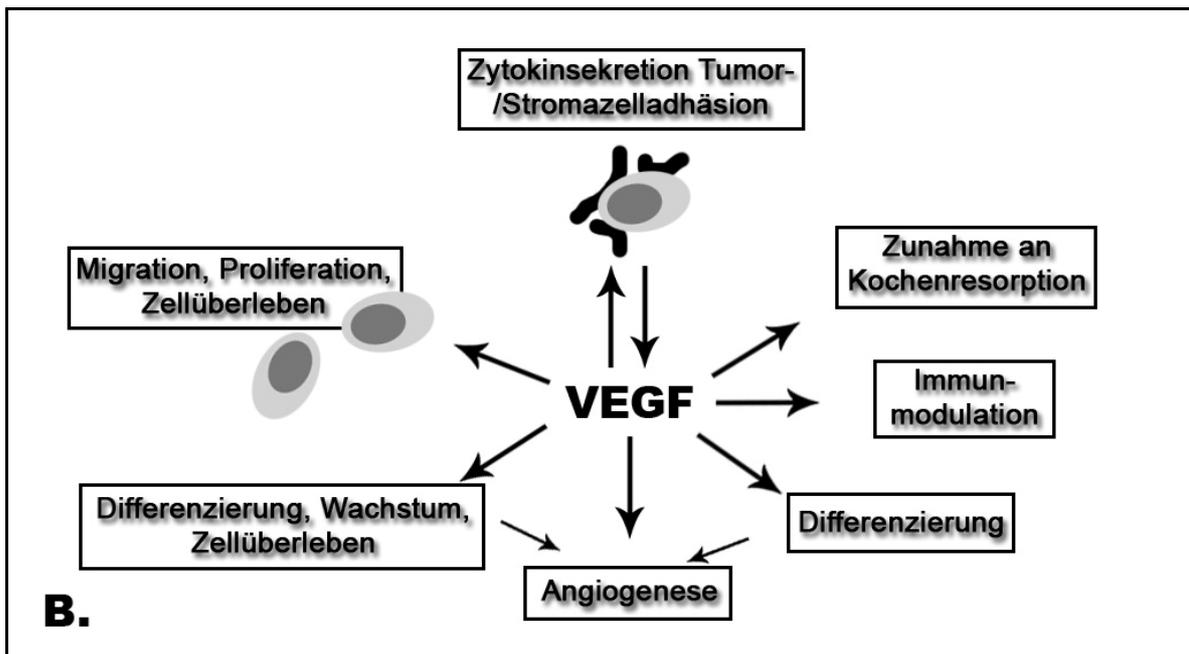


Abb. 2: A. Allgemeine Zellmatrix [Podar et al., 2005] (siehe Seite 3).

B. Physiologische Funktionen von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

1.1.1. VEGF-A

Insgesamt besitzt VEGF-A neun unterschiedliche Isoformen, die durch alternatives Splicen eines Gens entstehen. Darunter ist VEGF-A₁₆₅ in vielen Geweben, neben VEGF-A₁₂₁ und VEGF-A₁₈₉, die dominierende „Splice Variante“ (siehe Abbildung 3) [Houck et al., 1991] und [Leung et al., 1998].

Für VEGF-A₁₆₅ ist zudem bei *in vitro* Studien die höchste biologische Aktivität nachgewiesen worden [Petrova et al., 1999]. VEGF-A wird von vielen Zelltypen exprimiert. Die Genexpression ist bei endothelialen Zellen, Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten belegt [Ferrara et al., 1997] und [Freeman et al., 1995]. Im Gegensatz dazu wurde VEGF-A₂₀₆ bislang ausschließlich aus cDNA menschlicher Leberzellen isoliert [Houck et al., 1991].

Was die Rezeptorspezifität angeht, besitzt VEGF-A₁₆₅ die Möglichkeit an Neuropilin-1 (NP-1) [Soker et al., 1998] und Neuropilin-2 (NP-2) zu binden. Für VEGF-A₁₄₅ ist ausschließlich eine selektive Interaktion mit NP-2 dokumentiert [Gluzman-Poltorak et al., 2000].

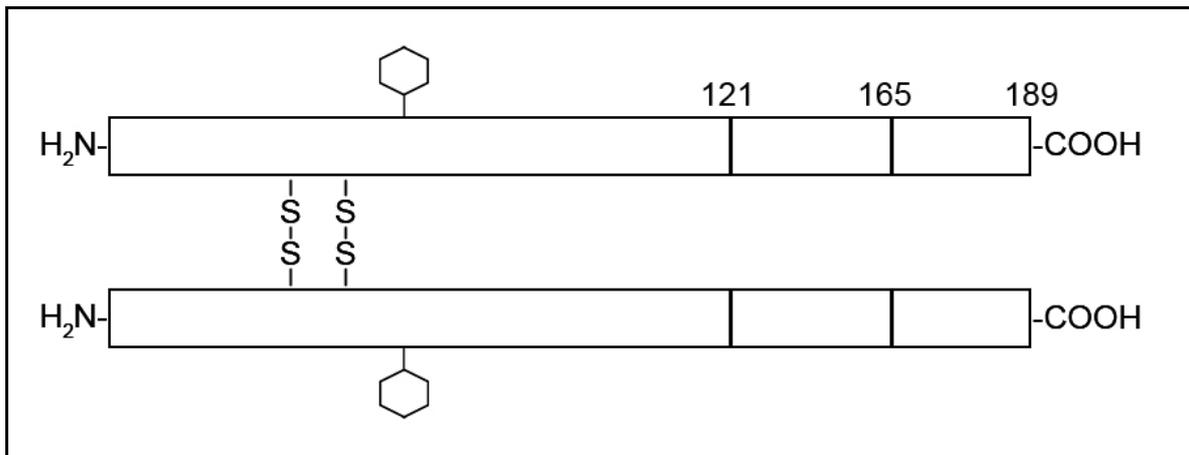


Abb. 3: Schema des dimeren VEGF-Peptids. Es besteht aus zwei über Disulfidbrücken verknüpften Peptidketten. Die Rechtecke zeigen die unterschiedlich langen Aminosäureketten der Splicevarianten. Die Sechsecke zeigen die Glykosylierungsstellen.

1.1.2. VEGF-B

Bei VEGF-B sind momentan zwei Isoformen beschrieben: VEGF-B₁₆₇ und -B₁₈₆. Olofsson et al., 1999, zeigte, dass beide Isoformen an VEGF-R1 und NP-1 binden und diese Rezeptoren aktivieren können. Die Proteine können in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe nachgewiesen werden. Die höchsten Expressionsraten von VEGF-B hat man im Herz und der Skelettmuskulatur bestimmt. [Olofsson et al., 1999].

Ein Teil der Funktionen von VEGF-B wurde kürzlich in zwei Studien an Mäusen aufgedeckt. Versuche mit VEGF-B Knockout-Mäusen demonstrierten die Rolle von VEGF-B hinsichtlich pathologischer Gefäßprozesse bei entzündlicher Arthritis [Mould et al., 2003] und dem Ischämieschutz des Gehirns [Sun et al., 2004].

1.1.3. VEGF-C und -D

Sowohl VEGF-C als auch -D binden und aktivieren VEGF-R2 und -R3. Eine Interaktion mit NP-2 ist nur für VEGF-C beschrieben [Lohela et al., 2003].

Erkenntnisse über die Funktionen von VEGF-C und -D wurden aus Experimenten mit Mäusen gewonnen. Eine Überexpression von VEGF-C führt bei Mäusen zu hyperplastischen Lymphgefäßverbänden [Jeltsch et al., 1997]. Eine neuere Studie belegt dies durch Versuche mit VEGF-C Knockout-Mäusen. Hier konnte nachgewiesen werden, dass VEGF-C für die Entwicklung von Lymphgefäßen benötigt wird [Karkkainen et al., 2004].

Über die Funktionen von VEGF-D ist weit weniger bekannt. Stacker et al. beschrieb 2001 die Induktion einer Lymphgefäßbildung und eine erhöhte Metastasierungsrate bei Tumoren [Stacker et al, 2001].

1.1.4. VEGF-E

Im Parapoxvirus Orf-Virus Genom wurden Proteine entdeckt, die eine VEGF-A ähnliche Aktivität aufweisen [Lyttle et al., 1994]. Diese Proteine sind unter dem Sammelbegriff VEGF-E bekannt. Je nachdem von welchem Orf Virusstamm sie isoliert wurden, besitzen diese VEGF Homologe unterschiedliche Namen. So leitet sich VEGF-E_{NZ-2} z.B. vom Orf-Virusstamm NZ-2 ab. Aktuell sind fünf unterschiedliche VEGF-E Subtypen beschrieben: VEGF-E_{NZ-2}, VEGF-E_{NZ-7}, VEGF-E_{NZ-10}, VEGF-E_{D1701} und VEGF-E_{Vr634}.

Während alle bislang untersuchten VEGF-E Varianten an den VEGF-R2 binden und aktivieren, gilt dies hinsichtlich NP-1 nur für VEGF-E_{NZ-2}, -E_{NZ-10} und -E_{D1701}.

1.1.5. PlGF

Der Placenta Growth Factor (PlGF) wurde erstmals 1991 aus humaner Plazenta isoliert [Maglione et al., 1991]. Vergleichbar zu VEGF-A und VEGF-B entstehen auch von PlGF durch alternatives splicen verschiedene Isoformen: PlGF-1 (PlGF₁₃₁), PlGF-2 (PlGF₁₅₂), PlGF-3 (PlGF₂₀₃) und PlGF-4 (PlGF₂₂₄).

In Bezug auf die Rezeptorinteraktionen der PlGF Isoformen sind folgende Forschungsergebnisse veröffentlicht. PlGF-2 besitzt die Fähigkeit nicht nur an NP-1 sondern auch an NP-2 zu binden [Maglione et al., 1993].

Wie der Name des Proteins vermuten lässt, ist die Expression von PlGF während der gesamten Gestationszeit in der menschlichen Plazenta sehr hoch. Das Protein wird aber nicht ausschließlich in der Plazenta synthetisiert. Eine Genexpression von PlGF wurde auch im Herz, der Lunge, der Schilddrüse und der Skelettmuskulatur dokumentiert [Persico, 1999]. Carmeliet et al. zeigte, dass ein Mangel an PlGF bei Mäusen keinen Einfluss auf die embryonale Angiogenese hat [Carmeliet et al., 2001]. Nichts desto trotz beeinträchtigt der Verlust von PlGF die Angiogenese, die Plasmaextravasation und Gefäßneubildung während einer Ischämie, Entzündung und Wundheilung. Dies weist alles auf die Wichtigkeit der VEGF-R1 vermittelten Signaltransduktion unter pathologischen Umständen hin (siehe Abbildung 4).

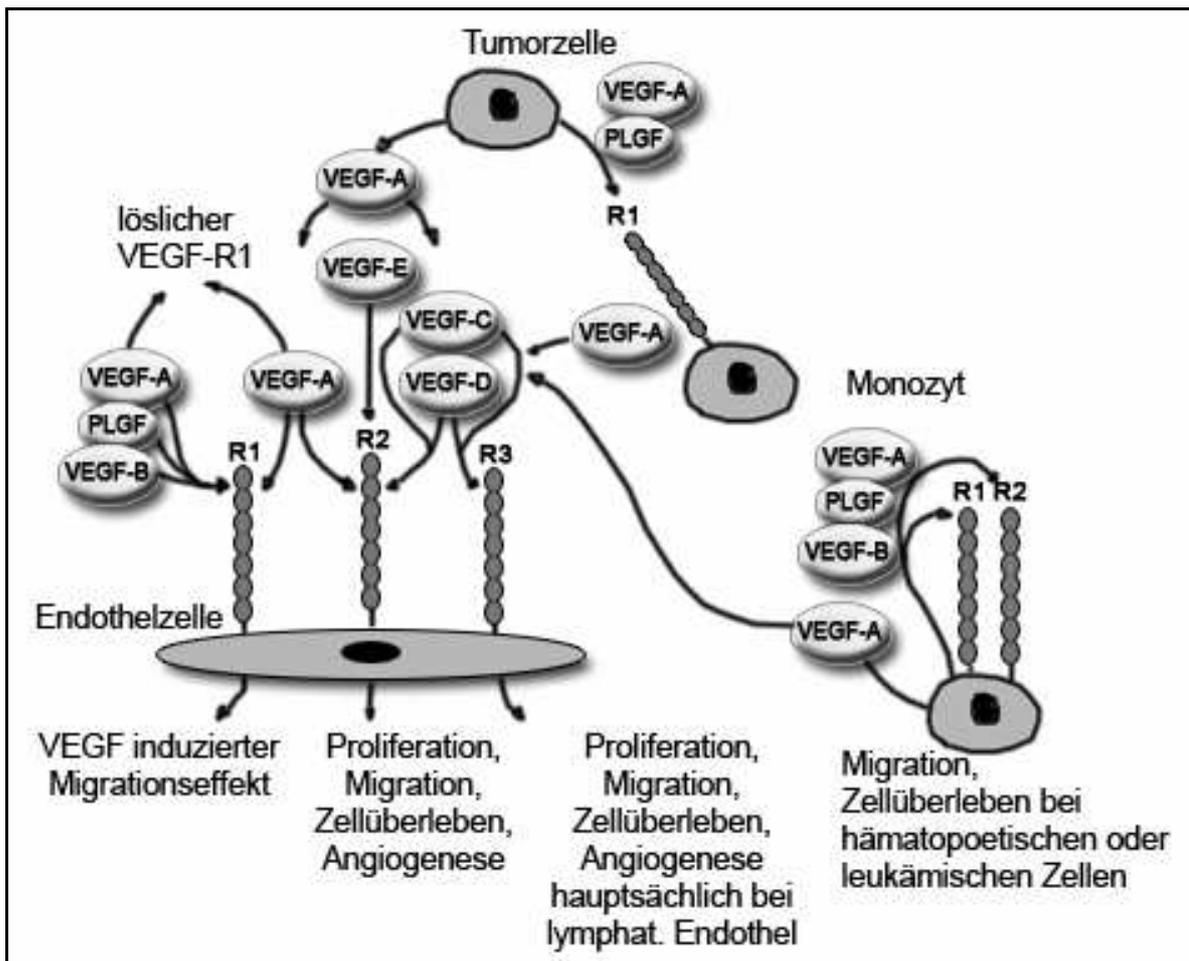


Abb. 4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Rezeptorfunktionen bei Endothel-, hämatopoetischen und leukämischen Zellen.

1.2. Rezeptoren

VEGF-R1, oder auch *fms*-like-tyrosine kinase-1 (Flt-1) genannt, ist ein hochspezifischer Rezeptor für VEGF-A, VEGF-B und PlGF [De Vries et al., 1992]. Er wird hauptsächlich von Gefäßendothelzellen aber auch von Makrophagen, Monozyten [Sawano et al., 2001] und hämopoetischen Stammzellen exprimiert [Hattori et al., 2002]. Bei blockiertem VEGF-R1 kann unter Stimulation mit VEGF-A bei HUVECs (**h**uman **u**mbilical **v**ein **e**ndothelial **c**ells) eine Beeinträchtigung der Zellmigration aber nicht der Proliferation beobachtet werden.

Die wichtigsten biologischen Effekte, wie Zellüberleben, Migration und Proliferation, werden bei endothelialen Zellen von VEGF-R2 übermittelt [Meyer et al., 1999], [Waltenberger et al., 1994] und [Rousseau et al., 2000]. Um diese Effekte bei endothelialen Zellen hervorzurufen genügt eine Stimulation mit VEGF-E, mit einer Bindung ausschließlich an VEGF-R2 [Meyer et al., 1999]. VEGF-R2 ist in der Literatur auch unter den Synonymen Kinase Domain Region (KDR) oder Fetal liver kinase-1 (Flk-1) bekannt.

VEGF-R3 oder auch Flt-4 (*fms*-like-tyrosine kinase-4) wurde ausschließlich aus lymphatischem Endothel isoliert [Garcia-Ramirez et al., 2000] und [Kaipainen et al., 1995].

Die Interaktion der unterschiedlichen VEGF Isoformen und Rezeptoren ist in Abbildung 5 kurz zusammengefasst.

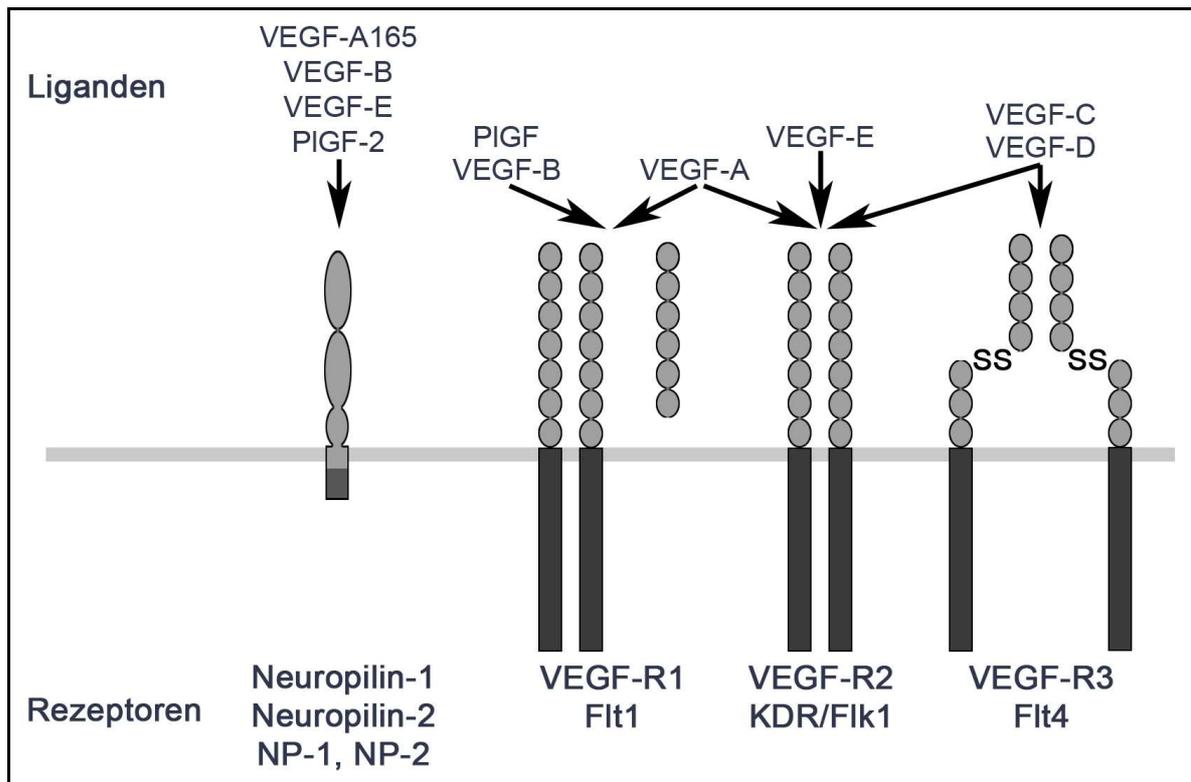


Abb. 5: Interaktion der VEGF Isoformen mit den unterschiedlichen Rezeptortypen.

1.3. Genregulation

Die Regulation der VEGF Gen Expression ist äußerst komplex und wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Für eine Hochregulation zählen Hypoxie, verschiedene Wachstumsfaktoren, Mutationen des p53-Gens, Östrogene, Thyroidea stimulierendes Hormon (TSH), Tumorpromotoren und Stickstoffmonoxid zu den wichtigsten Stimuli.

Analog zur Hochregulation der VEGF Gen Expression verhält sich die Expression der VEGF Rezeptoren. Dies konnte bei Ratten speziell unter akuter oder chronischer Hypoxie in den Lungengefäßen für VEGF-R1 und –R2 nachgewiesen werden [Tuder et al., 1995]. Eine Hochregulation dieser beiden Rezeptoren wurde ebenfalls nach Myokardinfarkt bei Ratten beobachtet [Li et al., 1996].

1.4. Fragestellung der Arbeit

Neben den in der Einleitung genannten Effekten auf Endothelzellen wurde bereits eine chemotaktische Wirkung von VEGF bei primären humanen Osteoblasten gezeigt [Mayr-Wohlfahrt et al., 2002]. Dass eine Induktion der Chemotaxis bei humanen multipotenten Stromazellen (MSZ) möglich ist, wurde mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (BMP, TGF β und PDGF) bereits nachgewiesen [Fiedler et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob VEGF auch für humane MSZ chemotaktisch attraktiv ist und welche Rezeptoren an der Signalvermittlung beteiligt sind. Zusätzlich sollte die Expression der verschiedenen VEGF-Rezeptoren untersucht werden und ob es im Rahmen einer Differenzierung zu Osteoblasten Veränderungen im Expressionsmuster gibt.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Material

2.1.1. Humane multipotente Stromazellen

Die bei den Versuchen verwendeten Zellen wurden aus Knochenmarkaspirat der in Tabelle 1 aufgeführten Patienten isoliert. Sämtliche Proben wurden während operativer Eingriffe entnommen, die eine Eröffnung des Markraumes zur Folge hatten. Die Entnahme erfolgte in Übereinstimmung und den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Ulm. Alle Patienten wurden vor der Operation vom zuständigen Stationsarzt ausführlich aufgeklärt und haben freiwillig an der Studie teilgenommen.

Bei der Probandenrekrutierung wurde darauf geachtet, dass zum Zeitpunkt der Materialgewinnung keine Stoffwechselstörungen (z.B. endokrinologische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus) oder andere bekannten Erkrankungen des Skelettsystems vorlagen. Zudem wurden die Patientenakten im Hinblick auf die Einnahme zytostatischer Medikamente überprüft und von der Studie ausgeschlossen.

Tab. 1: Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden. * Zum Zeitpunkt der Probeentnahme.

Proband	Geschlecht	Alter in Jahren*	OP und Entnahmestelle des Knochenmarks
1	Männlich	67	Tibiakopffraktur Tibia
2	Weiblich	19	Tripleosteotomie bei Hüft dysplasie Beckenkamm
3	Männlich	72	Ventrale Spondylodese Beckenkamm
4	Weiblich	56	Dorso-ventrale Spondylodese Beckenkamm

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 1

5	Weiblich	42	Ventrale Spondylodese Beckenkamm
6	Weiblich	25	Tripleosteotomie bei Hüftdysplasie Beckenkamm
7	Weiblich	20	Tripleosteotomie bei Hüftdysplasie Beckenkamm
8	Weiblich	55	Keine Angabe

2.1.2. *Gebrauchsartikel, Reagenzien und Kits*

AEC und Substrate–Chromogen	Dako® GmbH, Hamburg, Deutschland
Aqua Spüllösung	DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland
Biocoll Separation Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Biotinylated link Anti-Mouse and Anti-Rabbit	Dako® GmbH, Hamburg, Deutschland
Brilliant® SYBR® Green QPCR MM	Stratagene®, Amsterdam, NL
Bromphenolblau	peqLab GmbH, Erlangen, Deutschland
Dako® Protein Block	Dako® GmbH, Hamburg, Deutschland
Diethylpyrocarbonat	Sigma Chemie GmbH, Steinhausen, Deutschland
DMEM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco´s PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Etidiumbromid	biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon® 4 Kammer Culturslide	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Falcon® Multiwellplatten	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Falcon® Petrischalen	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Falcon® Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Falcon® Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
FKS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Formalin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Giemsa Färbelösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HotStarTaq Master Mix Kit	QIAGEN Sciences, Hilden, Deutschland
Immersionsöl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MACS CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach Deutschland
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nuclepore [®] Polyester Filter	Whatman Inc., Clifton, NJ USA
Omniscript RT	QIAGEN Sciences, Hilden, Deutschland
PCR Pipettierbedarf	Brand, Wertheim, Deutschland
Primer	alle verwendeten Primer wurden von MWG Biotech, München, Deutschland hergestellt
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Puffertabletten nach Weise	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rneasy MiniKit	QIAGEN Sciences, Hilden, Deutschland
Protector RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
SeaKem [®] LE agarose	BMA, Rockland, ME USA
Streptavidin – HRP	Dako [®] GmbH, Hamburg, Deutschland
Terg-A-Zyme [™]	Alconox Inc., New York, NY USA
Trypsin/ EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
VEGF-A	ReliaTech, Braunschweig, Deutschland
rhPIGF-1	R&D, Deutschland
Zellkultur Pipettierbedarf	Costar [®] , Corning Incorporated, Deutschland

2.1.3. Geräte

ABI Prism 7000 Seq. Det. Sys. V1.1	Applera GmbH, Deutschland
Brutschrank Cytoperm	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Chemotaxiskammer	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD USA
Feinwaage Precissa 400 M	PAG Oerlikon AG, Zürich, Schweiz
ImageMaster [®] VDS	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 35	Leica, Deutschland
Mikroskop Polyvar	Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland
Mikroskop ZEISS Axiomot 2	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Pipettierhilfen, diverse	Eppendorf, Köln, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus [®] -akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Robocycler [®] Gradient 96	Stratagene [®] , Amsterdam, NL
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Stromnetzteil Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortex-Genie [™]	Bender & Hohlbein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Ges. für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Allegra [™] 64R	Beckman Coulter [™] , Palo Alto, CA USA
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Zellzähler Casy [®] 1 TT	Schärfe-System GmbH, Reutlingen, Deutschland

2.1.4. Zusammensetzung und Herstellung von Lösungen und Medien

FKS Inaktivierung	500 ml über die Nacht bei 4° C aufgetautes FKS für 30 min bei 56° C in Wasserbad gegeben.
Vollmedium:	440 ml DMEM ohne L-Glutamin 50 ml inaktiviertes FKS 5 ml L-Glutamin (wird einmal pro Woche aufgefrischt mit jeweils 1% des Gesamtvolumens) 5 ml Penicillin/Streptomycin.
TBE Puffer 1x	108 g Tris-base 55 g Boric acid 9,3 g Na ₂ EDTA ad 10 l Aqua dest. Einstellung auf pH 8,3
Weise Puffer	Eine Puffertablette nach Weise in 1 l Aqua dest. gelöst.
Giemsa Lösung	20 ml Giemsafärbelösung mit Weise Puffer auf 200 ml eingestellt und anschließend filtriert.
1fach Trypsin	5ml 10fach Trypsin/ EDTA Solution mit steriler Aqua Spüllösung auf 50 ml eingestellt.
Osteoblastendifferenzierungs Medium:	DMEM (10% FKS inakt., 1% Glutamin) Vit C Phosphat 0,01 ml (50 µg/ml DMEM) β-Glycerophosphat 0,1 ml (0,216 µg/ml DMEM) Dexamethason 0,01 ml (0,02 µg/ml DMEM) Penicillin/Streptomycin 0,1 ml anschließend steril filtriert und bei -20° C eingefroren.

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation der humanen multipotenten Stromazellen

Die Isolation der multipotenten Stromazellen (MSZ) aus Knochenmarkaspirat wurde sofort nach Erhalt des Zellmaterials durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation [Deans u. Mosley, 2000] die MSZ vom restlichen Zellmaterial getrennt. Anschließend nutzte man mittels einer Direkt-Ausplattier-Methode [Friedenstein et al., 1976] die selektive Adhärenz der MSZs an Plastikoberflächen aus. Aufgrund von FACS Analysen mit MSZ spezifischen Oberflächenmarkern kann von einer 90-95% homologen Population ausgegangen werden [Fickert et al., 2004]. Um Subpopulationen unerwünschter Zellen, wie z.B. endothelialer Vorläuferzellen, sowohl zu selektieren als auch bei den Versuchen vorab auszuschließen, wurden weitere Verfahren angewandt: Magnetic Adsorbant Cell Separation (MACS; Firma Miltenyi Biotech GmbH), immunhistologische Färbungen und molekularbiologische Analysen.

Zur MSZ Isolation benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

32 ml Biocoll Separation Solution, im Wasserbad auf 37° C erwärmtes Vollmedium und Dulbecco's PBS, 4 sterile Zentrifugenröhrchen Falcon[®], 10 ml und 2 ml Costar Pipettenspitzen, Pipettierhilfe pipetus[®]-akku, 1 Petrischale Falcon[®], 4 Zellkulturflächen T75 Falcon[®]

Protokoll „*Isolation von MSZ aus Knochenmarkaspirat*“:

- ▶ Biocoll-Dichtegradienten-Zentifugation: Je Röhrchen 8 ml Biocoll 30 min bei 13500 g und 4° C zentrifugieren (Zentrifuge Allegra[™] 64R, Rotor F1010).
- ▶ Knochenmarkaspirat in Petrischale überführen und im Verhältnis Knochenmark/ Vollmedium 1:1 resuspendieren.
- ▶ Jeweils 2 ml Knochenmarksuspension pro Biocoll-Röhrchen vorsichtig auf den Gradienten auftragen.

- ▶ Erneut 30 min bei 600 g und 4 °C zentrifugieren.
- ▶ In jeder Zellkulturflasche 10 ml Vollmedium vorlegen. Die kernhaltigen Zellen in der Interphase des Biocoll-Gradienten sorgfältig abpipettieren und in die vorbereiteten Kulturflaschen überführen.
- ▶ Bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubieren.
- ▶ Nach 24h Inkubation bei allen Kulturflaschen und der Petrischale Vollmedium verwerfen und 2-mal mit je 5 ml PBS spülen (jeweils verworfen).
- ▶ Je 12 ml Vollmedium in Kulturgefäße geben. Bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubieren.
- ▶ In der Petrischale zurückgebliebene Knochenmarksuspension mit 10 ml Vollmedium resuspendiert und bei 37° C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert (Brutschrank Cytoperm).
- ▶ Alle drei Tage Wechsel des Vollmediums.

2.2.2. Zellkultur humaner multipotenter Stromazellen

Im folgenden Abschnitt werden grundlegende Arbeitsschritte bei der Arbeit mit Zellkulturen beschrieben.

Um eine vorzeitige Differenzierung und den Verlust der Progenitoreigenschaften zu vermeiden, wurde darauf geachtet, die Kulturflasche höchstens bis zu einer Zelldichte von ca. 75% zu kultivieren [Deans and Mosley, 2000].

Für die Arbeit mit Zellkulturen benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

Dulbecco's PBS und Vollmedium auf 37 °C im Wasserbad erwärmt, pro zu trypsinierende Flasche 1 ml 1fach Trypsin, 50 ml Falcon[®] Zentrifugenröhrchen, je nach Bedarf Falcon[®] Zellkulturflaschen T75, 5 ml und 10 ml Costar Pipettenspitzen, Pipettierhilfe pipetus[®]-akku.

Protokoll „Zellen trypsinieren“:

- ▶ Altes Vollmedium der Kulturflasche verwerfen und 2-mal mit je 10 ml PBS gespült (jeweils verwerfen).
- ▶ 1 ml 1fach Trypsin in Zellkulturflasche geben.
- ▶ Bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit 5 min inkubieren.
- ▶ Zellen durch Beklopfen der Kulturflasche vom Grund ablösen. Anschließend mikroskopische Kontrolle.
- ▶ Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 4 ml Vollmedium.
- ▶ Zellsuspension gut resuspendieren. Zentrifugation 10 min bei 1000 U/min (Zentrifuge Biofuge 13).
- ▶ Nach Zentrifugation Überstand verwerfen und Zellpellet mit angemessenem Volumen Vollmedium resuspendiert (hier erfolgt gegebenenfalls eine Zellzählung s.u.).
- ▶ In jede Kulturflasche 10 ml Vollmedium vorgelegen. Zellsuspension gleichmäßig auf Zellkulturflaschen aufteilen. Bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubieren.
- ▶ Alle drei Tage Mediumwechsel.

Die Bestimmung der Zellzahl war für die Chemotaxisexperimente von großer Bedeutung, da nur unter konstanten Zellkonzentrationen vergleichbare Ergebnisse eruiert werden können. Die Zellzählung erfolgte durch das Gerät Casy[®] 1 TT mittels Durchflußzytometrie.

Zur Zellzählung benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

Casyton, Zellzähler Casy[®] 1 TT, 50 ml Falcon[®] Zentrifugenröhrchen, je nach Bedarf Falcon[®] Zellkulturflaschen T75, 5 ml und 10 ml Costar Pipettenspitzen, Pipettierhilfe pipetus[®]-akku, 100 µl PCR-Pipettenspitzen und entsprechende Pipettierhilfe.

Protokoll „Zellzählung“:

- ▶ Zellen nach Protokoll trypsinieren.

- ▶ Zur Zellzählung 10 ml Casyton in einem Meßbecher vorlegen und 100 µl der gut gemischten Zellsuspension hinzupipettieren. Anschließend 3-mal invertieren.
- ▶ Zählung mit Casy[®] 1 TT. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Zu zählende Zellgröße 7,5 bis 50 µm, 3x400 µl Probenentnahme. Durchschnittlich wurden 25 Zellen größer als 50 µm gezählt.

2.2.3. Osteogene Differenzierung humaner multipotenter Stromazellen

Die osteogene Differenzierung wurde mit dem Osteoblastendifferenzierungsmedium durchgeführt [Fiedler, Röderer et al., 2002]. Zur Herstellung siehe Kapitel 1.4, Seite 16.

Zur osteogenen Differenzierung benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

Je nach Bedarf Falcon[®] Zellkulturflaschen T75, 10 ml Costar Pipettenspitzen, Pipettierhilfe pipetus[®]-akku, Osteoblastendifferenzierungsmedium.

Eine Überprüfung des Differenzierungsstatus erfolgte mittels PCR für osteoblastentypische Genexpressionsmuster (Primer siehe Tabelle 2, Kapitel 2.7. Molekularbiologische Analysen, Seite 31).

Protokoll:

- ▶ Anstatt mit Vollmedium wurden die MSZs ohne Passagierung mit Osteoblastendifferenzierungsmedium zwei Wochen lang bei 37° C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert (Brutschrank Cytoperm).
- ▶ Alle drei Tage Mediumwechsel.

2.2.4. Magnetic Adsorbant Cell Separation

Da die chemotaktischen Werte durch Subpopulationen verfälscht werden könnten, hier insbesondere durch CD34 positiven Zellen, z.B. von endothelialen Progenitorzellen, musste eine Möglichkeit gefunden werden, diese Kontaminierung zu minimieren oder gänzlich auszuschalten [Hirohata et al., 2004]. Aus diesem Grund wurden die Zellkulturen vor der Chemotaxis mittels Magnetic Adsorbant Cell Separation (MACS) separiert.

Dabei wird die Zellsuspension mit Eisen beladenen CD34 Antikörpern, sogenannten MicroBeads, inkubiert. Durch anschließendes Anlegen eines Magnetfeldes ist es möglich die CD34 positiven Zellen hochspezifisch zu selektieren (siehe Abbildung 6).

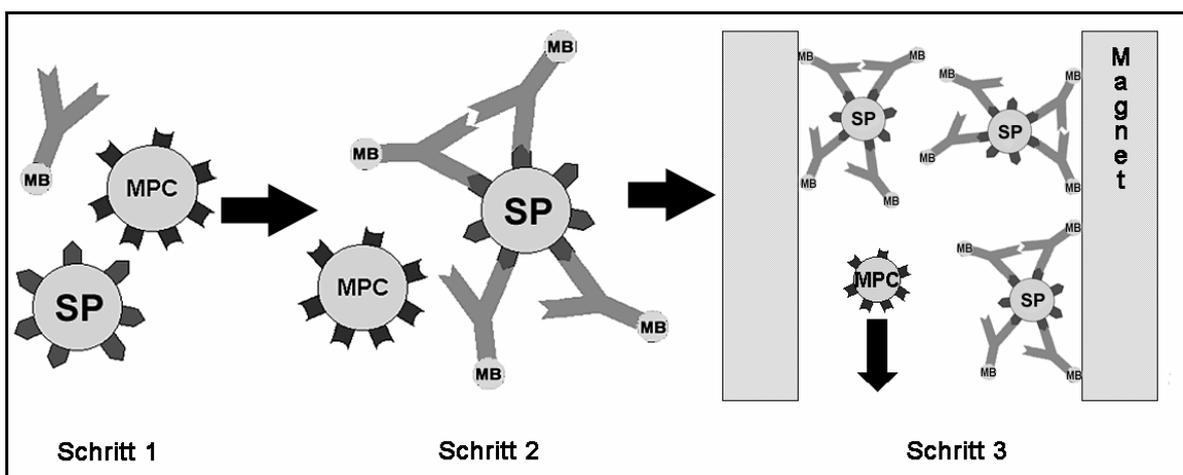


Abb. 6: Schematische Darstellung der MACS.

Schritt 1: Inkubation, Schritt 2: Antikörperbindung, Schritt 3: Separation im Magnetfeld.

SP.: Subpopulation mit an MACS Microbeads (MB) gekoppeltem Antikörper.

Zur MACS benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

MACS CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, PBS EDTA 2 mM, nach Bedarf Falcon[®] Zellkulturflaschen, 50 ml Falcon[®] Zentrifugenröhrchen, 10 ml und 5 ml Costar Pipettenspitzen, Pipettierhilfe pipetus[®]-akku, 1 ml und 100 µl Pipettierhilfen und PCR-Pipettenspitzen.

Protokoll „*MACS-Separation*“:

- ▶ Zellen nach Protokoll trypsinieren (siehe Kapitel 2.1. Präparation der humanen multipotenten Stromazellen, Seite 17).
- ▶ Zellsuspension gut resuspendieren. Zentrifugation 10 min bei 1000 U/min (Zentrifuge Biofuge 13).
- ▶ Überstand verwerfen und Pellet mit 1-10 ml PBS (je nach erwarteter Zellzahl) 2mM EDTA resuspendieren.
- ▶ Zellzählung und Zentrifugation 10 min bei 1000 U/min.
- ▶ Überstand verwerfen; Pellet mit 300 µl PBS 2 mM EDTA und 100 µl FCR-Blocking-Reagent resuspendieren (aktuelles Volumen 400 µl).
- ▶ 15 min Inkubation im Kühlschrank (6-12 °C).
- ▶ 100 µl CD34-Hapten-Antibody hinzugeben und gut vermischen.
(s.o. Abbildung 6, Schritt 1)
- ▶ 15 min Inkubation im Kühlschrank.
- ▶ Mit 10 ml PBS 2 mM EDTA resuspendieren. Zentrifugation 10 min bei 1000U/min.
- ▶ Überstand verwerfen und mit 100 µl Microbeads und 400 µl PBS 2 mM EDTA resuspendieren.
- ▶ 15 min Inkubation im Kühlschrank.
- ▶ Mit 10 ml PBS 2 mM EDTA resuspendieren. Zentrifugation 10 min bei 1000 U/min.
- ▶ Einbringung der MACS- Säule ins Magnetfeld und mit 500 µl normalem PBS vorgespült. Eluat verwerfen.
- ▶ Nach Zentrifugation Überstand verwerfen, mit 2 ml normalem PBS resuspendieren und auf Säule auftragen. Sobald die 2 ml durchgelaufen sind, 3-mal mit 500 µl normalem PBS nachspülen (s.o. Abbildung 6, Schritt 3).
- ▶ ***Eluat 1: MSZ*** (siehe Abbildung 7).
- ▶ Anschließend Säule aus dem Magnetfeld herausnehmen und 1 ml normaler PBS auftragen und mit dem beiliegenden Stempel durch die Säule drücken.
- ▶ ***Eluat 2: CD34 positive endotheliale Progenitorzellen.***
- ▶ Bestimmung der Zellzahl beider Eluate und Verteilung auf die Kulturflaschen.

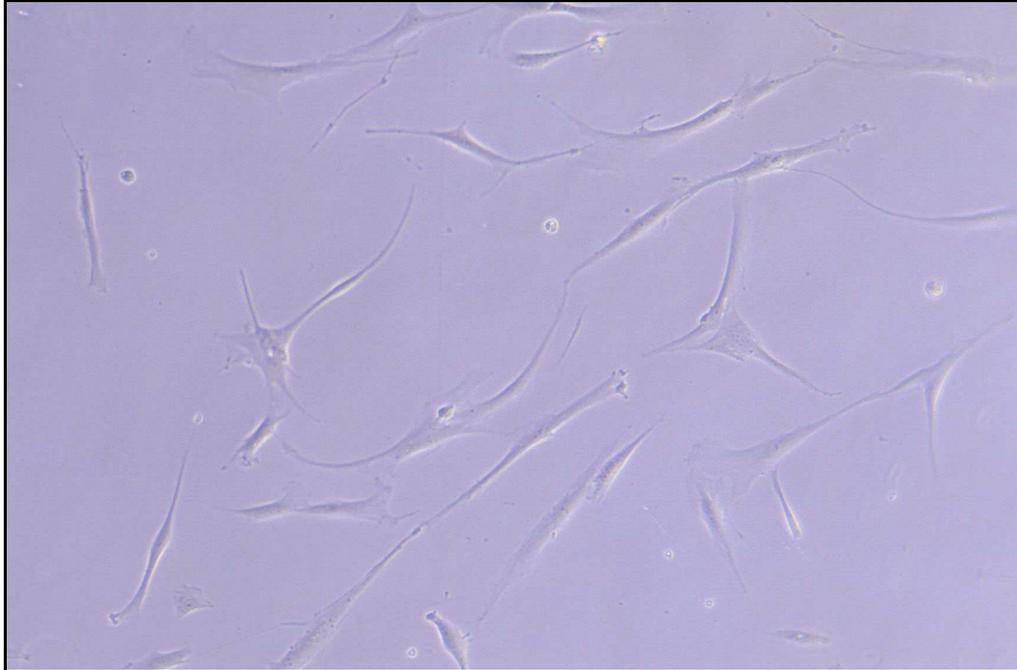


Abb. 7: MSZ Zellkultur nach MACS bei 40facher Vergrößerung.

2.2.5. Immunhistochemische Färbungen

Die Homogenität der Zellpopulation wurde zusätzlich mit immunhistochemischen Färbungen geprüft. Die Färbungen wurden mit Antikörpern gegen stammzelltypische Oberflächenrezeptoren durchgeführt, für die eine Expression bei MSZ nachgewiesen ist [Fickert et al., 2004]: CD9, CD54, CD90 und CD166.

Zur immunhistologischen Färbung benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

3% H₂O₂, Dako[®] Protein Block, Antikörper-Lösungen CD 9 und CD 90 0,05 µg/ml, Antikörperlösungen CD 54 und CD 166 mit 5 µg/ml, Biotinylated link Anti-Mouse and Anti - Rabbit, Streptavidin – HRP, AEC und Substrate–Chromogen, PBS BRIJ, 12 Well Platte Falcon[®], 1 ml Costar Pipettenspitzen Pipettierhilfe pipetus[®]-akku.

Protokoll „*CD-Färbung*“:

- ▶ Durchführen eines Chemotaxisansatzes nach unten abgebildetem Schema (Abbildung 8).
- ▶ Aufteilung des Chemotaxis-Filters (Abbildung 8), so dass von jeder Probe (PK, 10 ng/ml und NK) vier Abschnitte vorhanden sind, die jeweils mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden konnten.

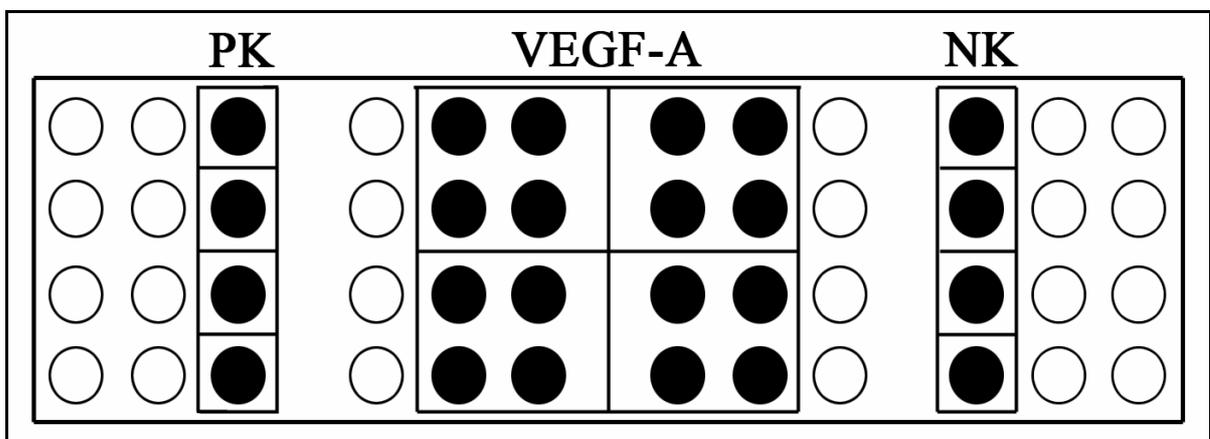


Abb. 8: Schematische Darstellung der Schnittführung für die Filteraufteilung.

Schwarze Kreise stehen für die genutzten Wells. (PK: Positivkontrolle, VEGF-A Konz. 10 ng/ml, NK: Negativkontrolle)

Die Linien stehen für die Schnittführung bei der Filteraufteilung.

- ▶ 15 min Inkubation in 3% H₂O₂ bei Raumtemperatur (RT).
- ▶ Mit Wasser spülen, anschließend mit Dako[®] Protein Block für 15 min bei RT inkubieren. Bei allen Schritten ist darauf zu achten, dass sich der Filter mit der Zelleseite nach unten zeigend in der Flüssigkeit befindet.
- ▶ Inkubation mit CD 9 AK und CD 90 AK mit einer Konzentration von je 0,05 µg/ml. Inkubation mit CD 54 AK und CD 166 AK mit einer Konzentration von je 5 µg/ml (Abbildung 9) in einer feuchten Kammer für 18 h im Kühlschrank inkubieren.

CD 9	CD 54	CD 90	CD 166
PK	PK	PK	PK
CD 9	CD 54	CD 90	CD 166
VEGF-A	VEGF-A	VEGF-A	VEGF-A
CD 9	CD 54	CD 90	CD 166
NK	NK	NK	NK

Abb. 9: Schematische Darstellung der 12-Well Platte mit der Versuchsanordnung, wie sie zur Inkubation verwendet wird. (PK: Positivkontrolle, VEGF-A Konz. 10 ng/ml, NK: Negativkontrolle).

- ▶ Abwaschen der Antikörper mit PBS und 10 min bei RT in PBS Brij inkubieren.
- ▶ PBS Brij abpipettieren und Filterabschnitte mit Biotinylated link Anti-Mouse and Anti - Rabbit für 30 min bei RT inkubieren.
- ▶ 2x mit PBS spülen und 10 min bei RT in PBS Brij inkubieren. PBS Brij abpipettieren und 30 min bei RT mit Streptavidin – HRP inkubieren.
- ▶ 2x mit PBS spülen und 10 min bei RT in PBS Brij inkubieren. PBS Brij abpipettieren und 20 min bei RT mit AEC und Substrate–Chromogen inkubieren.
- ▶ 2x mit Aqua dest. spülen, 10 min Gegenfärbung mit Hämalaun, anschließend in Leistungswasser spülen.
- ▶ Filterabschnitte auf Objektträger überführen und mit Gelatine fixieren.

2.2.6. Chemotaxis

Bei diesen Versuchen wurde die gerichtete Zellmigration entlang eines Konzentrationsgradienten untersucht. Um dieses Vorhaben zu realisieren, verwendete man eine Chemotaxiskammer der Firma Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD USA (Abbildung 10).

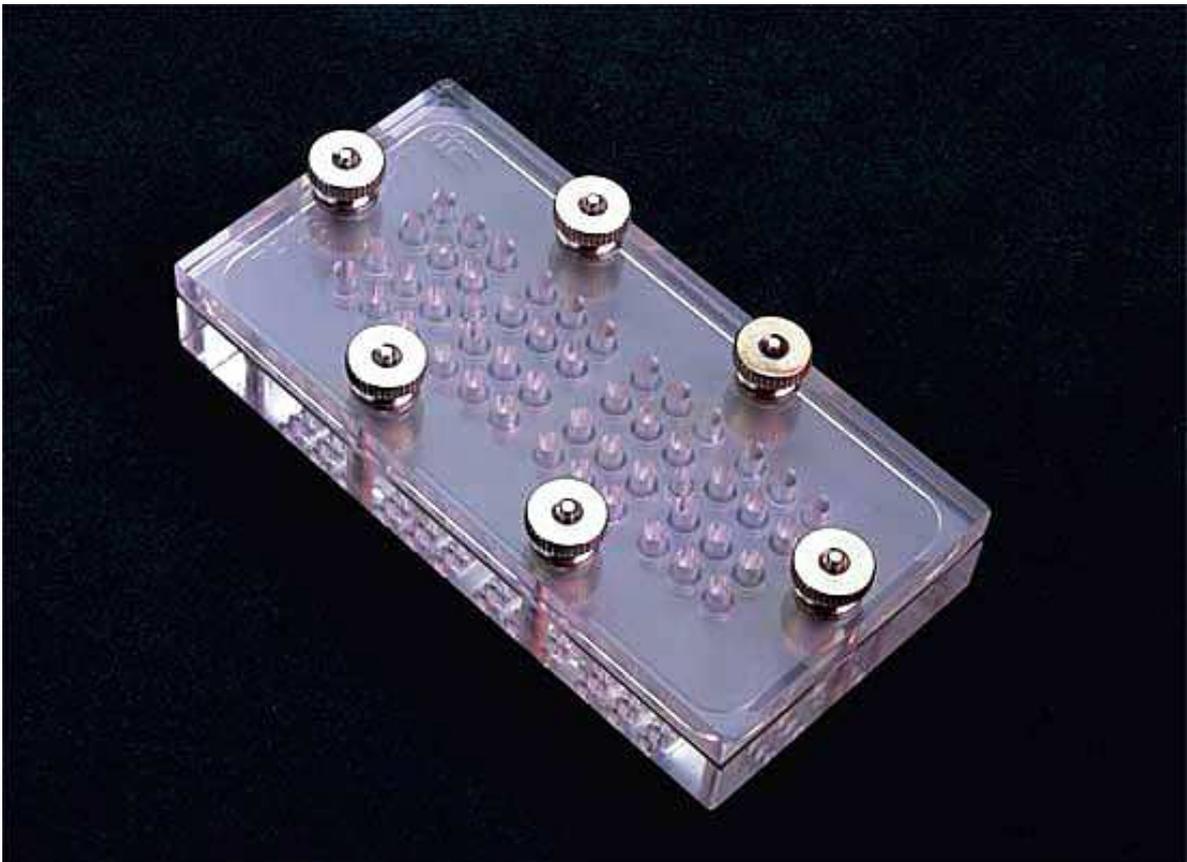


Abb. 10: 48 Well Chemotaxiskammer der Firma Neuro Probe Inc..

Die 48 Well Micro Chemotaxiskammer setzt sich aus insgesamt vier Elementen zusammen: Oberplatte, Silikondichtung, Filter und Bodenplatte (siehe Abbildung 11). Während sich in der Bodenplatte 48 kleine Vertiefungen (Wells) befinden, enthält die Oberplatte 48 vollständige Durchbohrungen, korrespondierend zu den 48 Wells der Bodenplatte. Zwischen diesen beiden Acrylplatten kommt im Sandwich-Verfahren sowohl ein Nuclepore[®] Polyester Filter mit einer Porengröße von 5 μm (Whatman Inc., Clifton, NJ USA) als auch eine Silikondichtung, mit ebenfalls 48 Löchern, zu liegen. Bei der

zusammengesetzten Kammer entstehen so aus den oben erwähnten Durchbohrungen der Oberplatte Wells zum Einbringen der Zellsuspension.

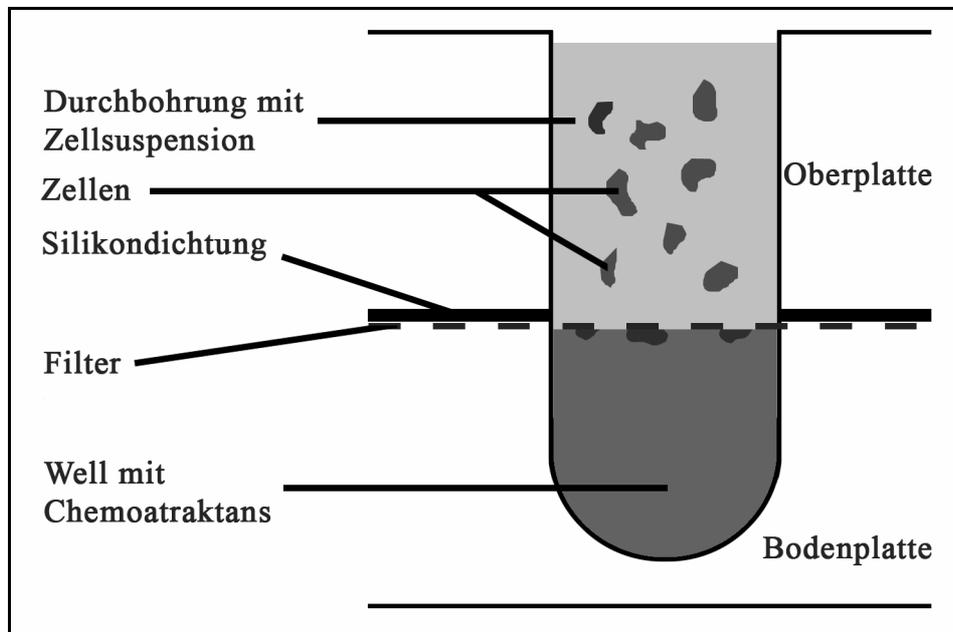


Abb. 11: Schematischer Aufbau der Chemotaxiskammer

Als Positivkontrolle diente konditioniertes Osteoblastenmedium, für die Negativkontrolle wurde Leermedium (DMEM) verwendet. Um eine genauere Aussage über die Anzahl der gewanderten Zellen zu machen, wurde für jede eingebrachte Substanz eine 4fache Bestimmung vorgenommen. Mit den hieraus ermittelten Mittelwerten war es möglich, den Chemotactic Index (CI) zu berechnen.

$$CI = \frac{\text{Mittelwert der in den Testwells gewanderten Zellen}}{\text{Mittelwert der in der Negativkontrolle gewanderten Zellen}}$$

Durchschnittlich wanderten in der Negativkontrolle ca. 20 bis 40 Zellen, in der Positivkontrolle über 500 Zellen. Bei jedem durchgeführten Chemotaxisansatz waren 20 Wells in Verwendung. Um eine Kontamination mit anderen Faktorenkonzentrationen zu vermeiden, wurde jeweils eine Spalte freigelassen (siehe Abbildung 12).

		Positiv- kontrolle		VEGF 10 ng/ml		VEGF 1 ng/ml		VEGF 0,1 ng/ml		Negativ- kontrolle	
		Positiv- kontrolle		VEGF 10 ng/ml		VEGF 1 ng/ml		VEGF 0,1 ng/ml		Negativ- kontrolle	
		Positiv- kontrolle		VEGF 10 ng/ml		VEGF 1 ng/ml		VEGF 0,1 ng/ml		Negativ- kontrolle	
		Positiv- kontrolle		VEGF 10 ng/ml		VEGF 1 ng/ml		VEGF 0,1 ng/ml		Negativ- kontrolle	

Abb. 12: Pipettierschema für die Bodenplatte. Ein Quadrat entspricht einem Well.

Positivkontrolle (konditioniertes Osteoblastenmedium), VEGF (VEGF-A mit jeweiliger Konzentration), Negativkontrolle (DMEM).

2.1.6.1. Versuchsablauf eines Chemotaxisansatzes

Für einen Chemotaxisansatz benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

Voll- und LeermEDIUM (DMEM), jeweils auf 37°C im Wasserbad aufgewärmt, Wachstumsfaktor VEGF-A (10 ng/ml, 1 ng/ml und 0,1 ng/ml), Positivkontrolle (SaOS-Überstand), Negativkontrolle LeermEDIUM, Chemotaxiskammer, Nuclepore[®] Polyester Filter (5 µm Porengröße), Casyton, Zellzähler Casy[®] 1 TT, 50 ml Falcon[®] Zentrifugenröhrchen, Falcon[®] Zellkulturflaschen T75, 5 ml und 10 ml Costar Pipettenspitzen, Pipettierhilfe pipetus[®]-akku, 1000 µl, 100 µl PCR-Pipettenspitzen und entsprechende Pipettierhilfe.

Zur anschließenden Filterfärbung wurde Formalin, Weise Puffer und Giemsa Färbelösung verwendet.

Protokoll „Chemotaxis“:

- ▶ Aliquots der Wachstumsfaktoren aus dem –80°C Gefrierschrank auf Eis auftauen.
- ▶ Humane MSZ nach Protokoll trypsinieren.
- ▶ Zellen in 4 ml Vollmedium aufnehmen.

- ▶ Zellsuspension gut mischen. Zentrifugation 10 min bei 1000 U/min (Zentrifuge Biofuge 13).
- ▶ Überstand verwerfen und Pellet mit 2 ml Leermedium (DMEM) gut resuspendieren.
- ▶ Zellzählung, dann Einstellung der Zellkonzentration mit Hilfe von Leermedium auf 2×10^5 Zellen/ml.
- ▶ Aliquot für RNA-Isolierung abnehmen, bei 1600 U/min 5 min lang zentrifugieren (Zentrifuge Megafuge 1.0), mit 606 μ l Lysispuffer, 600 μ l RLT-Puffer und 6 μ l Mercaptoethanol, versetzen und, falls nicht umgehend die RNA-Isolierung durchgeführt wurde, bei -20°C eingefroren. Weitere Verarbeitung dieser Probe siehe Kapitel 2.8. RNA-Isolierung mit DNase-Verdau.
- ▶ Platzierung der Bodenplatte, so dass das Handelszeichen links oben zu liegen kommt.
- ▶ Die Bodenplatte der Chemotaxiskammer pro Well 28 μ l der Positivkontrolle bzw. der Wachstumsfaktoren füllen. Eine gute Kontaktfläche der pipettierten Volumina mit dem später aufliegenden Filter erhält man, indem beim Pipettiervorgang besonders darauf geachtet wird, dass sich zum einen ein leicht positiver Konus und zum anderen keine Luftblasen bilden.
- ▶ Seitenmarkierung des Filters durch Abschneiden einer Ecke.
- ▶ Um eine möglichst genaue Platzierung des Nuclepore[®] Polyester Filters (5 μ m Porengröße) zu erzielen, mit der glänzenden Seite nach unten, so auf die Wells aufbringen, dass beim Auflegen zunächst Kontakt zu den mittleren und dann zu den seitlichen Wells besteht. Die abgeschnittene Ecke des Filters links oben platzieren.
- ▶ Silikondichtung auf Filter legen und vorsichtig nach unten drücken. Ausrichtung ebenfalls nach links oben.
- ▶ Oberplatte über die Silikondichtung legen und jeweils die zwei gegenüberliegenden Schrauben fingerfest anziehen.
- ▶ Die Durchbohrungen der Deckelplatte werden nun durch das Zusammensetzen der Chemotaxiskammer zu Wells, in die man jeweils 50 μ l Zellsuspension hineinpipettiert. Hierbei darauf achten, dass sich an der Basis keine Luftblasen bilden. Um eine Kontamination mit Wachstumsfaktoren bzw. der Positivkontrolle zu vermeiden, wird bei jedem Pipettiervorgang die Pipettenspitze gewechselt.
- ▶ Inkubation der Chemotaxiskammer für 4 Stunden bei 37°C , 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit (Brutschrank Cytoperm).

- ▶ Nach 4 Stunden Inkubation erfolgt die Weiterverarbeitung des Filters.
- ▶ Die Schrauben lösen und die Kammer umstülpen, so dass die Filterseite mit den gewanderten Zellen nun nach oben zeigt. Im weiteren Protokoll wird diese Seite „Zellseite“ genannt.
- ▶ Filter mit Klammern fassen, mit nach oben zeigender Zellseite die Filterunterseite mit PBS benetzen und über eine Gummilippe streifen. Diesen Vorgang 3-mal wiederholen. Zwischen den mechanischen Reinigungsvorgängen jeweils Säuberung der Gummilippe.
- ▶ 3 min Fixation des Filters in Formalin.
- ▶ Eintauchen in Weise Puffer.
- ▶ 20 min Färbung in Giemsa Lösung.
- ▶ Eintauchen in Weise Puffer.
- ▶ Filter mit der „Zellseite“ nach oben zeigend auf Objektträger trocknen lassen.
- ▶ Zurechtschneiden des Filters, Immersionsöl auftragen und Deckglas auflegen.
- ▶ Einlegen und Spülung der Kammerteile in Aqua dest..
- ▶ Mit Hilfe einer Schablone, die den Öffnungen der Deckel- bzw. Bodenplatte entspricht, jedes Well mit dem Mikroskop auszählen.
- ▶ Rechnerische Ermittlung des Chemotactic Index.

2.1.6.2. Reinigung der Chemotaxiskammer

Proteine und verwendete Wachstumsfaktoren können sich vor allem in den Wells der Bodenplatte anlagern. Infolgedessen wurde die Kammer regelmäßig mit Terg-A-Zyme™ (Alconox Inc., New York, NY USA) nach folgendem Protokoll gereinigt.

Zur Reinigung der Chemotaxiskammer benötigte Materialien, Lösungen und Medien:
Terg-A-Zyme™, Aqua dest., Wasserbad.

Protokoll „Reinigung der Chemotaxiskammer“:

- ▶ 4,5 g von Terg-A-Zyme™ mit Aqua dest. auf ein Volumen von 500 ml einstellen.

- ▶ Lösung im Wasserbad auf 60° C erhitzen.
- ▶ Kammer einlegen und für 2 h bei 60° C inkubieren.

2.1.7. Molekularbiologische Analysen

Die Charakterisierung der MSZ Zellkultur erfolgte durch den Nachweis einer Amplifikation spezifischer Oberflächenrezeptoren. Hierfür fanden Primer für CD9, CD44, CD90 und CD166 Verwendung, von denen die Expression bei MSZ bekannt ist [Fickert et al., 2004].

Ebenfalls von Interesse war der Rezeptorstatus von VEGF-R1 bis R3. Dieser wurde sowohl bei MSZ als auch dOB mittels PCR Analysen ermittelt. Zusätzlich wurde das Zellmaterial auf die Genexpression von Proteinen, die bei der Signaltransduktion beteiligt sind, geprüft: Neuropilin-1 und -2 (Tabelle 2).

Tab. 2: Verwendete PCR Primer. Die Primer stammen von der Firma MWG Biotech (München, Deutschland) und entsprechen der HPSF Qualität.

Primer Accession No.	Richtung	Sequenz		Produktgröße [bp]
		5´	3´	
GAPDH NM_002046	Forward	GAG TCC ACT GGC GTC TTC AC		188
	Revers	GGT GCT AAG CAG TTG GTG GT		
VEGF-R1 NM_002019	Forward	GGA ACA AGG CAA GAA ACC AA		216
	Revers	CGA TGA ATG CAC TTT CTG GA		
VEGF-R2 AF063658	Forward	ATC CCT GTG GAT CTG AAA CG		196
	Revers	CCA AGA ACT CCA TGC CCT TA		
VEGF-R3 NM_002020	Forward	TGA AAG CAT CTT CGA CAA GG		201
	Revers	TTC AGC ATG ATG TGG CGT AT		
Neuropilin-1 XM_005798	Forward	GGT GGA TGA ATG TGA TGA CG		212
	Revers	GCA CGT GAT TGT CAT GTT CC		
Neuropilin-2	Forward	CAT CAG GTT CAC CTC CGA CT		230

XM_002670	Revers	GCT CCA GGT CAA AGA TCA GG	
CD9	Forward	TCCGATTCGACTCTCAGACC	200
NM_001769.2	Revers	GGCGAATATCACCAAGAGGA	
CD44	Forward	AGACGAAGACAGTCCCTGGAT	200
NM_000610	Revers	TGATCAGCCATTCTGGAATTT	
CD90	Forward	GACCCGTGAGACAAAGAAGC	204
NM_006288.2	Revers	ACTGTGACGTTCTGGGAGGA	
CD166	Forward	CGATGGCTCCCCAGTATTTAT	198
NM_001627.2	Revers	ATTGTAGGTGCCTCAAACACG	
AP	Forward	ACCTCGTTGACACCTGGAAG	189
NM_000478.2	Revers	CCACCATCTCGGAGAGTGAC	
OC	Forward	GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG	194
NM_199173.2	Revers	AGCAGAGCGACACCCTAGAC	
18sRNA	Forward	CGCAGCTAGGAATAATGGAATAGG	65
X03205.1	Revers	CATGGCCTCAGTTCCGAAA	

Bis zur Fertigstellung der PCR-Analysen sind mehrere Zwischenschritte nötig.

Die kultivierten Zellen, besonders MSZ, weisen bei zu hoher Zellkonfluenz osteogene Differenzierungstendenzen auf, d.h. bei höheren Zellpassagen könnten mittels PCR Differenzierungsmerkmale festgestellt werden. Um diese Fehlerquelle zu umgehen erfolgte direkt bei Ausführung der Chemotaxisexperimente eine Probenentnahme. Nach entsprechender Probenaufarbeitung (siehe Protokoll „Chemotaxis“, Kapitel 2.6. Chemotaxis) folgt die RNA-Isolierung mit anschließender cDNA-Synthese (siehe folgender Abschnitt). Mit der gewonnenen cDNA kann nun eine PCR oder quantitative RT-PCR durchgeführt werden.

2.1.7.1. RNA-Isolierung mit DNase-Verdau

Zur RNA-Isolierung benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

Rneasy MiniKit, Mercaptoethanol, DEPC-Wasser, 1000 µl, 100 µl und 20 µl Pipetten mit entsprechenden PCR Spitzen.

Protokoll „*RNA-Isolation*“:

- ▶ Eingefrorene, mit 600 µl RLT-Puffer und 6 µl Mercaptoethanol versetzte, Zellsuspension auftauen.
- ▶ Zum Homogenisieren der Probe Lysat auf eine QIAshredder-Säule auftragen und 2 min bei 13000 RPM zentrifugieren (Zentrifuge Allegra™ 64R).
- ▶ 70% Ethanol mit DEPC-Wasser frisch ansetzen, da bei längerer Lagerung der Ethanol-Gehalt durch Verdunstung sinkt. 600 µl zu homogenisiertem Lysat hinzugeben und vorsichtig resuspendieren.
- ▶ 2-mal 600 µl Probe auf RNeasy mini spin-Säule auftragen und 15 sec bei 13000 RPM zentrifugieren. Zentrifugationsprodukt jedesmal verwerfen.
- ▶ 350 µl Puffer RW1 auf die RNeasy-Säule pipettieren und 15 sec bei 13000 RPM zentrifugiert. Zentrifugationsprodukt erneut verwerfen.
- ▶ Für jeden Ansatz 10,5 µl der RNase-freien DNase-Stammlösung mit 73,5 µl Puffer RDD vorsichtig mischen (auf keinen Fall vortexen). Zuvor lyophilisierte RNase-freie DNase I in 550 µl des mitgelieferten RNase-freien Wassers vorsichtig lösen und sorgfältig resuspendieren.
- ▶ Jeweils 80 µl des DNase-Inkubationsmixes vorsichtig auf die Membran der RNeasy-Säulchen pipettieren und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- ▶ 350µl Puffer RW1 auf die RNeasy-Säule pipettieren und 15 sec bei 13000 RPM zentrifugieren.
- ▶ RNeasy-Säulchen in neues 2 ml Sammeltube überführen, 500 µl Puffer RPE in die Säule pipettieren, 15 sec bei 13000 RPM zentrifugieren. Zentrifugationsergebnis entfernen.
- ▶ Erneut 500 µl Puffer RPE auf die Säule geben, 2 min bei 13000 RPM zentrifugieren und Durchbruch möglichst vollständig entfernen.
- ▶ 1 min bei 13000 RPM zentrifugieren.

- ▶ RNeasy-Säulchen in 1,5 ml Sammeltube überführen, zur Elution der RNA 30 µl des mitgelieferten RNase-freien Wassers direkt auf die Membran der RNeasy-Säulchen pipettieren und 1 min bei 13000 RPM zentrifugieren. Ab diesem Schritt wird auf Eis weitergearbeitet.
- ▶ Bestimmung der RNA-Ausbeute in Aliquot des Eluats mit Hilfe eines Photometers (Ultraspec 3000). Dazu 65 µl DEPC-Wasser mit 5 µl RNase-freiem Wasser als Nullabgleich verwenden. Anschließend 65 µl DEPC-Wasser mit 5 µl Eluat für die Messung benutzen.
- ▶ RNA-Lösung gegebenenfalls bei -20 °C einfrieren.

2.1.7.2. Reverse Transkription mit Omniscript RT

Zur reversen Transkription benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

Omniscript RT, Protector RNase-Inhibitor, 100 µl und 10 µl Pipetten mit entsprechenden PCR Spitzen, sterile PCR Reaktionscaps.

Protokoll „*cDNA-Synthese*“:

- ▶ Primer-Lösungen, 10X RT-Puffer, dNTP-Mix und RNase-freies Wasser bei Raumtemperatur auftauen, alles auf Eis stellen.
- ▶ Die nachfolgende Vorschrift setzt veränderte Konzentrationen der verwendeten Primer ein:

Oligo-dT-Primer	20 µM
Random-Hexamer-Primer	0,1 mM

Um pipettierbare Volumina zu erhalten, ist es gegebenenfalls notwendig den RNase-Inhibitor mit 1X RT-Puffer zu verdünnen. Sämtliche Verdünnungen erfolgen entsprechend Tabelle 3.

Tab. 3: Verdünnung der benötigten Reagenzien.

Reagenzien	Verdünnung	Neue Konzentration
Oligo-dT-Primer (160 µM)	Ein Teil Primer und 7 Teile RNase-freies Wasser	20 µM
Random-Hexamer (1 mM)	Ein Teil Primer und 9 Teile RNase-freies Wasser	0,1 mM
10X RT-Puffer	Ein Teil 10fach RT-Puffer und 9 Teile RNase-freies Wasser	1fach
RNase-Inhibitor (50 units/µl)	Ein Teil RNase-Inhibitor 4 Teile 1fach RT-Puffer	10 units/µl

- ▶ RNA-Lösung mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl auffüllen, so dass eine maximale RNA-Konzentration von 2 µg/ml eingehalten wird.
- ▶ Vorbereitung des Master-Mixes (siehe Tabelle 4). Sorgfältig vortexen. Bei paralleler Durchführung mehrerer Reaktionen wird, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, 10 % vom eigentlich benötigten Volumen mehr angesetzt.. Um eine frühzeitige Reaktion zu vermeiden, Omniscript RT erst kurz vor Zugabe des Master Mixes in denaturierte RNA-Lösung in Master Mix geben.

Tab. 4: Volumina der Reagenzien, die für einen Reaktionsansatz benötigt wird.

Reagenzien	Menge in µl
10X RT-Puffer	2
dNTP-Mix (5 mM each)	2
Oligo-dT-Primer (20 µM)	1
Random-Hexamer (0,1 mM)	1
RNase-Inhibitor (10 units/µl)	1
Omniscript RT (4 units/µl)	1

- ▶ Zur Denaturierung 5 min bei 65 °C inkubieren, anschließend sofort auf Eis überführen.

- ▶ Je 8 µl des Master Mixes zur denaturierten RNA pipettieren (Gesamtvolumen dann 20 µl), sorgfältig mischen. Bei Bedarf kurz abzentrifugieren.
- ▶ Reaktionsablauf im Robocycler[®] ohne beheizten Deckel starten:
 - 60 min bei 37 °C inkubieren
 - 60 min bei 42 °C inkubieren
- ▶ cDNA mit 80 µl sterilem Wasser verdünnen und bei –20 °C einfrieren.

2.1.7.3. PCR mit HotStarTaq Master Mix

Zur PCR benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

HotStarTaq Master Mix Kit, 2,5 µl Etidiumbromid, 1 g SeaKem[®] LE agarose, 50 ml TBE Puffer 1x, 100 µl, 20 µl und 10 µl Pipetten mit entsprechenden PCR Spitzen, sterile PCR Reaktionscaps.

Protokoll „PCR“:

- ▶ Die Probe, die man bei der reversen Transkription erhält, wird nach folgendem Schema weiterverarbeitet.
- ▶ Alle Reagenzien auf Eis auftauen und vor Gebrauch vortexen (Vortex-Genie[™]).
- ▶ Herstellung der Stammlösung mit HotStarTaq Master Mix und Aqua dest. (Mengenangaben siehe Tabelle 5). Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, wird 10 % vom eigentlich benötigten Volumen mehr angesetzt.

Tab. 5: Menge an Reagenzien, die für einen Reaktionsansatz benötigt wird.

Reagenzien	Menge in µl
HotStarTaq Master Mix	10
RNase-freies Wasser	6
Primer Mix	2
Probe	2

- ▶ Jeweils Probe und Primer Mix (bestehend aus 10 µl Forward Primer, 10 µl Reverse Primer und 80 µl steriles Aqua dest.) in PCR-Reaktionsgefäß geben.
- ▶ Pro Reaktionsgefäß 16 µl Stammlösung hinzupipettieren.
- ▶ Zentrifugation 1 min bei 1000 U/min.
- ▶ Proben in PCR-Gerät (Robocycler[®] Gradient 96) platzieren und Gerät starten. Es werden zwei unterschiedliche Programme verwendet. Da für die VEGF Rezeptoren in Vorversuchen eine niedrige Genexpression nachgewiesen wurde, nutzt man bei den PCR-Ansätzen mit VEGF-R1, -R2 und -R3 Primern ein Programm mit 40 Zyklen: Inkubation der Proben für 14 min bei 96 °C, gefolgt von 40 Zyklen mit jeweils 1 min bei 94 °C, 45 s bei 60 °C und 1 min bei 72 °C. Bei allen anderen Primern wird ein PCR-Programm mit 32 Zyklen verwendet.
- ▶ Zu jeder Probe 5 µl Bromphenolblau hinzugeben und gut resuspendieren.
- ▶ 2%iges Agarosegel herstellen: 1 g SeaKem[®] LE agarose in 50 ml TBE Puffer unter Erhitzen auflösen. Anschließend unter Rühren 2,5 µl Etidiumbromid hinzugeben und in Gelkammer erkalten lassen.
- ▶ Pro Geltasche jeweils 10 µl Probe auftragen.
- ▶ Gelelektrophorese mit Agarosegel 30 min bei 120 V und einer Stromstärke von 20 mA (Stromnetzteil Standard Power Pack P25).
- ▶ Gel dokumentieren mit ImageMaster[®] VDS (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

2.1.8. Quantitative PCR mit TaqMan

Die quantitative PCR wurde, mit der Zielsetzung Aufschluss über den Zusammenhang zwischen der VEGF-R1 bis -R3 Expression und der MSZ-Differenzierung zu erlangen, durchgeführt. Für die verschiedenen Differenzierungsgrade setzte man drei unterschiedliche Zellpopulationen ein: MSZ, dOB und OB. Die Quantifizierung erfolgte für jeden Rezeptor anhand von 3fach Bestimmungen.

Zur quantitativen PCR benötigte Materialien, Lösungen und Medien:

Brilliant[®] SYBR[®] Green QPCR MM, TaqMan[®] 7000, TaqMan[®] 96 Well Platte, steriles Aqua dest., 1000 µl, 100 µl, 20 µl und 10 µl Pipetten mit entsprechenden PCR Spitzen.

Protokoll „*quantitative RT-PCR*“:

- ▶ Zuerst erfolgt die Einstellung der korrekten Primer- bzw. cDNA-Konzentrationen:
 - Primer: Sowohl die Forward- als auch die Reversprimer sind in einer Stammlösung mit einer Konz. von 100 pmol vorhanden. Es erfolgt die Einstellung auf eine Konzentration von 20 pmol.
 - cDNA: Die Verdünnung wird, wie bereits in Abschnitt 2.4. b) Reverse Transkription mit Omniscript beschrieben, Tabelle 3, Seite 35, angesetzt.
- ▶ Zudem sind Forward- und Reversprimer-Mischungen notwendig (siehe Tabelle 6).

Tab. 6: VEGF Rezeptor Primer-Mix basierend auf einer Konz. von jeweils 20 pmol für 25 Ansätze. VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor.

Anteil Primer	Forward [µl]	Revers [µl]	Verhältnis Forward/Revers	H₂O [µl]
VEGF-R1	7,5	7,5	1	52,5
VEGF-R2	22,5	7,5	3	37,5
VEGF-R3	22,5	7,5	3	37,5

- ▶ Herstellung des Mastermix für 13 Ansätze:
 - 52 µl cDNA
 - 162,5 µl SYBR[®] Green
 - 75,4 µl H₂O
- ▶ Die Ansätze werden entsprechend Abbildung 13 pipettiert, wobei die 18s RNA Probe als Abgleichsprobe zur Quantifizierung verwendet wird. Für jedes Well werden folgende Reagenzien verwendet:
 - 4 µl cDNA
 - 12,5 µl SYBR[®] Green
 - 5,8 µl H₂O
 - 2,7 µl Primer-Mix

} Mastermix

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		
B	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		
C	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		
D	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		
E	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		
F	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		
G	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		
H	18s RNA			VEGF-R1			VEGF-R2			VEGF-R3		

Abb. 13: Pipettierschema für eine TaqMan[®] 96 Wellplatte. Für jeden Ansatz wurde eine Triplette verwendet.

- ▶ Als Housekeeping Gene 18s RNA verwenden.
- ▶ TaqMan[®] Programm auf 40 Zyklen mit jeweils 15 s bei 95°C und 1 min bei 60°C einstellen.
- ▶ Speichern und Auswertung der Daten.
- ▶ Ergebnisse mit relative quantification method ($\Delta\Delta CT$) mittels ABI Prism 7000 Sequence Detection System V1.1 auswerten.
- ▶ Die $\Delta\Delta CT$ der Amplifikate zur Genexpression in primären Osteoblasten normieren.

3. Statistik

Zur Auswertung der Daten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Zur Signifikanztestung wurde der Student's t-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde für $p < 0,05$ definiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Zelltypisierung und Zellcharakterisierung

3.1.1. Humane multipotente Stromazellen

Um nachzuweisen, dass es sich bei den Versuchszellen um multipotente Stromazellen (MSZ) handelt und um sicher zu gehen, dass keine andere Zellsubpopulation die chemotaktische Stimulation beeinflusst, wurden unterschiedliche Verfahren angewandt. Aufgrund von FACS Analysen mit MSZ spezifischen Oberflächenmarkern konnte bei den verwendeten Zellen von einer 90-95% homologen Population ausgegangen werden [Fickert et al., 2004].

Zusätzlich wurden die MSZ mittels weiterer Methoden auf ihren Stammzellcharakter geprüft: Magnetic Adsorbant Cell Separation (MACS), immunhistologische Färbungen und molekularbiologische Analysen.

Um einen chemotaktischen Einfluss von endothelialen Progenitorzell-Subpopulationen auszuschließen, wurde zunächst eine Magnetic Adsorbant Cell Separation (MACS) mit Anti CD34 Antikörpern durchgeführt [Hirohata et al, 2004]. Durchschnittlich wurde ca. 1% der Gesamtzellzahl als CD34 positiv detektiert. Dies spricht für eine bereits vor der MACS- Separation sehr homogene MSZ Kultur.

Nach erfolgter Separation wurden sowohl die CD34 negativen als auch die CD34 positiven Zellen zusätzlich mittels immunhistochemischen Färbungen auf Stammzell-typische Oberflächenmarker geprüft. Bei allen verwendeten Oberflächenmarkern ist eine Expression bei MSZ nachgewiesen [Fickert et al., 2004]. Die Färbungen wurden mit Antikörpern gegen folgende Oberflächenrezeptoren durchgeführt: CD9, CD54, CD90 und CD166.

Die mittels MACS separierten CD34 *positiven* Zellen zeigen in der durchgeführten immunhistologischen Färbung nachfolgenden Oberflächenmarkerstatus:

- CD9 positiv
- CD90 positiv

- CD166 negativ

Zur Charakterisierung der CD34 *negativen* MSZ wurde ebenfalls eine Immunfärbung mit den o.g. Oberflächenrezeptoren durchgeführt. Hierfür wurde, wie bereits in Kapitel A 2.6. Chemotaxis Seite 26 beschrieben, ein Chemotaxisansatz mit 16 Wells VEGF-A [10 ng/ml], 4 Wells Positivkontrolle und 4 Wells Negativkontrolle vorgenommen. Der Filter wurde gemäß Protokoll gefärbt.

Dabei ließen sich sowohl für sämtliche gewanderten Zellen als auch für jeden getesteten Oberflächenmarker eine positive Rotfärbung nachweisen (Abbildung 14).

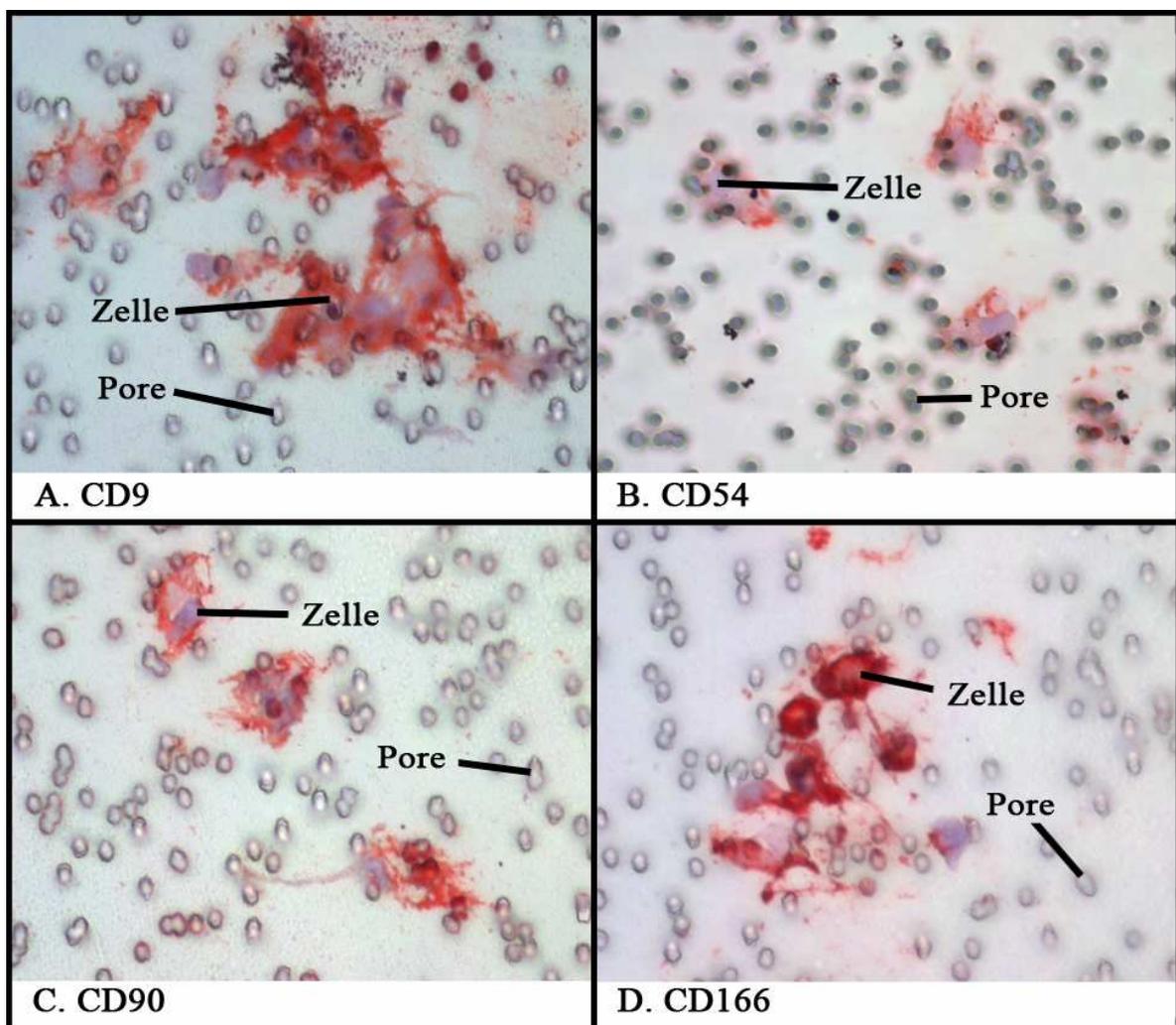


Abb. 14: Positive immunhistologische Färbung der MSZ für die unterschiedlichen Oberflächenmarkern bei jeweils 40 facher Vergrößerung.

A. CD9 positive MSZs, B. CD54 positive MSZs, C. CD90 positive MSZs und D. CD166 positive MSZs

Aufgrund der durchweg positiven immunhistochemischen Austestung für Stammzell-typische Oberflächenrezeptoren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Zellpopulation um multipotente Stromazellen handelt.

Bei der molekularbiologischen Untersuchung wurde neben den oben bereits erwähnten Oberflächenrezeptoren zusätzlich die Genexpression unterschiedlicher Proteine ermittelt. Dabei erfolgte die Überprüfung der MSZ und osteogen differenzierter MSZ (dOB) sowohl auf die Expression von VEGF Rezeptoren (VEGF-R1, -R2 und -R3) als auch die Genexpression von Proteinen, die mit VEGF Rezeptoren interagieren: Neuropilin 1 und 2. Zur Prüfung des Differenzierungsgrades wurden die alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (OC) bestimmt. Dabei war die Expression von alkalischer Phosphatase und OC bei MSZs nicht oder kaum nachweisbar.

Das dargestellte Genexpressionsmuster spiegelte sich bei allen in den Chemotaxisansätzen verwendeten MSZ wieder (Abbildung 15). Neben den VEGF Rezeptoren wies hierbei lediglich die Expression von Osteocalcin und der ALP Schwankungen auf. Auf den Rezeptorstatus wird in Kapitel 3. VEGF Rezeptorexpression bei MSZ und dOB, Seite 48, näher eingegangen.

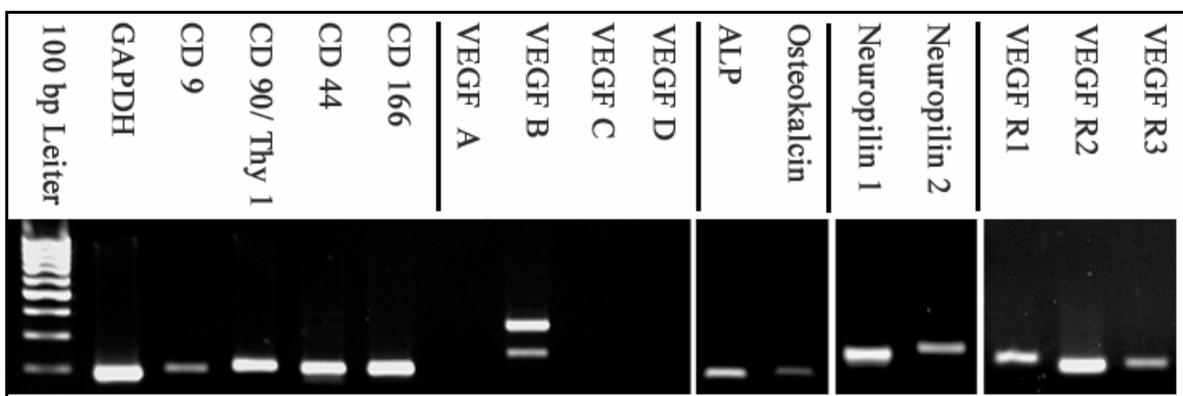


Abb. 15: Genexpression bei multipotenten Stromazellen (MSZ)..

Zur Amplifikation von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Receptor 1, -R2 und -R3 wurden 40 Zyklen durchgeführt (1 min bei 94 °C , 45 s bei 60 °C, 1 min bei 72 °C).

Die Genexpression der osteogen differenzierten MSZ (dOB) wurde anhand der gleichen Primer ermittelt, wie sie zuvor für die MSZ Charakterisierung verwendet wurden. Die Versuche zeigten bei allen PCR Ansätzen mit dOB ein vergleichbares Expressionsmuster

(siehe Abbildung 16). Im Vergleich zum Expressionsmuster der MSZ zeigten sich Unterschiede bzgl. der Amplifikation von ALP, Osteokalcin, VEGF-R1, -R2 und -R3.

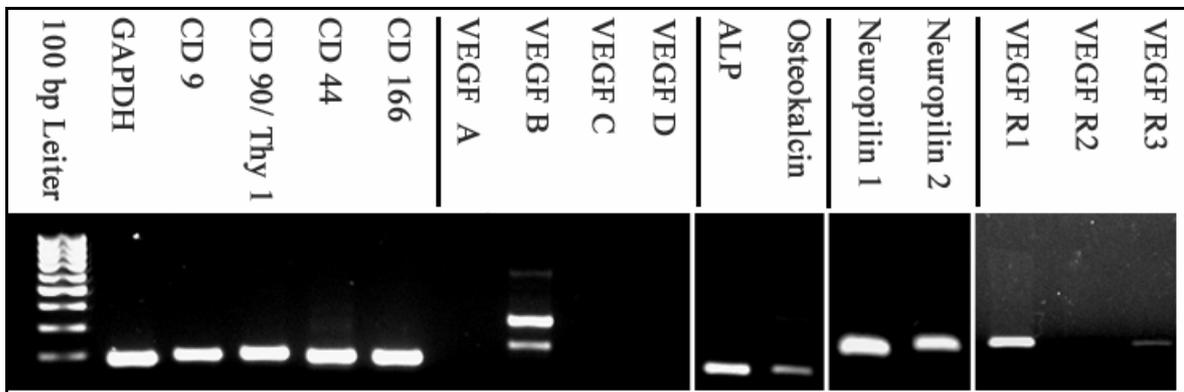


Abb. 16: Genexpression bei differenzierten Osteoblasten (dOB).

Zur Amplifikation von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Receptor 1, -R2 und -R3 wurden 40 Zyklen durchgeführt (1 min bei 94 °C, 45 s bei 60 °C, 1 min bei 72 °C).

Ein Genexpressionsmuster, vergleichbar mit dem osteogen differenzierter Osteoblasten, lies sich für CD34 positiven Zellen nachweisen. Hier zeigten sich insbesondere Unterschiede für die Expression der VEGF Rezeptoren (siehe Abbildung 17).

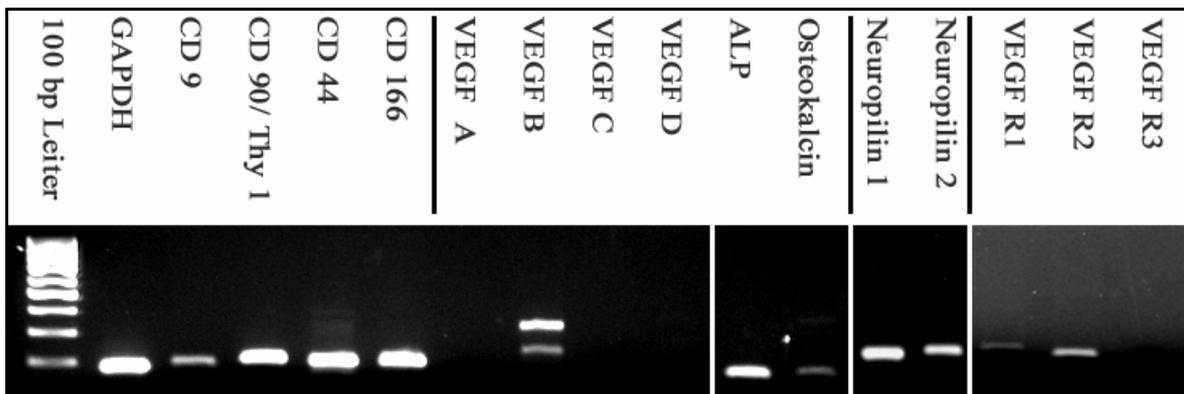


Abb. 17: Genexpression bei CD34 positiven Zellen (Cluster of Differentiation).

Zur Amplifikation von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Receptor 1, -R2 und -R3 wurden 40 Zyklen durchgeführt (1 min bei 94 °C, 45 s bei 60 °C, 1 min bei 72 °C).

3.2. Chemotaxis

3.2.1. Chemotaxis bei VEGF-A stimulierten MSZ

Bei den Chemotaxisansätzen mit der Stimulation von MSZ mit VEGF-A zeigte sich, dass die Progenitorzellen einer dosisabhängigen Migration unterlagen. Dementsprechend wurde bei steigenden VEGF-A Konzentrationen korrespondierend höhere CI Werte beobachtet. Im Durchschnitt wurden 20 Zellen in der Negativkontrolle und mehr als 500 Zellen in der Positivkontrolle detektiert.

Bei Stimulation durch VEGF-A stellte sich eine Migration von ca. 40 Zellen ein. Bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml wurde nur eine geringe Stimulation der Zellmigration beobachtet. Aufgrund der Streuung kann daher ein chemotaktischer Effekt bei der geringen Konzentration ausgeschlossen werden.

Bei einer Konzentration von 10 ng/ml wurde ein maximaler chemotaktischer Index (CI) von 2,7 ($\pm 1,08$) erfasst (Abbildung 18). Dieser Wert liegt im Rahmen bereits bekannten Daten bei primären humanen Osteoblasten [Mayr-Wohlfahrt et al., 2002]. Bei Betrachtung der absolut gewanderten Zellzahl zeigte sich wie in Abbildung 19 ersichtlich beim Student's t-Test eine Signifikanz für sämtliche Konzentrationen bei Testung gegen die Negativkontrolle, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angesetzt wurde.

Eine Checkerboard-Analyse bzgl. VEGF-A und MSZ wurde bereits im Zusammenhang einer anderen Veröffentlichung durchgeführt [Fiedler et al., 2005]. Dabei zeigte sich eine zum Gradienten gerichtete Zellwanderung.

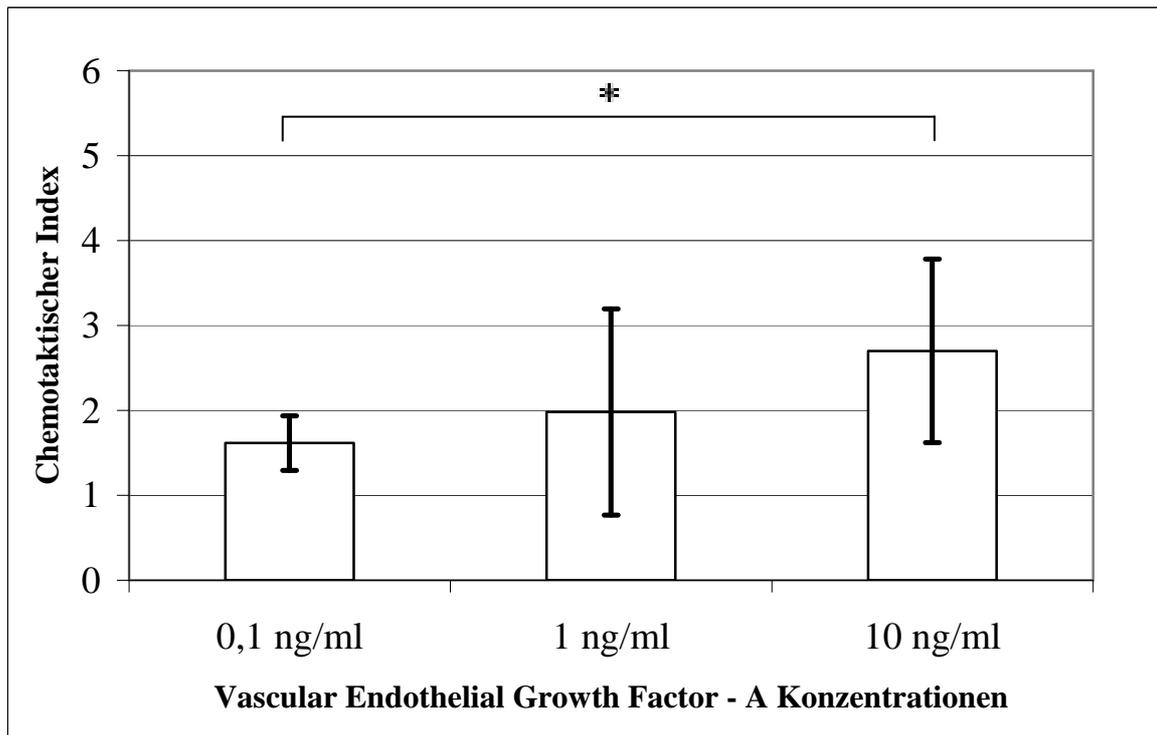


Abb. 18: Dosisabhängige Zellwanderung von multipotenten Stromazellen (MSZ) bezüglich Vascular Endothelial Growth Factor A. Dargestellt ist die Chemotaxis von 8 Versuchen, wobei die Mittelwerte und die Standardabweichung (Fehlerbalken) abgebildet sind. Die Signifikanz wurde berechnet nach "studentischer T-Test": Signifikanz für 0,1 ng/ml vs. 10 ng/ml * ($p < 0,05$).

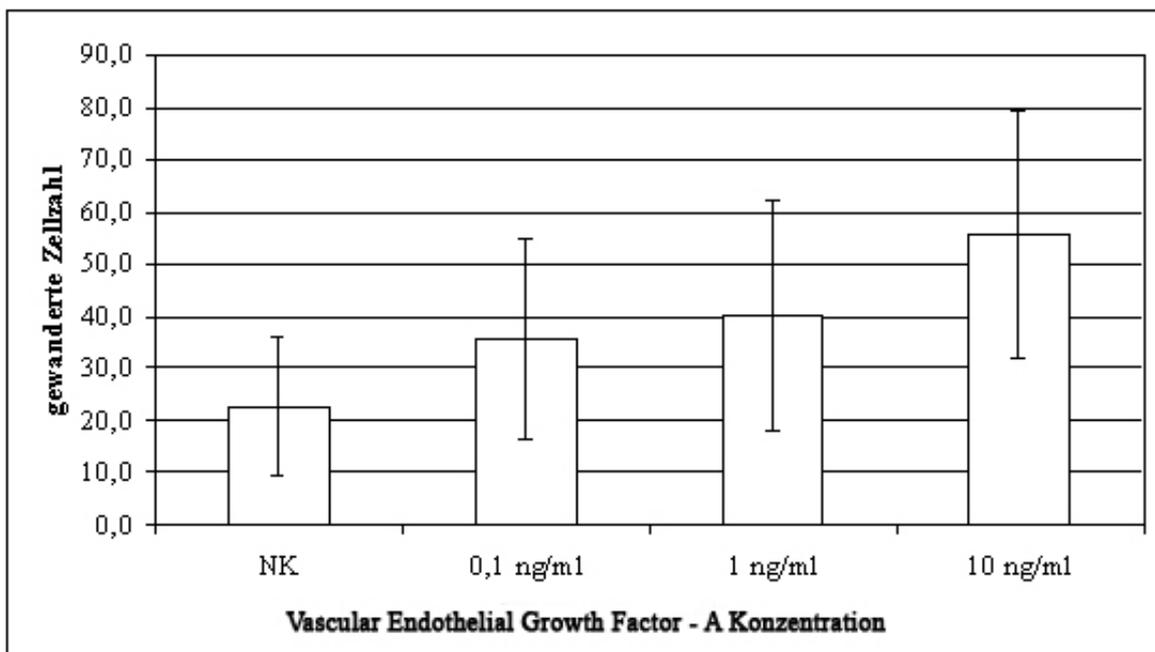


Abb. 19: Dosisabhängige Zellwanderung von multipotenten Stromazellen (MSZ) bezüglich Vascular Endothelial Growth Factor A. Dargestellt ist die Chemotaxis von 8 Versuchen, wobei die Mittelwerte und die Standardabweichung abgebildet sind. Fehlerbalken entsprechen dem Durchschnittswert \pm Standard Deviation.

3.2.2. Chemotaxis bei PIGF-1 stimulierten MSZ

Ein weiterer bekannter Faktor für Chemotaxis in Zusammenhang mit VEGF-Rezeptoren ist PIGF. Da für VEGF-A eine Bindung sowohl an VEGF-R1 als auch an VEGF-R2 nachgewiesen ist, und im Gegensatz dazu PIGF ausschließlich mit VEGF-R1 interagiert [Shibuya, 2001], ist es möglich den für die Chemotaxis bei MSZ verantwortlichen VEGF-Rezeptor zu identifizieren.

In den folgenden Experimenten wurde überprüft, ob dieser Zusammenhang auch für MSZ gilt. Zudem sollten die Versuchsansätze Aufschluss darüber geben, welcher Rezeptor bzw. Rezeptoren an der Chemotaxis bei MSZ beteiligt ist.

In einer Checkerboardanalyse konnte für positive PIGF-1 Konzentrationsgradienten eine Chemotaxis nachgewiesen und somit eine Chemokinese ausgeschlossen werden.

Die Anzahl der gewanderten Zellen (MSZ) bei einer Stimulation mit PIGF betrug im Durchschnitt 70 Zellen.

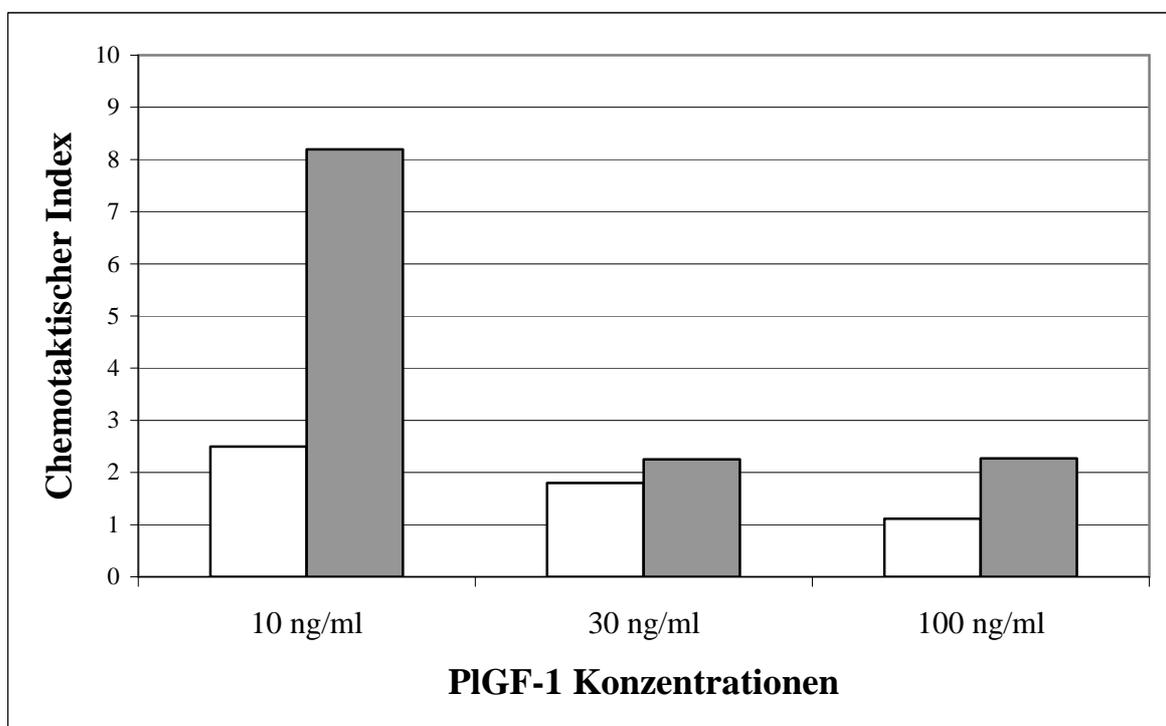


Abb. 20: Dosisabhängige Zellwanderung von multipotenten Stromazellen (MSZ) bzgl. Placenta Growth Factor – 1 (PIGF-1). Dargestellt ist die Chemotaxis von zwei Versuchen.

In Anlehnung bereits veröffentlichter Daten wurden für die Experimente mit PIGF Konzentrationen von 10 ng/ml, 30 ng/ml und 100 ng/ml verwendet. Bei den Chemotaxisansätzen mit PIGF-1 konnte ebenfalls, wie in Abbildung 20 ersichtlich, eine dosisabhängige Zellmigration beobachtet werden: Steigende PIGF-1 Konzentrationen führten zu abnehmenden CI-Werten. Bei zwei Chemotaxisansätzen wurde für die Konzentration von 10 ng/ml PIGF-1 ein CI von 5,3 ($\pm 4,03$) ermittelt.

3.2.3. Chemotaxis bei VEGF-A stimulierten CD34 positiven Zellen

Bei den CD34 positiven Zellen könnte es sich eventuell um eine endotheliale Subpopulation handeln. Um dies nachzuweisen wurde neben molekularbiologischen Methoden ein Chemotaxisansatz durchgeführt.

Was die CD34 positiven Zellen angeht, wurde im Vergleich zu den o. g. Chemotaxisansätzen der MSZ eine ähnliche Konzentrations-CI-Abhängigkeit beobachtet, jedoch mit geringerem Effekt auf die Zellmigration, so dass bei einer VEGF-A Konzentration von 10 ng/ml ein maximaler CI von 1,3 bestimmt wurde (Abbildung 21).

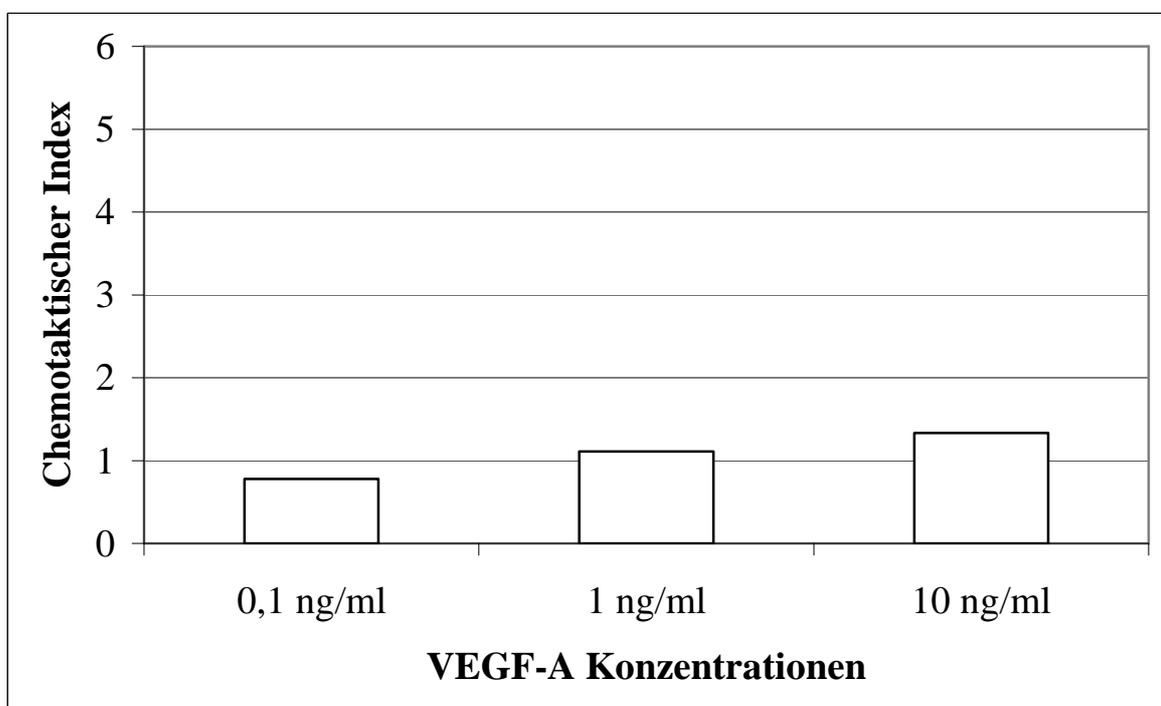


Abb. 21: Dosisabhängige Zellwanderung von CD34 positiven Zellen (Cluster of Differentiation) bzgl. Vascular Endothelial Growth Factor – A (VEGF-A). Dargestellt ist die Chemotaxis eines Versuches.

3.2.4. Chemotaxis bei VEGF-A stimulierten osteogen differenzierten humanen multipotenten Stromazellen

Nach Abschluss der osteogenen Differenzierung isolierter MSZ wurden ebenfalls Chemotaxisversuche vorgenommen.

Die Stimulation von dOB führte zu einer dosisabhängigen Zellmigration, wobei eine steigende VEGF-A Konzentration einen erhöhten chemotaktischen Index bewirkte. So korreliert der CI 1,6 ($\pm 0,47$) mit einer VEGF-A Konzentration von 10 ng/ml (Abbildung 22). Dieser Wert liegt im Rahmen bereits bekannten Daten bei primären humanen Osteoblasten [Mayr-Wohlfahrt et al., 2002]. Beim Student's t-Test zeigte sich bzgl. der absolut gewanderten Zellzahl gegen die Negativkontrolle eine Signifikanz für 1 ng/ml.

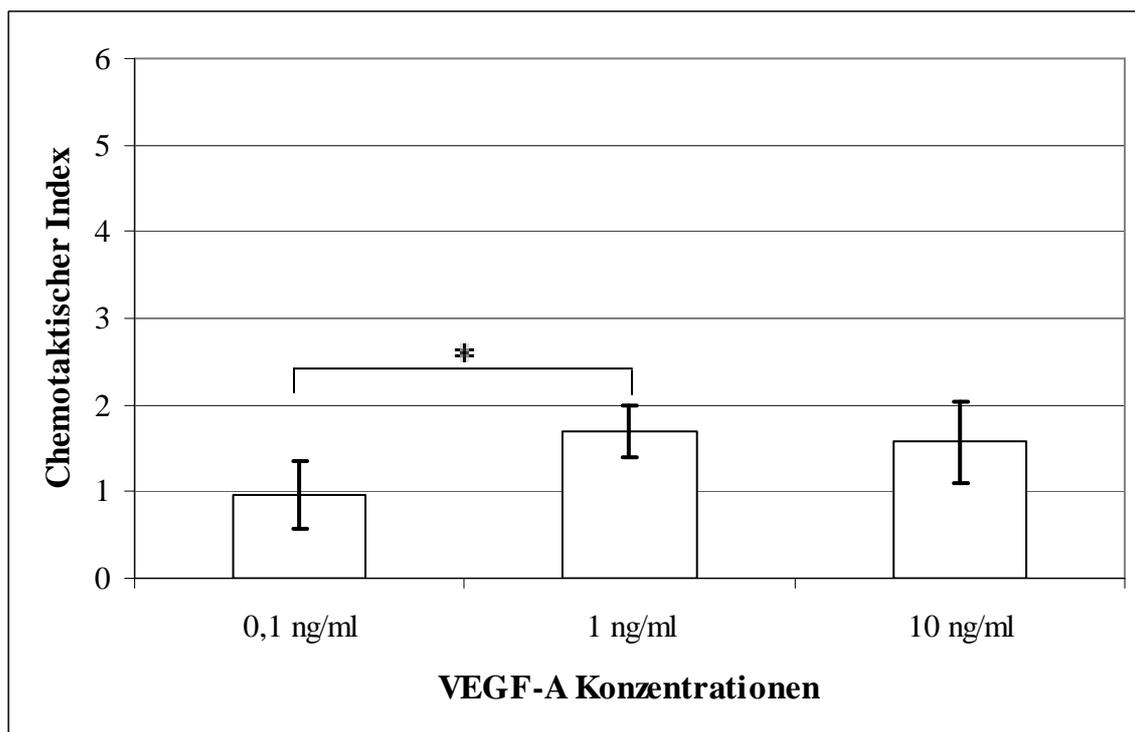


Abb. 22: Dosisabhängige Zellwanderung von osteogen differenzierten multipotenten Stromazellen (dOB) bzgl. Vascular Endothelial Growth Factor – A (VEGF-A). Dargestellt ist die Chemotaxis von 4 Versuchen, wobei die Mittelwerte und die Standardabweichung abgebildet sind. Die Signifikanz wurde berechnet nach "studentische T-Test", wobei $p < 0,05$ als signifikant erachtet wurden *. Fehlerbalken entsprechen dem Durchschnittswert \pm SD.

3.3. VEGF Rezeptorexpression bei MSZ und dOB

Bislang gibt es nur wenige Daten über die Genexpression von VEGF Rezeptoren (VEGF-R1 bis -R3) bei MSZ. Um herauszufinden welche Rezeptoren bei der Chemotaxis mit VEGF-A eine Rolle spielen, wurde die VEGF Rezeptorexpression sowohl mit Hilfe immunhistologischer Verfahren als auch molekularbiologisch anhand von PCR Analysen untersucht. Zudem erfolgte die Überprüfung der MSZ und dOB hinsichtlich der Genexpression von Proteinen, die mit VEGF Rezeptoren interagieren: Neuropilin 1 und 2. Letztlich erfolgte eine relative Quantifizierung der Rezeptoren auf Ebene der Genexpression sowohl bei MSZ als auch bei dOB mittels einer quantitativen Realtime PCR mit TaqMan.

3.3.1. Analysen der VEGF-Rezeptor Expression

Die Expression der VEGF Rezeptoren, Neuropilin-1 und -2 sind in Abbildung 23B dargestellt. Es ließen sich sowohl bei MSZ als auch bei dOB alle o. g. Marker nachweisen. Es hat den Anschein, dass die Genexpression der VEGF-R1 bis -R3 bei den osteogen differenzierten MSZ niedriger als bei den MSZ sind (Abbildung 23A).

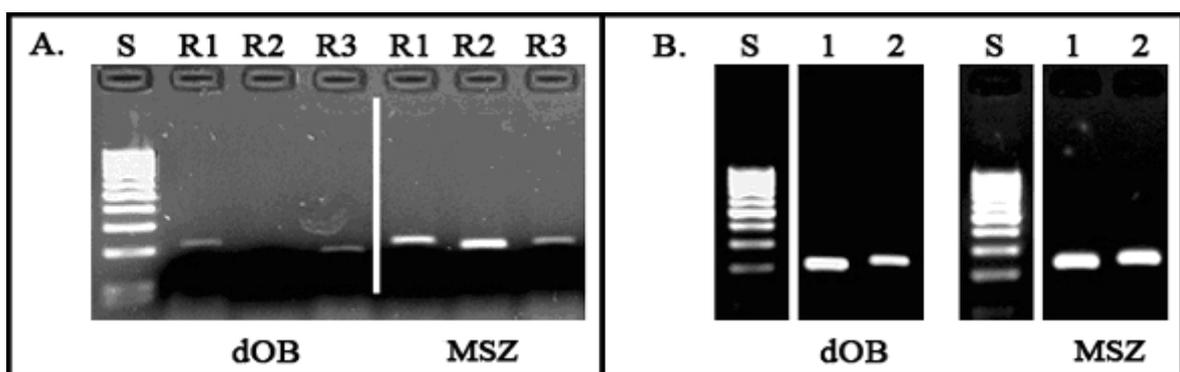


Abb. 23:A. VEGF Rezeptor Expression bei multipotenten Stromazellen (MSZ) und osteogen differenzierten MSZ (dOB). Die Differenzierung führte zu einer Abnahme der Rezeptorexpression.

Zur Amplifikation der VEGF Rezeptoren wurden 40 Zyklen mit je 1 min bei 94 °C , 45 s bei 60 °C und 1 min bei 72 °C durchgeführt (S 100Bp Leiter, R1 VEGF-R1, R2 VEGF-R2, R3 VEGF-R3).

B. Nachweis einer Neuropilin Amplifikation sowohl in MSZ als auch in dOB (S 100Bp Leiter, 1 Neuropilin 1, 2 Neuropilin 2).

3.3.2. Immunhistologische Färbung mit VEGF-R1/FLT-1

Als Zellmaterial wurden MSZ verwendet, die aufgrund der Stimulation durch VEGF-A bei einem Chemotaxisansatz (VEGF-A Konzentration 10 ng/ml) durch den Filter migriert sind. Bei der durchgeführten immunhistologischen Färbung zeigt sich, dass alle gewanderten Zellen bzgl. FLT-1 positiv sind (Abbildung 24).

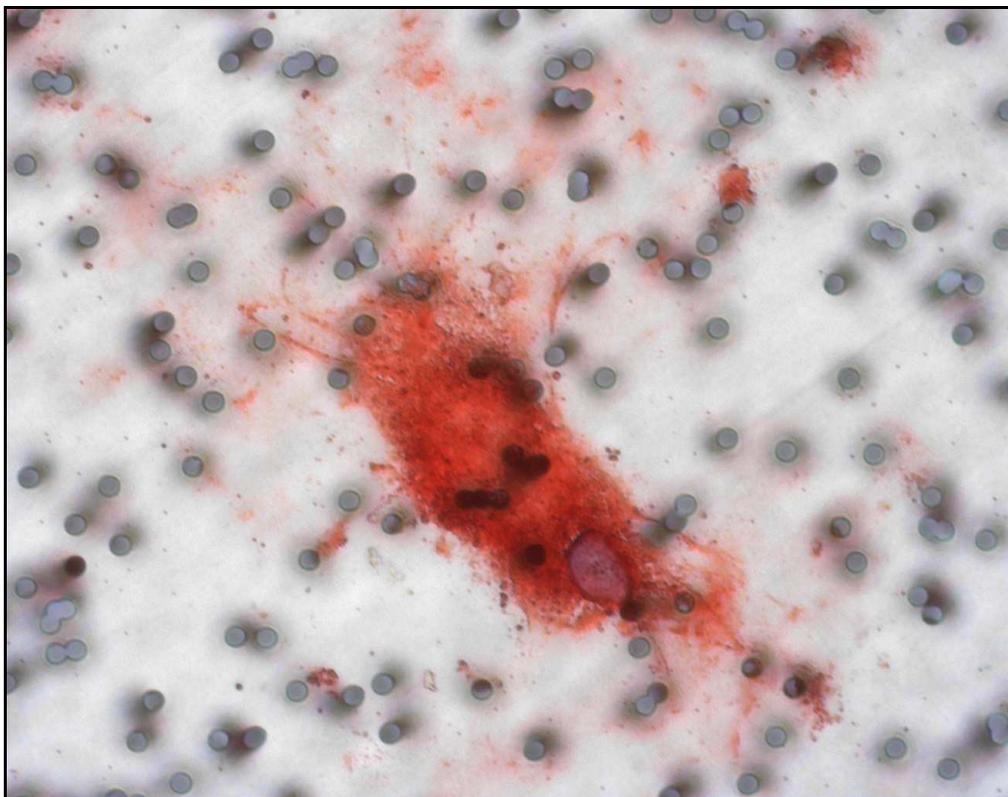


Abb. 24: FLT-1 positive multipotente Stromazelle bei 40 facher Vergrößerung.

3.3.3. Quantitative PCR mittels “real time PCR” TaqMan

Um herauszufinden, welche Rezeptoren bei der Chemotaxis mit VEGF-A eine Rolle spielen, und in welchem Ausmaß sie in den verwendeten Zellen (MSZ und dOB) exprimiert werden, wurde eine quantitative PCR mittels TaqMan durchgeführt.

Die relative Quantifizierung von VEGF R1, -R2 und -R3 zeigte bei multipotenten Stromazellen (MSZ) eine 10 fach höhere Expression aller drei Rezeptoren, während im Gegensatz dazu nach einer osteogenen Differenzierung (dOB) die relative Menge vergleichbar der primärer Osteoblasten war (Abbildung 25).

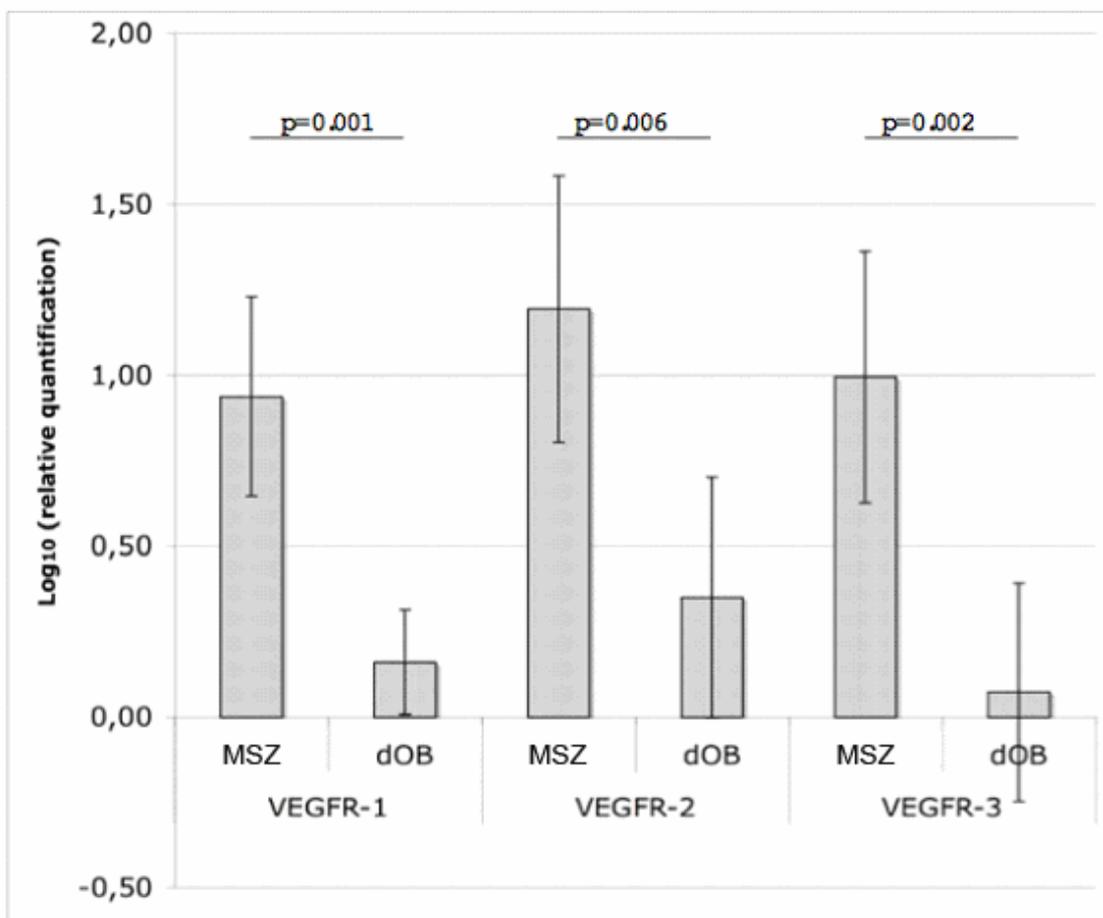


Abb. 25: Relative Quantifikation von VEGF-R1, -R2 und -R3 bei bei multipotenten Stromazellen (MSZ) und osteogen differenzierten MSZ (dOB).

$\Delta\Delta CT$ der Amplifikate wurde zur Genexpression in primären Osteoblasten normiert. [$n(\text{MSZ})=6$, $n(\text{dOB})=5$]. T-Test Werte $<0,01$ wurden als signifikant erachtet.

4. DISKUSSION

Der chemotaktische Effekt ist sowohl für VEGF-A als auch für PlGF-1 bereits bei unterschiedlichen Zelltypen beschrieben. Unter anderem konnte die Stimulation einer Chemotaxis neben Osteosarkomzellen (SaOS-2) auch für humane und von Ratten stammende Osteoblasten nachgewiesen werden [Mayr-Wohlfahrt et al., 2002] und [Lind et al., 1996]. Über einen möglichen chemotaktischen Effekt von VEGF auf humane multipotente Stromazellen aus dem Knochenmark (MSZ) oder über die beteiligten VEGF Rezeptoren, die für eine Vermittlung chemotaktischer Signale bei MSZ verantwortlich sind, ist die Datenlage aktuell unzureichend.

Die vorliegende Arbeit erweiterte das Wissen vor allem dahingehend, dass

- bei MSZ durch Stimulation mit VEGF-A und PlGF-1 eine Chemotaxis induziert werden kann.
- die VEGF-R1, -R2 und -R3 Rezeptorexpression bei MSZ im Vergleich zu primären und *in vitro* differenzierten Osteoblasten (dOB) deutlich höher ist.

4.1. Chemotaxis und Zellseparation

Ziel der Untersuchungen war es, neben dem chemotaktischen Effekt von VEGF auf MSZ, die beteiligten Rezeptoren zu identifizieren. Um dieser Problematik gerecht zu werden, wurde bei sämtlichen Versuchen darauf geachtet, möglichst homogene MSZ-Zellkulturen zu verwenden. Zur Realisierung einer homogenen Zellkultur kamen deshalb unterschiedliche Verfahren zum Einsatz.

Zunächst wurde eine Zellseparation mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt [Deans u. Mosley, 2000], gefolgt von der Direkt-Ausplattier-Methode [Friedenstein et al., 1976], welche die selektive Adhärenz der MSZs an Plastikoberflächen nutzt. Aufgrund von FACS Analysen mit MSZ spezifischen Oberflächenmarkern kann nach Abschluss dieser

Verfahren von einer 90-95% homologen Population ausgegangen werden [Fickert et al., 2004]. Um Subpopulationen unerwünschter Zellen, wie z.B. endothelialer Vorläuferzellen, auszuwählen, kamen neben o.g. zusätzliche Methoden zum Einsatz: Immunhistologische Färbungen, molekularbiologische Verfahren und die Magnetic Adsorbent Cell Separation (MACS).

In der Literatur sind gemeinsame hämatopoetische und mesenchymale Vorläuferzellen beschrieben [Huang et al., 1993], welche als CD34 positiv, CD38 negativ und HLA DR negativ identifiziert wurden. CD34 wird jedoch nicht bei ex vivo kultivierten MSZ exprimiert [Pittenger et al., 1999]. Neben o.g. Markern können zur Anreicherung von MSZ auch Stro-1 Antikörper verwendet werden [Simmons et al., 1994]. Bezüglich Stro-1 wurde hierbei eine Bindungsmöglichkeit für alle Zellen des menschlichen Knochenmarks nachgewiesen, die mit einer CFU-F Aktivität assoziiert sind [Simmons et al., 1991a],[Simmons et al., 1991b]. Jedoch ist im menschlichen Knochenmark die Stro-1 CFU-F Aktivität mit einer verminderten Genexpression von CD34 einhergehend. Zusätzlich konnte eine geringe CFU-F Aktivität auch bei Zellen mit nicht detektierbarer CD34-Expression nachgewiesen werden. In Anbetracht dieser Tatsache handelt es bei der *alleinigen* Detektion CD34 um keinen eindeutigen Marker bzgl. der Unterscheidung zwischen hämatopoetischen und mesenchymalen Zellreihen [Deans et al., 2000].

Mittels MACS wurden Subpopulationen unerwünschter Zellen, wie z.B. endothelialer Zellen, spezifisch selektiert und somit bei den Chemotaxisansätzen als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen. Durchschnittlich wurde ca. 1% der Gesamtzellzahl als CD34 positiv detektiert. Dies spricht für eine bereits vor der MACS- Separation sehr homogene MSZ Kultur.

Eine gerichtete Zellwanderung war sowohl durch VEGF-A als auch durch PlGF bei MSZ induzierbar. Für die Stimulation von MSZ mit VEGF-A wurde bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml nur eine geringe Chemotaxis mit einem CI von 1,5 ($\pm 0,36$) bestimmt. In Folge dessen kann ein chemotaktischer Effekt bei solch geringer Konzentration ausgeschlossen werden. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml wurde ein maximaler chemotaktischer Index (CI) von 2,4 ($\pm 1,13$) ermittelt.

Die Experimente mit der Kombination von PlGF und MSZ ergaben bei Stimulation mit 10 ng/ml einen CI von 5,3 ($\pm 4,03$), wobei eine deutliche Schwankung der CI-Werte bei einer Fallzahl n=2 zu registrieren war.

Die Chemotaxisversuche mit dOB und VEGF-A führten zu einer dosisabhängigen Zellmigration, hierbei korrelierte eine steigende VEGF-A Konzentration mit einem höheren chemotaktischen Index. So entsprach der CI mit 1,6 ($\pm 0,47$) bei einer Konzentration von 10 ng/ml VEGF-A einem im Vergleich mit MSZ deutlich niedrigerem CI-Wert.

Bzgl. der Stimulation von CD34 positiven Zellen mit VEGF-A konnte keine chemotaktische Wirkung nachgewiesen werden. Vielmehr handelte es sich bei den ermittelten CI-Werten um eine ungerichtete Zellwanderung, soweit dies mit einem Versuchsansatz beurteilbar war.

Zusammenfassend stellte sich ein positiver chemotaktischer Effekt bzgl. MSZ zum einen für VEGF-A und zum anderen für PlGF ein. VEGF-A ist es möglich mit VEGF-R1 und –R2 zu interagieren. Demgegenüber ist PlGF ausschließlich die Interaktion mit VEGF-R1 möglich [De Vries et al, 1992]. Um letztendlich zu klären, ob nicht auch andere VEGF Rezeptoren an der Vermittlung eines chemotaktischen Reizes mit involviert sind, wurden im Rahmen einer anderen Veröffentlichung Untersuchungen mit unterschiedlichen VEGF-Rezeptor Liganden angestellt [Fiedler et al., 2005].

Hinsichtlich der Liganden sind folgende Informationen bekannt:

- VEGF-E interagiert ausschließlich mit VEGF-R2,
- VEGF-C besitzt die Fähigkeit an VEGF-R2 und –R3 zu binden [Shibuya, 2001]
- VEGF-C_{152S} selektive Bindung an VEGF-R3 [Marrony et al., 2003].

Es zeigte sich, dass es weder VEGF-C noch VEGF-C_{152S} oder VEGF-E möglich war, eine Stimulation der Chemotaxis bei MSZ hervorzurufen [Fiedler et al., 2005]. Aufgrund dieser Tatsache und der oben genannten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Chemotaxis bei humanen multipotenten Stromazellen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch VEGF-R1 vermittelt wird.

4.2. Genexpressionsanalyse

Bei humanen MSZ, welche von zirkulierenden hämatopoetischen Zellen isoliert wurden, zeigte sich eine Koexpression für Osteoblasten charakteristischer Gene (ALP, OC und Osteopontin). Diese Tatsache wird dahingehend gedeutet, dass es sich bei MSZ um unabhängige Vorläuferzellen handelt [Rickard et al., 1996].

In Versuchen, bei denen eine Isolation mit Stro-1 Antikörpern durchgeführt wurden, konnten die Zellen anschließend ebenfalls für Thy-1 (CD90), VCAM-1 (CD106), CD29/CD49 (Integrinfamilie) CD10 und CD13 positiv detektiert werden. In Zusammenschau einiger Veröffentlichungen kann bei einer Zellkultur mit folgenden Oberflächenmarkern mit hoher Wahrscheinlichkeit von MSZ ausgegangen werden: CD9 positiv, CD34 negativ, CD44 positiv, CD54 positiv, CD90 positiv und CD166 positiv [Pittenger et al., 1999] und [Azizi et al., 1998].

Diese Marker konnten, mit Ausnahme der immunhistochemischen Färbung von CD166 bei CD34 positiven Zellen, bei sämtlichen verwendeten Spendern nachgewiesen werden (MSZ, dOB und CD34 negativ). Die negative immunhistochemische CD166 Färbung steht im Gegensatz zu dem PCR Ergebnis, wobei CD166 als positiv detektiert wurde. In Anbetracht dieser Tatsache lag möglicherweise eine Fehlbestimmung im Rahmen der immunhistochemischen Färbung vor.

Neben dem Nachweis der drei VEGF Rezeptoren, konnten zwei weitere Proteine, mit denen eine VEGF Interaktion möglich ist, identifiziert werden: Neuropilin-1 und -2. Sowohl Neuropilin-1 (NP-1) als auch Neuropilin-2 (NP-2) werden von MSZ und dOB exprimiert. Soker führte den Nachweis, dass VEGF-A für NP-1 und VEGF-R2 identische Bindungsaffinitäten besitzt. Zudem bewies er, dass bei einer gleichzeitigen Expression von NP-1 und VEGF-R2 eine 4fach höhere Bindung von VEGF-A am Rezeptor existiert [Soker et al., 1998]. NP-1 kann somit die biologische Aktivität von VEGF verändern. Beim humanen fetalen Herzen ist, abgesehen von MSZ, ebenfalls eine gleichzeitige Expression von NP-1 mit VEGF-R1 und -R2 im Endokard und in myokardialen Kapillaren

beschrieben. Demgegenüber wird in Koronargefäßen ausschließlich VEGF-R1 zusammen mit NP-1 exprimiert [Partanen et al., 1999].

Bislang war nicht nur eine Stimulation der Chemotaxis durch VEGF-A bei primären Osteoblasten beschrieben sondern auch die Genexpression von VEGF-R1 und -R2 [Deckers et al. 2000] und [Mayr-Wohlfahrt et al., 2002]. Die Daten zur Rezeptorexpression sind sehr unterschiedlich und zeigen deutliche Schwankungen. Neben geringer oder sehr hoher Expressionsraten beider Rezeptoren ist ebenso die Abwesenheit einer VEGF-R2 Expression dokumentiert [Wang et al., 1996], [Deckers et al., 2000] und [Gerber et al., 1999]. Mögliche Erklärungen dieser Heterogenität sind Alterseffekte, unterschiedliche Herkunft des Zellmaterials (Mensch oder Tier) und die Art der Zellkultur (primäres Zellmaterial oder Zelllinien).

Die MSZ wiesen im Vergleich zu den primären Osteoblasten eine relativ hohe Expression von VEGF-R1, R2 und -R3 auf. Es zeigten sich sämtliche Daten als statistisch signifikant, wobei Werte von $p < 0,01$ als signifikant erachtet wurden. Im Laufe der in vitro Differenzierung von MSZ zu dOB kann eine deutlich regrediente Rezeptorexpression beobachtet werden, analog zu derer primärer Osteoblasten. Während der relativen Quantifizierung der drei Rezeptoren mittels TaqMan (siehe Seite 38) zeigte sich bei MSZ im Vergleich zu dOB oder primärer Osteoblasten eine 10fach höhere Rezeptorexpression. Erstaunlicherweise ist es möglich, VEGF-R3 auf mRNA Ebene nachzuweisen. Dieser Rezeptor wird hauptsächlich in lymphatischem Endothel exprimiert [Garcia-Ramirez et al., 2000], [Kaipainen et al., 1995] und [Zachary, 2001] und von zwei Liganden aktiviert: VEGF-C und -D [Shibuya, 2001]. Untersuchungen an Mäusen zufolge führt ein Defekt am VEGF-R3 Gen zu keiner Hemmung der Angiogenese, sondern verursacht eine Störung der normalen Gefäßentwicklung und ruft somit einen vermehrten Flüssigkeitsaustritt aus den Kapillaren hervor [Dumont et al., 1998].

Die biologischen Funktionen von VEGF werden durch spezifische Tyrosinkinaserzeptoren übermittelt: VEGF-R1 und VEGF-R2 [De Vries et al., 1992], [Terman et al., 1992]. Die wichtigsten Aufgaben, wie Zellwanderung, Proliferation und Angiogenese, werden bei Gefäßendothel hauptsächlich von VEGF-R2 übernommen.

[Meyer et al., 1999], [Waltenberger et al., 1996] und [Rousseau et al., 2000]. Zur Induktion dieser Effekte ist z.B. bei Gefäßendothel die Stimulation mit VEGF-E, einem Liganden, welcher ausschließlich an VEGF-R2 bindet, ausreichend [Meyer et al. 1999]. Im Gegensatz dazu, werden die wichtigsten biologischen Effekte, unter anderem auch die Chemotaxis, bei humanen Monozyten durch Stimulation mittels VEGF-A über VEGF-R1 ausgelöst [Barleon et al., 1996] und [Clauss et al., 1996].

Um aufzuzeigen welche VEGF Rezeptoren während der Signaltransduktion biologischer Funktionen bei MSZ eine wesentliche Rolle spielen, wurde die Aktivierung von VEGF-R1 und -R2 mittels eines in vitro Kinase-Assays analysiert. Die Untersuchung wurde wie folgt durchgeführt:

MSZ von zwei Probanden mit VEGF-A (50 ng/ml) oder PlGF-1 (50 ng/ml) für 8 min inkubiert. Anschließend Lyse des Zellmaterials, Kinase Assay, SDS-PAGE und Autoradiographie.

Die Arbeit erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. Waltenberger (Department of Invasive Cardiology, University of Maastricht, Cardiovascular Research Institute of Maastricht CARIM, Maastricht, Niederlande). In den Assays wies die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Waltenberger nach, welcher Rezeptor durch Ligandenbindung phosphoryliert werden konnte. Für die Stimulation von VEGF-R1 kamen VEGF-A und PlGF zum Einsatz. Die Aktivierung von VEGF-R2 wurde mit VEGF-A ausgetestet.

Aus den Ergebnissen konnten folgende Rückschlüsse zur MSZ-Chemotaxis abgeleitet werden:

VEGF-R1 wird sowohl von VEGF-A als auch von PlGF-1 aktiviert.

Demgegenüber kann VEGF-R2 nur von VEGF-A aktiviert werden [Fiedler et al., 2005].

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Anbetracht der durchgeführten Versuche und der bereits bekannten Daten sollte es möglich sein, eine Aussage über die VEGF und PlGF induzierte Chemotaxis multipotenter Stromazellen (MSZ) des Knochenmarks treffen.

Nachdem die humanen multipotente Stromazellen präpariert und kultiviert waren, erfolgte die Magnetic Adsorbant Cell Separation (MACS), um eine Kontamination durch endotheliale Zellen zu vermeiden. Die anschließende Typisierung der MSZ wurde mittels immunhistochemischer und molekularbiologischer Verfahren komplettiert. Neben den MSZ wurden auch in vitro differenzierte Osteoblasten (dOB) für die Experimente verwendet.

Bei den durchgeführten Chemotaxisversuchen wurde die gerichtete Zellmigration entlang eines Konzentrationsgefälles für VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor) und PlGF-1 (Placenta Growth Factor) untersucht. Die ermittelten CI-Werte (Chemotaktischer Index = gewanderte Zellzahl Wachstumsfaktor / gewanderte Zellzahl Negativkontrolle) lagen sowohl für MSZ als auch für dOB bei Stimulation mit VEGF-A im Rahmen bereits bekannter Ergebnisse. Hierbei konnten zum Vergleich Werte primärer humaner Osteoblasten herangezogen werden [Mayr-Wohlfahrt et al., 2002].

Für die Chemotaxisansätze mit der Kombination PlGF-1 und MSZ beobachteten wir ebenfalls eine dosisabhängige Zellmigration. Zusammenfassend ließ sich aus den Ergebnissen folgendes ableiten:

Bei MSZ ist es möglich durch Stimulation mit VEGF-A und PlGF-1 eine Chemotaxis zu induzieren.

Diese Resultate stehen in Einklang mit den Ergebnissen der Kinase-Assays, die durch die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Waltenberger realisiert werden konnte.

Die molekularbiologischen Verfahren zeigten bei MSZ und dOB entsprechend sämtliche verwendeten Stammzell- und Osteoblasten-typische Marker, jedoch schien die Genexpression von VEGF-R1, -R2 und -R3 bei den osteogen differenzierten MSZ niedriger als bei MSZ zu sein. Diese Vermutung spiegelte sich sowohl in den ermittelten

CI-Werten (MSZ versus dOB) als auch in der quantitativen PCR wieder (Polymerase Chain Reaction). Hier konnte man eine bei multipotenten Stromazellen signifikant 10fach höhere Expression aller drei Rezeptoren nachweisen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass VEGF-A und eventuell PlGF zur Aktivierung von multipotenten Stromazellen des Knochenmarks (MSZ) im Hinblick auf Knochenheilung, -bildung und -umbau beitragen können. VEGF ist es dabei nicht nur möglich Gefäßneubildungsprozesse zur Förderung von Knochenneubildung einzuleiten, sondern auch eine Osteogenese direkt über die Induktion der MSZ-Chemotaxis als Bindeglied zwischen Vaskulo- und Osteogenese zu stimulieren.

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung wäre ein Einsatz im *Bone Tissue Engineering* denkbar. Speziell auf dem Gebiet des künstlichen Knochenersatzes ist eine sichere und vor allem schnelle Osteointegration des eingebrachten Konstruktes von entscheidender Bedeutung. Insbesondere eine VEGF-A Beschichtung könnte mit seinen Eigenschaften besondere Vorteile bieten.

Im Gegensatz zu PlGF-1 besitzt VEGF-A den Vorteil sowohl an VEGF-R1 als auch an VEGF-R2 zu binden und zu aktivieren. In Folge dessen führt VEGF-A neben dem Wachstum und Einsprossen von Kapillaren zu einer Rekrutierung von MSZ aus dem Knochenmark mittels Chemotaxis. Die wichtigsten biologischen Effekte, wie Zellüberleben, Migration und Proliferation, werden bei endothelialen Zellen durch VEGF-R2 übermittelt [Meyer et al., 1999; Waltenberger et al., 1994 und Rousseau et al., 2000].

Neben dem Einsatz beim *Bone Tissue Engineering* wäre auch eine Verwendung im Frakturmanagement oder der Therapie von Pseudarthrosen vorstellbar. Gerade während der Frakturheilung ist die Vaskulogenese ein entscheidendes Glied der Osteogenese [Brighton et al., 1991]. Durch intraoperatives Einbringen von VEGF direkt an den Frakturspalt könnte der Heilungsprozess beschleunigt werden.

In weiterführenden Arbeiten könnten z.B. Versuche mit einer VEGF beschichteten Matrix unternommen und die Adhäsion bzw. Chemotaxis von MSZ zu dieser Matrix untersucht werden. Zusätzlich wäre nach gelungener Adhäsion an den Träger versuchsweise die in vitro Differenzierung zu Osteoblasten denkbar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Monns L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin D J, Persico G, Herbert J M, Shibuya M, Collen D, Conway E M, Carmeliet P. Role of PlGF-1 in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 9: 936-943, 2003.

Azizi S A, Stokes D, Augelli B J, DiGirolamo C, Prockop D J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3908-3913, 1998.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich A, Mantovani A, Marme D, Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1, *Blood* 97: 3336-3343, 1996.

Brighton C T, Hunt R M. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 73: 832-847, 1991.

Cao Y, Ji W R, Qi P and Rosin A. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem. Biophys Res Commun* 235: 493–498, 1997.

Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A. et al.. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7: 575–583, 2001.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660, 2003.

Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W, The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis, *J Biol Chem* 271: 17629-17634, 1996.

Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28: 875-884, 2000.

Deckers M M, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos S E, Lowik C W. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141: 1667-1674, 2000.

De Vries C, Escobedo J A, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams L T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991, 1992.

Dumont D, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M and Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282: 946-949, 1998.

Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25, 1997.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858, 1989.

Fickert S, Fiedler J, Brenner R E. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther* 6: R422-432, 2004.

Fiedler J, Röderer G, Gunther K P, Brenner R E. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87: 305-312, 2002.

Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner R E. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem and Biophys Res Comm* 334: 561-568, 2005.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*, 235, 442–447, 1987.

Freeman MR, Scheck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE, Klagsbrun M. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T lymphocytes in angiogenesis. *Cancer Res.* 55: 4140-4145, 1995.

Friedenstein A J, Gorskaja U, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hemopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267-274, 1976.

Garcia-Ramirez M, Toran N, Andaluz P, Carrascosa A, Audi L. Vascular endothelial growth factor is expressed in human fetal growth cartilage. *J Bone Miner Res* Mar 15: 534-40, 2000.

Gerber H P, Vu T H, Ryan A M, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during enchondral bone formation. *Nat Med* 5: 623-628, 1999.

Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y and Neufeld G. Neuropilin-2 and neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF. *J Biol Chem* 275: 18040–18045, 2000.

Hattori K, Heissig B, Wu Y et al.. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 8: 841–849, 2002.

Hirohata S, Yanagida T, Nampei A, Kunugiza Y, Hashimoto H, Tomita T, Yoshikawa H, Ochi T. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis Rheum* 50: 3888-3896, 2004.

Houck KA, Ferrare N, Winter J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814, 1991.

Huang S, Terstappen LWMM. Formation of haematopoietic micro-environment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 360: 745-749, 1992.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V et al.. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276: 1423–1425. 1997.

Kaipainen A, Korhonen K, Mustonen V, van Hinsberg G-H, Fang D, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the FLT4 receptor tyrosine kinase becomes restricted to the lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3566-3570, 1995.

Karkkainen M J, Haiko P, Sainio K et al.. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5: 74–80, 2004.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J., Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312, 1989.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989.

Li J, Brown L F, Hibberd M G, Grossmann J D, Morgan J P, Simons M. VEGF, Flk-1 and Flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 270: H1803-1811, 1996.

Lind M, Eriksen E F, Bunger C. Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulate chemotactic migration of human osteoblast, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. *Bone* 18: 53-57, 1996.

Lohela M, Saaristo A, Veikkola T and Alitalo K. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemostasis* 90: 167-184, 2003.

Lyttle D J, Fraser K M, Fleming S B, Mercer A A and Robinson A J. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 68 : 84-92, 1994.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G et al.. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 8: 925-931, 1993.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P and Persico MG. Isolation human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9267-9271, 1991.

Marrony S, Bassilana F, Seuwen K, Keller H. Bone morphogenetic protein 2 induces placental growth factor in mesenchymal stem cells. *Bone* 33: 426-433, 2003.

Mayr-Wohlfahrt U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Günther K-P, Dehio C, Puhl W, Brenner R E. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30, No. 3: 472-477, March 2002.

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 18: 363–374, 1999.

Mould A W, Tonks I D, Cahill M M et al.. Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2660–2669, 2003.

Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U and Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 10: 528–535, 1999.

Partanen TA, Makinen T, Arola J, Suda T, Weich HA and Alitalo K. Endothelial growth factors in human fetal heart. *Circulation* 100: 583-586, 1999.

Persico MG, Vincenti V and DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placental growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 31-40, 1999.

Petrova TV, Makinen T and Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 253: 117-130, 1999.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Kaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999.

Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications, *Blood* 105 (4):1383-1395, 2005.

Reynolds L P, Killilea S D, Redmer D A, Angiogenesis in the female reproductive system, Department of Animal and Range Sciences and Department of Biochemistry, North Dakota State University, Fargo, North Dakota 58105, USA, The FASEB Journal, Vol. 6: 886-892, 1992.

Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL, Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 11: 312, 1996.

Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J and Hout J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 275: 10661-10672, 2000.

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97: 785-791, 2001.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985, 1983.

Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function* 26: 25-35, 2001.

Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves SE. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res*: 389: 271-280, 1994.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, Stro-1. *Blood* 78: 55-62, 1991.

Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in human bone marrow stromal cell precursors. *Blood* 78: 2848-2853, 1991.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G and Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735-745, 1998.

Stacker S A, Caesar C, Baldwin M E et al.. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7: 186–191, 2001.

Sun Y, Jin K, Childs J T, Xie L, Mao X O and Greenberg D A. Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1146–1152, 2004.

Terman B I, Dougher-Vermazen M, Carrion M E, Dimitrov D, Armellino D C, Gospodarowicz D, Bohlen P, Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor, *Biochem. Biophys Res Commun* 187: 1579-1586, 1992.

Tuder R M, Flook B E, Voelkel N F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or chronic hypoxia. *J Clin Invest* 95: 1798-1807, 1995.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988-26995, 1994.

Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94: 1647-1654, 1996.

Wang D S, Yamazaki K, Nohtomi K, Shizume K, Ohsumi K, Shibuya M, Demura H, Sato K. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 11: 473-479, 1996.

Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry R J and Torry D S. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* 60: 53–60, 2003.

Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1375-C1386, 2001.