

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung

1.1	Angiogenese	14
1.1.1	Unterschiede zwischen Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese	14
1.1.2	Angiogenesefaktoren	16
1.1.3	Endogene Hemmstoffe der Angiogenese.....	17
1.1.4	Angiogenese-assoziierte Krankheiten und Therapieansätze.....	18
1.2	Aktiviertes Protein C (APC)	20
1.2.1	Antikoagulatorische Wirkung von APC	20
1.2.2	Profibrinolytische Wirkung von APC.....	22
1.2.3	Indirekte und direkte anti-inflammatoryische Wirkung von APC.....	23
1.2.4	Anti-apoptotische und proliferationssteigernde Wirkungen von APC	24
1.2.5	Rezeptoren für APC	25
1.2.6	APC in der Sepsisbehandlung und weitere potentielle Indikationen	26
1.3	Endotheliale Progenitorzellen (EPCs).....	28
1.3.1	Abstammung der EPCs	28
1.3.2	Isolierung und Charakterisierung der EPCs.....	28
1.3.3	Medizinische Bedeutung der EPCs	30
1.4	Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C)	31

1.5	Leptin	32
1.6	Angiopoietin-2 (Ang-2)	34
1.7	Thrombospondin-2 (TSP-2)	36
1.8	Platelet Factor-4 (PF-4)	37
1.9	Interferon-γ (IFN-γ)	38
1.10	Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit.....	40

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1	Zellkultur	41
2.1.1	Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)	41
2.1.1.1	Isolierung von EPCs aus Buffy Coats.....	41
2.1.1.2	Kultivierung von EPCs	43
2.1.1.3	Durchführung der EPC-Experimente.....	43
2.1.2	Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).....	44
2.1.2.1	Zellisolierung und Erstellung einer HUVEC-Primärkultur	44
2.1.2.2	Kultivieren und Passagieren von HUVECs	45
2.1.2.3	Durchführung der HUVEC-Experimente	46
2.2	Untersuchung der Zellkulturen auf Mykoplasmen	47

2.3	Untersuchung der EPCs mit dem Fluoreszenz-Mikroskop	48
2.4	FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting) von EPCs und HUVECs.....	50
2.5	Zellzählungen	52
2.5.1	Zellzählung der kultivierten EPCs	52
2.5.2	Zellzählung der kultivierten HUVECs.....	53
2.6	Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	54
2.6.1	Prinzip der RT-PCR.....	54
2.6.2	Stimulationsbedingungen bei den RT-PCR-Versuchen.....	56
2.6.3	RNA-Extraktion und Messung der RNA-Konzentration.....	56
2.6.4	Reverse Transkription	58
2.6.5	Polymerase Kettenreaktion	58
2.6.6	Gelektrophorese	61
2.6.7	Densitometrie	62
2.7	Quantitative PCR (qPCR) in vitro kultivierter EPCs	62
2.7.1	Prinzip der qPCR und Unterschiede zur traditionellen PCR	62
2.7.2	Die $\Delta\Delta_{ct}$ - Methode.....	64
2.7.3	Versuchsdurchführung und Effizienz der quantitativen PCR.....	65

2.8	Super Arrays „Angiogenesis“ und „Stem Cells“	67
2.8.1	Prinzip des Super Arrays.....	67
2.8.2	Versuchsdurchführung der Super Arrays.....	68
2.9	Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) aus EPC- und HUVEC-Überständen.....	69
2.9.1	VEGF-C Immunoassay	70
2.9.2	TSP-2 Immunoassay	71
2.9.3	PF-4 Immunoassay.....	72
2.9.4	IFN-gamma Immunoassay.....	72
2.10	Material.....	74
2.10.1	Kulturmedien und Zusätze	74
2.10.2	Reagenzien und Chemikalien.....	75
2.10.3	Antikörper	77
2.10.4	Genspezifische Primer	78
2.10.5	Super Arrays	79
2.10.6	Kommerziell erhältliche Reaktionskits	79
2.10.7	Verbrauchsmaterialien	80
2.10.8	Geräte	81
2.10.9	Computerprogramme	82
2.10.10	Statistik.....	82

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1	Morphologie und Eigenschaften der isolierten Zellkulturen.....	83
3.1.1	Zellmorphologie von HUVECs	83
3.1.2	Zellmorphologie von EPCs.....	84
3.1.3	Nachweis der Mykoplasmenfreiheit	84
3.1.4	Lipoprotein-Aufnahme und Lektin-Bindung der Ficoll-isolierten Zellen	85
3.1.5	Charakterisierung von EPCs und HUVECs mittels FACS-Analyse	87
3.2	Wirkung von rekombinantem humanem APC (rhAPC) auf die Zellproliferation von EPCs und HUVECs.....	91
3.2.1	Wirkung von rhAPC auf die Zellproliferation von EPCs	91
3.2.2	Wirkung von Überständen rhAPC-stimulierter EPCs auf die Zellproliferation von HUVECs	95
3.3	Wirkung von rhAPC auf die Expressionsraten von Stammzell- und Angiogenese-relevanten Genen in EPCs (Super Array Screening-Untersuchungen).....	97
3.4	Wirkung von rhAPC auf die VEGF-C-mRNA-Expression in HUVECs.	100
3.5	Wirkung von rhAPC auf die endotheliale VEGF-C-Freisetzung.....	102
3.5.1	Dosisabhängigkeit	102
3.5.2	Zeitabhängigkeit.....	104
3.6	Wirkung von rhAPC auf die Leptin-mRNA-Expression in EPCs	105

3.7	Wirkung von rhAPC auf die Angiopoietin-2-mRNA-Expression in EPCs	108
3.8	Wirkung von rhAPC auf die TSP-2-, PF-4- & IFNγ-Freisetzung aus EPCs	112
3.9	Wirkung von rhAPC auf die TSP-2-, PF-4- & IFNγ-mRNA-Expression in EPCs.....	112
3.10	Kontinuierliche Kontrolle von Spezifität und Effizienz der quantitativen PCR.....	113

Kapitel 4: Diskussion

4.1	Identifizierung von EPCs	115
4.2	APC und Proliferation endothelialer Progenitorzellen	117
4.3	Super Array Screening-Untersuchungen.....	118
4.4	Vascular Endothelial Growth Factor-C.....	120
4.5	Leptin	122
4.6	Angiopoietin-2	123

4.7 Übertragbarkeit der beobachteten rhAPC-Effekte im Hinblick auf die eingesetzte Dosis (<i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>)	124
--	-----

Kapitel 5: Zusammenfassung

5 Zusammenfassung.....	126
------------------------	-----

Kapitel 6: Summary

6 Summary	128
-----------------	-----

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

7 Literaturverzeichnis.....	130
-----------------------------	-----

Kapitel 8: Anhang

8.1 Danksagung	152
8.2 Eidesstattliche Erklärung.....	153