

Aus dem Anatomischen Institut
(Direktorium: Prof. Dr. Ralph Lucius
Prof. Dr. Franziska Theilig
Prof. Dr. Thilo Wedel
Jun. Prof. Dr. François Cossais)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zum Einfluss von Platelet-Released Growth Factors
auf M1-Makrophagen im Rahmen der Wundheilung**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sophie-Charlotte Müller
aus Kandel
Kiel, 2021

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Bayer

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Jost Philipp Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.07.2022

gez.: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Martina Böttner
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Glossar	III
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Kulturmedien und Pufferlösungen	3
2.2. Zelllinien	3
2.3. Herstellung von PRGF	4
2.4. Kultivierung der THP-1-Zelllinie	5
2.4.1. Kultivierung der Zellen.....	5
2.4.2. Bestimmung der Zellzahl	5
2.4.3. Asservierung der Zellen	6
2.5. PMA-Behandlung der Zellen.....	6
2.6. Differenzierung der Zellen	6
2.7. Stimulation der Zellen	7
2.7.1. Konzentrationskinetik.....	9
2.7.2. Zeitkinetik.....	9
2.8. Zellernte	10
2.9. RNA-Isolierung.....	11
2.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung	12
2.11. cDNA-Synthese.....	12
2.12. Verwendete Primer	14
2.13. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	15
2.14. Statistische Auswertung	17
2.15. Darstellung der Ergebnisse	17
3. Ergebnisse	18
3.1. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Interleukin 1 beta in M1-Makrophagen	18
3.2. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Interleukin 6 in M1-Makrophagen.....	20

3.3. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Tumor Nekrose Faktor alpha in M1-Makrophagen ...	22
3.4. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Transforming Growth Factor beta in M1-Makrophagen	23
3.5. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Transforming Growth Factor alpha in M1- Makrophagen	26
3.6. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von KI-67 in M1-Makrophagen.....	28
3.7. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Platelet-Derived Growth Factor A in M1-Makrophagen	29
3.8. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von CD163 in M1-Makrophagen	32
3.9. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von CD206 in M1-Makrophagen	34
3.10. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Fibronectin 1 in M1-Makrophagen.....	36
3.11. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Chemokinligand-2 in M1-Makrophagen	38
4. Diskussion.....	40
5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	46
6. Literaturverzeichnis.....	47
7. Abbildungsverzeichnis.....	53
8. Danksagung.....	56
9. Lebenslauf	57

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

A	Desoxyadenosin
Abb.	Abbildung
C	Desoxycytidin
°C	Grad Celsius
CCL2/MCP1	<i>chemokine-cc motif-ligand 2 / monocyte chemotactic protein-1</i> / Makrophagen-Chemokinligand-2
CD163	<i>cluster of differentiation 163</i> / Membranrezeptor der Scavenger-Rezeptoren-Familie, PRR
CD206	<i>cluster of differentiation 206</i> / Mannose-Rezeptor
cDNA	<i>mRNA complementary DNA</i> / zur mRNA komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoff-Dioxid
C _T -Wert	<i>Threshold Cycle</i> / Schwellenwertzyklus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Falcon Tubes	konische Zentrifugenröhrchen mit Volumina von 15 oder 50 ml
FBS	<i>fetal bovine serum</i> / fetales Kälberserum
FN1	Fibronektin 1
F-Primer	<i>forward-primer</i> / vorwärts gerichteter (sense) Primer
g	Erdbeschleunigung
G	Desoxyguanosin
H ₂ O	Wasser

IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KI-67	Kiel-Antigen Nr. 67
LPS	Lipopolysaccherid
MCP1/CCL2	<i>monocyte chemotactic protein-1 / chemokine-cc motif-ligand 2 /</i> Makrophagen-Chemokinligand-2
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mRNA	<i>messenger RNA /</i> Boten-RNA
M	Mol
ng	Nanogramm
ns	nicht signifikant
PBS	<i>phosphat buffered saline /</i> Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGFA	<i>platelet-derived growth factor A /</i> alpha-Unterform einer von Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren-Familie, Eigenname
pg	Pikogramm
PMA	Phorbol 12-myristat- 13-Acetat
(q)PCR	<i>(quantitative) Polymerase Chain Reaction /</i> (quantitative) Polymerase- Kettenreaktion
PRF	<i>platelet-rich fibrin /</i> autologe leukozyten- und thrombozytenreiche Fibrinmatrix, die aus körpereigenem Blut gewonnen werden kann
PRGF	<i>platelet-released growth factors /</i> aus Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren

PRR	<i>pattern recognition receptor</i> / pathogen-assoziierte Muster erkennende Rezeptoren
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
RP 38	ribosomales Protein 38
R-Primer	<i>reverse-primer</i> / rückwärts-gerichteter (antisense) Primer
RT-qPCR	<i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> / Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
T	Desoxythymidin
T75-Flaschen	Zellkulturflaschen zur Kultur von adhärenen Zellen mit Wachstumsflächen von 75 cm ²
Tab.	Tabelle
TGF-alpha	<i>transforming growth factor alpha</i> / transformierender Wachstumsfaktor, alpha-Unterform
TGF-beta	<i>transforming growth factor beta</i> / transformierender Wachstumsfaktor, beta-Unterform
Thermocycler	Geräte, die für den benötigten zyklischen Temperaturwechsel bei Polymerasekettenreaktionen (PCR) entwickelt wurden
TNF alpha	<i>tumor necrosis factor alpha</i> / Tumornekrosefaktor alpha
U	<i>Units</i> / Einheiten
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Vortexen	Durchmischen von Reaktionsgemischen durch Schüttelbewegung mithilfe eines speziellen sog. Vortexmischers
well	Vertiefung der Reaktionsplatte

1. Einleitung

Hochkonzentrierte autologe Thrombozytenkonzentratprodukte wie Platelet-Released Growth Factors (PRGF) oder Platelet-Rich Fibrin (PRF) enthalten eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen (1)(2)(3). Aus diesem Grunde besitzen sie allgemein ein hohes regeneratives Potenzial (4) und werden weltweit in vielen medizinischen Disziplinen im Sinne der regenerativen Medizin klinisch eingesetzt (5)(6)(7). Eine relevante Indikation für den klinischen Einsatz von PRGF oder PRF stellt hierbei auch die Behandlung von chronischen Wunden dar. In diesem Zusammenhang konnte bislang gezeigt werden, dass ein großer Anteil dieser Patienten von einer topischen Wundtherapie mit PRGF oder PRF profitiert (8)(9). Die zugrunde liegenden Mechanismen für diese positiven, klinischen Wundheilungsverläufe unter einer topischen PRGF- oder PRF-Therapie sind jedoch bislang nur unzureichend untersucht und bekannt.

Prinzipiell stellt die humane Wundheilung ein exzellent orchestriertes Zusammenspiel vieler Zellen und Proteine dar (10)(11), in dem Makrophagen eine wesentliche Rolle spielen (12)(13). Funktionell können Makrophagen allgemein in unterschiedliche Subtypen, sogenannte M1- und M2-Makrophagen unterteilt werden (14)(15). Dabei haben M1-Makrophagen eine eher proinflammatorische und wundreinigende Wirkung, während M2-Makrophagen vor allem immunsuppressive Funktionen haben und zudem die Neubildung extrazellulärer Matrix sowie die für die Wundheilung notwendige Neoangiogenese initiieren.

Aufgrund der maßgeblichen Bedeutung der M1-Makrophagen für die Wundheilung wäre es äußerst vorteilhaft, diese klinisch in ihrer Funktion unterstützen zu können. Bislang ist wenig darüber bekannt, ob autologe Thrombozytenkonzentratprodukte wie PRGF die Funktion von M1-Makrophagen im Sinne der Wundheilung positiv beeinflussen können. Zu untersuchen, ob und gegebenenfalls wie eine Beeinflussung der M1-Makrophagen in ihrer Funktion im Zusammenhang mit der Wundheilung und ihrer Proliferation durch eine Behandlung mit PRGF möglich ist, war deshalb Ziel dieser Arbeit.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung untersuchten wir in Zellkulturversuchen den Einfluss einer PRGF-Stimulation auf M1-Makrophagen anhand der Expression unterschiedlicher Gene, die für den Funktionszustand und Proliferationsgrad dieses Makrophagensubtyps als charakteristisch gelten. Hierzu zählten wir die proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1

beta (IL-1 beta), Interleukin 6 (IL-6), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF alpha), Transforming Growth Factor alpha (TGF-alpha) und Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) (14)(11)(16)(17)(18).

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine Stimulation mit PRGF auch Einfluss auf die Proliferationsrate der M1-Makrophagen hat. Hierfür analysierten wir die Genexpression des Proliferationsmarkers KI-67 unter PRGF-Einfluss (19).

Ferner untersuchten wir den Einfluss der PRGF-Stimulation auf die Genexpression von Platelet-Derived Growth Factor A (PDGFA), CD163, CD206, Fibronectin 1 (FN1) und Chemokinligand-2 (CCL2).

2. Material und Methoden

Allgemeine Erläuterungen

Die Chemikalien wurden in den höchsten Reinheitsgraden (pro analysi) verwendet. Der Sitz des Herstellers wird jeweils nur in der ersten Erwähnung des jeweiligen Reagenzes, Gerätes oder Kits genannt. Soweit aus Verständnisgründen nicht auf die Nennung von produktspezifischen Eigennamen verzichtet werden konnte, wurden diese durch die Wahl eines kursiven Schriftsatzes kenntlich gemacht. Auch englischsprachige Eigennamen wurden kursiv dargestellt und in Klammern bzw. im Abkürzungsverzeichnis und Glossar erläutert.

2.1. Kulturmedien und Pufferlösungen

Kulturmedium: Als Medium für die Kultivierung der THP-1-Zellen wurde *RPMI-1640* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit den folgenden Zusätzen verwendet: 10 % *FBS-11A Fetal Bovine Serum Advanced* (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland), 1 % L-Glutamin 200 mM (Thermo Fisher Scientific), 1 % *Penicillin V-Streptomycin mixture* (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland).

Die Stimulation der Zellen erfolgte ebenfalls in *RPMI-1640*. Als Zusätze verwendeten wir hierzu 5 % *FBS-11A Fetal Bovine Serum Advanced* (Capricorn Scientific) und 1 % L-Glutamin 200 mM (Thermo Fisher Scientific)

PBS (Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung): Als Puffermedium für die Herstellung des PRGF (*Platelet-Released Growth Factors*) diente PBS. Die phosphatgepufferte Salzlösung enthält Natriumchlorid (8 g/L), Kaliumchlorid (0,2 g/L), Dinatriumhydrogenphosphat (1,42 g/L), sowie Kaliumdihydrogenphosphat (0,27 g/L). Der pH-Wert der Pufferlösung betrug 7,4 (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland).

2.2. Zelllinien

Für unsere Zellkulturversuche wurden THP-1-Zellen verwendet, die wir freundlicherweise von Herrn Prof. Jürgen Harder aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel erhielten. Diese Zelllinie ist eine humane monozytische Zelllinie, die einem an akuter monozytischer Leukämie erkrankten

Patienten entstammt. Die Zellen erreichten uns in Passage 68 (p 68) und in kryoasserviertem Zustand. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -160 °C gelagert.

2.3. Herstellung von PRGF

Für die Herstellung des PRGF wurden am Tag der Herstellung gespendete Thrombozytenkonzentrate aus der Blutbank des Institutes für Transfusionsmedizin des UKSH, Campus Kiel bezogen. Dabei stammte jedes Thrombozytenkonzentrat von einem individuellen Spender. Die Konzentrate wurden standardisiert durch Hämapherese aus Vollblut gewonnen und sind beinahe leukozytendepletiert ($< 1 \times 10^6$ Leukozyten auf 220 ml; Transfusionsordnung Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, 2016).

Zur Herstellung des PRGF wurden die in den Schläuchen der Sammelbeutel verbliebenen Anteile der Thrombozytenkonzentrate verwendet. Diese Schläuche enthielten jeweils zwischen 5 und 12 ml Volumen. Dieses Ausgangsvolumen wurde notiert, die Schläuche desinfiziert und das enthaltene Thrombozytenkonzentrat unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml fassendes Zentrifugenröhrchen (*Falcon Tube*) überführt. Dabei wurden die einzelnen Konzentrate der unterschiedlichen Spender jeweils getrennt und ohne Pooling verarbeitet. Die Thrombozytenkonzentrate wurden für 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, sodass die Thrombozyten sich als Pellet am Boden des Röhrchens absetzten. Das dem Pellet überstehende plättchenarme Plasma wurde abgenommen und verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Thrombozyten in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge Natrium-Citrat-Puffer (Konzentration 11 mM, aus Stocklösung 1:10 in H₂O verdünnt; pH 5,5) durch leichte Bewegung gewaschen und anschließend erneut für 10 Minuten bei 2 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und die Thrombozyten ein weiteres Mal gewaschen. Anschließend wurde das Thrombozytenpellet in der Hälfte des Ausgangsvolumens PBS durch Vortexen aufgenommen und auf Eis gelagert. Zur Lyse der Thrombozyten wurde nun jede Suspension mit 5 Durchgängen von 10 Ultraschallstößen behandelt. Zwischen den Durchgängen wurden die Proben erneut auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Suspensionen für 24 Stunden bei -80 °C eingefroren.

Am nächsten Tag wurden die Suspensionen aufgetaut, erneut mit 5 x 10 Ultraschallstößen steril behandelt und dabei ebenfalls zwischen den einzelnen Durchgängen auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Suspensionen erneut für 24 Stunden bei -80 °C eingefroren.

Nach 24 Stunden wurden die Suspensionen wieder aufgetaut und für 60 Sekunden bei Raumtemperatur und 18 000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und aliquotiert und entsprachen nun dem fertigen PRGF, das zur Stimulation der M1-Makrophagen verwendet wurde. Bis zu seiner Verwendung wurde das PRGF bei -20 °C gelagert.

2.4. Kultivierung der THP-1-Zelllinie

2.4.1. Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung wurden die kryoasservierten THP-1-Zellen zunächst im Wasserbad bei 37 °C langsam erwärmt. Anschließend wurden sie in 15 ml *RPMI-1640* Medium unter Zusatz von 10 % *FBS-11A*, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin in *T75*-Zellkulturflaschen in Kultur gebracht. Um das Wachstum anzuregen, wurden die Zellen im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten, 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurden jeweils zwei *T75*-Zellkulturflaschen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dieses bei Raumtemperatur und 200 x g für fünf Minuten zentrifugiert, sodass sich die Zellen am Boden des Röhrchens als Pellet absetzten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet anschließend in etwa 5 ml frischem Medium resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 15 ml frischen Mediums wurde die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt und weiter im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.4.2. Bestimmung der Zellzahl

Das Wachstum der THP-1-Zellen wurde stetig beobachtet und die Konfluenz kontinuierlich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Anzahl der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde eine 1:5 Verdünnung aus 16 µL Trypanblau sowie 4 µL Zellsuspension hergestellt und in die Zählkammer einpipettiert.

Anschließend wurden vier Eckquadrate ausgezählt und die Gesamtzellzahl mittels folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{ausgezählte Zellen}}{4} * 10.000 * 5 * \text{Volumen der Zellsuspension} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Für die Stimulation war eine Anzahl von 8×10^5 Zellen pro Vertiefung (*well*) vorgesehen.

2.4.3. Asservierung der Zellen

Da die THP-1-Zellen sehr schnell wuchsen, wurden regelmäßig überschüssige Zellen als Reserve asserviert. Dazu wurden jeweils 700 µL Zellsuspension mit 200 µL FBS und 100 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) in ein Kryoröhrchen gegeben und zunächst für 24 h bei -80 °C gelagert. Zur schonenden Asservierung der Zellen wurde der *Corning™ CoolCell™ LX* Fläschchenbehälter (Fisher Scientific) verwendet, der ein langsames Herunterkühlen der Röhrchen mit einer Geschwindigkeit von -1 °C/Minute ermöglicht. Nach 24 Stunden wurden die THP-1-Zellen dann bis zur weiteren Verwendung durchgängig bei -160 °C gelagert.

2.5. PMA-Behandlung der Zellen

Bei einer Konfluenz von etwa 70 % waren die Zellen bereit für die Stimulation. Für die anschließenden Versuche mussten die noch in Suspension schwimmenden THP-1-Zellen zunächst adhärent gemacht werden. Hierfür wurden sie mit 5 ng/ml PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate; 1:200 Verdünnung aus Stocklösung mit 1 µg/ml; Merck, Darmstadt, Deutschland) in 12-well-Platten mit je 2 ml pro *well* ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation erfolgten eine optische Kontrolle der Adhärenz und des Zellwachstums sowie ein Mediumwechsel. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für weitere 72 Stunden.

2.6. Differenzierung der Zellen

Vor Beginn der Stimulationsversuche wurde der Erfolg der Adhärenz erneut unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend wurde ein Teil der THP-1-Zellen zur Differenzierung zu M1-Makrophagen gebracht. Als Stimuli für die Differenzierung wurden LPS

(*Lipopolysaccherid*; Zielkonzentration 10 µg/ml, aus Stocklösung mit 1 ng/ml 1:100 verdünnt; Sigma Aldrich, Hamburg) und IFN γ (*Interferon-gamma*; Zielkonzentration 20 ng/ml, aus Stocklösung mit 20 µg/ml 1:1000 verdünnt; Peprotech, Hamburg) verwendet. Zum Erreichen der gewünschten Zielkonzentrationen wurden die Stimuli in *RPMI-1640* mit Zusatz von 10 % FBS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin entsprechend verdünnt und die zu differenzierenden THP-1-Zellen mit je 1 ml/*well* behandelt. Der übrige Teil der THP-1-Zellen diente als Kontrolle und wurde ausschließlich mit 1 ml *RPMI* Medium pro *well* ohne weitere Zusätze behandelt (siehe Abbildung 1). Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

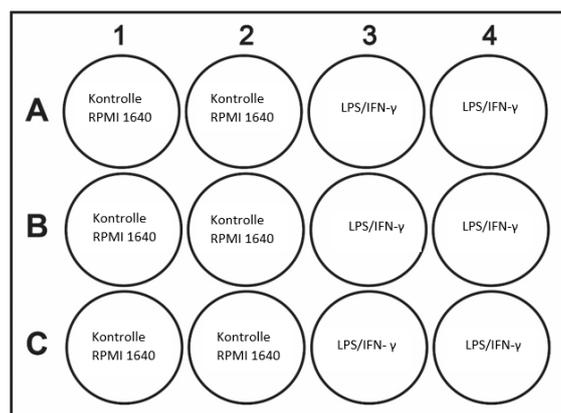


Abbildung 1: Plattenlayout der 12-well Platte zur Differenzierung der THP-1-Zellen. Ein Teil der THP-1-Zellen wurden mit 10 µg/ml LPS und 20 ng/ml IFN γ über 24 Stunden behandelt und damit zu M1-Makrophagen differenziert. (A-C, jeweils well 3 und 4). In den übrigen wells wurde den Zellen nur Medium zugegeben, da diese als Kontrolle dienten (A-C, jeweils well 1 und 2).

2.7. Stimulation der Zellen

Nach erfolgreicher Differenzierung erfolgte bei einer Zelldichte von 70 % am nächsten Tag die Stimulation der Zellen. Als Stimulans diente hierfür bereits im Vorfeld hergestelltes und kryoasserviertes PRGF. Als Kulturmedium wurde *RPMI-1640* mit Zugabe von 5 % *FBS-11A* und 1 % L-Glutamin verwendet. Das PRGF wurde zunächst im Wasserbad bei 37 °C vorsichtig erwärmt und anschließend in *RPMI-1640* als Verdünnungsmedium entsprechend der Zielkonzentration verdünnt. Das verbrauchte Medium wurde aus den Vertiefungen der 12-well-Platte abgesaugt und die Zellen mit je 1 ml der PRGF-Verdünnung behandelt. Für die ersten Stimulationsversuche je zwei *wells* zuvor differenzierter Zellen mit 1:10 verdünntem PRGF behandelt. Die Zellen zweier weiterer *wells* wurden mit je 1 ml PBS, dem Puffermedium

der PRGF-Herstellung, stimuliert und dienten somit als Negativkontrolle des PRGF. Auch PBS wurde in *RPMI* 1:10 verdünnt. Zwei weitere *wells* wurden mit je 1 ml *RPMI-1640* ohne weitere Zusätze behandelt und dienten als Negativkontrolle des Mediums (siehe Abbildung 2). Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden.

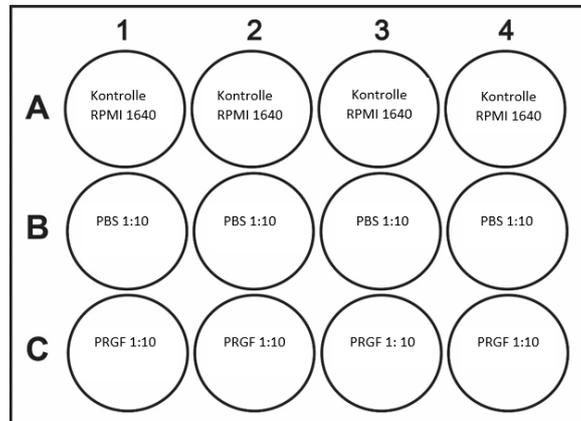


Abbildung 2: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation. Die zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen wurden über 24 Stunden jeweils mit 10 % PRGF (*wells* C1-C4), 10 % PBS (*wells* B1-B4) oder reinem RPMI-Medium (*wells* A1-A4) behandelt.

In weiteren Stimulationsversuchen wurde anstelle der PRGF-Kontrolle mit PBS ein zweites 1:10 verdünntes PRGF eines weiteren Spenders zur Stimulation verwendet (siehe Abbildung 3).

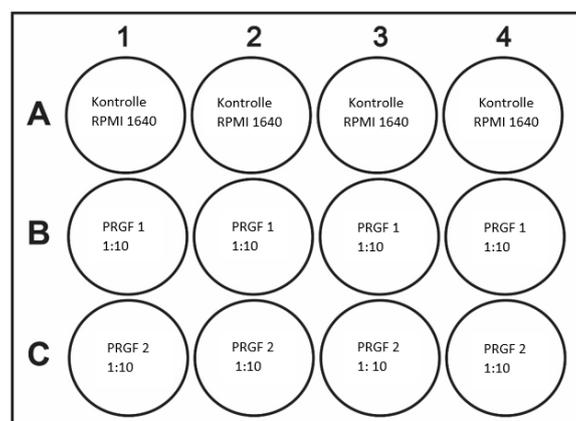


Abbildung 3: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation mit PRGF zweier unterschiedlicher Spender. Die zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen wurden über 24 Stunden mit 10 % PRGF zweier unterschiedlicher Spender (Spender 1: B1-B4, Spender 2: C1-C4) behandelt. Ein Teil der Zellen wurde mit reinem Medium behandelt (A1-A4) und diente als Negativkontrolle.

2.7.1. Konzentrationskinetik

In weiteren Versuchen erfolgte die Stimulation im Sinne einer Konzentrationskinetik, um die Wirkung unterschiedlicher PRGF-Konzentrationen auf die Genexpressionen der M1-Makrophagen zu untersuchen. Auch hier wurde *RPMI-1640* mit Zusatz von 5 % *FBS-11A* und 1 % L-Glutamin als Medium verwendet. Anschließend erfolgte die Stimulation für je zwei *wells* einer Differenzierung durch Zugabe von 1 ml PRGF der gleichen Charge in fünf- bzw. zehnpromzentiger Konzentration. Je zwei weitere *wells* dienten als Kontrolle und wurden mit je 1 ml des Standardmediums RPMI behandelt (siehe Abbildung 4). Zur Verdünnung des PRGF wurde jeweils ebenfalls *RPMI-1640* mit Zugabe von 5 % *FBS-11A* und 1 % L-Glutamin verwendet.

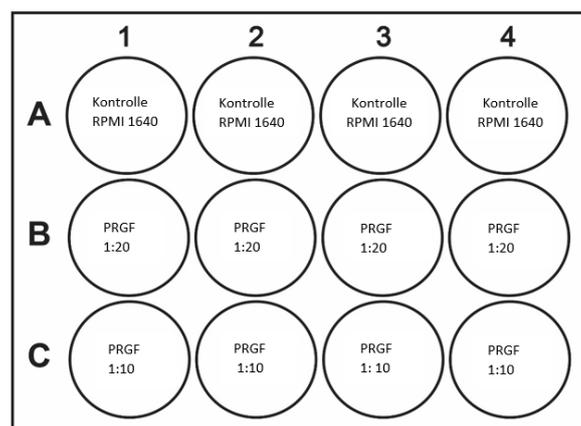


Abbildung 4: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation mit PRGF unterschiedlicher Konzentrationen. Die zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % (B 1-4) und 10 % (C 1-4) behandelt. Die mit reinem RPMI-1640 behandelten Zellen (A 1-4) dienen der Kontrolle.

2.7.2. Zeitkinetik

Um auch den Einfluss unterschiedlicher Stimulationsdauern auf die PRGF-vermittelte Expression der Zielgene untersuchen zu können, wurden weitere Versuche als Zeitkinetik durchgeführt. Wie zuvor wurde auch hier *RPMI-1640* mit Zusatz von 5 % *FBS-11A* und 1 % L-Glutamin als Stimulationsmedium verwendet.

Die Stimulation erfolgte mit 1:10 verdünntem PRGF jeweils über einen Zeitraum von sechs, 24, 48 oder 72 Stunden (siehe Abbildung 5). Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle Zellen mit PRGF desselben Spenders stimuliert wurden. Das Reaktionsvolumen betrug für die

Stimulationen über 6 und 24 Stunden jeweils 500 $\mu\text{l}/\text{well}$. Für die Stimulationen über 48 und 72 Stunden wurden wegen der längeren Dauer größere Stimulationsvolumina von 1 ml/well verwendet.

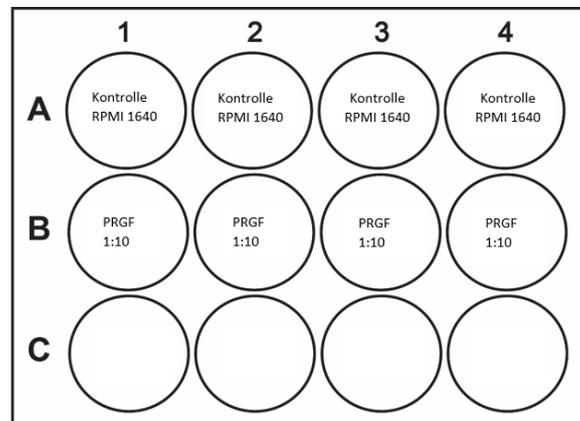


Abbildung 5: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation im Sinne der Zeitkinetik. Für die Zeitkinetik wurde jeweils eine Platte mit zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen mit PRGF 1:10 (B1-B4) oder RPMI-1640 (A1-A4) über jeweils sechs, 24, 48 oder 72 Stunden behandelt.

Nach Ende der Stimulationsdauer wurden die Zellen geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.8. Zellernte

Für die Auswertung der Stimulationsversuche wurden die behandelten M1-Makrophagen am Boden der Platte geerntet. Die Ernte und anschließende weitere Analyse erfolgte für jedes well einzeln. Hierfür wurden die Überstände vollständig in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei $200 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert, um auch möglicherweise im Medium verbliebene und nicht am Boden der Platte haftende Zellen ernten zu können. Über dem so entstandenen Pellet wurden anschließend die Überstände abgenommen, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.9. RNA-Isolierung

Zur Gewinnung der RNA wurden die Zellen am Boden der Platte unmittelbar nach Abnahme des Überstandes mit je 400 µl Trizol (T 9424 TRI Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) behandelt und dadurch lysiert. Die aus den zentrifugierten Überständen entstandenen Pellets wurden mit jeweils 100 µl Trizol behandelt und hinzugegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 500 µl ergab. Zusätzlich erfolgte eine mechanische Zerstörung der Zellen durch mehrfaches Ansaugen und Abgeben der Suspension mit der Pipette. Das Gemisch wurde in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt.

Durch Zugabe von 200 µl Chloroform/ml Trizol und anschließender Zentrifugation (Kühlzentrifuge 4 °C, 12 000 x g, 15 Minuten) wurde eine Phasentrennung induziert. Die obere wässrige, RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-haltige Interphase sowie die proteinreiche Chloroformphase unterhalb der RNA-Phase wurden verworfen. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und erneute Zentrifugation (Kühlzentrifuge 4 °C, 12 000 x g, 10 Minuten) setzte sich die RNA als Pellet an der Außenwand des Gefäßes ab. Nach zweimaligem Waschen der Pellets mit je 1 ml 75-prozentigem Ethanol, erneuter Zentrifugation (Kühlzentrifuge 4 °C, 12 000 x g, 5 Minuten) und anschließendem Trocknen erfolgte die Aufnahme der RNA in 20 µl hochreinen Wassers.

Mit dem Ziel, höhere Reinheitswerte der isolierten RNA zu erreichen, erfolgte die Isolierung zwischenzeitlich nach dem Protokoll des *NucleoSpin RNA Kits* (Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Hierbei erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 350 µl *RA1 Buffer* (Guanidinthiocyanat 45-60 %) mit Zusatz von 10 mM DTT (Dithiothreitol) sowie manuell durch Vortexen der Zellsuspension. Anschließend folgte die Filtration des Lysates durch einminütiges Zentrifugieren bei 11 000 x g über *NucleoSpin Filter* und Auffangen des Filtrates in 2 ml Reaktionsgefäßen. Die Zugabe von 350 µl 70-prozentigem Ethanol zu den Lysaten und anschließendes zweimaliges, jeweils fünfsekündiges Vortexen verbesserte die Konditionen für die anschließende Bindung der RNA an die Silica-Membranen der *NucleoSpin RNA Columns*. Die RNA-Bindung an die Silica-Membranen erfolgte schließlich durch nochmaliges Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 11 000 x g.

Zur Lyse gegebenenfalls vorhandener Verunreinigungen der RNA durch DNA-Komponenten wurden 10 µl rDNase (200 U gelöst in 120 µl RNase-freiem H₂O) sowie 90 µl *Reaction Buffer*

for *rDNase* durch Schütteln vermischt, anschließend 95 µl der Mixtur mittig auf die Silica-Membran gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vorherige Zugabe von 300 µl *Membrane Desalting Buffer* und anschließendes Trocknen der Membran durch Zentrifugieren bei 11 000 x g für 1 Minute führte zu einer deutlich verbesserten Effektivität bei der Verdauung der DNA.

Das Waschen der Silica-Membran erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst folgte die Inaktivierung der *rDNase* durch Zugabe von 200 µl *RAW2 Buffer* (Guanidinhydrochlorid 24-36 % + Ethanol 20-35 %) und Zentrifugieren bei 11 000 x g für 30 Sekunden. Die anschließende Applikation von 600 µl *RA3* Waschpuffer (6 ml Waschpuffer, gelöst in 24 ml Ethanol) auf die Säulenmembranen und erneutes Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 11 000 x g diente dem Fortschwemmen des *RAW2* Puffers. Der finale Waschschrift wurde durch Zugabe von 250 µl *RA3 Buffer* erzielt. Anschließendes Zentrifugieren für 2 Minuten bei 11 000 x g diente der vollständigen Trocknung der Membranen.

Zuletzt wurde die RNA durch Zugabe von 40 µl hochreinen Wassers und Zentrifugieren bei 11 000 x g für 1 Minute von der Membran gelöst und in nuklease-freien Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Um eventuell ausgebildete Sekundärstrukturen zu zerstören und die RNA wieder zu linearisieren wurden die Reaktionsgefäße 10 Minuten bei 57 °C (Heizblock) inkubiert. Die RNA-Lösungen wurden schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration sowie die Reinheit der einzelnen RNA-Lösungen wurde mithilfe eines Mikroplatten-Spektralphotometers (Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer, BioTek, Vermont, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.11. cDNA-Synthese

Vor der Analyse der Zielgen-Expression musste die isolierte RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für diese Transkription wurde das *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet.

Zunächst wurden den RNA-Lösungen jeweils ein 1 µg RNA entsprechendes Volumen entnommen und in 0,2 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden anschließend mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8 µl aufgefüllt.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde die RNA vor Beginn der Synthese zunächst von möglichen DNA-Spuren befreit. Hierzu wurden jedem Reaktionsgefäß 1 µl *DNase I* und 1 µl *10x Reaction Buffer with MgCl₂* hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden danach für 30 Minuten bei 37 °C im *iCycler Thermal Cycler* (Bio-Rad, Hercules, USA) inkubiert. Durch Zugabe von je 1 µl *EDTA 50 mM* und anschließender Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C wurde die DNase inaktiviert und die RNA war bereit zur eigentlichen Transkription.

Diese erforderte nun zunächst die Anlagerung der Primer (sog. Primerhybridisierung oder *Annealing*) an die RNA-Einzelstränge. Die Primer werden benötigt, um später der Reversen Transkriptase als Startpunkt für die Kettenverlängerung zu dienen. Hierfür wurde den Reaktionsgefäßen je 1 µl Oligonucleotid-Primer (*Random Hexamer Primer*) hinzugegeben und bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert. Durch eine anschließende Lagerung der Proben auf Eis für mindestens eine Minute sollte die Ausbildung doppelsträngiger Strukturen vermieden und somit die Effizienz der Primerhybridisierung gesteigert werden. Auch zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte stets die Lagerung der Reaktionsgefäße auf Eis.

Im nächsten Schritt folgte die Extension der Primer durch die Reverse Transkriptase. Hierfür wurden jeweils 1 µl *RevertAid RT*, 2 µl *dNTP-Mix 10 mM*, 1 µl *RiboLock RNase Inhibitor* sowie 4 µl *5x Reaction Buffer* hinzugegeben und anschließend für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 42 °C für weitere 60 Minuten. Schließlich führte eine Temperaturerhöhung auf 70 °C für 5 Minuten zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und damit zum Ende der Extensionsphase. Zuletzt folgte die Abkühlung auf 10 °C, bevor die cDNA-Proben schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurden.

2.12. Verwendete Primer

Gen mRNA	Primer	Sequenz
RP38	RP38-f1	5'-TCAAGGACTTCCTGCTCACA-3'
RP38	RP38-r1	5'-AAAGGTATCTGCTGCATCGAA-3'
IL-1 beta	IL-1 beta-f1	5'-AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG-3'
IL-1 beta	IL-1 beta-r1	5'-GAAGCTGATGGCCCTAAACA-3'
IL-6	IL-6-f4	5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3'
IL-6	IL-6-r4	5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3'
TNF alpha	TNF-a-f1	5'-TCTGGCCCAGGCAGTCAGATC-3'
TNF alpha	TNF-a-r1	5'-TCAGCTTGAGGGTTTGCTACAA-3'
PDGFA	PDGFA-f1	5'-ATAGACTCCGTAGGGAGTGAG-3'
PDGFA	PDGFA-r1	5'-TTCTCTTCCTCCGAATGGGC-3'
TGF-beta	TGF-beta-f1	5'-TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC-3'
TGF-beta	TGF-beta-r1	5'-GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA-3'
FN1	FN1-f1	5'-ACAACGTCATAGTGGAGGCA-3'
FN1	FN1-r1	5'-CATCCGTAGGTTGGTTCAAG-3'
CD163	CD163-f1	5'-ACTTGAAGACTCTGGATCTGCT-3'
CD163	CD163-r1	5'-CTGGTGACAAAACAGGCACTG-3'
TGF-alpha	TGF-alpha-f1	5'-AGATTCCCACACTCAGTTCTG-3'
TGF-alpha	TGF-alpha-r1	5'-GAATGGCAGACACATGCTG-3'
KI-67	KI-67-f1	5'-TGACTTCCTCCATTCTGAAGAC-3'
KI-67	KI-67-r1	5'-TGGGTCTGTTATTGATGAGCC-3'
CD206	CD206-f1	5'-GATGAAAGGCAAGGATGGG-3'
CD206	CD206-r1	5'-CTTCGTGATTTTCATCTTGAC-3'
CCL2	CCL2-f1	5'-CCAGATGCAATCAATGCCC-3'
CCL2	CCL2-r1	5'-TGGTCTTGAAGATCACAGCT-3'

Tabelle 1: Sequenzen der Primer, die im Rahmen der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion verwendet wurden.

2.13. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) ist eine Methode zum Nachweis und der Quantifizierung von Nucleinsäuren. Hierdurch lässt sich eine Aussage über die Menge der cDNA und die Expression eines bestimmten Gens treffen. Durch Zugabe von Oligonucleotid-Primern für spezifische Gensequenzen kann diese Sequenz gezielt vermehrt und quantifiziert werden. Durch thermostabile DNA-Polymerasen und programmierbare *Thermocycler* ist die automatisierte Durchführung einer PCR möglich.

Die Quantifizierung erfolgt durch die Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes, der an doppelsträngige DNA bindet und dessen Intensität kontinuierlich in Echtzeit erfasst wird. Die Intensität des Fluoreszenzsignals nimmt dabei proportional zum vorhandenen PCR-Produkt zu.

Als Maß für die Menge des Ausgangsmaterials wird der sog. CT-Wert (*Threshold Cycle*, Schwellenwertzyklus) ermittelt. Dieser kennzeichnet den Amplifikationszyklus, an dem die Reaktion in den exponentiellen Anstieg übergeht und das Fluoreszenzsignal erstmals einen vorher festgelegten Schwellenwert übersteigt und detektiert werden kann. Diese Schwelle wird umso früher überschritten, je mehr Ausgangsmaterial ursprünglich vorhanden war.

Ein Zyklus besteht dabei immer aus den gleichen drei Teilschritten, die vielfach hintereinander wiederholt werden. Zuerst erfolgte bei hoher Temperatur (93 – 95 °C) die Denaturierung und das Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen. Im zweiten Schritt folgt bei niedrigerer Temperatur (50 – 65 °C) die Anlagerung der Oligonucleotid-Primer an die jeweilige komplementäre DNA-Sequenz. Die genaue Temperatur ist dabei abhängig von Länge und Sequenz der verwendeten Primer. Als Letztes erfolgt die Verlängerung (Elongation) der Primer bei ca. 70 °C durch die thermostabile DNA-Polymerase. Ausgehend vom 3'-Ende des Primers lagern sich komplementäre Basen an und werden durch die Polymerase verknüpft. In jedem Zyklus verdoppelt sich somit die Menge der vorhandenen DNA-Moleküle.

Da interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie *TB Green*[®] an jegliche doppelsträngige DNA-Struktur binden, können auch unspezifische PCR-Nebenprodukte wie beispielsweise zufällig entstandene Primer-Dimere den Farbstoff einlagern und als falsch-positive Signale detektiert werden. Aus diesem Grund soll im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion eine

Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um die Spezifität der PCR-Produkte bestimmen zu können. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt durch schrittweises Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung von 60 °C bis auf 95 °C im PCR-System. Hierbei werden die Doppelstränge bei einer jeweils spezifischen Schmelztemperatur wieder voneinander getrennt, sodass erneut ein Fluoreszenzsignal detektierbar wird. Unspezifische PCR-Produkte haben eine niedrigere Schmelztemperatur als die doppelsträngige DNA und können somit identifiziert werden.

Praktisches Vorgehen:

Für unsere Versuche erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion im *7500 Fast Real-Time PCR-System* (Applied Biosystems, Waltham, USA). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde *TB Green®* (Takara Bio, Shiga, Japan) verwendet. Es wurden Ansätze zu je 10 µl hergestellt und auf 96-well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verteilt. Die Ansätze enthielten pro well jeweils 5,2 µl *TB Green® Premix Ex Taq™ II* (Takara Bio, Shiga, Japan), 3 µl hochreinen Wassers sowie jeweils 0,4 µl des entsprechenden 10 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimers. Sie wurden durch Vortexen vermischt und auf der Platte verteilt. Anschließend wurde jeweils 1 µl cDNA (1:5 in hochreinem H₂O verdünnt) hinzugegeben.

Die Platten wurden mit selbstklebender Folie (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verschlossen. Durch Zentrifugieren für 30 Sekunden bei Raumtemperatur und 1000 x g sammelten sich die Ansätze vollständig am Boden der Platte an.

Die PCR begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 30 Sekunden. Anschließend folgten 40 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 3 Sekunden, gefolgt von der Primerhybridisierung und Elongationsphase bei 60 °C für 30 Sekunden. Zum Schluss folgte jeweils eine Schmelzkurvenanalyse.

Als Referenz-Gen wurde das ribosomale Protein 38 (RP38) verwendet. Es wird in M1-Makrophagen konstitutiv exprimiert und kann somit als interne Kontrolle sowie zur Bestimmung der Expressionsunterschiede genutzt werden. Die relative Expression der Ziel-Gene ergab sich aus dem Quotienten der jeweiligen gemessenen Genexpression und der Expression von RP38.

2.14. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *Microsoft Excel Professional Plus 2019* (Microsoft, Redmond, USA). Anschließend erfolgte die weitere Verarbeitung der Daten mit *GraphPadPrism 5* (GraphPad Software, San Diego, USA). Statistische Unterschiede wurden anhand des ungepaarten Studentischen T-Tests ermittelt.

2.15. Darstellung der Ergebnisse

Die Abbildungen 6-38 wurden mit dem Programm *GraphPadPrism 5* (GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Interleukin 1 beta in M1-Makrophagen

Die M1-Makrophagen wurden über jeweils 24 Stunden mit PRGF in Konzentrationen von 5 und 10 % stimuliert. Diese Versuche zeigten eine signifikante, konzentrationsabhängige Geninduktion von IL-1 beta in den M1-Makrophagen (Abbildung 6).

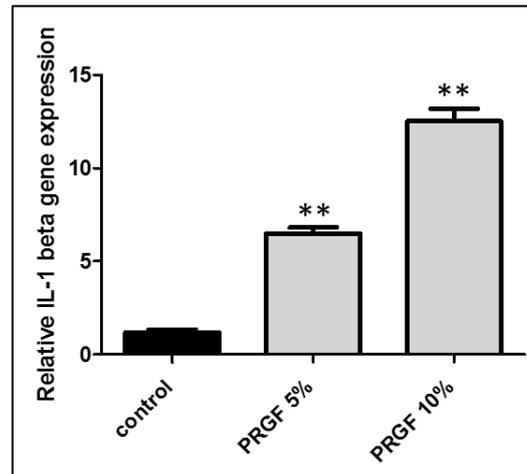


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Geninduktion von IL-1 beta in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden ohne und mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % behandelt. Es zeigte sich eine signifikante IL-1 beta-Geninduktion mit zunehmender Konzentration des PRGF. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Studentischen T-Tests (** = $p < 0,01$).

In unseren Untersuchungen zur Zeitkinetik zeigte sich durch Stimulation der M1-Makrophagen mit 10-prozentigem PRGF eine signifikante Induktion von IL-1 beta erst nach einer Stimulationsdauer von 72 Stunden. Nach 24 und 48 Stunden erreichte diese, obwohl relevant, aufgrund der relativ großen Standardabweichung keine statistische Signifikanz. Nach sechs Stunden Stimulationsdauer zeigte sich keine relevante Induktion von IL-1 beta in den M1-Makrophagen (Abbildung 7).

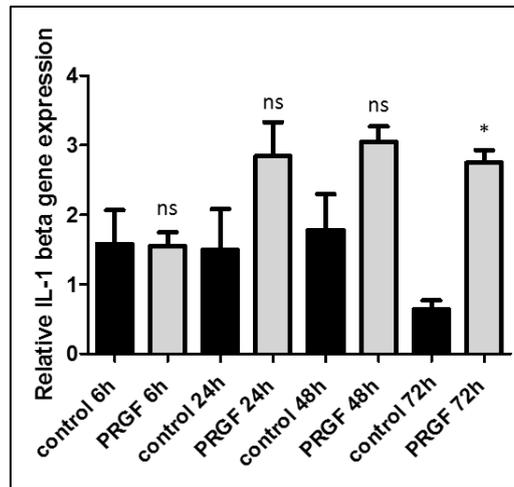


Abbildung 7: Zeitabhängige Geninduktion von IL-1 beta in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF. M1-Makrophagen wurden mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration über sechs, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. In diesem Versuch zeigte sich nach 24 und 48 Stunden eine deutlich sichtbare IL-1 beta-Geninduktion in den M1 Makrophagen im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle. Statistische Signifikanz erreichte diese jedoch erst nach 72-stündiger Stimulation (* = $p < 0,05$; Studentischer T-Test).

Des Weiteren untersuchten wir die Abhängigkeit der PRGF-vermittelten Geninduktion von IL-1 beta in M1-Makrophagen von dem jeweiligen PRGF-Spender. Hierfür wurden die M1-Makrophagen mit 10-prozentigem PRGF von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) über jeweils 24 Stunden stimuliert. Die Genexpression von IL-1 beta zeigte sich sehr stark abhängig von der Auswahl des jeweiligen PRGF-Spenders (Abbildung 8).

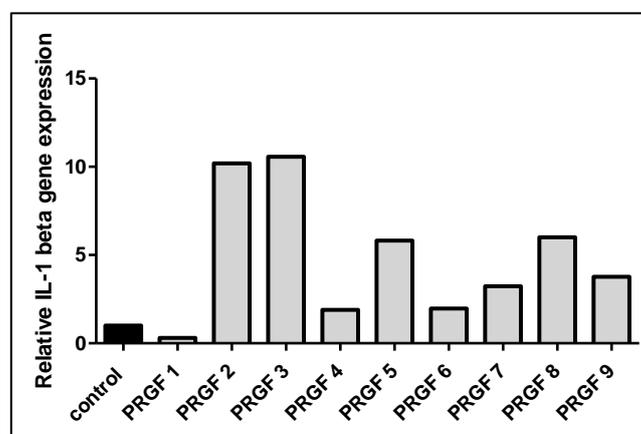


Abbildung 8: Die PRGF-vermittelte IL-1 beta-Geninduktion in M1-Makrophagen ist abhängig vom PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF (1:10) von neun unterschiedlichen Spendern behandelt. In diesem Experiment zeigte sich eine deutlich vom jeweiligen Spender abhängige IL-1 beta-Geninduktion in den mit PRGF behandelten M1-Makrophagen.

3.2. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Interleukin 6 in M1-Makrophagen

Wir untersuchten die Geninduktion von IL-6 in den M1-Makrophagen nach Stimulation mit 5- und 10-prozentigem PRGF über 24 Stunden. Bei diesem Versuch zeigte sich eine signifikante IL-6-Geninduktion, die unter Verwendung von fünfprozentigem PRGF noch deutlich stärker ausgeprägt war als unter Stimulation mit 10-prozentigem PRGF (Abbildung 9).

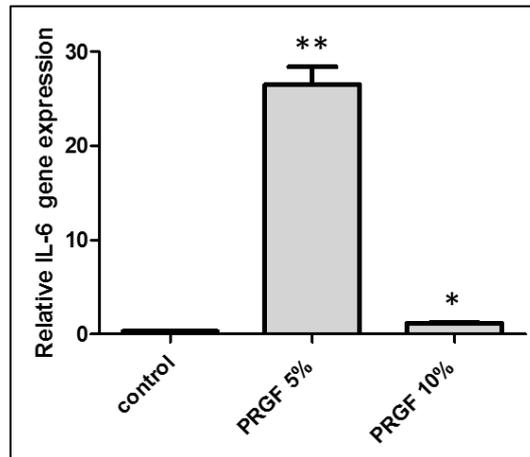


Abbildung 9: Konzentrationsabhängige IL-6-Geninduktion in M1-Makrophagen nach PRGF-Stimulation. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden ohne und mit PRGF (Konzentrationen 5 % und 10 %) stimuliert. Wir beobachteten eine signifikante IL-6-Geninduktion in den mit PRGF-behandelten M1-Makrophagen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; Studentischer T-Test).

Es wurden außerdem Versuche im Sinne einer Zeitkinetik unter Verwendung von 10-prozentigem PRGF durchgeführt. Hier zeigte sich erst nach 72-stündiger Stimulationsdauer eine signifikante Induktion von IL-6 in den M1-Makrophagen (Abbildung 10).

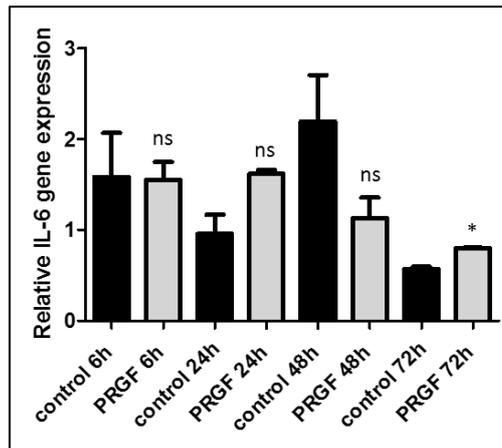


Abbildung 10: Zeitabhängige Geninduktion von IL-6 in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF. M1-Makrophagen wurden über sechs, 24, 48 und 72 Stunden mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration behandelt. Es zeigte sich erst nach 72 Stunden eine signifikante IL-6-Geninduktion in den PRGF-behandelten M1-Makrophagen (* = $p < 0,05$; Studentischer T-Test).

Um zu untersuchen, ob PRGF verschiedener Spender auch hier zu einer unterschiedlichen Genexpression von IL-6 in den M1-Makrophagen führt, wurden diese über 24 Stunden mit 10 % PRGF von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) stimuliert. Auch hier zeigte sich eine stark vom Spender abhängige IL-6-Geninduktion, die im Vergleich zur Kontrolle jedoch nur bei zwei Spendern relevant erhöht war (Abbildung 11).

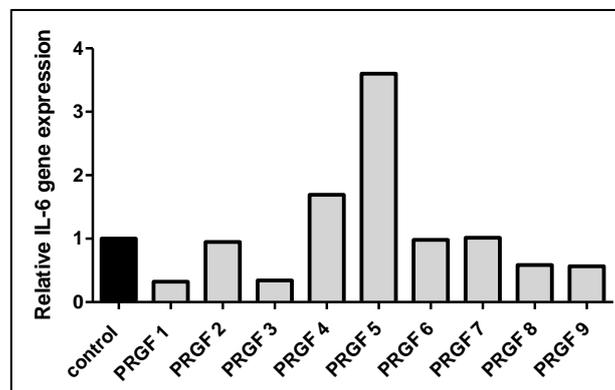


Abbildung 11: Die PRGF-vermittelte Geninduktion von IL-6 in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit 10 % PRGF von 9 unterschiedlichen Spendern behandelt. Auch in diesem Experiment zeigte sich eine deutlich vom PRGF-Spender abhängige IL-6-Geninduktion in den behandelten M1-Makrophagen.

3.3. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Tumor Nekrose Faktor alpha in M1-Makrophagen

Die M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % behandelt. Die TNF alpha-Geninduktion in den M1-Makrophagen wurde dadurch nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 12).

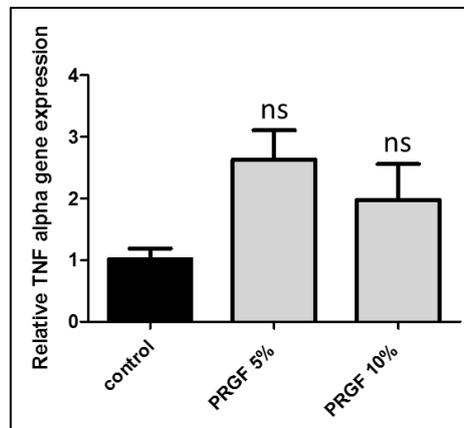


Abbildung 12: Die 24-stündige PRGF-Behandlung von M1-Makrophagen führt zu keiner signifikanten Induktion von TNF alpha. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in Konzentrationen von 5 % und 10 % behandelt. Anschließend bestimmten wir die relative TNF alpha-Genexpression. In diesem Experiment konnten wir keinen relevanten Einfluss einer 24-stündigen PRGF-Behandlung auf die TNF alpha-Genexpression und M1-Makrophagen beobachten (ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

In unseren Versuchen zur Zeitkinetik wurden die M1-Makrophagen über unterschiedliche Zeiträume mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration behandelt. Es zeigte sich ausschließlich nach 48 Stunden Stimulationsdauer eine signifikant inhibierte TNF alpha-Genexpression. Zu allen anderen Untersuchungszeitpunkten unterschied sich die Genexpression von TNF alpha in den PRGF-stimulierten Zellen nicht von der Expression unbehandelter M1-Makrophagen (Abbildung 13).

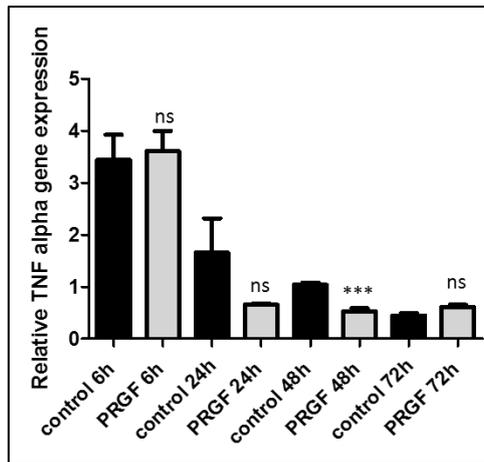


Abbildung 13: Zeitabhängige Genexpression von TNF alpha in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF. M1-Makrophagen wurden über sechs, 24, 48 und 72 Stunden mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration behandelt. Es zeigte sich nach 48 Stunden eine signifikante Inhibition der TNF alpha-Genexpression in den mit PRGF-behandelten M1-Makrophagen (***) = $p < 0,001$; Studentischer T-Test).

Auch in den Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher PRGF-Spender zeigte sich nach 24-stündiger Stimulation der M1-Makrophagen mit 10-prozentigem PRGF eine deutliche Abhängigkeit der TNF alpha-Geninduktion von den neun untersuchten PRGF-Spendern (PRGF 1 - PRGF 9). Je nach Spender zeigten sich neben einer relevanten Geninduktion teilweise auch gegenteilige Effekte im Sinne einer Geninhibition nach 24-stündiger Stimulation mit PRGF (Abbildung 14).

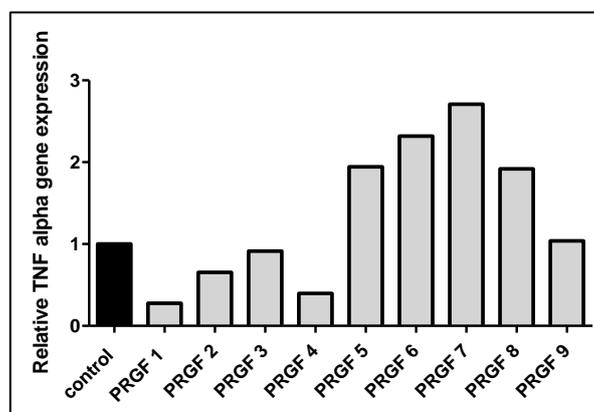


Abbildung 14: Die PRGF-vermittelte TNF alpha-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit 10 % PRGF von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) behandelt. In Abhängigkeit von den jeweiligen PRGF-Spendern zeigte sich eine teilweise inhibierte, teilweise induzierte TNF alpha-Genexpression in den M1-Makrophagen.

3.4. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Transforming Growth Factor beta in M1-Makrophagen

Nach 24-stündiger Stimulation der M1-Makrophagen mit 5- und 10-prozentigem PRGF zeigte sich eine konzentrationsabhängige Geninduktion von TGF-beta. Bei der Stimulation mit 10-prozentigem PRGF zeigte sich die Genexpression von TGF-beta im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 15).

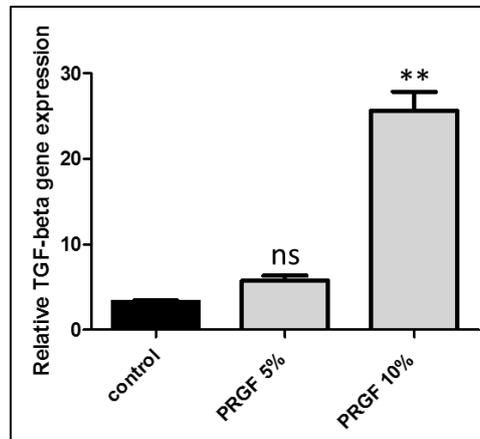


Abbildung 15: Die PRGF-Behandlung von M1-Makrophagen bewirkt eine konzentrationsabhängige Geninduktion von TGF-beta. M1-Makrophagen wurden 24 Stunden lang mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % stimuliert. Danach bestimmten wir die TGF-beta-Geninduktion in den M1-Makrophagen. Dieser Versuch erbrachte eine konzentrationsabhängige TGF-beta-Geninduktion in den M1-Makrophagen nach Stimulation mit 10-prozentigem PRGF (** = $p < 0,01$, ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

Unsere Untersuchungen zum Einfluss der Stimulationsdauer auf die Genexpression von TGF-beta zeigten eine signifikante Geninduktion nach sechs und nach 72 Stunden Stimulationsdauer in den mit 10 % PRGF behandelten M1-Makrophagen (Abbildung 16).

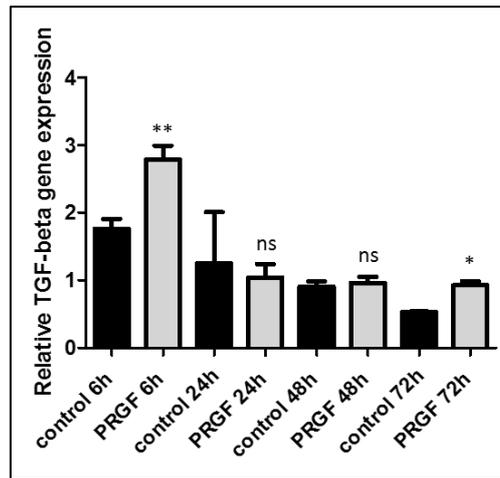


Abbildung 16: Zeitabhängige Geninduktion von TGF-beta in PRGF-stimulierten M1-Makrophagen. M1-Makrophagen wurden über sechs, 24, 48 und 72 Stunden mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration behandelt. Dieses Experiment zeigte eine signifikante TGF-beta-Geninduktion in PRGF-behandelten M1-Makrophagen nach sechs und 72 Stunden (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; Studentischer T-Test).

Die PRGF-vermittelte Induktion von TGF-beta in den M1-Makrophagen zeigte sich unter Behandlung der Zellen mit 10-prozentigem PRGF über 24 Stunden ebenfalls stark abhängig vom jeweiligen PRGF-Donator (PRGF 1 - PRGF 9). Bei sechs der neun Donatoren zeigte sich die TGF-beta-Genexpression relevant erhöht, bei einem der Donatoren zeigten sich jedoch auch gegenteilige Effekte im Sinne einer relevanten Inhibition der TGF-beta-Genexpression (Abbildung 17).

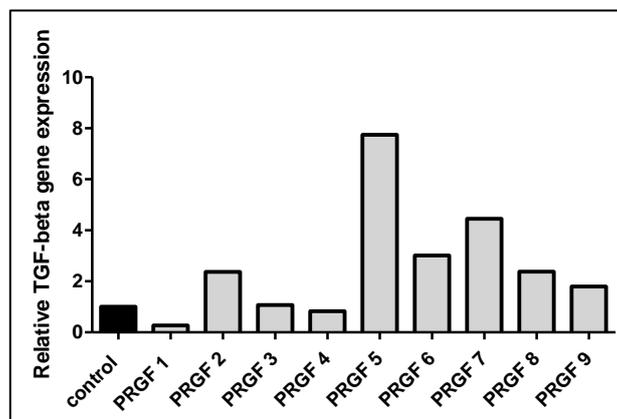


Abbildung 17: Die PRGF-abhängige TGF-beta-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donator. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF (10 %) von neun unterschiedlichen Donatoren (PRGF 1 - PRGF 9) behandelt. Im Anschluss analysierten wir die TGF-beta-Genexpression in den M1-Makrophagen. Auch hier zeigte sich eine stark vom jeweiligen PRGF-Donator abhängige Induktion von TGF-beta in den mit PRGF behandelten M1-Makrophagen.

3.5. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Transforming Growth Factor alpha in M1-Makrophagen

Die M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % stimuliert, anschließend analysierten wir die Geninduktion von TGF-alpha. In diesen Versuchen zeigte sich eine signifikante Geninduktion von TGF-alpha unter Verwendung von PRGF in 10-prozentiger Konzentration (Abbildung 18).

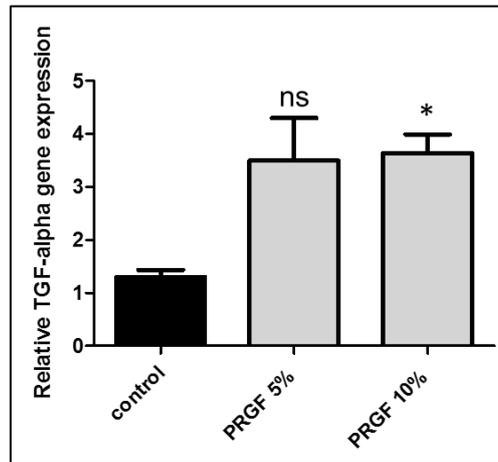


Abbildung 18: Konzentrationsabhängige Induktion von TGF-alpha in PRGF-behandelten M1-Makrophagen. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % behandelt. Dieser Versuch zeigte eine konzentrationsabhängige TGF-alpha-Geninduktion in den M1 Makrophagen durch die 10-prozentige PRGF-Stimulation (* = $p < 0,05$, ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

Unsere Untersuchungen im Sinne einer Zeitkinetik unter Verwendung von ebenfalls 10-prozentigem PRGF zeigten keine signifikant veränderten TGF-alpha-Genexpressionen nach sechs, 24, 48 oder 72 Stunden Behandlungsdauer (Abbildung 19).

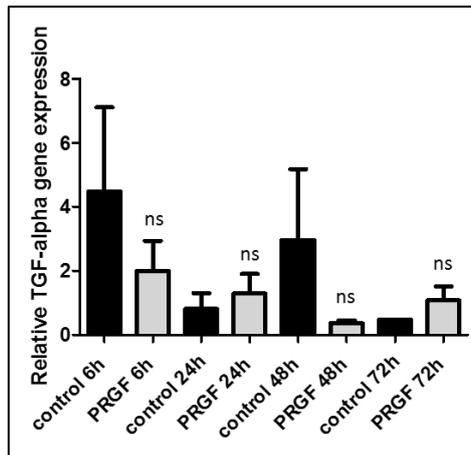


Abbildung 19: Zeitunabhängiger Einfluss von PRGF auf die TGF-alpha-Genexpression in PRGF-stimulierten M1-Makrophagen. M1-Makrophagen wurden mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration über sechs, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. In diesem Experiment zeigte sich keine signifikante TGF-alpha-Geninduktion in PRGF-behandelten M1-Makrophagen (ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

In den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Genexpression von unterschiedlichen PRGF-Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) zeigte sich, dass eine 24-stündige Stimulation mit 10 % PRGF bei mindestens fünf der neun Spender zu einer relevant erhöhten TGF-alpha-Geninduktion in den M1-Makrophagen führte (Abbildung 20).

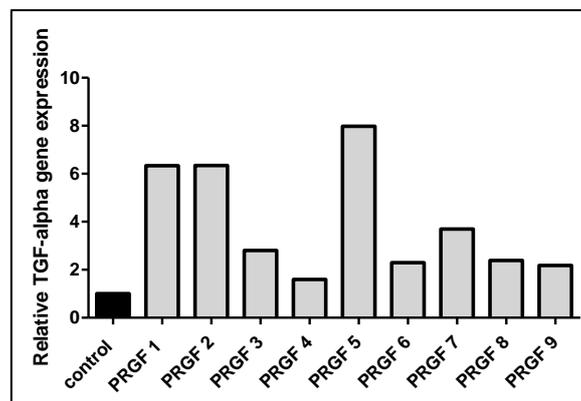


Abbildung 20: Die PRGF-vermittelte TGF-alpha-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit 10 % PRGF von neun unterschiedlichen Spendern behandelt. Auch in diesen Experimenten zeigte sich die PRGF-vermittelte TGF-alpha-Geninduktion in den M1-Makrophagen stark abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender.

3.6. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von KI-67 in M1-Makrophagen

M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit 5- und 10-prozentigem PRGF behandelt. Danach wurde die Genexpression von KI-67 analysiert. In der Analyse der Genexpression zeigte sich in den PRGF-behandelten M1-Makrophagen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikant inhibierte KI-67-Genexpression (Abbildung 21).

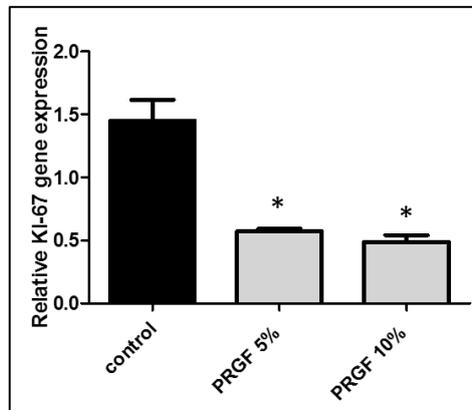


Abbildung 21: PRGF führt zu einer Inhibition der KI-67-Genexpression in M1-Makrophagen. Wir behandelten M1-Makrophagen über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 %. Anschließende Analysen zeigten eine signifikante Inhibition der KI-67-Genexpression in M1-Makrophagen nach 24-stündiger PRGF-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen (* = $p < 0,05$; Studentischer T-Test).

In unseren Untersuchungen zur Zeitkinetik zeigte sich, dass es unter Stimulation mit 10 % PRGF nach sechs und 72 Stunden Behandlungsdauer zu einer signifikant erhöhten Genexpression von KI-67 in den behandelten M1-Makrophagen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kam (Abbildung 22).

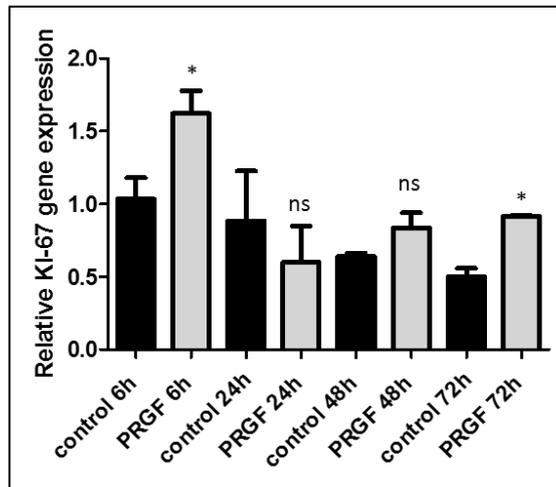


Abbildung 22: Zeitabhängige, PRGF-vermittelte KI-67-Geninduktion in M1-Makrophagen. M1-Makrophagen wurden mit 10-prozentigem PRGF über sechs, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. In diesen Untersuchungen zeigte sich nach einer sechs und 72 Stunden dauernden PRGF-Stimulation eine signifikante Geninduktion von KI-67 in den M1-Makrophagen (* = $p < 0,05$, ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

Um zu untersuchen, ob PRGF von unterschiedlichen Spendern die KI-67-Genexpression in M1-Makrophagen unterschiedlich beeinflusst, wurden die M1-Makrophagen über 24 Stunden mit PRGF von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) in 10-prozentiger Konzentration behandelt. Hierbei zeigte sich, dass es in den behandelten M1-Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle bei drei Spendern zu einer inhibierten, bei fünf zu einer vergleichbaren und bei einem Spender zu einer verstärkten KI-67-Genexpression kam (Abbildung 23).

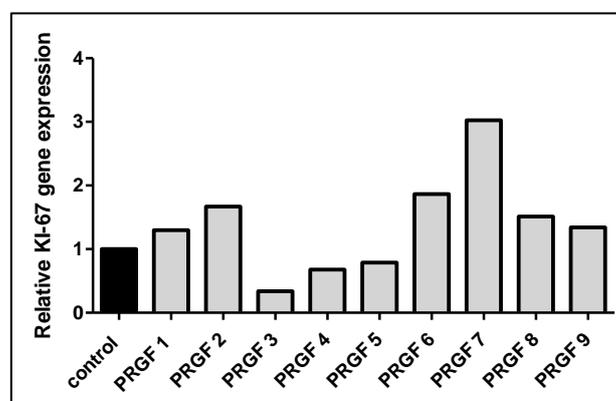


Abbildung 23: Die PRGF-vermittelte KI-67-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden für 24 Stunden mit PRGF (10 %) von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) behandelt. Unsere Untersuchungen zeigten, dass es durch die PRGF-Behandlung bei einigen PRGF-Spendern zu einer Inhibition und bei anderen zu einer Induktion der KI-67 Genexpression in den M1-Makrophagen kam.

3.7. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Platelet-Derived Growth Factor A in M1-Makrophagen

Die Stimulation der M1-Makrophagen über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % führte zu einer konzentrationsabhängigen, signifikant verstärkten Genexpression von PDGFA (Abbildung 24).

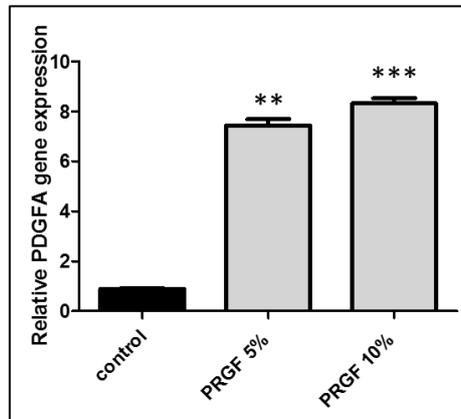


Abbildung 24: Die Behandlung der M1-Makrophagen mit PRGF führt zu einer Induktion von PDGFA. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % behandelt. Nach erfolgter PRGF-Behandlung zeigte sich eine konzentrationsabhängige Geninduktion von PDGFA in den M1-Makrophagen (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; Studentischer T-Test).

Zur Ermittlung der zeitabhängigen Genexpression wurden Versuche im Sinne einer Zeitkinetik durchgeführt. Die Stimulation der M1-Makrophagen mit 10-prozentigem PRGF zeigte ausschließlich nach 6 Stunden eine signifikant erhöhte PDGFA-Genexpression. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigten sich die Genexpression von PDGFA bereits nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden nicht weiter signifikant erhöht (Abbildung 25).

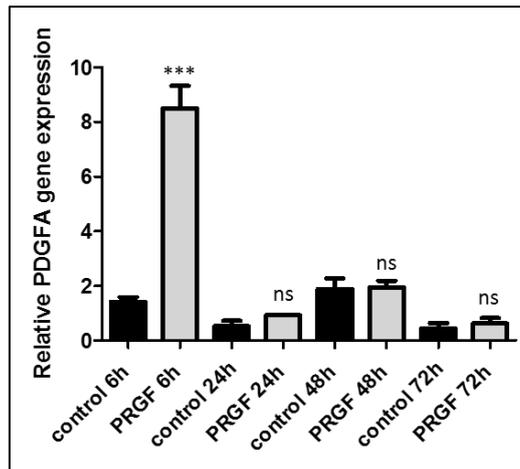


Abbildung 25: Zeitabhängige Induktion von PDGFA in PRGF-behandelten M1 Makrophagen. M1-Makrophagen wurden mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration über sechs, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. In diesem Versuch beobachteten wir nach sechs Stunden eine signifikante Geninduktion von PDGFA in den PRGF-behandelten M1-Makrophagen (***) = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Spender auf die Geninduktion von PDGFA in M1-Makrophagen zeigten nach einer 24-stündigen Stimulation mit 10 % PRGF von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) eine deutliche Abhängigkeit vom jeweiligen PRGF-Spender (Abbildung 26).

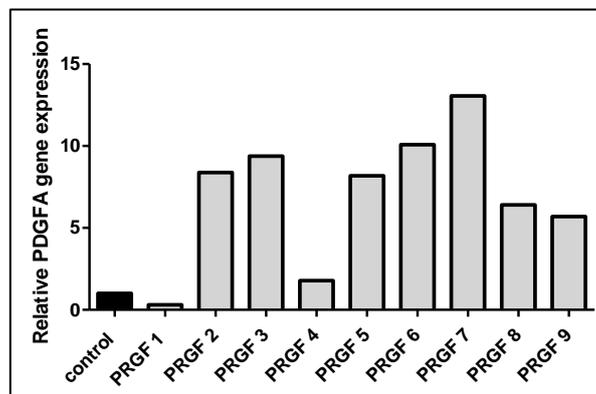


Abbildung 26: Die PRGF-vermittelte PDGFA-Geninduktion in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit 10-prozentigem PRGF von neun unterschiedlichen Spendern behandelt. Im Anschluss bestimmten wir die relative PDGFA-Genexpression. Wie in den vorigen Experimenten zeigte sich auch hier eine deutlich vom jeweiligen Spender abhängige PDGFA-Geninduktion in den mit PRGF behandelten M1-Makrophagen.

3.8. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von CD163 in M1-Makrophagen

Die M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in 5- und 10-prozentiger Konzentration stimuliert. Im Anschluss untersuchten wir die Genexpression von CD163. Hier zeigte sich konzentrationsunabhängig eine signifikante Induktion von CD163 (Abbildung 27).

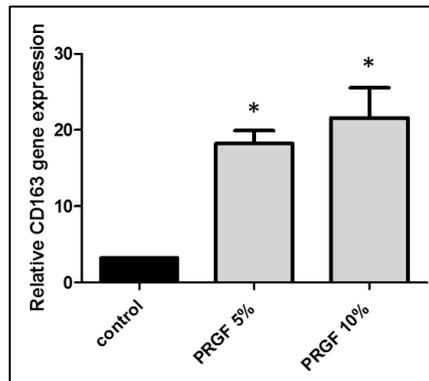


Abbildung 27: Die Behandlung von M1-Makrophagen mit PRGF führt zu einer signifikanten Geninduktion von CD163. Wir stimulierten M1-Makrophagen über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % und untersuchten im Anschluss die relative CD163-Geninduktion. Diese Analysen zeigten eine signifikante Induktion von CD163 in den M1-Makrophagen nach erfolgter PRGF-Behandlung (* = $p < 0,05$; Studentischer T-Test).

Unsere Untersuchungen zur Zeitkinetik zeigten, dass in diesem Experiment erst eine Behandlungsdauer von 72 Stunden zu einer signifikant erhöhten CD163-Geninduktion in den mit 10-prozentigen PRGF behandelten M1-Makrophagen führte (Abbildung 28).

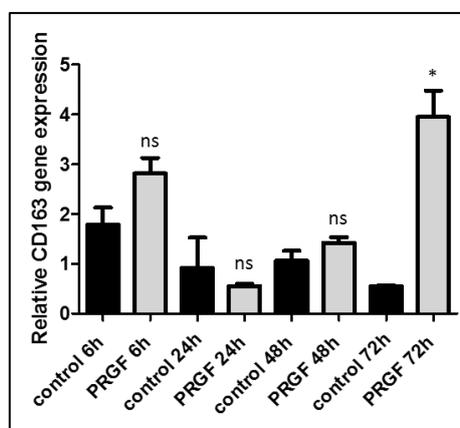


Abbildung 28: Zeitabhängige, PRGF-vermittelte Geninduktion von CD163 in M1-Makrophagen. M1-Makrophagen wurden mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration über sechs, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. In diesem Experiment zeigte sich erst nach 72 Stunden eine signifikante CD163-Geninduktion in den PRGF-behandelten M1-Makrophagen (* = $p < 0,05$, ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

Um zu untersuchen, inwieweit die PRGF-vermittelte CD163-Induktion in den M1-Makrophagen vom jeweiligen PRGF-Donor abhängig ist, stimulierten wir die Zellen über 24 Stunden mit 10-prozentigem PRGF von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9). Hierbei zeigte sich bei sieben der neun Spender eine relevant erhöhte CD163-Geninduktion in den PRGF-behandelten M1-Makrophagen (Abbildung 29).

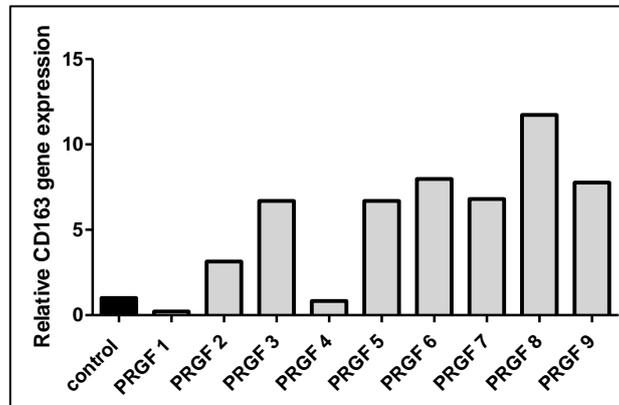


Abbildung 29: Die PRGF-vermittelte CD163-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor. Wir behandelten M1-Makrophagen über 24 Stunden mit PRGF (10 %) von neun unterschiedlichen Spendern. Hier zeigte sich, dass auch die PRGF-vermittelte CD163-Geninduktion in M1-Makrophagen abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor war.

3.9. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von CD206 in M1-Makrophagen

M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit 5- und 10-prozentigem PRGF behandelt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Einfluss einer Stimulation mit PRGF auf die CD206-Genexpression in M1-Makrophagen (Abbildung 30).

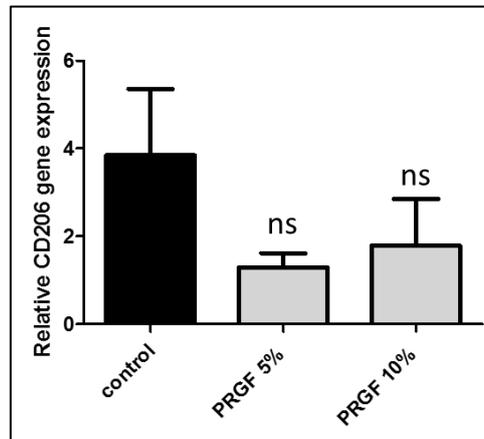


Abbildung 30: Die Genexpression von CD206 wird in M1 Makrophagen durch eine 24-stündige PRGF-Stimulation nicht signifikant beeinflusst. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % stimuliert. Im Anschluss wurde die Genexpression von CD206 in diesen Zellen untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der PRGF-Behandlung auf die CD206-Genexpression in den M1 Makrophagen (* = $p < 0,05$; Studentischer T-Test).

Untersuchungen zur Zeitkinetik zeigten, dass es erst nach 72-stündiger Behandlung mit 10 % PRGF zu einer signifikant erhöhten Genexpression von CD206 in den stimulierten M1-Makrophagen kam (Abbildung 31).

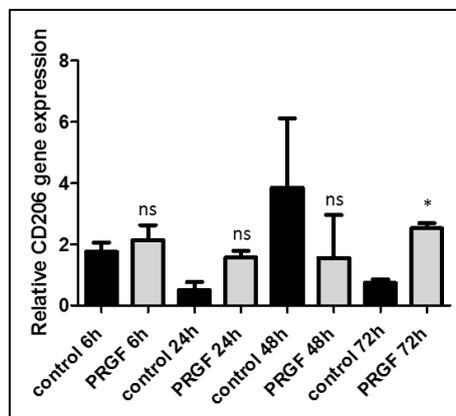


Abbildung 31: Zeitabhängige, PRGF-vermittelte Geninduktion von CD206 in M1-Makrophagen. M1-Makrophagen wurden mit PRGF (10 %) über sechs, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Es zeigte sich erst nach 72 Stunden eine signifikante CD206-Geninduktion in den PRGF-behandelten M1-Makrophagen (* = $p < 0,05$, ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

Die PRGF-vermittelte CD206-Geninduktion in den M1-Makrophagen war ebenfalls stark vom jeweiligen PRGF-Spender abhängig. Nach einer 24-stündigen Behandlung der M1-Makrophagen mit 10-prozentigem PRGF von neun unterschiedlichen Spendern kam es bei vier der neun PRGF-Spender zu einer relevanten CD206-Geninduktion in den M1-Makrophagen (Abbildung 32).

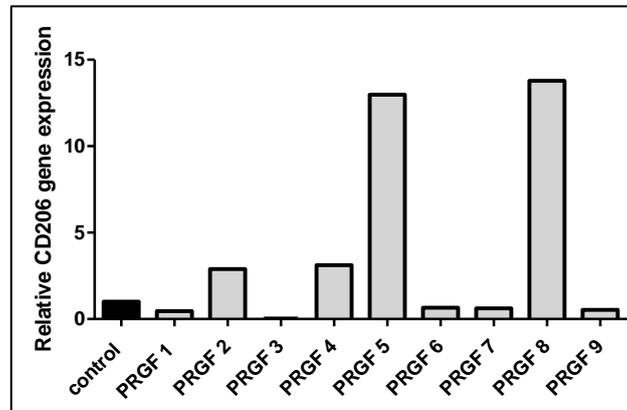


Abbildung 32: Die PRGF-abhängige CD206-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. Wir behandelten M1-Makrophagen 24 Stunden mit PRGF (10 %) von neun unterschiedlichen Spendern. Es zeigte sich, dass auch die PRGF-vermittelte CD206-Geninduktion in M1-Makrophagen von dem jeweiligen PRGF-Spender abhängig ist.

3.10. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Fibronectin 1 in M1-Makrophagen

Nach einer Stimulation mit 5- und 10-prozentigem PRGF über jeweils 24 Stunden zeigte sich auch bei der Genexpression von FN1 eine konzentrationsabhängige, signifikante Geninduktion in den M1-Makrophagen (Abbildung 33).

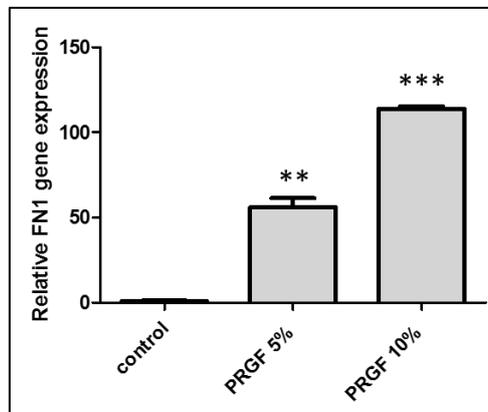


Abbildung 33: Konzentrationsabhängige Geninduktion von FN1 in M1-Makrophagen nach PRGF-Stimulation. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der FN1-Genexpression in den behandelten Zellen. In unseren Versuchen zeigte sich eine signifikante, konzentrationsabhängige Geninduktion von FN1 in den M1 Makrophagen (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; Studentischer T-Test).

In den Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Stimulationsdauern auf die Expression von FN1 zeigte sich eine signifikante Geninduktion nach sechs, 48 und 72 Stunden Behandlungsdauer. Nach 24-stündiger Stimulation mit PRGF war die FN1-Geninduktion in diesem Experiment zwar ebenfalls deutlich erhöht, erreichte aber keine statistische Signifikanz (Abbildung 34).

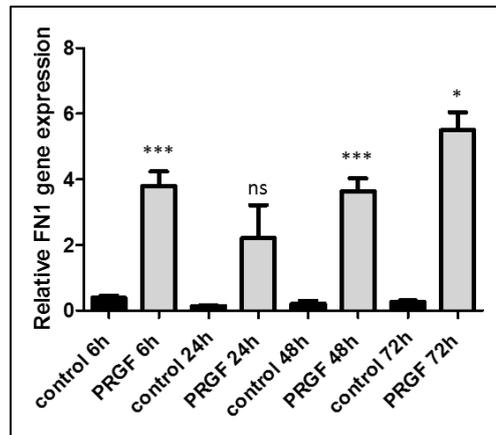


Abbildung 34: Zeitabhängige Geninduktion von FN1 in M1-Makrophagen nach PRGF-Behandlung. M1-Makrophagen wurden über sechs, 24, 48 und 72 Stunden mit 10-prozentigem PRGF behandelt. In diesem Experiment zeigte sich nach allen Stimulationsdauern eine relevante und, mit Ausnahme der 24-stündigen Stimulation, auch signifikante Geninduktion von FN1 in den M1-Makrophagen (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

Die M1-Makrophagen wurden mit 10-prozentigem PRGF von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF 1 - PRGF 9) über 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Genexpression von FN1 in den behandelten Zellen untersucht. Hier zeigte sich bei sieben der neun PRGF-Spender eine relevante FN1-Geninduktion in den M1-Makrophagen (Abbildung 35).

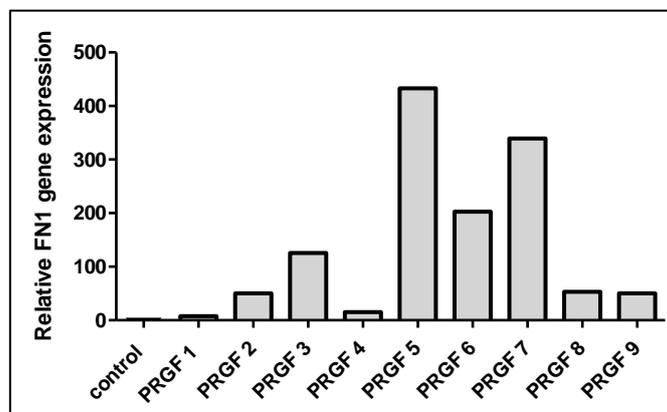


Abbildung 35: Die PRGF-induzierte FN1-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF (10 %) von neun unterschiedlichen Spendern (PRGF1 - PRGF 9) stimuliert. Diese Experimente zeigten, dass die PRGF-vermittelte FN1-Geninduktion stark abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender ist.

3.11. Die PRGF-vermittelte Geninduktion von Chemokinligand-2 in M1-Makrophagen

Unsere Untersuchungen zum Einfluss der PRGF-Behandlung auf die Genexpression von CCL2 zeigten eine signifikante, konzentrationsunabhängige CCL2-Geninduktion in den M1-Makrophagen nach 24-stündiger Stimulation mit 5- und 10-prozentigem PRGF (Abbildung 36).

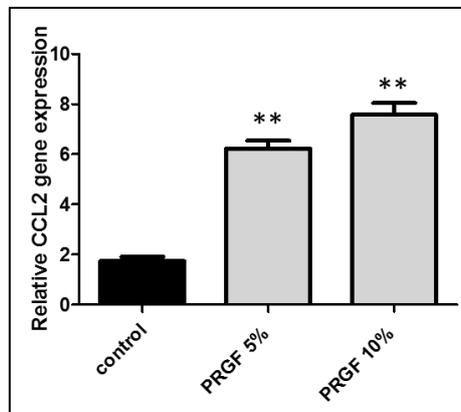


Abbildung 36: Die PRGF-Therapie führt konzentrationsunabhängig zu einer signifikanten CCL2-Geninduktion in M1-Makrophagen. M1-Makrophagen wurden über 24 Stunden mit PRGF in den Konzentrationen 5 % und 10 % behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der relativen CCL2-Genexpression. Es zeigte sich nach 24-stündiger PRGF-Behandlung eine signifikante Induktion von CCL2 in den M1-Makrophagen (** = $p < 0,01$; Studentischer T-Test).

Für die entsprechende Zeitkinetik wurden die Zellen mit PRGF in 10-prozentiger Konzentration jeweils sechs, 24, 48 oder 72 Stunden lang behandelt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich in den stimulierten M1-Makrophagen unabhängig von der Stimulationsdauer kein signifikanter Einfluss der PRGF-Behandlung auf die CCL2-Genexpression (Abbildung 37).

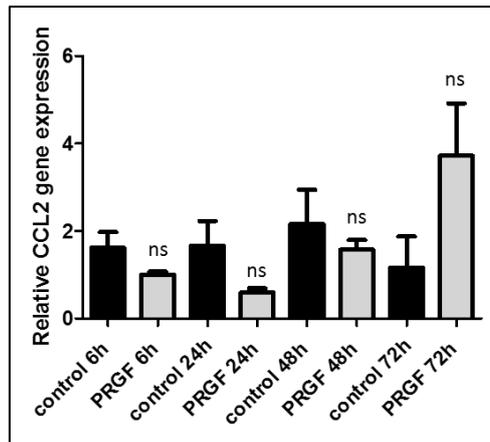


Abbildung 37: Die Genexpression von CCL2 in M1-Makrophagen ist zeit- und PRGF-unabhängig. M1-Makrophagen wurden mit PRGF (10 %) für sechs, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Unabhängig von der Behandlungsdauer konnte keine signifikante Geninduktion von CCL2 in den M1-Makrophagen beobachtet werden (ns = nicht signifikant; Studentischer T-Test).

In den Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher PRGF-Spender auf die CCL2-Expression zeigte sich auch in diesen Versuchen eine starke Abhängigkeit der Geninduktion von der Auswahl des jeweiligen PRGF-Spender. Nur bei sechs der neun untersuchten Spender (PRGF 1 - PRGF 9) führte eine 24-stündige Behandlung der M1-Makrophagen mit 10% PRGF zu einer relevanten Geninduktion von CCL2 (Abbildung 38).

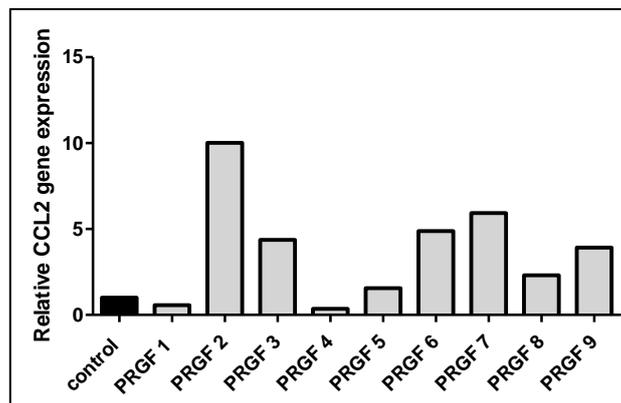


Abbildung 38: Die PRGF-vermittelte CCL2-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender. M1-Makrophagen wurden 24 Stunden lang mit PRGF (10 %) von neun unterschiedlichen Spendern behandelt. Im Anschluss wurde die CCL2-Genexpression in den M1-Makrophagen untersucht. Diese Experimente zeigten, dass auch die PRGF-vermittelte Geninduktion von CCL2 in M1-Makrophagen abhängig vom jeweiligen PRGF Spender ist.

4. Diskussion

Autologe Thrombozytenkonzentratprodukte wie PRGF oder PRF enthalten eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen und haben deswegen allgemein ein hohes regeneratives Potenzial (1)(2)(3)(4). Aufgrund dieser enthaltenen Proteine werden sie weltweit in vielen verschiedenen medizinischen Disziplinen klinisch eingesetzt, um die Regeneration von Geweben zu erzielen oder zu beschleunigen (7)(20)(21)(22)(5). Auch in der Therapie von chronischen oder schwer heilenden Wunden sowie komplizierten Wundheilungsverläufen werden diese Produkte bereits erfolgreich klinisch eingesetzt (8)(9). Bislang ist jedoch nicht ausreichend untersucht, welche Mechanismen für diese positiven Wundheilungsverläufe unter einer lokalen PRGF- oder PRF-Therapie verantwortlich sind. In früheren Versuchsreihen konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung von Keratinozyten mit PRGF zu einer Induktion antimikrobieller Peptide in den Keratinozyten und dadurch mutmaßlich zu einer Aktivierung der epithelialen Barrierefunktion der Haut führt (23)(24)(25). Darüber hinaus scheint eine Behandlung von Keratinozyten mit PRGF zu einer Verbesserung der Bildung extrazellulärer Matrix zu führen (26).

In dem komplexen Zusammenspiel des Wundheilungsprozesses spielen Makrophagen eine bedeutsame Rolle (14)(15). Prinzipiell können sogenannte M1-Makrophagen von M2-Makrophagen unterschieden werden (27). Diese beiden Subtypen unterscheiden sich maßgeblich in ihren Funktionen und übernehmen dementsprechend sehr unterschiedliche Rollen in der Wundheilung. M1-Makrophagen gelten als proinflammatorisch und leisten insbesondere in der frühen Phase der Wundheilung einen wichtigen Beitrag, da sie für die „Wundreinigung“ verantwortlich sind. Sie sind an der Abwehr eindringender Fremdkörper und Mikroorganismen sowie der Phagozytose nekrotischer Zellen und Gewebe beteiligt und ermöglichen dadurch erst eine phasengerechte Wundheilung (28). Im Gegensatz dazu sind die antiinflammatorischen M2-Makrophagen in der späten Phase der Wundheilung unter anderem an der Bildung und Strukturierung der extrazellulären Matrix beteiligt sowie zuständig für die Neoangiogenese und damit für die eigentliche Geweberegeneration (15)(29)(30)(31).

In dieser Arbeit sollte anhand von Zellkulturversuchen untersucht werden, ob und wie eine Behandlung mit PRGF die Funktion und den Proliferationsgrad von M1-Makrophagen

beeinflussen kann. Hierfür wählten wir verschiedene Gene aus, die als charakteristisch für diesen Makrophagensubtyp und ihren Proliferationsgrad angesehen werden.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von IL-1 beta in M1-Makrophagen

IL-1 beta gilt als proinflammatorisches Zytokin (32), das charakteristischerweise von M1-Makrophagen exprimiert und sezerniert werden kann (33). In unseren Zellkulturversuchen beobachteten wir, dass eine 24-stündige Stimulation der M1-Makrophagen mit PRGF zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Geninduktion von IL-1 beta in den M1-Makrophagen führte. Auffallend war dabei eine starke Abhängigkeit des Induktionsausmaßes von der Auswahl des PRGF-Spenders. Insgesamt zeigte sich jedoch eine eindeutige Steigerung der Genexpression, sodass auf eine Aktivierung der M1-Makrophagen durch die PRGF-Stimulation geschlossen werden kann.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von IL-6 in M1-Makrophagen

In unseren Zellkulturversuchen konnten wir feststellen, dass die Behandlung von M1-Makrophagen mit PRGF ebenfalls zu einer signifikanten Geninduktion von IL-6 führte. Da auch IL-6 als charakteristisches Zytokin für M1-Makrophagen (34) gilt und ebenfalls ausgeprägt proinflammatorische Eigenschaften besitzt (32), kann auch dies als Ausdruck der Aktivierung der proinflammatorischen Funktion der M1-Makrophagen durch die PRGF-Stimulation gedeutet werden. Auch hier zeigte sich das Ausmaß der Aktivierung stark abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von TNF alpha in M1-Makrophagen

TNF alpha hat viele und sehr diverse Funktionen, gilt allgemein aber als proinflammatorisches Zytokin (35), dessen Expression ebenfalls als charakteristisch für M1-Makrophagen angesehen werden kann (36)(37)(38). Wir beobachteten in unseren Zellkulturversuchen heterogene Effekte einer PRGF-Stimulation auf die Genexpression von TNF alpha in den M1-Makrophagen. Sowohl während der Konzentrations- als auch während der Zeitkinetiken zeigte sich keine relevante Geninduktion, jedoch zeigte sich nach 48-stündiger Stimulationsdauer eine signifikant inhibierte TNF alpha-Genexpression.

Da sich in der Zeitkinetik nach 24-stündiger Stimulation kein signifikanter Effekt zeigte, könnte hierin die Ursache für die fehlende Signifikanz der Ergebnisse in der Konzentrationskinetik liegen, in der über denselben Zeitraum stimuliert wurde.

Dennoch ergab die Stimulation der Zellen mit PRGF von neun unterschiedlichen Spendern über 24 Stunden bei immerhin vier dieser neun Spender eine deutliche Geninduktion von TNF alpha. Auch in Bezug auf die Expression von TNF alpha nach PRGF-Stimulation scheinen in M1-Makrophagen somit also stark spenderabhängige und zum Teil gegensätzliche Effekte vorzuliegen.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von TGF-beta in M1-Makrophagen

TGF-beta gilt als proangiogenes Zytokin (39), das sowohl von M1- als auch von M2-Makrophagen exprimiert werden kann (40)(41). Wir konnten zeigen, dass die Behandlung der M1-Makrophagen mit PRGF nach sechs- und 24-stündiger Stimulationsdauer zu einer konzentrationsabhängigen Geninduktion von TGF-beta in diesen Zellen führte. Gleichzeitig zeigte sich nach einer 24-stündigen PRGF-Behandlung bei mindestens drei der neun untersuchten PRGF-Spender eine deutliche TGF-beta-Geninduktion in den M1-Makrophagen. Da TGF-beta sowohl von M1- als auch von M2-Makrophagen exprimiert werden kann, bleibt der genaue Einfluss der PRGF-Stimulation auf die Funktion der M1-Makrophagen weiterhin unklar.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von TGF-alpha in M1-Makrophagen

In unseren in vitro Versuchen konnten wir feststellen, dass die Behandlung von M1-Makrophagen mit PRGF zumindest nach 24-stündiger Behandlungsdauer und bei Verwendung einer 10-prozentigen PRGF-Konzentration zu einer signifikanten TGF-alpha-Geninduktion führen kann. Auch dieser Effekt war stark vom jeweiligen PRGF-Spender abhängig, so kam es bei mindestens vier der neun untersuchten PRGF-Spender zu einer deutlichen Geninduktion von TGF-alpha in den stimulierten M1-Makrophagen. Da die TGF-alpha-Genexpression mit der Funktion der M1-Makrophagen assoziiert ist (40), leiten wir aus unseren Ergebnissen eine potenzielle Aktivierung der M1-Makrophagen durch eine Stimulation mit PRGF ab.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von KI-67 in M1-Makrophagen

Die Expression von KI-67 gilt allgemein als Ausdruck der zellulären Proliferationsrate (42)(43). Da wir im Rahmen unserer Versuche beobachten konnten, dass die PRGF-Behandlung von M1-Makrophagen sowohl zu einer Geninduktion als auch zu einer -inhibition von KI-67 führen kann, kann diesbezüglich abschließend kein konstanter Effekt beschrieben werden. Die Ursache hierfür wird in den unterschiedlichen Potenzen verschiedener PRGF-Spender vermutet.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von PDGFA in M1-Makrophagen

In unseren Versuchen konnten wir feststellen, dass die Behandlung von M1-Makrophagen mit PRGF zu einer konzentrationsabhängigen, signifikanten Geninduktion von PDGFA in den M1-Makrophagen nach einer Stimulationsdauer von sechs und 24 Stunden führte. Bei den Untersuchungen unterschiedlicher PRGF-Spender zeigte sich, dass es bei sieben der neun untersuchten Spender zu einer deutlichen Geninduktion von PDGFA in den behandelten M1-Makrophagen kam. Da gezeigt werden konnte, dass PDGFA proinflammatorische, proangiogene und profibrogene Effekte, unter anderem an infarziertem Myokard haben kann (40)(44), ist vorstellbar, dass die von uns beobachtete PDGFA-Geninduktion in M1-Makrophagen ebenfalls für die wundheilungsfördernden Eigenschaften von PRGF mitverantwortlich sein kann.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von CD163 in M1-Makrophagen

CD163 gilt eigentlich als charakteristisches Oberflächenprotein der M2-Makrophagen (38)(45)(46)(47)(48). Wir konnten in unseren Versuchen jedoch beobachten, dass die Behandlung mit PRGF auch bei M1-Makrophagen zu einer signifikanten CD163-Geninduktion führen kann. Entsprechend zeigte sich bei sieben der neun untersuchten PRGF-Spender eine deutliche Geninduktion von CD163 in den stimulierten M1-Makrophagen. Somit scheint PRGF nicht nur zu einer Aktivierung von proinflammatorischen Funktionen der M1-Makrophagen zu führen, sondern auch Funktionen in den M1-Makrophagen zu aktivieren, die normalerweise allgemein eher den antiinflammatorischen, regenerativen M2-Makrophagen zugeschrieben werden.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von CD206 in M1-Makrophagen

CD206 gilt ebenfalls als Oberflächenprotein, das eher für den antiinflammatorischen M2-Makrophagensubtyp charakteristisch ist (29)(49)(50). Wir konnten in unseren Versuchen jedoch beobachten, dass es bei vier der neun untersuchten PRGF-Spender zu einer deutlichen Induktion von CD206 in den M1-Makrophagen kam, die allerdings in der Konzentrations- und Zeitkinetik – mit Ausnahme der 72-stündigen Stimulation – keine Signifikanz erreichte. Somit scheint auch der Einfluss von PRGF auf die Expression von CD206 in M1-Makrophagen heterogen und stark vom jeweiligen PRGF-Spender abhängig zu sein.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von FN1 in M1-Makrophagen

Fibronectin 1 erfüllt multiple unterstützende Funktionen im Rahmen der Wundheilung (51)(52)(53)(54). Topisch auf Wunden aufgebracht kann FN1 die Wundheilung positiv beeinflussen (55). Da wir in unseren Versuchen eine signifikante FN1-Geninduktion nach sechs, 24, 48 und 72 Stunden PRGF-Behandlung in M1-Makrophagen fanden, kann davon ausgegangen werden, dass die PRGF-vermittelte FN1-Genexpression in M1-Makrophagen einen weiteren Mechanismus darstellt, der zu den positiven Wundheilungsverläufen unter einer topischen PRGF- oder PRF-Therapie beiträgt. Einschränkend ist jedoch zu betonen, dass sich auch diese Effekte deutlich abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender zeigten.

Der Einfluss von PRGF auf die Genexpression von CCL2 in M1-Makrophagen

Der Chemokinligand-2 (CCL2), auch monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) genannt, ist eines der Schlüsselchemokine, das die Migration von Monozyten und Makrophagen in die Wunde reguliert (56)(57). Wir beobachteten, dass die PRGF-Stimulation von M1-Makrophagen zu einer signifikanten CCL2-Geninduktion führen konnte. Dies zeigte sich bei mindestens fünf der neun untersuchten PRGF-Spender in einer deutlichen CCL2-Geninduktion nach 24-stündiger Stimulationsdauer. Es zeigte sich eine potenziell signifikante, jedoch stark vom jeweiligen Spender abhängige CCL2-Geninduktion in den PRGF-behandelten M1-Makrophagen. Die Ursache für das Ausbleiben signifikanter Ergebnisse in den Versuchen zur Zeitkinetik kann demnach in der stark unterschiedlichen Potenz der unterschiedlichen PRGF-Spender vermutet werden. Aufgrund der oben genannten Funktionen von CCL2 kann ein

weiterer Grund für die positiven klinischen Wundheilungsverläufe unter einer topischen Wundtherapie mit PRGF oder PRF in einer verstärkten CCL2-Expression vermutet werden.

Der Einfluss der PRGF-Spender

In unseren Zellkulturversuchen konnten wir in den Analysen aller untersuchten Gene beobachten, dass das Ausmaß der Geninduktion oder Geninhibition stark vom individuellen PRGF-Spender abhängig war. Unseren Untersuchungen zufolge scheint es bezogen auf die Induktionsfähigkeit potentere und weniger potente PRGF-Spender zu geben. Wobei diese PRGF-Potenz keine konstitutive Eigenschaft der Spender zu sein scheint, sondern sich auch hinsichtlich der untersuchten Gene unterscheidet. So scheinen unterschiedliche Spender die einzelnen Gene unterschiedlich stark induzieren oder inhibieren zu können. In diesen zum Teil nicht unerheblichen Unterschieden in der Potenz der einzelnen PRGF-Spender ist möglicherweise auch die Erklärung zu suchen, warum die in vitro Ergebnisse teilweise trotz gleicher PRGF-Konzentration und Stimulationsdauer stark voneinander abweichen. Diese in vitro-Beobachtung könnte auch erklären, warum im klinischen Alltag viele, aber nicht alle Wundpatienten von einer lokalen Wundtherapie mit PRGF oder PRF in vivo profitieren.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlussfolgert werden, dass die Behandlung der M1-Makrophagen mit PRGF zu einer Aktivierung der proinflammatorischen Funktionen dieses Makrophagensubtyps führt, welcher wesentlich in der frühen Phase der humanen Wundheilung aktiv und für diese von großer Bedeutung ist. Gleichzeitig führt die PRGF-Stimulation von M1-Makrophagen zu einer Induktion von Fibronectin 1 (FN1) und Chemokinligand-2 (CCL2), welche multiple wundheilungsfördernde Eigenschaften aufweisen. Diese Effekte können eine mögliche Ursache dafür sein, warum eine Mehrheit der behandelten Wundpatienten von einer Therapie mit PRGF oder PRF profitiert.

Einschränkend muss gesagt werden, dass sich diese in vitro-Mechanismen und -Effekte in unseren Versuchen stark vom jeweiligen PRGF-Spender abhängig zeigten. Dies könnte unter anderem miterklären, warum in der klinischen Praxis in vivo viele, aber nicht alle Patienten mit chronischen Wunden von einer topischen Therapie mit PRGF oder PRF profitieren.

Zukünftige Forschungsansätze sollten deshalb unter anderem danach streben, vor einer geplanten Therapie mit PRGF oder PRF diejenigen Patienten identifizieren zu können, die von einer solchen Behandlung profitieren können. Hierfür könnten beispielsweise molekularbiologische Techniken verwendet werden. Ebenso würde sich die Identifikation potenter PRGF-Spender vor einer angedachten PRGF-Therapie als äußerst vorteilhaft erweisen, sodass auch dies in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden sollte.

6. Literaturverzeichnis

1. Weibric G, Buch RSR, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 2002 Jun;20(2):93–7.
2. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2004 Jan;91(1):4–15.
3. Ågren MS, Rasmussen K, Pakkenberg B, Jørgensen B. Growth factor and proteinase profile of Vivostat[®] platelet-rich fibrin linked to tissue repair. *Vox Sanguinis*. 2014 Jul;107(1):37–43.
4. Alsousou J, Ali A, Willett K, Harrison P. The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets*. 2013 Jan;24(3):173–82.
5. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2017;23(1):83–99.
6. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2009 Aug;91(8):987–96.
7. Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*. 2018 Aug 18;29(6):556–68.
8. Steenvoorde P, van Doorn LP, Naves C, Oskam J. Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds. *Journal of wound care*. 2008 Feb;17(2):60–3.
9. Bayer A, Höntsch G, Kaschwich M, Dell A, Siggelkow M, Berndt R, et al. Vivostat Platelet-Rich Fibrin[®] for Complicated or Chronic Wounds-A Pilot Study. *Biomedicines*. 2020;8(8).

10. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. Epstein FH, editor. New England Journal of Medicine. 1999 Sep 2;341(10):738–46.
11. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004 Jan 1;9:283–9.
12. Ellis S, Lin EJ, Tartar D. Immunology of Wound Healing. *Current Dermatology Reports*. 2018 Dec 28;7(4):350–8.
13. Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2010 Jul 25;3(7):643–53.
14. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2011 Jul 11;13:e23.
15. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Jul 17;18(7):1545.
16. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science (New York, NY)*. 1988 Aug 5;241(4866):708–12.
17. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*. 2003 Feb;73(2):209–12.
18. Fahey TJ, Sherry B, Tracey KJ, van Deventer S, Jones WG, Minei JP, et al. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine*. 1990 Mar;2(2):92–9.
19. Herwig MC, Holz FG, Loeffler KU. Distribution and presumed proliferation of macrophages in inflammatory diseases of the ocular adnexae. *Current eye research*. 2015 May;40(6):604–10.
20. Padilla S, Sanchez M, Padilla I, Orive G, Anitua E. Healing or Not Healing. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2016 Jan;17(5):419–30.

21. Orcajo B, Muruzabal F, Isasmendi MC, Gutierrez N, Sánchez M, Orive G, et al. The use of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) in the treatment of a severe mal perforant ulcer in the foot of a person with diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2011 Aug;93(2):e65-7.
22. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2008 Feb;84(2):415–21.
23. Bayer A, Lammel J, Tohidnezhad M, Lippross S, Behrendt P, Klüter T, et al. The Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin-3 Is Induced by Platelet-Released Growth Factors in Primary Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017.
24. Bayer A, Lammel J, Rademacher F, Groß J, Siggelkow M, Lippross S, et al. Platelet-released growth factors induce the antimicrobial peptide human beta-defensin-2 in primary keratinocytes. *Experimental dermatology*. 2016 Jun;25(6):460–5.
25. Bayer A, Lammel J, Lippross S, Klüter T, Behrendt P, Tohidnezhad M, et al. Platelet-released growth factors induce psoriasin in keratinocytes: Implications for the cutaneous barrier. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2017 May 24;
26. Bayer A, Wijaya B, Möbus L, Rademacher F, Rodewald M, Tohidnezhad M, et al. Platelet-Released Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin Induce Expression of Factors Involved in Extracellular Matrix Organization in Human Keratinocytes. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12).
27. Haldar M, Murphy KM. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunological Reviews*. 2014 Nov;262(1):25–35.
28. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*. 2018 May 1;9:419.

29. Klar AS, Michalak-Mińska K, Biedermann T, Simmen-Meuli C, Reichmann E, Meuli M. Characterization of M1 and M2 polarization of macrophages in vascularized human dermo-epidermal skin substitutes in vivo. *Pediatric Surgery International*. 2018 Feb 9;34(2):129–35.
30. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RHJ. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011 Jul;216(7):753–62.
31. Novak ML, Koh TJ. Phenotypic Transitions of Macrophages Orchestrate Tissue Repair. *The American Journal of Pathology*. 2013 Nov;183(5):1352–63.
32. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga C, Ross R, Frydas I, et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2020;34(2):327–31.
33. Nasirzade J, Kargarpour Z, Hasannia S, Strauss FJ, Gruber R. Platelet-rich fibrin elicits an anti-inflammatory response in macrophages in vitro. *Journal of Periodontology*. 2020 Feb 14;91(2):244–52.
34. S R-J. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*. 2012;8(9):1237–47.
35. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* . [et al]. 2013 Jul;62(7):641–51.
36. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):6425–40.
37. Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, Vogel I, et al. Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *International Journal of Cancer*. 2014 Aug 15;135(4):843–61.

38. Ashouri F, Beyranvand F, Beigi Boroujeni N, Tavafi M, Sheikhan A, Varzi AM, et al. Macrophage polarization in wound healing: role of aloe vera/chitosan nanohydrogel. *Drug delivery and translational research*. 2019;9(6):1027–42.
39. Tonnesen MG, Feng X, Clark RAF. Angiogenesis in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2000 Dec;5(1):40–6.
40. Kodelja V, Müller C, Tenorio S, Schebesch C, Orfanos CE, Goerdts S. Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. *Immunobiology*. 1997 Nov;197(5):478–93.
41. Zhang F, Wang H, Wang X, Jiang G, Liu H, Zhang G, et al. TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*. 2016 Aug 9;7(32):52294–306.
42. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000 Mar;182(3):311–22.
43. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127(2):175–86.
44. Zhao W, Zhao T, Huang V, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Platelet-derived growth factor involvement in myocardial remodeling following infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011 Nov;51(5):830–8.
45. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants & redox signaling*. 2013 Jun 10;18(17):2352–63.
46. Guo L, Akahori H, Harari E, Smith SL, Polavarapu R, Karmali V, et al. CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128(3):1106–24.
47. Liu J, Chen B, Bao J, Zhang Y, Lei L, Yan F. Macrophage polarization in periodontal ligament stem cells enhanced periodontal regeneration. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):320.

48. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014 Sep;219(9):695–703.
49. Wang J, Xu L, Xiang Z, Ren Y, Zheng X, Zhao Q, et al. Microcystin-LR ameliorates pulmonary fibrosis via modulating CD206+ M2-like macrophage polarization. *Cell death & disease*. 2020;11(2):136.
50. Zhu L, Fu X, Chen X, Han X, Dong P. M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway. *Cell biology international*. 2017 Sep;41(9):960–8.
51. Grinnell F. Fibronectin and wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1984;26(2):107–16.
52. Brotchie H, Wakefield D. FIBRONECTIN: STRUCTURE, FUNCTION AND SIGNIFICANCE IN WOUND HEALING. *Australasian Journal of Dermatology*. 1990 Apr;31(1):47–56.
53. Stoffels JMJ, Zhao C, Baron W. Fibronectin in tissue regeneration: timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013 Nov 12;70(22):4243–53.
54. Wysocki AB. Fibronectin in acute and chronic wounds. *Journal of ET nursing : official publication, International Association for Enterostomal Therapy*. 1992;19(5):166–70.
55. Johnson MB, Pang B, Gardner DJ, Niknam-Benia S, Soundarajan V, Bramos A, et al. Topical Fibronectin Improves Wound Healing of Irradiated Skin. *Scientific Reports*. 2017 Dec 20;7(1):3876.
56. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009 Jun;29(6):313–26.
57. Zigmond RE, Echevarria FD. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Progress in neurobiology*. 2019;173:102–21.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Plattenlayout der 12-well Platte zur Differenzierung der THP-1-Zellen.	7
Abb. 2: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation.	8
Abb. 3: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation mit PRGF zweier unterschiedlicher Spender.	8
Abb. 4: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation mit PRGF unterschiedlicher Konzentrationen.	9
Abb. 5: Plattenlayout der 12-well-Platte zur Stimulation im Sinne der Zeitkinetik.	10
Abb. 6: Konzentrationsabhängige Geninduktion von IL-1 beta in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF.	18
Abb. 7: Zeitabhängige Geninduktion von IL-1 beta in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF.	19
Abb. 8: Die PRGF-vermittelte IL-1 beta-Geninduktion in M1-Makrophagen ist abhängig vom PRGF-Spender.	19
Abb. 9: Konzentrationsabhängige IL-6-Geninduktion in M1-Makrophagen nach PRGF- Stimulation.	20
Abb. 10: Zeitabhängige Geninduktion von IL-6 in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF.	21
Abb. 11: Die PRGF-vermittelte IL-6-Geninduktion in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender.	21
Abb. 12: Die 24-stündige PRGF-Behandlung von M1-Makrophagen führt zu keiner signifikanten Induktion von TNF alpha.	22
Abb. 13: Zeitabhängige Genexpression von TNF alpha in M1-Makrophagen nach Stimulation mit PRGF.	23
Abb. 14: Die PRGF-vermittelte TNF alpha-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender.	23
Abb. 15: Die PRGF-Behandlung von M1-Makrophagen bewirkt eine konzentrationsabhängige Geninduktion von TGF-beta.	24

Abb. 16: Zeitabhängige Geninduktion von TGF-beta in PRGF-stimulierten M1-Makrophagen.	25
Abb. 17: Die PRGF-abhängige TGF-beta-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor.	25
Abb. 18: Konzentrationsabhängige Induktion von TGF-alpha in PRGF-behandelten M1-Makrophagen.	26
Abb. 19: Zeitunabhängiger Einfluss von PRGF auf die TGF-alpha-Genexpression in PRGF-stimulierten M1-Makrophagen.	27
Abb. 20: Die PRGF-vermittelte TGF-alpha-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor.	27
Abb. 21: PRGF führt zu einer Inhibition der KI-67-Genexpression in M1-Makrophagen.	28
Abb. 22: Zeitabhängige, PRGF-vermittelte KI-67-Geninduktion in M1-Makrophagen.	29
Abb. 23: Die PRGF-vermittelte KI-67-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor.	29
Abb. 24: Die Behandlung der M1-Makrophagen mit PRGF führt zu einer Induktion von PDGFA.	30
Abb. 25: Zeitabhängige Induktion von PDGFA in PRGF-behandelten M1 Makrophagen.	31
Abb. 26: Die PRGF-vermittelte PDGFA-Geninduktion in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor.	31
Abb. 27: Die Behandlung von M1-Makrophagen mit PRGF führt zu einer signifikanten Geninduktion von CD163.	32
Abb. 28: Zeitabhängige, PRGF-vermittelte Geninduktion von CD163 in M1-Makrophagen.	32
Abb. 29: Die PRGF-vermittelte CD163-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor.	33
Abb. 30: Die Genexpression von CD206 wird in M1 Makrophagen durch eine 24-stündige PRGF-Stimulation nicht signifikant beeinflusst.	34
Abb. 31: Zeitabhängige, PRGF-vermittelte Geninduktion von CD206 in M1-Makrophagen.	34
Abb. 32: Die PRGF-abhängige CD206-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Donor.....	35

Abb. 33: Konzentrationsabhängige Geninduktion von FN1 in M1-Makrophagen nach PRGF-Stimulation.	36
Abb. 34: Zeitabhängige Geninduktion von FN1 in M1-Makrophagen nach PRGF-Behandlung.	37
Abb. 35: Die PRGF-induzierte FN1-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender.	37
Abb. 36: Die PRGF-Therapie führt konzentrationsabhängig zu einer signifikanten CCL2-Geninduktion in M1-Makrophagen.	38
Abb. 37: Die Genexpression von CCL2 in M1-Makrophagen ist zeit- und PRGF-unabhängig.	39
Abb. 38: Die PRGF-vermittelte CCL2-Genexpression in M1-Makrophagen ist abhängig vom jeweiligen PRGF-Spender.	39

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Andreas Bayer, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die exzellente Betreuung sowie die freundliche Hilfe und Unterstützung, die er mir während der gesamten Entstehung dieser Arbeit hat zuteilwerden lassen. Insbesondere die konstruktive Rücksprache und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe für mich.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius und Herrn Prof. Dr. Thilo Wedel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Förderung dieses Projektes danken.

Mein Dank gilt außerdem Anne-Rose Nissen, Gabi Steinkamp und Frank Lichte für die stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der experimentellen Arbeit im Labor sowie Leonhard Buck, meinem Laborpartner.

Euch allen danke ich für die nette und humorvolle Art, die diese Arbeit auch zu einer persönlich angenehmen Erfahrung für mich gemacht hat.

Auch danke ich Herrn Prof. Jürgen Harder und Cornelia Wilgus für die wissenschaftliche Zusammenarbeit dieses Projektes.

Mein ewiger Dank gilt an dieser Stelle auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit und während des gesamten Studiums stets liebevoll und aufmerksam unterstützt, ermutigt und bestärkt hat.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Sophie-Charlotte Müller

geboren am 05.08.1995 in Kandel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/2002 - 07/2006 Grundschule Tullaschule, Maximiliansau

09/2006 - 06/2014 Bismarck-Gymnasium, Karlsruhe
Abschluss: Abitur 06/2014

Ausbildung

11/2014 - 05/2015 Bildungszentrum ProMedic Rettungsdienst
Ausbildung zur Rettungssanitäterin

09/2015 - 08/2017 Semmelweis Universität Budapest, Ungarn
vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums
Abschluss: Physikum 08/2017

Seit 04/2018 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
klinischer Abschnitt des Medizinstudiums
Abschluss: Staatsexamen (voraussichtlich 05/2022)

Seit 07/2020 Promotion am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel

Veröffentlichungen

S. Müller, J. Harder, R. Gläser, T. Wedel, R. Lucius, A. Bayer (2021): Platelet-Released Growth Factors aktiviert M1-Makrophagen in der frühen Phase der Wundheilung. Poster auf der 35. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Dermatochirurgie in Hamburg, 03.-05.09.2021.