



**HEINRICH HEINE**  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

***In vitro* Untersuchung der biologischen Effekte  
von Kieselgel-Wundauflagen auf relevante  
physiologische Parameter der Wundheilung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Vera Grotheer**  
aus Neuss

Düsseldorf, Februar 2012

aus dem Institut für Unfall- und Handchirurgie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Christoph Suschek  
Korreferent: Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung:

Ich habe keine besondere Begabung,  
sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.

*Albert Einstein*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>12</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>15</b>
1.1. Die Biologie der kutanen Wundheilung.....	15
1.2. Die Bedeutung von NF- $\kappa$ B als Mediator in Entzündungsprozessen.....	19
1.3. Die Bedeutung der Angiogenese für die Wundheilung.....	21
1.4. Hypertrophe Narben und Keloide als Ausdruck einer gestörten Narbenbildung.....	23
1.5. Die Kieselgel-Wundaufgabe als neue Strategie der Wundbehandlung.....	24
1.6. Ziele der Arbeit.....	28
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1. Material.....	29
2.1.1. Laborgeräte .....	29
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.3. Chemikalien und Zellkulturlösungen .....	30
2.1.4. Kommerzielle Testsysteme (Kits) .....	31
2.1.5. Puffer und Lösungen .....	31
2.1.6. Nährmedien .....	32
2.1.7. Biologisches Material.....	33
2.1.8. Zytokine .....	33
2.1.9. Zytostatika .....	33
2.1.10. Oligonukleotide .....	33
2.1.11. Antikörper.....	34
2.1.12. Software und Server.....	35
2.2. Methoden.....	36
2.2.1. Isolation von Endothelzellen aus Nabelschnurblut.....	36
2.2.2. Aufbereitung der Vollhaut für die Isolation von Fibroblasten und Keratinozyten.....	36
2.2.3. Isolation von Keratinozyten aus der Vollhaut .....	37
2.2.4. Isolation von Fibroblasten aus der Vollhaut .....	37
2.2.5. Isolation von Keratinozyten aus der Spalthaut .....	38
2.2.6. Herstellung von konditioniertem Medium für die Keratinozyten.....	38
2.2.7. Erstellen von Wachstumskinetiken für die Zellkulturen.....	38
2.2.8. Viabilitätstest mit dem Neutralrot-Assay.....	40
2.2.9. Viabilitätsassay mit dem AlamarBlue-Assay.....	40
2.2.10. Fixierung von Zellen.....	41
2.2.11. Propidiumiodid-Färbung.....	41
2.2.12. Bisbenzimid-Färbung.....	41
2.2.13. Die Involucrin-Färbung.....	41
2.2.14. Ki-67-Färbung ( $\alpha$ SMA, vWF, CD31).....	42
2.2.16. Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	43

2.2.17. Herstellung von Proteinlysaten aus nukleären und zytoplasmatischen Zellfraktionen .....	44
2.2.18. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) .....	45
2.2.19. Erstellen einer Standardkurve.....	45
2.2.20. Die Diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970).....	46
2.2.21. Western Blot.....	47
2.2.22. Strippen einer Membran.....	49
2.2.23. Nachweis und Quantifizierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B.....	49
2.2.24. Reportergen-Assay zum Nachweis der Aktivierung von NF- $\kappa$ B .....	50
2.2.25. SEAP-Assay mit chemilumineszентem Substrat (CSPD®) .....	52
2.2.26. Bestimmung der Zellvitalität mit Resazurin (Zytotoxizitätstest).....	52
2.2.27. Relative Quantifizierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B.....	52
2.2.28. Transkriptionsfaktorassay .....	53
2.2.29. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	54
2.2.30. Herstellung der Kieselgel-Wundaufgabe .....	56
2.2.31. Densitometrische Analyse mit <i>ImageJ</i> .....	58
2.2.32. Statistische Auswertung.....	58
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
3.1. <i>Analyse der Kieselgel-Wundaufgaben auf ihre Zytotoxizität</i> .....	59
3.1.1. Der Einfluss der <i>Cell Culture Inserts</i> auf die Zytotoxizität der Kieselgel-Wundaufgaben .....	59
3.1.2. Vergleich verschiedener Zytotoxizitätstests und die Relevanz von <i>Cell Culture Inserts</i> .....	61
3.1.3. Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der Kieselgel-Wundaufgaben über eine Zeitspanne von 96 h.....	62
3.1.4. Untersuchung des Einflusses der Kieselgel-Wundaufgaben auf die Morphologie von Makrophagen .....	64
3.1.5. Untersuchung von möglichen apoptotischen Ereignissen als Ursache für die Zellzahlabnahme der RAW-Zellen.....	66
3.1.6. Untersuchung von möglichen nekrotischen Ereignissen als Ursache für die Zellzahlabnahme der RAW-Zellen.....	66
3.1.7. Visuelle Untersuchung der in Makrophagen enthaltenen Phagosomen .....	67
3.1.8. Untersuchung der Inkorporation von Silizium durch Makrophagen mit Hilfe der <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (ICP-MS).....	68
3.2. <i>Analyse der Kieselgel-Wundaufgaben auf die Proliferation von Zellen</i> .....	70
3.2.1. Der Einfluss der Silika-Vliese auf die Proliferation von Fibroblasten .....	70
3.2.2. Untersuchung der Proliferation von Fibroblasten über einen Zeitraum von 16 Tagen.	71
3.2.3. Der Einfluss der Silika-Vliese auf Endothelzellen.....	71
3.2.4. Untersuchung der Proliferation von Endothelzellen über einen Zeitraum von 18 Tagen .....	72
3.2.5. Untersuchung der Proliferation von Makrophagen über einen Zeitraum von 18 Tagen .....	73
3.2.6. Untersuchung der Proliferation von Keratinozyten über einen Zeitraum von 16 Tagen .....	74
3.2.7. Untersuchung der Effekte der Kieselgel-Wundaufgaben auf die Differenzierung humaner Keratinozyten.....	74

3.3. Effekte der Kieselgel-Wundauflagen auf inflammatorische Parameter .....	76
3.3.1. Konstitutive Expression von Il-1 $\beta$ in Keratinozyten.....	77
3.3.2. Konstitutive Expression von Il-6 in Keratinozyten .....	78
3.3.3. Konstitutive Expression von Il-6 in Endothelzellen .....	78
3.3.4. Konstitutive Expression von Il-6 in Fibroblasten .....	79
3.3.5. Konstitutive Expression von Il-8 in Keratinozyten .....	80
3.3.6. Konstitutive Expression von Il-8 in Endothelzellen .....	81
3.3.7. Konstitutive Expression von Il-8 in Fibroblasten .....	82
3.3.8. Konstitutive Expression von TNF- $\alpha$ in Keratinozyten.....	82
3.3.9. Konstitutive Expression von TNF- $\alpha$ in Endothelzellen.....	83
3.3.10. Der Einfluss der Silika-Vliese auf NF- $\kappa$ B.....	83
3.3.11. Visualisierung des Effektes der Silika-Präparate auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$ .....	84
3.3.12. Western Blot Analyse der Translokation von p50 in den Nukleus.....	85
3.3.13. Western Blot Analyse der Expression von p50 im Zytoplasma.....	87
3.3.14. Western Blot Analyse der Expression von p65 im Nukleus .....	87
3.3.15. Western Blot Analyse der Expression von p65 im Zytoplasma.....	88
3.3.16. Western Blot Analyse der Expression von I $\kappa$ B im Zytoplasma .....	89
3.3.17. Die Expression von NF- $\kappa$ B in Zellen mit einem SEAP-Reportergenkonstrukt .....	89
3.3.18. Transkriptionsfaktor Assay zur Überprüfung der Aktivität von p65 im Kern .....	91
3.4. Die physiologische Bedeutung der Kieselgel-Wundauflagen auf die Neo-Angiogenese .....	91
3.4.1. Immunhistochemische Untersuchung der Neo-Angiogenese mit CD31 .....	92
3.4.2. Immunhistochemische Untersuchung der Neo-Angiogenese mit vWF (van Willebrand Faktor).....	93
3.4.3. Vergleich der immunhistochemischen Untersuchungen .....	94
3.4.4. Vergleichende Quantifizierung der relativen Gefäßdichte .....	95
3.4.5. Quantifizierung der Neo-Angiogenese mit CD31 .....	95
3.4.6. Quantifizierung der Neo-Angiogenese mit vWF-Antikörper .....	98
3.4.7. Untersuchung der durch die Kieselgel-Wundauflagen induzierten VEGF-Synthese ....	99
3.4.8. Effekt der Kieselgel-Wundauflagen auf die VEGF-Synthese.....	100
3.4.10. Quantitative Evaluierung des Effektes von Suramin auf die Angiogenese .....	103
3.4.11. Untersuchung des Effektes der Silika-Vliese auf die Synthese von Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) .....	103
3.5. Kollagensynthese .....	104
3.5.1. Kollagensynthese in Fibroblasten.....	105
3.5.2. Untersuchung von $\alpha$ SMA als Indikator für Myofibroblasten als ein narbenbildender Parameter im Wundheilungsprozess.....	106
3.5.3. Relative Quantifizierung der $\alpha$ SMA Synthese in Fibroblasten .....	107
3.5.3. Untersuchung von TGF- $\beta$ in Fibroblasten als ein narbenbildender Parameter im Wundheilungsprozess .....	108
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>110</b>
4.1. Der Einfluss der Silika-Vliese auf die Toxizität.....	110
4.2. Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Proliferation.....	112
4.3. Der Einfluss der Silika-Vliese auf verschiedene Entzündungsparameter .....	114
4.4. Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Neo-Angiogenese.....	123

<i>4.5. Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflage auf die TGF-<math>\beta</math> -induzierte Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten.....</i>	<i>127</i>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>Summary .....</b>	<b>130</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über frühe Phase im Wundheilungsprozess	26
Abbildung 2: Schematische Übersicht über späte Phase im Wundheilungsprozess	19
Abbildung 3: Die bioresorbierbare Kieselgel-Wundauflage	26
Abbildung 4: Bisbenzimid-Färbung, PI-Färbung nekrotischer Zellen	59
Abbildung 5: Bisbenzimid-Färbung, PI-Färbung	60
Abbildung 6: Bisbenzimid-Färbung, PI-Färbung	60
Abbildung 7: Bisbenzimid-Färbung, PI-Färbung	60
Abbildung 8: Neutralrot-Assay mit Fibroblasten nach 24 h Inkubation	61
Abbildung 9: AlamarBlue-Assay mit Fibroblasten nach 24 h Inkubation	61
Abbildung 10: Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Fibroblasten	62
Abbildung 11: Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Keratinozyten	63
Abbildung 12: Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Endothelzellen	63
Abbildung 13: Zeigt den Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Makrophagen	64
Abbildung 14: 24 h Inkubation der RAW-Zellen mit Silika-Vliesen	65
Abbildung 15: 48h Inkubation der RAW-Zellen mit Silika-Vliesen	65
Abbildung 16: 72 h Inkubation der RAW-Zellen mit Silika-Vliesen	65
Abbildung 17: 48 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender Bisbenzimid-Färbung	66
Abbildung 18: 48 h Inkubation mit den Silika-Vliesen mit anschließender Propidiumiodid-Färbung	66
Abbildung 19: 24 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle	67
Abbildung 20: 24 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle	67
Abbildung 21: 48 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle	68
Abbildung 22: 72 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle	68

Abbildung 23: Untersuchung des Siliziumgehaltes in Makrophagen nach 24 h .....	69
Abbildung 24: Untersuchung des Siliziumgehaltes in humanen THP-1-Zellen.....	69
Abbildung 25: Beobachtung der Proliferation über eine Zeitspanne von 10d.....	70
Abbildung 26: Beobachtung der Langzeitproliferation der Fibroblasten .....	71
Abbildung 27: Beobachtung der Proliferation über eine Zeitspanne von 10 d.....	71
Abbildung 28: Beobachtung der Langzeitproliferation der Endothelzellen .....	72
Abbildung 29: Beobachtung der Langzeitproliferation von Makrophagen .....	73
Abbildung 30: Beobachtung der Langzeitproliferation von Keratinozyten .....	74
Abbildung 31: Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67, Braunfärbung zeigt Proliferation an .....	75
Abbildung 32: Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67, Braunfärbung zeigt Proliferation an .....	75
Abbildung 33: Färbung mit dem Differenzierungsmarker Involucrin, Braunfärbung zeigt Differenzierung an .....	76
Abbildung 34: Färbung mit dem Differenzierungsmarker Involucrin, Braunfärbung zeigt Differenzierung an .....	76
Abbildung 35: Relative Konzentration von Il-1 $\beta$ im Zelllysate von Keratinozyten .....	77
Abbildung 36: Relative Konzentration von Il-6 im Zelllysate von Keratinozyten .....	78
Abbildung 37: Relative Konzentration von Il-6 im Zelllysate von Endothelzellen.....	78
Abbildung 38: Relative Konzentration von Il-6 im Zelllysate von Fibroblasten .....	79
Abbildung 39: Relative Konzentration von Il-8 im Zelllysate von Keratinozyten .....	80
Abbildung 40: Relative Konzentration von Il-8 im Zelllysate von Endothelzellen.....	81
Abbildung 41: Relative Konzentration von Il-8 im Zelllysate von Fibroblasten .....	82
Abbildung 42: Relative Konzentration von TNF- $\alpha$ im Zelllysate von Keratinozyten (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12): signifikante Werte; Kontrolle (blau), Keratinozyten zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot) .....	82
Abbildung 43: Relative Konzentration von TNF- $\alpha$ im Zelllysate von Endothelzellen ..	83
Abbildung 44: Visualisierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Translokation in den Kern.....	84
Abbildung 45: Western Blot Analyse vom nukleären p50 .....	86

Abbildung 46: Western Blot Analyse vom zytoplasmatischen p50 .....	87
Abbildung 47: Western Blot Analyse vom nukleären p65 .....	87
Abbildung 48: Western Blot Analyse vom zytoplasmatischen p65 .....	88
Abbildung 49: Western Blot Analyse vom zytoplasmatischen I $\kappa$ B .....	89
Abbildung 50: Effekt der Kieselgel-Wundauflagen auf die Expression von NF- $\kappa$ B mit einem SEAP-Reportergenkonstrukt analysiert .....	90
Abbildung 51: Nachweis des Transkriptionsfaktors p65 im Kern .....	91
Abbildung 52: Färbung der Endothelzellen mit CD31 .....	92
Abbildung 53: Färbung der Endothelzellen mit vWF .....	93
Abbildung 54: Gegenüberstellung der verschiedenen Antikörper .....	94
Abbildung 55: Gegenübergestellt werden mit unterschiedlichen Antikörpern markierte Endothelzellen .....	95
Abbildung 56: Mikroskopische Aufnahmen von den Endothelzellen und vergleichend die daraus erstellten Schwarz-Weiß-Bilder für die densitometrische Analyse ....	96
Abbildung 57: Quantifizierung der relativen Gefäßdichte mit dem CD31-Antikörper.	97
Abbildung 58: Mikroskopische Aufnahmen von den Endothelzellen und vergleichend die daraus erstellten Schwarz-Weiß-Bilder für die densitometrische Analyse ....	98
Abbildung 59: Auswertung der densitometrische Analyse der Neo-Angiogenese, : die Werte sind im Vergleich mit der Kontrolle signifikant .....	99
Abbildung 60: VEGF-Gehalt in mit Silika-Vliesen inkubierten Endothelzellen .....	100
Abbildung 61: VEGF-Gehalt in mit verschiedenen Silika-Vliesen inkubierten Endothelzellen .....	101
Abbildung 62: Mikroskopische Aufnahmen von den Endothelzellen .....	102
Abbildung 63: Densitometrische Analyse der Gefäßdichte .....	103
Abbildung 64: TGF- $\beta$ Gehalt in Endothelzellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten .....	104
Abbildung 65: Kollagensynthese in Fibroblasten, n=6 (aus jeweils 10 Patienten werden Fibroblasten isoliert und in 3 Zellpools zusammengeführt) .....	105
Abbildung 66: Kollagensynthese in Fibroblasten, n=6 (aus jeweils 10 Patienten werden Fibroblasten isoliert und in je 4 Zellpools zusammengeführt) .....	106
Abbildung 67: Fibroblasten als Kontrolle, Fibroblasten mit Silika-Vliesen .....	106

Abbildung 68: Fibroblasten mit TGF- $\beta$ , Fibroblasten mit TGF- $\beta$  und Silika-Vliesen 107

Abbildung 69: Densitometrische Auswertung der  $\alpha$ SMA Synthese in Fibroblasten 108

Abbildung 70: Relative Konzentration von TGF- $\beta$  in mit Interleukin-1 $\beta$  aktivierten  
Fibroblasten..... 109

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die benutzten Zelllinien und Zellkulturmedien.....	32
Tabelle 2: Übersicht über die benutzten Primärzellen und Zellkulturmedien.....	32
Tabelle 3: Übersicht über die Zellkulturlinien und ihre Herkunft .....	33
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide .....	33
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper .....	34
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper.....	34
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Proteingele .....	47
Tabelle 8: Trennbereiche von SDS-Gelen .....	47
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und die entsprechenden Blocking-Reagenzien .....	48
Tabelle 10: PCR-Pipettierschema.....	56
Tabelle 11: PCR-Programm.....	56
Tabelle 12: Unterschiedliche Lagerzeiten der Silika-Vliese .....	57
Tabelle 13: Die verschiedenen Typen der Silika-Vliese.....	57

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	ml/l
% (w/ml)	g/ml
A	Ampere
A	Adenosin
AK	Antikörper
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
$\alpha$ SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
BLAST	Basic Alignment Search Tool; Programm für den Vergleich einer Ausgangssequenz gegen Sequenzdatenbanken
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BFGF	Basic-Fibroblast-Growth-Factor
C	Cytosin
CaCl	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl) phenyl phosphate Chemilumineszenzsubstrat
dest.	destilliert
d	Tag
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECGM	Endothelial Cell Growth <i>Medium</i>
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assays
FA	Formid
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Kälberserum)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GIF	<i>Graphics Interchange Format</i>
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HeLa	Henrietta Lacks Zelllinie aus einem Zervixkarzinom
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonat
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen
i. a.	im Allgemeinen
IgG	Immunglobulin G
I $\kappa$ B	Inhibitor $\kappa$
Il-1	Interleukin-1
Il-6	Interleukin-6
Il-8	Interleukin-8
l	Liter
IR	Infrarot

JM	Jurkat (Zelllinie)
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
KCl	Kaliumchlorid
m	Milli-
M	Molar
μ	Mikro-
min	Minute
min.	mindestens
mRNA	messenger RNA
n-	nano-
n=	Anzahl der Versuchsdurchführungen
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NIH	National Institute of Health
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly [ADP-ribose] polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure
Rel B	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	Sekretierte Embryonale Alkalische Phosphatase
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (DNA-Polymerase)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween
TBE	Tris-Borat-EDTA
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
T <sub>M</sub>	DNA-Schmelztemperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	humaner Tumornekrosfaktor-α
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T	Tyrosin
U	Unit
üN	über Nacht
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Biologie der kutanen Wundheilung

Die Funktionen der Haut sind äußerst vielfältig. Neben ihrer Aufgabe als Sinnesorgan schirmt sie unseren Körper gegen schädliche Einflüsse von außen ab und dient uns als Barriere gegen UV-Strahlen, Eindringen von Wasser, Mikroben und Schmutz. Außerdem reguliert sie unseren Wärmehaushalt, schützt uns vor Feuchtigkeitsverlust und bietet mechanischen Schutz vor Druck und Stößen. Kommt es zu einer Verletzung dieses Organs, gilt es dessen Integration schnellstmöglich wieder herzustellen. Möglich ist eine vollständige Regeneration oder eine Reparatur des betroffenen Gewebes. Eine Regeneration ist dann möglich, wenn nur die Epidermis (obere Hautschichten) betroffen ist. Werden dagegen die darunter liegenden Hautschichten verletzt spricht man von einer Reparatur, da das zerstörte Gewebe nicht ausnahmslos ersetzt werden kann, sondern mit unspezifischem Gewebe substituiert wird. Als Folge entsteht Narbengewebe, das sich wesentlich von der vorherigen gesunden Gewebestruktur unterscheidet (Martin, 1997).

Der kutane Wundheilungsprozess ist ein komplexer Regenerations- bzw. Reparaturmechanismus, bei dem eine Vielzahl von Zelltypen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Komponenten der extrazellulären Matrix zusammenwirken (Martin, 1997; Singer 1999). Die Wundheilung lässt sich in drei dynamische Phasen, die sich zeitlich überlappen können, unterteilen. Aufgrund der morphologischen und im Lichtmikroskop sichtbaren Veränderungen kann man Entzündungs-, Granulations- und Regenerationsphase unterscheiden.

Unmittelbar nach dem Trauma beginnt die Entzündungsphase, in deren Folge es zu einer Blutung und zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt. Ziel der Hämostase ist es, ausreichend Fibrin für die Ausbildung eines Koagulums (Blutgerinnsels) zu erzeugen, um weitere Blutverluste zu verhindern und die offene Wunde vor Verunreinigungen aus der Umwelt zu schützen. Hinzu kommt, dass das Koagulum den einwandernden Zellen als provisorische Matrix dient (Clark, 1993). Durch die Verletzung kommt es zum Kontakt der im Blut befindlichen Thrombozyten mit geschädigten Endothelzellen bzw. geschädigtem Kollagen. Dadurch werden die Thrombozyten aktiviert und adhärieren an dem Gefäßwanddefekt. Sie setzen in Gra-

nula gespeicherte Substanzen frei und bilden ein Thrombozytenaggregat (Abb. 1) (Böcker et al, 2001).

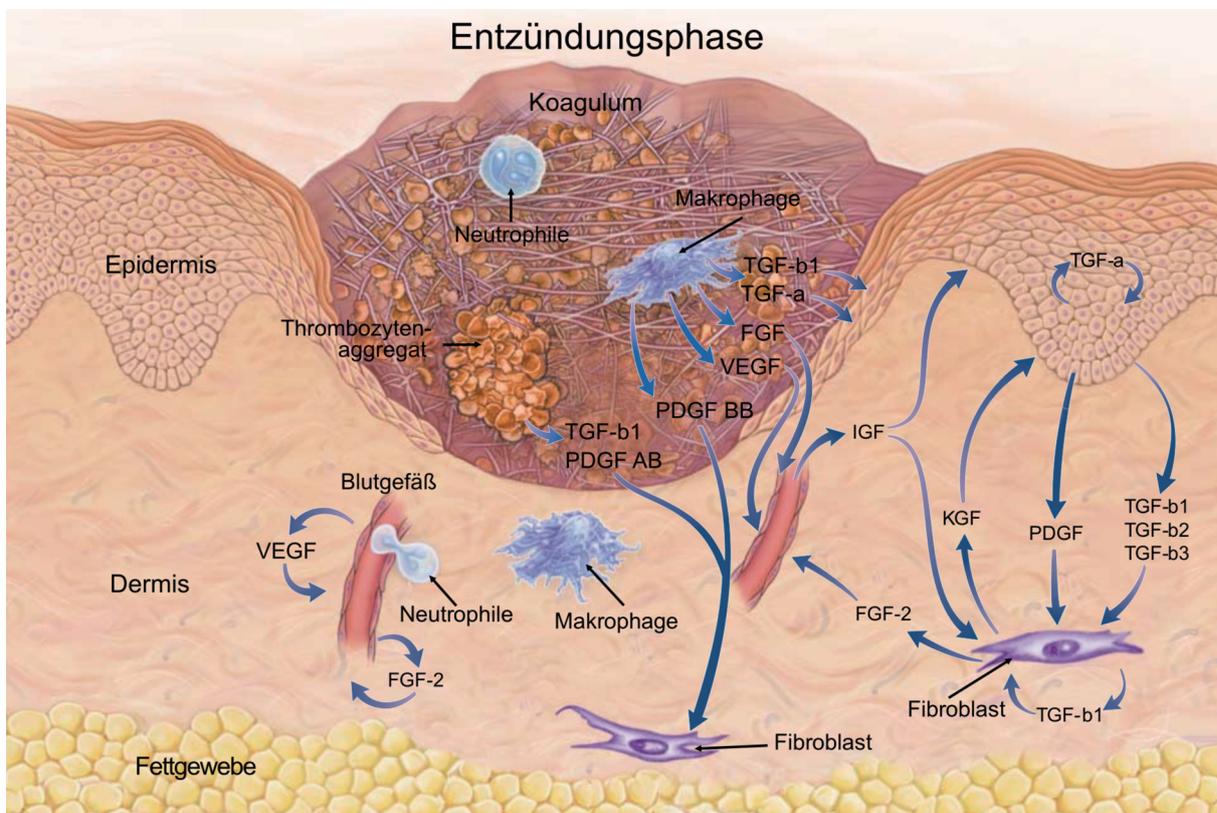


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die frühe Phase im Wundheilungsprozess mit involvierten Entzündungsmediatoren und Zelltypen (modifiziert nach Singer et al. (1999))

Die aktivierten Thrombozyten setzen Thrombin frei, welches lösliches Fibrinogen proteolytisch in Fibrin spaltet. Es bilden sich vernetzte Fibrinfasern aus, in die hauptsächlich die Thrombozyten zusammen mit Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin eingebettet sind. Thrombin induziert zusätzlich die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IFN-}\beta$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF-}\alpha$  aus peripheren Monozyten, die wahrscheinlich zur Differenzierung von Monozyten in Makrophagen benötigt werden. Außerdem stimuliert Thrombin die Freisetzung von  $\text{IL-6}$  und  $\text{IL-8}$  aus Endothelzellen. Durch Degranulation der aktivierten Thrombozyten kommt es zu einer Ausschüttung von *Transforming Growth Factors* ( $\text{TGF-}\beta$ ) und *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF). Diese Zytokine und Wachstumsfaktoren führen neben den Proteolyseprodukten des Fibrins und anderer Matrixkomponenten zu einer chemotaktischen Invasion von Neutrophilen und Monozyten in das Wundgewebe (Clark et al. 1996).

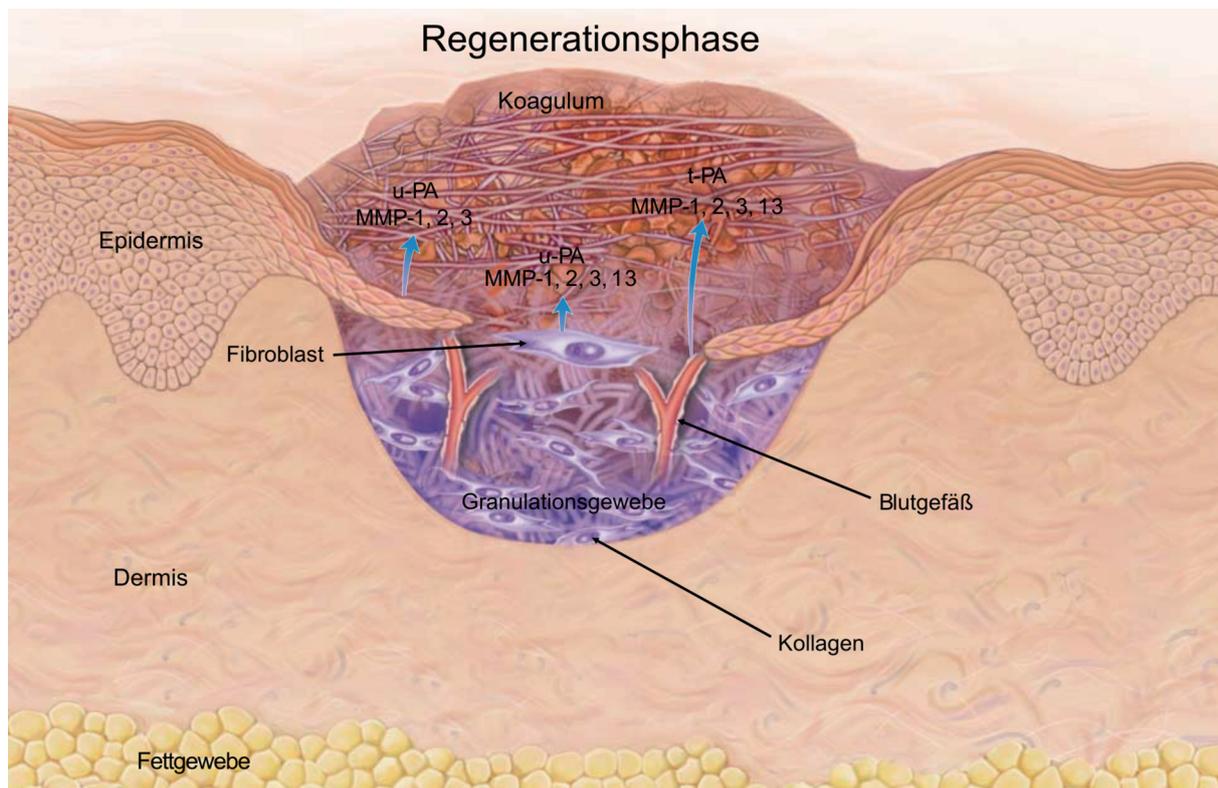
Die infiltrierenden Neutrophilen reinigen das Wundmilieu und werden mit dem Wundschorf oder durch Makrophagen entfernt. Zusätzlich aktivieren sie lokale Fibroblasten und Keratinozyten (Hübner et al., 1996). Die aus Monozyten differenzierten Makrophagen sezernieren wiederum Wachstumsfaktoren wie *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und TGF- $\beta$  und initiieren den Aufbau des Granulationsgewebes (Engelhardt et al., 1998).

In der Granulationsphase bildet sich eine provisorische Fibrinmatrix aus. Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten benutzen diese Matrix, um von den Wundrändern aus in das Wundareal einzuwandern (Hunt et al., 1980). Die Makrophagen stellen die Wachstumsfaktoren für die Neo-Angiogenese und insbesondere PDGF und TGF- $\beta$  für die Stimulierung der Fibroblasten zur Verfügung. Die Fibroblasten wandern in die provisorische Matrix ein, proliferieren und differenzieren zu Myofibroblasten (Tomasek et al., 2002; Hinz 2007).

Zusätzlich supprimieren die Makrophagen die Immunantwort, bauen nekrotische Zellen ab und sind für die Remodellierung und Reparatur des Gewebes zuständig. TGF- $\beta$  vermittelt eine Reihe von Aspekten der Wundheilung wie z.B. die Entzündungsreaktion, Kontraktion der Wunde, Chemotaxis, Angiogenese und den Umbau der extrazellulären Matrix (ECM). Außerdem können PDGF und TGF- $\beta$  die Transition von mesenchymalen Zellen zu Myofibroblasten induzieren (Kalluri und Neilson, 2003, Werner und Grose, 2003). Zusätzlich stimulieren die Wachstumsfaktoren die Fibro- und Myofibroblasten zur Synthese von Kollagen und anderen Komponenten der ECM, um die Einwanderung der Zellen möglich zu machen. Charakteristisch für die Myofibroblasten ist die Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). Darüber hinaus sind Myofibroblasten an der Kontraktion der Wunde beteiligt (Martinez-Ferrer et al. 2010).

Die emigrierten Endothelzellen bilden die Kapillargefäße aus, um das Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. In dieser Phase synthetisieren die eingewanderten Fibroblasten die extrazelluläre Matrix, die zunehmend durch eine kollagenreiche Matrix ersetzt wird. Das fibrinreiche Koagulum wird zu einem kollagenreichen Gewebe transformiert. Diese Transformation erfordert ein ausbalanciertes System zwischen Degradation und Produktion der extrazellulären Matrix. Um die Wunde wieder mit einer neuen Epidermis zu bedecken, migrieren Keratinozyten vom Wundrand zu dessen Zentrum bis sie in Kontakt mit den Keratinozyten treten, die von der gegenüberliegenden Seite einwandern. In diesem Reepithelialisierungspro-

zess ist TGF- $\beta$  eines der wichtigsten Signalmoleküle und maßgeblich verantwortlich für die Wanderung der Epithelzellen (O'Kane und Ferguson 1997). Der Prozess der Epithelialisierung wird durch Kontraktion des darunter liegenden Gewebes unterstützt. Diese Kontraktion wird durch die Myofibroblasten vermittelt, die durch TGF- $\beta$  und PDGF aktiviert werden (Frank et al., 1995). Sobald die Wundoberfläche von einem Monolayer von Keratinozyten bedeckt ist, wird eine neue stratifizierte Epidermis, mit darunter liegender Basallamina, ausgehend von den Wundrändern gebildet. In der Regenerationsphase ist die Barrierefunktion der Haut wiederhergestellt. Diese Phase kann Wochen oder Monate andauern. Diese Phase ist durch Abnahme der Proteinsynthese, Zellproliferation und einer Remodellierung des Kollagens in größere und organisiertere Fibrillen gekennzeichnet (Abb. 2).



**Abbildung 2: Schematische Übersicht über die späte Phase im Wundheilungsprozess mit involvierten Entzündungsmediatoren und Zelltypen (modifiziert nach Singer et al. (1999))**

Der Nährstoffverbrauch im Gewebe nimmt ab und dementsprechend kommt es zu einer Reduktion der kürzlich gebildeten Kapillargefäße. Die Zahl der Endothelzellen, Myofibroblasten und Makrophagen verringert sich durch Apoptose oder die Zellen verlassen das Wundmilieu (Gurtner et al., 2008). Das Granulationsgewebe wird zu

Narbgewebe umstrukturiert, indem die Kollagenfasern des Typs III durch Kollagenfasern des Typs I substituiert werden. Die Kollagenfibrillen des Typs I werden vernetzt und sind zugfester. Für diese Rearrangierung ist ein kontinuierlicher Abbau und eine Neusynthese von Kollagen vonnöten und wird hauptsächlich durch zwei Proteinfamilien gewährleistet. Die Degradation des Kollagens wird durch proteolytische Enzyme, den sogenannten Matrix Metalloproteasen (MMPs) kontrolliert. Die MMPs werden von Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten hauptsächlich aber von Makrophagen sezerniert (Mignatti et al., 1996, Delavary et al., 2011) und befinden sich mit ihren Gegenspielern, den Inhibitoren der MMPs (TIMPs) in einem distinkten Verhältnis.

## 1.2. Die Bedeutung von NF- $\kappa$ B als Mediator in Entzündungsprozessen

Eine effektive aber streng regulierte Immunantwort ist für die Bekämpfung mikrobieller Pathogene, darauf folgender Infektionen und für die Entfernung von zerstörten und nekrotischen Zellen nach einem Gewebstrauma essentiell. Sind die Entzündungsprozesse gestört, wie z.B. bei chronischen Erkrankungen, wird das Gewebe durch toxische Faktoren (z.B. proteolytische Enzyme), die durch Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen synthetisiert werden, zerstört. Deswegen ist eine distinkte Regulation der Expression inflammatorischer Gene, wie die von Zytokinen, Chemokinen, Zelladhäsionsmolekülen und proteolytischer Enzyme für die Induktion und den Verlauf einer kontrollierten Entzündung unerlässlich.

Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor und kardinaler Regulator inflammatorischer Gene. Er ist in zahlreiche Regulationsmechanismen involviert, wie z.B. Apoptose, Stressantworten, Entzündungsprozesse, angeborene und adaptierte Immunantworten. NF- $\kappa$ B kann die Expression von Genen aktivieren und inhibieren und kommt in fast allen Zelltypen und Geweben vor. In Wundheilungsprozessen müssen die vielfältigen pro-inflammatorischen Funktionen von NF- $\kappa$ B streng reguliert werden, um eine unverhältnismäßige Zerstörung des Gewebes und Remodellierung durch aktivierte inflammatorische Zellen und solche, die im Wundheilungsprozess eine Rolle spielen, zu verhindern. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bindet an spezifische DNA-Sequenzen (Promotoren und Enhancer), die als  $\kappa$ B-Elemente beschrieben werden (D'Aquisto et al., 2002). In Säugetierzellen gibt es

fünf Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie: Rel A (p65), Rel B, cRel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1) und p52/p100 (NF- $\kappa$ B2), diese Untereinheiten bilden als Homo- bzw. Heterodimer NF- $\kappa$ B. Häufig bestehen die Dimere aus p50 und p65. Differierende Dimerkombinationen agieren als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren. Homodimere wie p50-p50, denen die Transaktivierungsdomäne fehlt, funktionieren als Repressoren und reprimieren die Expression von Targets von NF- $\kappa$ B wie z.B. TNF- $\alpha$  (Kastenbauer und Ziegler-Heitbrock, 1999). Alle Familienmitglieder enthalten an ihrem N-Terminus eine *Rel-Homology-domain* (RHD), die die DNA-Bindung und die Dimerisation vermittelt. Diese Domäne besteht aus fast 300 Aminosäuren (Perkins, 2007). Die Rel-Proteine besitzen an ihrem C-Terminus eine Transkriptions-Aktivierungs-Domäne. In einer unstimulierten Zelle befindet sich NF- $\kappa$ B als inaktive Form im Zytoplasma. Dort ist es an ein Protein namens I $\kappa$ B (Inhibitor of NF- $\kappa$ B) gebunden. Dieses Protein maskiert die *Nuclear Location Sequence* (NLS) von NF- $\kappa$ B. Zahlreiche Stimuli sind in der Lage NF- $\kappa$ B zu aktivieren, z.B. Zytokine wie TNF- $\alpha$ .

Zytokine sind chemische Botenstoffe, die regulierende Funktionen auf das Immunsystem und die Differenzierung von Zellen haben. TNF- $\alpha$  wird von verschiedenen Zellen sekretiert und gehört zu TNF/TNFR-Familie. Es ist ein multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems, der in Entzündungsprozesse involviert ist. Die TNF/TNFR-Familie besteht aus 40 identifizierten Ligand- und Rezeptor-Proteinen, die zumeist von Zellen des Immunsystems gebildet werden und die Zellproliferation und Apoptose der antwortenden Zellen beeinflussen.

Wird die Zelle nun stimuliert, wird ein Komplex, der IKK (I $\kappa$ B-Kinase) genannt wird, aktiviert. Dieser Komplex besteht aus zwei Kinasen IKK1/ $\alpha$  und IKK2/ $\beta$  und dem regulatorischen Element IKK $\gamma$ /NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*). Dieser Komplex phosphoryliert I $\kappa$ B an zwei spezifischen Resten des N-Terminus und gibt somit das Signal zur Ubiquitylierung von I $\kappa$ B. Daraufhin wird I $\kappa$ B mehrfach ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert. Die NLS von NF- $\kappa$ B wird frei. NF- $\kappa$ B transloziert in den Kern und bindet dort an die  $\kappa$ B-DNA-Erkennungsmotive. Die  $\kappa$ B-Elemente sind Konsensussequenzen, die 10 Nukleotide lang sind. Die Transkription der Zielgene wie z.B. Il-6, Il-8 oder Il-1 $\beta$  wird initiiert.

Aber NF- $\kappa$ B nimmt nicht nur über die Aktivierung oder Inhibition der Genexpression pro-inflammatorischer Faktoren Einfluss auf den Wundheilungsprozess, sondern auch über die Regulation pro- und anti-apoptotischer Zielgene. So konnte gezeigt

werden, dass NF- $\kappa$ B eine anti-apoptotische Wirkung hat, indem es die Expression anti-apoptotischer Gene wie z.B. Bcl-L, TRAF1, TRAF2, c-IAP1 und c-IAP2 induzieren kann (Wang et al, 1998; Martin et al., 1995). Die durch NF- $\kappa$ B induzierte Apoptose ist ein essentieller Vorgang, um eine prolongierte Entzündungsphase im Wundheilungsprozess zu verhindern (Lawrence und Fong, 2010). Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Apoptose von Neutrophilen und der aktivierte induzierte Zelltod der antigen-repräsentierenden T-Zellen.

### 1.3. Die Bedeutung der Angiogenese für die Wundheilung

Als Angiogenese bezeichnet man die Aussprossung kapillärer Endothelzellen, das Gefäßwachstum und zusätzlich die Remodellierung existierender Gefäße innerhalb einer Gefäßstruktur (Cameliet, 1997). Die Angiogenese soll die Nähr- und Sauerstoffversorgung eines Gewebes gewährleisten. Bei vielen ernstzunehmenden Erkrankungen ist allerdings die Angiogenese gestört. Man unterscheidet Erkrankungen, in denen die Generierung von Kapillargefäßen zu exzessiv oder unzureichend ist. Erkrankungen, die eine inadäquate Angiogenese begünstigen und damit zu einer mangelhaften Wundheilung führen können sind: Diabetes, verminderte Herzleistungen, Gefäßerkrankungen, eine Sauerstoffminderung aufgrund eingeschränkter Lungenfunktion, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Eiweiß- und Vitaminmangel (Leffmann et al., 2002). Die unzureichende Ausbildung der Kapillargefäße und die damit verbundene Minderversorgung des Gewebes kann, sogar zu dessen Absterben führen. Eine insuffiziente Angiogenese äußert sich u.a. in der Entwicklung von chronischen Wunden und im diabetischen Fußsyndrom. In den Industrienationen leiden ca. 2% der Bevölkerung an einer chronischen Wunde, in Deutschland wird die Zahl auf 2,4 Millionen Menschen geschätzt (Dissemond, 2003). Diese Zahl verdeutlicht die besondere Bedeutung der Angiogenese für die Wundheilung. Ursache für eine insuffiziente Angiogenese ist oft ein Defizit an Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF und *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). bFGF scheint die Voraussetzungen für die Angiogenese innerhalb der ersten Tage der Wundheilung zu schaffen, während VEGF für die Ausbildung des Granulationsgewebes essentiell ist (Nissen et al., 1998). Frank et al. konnten 1995 nachweisen, dass VEGF bei der Wundheilung eine entscheidende Bedeutung übernimmt (Eming et al., 2007). Sie konnten zeigen, dass in diabetischen Mäusen die mRNA- und Proteinexpression von VEGF drastisch redu-

ziert war. Die Angiogenese dieser Mäuse war im Wundbereich signifikant reduziert und die Wundheilung verzögert. Dies zeigte den kausalen Zusammenhang zwischen einer verminderten VEGF Expression und einer eingeschränkten Angiogenese, sowie einer verzögerten Wundheilung auf. Außerdem ließ sich feststellen, dass in ischämischen Wunden die Behandlung mit VEGF-Protein oder mit Adenovirus vermitteltem Gentransfer von VEGF die Wundheilung in diabetischen Mäusen verbessern konnte (Corral et al., 1999; Romano Di Peppe et al., 2002).

Normalerweise wird VEGF in der Haut nicht exprimiert. Kommt es allerdings zu einer mechanischen Verletzung des Gewebes wird eine starke Expression von VEGF induziert. Diese Expression korreliert mit der zeitlichen und räumlichen Entstehung neuer Kapillargefäße (Brown et al., 1992). Erste Studien zeigten, dass Makrophagen, Keratinozyten und Fibrozyten (Fukumura et al., 1998) die Quellen der VEGF Expression sind. Später konnte in *in vitro* Studien belegt werden, dass Neutrophile, Thrombozyten und Mastzellen im Wundgewebe VEGF exprimieren können. Die Expression von VEGF wird transkriptional und über die Stabilität der mRNA reguliert. Die Transkription von VEGF wird durch zahlreiche Faktoren reguliert wie z.B. Wachstumsfaktoren, pro-inflammatorische Zytokine, Hormone und zellulären Stress (Pages und Pouyssegur, 2005). Während der Wundheilung wird die Transkription von VEGF aber insbesondere durch pro-inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und insbesondere durch Hypoxie induziert (Detmar et al., 1995; Frank et al., 1995). Der Wachstumsfaktor VEGF vermittelt die Permeabilität von Blutgefäßen, den Einstrom inflammatorischer Zellen, Migration und Proliferation schon vorhandener Endothelzellen in das Wundgewebe und die Rekrutierung mesenchymaler Progenitoren, um die Reparatur des zerstörten Gewebes zu unterstützen (Brown et al., 1992; Nissen et al., 1998). Diese vielfältigen Funktionen belegen, welche Bedeutung VEGF als Regulator in der Neo-Angiogenese zerstörten Hautgewebes hat.

## 1.4. Hypertrophe Narben und Keloide als Ausdruck einer gestörten Narbenbildung

Die Narbe als Folge einer Verletzung der Haut stellt einen Endzustand der Wundheilung dar. Im Narbengewebe ist das Kollagen nicht mehr komplex verflochten, sondern parallel angeordnet. Neben Einschränkungen der Beweglichkeit können kosmetische Betrachtungen, Juckreiz, Spannungsgefühle oder Schmerzen zu funktionellen und psychologischen Einschränkungen führen. Sonderformen der Narben sind Keloide und hypertrophe Narben. Sie sind Ausdruck einer gestörten Wundheilung, deren Ursache bislang nicht abschließend geklärt werden konnte. In beiden Sonderformen kann man eine überhöhte Kollagensynthese und eine unverhältnismäßige Anordnung der Kollagenfasern beobachten. Auch Diegelmann et al. konnten schon 1979 beobachten, dass Fibroblasten aus Keloiden in Abwesenheit von humoralen Substanzen fortwährend Kollagen synthetisieren. Die Kollagensynthese ist im Vergleich zu normaler Haut um 20% erhöht (Cohen et al., 1971). Während der normalen Wundheilung wird zunächst Kollagen Typ III synthetisiert, welches nachfolgend durch das Kollagen Typ I ersetzt wird (Huttenlocher et al., 1996). Sowohl in hypertrophen Narben sowie in Keloiden findet man allerdings in der Regenerationsphase ein Gleichgewicht, das zu Kollagen Typ III verschoben ist (Weber et al., 1978).

TGF- $\beta$  ist neben dem *Epidermal Growth Factor* (EGF) einer der Wachstumsfaktoren, die im kausalen Zusammenhang mit der Ausbildung hypertropher Narben und Keloiden beobachtet werden konnten. Sofort nach einer Gewebsverletzung wird es in hoher Konzentration von Thrombozyten freigesetzt. Dies wirkt wie ein initialer Startschuss, auf dessen Reaktion Neutrophile, Makrophagen und Fibroblasten in das Wundmilieu gelockt werden. Außerdem wird TGF- $\beta$  anfänglich von Endothelzellen, danach von Fibroblasten und später von Keratinozyten gebildet. Einerseits fördert dieser Wachstumsfaktor die Synthese von Fibronectin, Proteoglykanen und der extrazellulären Matrix (ECM) sowie die Bildung des Kollagens Typ I und Typ III (Rodland et al., 1990; Zhang et al., 1995a). Andererseits hemmt TGF- $\beta$  die Aktivierung der für den Umbau der Kollagenmatrix erforderlichen Kollagenase (Overall et al., 1989, Uriste et al. 1999).

TGF- $\beta$  erhöht die TIMP Expression, in deren Folge es zu einer Inhibition der MMPs kommt. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine hypertrophe Narbenbildung und die Ausbildung von Keloiden mit einer Überexpression von TGF- $\beta_1$  und

TGF- $\beta_2$  (Shah et al., 1995, Wang et al., 2000, Ishida et al., 2008) verbunden sind. TGF- $\beta$  stimuliert nicht nur die Chemotaxis und die Zytokinproduktion durch Makrophagen, sondern es ist eines der wichtigsten Zytokine, die die Funktion der Fibroblasten und die Bildung der ECM beeinflussen. Das Protein begünstigt die Ausbildung von Fibrosen, indem es mesenchymale Zellen und Fibroblasten direkt stimuliert (Martin und Leibovich, 2005).

TGF- $\beta$  induziert außerdem eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma), eine Komponente des Zytoskeletts, welche an der Vermittlung von Zelladhäsion und Bewegung beteiligt ist. Keloide und hypertrophen Narben enthalten Myofibroblasten, die durch die Akkumulation von intrazellulärem  $\alpha$ -sma gekennzeichnet sind (Gabbiani, 1992), was auf die Wirkung von TGF- $\beta$  zurückgeführt wird (Desmouliere et al., 1993; Younaie et al., 1996). In normalen Narben werden Myofibroblasten nur vorübergehend und im normalen Hautgewebe gar nicht gefunden (Darby et al., 1990).

Das Proteoglykan Decorin kann Fibrosen dadurch lösen, dass es die Wirkung von TGF- $\beta$  neutralisiert (Hildebrandt et al. 1994). Scott et al. wiesen 1996 nach, dass die Expression von Decorin in hypertrophen Narben im Gegensatz zum Normalgewebe um 75% reduziert ist.

Zusätzlich zeigen Fibroblasten aus Keloiden und hypertrophen Narben eine erhöhte Sensitivität gegenüber TGF- $\beta$  (Younai et al., 1994). Diese gesteigerte Sensitivität kann zu einer erhöhten Kontraktilität dieser Fibroblasten führen, die wiederum zur Kontraktion der Narbe führt (Tuan et al., 1998). Interleukin-1 (Il-1), *Insulin-like Growth Factor-1* (Ghahany et al., 1995), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) (Lynch et al., 1989) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) tragen zu einer Erhöhung der Kollagen- und Fibronectin-Synthese innerhalb der Fibroblasten bei und sind wie Il-6 in Keloiden erhöht exprimiert (Urioste et al., 1999).

## 1.5. Die Kieselgel-Wundauflage als neue Strategie der Wundbehandlung

Ist die Integrität der Haut durch ein offenes Trauma zerstört, gilt es diesen Gewebdefekt zu beheben, um die Barrierefunktion der Haut schnellstmöglich wieder herzustellen. Seit Menschengedenken werden Wunden deswegen mit Verbandsmateria-

lien abgedeckt, um eine rein physikalische Barriere vor pathogenen Keimen und Schutz vor dem Austrocknen zu bieten. Im Gegensatz dazu begann die Entwicklung innovativer Verbandsmaterialien erst im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts mit den Möglichkeiten der industriellen Verarbeitung. Erst zu diesem Zeitpunkt wurde die Leinenscharpie als das seit zwei Jahrtausenden führende Verbandsmittel von der Baumwolle abgelöst. Die Zunahme des metabolischen Syndroms und der Wohlstandskrankheiten in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts führte zu einer steigenden Inzidenz an chronischen Wunden. Als Resultat wurden enorme Fortschritte auf dem Gebiet der Wundheilungstherapie gemacht.

Der heutige Kenntnisstand favorisiert in Folge dessen die „Feuchte Wundbehandlung“. Wissenschaftliche Grundlage hierfür sind die Experimente von Winter (1962). Er konnte zeigen, dass Wunden, die an jungen Schweinen gesetzt wurden, schneller heilten, wenn sie feucht gehalten wurden. Trocknete man diese Wunden hingegen aus, wurde die Epithelisation inkommodiert und der Wundheilungsprozess verlief retardiert. Es konnte gezeigt werden, dass in einer feucht gehaltenen Wunde die Migration des Epithels durch die Wundflüssigkeit schneller verlief als unter trockenem Wundschorf (Winter und Scales, 1963; Hinmann und Maibach, 1963).

Der normale Wundheilungsprozess dient der schnellen funktionellen Wiederherstellung des verletzten Gewebes und basiert auf einer komplexen Serie von Prozessen zwischen Zellen, löslichen Mediatoren und der extrazellulären Matrix, die optimal aufeinander abgestimmt sein müssen. Zahlreiche Regulationspunkte kontrollieren den geordneten Ablauf. Entsteht ein Ungleichgewicht innerhalb dieser Heilungsprozesse, so dass diese unterbrochen oder gehemmt werden, entsteht eine Wundheilungsverzögerung oder eine Entzündung, in deren Folge die Wunde „chronisch“ werden kann. Und eine Wunde wird dann als chronisch bezeichnet, wenn sie trotz fachgerechter Behandlung nach einem angemessenem Zeitraum (ca. 8 Wochen) nicht abheilt.

Durch die epidemiologische Entwicklung unserer Gesellschaft nehmen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, Varicosis und periphere arterielle Verschlusskrankheiten zu. Diese Erkrankungen begünstigen weiterhin die Entstehung von chronischen Wunden. Zusätzlich kommt es aufgrund der demographischen Entwicklung zu einer Zunahme von Dekubitusgeschwüren und zu einer weiteren Erhöhung der eben genannten Erkrankungen, da diese vorwiegend in späteren Lebensdekaden auftreten. So leiden heute fast 100 Millionen Patienten weltweit an einer chronischen Wunde.

Viele chronische Wunden befinden sich in einem Teufelskreis, denn das geschädigte Gewebe exprimiert zu viele pro-inflammatorische Zytokine (wie z.B.  $IL-1\beta$ ) (Mast und Schulz, 1996), was wiederum eine überhöhte Expression von Proteasen und Radikalen zur Folge hat. Dieses Missverhältnis verhindert eine effektive Abheilung und Geweberegeneration. Die verschiedenen Wundheilungsphasen und die besonderen Erfordernisse, die die Behandlung chronischer Wunden verlangt, macht die Entwicklung von geeigneten Wundheilungstherapeutika zu einem anspruchsvollen und interessanten Forschungsfeld.

Im Gegensatz zu einer Vielzahl auf dem Markt befindlicher Wundauflagen, die oftmals aus Baumwolle und Cellulose bestehen und mit Pharmazeutika substituiert sind, soll in der vorliegenden Arbeit eine Siliziumoxid-basierte, völlig neuartige, anorganische Wundauflage untersucht werden.

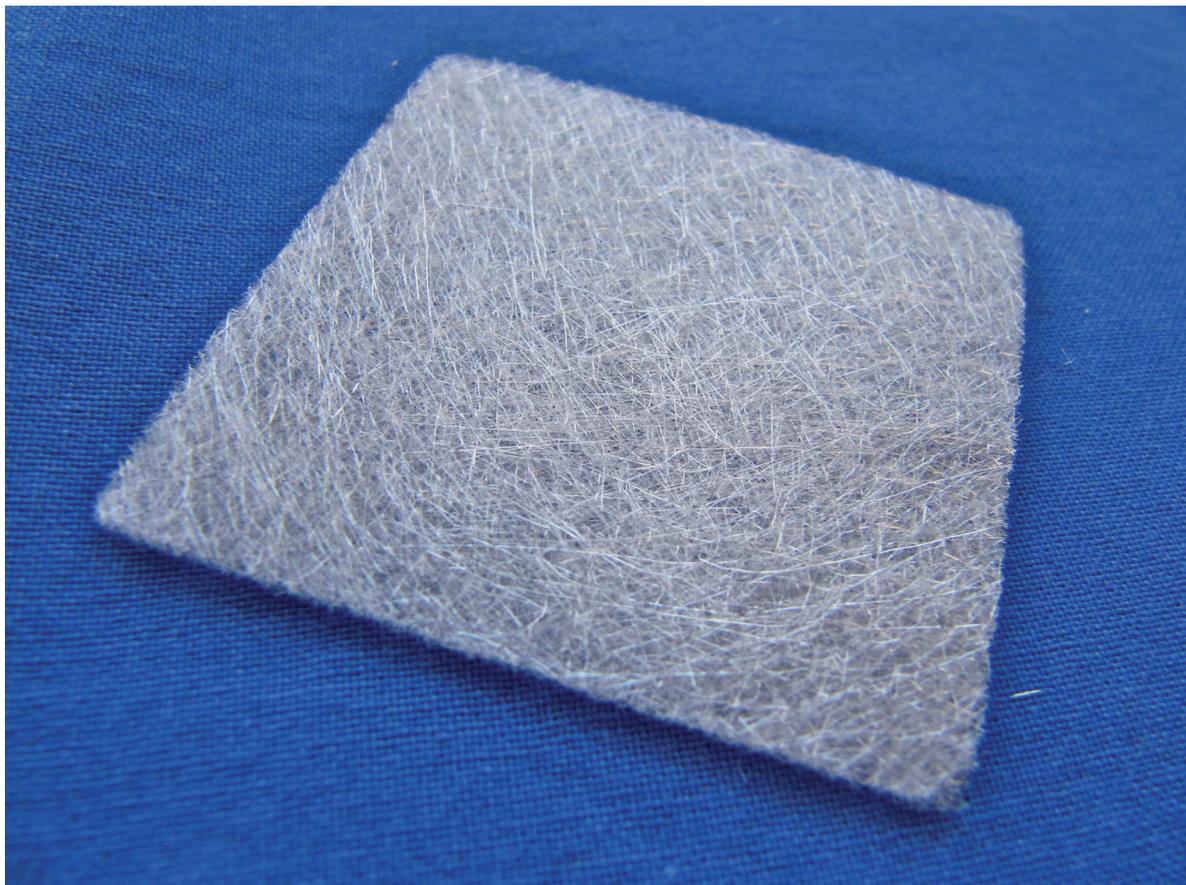


Abbildung 3: Die bioresorbierbare Kieselgel-Wundauflage

Diese bioresorbierbare Auflage (Abb.3) besteht aus Kieselgelfasern, bildet eine dreidimensionale Struktur aus und soll eine neue Behandlungsstrategie verfolgen. Die von Konkurrenzunternehmen hergestellten bioresorbierbaren Wundauflagen, wurden

teilweise vom Körper zu schnell resorbiert, so dass es zuerst zu einer Anhäufung von Zellen am Wundauflagenmaterial kam und als Folge der schnellen Resorption zur Unterversorgung der Zellen mit Nährstoffen. In deren Folge starben die innen liegenden Zellen ab und das neu gebildete Gewebe fiel in sich zusammen. Die biologisch degradierbaren Kieselgel-Wundauflagen sollen so lange in ihrer ursprünglichen Struktur erhalten bleiben, bis sie vom Körper resorbiert werden. So kann ein Minimum an Zellen an diese dreidimensionale Struktur adhären, so soll eine optimale Zellvermehrung gewährleistet werden. Außerdem sollen die Silika-Vliese überschüssiges Wundsekret aufnehmen und die Wunde nicht austrocknen.

Bestandteil der Kieselgel-Wundauflagen ist Silizium, welches hier als Ester der ortho-Kieselsäure ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) als Silikat gebunden ist. Grundprinzip aller Silikate ist ein  $\text{SiO}_4$ -Tetraeder, welcher in diesem Falle Hydroxygruppen (-OH) zum Ladungsausgleich gebunden hat. Silikate sind in unserer Umwelt von essentieller Bedeutung und als Nahrungsergänzungsmittel ist Kieselgel (als Kieselerde) bereits lange bekannt.

Denn für den humanen Organismus ist Silizium von besonderer Bedeutung. Es ist ein Spurenelement und zu ca. 20 mg/kg Körpergewicht im Organismus enthalten. Mit dem zunehmenden Alter nimmt dieser Wert allerdings ab. Es konnte gezeigt werden, dass Silikate zur Bildung (Carlisle, 1970 und 1971) und Reifung von Knochen (Carlisle, 1972) notwendig sind. Auch konnte Carlisle (1973) zeigen, dass Silikate für die Kollagensynthese in der Dermis und im Knorpelgewebe benötigt werden (Calomme und Berghe, 1996). So werden sie für den Aufbau von Glycosaminoglykanen benötigt. Des Weiteren führt eine verminderte Aufnahme von Silikaten zu einer verminderten Konzentration von Kalzium und Phosphor im Blutserum und hat somit einen Einfluss auf das Immunsystem. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse soll im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung einer anorganischen, Siliziumoxid-basierten Wundauflage auf verschiedene Parameter der Wundheilung untersucht werden.

## 1.6. Ziele der Arbeit

Die Wundheilung ist ein dynamischer, interaktiver Prozess in den lösliche Faktoren, Blutzellen, extrazelluläre Matrix und verschiedene Zelltypen involviert sind. Dieser Prozess ist distinkt reguliert und lässt sich in drei Phasen unterteilen. Kommt es zu einem Ungleichgewicht innerhalb der zellulären und außenzellulären Signalmoleküle, werden z.B. pro-inflammatorische Mediatoren überexprimiert und mit der Folge einer persistierenden Entzündungsphase - können chronische Wunden entstehen. Es wird geschätzt, dass in der Bundesrepublik Deutschland 2,4 Millionen Menschen an einer chronischen Wunde leiden und dass sich die Behandlungskosten dementsprechend auf 1 bis 1,5 Milliarden Euro belaufen.

Für die Behandlung von Wunden steht ein weites Spektrum kommerziell erhältlicher Wundauflagen wie z.B. Hydrokoloide, Alginat, Polyurethanschäume, Baumwolle und Zellulose zur Verfügung. Alle diese organischen Materialien werden zudem tendenziell mit unterschiedlichsten Pharmazeutika derivatisiert. Trotz dieser Vielzahl verschiedenster Wundauflagen ist bis jetzt noch Mittel gefunden worden, welches bei der Behandlung von Problemwunden besonders vorteilhaft wäre.

Im Rahmen dieser Arbeit soll erstmalig eine Siliziumoxid-basierte und bioresorbierbare Wundauflage analysiert werden.

Es ist die Analyse eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Inkubation der Kieselgel-Wundauflagen mit verschiedenen sich in der Haut befindenden Zelltypen und einer möglichen unterstützenden Wundheilung geplant. Aus diesem Grunde sollen die biologische Verträglichkeit, biologische Wirksamkeit und die toxikologische Eigenschaften der Silika-Vliese untersucht werden. Es ergeben sich folgende Ziele:

1. Die Identifizierung möglicher toxischer Eigenschaften der Silika-Vliese
2. Die Analyse des Einflusses der Kieselgel-Wundauflagen auf die Proliferation
3. Die Bestimmung des Effektes der Wundauflagen auf pro-inflammatorische Mediatoren
4. Die Abklärung der Bedeutung der Silika-Vliese für die Angiogenese
5. Die Untersuchung der Wirkung der Kieselgel-Präparate auf den Kollagenstoffwechsel

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Systemec (Wettenberg)
Brutschrank Corp Steri Cycle	Thermo Electron (Karlsruhe)
CO <sub>2</sub> Incubator	
DNA-Concentrator	Eppendorf AG (Hamburg)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Fluostar OPTIMA	BMG Labtech (Offenburg)
Fluostar OMEGA	
Geldokumentationssystem	Biometra; BioDocAnalyse
	Video Copy Processor Mitsubishi (Ratingen)
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH (Staufen)
Inkubationsschüttler	Artisan Scientific (Champaign, USA)
INNOVA 2000	
Magnetrührer	MR 3001 Heidolph (Schwabach)
Mini-PROTEAN Tetra	BioRad (München)
Electrophoresis System	
Mini Trans-Blot Cell	BioRad (München)
Mikroskope	Leitz/Leica (Wetzlar)
	Zeiss Axioplan Epi-Fluoreszenz (Jena)
Netzgeräte	BioRad (München)
Neubauer-Zählkammer	Optik-Labor (Görlitz)
Orbitalshaker	Breda Scientific (Braunschweig)
Odyssey Infrared	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Imaging System	
ICP-MS Elan-DRCII	Perkin Elmer
pH-Meter 211	Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfen: Pipetboy	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Heilbronn)
Sterilbank	BSB4 Gelaire Flow Laboratories (Opera, Italien)
Tecan Tecan Safire <sup>2</sup> ™	Tecan (Mainz)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Genie 2 Scientific Industries (Bohemia N.Y., USA)
Western Blot Kammer	Hoefler (San Francisco)
Wasserbad	GFL® (Burgwedel)
Zentrifugen	Labofuge 400R
	Megafuge 1.0R
	Mikro 22R
	Universal 16R
	Heraeus Instruments (Hanau)

Heraeus Sepatech (Osterode)  
Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Cell Culture Inserts	BD Falcon™ (Heidelberg)/Greiner (Frickenhausen)
Eppendorf Reaktionsgefäße	(0,5-2 ml) Eppendorf (Hamburg)
Falcon-Tubes	Greiner (Frickenhausen)
Halbmikroküvetten Uvette	Eppendorf (Hamburg)
Nitrocellulosemembran	Whatmann Schleicher & Schuell (Dassel)
Parafilm	American National Can TM (Chicago, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Ahrensburg)
Plastikpipetten	Welabo (Düsseldorf)
Sterilfilter	Sartorius/vivascience AG (Hannover)
Whatman-Papier	Whatman Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturplatten	Biochrom (Berlin)/TPP (Trasadingen, Schweiz)/Greiner (Frickenhausen)

### 2.1.3. Chemikalien und Zellkulturlösungen

APS	Sigma-Aldrich (München)
alamarBlue®	Invitrogen (Darmstadt)
Bisbenzimid (Hoechst 33342)	Sigma-Aldrich (München)
BSA	Paa Laboratories GmbH (Cölbe)
DEPC	Sigma-Aldrich (München)
DualColor™ Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)
Loading Buffer Pack	
EDTA 1% (w/v)	Biochrom AG (Berlin)
Ethanol absolut	Merck (Darmstadt)
Eukitt	Sigma-Aldrich (München)
FBS	Sigma-Aldrich (München)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin > 99%	Roth (Karlsruhe)
HPLC-H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Gibco (Darmstadt)
6x Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
Methanol pro analysis	Merck (Darmstadt)
Neutralrot	PromoCell (Heidelberg)
PBS	Gibco (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin	Gibco (Darmstadt)
Propidiumiodid	Invitrogen (Darmstadt)
Protein Leiter (10-250kDA)	Fermentas (St. Leon-Rot)
HCl	Fluka (Buchs, Schweiz)
SDS	Sigma-Aldrich (München)
TEMED	Sigma-Aldrich (München)
Trizma base 99%	Sigma und Merck (München und Darmstadt)
Trockenmilchpulver	Fluka (Buchs, Schweiz)
Tween 20	BioRad (München)

#### 2.1.4. Kommerzielle Testsysteme (Kits)

Cellomics® NF-κB Activation HCS Reagent Kit Nuclear Extraction Kit Princess® Nina Transcription Factor Assay Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISAs	Thermo Scientific (Schwerte)  Millipore (Schwalbach) CCS Cell Culture Service (Hamburg) Millipore (Schwalbach) R&D Systems (Wiesbaden- Nordenstadt)
--	---

#### 2.1.5. Puffer und Lösungen

##### DEPC-Wasser

200µl DEPC  
100ml dest. H<sub>2</sub>O

##### 10x Elektrophoresepuffer

10g SDS  
30g Tris  
144g Glycin  
ad 1l aqua dest.

##### 10x Transferpuffer

60,6g Tris  
144g  
ad 1l aqua dest.

##### Gebrauchslösung:

100ml Transferpuffer + 200 ml Methanol  
ad 1l aqua dest.

##### Waschpuffer 1 (TBS-T)

10ml 1 M Triz (pH 7,5)  
10ml 20% Tween 20  
30ml 5 M NaCl  
ad 1l aqua dest.

##### Waschpuffer 2 (10 x TBS)

24,2 g Triz  
80g NaCl  
ad 1l aqua dest. mit HCl auf pH 7,6 einstellen

##### Stripping Buffer

0,2M Glycin  
0,5M NaCl  
pH-Wert auf 2,8 einstellen

Trypsin/EDTA-Lösung

10% Trypsin (v/v)

5% EDTA in PBS (v/v)

Kollagenase-Puffer

100mM HEPES

120mM NaCl

50mM KCl

1mM CaCl<sub>2</sub>

5mM Glucose (autoklavieren)

Kollagenase-Lösung

Kollagenase-Puffer

+0,2% Kollagenase

+1,5% BSA

**2.1.6. Nährmedien**

Die Zellkulturmedien und deren Zusätze wurden von Sigma-Aldrich (München) und Invitrogen/Gibco (Darmstadt) bezogen.

Zelllinie	Medium	Zusätze
HeLa	DMEM	+ 2mM L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FBS
JM	RPMI 1640	+ 2mM L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin + 10 % FBS
RAW 264.7	DMEM:Ham's F12 mixture (1:1)	+ 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FBS + 2mM L-Glutamin
THP-1	RPMI 1640	+ 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FBS

Tabelle 1: Übersicht über die benutzten Zelllinien und Zellkulturmedien

Primärzellen	Medium	Zusätze
Fibroblasten	DMEM	+ 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin
Keratinocyten	MCDB153/Keratinocyte-SFM (1:1)	+ 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin
Endothelzellen	ECGM	+ 2% FBS + 0,4% Endothel Growth Supplement + 0,1ng/ml EGF + 1ng/ml BFGF + 90µg/ml Heparin + 1µg/ml Hydrocortisone

Tabelle 2: Übersicht über die benutzten Primärzellen und Zellkulturmedien

### 2.1.7. Biologisches Material

#### Immortalisierte Zelllinien

Name	Bedeutung	Spezies	Morphologie	Referenz
HeLa	Henrietta Lacks	Mensch	Epithel	Scherer et al., 1953
JM	Jurkat	Mensch	Blutzellen	Schneider et al., 1977
RAW 264.7		Maus	Makrophagen	
THP-1		Mensch	Monozyten	Tsuchiya et al., 1980

Tabelle 3: Übersicht über die Zellkulturlinien und ihre Herkunft

### 2.1.8. Zytokine

Interleukin-1 $\beta$

TNF- $\alpha$  (humaner Tumornekrosfaktor- $\alpha$ )

TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ )

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

### 2.1.9. Zytostatika

Suramin

Sulfasalasin

Die Zytostatika so wie die Zytokine wurden entweder von der Firma Sigma-Aldrich (München) oder von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) bezogen.

### 2.1.10. Oligonukleotide

Name	Sequenz (5 $\rightarrow$ 3')	Gen (NCBI-Nr.)	Produktgröße
Mycoplasma arginini forward-GPO3	GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T	16 srRNA (M24579)	270 bp
Mycoplasma arginini reverse-MGSO	TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC		

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe von NCBI (Stemke et al., 1992) gewählt und von der Firma biomers (Ulm) synthetisiert.

### 2.1.11. Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Bezugsquelle	Applikation	Verdünnung	Inkubation	
PARP	rabbit	Cell Signaling	WB	1:1000	60 min	
$\alpha$ -Tubulin	mouse	Sigma	WB	1:5000	üN (4°C)	
NF- $\kappa$ B p50	mouse	Santa Cruz	WB	1:100		
NF- $\kappa$ B p65	mouse	Santa Cruz	WB	1:100		
NF- $\kappa$ B2 p100/p52	rabbit	Cell Signaling	WB	1:500		
RelB	rabbit	Cell Signaling	WB	1:500		
p- I $\kappa$ B- $\alpha$	mouse	Santa Cruz	WB	1:200		
Caspase 3	mouse	Cell Signaling	WB	1:500		
CD31	mouse	Dako	IC	1:80		3h
vWF	mouse	Dako	IC	1:125		3h
Involucrin	mouse	Acris Antibo- dies	IC	1:500	1h	
Ki-67	mouse	dianova GmbH	IC	1:30	1h	

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung	Inkubation
anti mouse IR-Dye 800cw	goat	LI-COR	1:10000	1h (RT)
anti mouse IR-Dye 680cw				oder üN
anti rabbit IR-Dye 800 cw				(4°C)
anti rabbit IR Dye 680cw				

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper

### 2.1.12. Software und Server

ImageJ; Version 1.44

BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Isolation von Endothelzellen aus Nabelschnurblut

Zu Beginn wird die Nabelschnur mit 70% Ethanol besprüht und beide Enden der Vene werden mit je einer Olive kanüliert. Daraufhin wird die Nabelschnur mit 20 ml PBS durchgespült. Nun gibt man so lange (ca. 10 ml) vorgewärmte Kollagenase-Lösung in die Nabelschnur, bis die Lösung am anderen Ende austritt. Die Vene wird abgeklemmt und für 20 min unter einem Tuch, um das Enzym gegen Wärmeverlust zu schützen, inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Kollagenase-Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Die Nabelschnur wird nochmals mit 10 ml Medium gespült und diese Suspension wird mit dem Falcon aufgefangen. Die Lösung wird für 5 min bei 400 g zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Abhängig von der Länge der Nabelschnur werden die Zellen in entsprechenden Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen werden täglich mikroskopiert, um auf evtl. Kontaminationen der isolierten Zellen sofort reagieren zu können. Nach drei Tagen wird das Medium gewechselt und die Zellen werden mehrfach mit PBS gewaschen, um noch verbliebene Erythrozyten zu exzidieren.

### 2.2.2. Aufbereitung der Vollhaut für die Isolation von Fibroblasten und Keratinozyten

Vollhaut besteht aus drei Komponenten: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und der Subkutis (Unterhaut). 90% der Epidermis besteht aus Keratinozyten (Böcker et al., 2001), wohingegen die Fibroblasten in der Dermis zu finden sind. Dementsprechend müssen aus unterschiedlichen Hautkompartimenten Zellen isoliert werden. Zu Beginn der Versuchsdurchführung unterscheiden sich die Protokolle aber nicht. Das Gewebe kann bis Verarbeitungsbeginn bis zu 48 h in DMEM/HAM's F12 Medium gelagert werden. Nach dessen Lagerung wird das Medium abgesaugt und die Haut mehrfach mit PBS gespült und das subkutane Fettgewebe wird mit den Blutgefäßen von der Dermis und Epidermis präpariert. Die Haut wird dann in 0,5 cm breite Streifen geschnitten. Falls das Gewebe noch mit viel Blut verunreinigt sein sollte, wird es noch 2-3 x mit PBS gewaschen und für 10 min im Falcon-Röhrchen ins Wasserbad gestellt. Anschließend wird die Haut mit Dispase II überschichtet und ün

bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Haut im Falcon für 10-30 min ins Schüttelwasserbad bei 37°C gestellt. Zwischendurch wird der Erfolg der Gewebedisaggregation immer wieder kontrolliert, um die Reaktion dann schnell mit 4°C kaltem PBS zu stoppen. Das Gewebe wird in eine Petrischale gegeben, wo nun die Epidermis (obere graue Phase) von der Dermis (weiße Phase) getrennt wird. Die Epidermis wird nun wie in „Isolation von Keratinozyten aus der Vollhaut“, die Dermis dementsprechend wie in „Isolation von Fibroblasten aus der Vollhaut“ weiter behandelt.

### 2.2.3. Isolation von Keratinozyten aus der Vollhaut

Die Epidermis wird in ein Falcon-Röhrchen gegeben und mit Trypsin/EDTA überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird das Reaktionsgefäß max. 10 min ins 37°C warme Schüttelbad gegeben. Hier wird die Auflösung der extrazellulären Matrix kontrolliert, damit die zellulären Strukturen nicht zerstört werden. Die Verdauung der Proteine durch Trypsin wird mit FBS abgestoppt (auf 5 ml Trypsin werden 2 ml FBS gegeben). Das abgestoppte Gemisch wird durch ein steriles Teflonsieb (Porenweite 50-100 µm) in ein steriles Becherglas gegeben. Das Sieb wird mit PBS gespült. Um die Suspension zu vereinzeln wird diese mehrmals auf und ab gezogen. Anschließend wird die Zellsuspension für 10 min bei 300 g zentrifugiert und dann in einer Zellzahl von 50.000/cm<sup>2</sup> in konditioniertem ECGM-Medium ausgesät. Die Zellen werden im Zellkulturschrank inkubiert und so wenig wie möglich bewegt nach 1-3 Tagen wird das Medium gegen nicht konditioniertes Medium getauscht.

### 2.2.4. Isolation von Fibroblasten aus der Vollhaut

Die Dermis wird in einem Falcongefäß mit Kollagenaselösung überschichtet und für ungefähr 45 min in ein 37°C warmes Schüttelwasserbad gestellt. Nach mehrmaliger Kontrolle der Disaggregation wird das Dermis-Lösungs-Gemisch durch ein Teflonsieb gegossen und mit kaltem PBS (4°C) gespült. Um die Zellen zu vereinzeln wird die Lösung auf- und abgezogen und anschließend in einem 50 ml Falcon und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Die Fibroblasten werden in DMEM resuspendiert und ausgesät.

### 2.2.5. Isolation von Keratinozyten aus der Spalthaut

Die Spalthaut eignet sich für die Isolation von Keratinozyten besonders gut, da man im Gegensatz zur Vollhaut eine höhere und vitalere Ausbeute erzielt (ein enzymatischer Abbau der Proteine entfällt). Die Spalthaut wird in 0,5 cm große Streifen geschnitten, mit Trypsin/EDTA überschichtet und üN bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wird die Haut in dem Falcon kurz gevortext. Falls sich aus dem Gewebeverband noch nicht genug Zellen gelöst haben, wird das Falcon für 2-3 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wird nach der entsprechenden Kontrolle schnell mit FBS abgestoppt. Das Epidermis-Lösungs-Gemisch wird durch ein steriles Teflonsieb in ein steriles Becherglas gegeben. Um die Zellen zu vereinzeln, wird das Gemisch mehrmals auf und ab gezogen und dann bei 300 g für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen werden im konditionierten EGFM-Medium resuspendiert und in einer Zellzahl von 50.000/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Zellkulturschalen sollten so wenig wie möglich bewegt werden und nach 1-3 Tagen erfolgt der Mediumwechsel mit nicht-konditioniertem Medium.

### 2.2.6. Herstellung von konditioniertem Medium für die Keratinozyten

Das MCDB153/Keratinocyte-SFM-Medium (10% FBS, 1% Pen/Strep) wird von gut proliferierenden Keratinozyten abgenommen, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

### 2.2.7. Erstellen von Wachstumskinetiken für die Zellkulturen

Zur Etablierung der Zellkulturen wurde für jede eine Wachstumskinetik erstellt. Diese Methode wird angewendet um sicherzustellen, dass sich die meisten Zellen in der *log*-Phase befinden, wenn sie passagiert und geerntet werden. Suspensionszellen werden in je eine, Adhäsionszellen in je fünf Zellkulturflaschen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$ /ml und  $5 \times 10^5$ /ml ausgesät. Den Suspensionszellen wird täglich ein Medium-Zell-Gemisch entnommen und -wie nachfolgend beschrieben- werden die Zellen gezählt.

Von den Adhäsionszellen werden täglich zwei Zellkulturflaschen ( $1 \times 10^5$ /ml und  $5 \times 10^5$ /ml) gezählt und danach verworfen. Da das Medium nicht der limitierende Faktor

sein sollte, wurde je nach Zelllinie die Nährlösung ein bis zweimal ausgetauscht. Der Wachstumszyklus von Zellpopulationen besteht aus vier Phasen: die erste Phase wird als Anlaufphase (*lag*-Phase) bezeichnet. Diese Phase dauert, abhängig von der Herkunft der Zellen und ihren spezifischen Wachstumsbedingungen unterschiedlich lang. Die exponentielle Phase wird auch als *log*-Phase beschrieben. In dieser Phase verdoppelt sich die Zellzahl pro Zeiteinheit und das Proteinexpressionsprofil ist entsprechend hoch. Die stationäre Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass das exponentielle Wachstum zum Erliegen kommt. Als letzte Phase schließt sich die Absterbephase an. Diese verläuft ebenfalls exponentiell, die Geschwindigkeit ist aber geringer als jene in der *log*-Phase.

#### Bestimmung der Lebendzellzahl mit Hilfe der Neubauerkammer

Die Zellsuspension (gegebenenfalls nach der Trypsinierung) wird durchgemischt und ein Aliquot von 100µl entnommen. Die Suspension wird mit 1:2 Trypanblau/PBS-Lösung versetzt. Trypanblau ist ein saurer Azofarbstoff, dessen Polyanionen an Zellproteine binden. Bei toten Zellen dringt der Farbstoff durch die Zellmembran und färbt das Zytoplasma blau. In der lichtmikroskopischen Betrachtung erscheinen lebende Zellen dagegen klar. Da Trypanblau an sich zytotoxisch wirkt, darf das Auszählen nicht zu lange dauern. Unter dem Mikroskop werden die vier Großquadrate ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Dieser Mittelwert wird mit dem Verdünnungsfaktor der Kammer und der Zellsuspension multipliziert und ergibt so die Zellzahl pro Milliliter.

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = n \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

n = Mittelwert der Großquadrate

$10^4$  = Verdünnungsfaktor der Kammer

### 2.2.8. Viabilitätstest mit dem Neutralrot-Assay

Der Neutralrot-Assay beruht auf einer Färbereaktion durch die lebende von toten Zellen unterschieden werden können (Vitalfärbung) und wurde von Bohrenfreund und Pürner (1985) entwickelt. Zellen werden *in vitro* mit dem Farbstoff Neutralrot inkubiert. Der ungeladene Farbstoff gelangt durch nicht-ionische Diffusion in die Zellen und in die Lysosomen dieser Zellen. In vitalen Zellen wird der Farbstoff in den Lysosomen protoniert. Man spricht von einer Protonenfalle, da der protonierte Farbstoff nun geladen ist und somit nicht mehr durch die Membran diffundieren kann und an deren Matrix akkumuliert. Tote und geschädigte Zellen können den Farbstoff nicht akkumulieren. Während der anschließenden Wasch- und Fixierungsschritte wird der Farbstoff nicht intrazellulär zurückgehalten und wieder ausgewaschen. Daher sind Ansätze mit toten und geschädigten Zellen oder mit einer reduzierten Zellvermehrung weniger stark gefärbt als solche mit vitalen Zellen. Die Neutralrot-Stammlösung wird mit Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Nach 3 h wird die Neutralrot-Lösung abgenommen und die Zellen mit einer Wasch- und Fixierlösung (Formaldehyd 0,5%, CaCl<sub>2</sub> 1%) für 1 min gewaschen. Die Rücklösung des Farbstoffes erfolgt über 20 min bei leichtem Schütteln mit dem entsprechenden Puffer (Ethanol 50%, Essigsäure 1%). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda=540$  nm mit dem Fluostar OPTIMA bestimmt.

### 2.2.9. Viabilitätsassay mit dem AlamarBlue-Assay

Grundlage des AlamarBlue-Assays ist die Resazurinlösung. Resazurin ist ein Redoxindikator, der in Abhängigkeit der mitochondrialen metabolischen Aktivität einer Zelle seine Farbe umschlägt und ein Fluoreszenzsignal abgeben kann. Der Farbumschlag ist proportional zur Anzahl der vitalen Zellen.

Resazurin ist ungiftig und wird bei der NADH/H<sup>+</sup> abhängigen Reduktion zum pinkfarbenen fluoreszierenden Resofurin (Fields und Lancaster, 1993; Ahmed et al., 1994). Zu je 200  $\mu$ l Medium werden 20  $\mu$ l Alamar Blue gegeben. Nach vier Stunden erfolgt die Messung der Fluoreszenz mit dem Tecan Tecan Safire<sup>2</sup>™ Dabei wird das Resofurin bei 530-560 nm angeregt und die Emission bei 590 nm gemessen.

### 2.2.10. Fixierung von Zellen

Da die Zellen für eine intrazelluläre Färbung permeabilisiert werden müssen, werden sie mit Paraformaldehyd behandelt. Zuerst werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer frisch angesetzten Paraformaldehydlösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Fixierung durch Zugabe von eiskaltem PBS beendet. Die Zellen können jetzt mit der entsprechenden Färbelösung bzw. mit einer RNase-Lösung inkubiert werden.

### 2.2.11. Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein interkalierender DNA-Farbstoff, der nicht in der Lage ist die Membran lebender Zellen zu durchdringen. PI wird benutzt um nekrotische Zellen einer Zellpopulation zu identifizieren.

Die fixierten Zellen werden mit einer RNase-Lösung (Endkonzentration 50  $\mu\text{g/ml}$ ) für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit der Propidiumiodidlösung (Endkonzentration 50  $\mu\text{g/ml}$ ) für ca. 5 min inkubiert und dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Die Exzitationswellenlänge beträgt 535 nm und die Emissionswellenlänge 617 nm.

### 2.2.12. Bisbenzimid-Färbung

Bisbenzimid bzw. Hoechst 33342 eignet sich für die Färbung von DNA und ist membranimpermeabel. Dieser Farbstoff interkaliert nicht, sondern bindet an AT-reiche Sequenzen und färbt nicht viable Zellen an. Bisbenzimid wird in PBS bestehend aus 25% Ethanol in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  gelöst. Die Fluoreszenz kann mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt werden. Die Emission wird dann entsprechend bei einer Wellenlänge von 418 nm gemessen.

### 2.2.13. Die Involucrin-Färbung

Der Differenzierungsmarker Involucrin ist ein lösliches Vorläuferprotein der Cornified Envelope, das calciumabhängig synthetisiert wird.

Nach der Fixierung erfolgt eine Inkubation der Zellen mit einer Trypsinlösung (0,1%) für 15 min bei 37°C. Die Proben werden dann mit Leitungswasser und TBS gespült. Es folgt die Primärantikörperinkubation (Tab. 5) und nach einem Waschschrift wird die Probe mit einem enzymgekoppelten biotinyliertem Anti-Mouse-Antikörper (1:100) für 30 min inkubiert. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit PBS. Mit Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat erfolgt die Färbung unter Zugabe des Chromogens DAB (3,3'-Diaminobenzidin). Das braune Endprodukt kann dann mit dem Mikroskop visualisiert werden.

#### **2.2.14. Ki-67-Färbung ( $\alpha$ SMA, vWF, CD31)**

Das Ki-67-Antigen ist ein Zellproliferationsmarker den man in Zellen in der späten G1, S, G2 und M-Phase des Zellzykluses detektieren kann.

Die Zellen werden erst wie unter Punkt 2.2.13 beschrieben fixiert und anschließend mit der in Tabelle 5 angegebenen Primärantikörperkonzentration inkubiert. Die Behandlung der Zellen und Sekundärantikörperinkubation erfolgt wie unter Punkt 2.2.13

#### **2.2.15. Analyse des Siliziumgehaltes mit Hilfe der ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelttem Plasma)**

Für diese Versuchsdurchführung werden jeweils  $3 \times 10^5$  Makrophagen in Flusssäure aufgenommen und in einem Plasma bei 5000°C zerstäubt. Das Plasma wird durch einen hochfrequenten Strom im ionisierten Argon induziert. Die aus dem Plasma kommenden Ionen werden durch zwei Blenden (Sampler und Skimmer) in ein Vakuum-System überführt. Der Ionenstrahl wird mit Hilfe der Ionenoptik im Massenspektrometer in Ionen unterschiedlicher Masse selektiert und detektiert. Eine spezifische Eigenschaft der Elemente ist u.a. ihre Masse. Diese Eigenschaft kann man zum qualitativen als auch zum quantitativen Nachweis nutzen. Die Bestimmung von Isotopenverhältnis ist darüber hinaus möglich.

### 2.2.16. Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA gehört zur Gruppe der Immunoassay-Verfahren und ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion Proteine oder niedermolekulare Verbindungen nachweist. Durch die Umsetzung eines Substrats durch ein Enzym entsteht ein Reaktionsprodukt, das photometrisch detektiert werden kann. Charakteristisch für den Sandwich-ELISA sind zwei Primärantikörper, die an das nachzuweisende Protein binden. Um sich gegenseitig nicht zu behindern, erkennen beide Antikörper zwei verschiedene Epitope des Proteins und bilden einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, das so genannte Sandwich. In der vorliegenden Arbeit wurde eine 96-Well-Platte verwendet, die mit einem Primärantikörper beschichtet ist, dieser wird als coating-Antikörper beschrieben und bindet das nachzuweisende Protein an die Oberfläche der Mikrotiterplatte. Darauf folgt die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper (Detektionsantikörper), der in diesem Falle mit der Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Durch die Zugabe des Substrats schlägt das hier verwendete Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) seine Farbe um. Es entsteht ein lösliches, blaues Reaktionsprodukt, das, benutzt man zum Abstoppen der Reaktion Schwefelsäure, mit der Säure einen stabilen Komplex bildet. Die Absorption dieses gelben Farbkomplexes ist proportional zur der Menge des gebundenen Proteins und wird bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Fluostar OMEGA bestimmt. Die Vorgehensweise ist wie folgt: Zuerst wird mit dem mitgelieferten Proteinstandard bekannter Konzentration eine Verdünnungsreihe erstellt. Jede Verdünnung wird in Doppelbestimmung quantitativ erfasst. Von allen Werten werden die Messwerte subtrahiert, die man erhält, wenn man die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von  $\lambda=540$  nm oder 570 nm misst. Diese Subtraktion trägt dem optischen Fehler, der sich durch die Anwendung in der Mikrotiterplatte ergibt Rechnung. In jedes Well werden 200  $\mu$ l Zellkulturüberstand bzw. Standard gegeben. Die Wells werden mit einem Klebestreifen versiegelt und für 2 h inkubiert. Danach wird der Überstand abgesaugt und dreimal mit je 400  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen. Dann werden die Wells mit dem enzymgekoppelten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Damit die nicht gebundenen Antikörper wieder entfernt werden, wird dreimal mit jeweils 400  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Darauf erfolgt eine lichtgeschützte Inkubation mit der Substrat-Lösung für 20 min. Die optische Dichte sollte nun in den nächsten 30 min wie oben beschrieben bestimmt werden. Von den

Zellen denen man den Zellkulturüberstand abgenommen hat werden Proteinlysate erstellt und die Proteinkonzentration pro ml bestimmt, dies ergibt den Referenzwert. Der Gehalt des nachzuweisenden Proteins wird aus derselben Probe bestimmt. Dann wird ein Wert ermittelt, der das Verhältnis zwischen Referenzwert und dem Gehalt der Probe beschreibt und dieser Quotient kann man mit den Werten anderer Proben vergleichen. Für die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 wurden die Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISAs von R&D Systems verwendet.

### 2.2.17. Herstellung von Proteinlysaten aus nukleären und zytoplasmatischen Zellfraktionen

Um der unterschiedlichen Funktion von NF- $\kappa$ B und der entsprechenden Subformen in den unterschiedlichen Zellkompartimenten Rechnung zu tragen, wurden Proteinlysate aus Zytoplasma- und Kernfraktionen erstellt. Zur Isolation der nukleären und zytoplasmatischen Proben wurde das *Nuclear Extraction Kit* von Millipore benutzt. Dieses Kit ermöglicht eine zügige und reproduzierbare Trennung der nukleären von der zytoplasmatischen Fraktion. Die Zellen wurden dazu in 6-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Und entsprechend der Versuchsvorgabe mit den Vliesen und/oder TNF- $\alpha$  inkubiert. Adhärente Zellen werden zu Beginn mit PBS gewaschen, trypsinisiert und im doppelten Volumen PBS abgenommen und in 50 ml Falcons überführt. Suspensionszellen werden direkt in 50 ml Falcons gegeben. Die Zellsuspension wird bei 250 g für 5 min 4°C abzentrifugiert und noch einmal mit 40 ml PBS gewaschen und nochmals bei 250 g für 5 min 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Volumen des Zellpellets wird abgeschätzt und mit dem fünffachen Volumen an 1 x *Cytoplasmatic Lysis Buffer* (0,5 mM DTT und 1:1000 Protease-Inhibitorcocktail) aufgefüllt. Die Suspension wird vorsichtig invertiert und 15 min auf Eis gestellt und im Anschluss bei 250 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in doppeltem Volumen *Cytoplasmatic Lysis Buffer* aufgenommen. Die Zellen werden lysiert, indem sie min. 5 x durch eine Kanüle (Größe 27) gezogen werden. Falls die Zellen verklumpen wird das mitgelieferte Detergenz hinzugefügt. Das Zelllysat wird anschließend bei 8000 g für 20 min bei 4°C gefügt. Der Überstand enthält die zytoplasmatische Fraktion und wird in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Das verbleibende Zellpellet

wird in  $\frac{2}{3}$  des anfänglichen Pelletvolumens im *Nuclear Extraction Buffer* aufgenommen (0,5 mM DTT und 1:1000 Protease-Inhibitorcocktail) und wieder 5 x durch eine Kanüle gezogen. Die nukleäre Suspension wird dann für 60 min mit Hilfe des Orbitalshakers inkubiert. Zum Schluss wird die nukleäre Suspension bei 16000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die nukleäre Fraktion enthält in ein Reaktionsgefäß überführt, wahlweise kann nun die Proteinkonzentration bestimmt oder die Probe bei -80°C weggefroren werden.

### **2.2.18. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)**

Das Bradford-Reagenz kann genutzt werden um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu bestimmen.

Die Bindung des Farbstoffes Comassie-Brillant-Blau G-250 an kationische und unpolare Seitenketten von Proteinen führt zur Komplexbildung. In dessen Folge verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm und kann photometrisch bestimmt werden. Die absorbierte Menge ist proportional zur Proteinkonzentration. Außerdem ist die Stärke der Farbreaktion abhängig von der Art der Proteine, so dass eine Kalibrierung notwendig ist. In der vorliegenden Arbeit wird BSA als Standardprotein genutzt. Es wird jeweils 1µl Probe mit 999µl Bradford-Reagenz nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur gemessen.

### **2.2.19. Erstellen einer Standardkurve**

Zuerst wird mit einem Proteinstandard eine Verdünnungsreihe erstellt. Die so erhaltenen Werte werden durch eine Regressionsgerade verbunden und ergeben eine Standardkurve. Wie präzise verdünnt worden ist lässt sich anhand des r-Wertes bestimmen. Dieser sollte nicht unter 0,97 liegen. Der Wert 0 weist auf eine zufällige Verteilung der Daten hin, während der Wert 1 eine Präzisionsverteilung widerspiegelt.

### 2.2.20. Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode bei der die Proteine ihrer molekularen Masse nach im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Polyacrylamid eignet sich durch sein hohes Auflösungsvermögen gut für die Elektrophorese. Durch den Zusatz von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylenamid (TEMED) wird Polyacrylamid radikalisch polymerisiert und bildet ein dreidimensionales Netzwerk. Die Acrylamidkonzentration kann zwischen 2% und 30% liegen, damit kann man die Porengröße variieren, je nachdem, ob man kleine oder große Proteine trennen möchte. Die Proteinlysate werden zu Beginn in einem SDS-Puffer aufgenommen der  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält. Durch das  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken der Proteine reduziert, wodurch Proteinquartärstruktur zerstört wird. Bei 95°C werden die Proteine für 5 min erhitzt, was zu ihrer Denaturierung und Auflösung der Tertiär- und Sekundärstruktur führt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat überdeckt die Eigenladung der Proteine so, dass sich anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit um das linearisierte Protein bilden (1,4 g SDS pro g Protein). Diese wandern dann ihrer Ladung entsprechend zur Anode. Ursache hierfür ist der lineare Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der relativen Wanderungstrecke einer SDS-Polypeptid-Mizelle. Das System heißt diskontinuierlich, weil die Probe zwei unterschiedliche Gele mit verschiedener Ionenkonzentration abhängig vom pH-Wert passieren muss. Das kleinere Sammelgel (oben gelegen) dient dazu die Proben zu fokussieren, es enthält Chloridionen (Leitionen), die schneller als die Probe durch das Gel wandern und Glycinionen (Folgeionen), die weniger mobil sind. Dadurch werden die Proteine aufkonzentriert, was sich in einer scharfen Proteinbande äußert. Durch den höheren pH-Wert im Trenngel (unten gelegen) können die Glycinionen die Protein-SDS-Mizellen überholen. Außerdem besitzt das Trenngel eine höhere Salzkonzentration. Insgesamt führt dies dazu, dass die großen Proteine an der Gelgrenze zurückgehalten und ihrer Größe nach aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde das *Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System* der Firma BioRad benutzt.

An die diskontinuierliche SDS-PAGE wird für ca. 1 h eine Stromstärke von 20 mA/Gel angelegt.

Sammelgel		Trenngel				
		6%		8%	10%	12%
H <sub>2</sub> O	1,4 ml	H <sub>2</sub> O	5,3ml	4,7ml	4ml	3,3ml
30% Acrylamid	0,33 ml	30% Acrylamid	2ml	2,7ml	3,3ml	4ml
1M Tris pH 6.8	0,25 ml	1,5M Tris pH 8.8	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
10% SDS-Lsg.	0,02 ml	10% SDS-Lsg.	0,2ml	0,2ml	0,1ml	0,1ml
10% APS-Lsg.	0,02 ml	10% APS-Lsg.	0,2ml	0,2ml	0,1ml	0,1ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,02ml	0,02ml	0,008ml	0,008ml

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Proteingele

Trennbereiche von SDS-Gelen				
Acrylamidkonzentration (%)	6	8	10	12
Trennbereich (kDa)	50-200	30-95	20-80	12-60

Tabelle 8: Trennbereiche von SDS-Gelen

### 2.2.21. Western Blot

Beim Western Blot werden die der Größe nach aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Membran überführt, um anschließend mit einer Nachweisreaktion detektiert zu werden. Auf der Membranoberfläche sind die Proteine immobilisiert und für eine spezifische Antikörperreaktion leicht zugänglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wet-Blot (Towbin et al., 1979) Verfahren für den elektrophoretischen Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran genutzt. Das Wet-Blot-Verfahren wird hier bevorzugt, da der Proteintransfer schonend ist und die Proteine nur geringfügig erwärmt werden. Der Elektroblot wurde wie folgt aufgebaut: Auf das Kunststoffgitter der Gelkassette wurde ein Schwammtuch gelegt, darauf kamen mindestens zwei Whatman-Papiere. Auf die Whatman-Papiere wurde die Membran und auf die Membran das Gel platziert. Luftblasen wurden vorsichtig mit in Transferpuffer getränkten behandschuhten Fingern ausgestrichen. Mindestens zwei weitere Whatman-Papiere wurden vorsichtig auf das Gel verbracht, um dann mit einem weiteren Schwammtuch das ganze abzuschließen. Mit einer Plastikpipette, die man über das „Sandwich“ rollt werden die restlichen Luftblasen zwischen den Lagen entfernt, um einen störungsfreien Transfer der Proteine auf die Membran zu gewährleisten. Die Gelkassette wird geschlossen und so in die mit Transferpuffer gefüllte Apparatur geschoben, so dass die Membran zwischen

Gel und Anode liegt. Schwammtücher, Whatman-Papiere und Membran werden vorher mit Transferpuffer befeuchtet. Hierfür wurde die Mini Trans-Blot Cell Apparatur der Firma Bio Rad verwendet.

Die Apparatur wird gekühlt und das Polyacrylamidgel für 1,5 h bei 90 V oder  $\bar{u}N$  bei 30 V auf die Membran geblottet. Der erfolgreiche Transfer wurde im Anschluss durch eine Inkubation der Membran mit Ponceau-S-Solution (Salinovich und Montelaro, 1986) nachgewiesen. Dafür wird die Nitrocellulosemembran für 5-10 min in der Ponceau-S-Solution unter Schütteln angefärbt. Ponceau-S ist ein synthetischer Farbstoff der reversibel an positiv geladene Aminogruppen binden kann und nicht kovalent an unpolare Proteinregionen. Anschließend wird die Membran mit Aqua dest. mehrfach gewaschen und mit dem Geldokumentationssystem von Biometra fotografiert. Danach wird die Nitrocellulosemembran vollständig mit Aqua dest. entfärbt. Vor der Bindung des Erstantikörpers muss der Protein-Blot für min. 45min abgesättigt werden, um unspezifische Bindungen der Nachweisreaktionen zu verhindern. Das Blockierungsreagenz wurde immer passend zum Nachweissystem eingesetzt. Zum einen reagieren manche Primärantikörper mit Milchbestandteilen und zum anderen können schwach gebundene Proteine durch Trockenmilch abgelöst werden (Hoffman und Jump, 1989; Hoffman et al., 1991). Die Primär- und Sekundärantikörper wurden wie in den Tabellen 5, 6 und 9 beschrieben eingesetzt und mit dem entsprechenden Blocking-Reagenz verdünnt.

Primärantikörper	Blocking-Reagenz
PARP	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% Trockenmilch
$\alpha$ -Tubulin	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% Trockenmilch
NF- $\kappa$ B p50	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% Trockenmilch
NF- $\kappa$ B p65	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% Trockenmilch
NF- $\kappa$ B p100/p52	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% BSA
RelB	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% Trockenmilch
p- I $\kappa$ B- $\alpha$	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% Trockenmilch
Caspase 3	1 x TBS, 0,1% Tween 20 + 5% Trockenmilch

**Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und die entsprechenden Blocking-Reagenzien**

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Detektion der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper das Odyssey Infrared Imaging System von LI-COR verwendet. Dieses

System verfügt über zwei Laser, die bei einer Wellenlänge von 685 nm und 785 nm die Sekundärantikörper anregen. So kann man mit zwei unterschiedlichen Kanälen die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe auf einer Membran (im Overlay) darstellen und sogar zwei verschiedene Proteine mit geringem molekularen Größenunterschied auf einer Membran visualisieren. Anschließend war es mit der dazugehörigen Software möglich, die Signalstärke der Proteinbande zu bestimmen.

### 2.2.22. Strippen einer Membran

Um eine proteinbeladene Membran ein weiteres Mal mit Primär- und Sekundärantikörper zu inkubieren, muss man zuerst die Antikörper entfernen. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min gewaschen und für weitere 5 min in dem Stripping-Puffer vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde die Membran noch einmal für 5 min gewaschen und die Detektion der nachzuweisenden Proteine begann wieder mit der Inkubation im Blocking Puffer und wurde wie oben beschrieben fortgeführt.

### 2.2.23. Nachweis und Quantifizierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird durch verschiedene Liganden, wie z.B. TNF- $\alpha$  oder Il-1 aktiviert. Durch diese Aktivierung wird I $\kappa$ B, welches mit NF- $\kappa$ B im Zytoplasma einen Komplex bildet proteolytisch abgebaut, die nukleäre Lokalisationssequenz von NF- $\kappa$ B wird demaskiert und NF- $\kappa$ B transloziert in den Kern. In dessen Folge werden viele Targetgene, auch NF- $\kappa$ B selbst transkribiert. Als Konsequenz einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt es also u.a. zu dessen Transkription und zu einer Zunahme von NF- $\kappa$ B-Molekülen in der Zelle. Mit Hilfe der im NF- $\kappa$ B *Activation Kit* enthaltenen Antikörper kann man einerseits die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Kern mikroskopisch und andererseits die Zunahme der NF- $\kappa$ B-Moleküle insgesamt anhand der Erhöhung der Fluoreszenz mit Hilfe eines Plattenlesegeräts nachweisen. Mit Hilfe dieses Assays wurde die optimale Konzentration und Inkubationszeit von TNF- $\alpha$  für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bestimmt. Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurden HeLa-Zellen zu  $5 \times 10^4$  Zellen/Well in 6-Well-Platten ausplattiert und für 24 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Silika-Vliese in  $1 \text{ cm}^2$  große Quadrate geschnitten und in die entsprechenden Zell-Culture-Inserts gelegt. Dann wurden die

Zellen damit für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten behandelt. Es wurden jeweils vier Proben vorbereitet. Als Negativkontrolle wurden Zellen weder mit TNF- $\alpha$  noch mit den Vliesen kultiviert. Als Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen nur mit TNF- $\alpha$  inkubiert und als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen nur mit den Kieselgel-Wundaufgaben inkubiert. Die eigentliche Probe waren Zellen, die mit TNF- $\alpha$  und den Vliesen inkubiert wurden. Für die Auswertung des Versuchs wurden (wenn nötig) die Einsätze mit den Vliesen entfernt, das Medium abgenommen und in jedes Well wird 1,5 ml vorgewärmte Fixierlösung gegeben. Nach 10 min wurde die Lösung abpipettiert und die Zellen mit 1,5 ml Waschpuffer gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss für weitere 10 min mit Permeabilisierungspuffer inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe. Daraufhin wurden die Zellen für eine Stunde mit dem Primärantikörper (800  $\mu$ l/Well) in einer Verdünnung von 1:250 behandelt. Anschließend wurden die Zellen in den Wells mit dem Waschpuffer II für 15 min gewaschen. Der Waschpuffer II wurde abgenommen und die Zellen nochmals zweimal in dem Waschpuffer I vorsichtig geschwenkt. Nun wurden die HeLa-Zellen mit 800  $\mu$ l/Well der Staining Solution für eine Stunde lichtgeschützt behandelt. In der Staining Solution waren der Sekundärantikörper (1:500) und der Kernfarbstoff (Hoechst Dye, 1:2000) enthalten. Die Lösung wurde abgenommen und durch den Waschpuffer II für 10 min ersetzt. Die Zellen wurden ein letztes Mal mit 1,5 ml/Well Waschpuffer I gewaschen. Der Puffer wurde abpipettiert und durch 800  $\mu$ l Waschpuffer I ersetzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Tecan Tecan Safire<sup>2</sup><sup>TM</sup>. Die Exzitationswellenlänge beträgt 493 nm und die emittierte Wellenlänge wurde bei 518 nm gemessen. Für die Auswertung mit dem Mikroskop wurden vor Versuchsbeginn die entsprechenden Deckgläschen in die 6-Wells verbracht, die dann nach dem letzten Waschriff vorsichtig entnommen und auf Objektträger mit Eukitt eingedeckelt wurden.

#### 2.2.24. Reporteragen-Assay zum Nachweis der Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Mit einem Reporteragen-Assay wurde die Aktivierung eines bestimmten Gens nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die stabil mit einem Reporteragenkonstrukt transfizierte A549 Zelllinie (humane Lungenkarzinomzelllinie) verwendet. Das Reporteragenkonstrukt besteht *upstream* aus einem DNA-Bindemotiv für den

Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und einem nachgeschalteten Reporterogen. In diesem Fall ist das Reporterogen die embryonale sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP). Dieses Reporterogen ist besonders vorteilhaft. Es hat einen großen linearen Bereich und die Phosphatase wird von den Zellen sezerniert. So kann die Phosphatase bequem im Überstand gemessen werden und die Zellen waren danach noch für weitere Versuche zu benutzen. Wird nun NF- $\kappa$ B durch die Inkubation mit TNF- $\alpha$  aktiviert und transloziert in den Kern, bindet NF- $\kappa$ B an die Konsensussequenz des responsiven Elements und die Transkription des dahinter liegenden Reportergens wird aktiviert. Somit steht die Expression des Reportergens unter der Kontrolle des NF- $\kappa$ B responsiven Elements und korreliert mit der NF- $\kappa$ B abhängigen Aktivierung. Diese Aktivierung kann durch Messung der SEAP-Aktivität im Zellkulturüberstand durch Dephosphorylierung des Substrats CSPD® (Chemilumineszenzsubstrat) gemessen werden. Für die Durchführung dieses Versuchs wurde der Princess®NINA Instant NF- $\kappa$ B Assay benutzt. Zu Beginn wurden die Testplatten bei 37°C für 30 min aufgetaut. Wenn die Zellen vollständig aufgetaut waren wurde 75  $\mu$ l 37°C warmes Medium in die Wells gegeben. Um die Zellen gleichmäßig in den Wells zu verteilen, wurde die 96-Well-Platte für 20 sec bei 1000 rpm geschüttelt. Dann wurde die Platte für 15 h im Zellkulturschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert, um die Zellen zu revitalisieren. Die Vliese wurden in gleich große Stücke geschnitten und dann in die Einsätze der 96-Well-Platten präpariert. Dann wurde die gewünschte Anzahl der A549-SEAP-transfizierten Zellen mit den Vliesen für 8 h inkubiert und in jedes Well wurde 125  $\mu$ l Medium pipettiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Expression der NF- $\kappa$ B-abhängigen Zielgene durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  (Endkonzentration: 7,5 ng/ml) induziert. Als eine Negativkontrolle wurden einige Wells 30 min vor der Zugabe von TNF- $\alpha$  mit Sulfasalazin in einer Endkonzentration von 5 mM behandelt. Sulfasalazin inhibiert die Translokation von NF- $\kappa$ B, indem es die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B $\alpha$  verhindert (Wahl et al., 1998). In seiner inaktiven Form liegt NF- $\kappa$ B in einem zytoplasmatischen Komplex gebunden an I $\kappa$ B vor. Kommt es zu einer Aktivierung wird I $\kappa$ B phosphoryliert, ubiquitiniert und anschließend vom Proteasom degradiert, in dessen Folge wird NF- $\kappa$ B frei und transloziert in den Kern. Mit dieser Kontrolle wurde die endogene Aktivierung von NF- $\kappa$ B untersucht. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden den entsprechenden Wells 50  $\mu$ l Medium entnommen und der SEAP-Assay mit chemilumineszentem Substrat durchgeführt.

### 2.2.25. SEAP-Assay mit chemilumineszentem Substrat (CSPD®)

Jedem zu untersuchendem Well wurden 50 µl Zellkulturüberstand abgenommen und in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. In jedes dieser Wells wurde nun 50 µl Inaktivierungspuffer gegeben und für 5 min inkubiert. Um eine Verfälschung des Ergebnisses zu verhindern, wurden die endogenen Phosphatasen chemisch mit diesem Puffer inaktiviert. Das CSPD®-Substrat wurde in dem Substratpuffer (1:20) verdünnt. In jedes Well wurden 50 µl der CSPD®-Substrat-Lösung gegeben und für 20 min inkubiert. Durch die alkalische Phosphatase wird das CSPD®-Substrat enzymatisch dephosphoryliert, dadurch wird es zu einem metastabilen Phenolatanion, das zerfällt und dabei Licht mit einer Wellenlänge von 477 nm emittiert. Die Auswertung der Chemilumineszenz erfolgte mit dem Plattenluminometer von Fluostar OPTIMA.

### 2.2.26. Bestimmung der Zellvitalität mit Resazurin (Zytotoxizitätstest)

Nachdem der Zellkulturüberstand für den SEAP-Assay entnommen wurde, wurde in jedes zu untersuchende Well 25 µl der auf 37°C vorgewärmten Resazurinlösung gegeben. Die Testplatte wurde dann für mindestens 4 h im Zellkulturschrank inkubiert bis ein deutlicher Farbumschlag von blau nach pink zu erkennen war. Das in der Lösung befindliche Resazurin wird irreversibel und abhängig von der metabolischen Aktivität der Zellen zum fluoreszierenden Resofurin reduziert. Die Extinktion erfolgt bei 560 nm und die Emission wird bei 590 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte hier mit dem Tecan Tecan Safire<sup>2</sup>™.

### 2.2.27. Relative Quantifizierung der Aktivierung von NF-κB

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, die das zahlenmäßige Verhältnis zwischen der Aktivierung von NF-κB, messbar durch die Expression des Reportergens (und dem damit verbundenen Abbau des Phenolatanions und dem dabei emittierten Licht) und der Vitalität der Zellen, die mit der Umsetzung von Resazurin zu Resofurin korreliert, bestimmt. Damit wurde ein Wert ermittelt, der das Verhältnis zwischen der Expression von NF-κB und der Vitalität der

Zellen beschreibt und dieser Quotient konnte dann mit den Werten aus den anderen Proben verglichen und statistisch ausgewertet werden.

### 2.2.28. Transkriptionsfaktorassay

Dieser Assay kombiniert das Prinzip eines *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) mit einem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), dadurch wird die Sensitivität im Vergleich mit einem herkömmlichen EMSA erhöht. Grundlage ist eine biotinylierte doppelsträngige *Capture Probe*, die den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B „einfängt“. Dieses biotinylierte Oligonukleotid wurde zusammen mit der nukleären Zellfraktion in den mit Streptavidin beschichteten Wells inkubiert. Streptavidin bindet mit einer sehr hohen Affinität Biotin, so dass der Komplex aus dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und der *Capture Probe* auf der mit Streptavidin beschichteten 96-Well-Platte immobilisiert wird. Anschließend wird ungebundenes Material durch einzelne Waschriffe entfernt. Gebundenes NF- $\kappa$ B wird mit einem spezifischen Antikörper markiert und mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. Als Substrat dient Wasserstoffperoxid, das die fast farblose Peroxidase zu einem farbigen Endprodukt oxidiert. Die Intensität der Chemilumineszenzsignale kann im Anschluss mit dem Fluostar OPTIMA bestimmt werden. Die Versuchsdurchführung war wie folgt beschrieben. In die Wells wurde als erstes der *1 x Enhanced Transcription Factor Assay Buffer (ETFA-Buffer)* gefüllt, das Volumen wurde einem Endvolumen von 50  $\mu$ l angepasst und war dementsprechend zwischen 45-48  $\mu$ l groß. In jede Probe sowie Positivkontrolle (min. in Doppelbestimmung) wurden 2  $\mu$ l *Capture Probe* pipettiert. In jedes zu benutzende Well wurde 2,5  $\mu$ g nukleärer Zellextrakt gegeben. Die Wells wurden mit einem Deckel bedeckt und dann für 2h bei RT inkubiert. Die benutzten Wells wurden dreimal mit jeweils 150  $\mu$ l *1 x ETFA Buffer*, wobei der Erste 30 sec, der Zweite 1 min und der dritte Waschriff 3 min dauern sollte. Nun folgte die Primärantikörperinkubation und zwar wurde der Antikörper (1:1000) so verdünnt, dass 100  $\mu$ l in jedes Testwell gegeben werden konnte und dies wurde für eine Stunde bei RT gelagert. Die Proben wurden wieder mit jeweils 150  $\mu$ l *1 x ETFA Buffer* gewaschen, wobei der erste 30 sec, der zweite 1 min und der dritte Waschriff 3 min dauerte. Der IgG-HRP konjugierte Sekundärantikörper wurde mit dem *1 x ETFA Buffer* so 1:500 verdünnt, dass 100  $\mu$ l der Antikörperlösung in jedes Testwell gegeben

und für 30 min inkubiert wurde. Daraufhin wurden die Proben viermal mit jeweils 250 µl 1 x *Transcription Factor Assay Buffer* gewaschen. (1. Waschschrift: 30 sec, 2. Waschschrift: 2 min, 3. Waschschrift: 3 min, 4. Waschschrift: 4 min). Anschließend wurde das Chemilumineszenz-Detektions-Reagenz mit dem Chemilumineszenz-Reaktions-Puffer (1:2) verdünnt und davon wurden jeweils 100 µl auf jede Probe gegeben. Der Nachweis der Lumineszenz erfolgte mit einem handelsüblichen Mikroplattenreader.

### 2.2.29. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine von Kary Mullis (Saeki et al., 1985) entwickeltes Verfahren zur *in vitro* Amplifikation von DNA. Für diese Methode benötigt man eine Ausgangs-DNA, die „*Template*“ genannt wird, vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase wie z.B. die Taq-Polymerase. Sie stammt aus dem thermophilen gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus* und wird nicht durch hohe Denaturierungstemperaturen zerstört. Sie besitzt allerdings keine *proof-reading*-Aktivität und ist deswegen fehleranfällig. Weiteres Merkmal der Taq-Polymerase ist, dass sie am 3`-Ende des synthetisierten Stranges ein dATP anhängt. Des Weiteren benötigt man zwei zu dem gewünschten Genfragment komplementäre Oligonukleotide. Die Primer grenzen den zu amplifizierenden Bereich nach außen ab und sollten zwischen 18 und 30 Nukleotide umfassen, damit sind sie in der Regel sequenzspezifisch. Dem Reaktionsgemisch werden dNTPs beigefügt, so dass die Taq die enzymatische Bindung der entsprechenden Nukleotide an das freie 3`-OH des Primers katalysieren kann. Das dNTP-Gemisch besteht aus dATP, dCTP, dGTP sowie dTTP mit einer jeweiligen Konzentration von 2,5 mM. Außerdem benötigt die Taq-Polymerase für ihre Funktion Mg<sup>2+</sup>-Ionen, diese werden dem Reaktionsgemisch durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub> beigefügt. Der Reaktionsansatz wird entsprechend gepuffert. Die PCR ist ein zyklischer Prozess, der aus drei Schritten besteht und in der Regel 25-45 Mal wiederholt wird. Im Falle der Mycoplasmen-PCR war eine Zyklenanzahl von 34 ausreichend. Vor Beginn der Zyklen wurde die Probe bei 95°C für 3 min initial denaturiert, damit die Wasserstoffbrücken aufbrechen und die DNA einzelsträngig wurde. Der erste Schritt des Zyklus beginnt mit der Denaturierung bei 95°C für 1 min. Der zweite Schritt wird als *Annealing* bezeichnet. In dieser Phase sollen die Primer hybridisieren. Die *Annealing*

Temperatur wird durch den GC-Gehalt der Primer bestimmt und lässt sich mit der folgenden Formel berechnen:

$$T_M = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [J+]) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (675/n) - 1,0 (\% \text{ Fehlpaarungen}) - 0,63 (\% \text{ FA})$$

J: Konzentration monovalenter Kationen in mol/l; %G+C: Anteil der Basen Guanin und Cytosin in Prozent; n: Anzahl der Basen im Oligonukleotid; % Fehlpaarungen: Anteil der fehlgepaarten Basen in Prozent; % FA: Anteil des Formids im Puffer in Prozent (entfällt normalerweise bei der PCR).

Die Formel gilt für Primer, die bis 20bp lang sind. Sind diese Primer länger kann der  $T_M$ -Wert mit folgender Formel (Baldino et al., 1989) berechnet werden.

$$T_M = 4 \cdot (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2 (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

Die Schmelztemperatur ist die Temperatur bei der 50% der Primer nicht mehr an das Template binden, also einzelsträngig sind. Demnach wird die Annealingtemperatur so gewählt, dass sie ca. 5% unter der berechneten Schmelztemperatur liegt (Rychlik et al., 1990). Für die Mycoplasmen-PCR wurde eine Annealingtemperatur von 57°C ermittelt. Der dritte Schritt der PCR wird als Elongation bezeichnet. In diesem Schritt synthetisiert die Taq-Polymerase an das freie 3'-OH des Primers den zur *Template*-DNA komplementären Strang. Die Elongationszeit wird entsprechend der Größe des zu erwartenden Produkts gewählt. Es gilt der Richtwert 0,5-1 min/kb. Entsprechend des Temperaturoptimums der Polymerase wird eine Temperatur von 72°C vorgegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Elongationszeit von 1 min gewählt. Die PCR schließt mit einem finalen Elongationsschritt von 3 min zur Vervollständigung der Amplifikate ab.

Pipettierschema der Mycoplasmen-PCR	
2,5µl	10 x Dream-Taq Puffer
0,5µl	10mM dNTP Mix
5pmol	Forward Primer
5pmol	Reverse Primer
0,3µl	Dream-Tay DNA-Polymerase
2µl	Zellkultur-Überstand
→ Überstand wird zuvor 5 min bei 95°C erhitzt ad 25µl mit d H <sub>2</sub> O	
(als Positivkontrolle wird der Überstand einer kontaminierten Zelllinie benutzt)	

Tabelle 10: PCR-Pipettierschema

Verwendetes PCR Programm	
Initiale Denaturierung	95°C 3min
Denaturierung	95°C 1min
Annealing	57°C 1min
Elongation	72°C 1min
Finale Elongation	72°C 3min
Kühlung nach Beendigung des Programms	4°C ∞

Tabelle 11: PCR-Programm



34 Zyklen

### 2.2.30. Herstellung der Kieselgel-Wundauflage

Die Silika-Vliese bestehen aus einem Polyhydroxykieselsäureethylester und wurden beim Europäischen Patentamt zum Patent angemeldet und sind CE-zertifiziert.

Die Herstellung durch einen Kooperationspartner erfolgte wie nachfolgend beschrieben und entstammt einer Patentmitschrift:

Als Ausgangsstoff wird Tetraethoxysilan (TEOS, 1124,98g) verwendet. Dieser wird mit Ethanol (EtOH, 313,60g) in einem Kessel 18 h gerührt, nachdem Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>, 55,62g) in Wasser gelöst (H<sub>2</sub>O, 120,76g) hinzugefügt wurde.

Das Reaktionsgemisch wird anschließend bei 62°C unter Zufuhr eines Schleppstroms gerührt (60 U/min) und bis zu einer dynamische Viskosität von 1 Pa · s eingedampft (Scherrate 10 s<sup>-1</sup> bei 4°C).

Darauf folgt ein Reifungsschritt bei dem das Gemisch in einem geschlossenen Polypolypropylen-Reifebecher ruhend bei 4°C bis zu einer dynamischen Viskosität von 55 PA

und einem Verlustfaktor von 3 heranreift. Die kolloidale Suspension wird in einer Spinnanlage zu einer Faser versponnen. Dafür wird die Suspension bei -15°C in einen Druckzylinder überführt und durch die Düsen gepresst. Die Fasern fallen dann durch einen 2m langen Spinnchacht. Im Spinnchacht beträgt die Temperatur 25 °C und die Luftfeuchtigkeit liegt bei 19%. Beim Auftreffen der zylindrischen Fasern auf den Changiertisch verkleben die Fäden an den Berührungspunkten miteinander und ergeben so ein Vlies, welches bei gleichen Bedingungen (25°C und 19% Luftfeuchte) für 35 min konditioniert wird.

Es wurden vier verschiedene Silika-Vliese Typ I, Typ II, Typ III und Typ VI mit einem Durchmesser von ca. 50 µm hergestellt, diese unterscheiden sich in ihrer Masse und dadurch, dass die Vliese nach dem Konditionierungsschritt vor dem Verpacken unterschiedlich lange einer luftfeuchten Umgebung von 35% bis 55% bei 25°C ausgesetzt werden. Um zu verhindern, dass das Vlies feucht wird, werden die Kieselgel-Wundauflagen abschließend mit einem Absorptionsmittel verpackt.

Die unterschiedlichen Abluftzeiten vor dem Verpacken der Vliese haben zur Folge, dass sich die Wundauflagen hinsichtlich Ihrer Kompressibilität und des Ethoxygehaltes unterscheiden.

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV
Lagerung vor der Verpackung	1-10 min	Ca. 2 h	Ca. 6 h	Ca. 24 h

Tabelle 12: Unterschiedliche Lagerzeiten der Silika-Vliese

	Masse	Dicke der Wundauflage	Kompressibilität	Ethoxy-Gruppen-Gehalt
<b>Typ I</b>	420 mg	1,7 mm	21%	26,1%
<b>Typ II</b>	390 mg	1,7 mm	16%	17,3%
<b>Typ III</b>	380 mg	1,7 mm	15%	12,7%
<b>Typ IV</b>	365 mg	1,7 mm	13%	6,6%

Tabelle 13: Die verschiedenen Typen der Silika-Vliese

### 2.2.31. Densitometrische Analyse mit *ImageJ*

Das lizenzfreie Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ*, das ursprünglich vom *National Institutes of Health* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) konzipiert wurde, eignet sich besonders für die medizinische und wissenschaftliche Bildanalyse. Es funktioniert mit jedem Computer auf dem Java 1.4 installiert ist und kann viele Bildformate (z.B. TIFF, GIF, JPEG) analysieren. Von den zu untersuchenden Mikroskopaufnahmen wurden Schwarz-Weiß-Bilder angefertigt, diese wurden mit der Flächen- und Pixel-Wert-Statistik dieses Programms ausgewertet. Und zwar wird hier jedem Pixel abhängig von der Graustufe ein Intensitätswert zugeordnet. Aus denen sich daraus ergebenden Intensitätswerten eines Bildes wird ein Mittelwert gebildet, der mit den Mittelwerten anderer Aufnahmen verglichen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Version *ImageJ 1.4* benutzt.

### 2.2.32. Statistische Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, die das zahlenmäßige Verhältnis einer unbehandelten Kontrolle zu der Probe (z.B. Zellen, die mit den Silika-Vliesen inkubiert worden sind) bestimmt. So wurde die relative Änderung der Genexpression zu dieser Referenz ermittelt. Zur Prüfung der Signifikanz verbundener Stichproben wurde der Student-t-Test herangezogen (Student, 1908). Dieser Test überprüft, ob sich zwei Datenkollektive in einem Merkmal signifikant unterscheiden. Die Nullhypothese besagt, dass es zwischen beiden Datenkollektiven keinen Unterschied gibt. Der t-Test vergleicht jeden Wert der einen Gruppe mit jedem Wert der anderen Gruppe. Die Signifikanz wird mittels des Quantils der zu überprüfenden Unwahrscheinlichkeit bestimmt. Das Quantil wird allgemein mit einem Wert von  $p = 0,05$  angegeben. Dies bedeutet eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Alle Werte, die unter  $p = 0,05$  liegen gelten als signifikant, alle Werte unter  $p = 0,01$  gelten als hoch signifikant. Alle Werte über 0,05 bedeuten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Datenkollektiven bzw. Expressionswerten und bestätigen die Nullhypothese. Die optische Darstellung erfolgte anhand von Säulen- und Liniendiagrammen.

### 3. Ergebnisse

Eine Wundauflage soll die Wunde vor Keimen aus der Umwelt schützen und wenn möglich den Wundheilungsprozess unterstützen. Die moderne Wundbehandlung favorisiert die feuchte Wundbehandlung, die aber in der Behandlung chronischer Wunden keinen besonderen Vorteil im Vergleich mit herkömmlichen Verbandsmaterialien hat. In dieser Arbeit soll nun eine völlig neuartige bioresorbierbare, Siliziumoxid-basierte Wundauflage auf ihre Wirkung auf verschiedene Wundheilungsparameter untersucht werden.

#### 3.1. Analyse der Kieselgel-Wundauflagen auf ihre Zytotoxizität

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Kieselgel-Wundauflagen eine schädliche Wirkung auf verschiedene sich in der Haut befindende Zelltypen haben.

##### 3.1.1. Der Einfluss der *Cell Culture Inserts* auf die Zytotoxizität der Kieselgel-Wundauflagen

Für diesen Versuch wurden die Zellkerne der Fibroblasten mit Bisbenzimid (blau) angefärbt und nekrotische Zellen mit einer Propidiumiodidfärbung (PI, rot) visualisiert. Derselbe Mikroskopausschnitt wurde fotografiert und nebeneinander angeordnet.

Mit *Cell Culture Inserts*

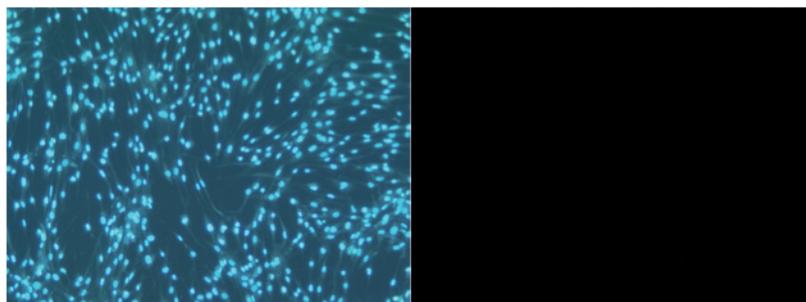


Abbildung 4: Bisbenzimid-Färbung (links), PI-Färbung nekrotischer Zellen (rechts)

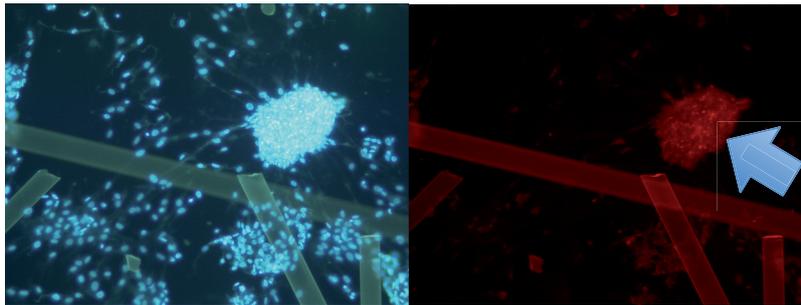
Ohne *Cell Culture Inserts*

Abbildung 5: Bisbenzimid-Färbung (links), PI-Färbung (rechts),  
Pfeil: gebildetes Zellcluster, nekrotischer Zellen

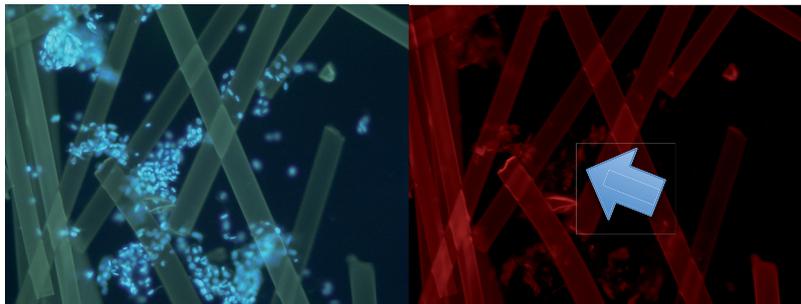


Abbildung 6: Bisbenzimid-Färbung (links), PI-Färbung (rechts)  
Pfeil: nekrotische Zellen

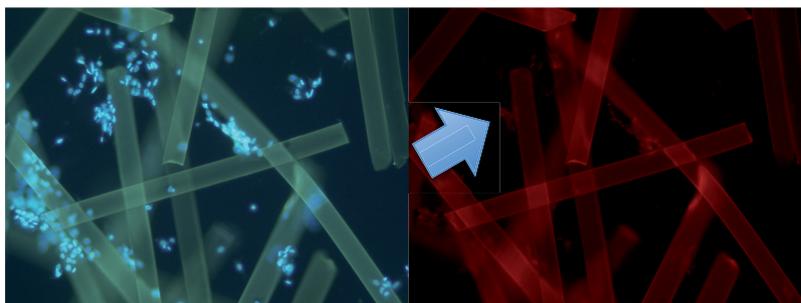


Abbildung 7: Bisbenzimid-Färbung (links), PI-Färbung (rechts)  
Pfeil: nekrotische Zellen

In der Abbildung 4 kann man gut erkennen, dass Fibroblasten, die mit der Kieselgel-Wundauflage in *Cell Culture Inserts* inkubiert werden einen gleichmäßig verteilten Zell-Monolayer ausbilden. Wohingegen die Zellen, die ohne *Cell Culture Inserts* mit den Vliesen inkubiert wurden, zwischen den Silika-Fasern Cluster bilden (Abb. 5-7, Pfeil). Die Bisbenzimid-Färbung (links) zeigte auf, dass weder die Zellen, die mit den Vliesen allein, noch die Zellen, die mit den Vliesen in *Cell Culture Inserts* inkubiert wurden, apoptotisch sind. Die Zellkerne erschienen rund und unfragmentiert. Im Gegensatz dazu stellte man unter zur Hilfenahme der Propidiumiodid-Färbung fest, dass viele Fibroblasten, die ohne *Inserts* mit den Silika-Präparaten inkubiert wurden

nekrotisch waren. Im direkten Vergleich kann man in Abbildung 4 keine nekrotische Zelle beobachten.

### 3.1.2. Vergleich verschiedener Zytotoxizitätstests und die Relevanz von *Cell Culture Inserts*

Jeder Assay wurde mit je drei Pools humaner Fibroblasten durchgeführt. Die Pools wurden aus jeweils 10 Patienten erstellt.

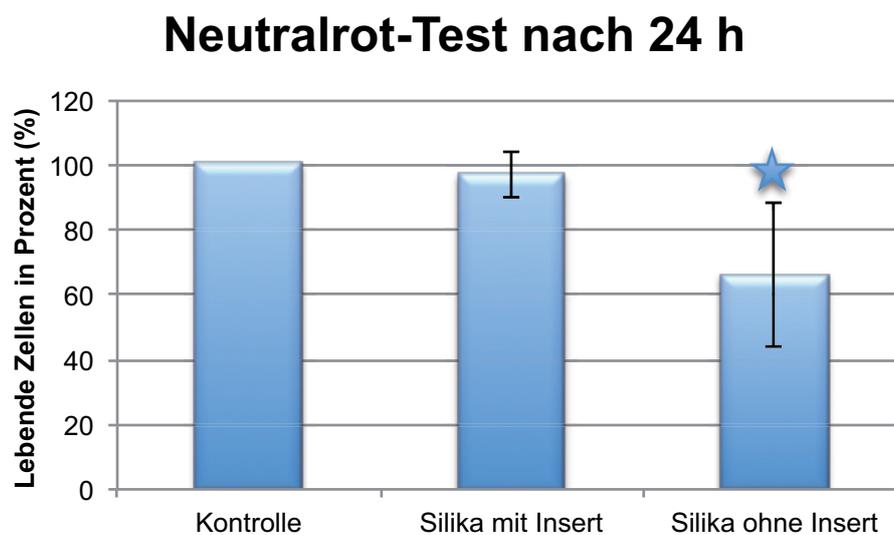


Abbildung 8: Neutralrot-Assay mit Fibroblasten nach 24 h Inkubation, ★ :signifikant

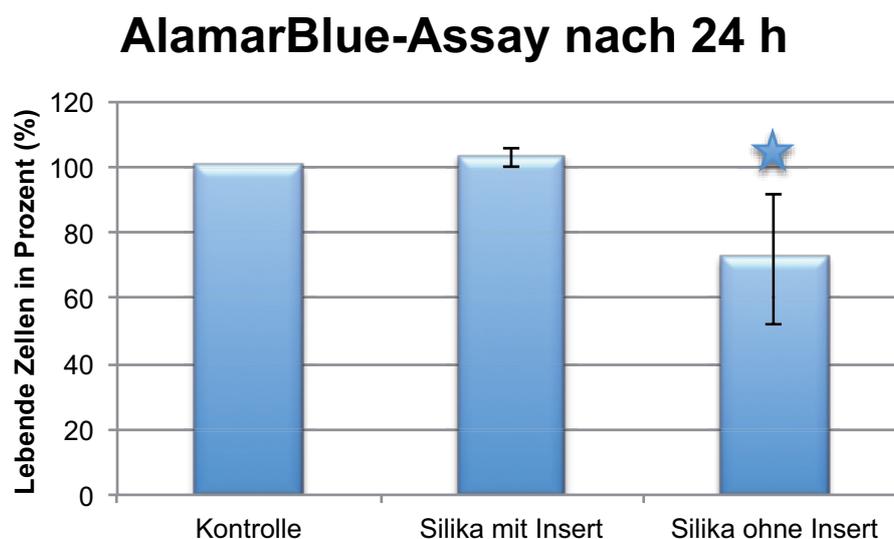


Abbildung 9: AlamarBlue-Assay mit Fibroblasten nach 24 h Inkubation, ★ :signifikant

Wurden die Fibroblasten ohne *Cell Culture Inserts* mit den Kieselgel-Wundauflagen inkubiert, konnte man eine signifikante Abnahme der Lebendzellzahl beobachten (Abb. 8+9). Da beide Assays im Vergleich ähnliche Resultate lieferten, wurden alle folgenden Experimente mit der AlamarBlue-Methode durchgeführt, da dieser Assay die kontinuierlicheren Daten lieferte. Die Ergebnisse der Analysen aus 3.1.1. und 3.1.2 hatten zur Folge, dass für alle weiteren Versuche *Cell Culture Inserts* benutzt wurden.

### 3.1.3. Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der Kieselgel-Wundauflagen über eine Zeitspanne von 96 h

Die Zellzahl und mögliche zytotoxische Effekte der Kieselgel-Wundauflagen wurden nach 24 h, 48 h und 96 h untersucht.

Nachfolgendes Experiment wurde mit aus der humanen Dermis isolierten Fibroblasten durchgeführt. Zehn Patientenproben wurden dafür zusammengeführt und bildeten jeweils die Grundlage für je ein Experiment.

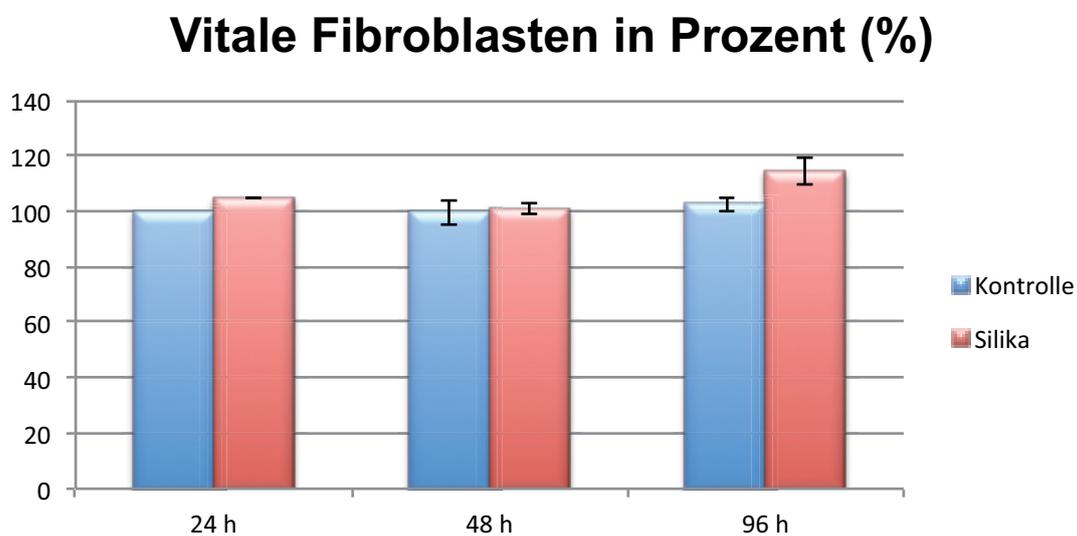


Abbildung 10: Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Fibroblasten; n=5

Die Versuchsdurchführung wurde mit humanen Keratinozyten, die aus jeweils zehn Hautresektaten (Epidermis) stammten, durchgeführt.

## Vitale Keratinozyten in Prozent (%)

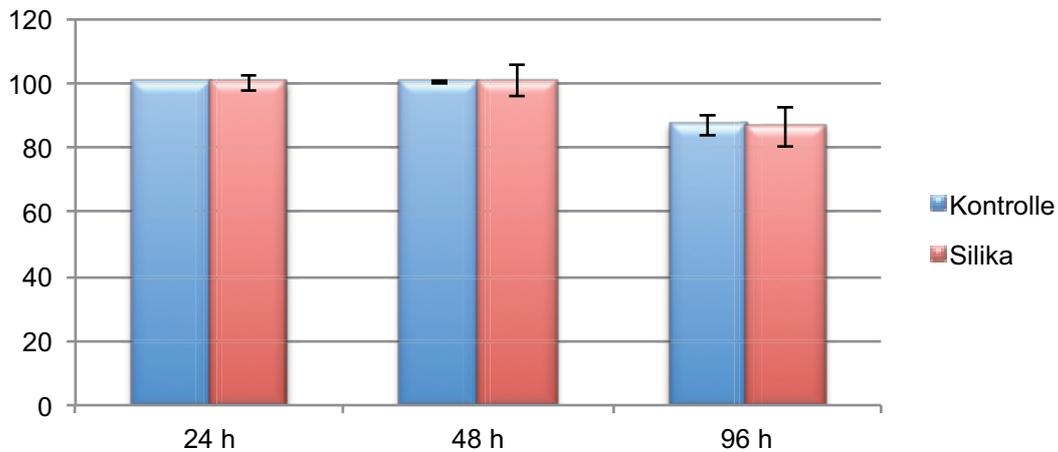


Abbildung 11: Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Keratinozyten; n=3

Für die Versuchsdurchführung mit Endothelzellen wurde die humane HUVEC-Zelllinie benutzt.

## Vitale Endothelzellen in Prozent (%)

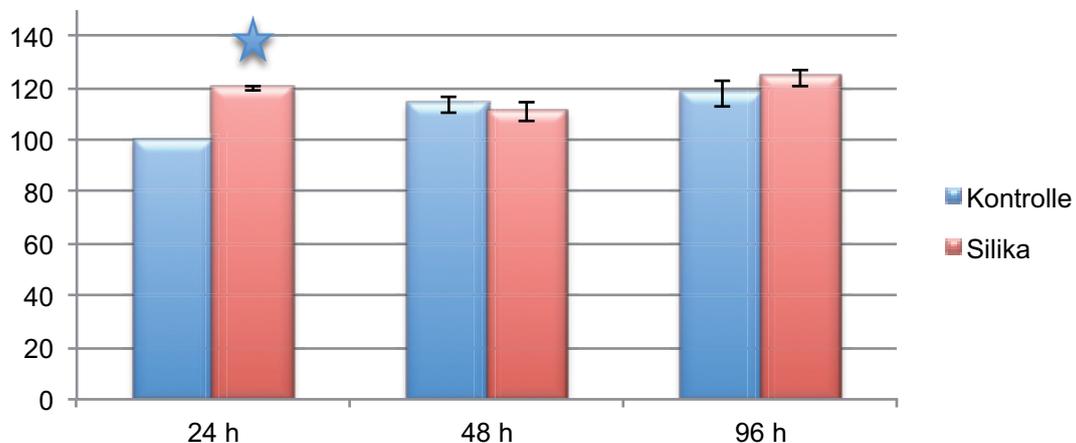


Abbildung 12: Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Endothelzellen; n=3, ★ :signifikant

Die Silika-Vliese hatten keinen signifikanten Effekt auf die Zellzahl und Vitalität von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen.

Das nachfolgende Experiment wurde mit der murinen RAW-Zelllinie durchgeführt.

## Vitale Makrophagen in Prozent (%)

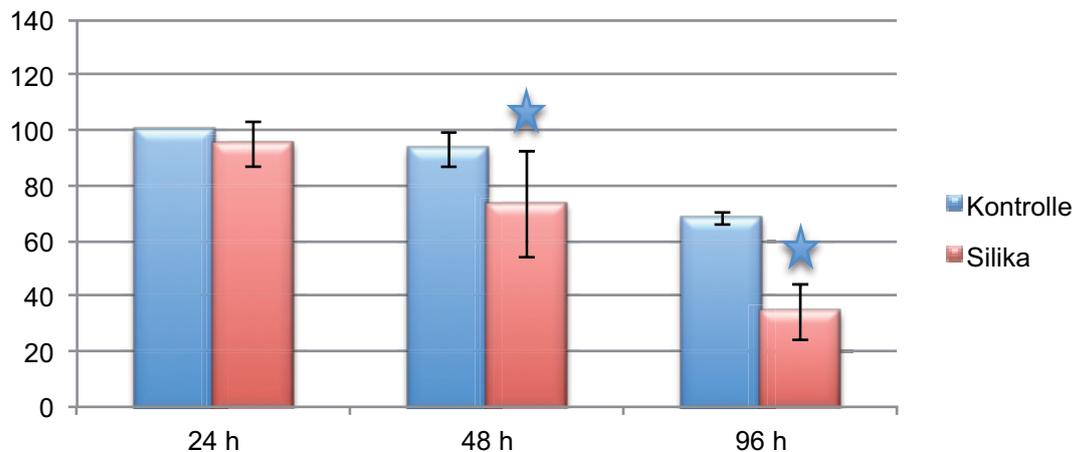


Abbildung 13: Zeigt den Einfluss der Silika-Vliese auf die Lebendzellzahl von Makrophagen; n=5,  
 ★ :signifikant

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Zelltypen verhält sich die RAW-Zelllinie. Nach 48 h und 96 h konnte man einen signifikanten Rückgang an vitalen RAW-Zellen beobachten (Abb. 13). Wobei zu beachten war, dass die Anzahl der Kontrollzellen abnahm, die Verringerung ist aber nicht signifikant. Mögliche Ursachen wurden in weiteren Experimenten untersucht.

### 3.1.4. Untersuchung des Einflusses der Kieselgel-Wundaufgaben auf die Morphologie von Makrophagen

Murine RAW-Zellen wurden mit den Silika-Präparaten inkubiert und nach verschiedenen Zeitspannen wurde die Morphologie der Zellen mikroskopisch begutachtet. Es sollte ein Hinweis darauf gefunden werden, warum die Lebendzellzahl der Makrophagen bei einer Kultivierung mit den Vliesen abnahm.

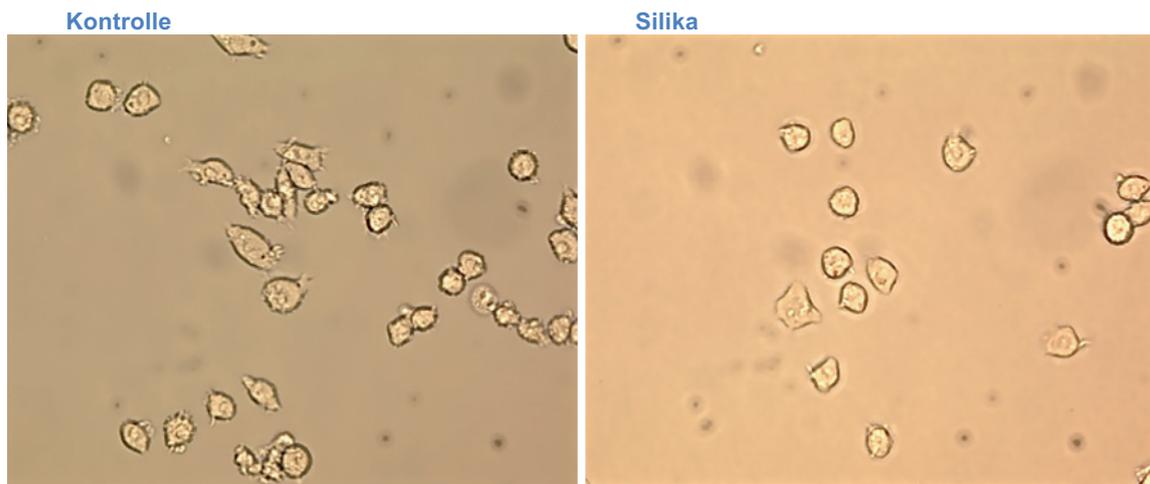


Abbildung 14: 24 h Inkubation der RAW-Zellen mit Silika-Vliesen; n=5

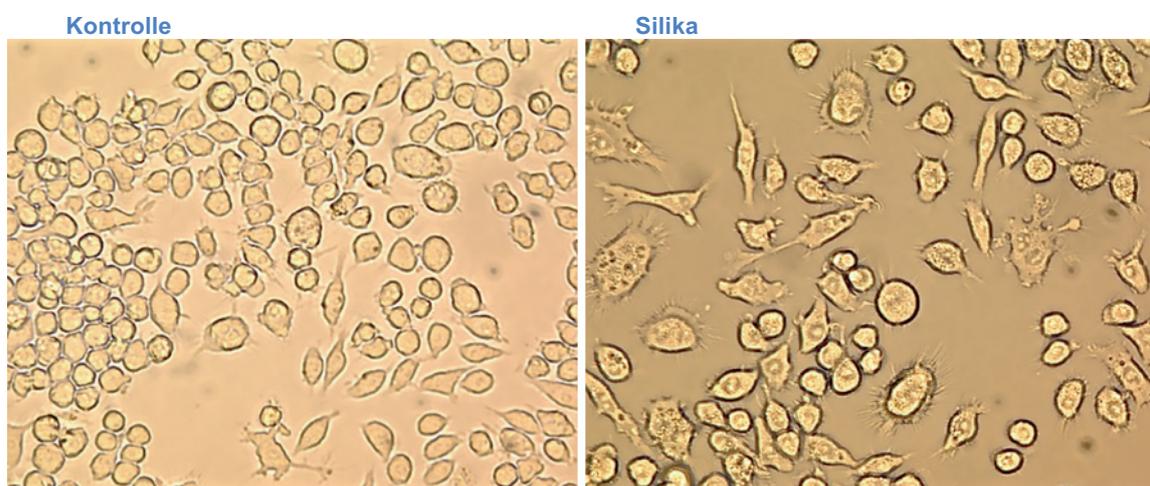


Abbildung 15: 48h Inkubation der RAW-Zellen mit Silika-Vliesen; n=5

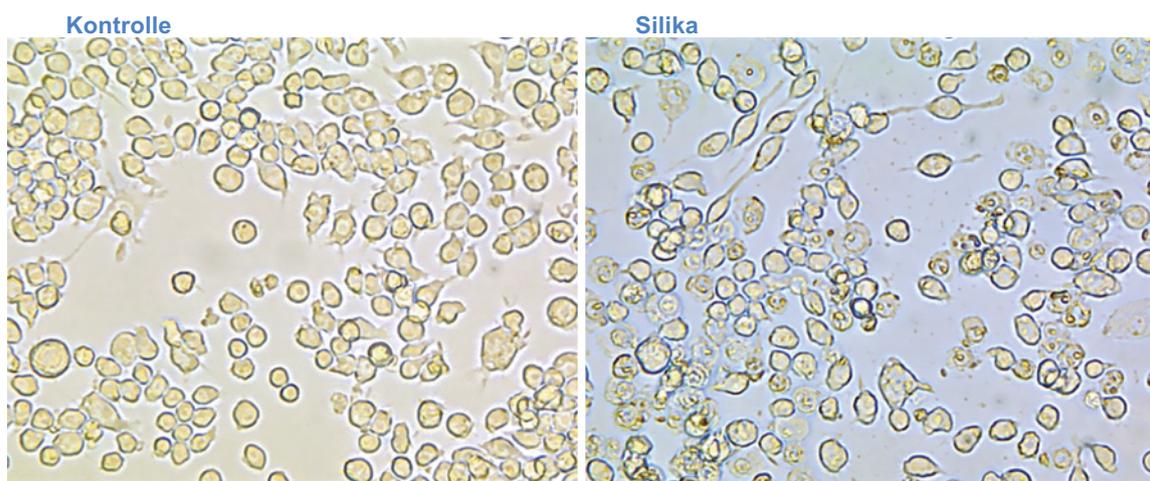


Abbildung 16: 72 h Inkubation der RAW-Zellen mit Silika-Vliesen; n=5

Die Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen veränderte die RAW-Zellen morphologisch nicht.

### 3.1.5. Untersuchung von möglichen apoptotischen Ereignissen als Ursache für die Zellzahlabnahme der RAW-Zellen

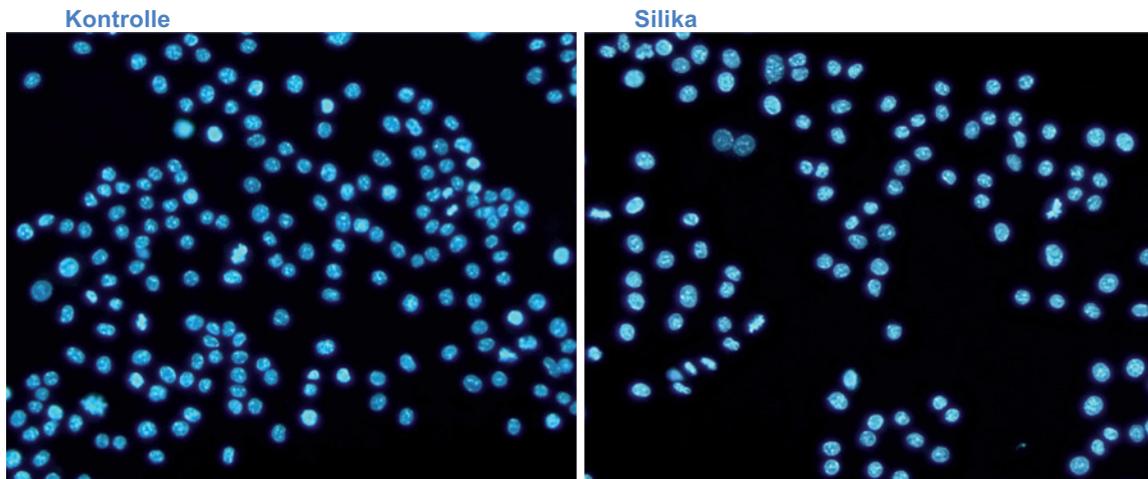


Abbildung 17: 48 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender Bisbenzimid-Färbung; n=5

Es war kein Unterschied zwischen der Kontrollzellen und den Zellen zu beobachten, die mit Kieselgel-Wundauflagen behandelt wurden.

### 3.1.6. Untersuchung von möglichen nekrotischen Ereignissen als Ursache für die Zellzahlabnahme der RAW-Zellen

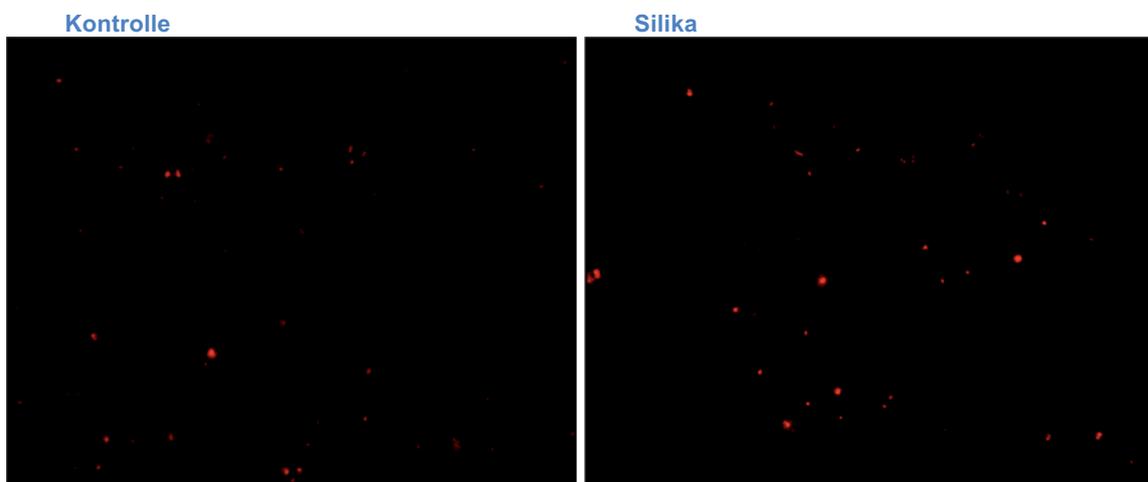


Abbildung 18: 48 h Inkubation mit den Silika-Vliesen mit anschließender Propidiumiodid-Färbung; n=5

Hier war kein Unterschied zwischen den Kontrollzellen (links) und den RAW-Zellen zu bemerken, die mit den Kieselgel-Wundauflagen inkubiert wurden.

### 3.1.7. Visuelle Untersuchung der in Makrophagen enthaltenen Phagosomen

Analyse der RAW-Zellen



Abbildung 19: 24 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle; n=5

In Makrophagen, die mit den Siliziumoxid-basierten Vliesen kultiviert wurden, konnte man keine Erhöhung der Anzahl bzw. eine Vergrößerung der Phagosomen (siehe Pfeil) im Vergleich mit den Kontrollzellen (links) bemerken.

Analyse der THP-1-Zellen:

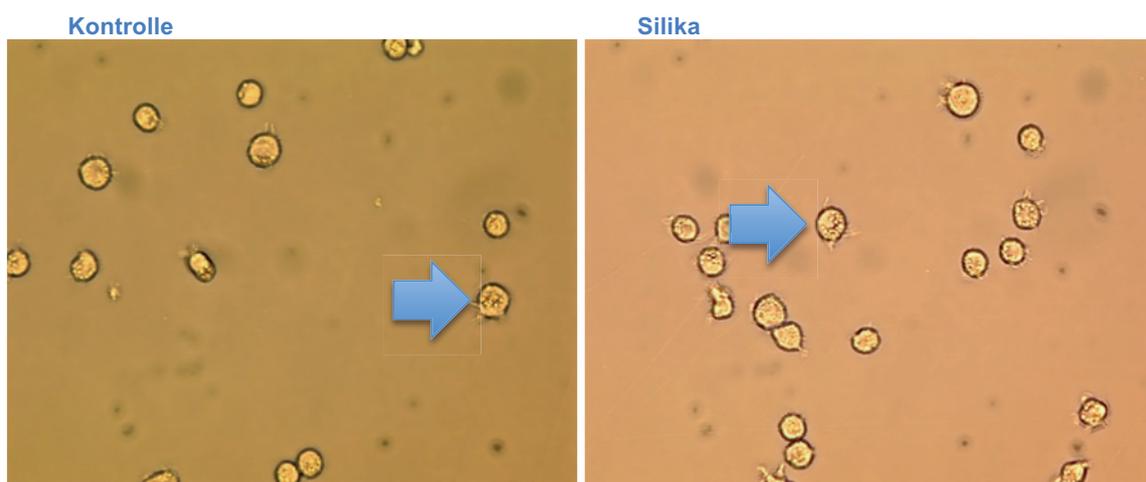


Abbildung 20: 24 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle, n=5

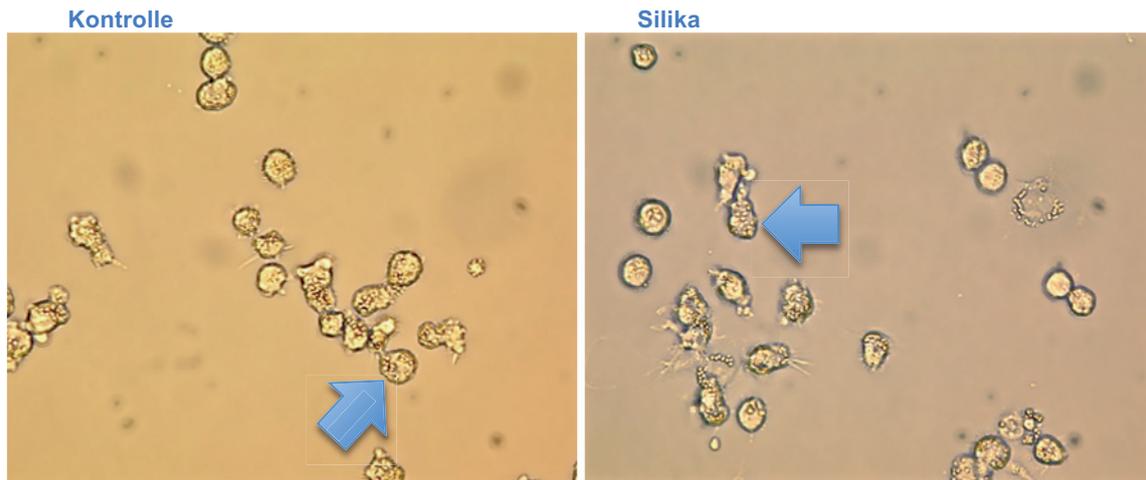


Abbildung 21: 48 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle, n=5

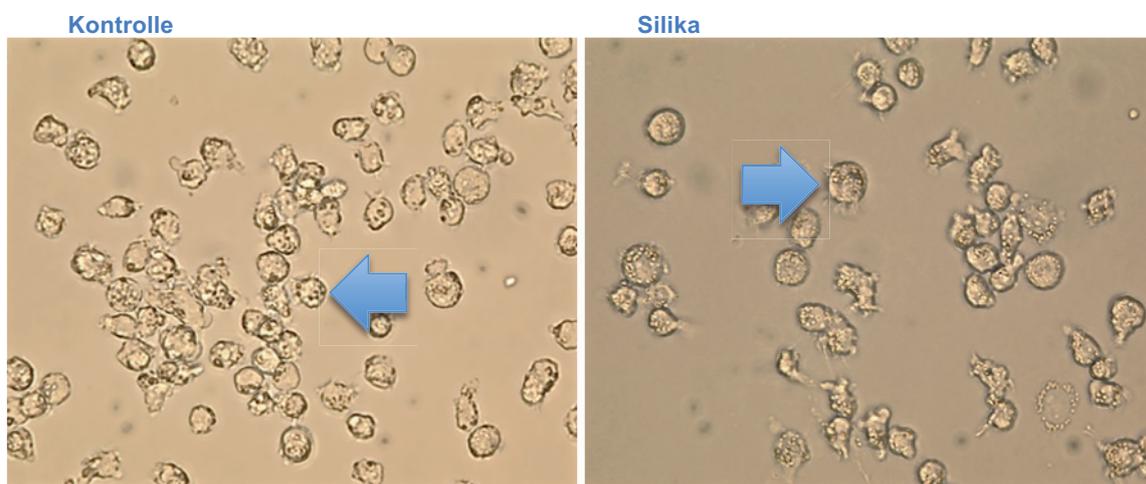


Abbildung 22: 72 h Inkubation mit Silika-Vliesen mit anschließender mikroskopischer Kontrolle, n=5

Zwischen unbehandelten und den mit Kieselgel-Wundauflagen inkubierten, humanen Makrophagen erkannte man nach einer Inkubationszeit von 24 h, 48 h und 78 h mikroskopisch keinen Unterschied. Die Anzahl und die Größe, der in den Zellen enthaltenen Phagosomen war mikroskopisch nicht zu unterscheiden.

### 3.1.8. Untersuchung der Inkorporation von Silizium durch Makrophagen mit Hilfe der *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)*

Mit dieser Methode sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang die Makrophagen Fragmente der Kieselgel-Wundauflagen phagozytierten, um Hinweise darauf zu erhalten, warum sich die Lebendzellzahl der RAW-Makrophagen innerhalb einer 72 h-Inkubation im Vergleich verringerte. Für diesen Versuch wurden jeweils 300.000 Zellen der Makrophagen Zelllinien RAW und THP-1 für 24 h mit den Kieselgel-

Wundauflagen inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Siliziumgehalt massenspektrometrisch analysiert.

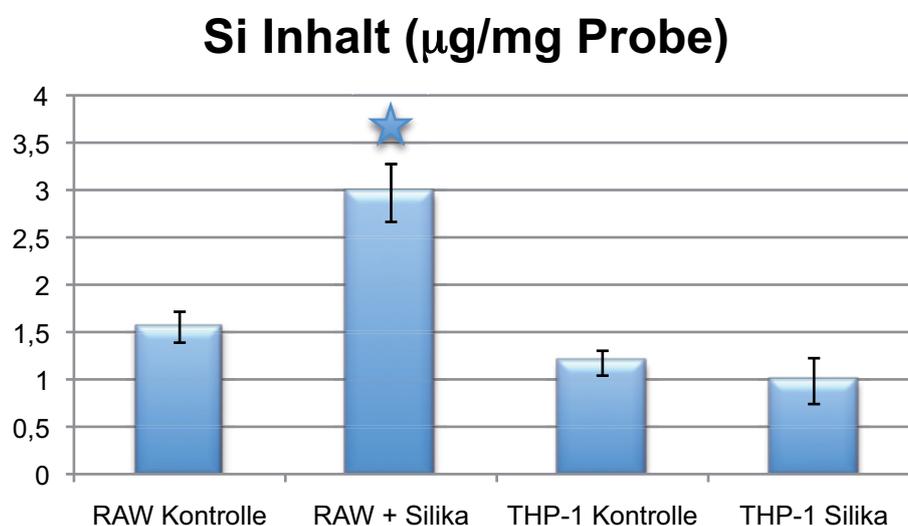


Abbildung 23: Untersuchung des Siliziumgehaltes in Makrophagen nach 24 h, n=5, ★ :signifikant

Nach 24 h hatten die RAW Zellen (inkubiert mit Silika-Präparaten) signifikant mehr Silizium aufgenommen, als ihre Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu war der Siliziumgehalt in den humanen THP-1 Zellen (inkubiert mit Silika-Vliesen) mit der entsprechenden Kontrolle vergleichbar.

Der Versuch wurde mit den THP-1 Makrophagen über eine Zeitspanne von 72 h wiederholt, um zu überprüfen, ob die humanen Makrophagen nicht doch Fragmente der Silika-Vliese inkorporierten.

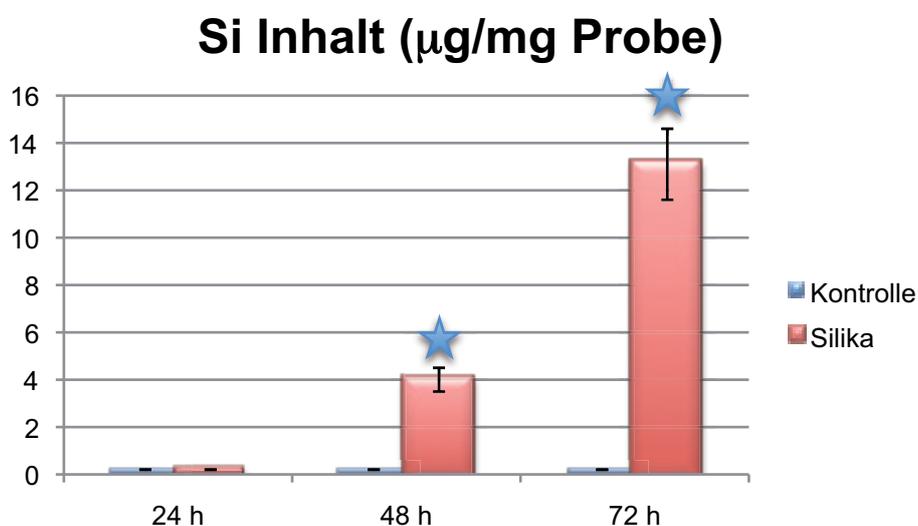


Abbildung 24: Untersuchung des Siliziumgehaltes in humanen THP-1-Zellen, n=4, ★ :signifikant

Auch die humanen THP-1-Makrophagen akkumulierten Silizium, benötigten dafür aber mehr Zeit als die murine RAW-Zelllinie.

### 3.2. Analyse der Kieselgel-Wundauflagen auf die Proliferation von Zellen

Um eine Substanz auf seine Verträglichkeit zu testen, ist es nicht nur notwendig mögliche toxische Effekte zu untersuchen, sondern es ist unerlässlich zu überprüfen, welchen Einfluss die Vliese auf die Proliferation der Zellen hatten. Denn für eine erfolgreiche Wundheilung ist die Entstehung neuen Gewebes und die damit verbundene Proliferation von Zellen substantziell.

#### 3.2.1. Der Einfluss der Silika-Vliese auf die Proliferation von Fibroblasten

Die Versuche wurden mit Fibroblasten durchgeführt, die aus der Haut von jeweils 10 Probanden isoliert wurden.

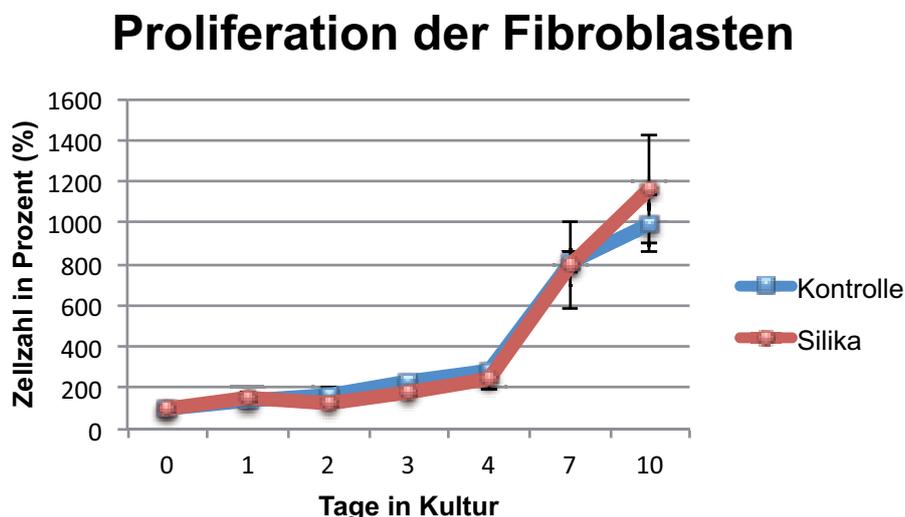


Abbildung 25: Beobachtung der Proliferation über eine Zeitspanne von 10d, n=5

Die Kieselgel-Wundaufgaben haben keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von Fibroblasten.

### 3.2.2. Untersuchung der Proliferation von Fibroblasten über einen Zeitraum von 16 Tagen

#### Langzeitproliferation der Fibroblasten

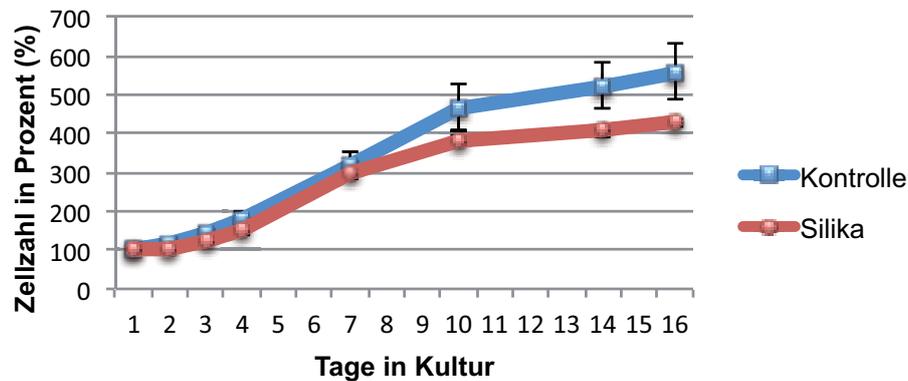


Abbildung 26: Beobachtung der Langzeitproliferation der Fibroblasten, n=3

In den Langzeitexperimenten der Fibroblasten, die mit Kieselgel-Wundauflagen behandelt wurden, beobachtete man eine leichte, aber nicht signifikante Verringerung der Zellzahl im Gegensatz zu den Vergleichszellen.

### 3.2.3. Der Einfluss der Silika-Vliese auf Endothelzellen

#### Proliferation der Endothelzellen

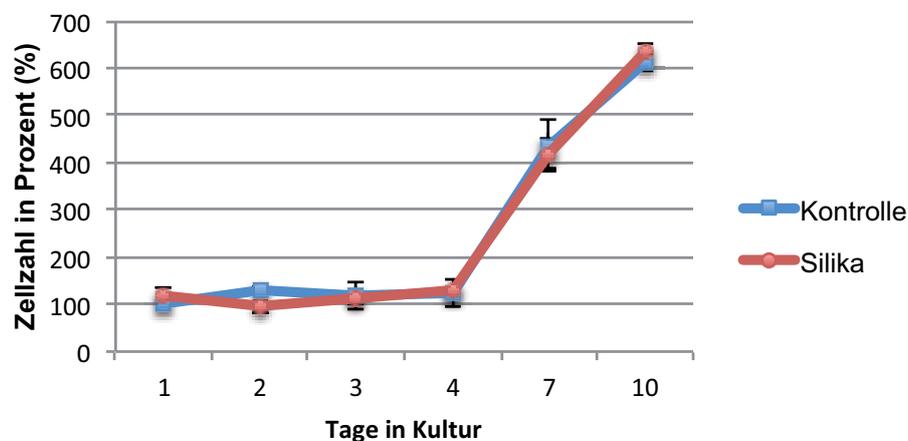


Abbildung 27: Beobachtung der Proliferation über eine Zeitspanne von 10 d, n=5

Untersuchte man die Zellproliferation über einen 10-tägigen Zeitraum, konnte kein Unterschied zwischen Endothelzellen, die mit Siliziumoxid-basierten Wundauflagen kultiviert wurden und den Kontrollzellen beobachtet werden.

### 3.2.4. Untersuchung der Proliferation von Endothelzellen über einen Zeitraum von 18 Tagen

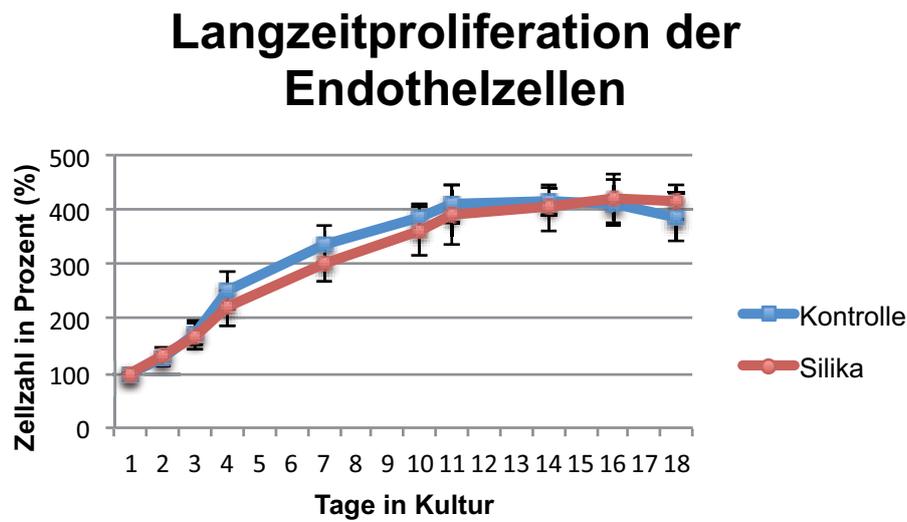


Abbildung 28: Beobachtung der Langzeitproliferation der Endothelzellen, n=3

Man konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den Endothelzellen, die mit den Vliesen inkubiert wurden erkennen. Die Kieselgel-Wundauflagen haben keinen Einfluss auf die Proliferation von Endothelzellen.

### 3.2.5. Untersuchung der Proliferation von Makrophagen über einen Zeitraum von 18 Tagen

#### Langzeitproliferation von Makrophagen

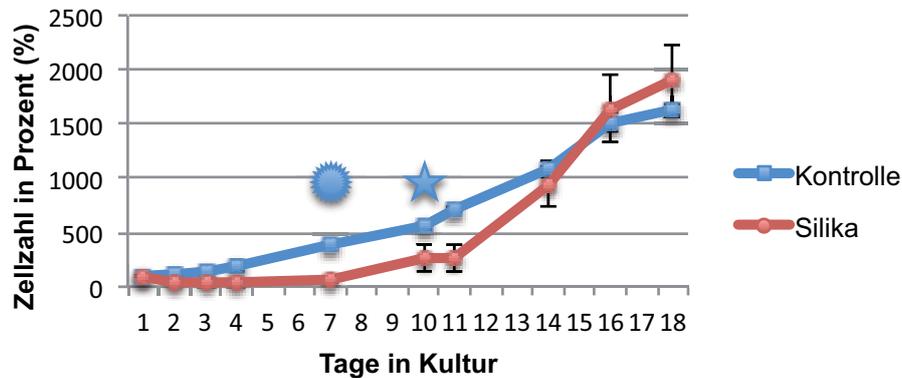


Abbildung 29: Beobachtung der Langzeitproliferation von Makrophagen, n=3, ★ :signifikant, ☀ : hochsignifikant

In Langzeitkulturen von Makrophagen, hier wurde die murine RAW-Zelllinie benutzt, konnte folgendes beobachtet werden: Zwischen Tag 5 und 13 konnte man eine reduzierte Proliferationsrate der Zellen, die mit den Silika-Präparaten behandelt wurden im Vergleich mit den Kontrollzellen feststellen. Am 7. Tag war der Unterschied hochsignifikant und am 10. Tag signifikant. Ab dem 15. Tag erreichten die Makrophagen, inkubiert mit Kieselgel-Wundauflagen, die Proliferationsrate der Kontrollzellen wieder und konnten diese sogar, wenn auch nur schwach übertreffen.

### 3.2.6. Untersuchung der Proliferation von Keratinozyten über einen Zeitraum von 16 Tagen

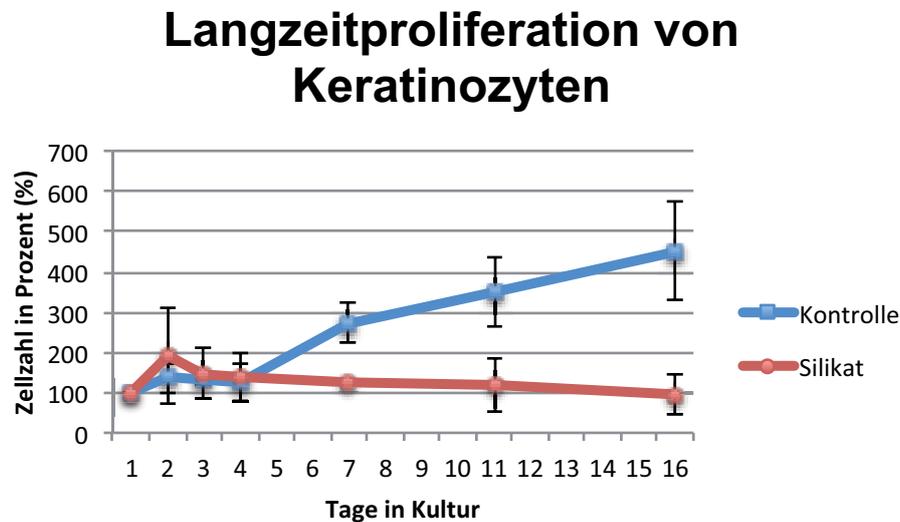


Abbildung 30: Beobachtung der Langzeitproliferation von Keratinozyten, n=3

Aus der Epidermis isolierte Keratinozyten, kultiviert mit den Kieselgel-Wundauflagen, zeigten eine verringerte Proliferationsrate im Vergleich mit den Kontrollzellen (blaue Kurve). Die mikroskopische Begutachtung der Zellen ließ aber vermuten, dass die Reduktion der Zellzahl, damit zu erklären war, dass sich die Keratinozyten differenzierten und deswegen nicht mehr proliferierten (siehe Punkt 3.2.5.).

### 3.2.7. Untersuchung der Effekte der Kieselgel-Wundauflagen auf die Differenzierung humaner Keratinozyten

Da die Proliferation der Keratinozyten, die mit Silika-Präparaten inkubiert wurden im Gegensatz zu den Vergleichszellen sank, stellte sich die Frage nach der Ursache. Hinweise aus der mikroskopischen Betrachtung ließen vermuten, dass die Zellen nicht starben, sondern differenzierten. Um diese Vermutung zu verifizieren wurden die Keratinozyten nach 8 Tagen Kultivierung mit dem Proliferationsmarker Ki67 und dem Differenzierungsmarker Involucrin angefärbt.

Färbung mit Proliferationsmarker Ki67

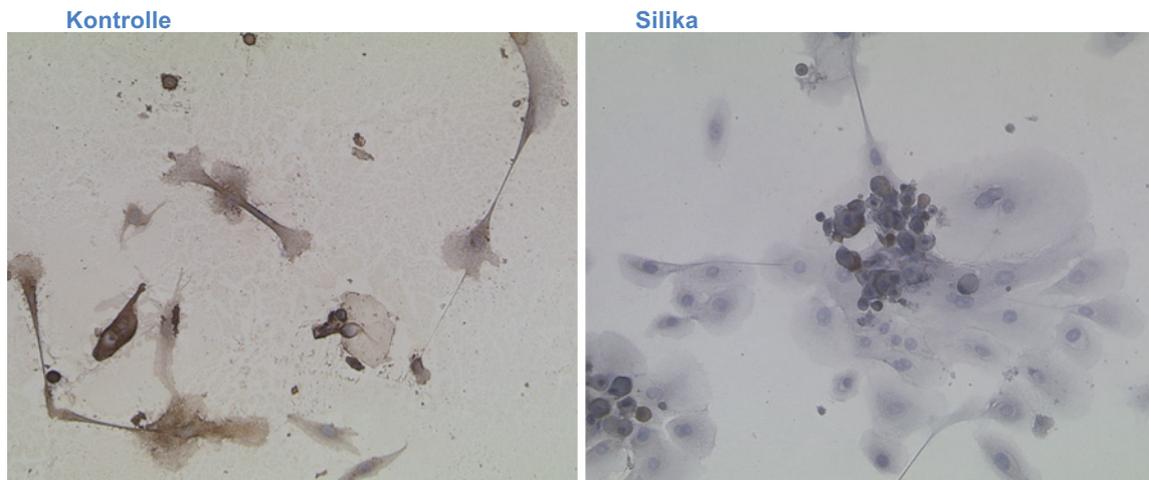


Abbildung 31: Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67, Braunfärbung zeigt Proliferation an

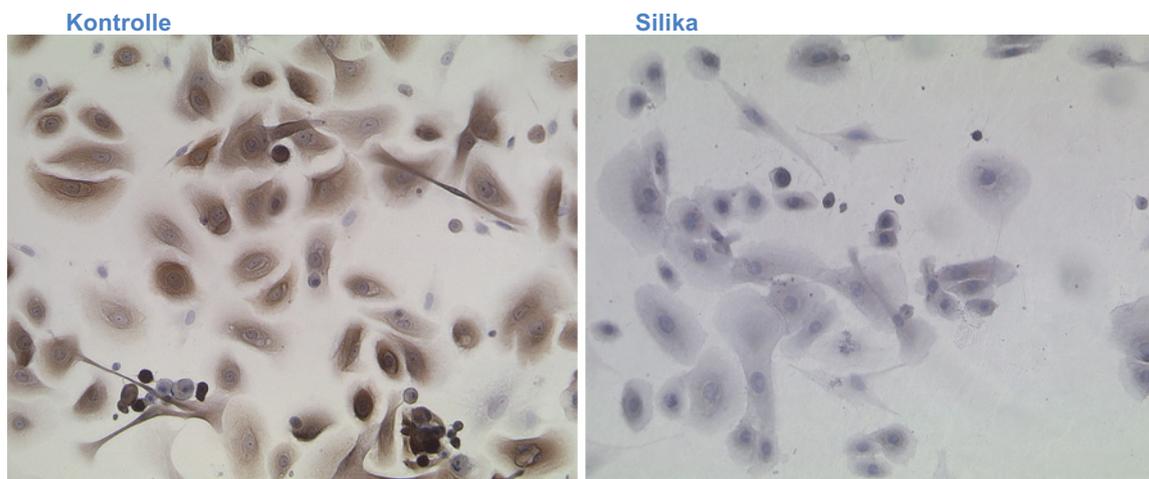


Abbildung 32: Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67, Braunfärbung zeigt Proliferation an

Die Färbung mit Ki67 bestätigte die Ergebnisse aus dem Versuch 3.2.4. Die mit den Kieselgel-Wundaufgaben kultivierten Keratinozyten proliferierten nicht.

## Färbung mit dem Differenzierungsmarker Involucrin

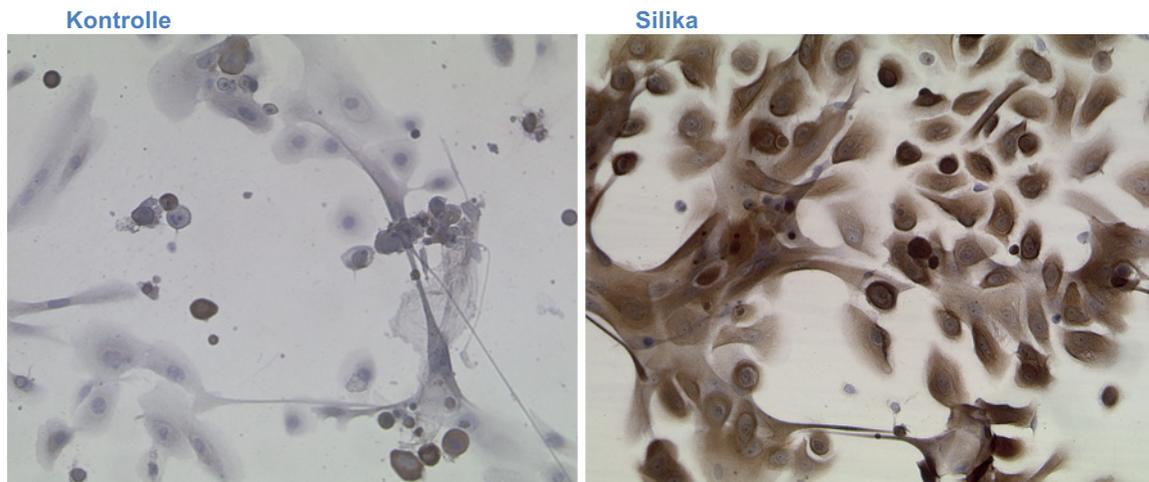


Abbildung 33: Färbung mit dem Differenzierungsmarker Involucrin, Braunfärbung zeigt Differenzierung an

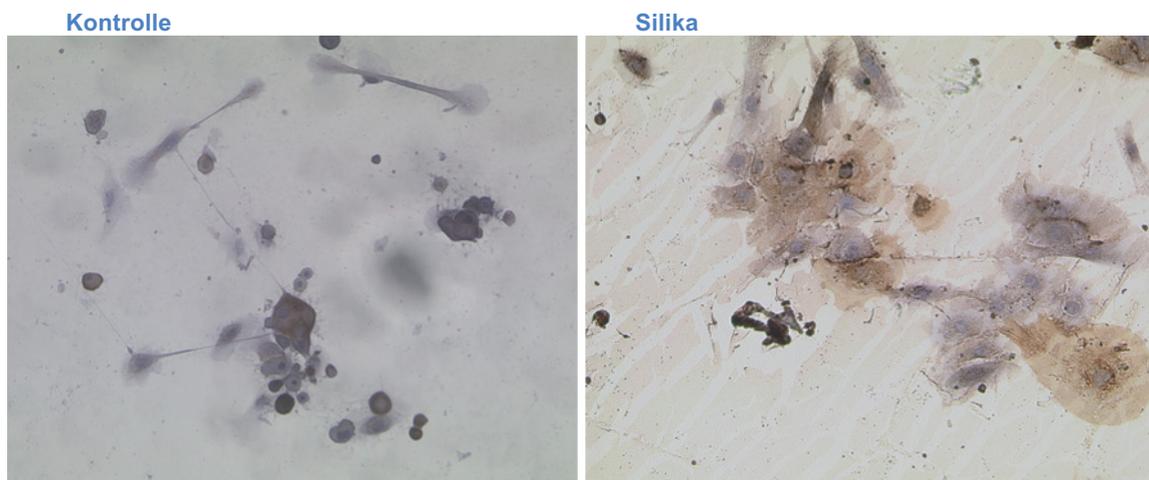


Abbildung 34: Färbung mit dem Differenzierungsmarker Involucrin, Braunfärbung zeigt Differenzierung an

In den rechten Abbildungen (Abb. 33+34) kann man an der braunen Färbung der Keratinozyten deutlich erkennen, dass die mit Kieselgel-Wundauflagen inkubierten Zellen sich differenziert haben und somit nicht mehr proliferieren können.

### 3.3. Effekte der Kieselgel-Wundauflagen auf inflammatorische Parameter

Ein Ungleichgewicht im Wundmilieu zugunsten pro-inflammatorischer Parameter kann die Entstehung von Problemwunden und einen inhibierten Heilungsprozess sowie die Ausbildung von funktionseinschränkenden Narben begünstigen. Aus die-

sem Grunde war es besonders interessant, den Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf verschiedene Entzündungsmediatoren zu untersuchen.

Zum einen wurde die Wirkung der Kieselgel-Wundauflagen auf die verschiedenen Zelltypen der Haut unter Normalbedingungen untersucht. Vergleichend wurden diese Zellen mit einem zentralen pro-inflammatorischen Signalstoff (Il-1 $\beta$ ) vorinkubiert. Somit wurden Versuchsbedingungen geschaffen, die denen in entzündeten Wunden ähnelten. Zusätzlich wird die Konzentration (pg/mg) ausgewählter Zytokine in den jeweiligen Zelllysaten mittels ELISA bestimmt und gegen die Konzentration in den Kontrollzellen normiert.

### 3.3.1. Konstitutive Expression von Il-1 $\beta$ in Keratinozyten

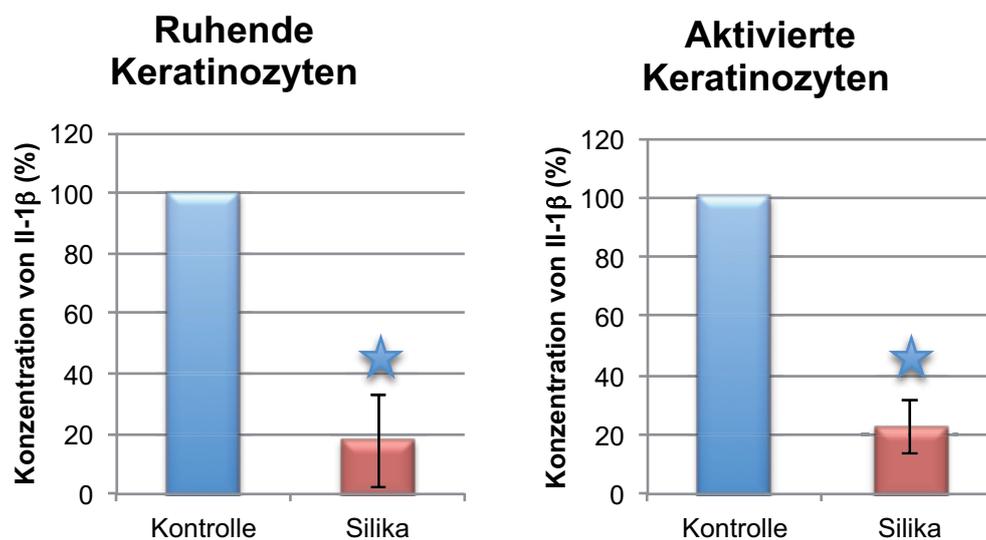


Abbildung 35: Relative Konzentration von Il-1 $\beta$  im Zelllysate von Keratinozyten (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Keratinozyten zusammen mit den Vliesen inkubiert (rot)

Die Konzentration des inflammatorischen Zytokins Il-1 $\beta$ , konnte durch eine Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen in ruhenden sowie aktivierten Keratinozyten signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse könnten auf eine entzündungshemmende Wirkung der Kieselgel-Wundauflagen hinweisen.

### 3.3.2. Konstitutive Expression von Il-6 in Keratinozyten

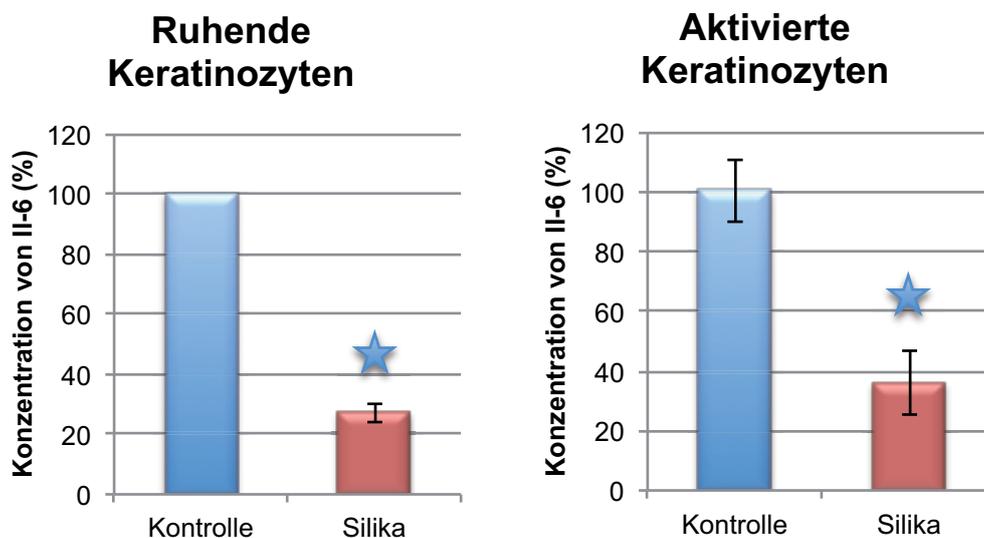


Abbildung 36: Relative Konzentration von Il-6 im Zelllysate von Keratinozyten (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Keratinozyten zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

Die Kieselgel-Wundauflagen konnten die Expression des inflammatorischen Zytokins Il-6 in ruhenden und aktivierten Keratinozyten deutlich und signifikant reduzieren. Das lässt eine anti-inflammatorische Wirkung der Kieselgel-Wundauflagen vermuten.

### 3.3.3. Konstitutive Expression von Il-6 in Endothelzellen

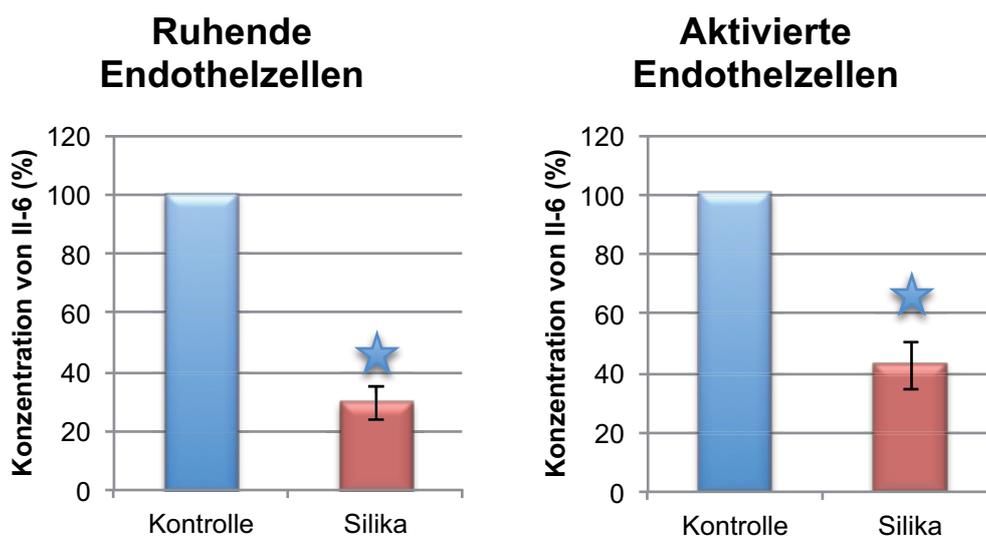


Abbildung 37: Relative Konzentration von Il-6 im Zelllysate von Endothelzellen (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ signifikante Werte; Kontrolle (blau), Endothelzellen zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

Werden ruhende oder aktivierte Endothelzellen mit Silika-Präparaten kultiviert, kommt es zu einer ausgeprägten und signifikanten Reduktion des Zytokins Il-6.

### 3.3.4. Konstitutive Expression von Il-6 in Fibroblasten

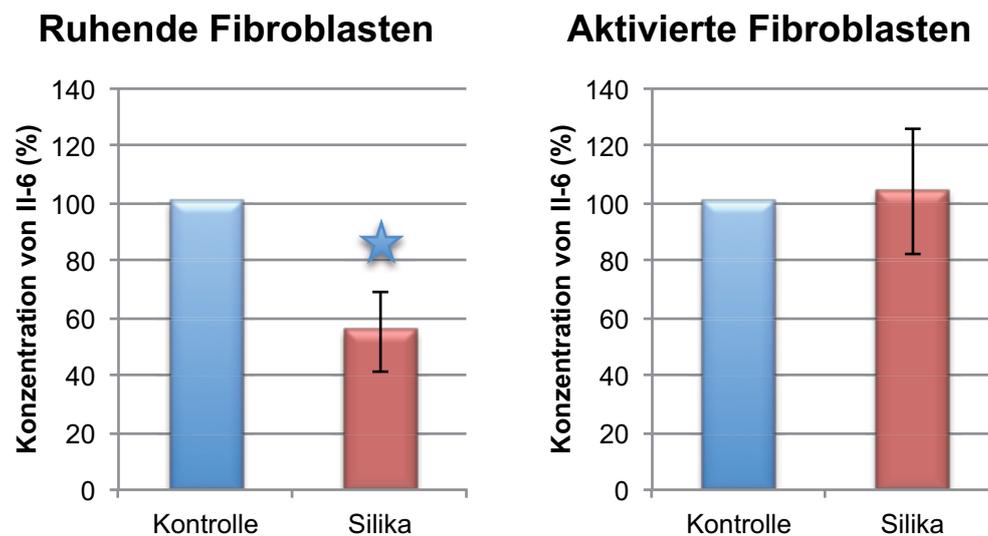


Abbildung 38: Relative Konzentration von Il-6 im Zelllysate von Fibroblasten (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Fibroblasten zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

In ruhenden Fibroblasten konnte man eine beträchtliche und signifikante Verringerung des Zytokins Il-6 erkennen. Dieses Ergebnis konnte in aktivierten Fibroblasten nicht bestätigt werden.

### 3.3.5. Konstitutive Expression von Il-8 in Keratinozyten

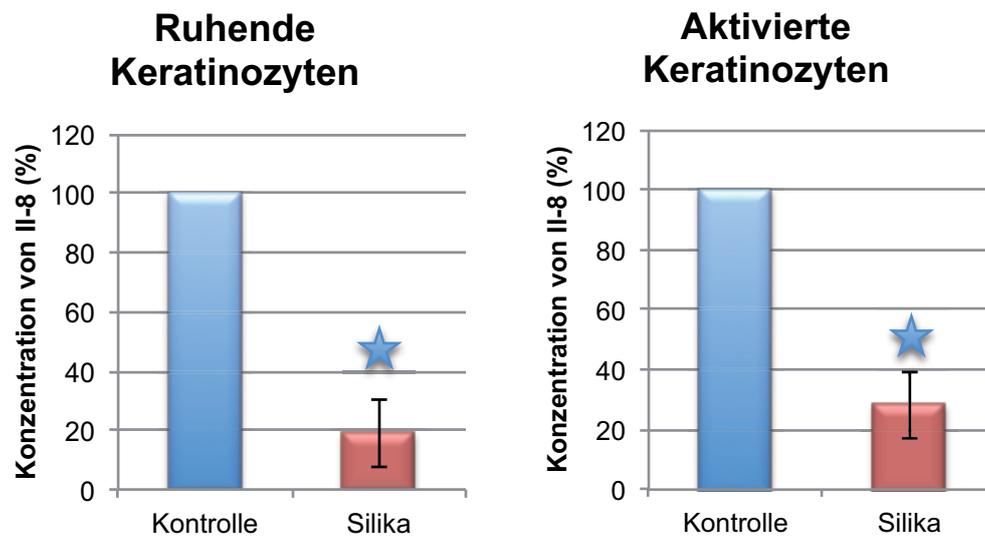


Abbildung 39: Relative Konzentration von Il-8 im Zelllysat von Keratinozyten (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Keratinozyten zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

Durch eine Inkubation mit den Kieselgel-Wundaufgaben konnte die Expression des Entzündungsmediators Il-8 deutlich vermindert werden. Die Expression wurde um ungefähr 80% reduziert und ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Es wäre möglich, dass die Silika-Präparate eine entzündungshemmende Wirkung haben.

### 3.3.6. Konstitutive Expression von Il-8 in Endothelzellen

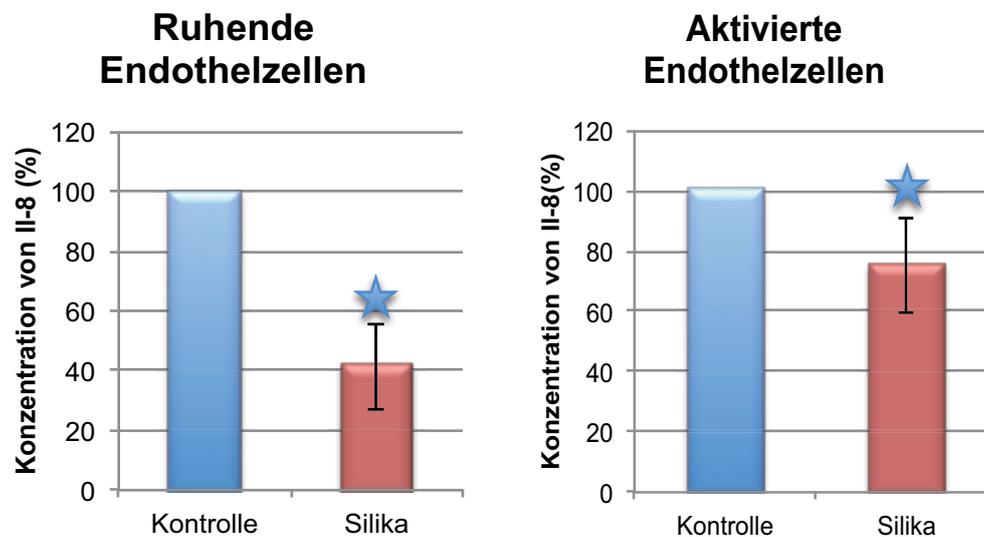


Abbildung 40: Relative Konzentration von Il-8 im Zelllysate von Endothelzellen (pg/ml) links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Endothelzellen zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

Die Expression des Chemokins Il-8 kann in ruhenden und aktivierten Endothelzellen signifikant ( $p < 0,05$ ) durch die Inkubation von Siliziumoxid-basierten Vliesen reduziert werden. Es wäre denkbar, dass die Vliese eine anti-inflammatorische Wirkung haben.

### 3.3.7. Konstitutive Expression von Il-8 in Fibroblasten

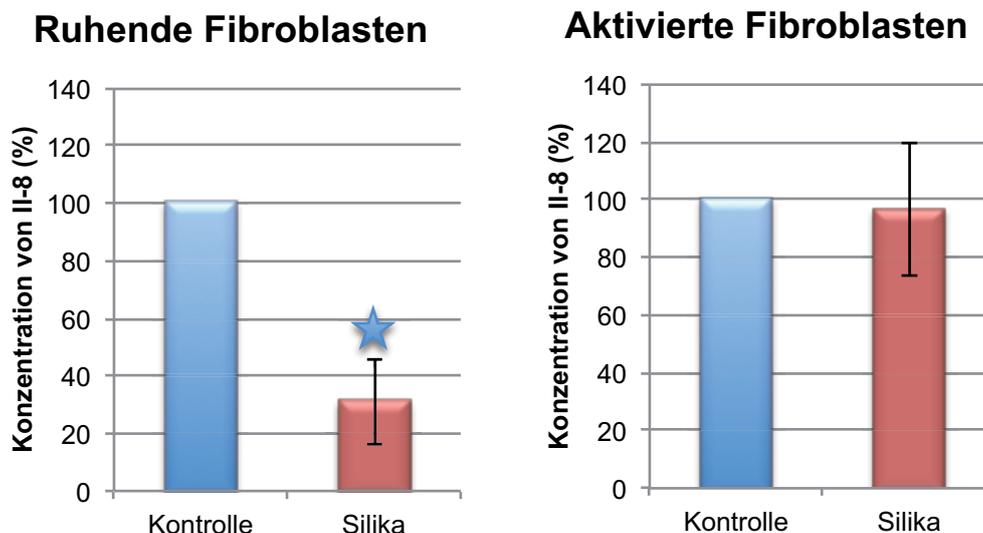


Abbildung 41: Relative Konzentration von Il-8 im Zelllysate von Fibroblasten (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Fibroblasten zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

Die Wundaufgaben reduzierten die Proteinsynthese von Il-8 in ruhenden Fibroblasten um min. 70% (Signifikanz  $p < 0,05$ ). Einen Einfluss auf die Synthese von Il-8 in aktivierten Fibroblasten hatten sie allerdings nicht.

### 3.3.8. Konstitutive Expression von TNF- $\alpha$ in Keratinozyten

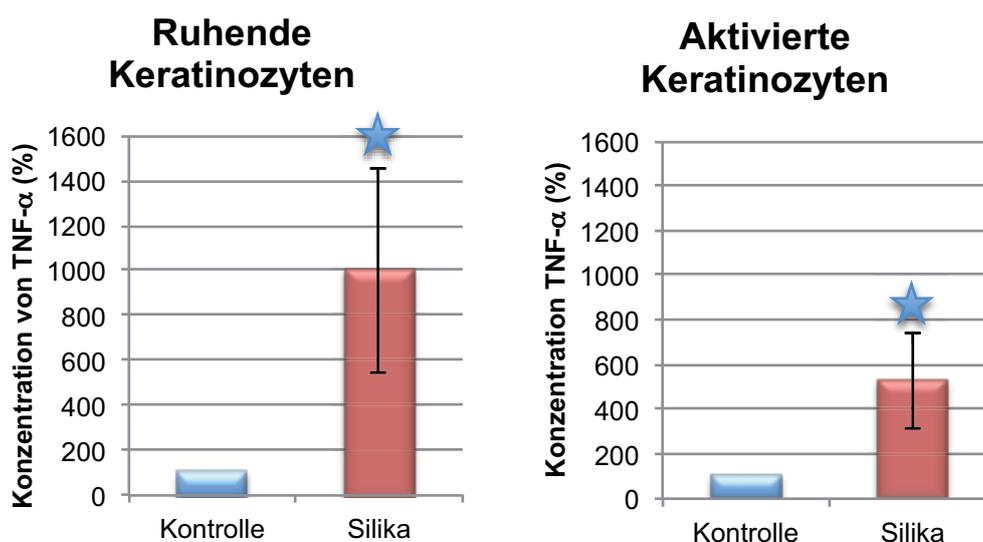


Abbildung 42: Relative Konzentration von TNF- $\alpha$  im Zelllysate von Keratinozyten (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Keratinozyten zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

Durch die Inkubation mit den Silika-Vliesen konnte man eine signifikante Erhöhung des Zytokins TNF- $\alpha$  beobachten.

### 3.3.9. Konstitutive Expression von TNF- $\alpha$ in Endothelzellen

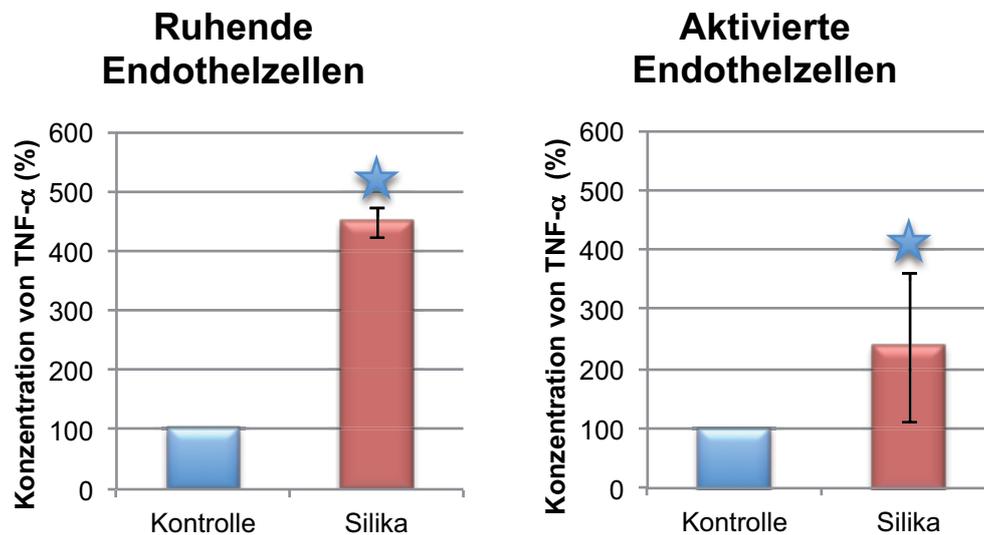


Abbildung 43: Relative Konzentration von TNF- $\alpha$  im Zelllysate von Endothelzellen (pg/ml); links: für 72 h (n=9); rechts für 24 h (n=12) ★ : signifikante Werte; Kontrolle (blau), Endothelzellen zusammen mit den Vliesen kultiviert (rot)

In ruhenden sowie in aktivierten Endothelzellen kam es durch die Inkubation mit den Kieselgel-Wundaufgaben zu einer deutlichen (signifikanten) Erhöhung von TNF- $\alpha$ . Es könnte möglich sein, dass dieses Ergebnis mit den Analysen aus Abschnitt 3.4.9. (Abb. 61-63) im Zusammenhang steht.

### 3.3.10. Der Einfluss der Silika-Vliese auf NF- $\kappa$ B

Nuclear Factor Kappa B ist ein multifunktionaler, Transkriptionsfaktor. Er ist in zahlreiche Regulationsmechanismen involviert, wie z.B. die angeborene und adaptierte Immunantwort. NF- $\kappa$ B kann die Expression von Genen aktivieren bzw. inhibieren und wird aus einem Dimer gebildet. Dieses Dimer wird häufig aus den Untereinheiten p65 und p50 generiert. In einer unstimulierten Zelle befindet sich NF- $\kappa$ B als inaktive Form im Zytoplasma, dort ist es an I $\kappa$ B (Inhibitor of NF- $\kappa$ B) gebunden. Wird I $\kappa$ B in Folge einer Phosphorylierung degradiert, wird die nukleäre Lokalisationssequenz von NF-

$\kappa$ B frei. Es kommt zu einer Translokation von NF- $\kappa$ B vom Zytoplasma in den Zellkern, wo die Transkription bzw. die Inhibition der Zielgene initiiert wird. In seiner Rolle als Koordinator von Immunantworten reguliert NF- $\kappa$ B die Transkription u.a. von Il-8, Il-6 und Il-1 $\beta$ . Aus diesem Grunde wurde in den folgenden Experimenten die Wirkung der Kieselgel-Wundauflagen auf NF- $\kappa$ B und dessen Aktivierung durch die Translokation in den Zellkern untersucht.

### 3.3.11. Visualisierung des Effektes der Silika-Präparate auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$

HeLa Zellen wurden mit TNF- $\alpha$  aktiviert und mit den Wundauflagen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde NF- $\kappa$ B mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper detektiert.

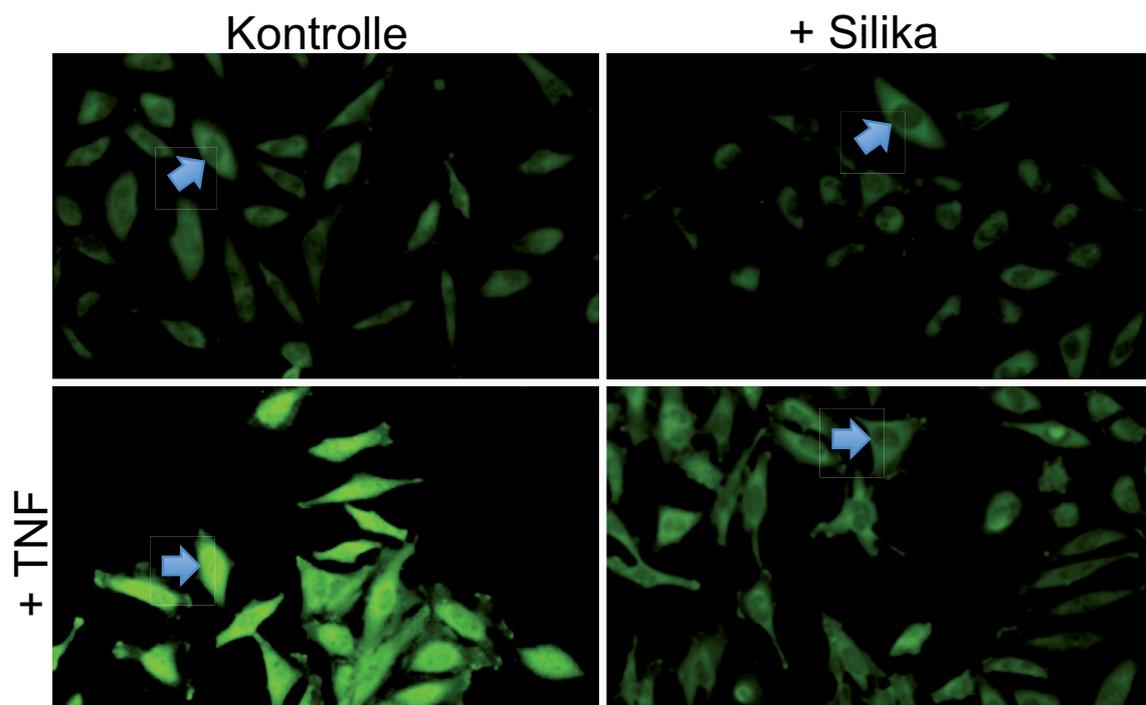


Abbildung 44: Visualisierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Translokation in den Kern (der Zellkern wurde jeweils mit einem Pfeil markiert), n=4

Zwischen der Kontrolle und den Zellen, die mit den Kieselgel-Wundauflagen inkubiert wurden, konnte man visuell keinen Unterschied feststellen (oben, Abb. 44).

Vergleich man allerdings die Kontrolle mit den Zellen, die mit TNF- $\alpha$  inkubiert wurden (linke Hälfte der Abb. 44) erkannte man eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz,

was dafür sprach, dass durch die Aktivierung von TNF- $\alpha$  mehr NF- $\kappa$ B exprimiert wurde. Außerdem zeigte sich eine auffällige Zunahme der Fluoreszenz im Zellkern (jeweils mit Pfeilen markiert). NF- $\kappa$ B wurde in Folge einer Inkubation mit TNF- $\alpha$  also nicht nur verstärkt synthetisiert, sondern translozierte in den Zellkern, wo es die Transkription verschiedener Targetgene beeinflussen kann. Die Zellen, die mit den Vliesen und TNF- $\alpha$  kultiviert wurden (unten rechts, Abb. 44), zeigten im Gegensatz zu den nur mit TNF- $\alpha$  behandelten Zellen (unten links, Abb. 44) eine geringere Fluoreszenzintensität und keine Akkumulation der Fluoreszenzmoleküle im Zellkern. Das lässt darauf schließen, dass die Kieselgel-Wundauflagen die Transkription von NF- $\kappa$ B und dessen Translokation in den Zellkern verhindern. Dies scheint ein Hinweis auf einen möglichen protektiven Einfluss der Wundauflagen zu sein.

### 3.3.12. Western Blot Analyse der Translokation von p50 in den Nukleus

Um die Versuchsergebnisse aus 3.3.11. zu verifizieren, wurden für die folgenden Versuche jeweils folgende Proteinproben generiert:

1. unbehandelte Zellen als (Negativ-) → Kontrolle (blau)
2. Zellen, die mit TNF- $\alpha$  aktiviert wurden → +TNF (blau)
3. Zellen, die mit den Silika-Vliesen inkubiert wurden → Silika (rot)
4. Zellen, die mit Silika-Vliesen und TNF- $\alpha$  inkubiert wurden → +TNF (rot)

Aus den Proteinproben wurden biochemisch nukleäre und zytoplasmatische Proteinlysate erstellt. Die erfolgreiche Separation wurde jeweils mit Hilfe eines Western Blots überprüft, bei dem mit den entsprechenden Antikörpern ein kernspezifisches Protein (PARP) und ein zytoplasmaspezifisches Protein ( $\alpha$ -Tubulin) detektiert wurde. Nach gelungener Validierung wurden mit Hilfe der nukleären bzw. zytoplasmatischen Proteinlysate Western Blots erstellt mit denen die Untereinheiten von NF- $\kappa$ B detektiert wurden, die am häufigsten an der Signaltransduktion beteiligt sind, nämlich p50 und p65. Die Stärke der detektierten Proteinbanden wurde mit dem Odyssey der Firma LI-COR ausgewertet und der Versuch mindestens dreimal wiederholt. Die Er-

gebnisse wurden nachfolgend in Balkendiagrammen dargestellt, wobei in diesem Falle gegen die Positivkontrolle (+TNF, blau) normiert wurde.

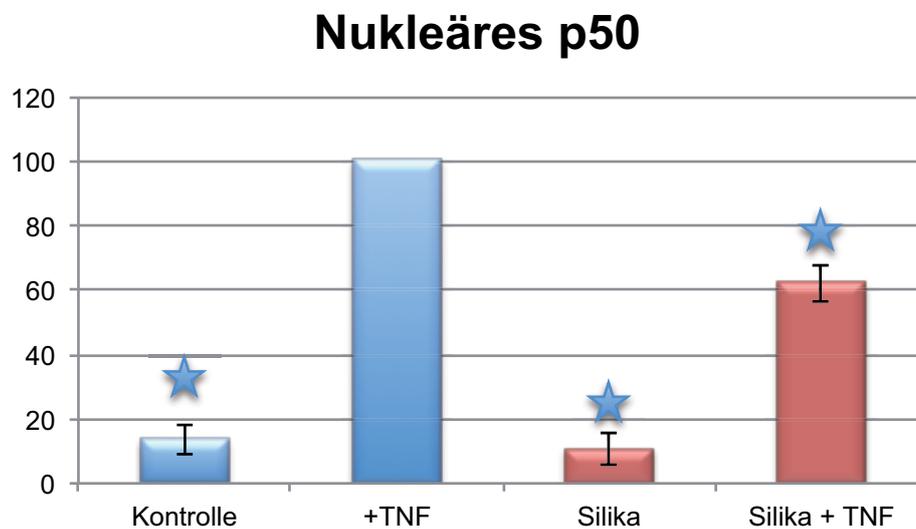


Abbildung 45: Western Blot Analyse vom nukleären p50, ★ : Werte sind im Vergleich mit +TNF (blau) signifikant, n=5

Erwartungsgemäß führte eine Inkubation mit TNF- $\alpha$  zu einer Erhöhung von p50 im Nukleus (blauer Balken, +TNF). Wohingegen die alleinige Inkubation der Zellen mit den Kieselgel-Wundauflagen keinen Effekt auf die Translokation von p50 in den Kern hatte. Wurden die Zellen aber mit TNF- $\alpha$  aktiviert und gleichzeitig mit den Silika-Vliesen inkubiert, konnte man eine deutlich sichtbare Verringerung (fast 40%) der Translokation von der p50-Untereinheit in den Kern beobachten.

### 3.3.13. Western Blot Analyse der Expression von p50 im Zytoplasma

#### Zytoplasmatisches p50

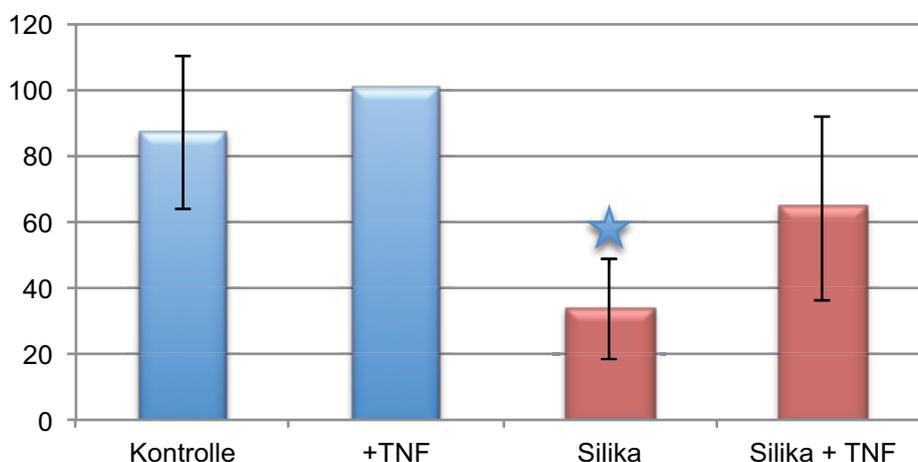


Abbildung 46: Western Blot Analyse vom zytoplasmatischen p50, ★ : Wert ist im Vergleich mit +TNF (blau) signifikant, n=4

Im Zytoplasma war der p50-Proteingehalt der Kontrolle ungefähr mit dem der mit TNF- $\alpha$  aktivierten Zellen vergleichbar (blaue Balken). Im Gegensatz dazu führte eine Kultivierung mit den Kieselgel-Wundaufgaben zu einer teils signifikanten Abnahme von p50 im Zytoplasma (rote Balken).

### 3.3.14. Western Blot Analyse der Expression von p65 im Nukleus

#### Nukleäres p65

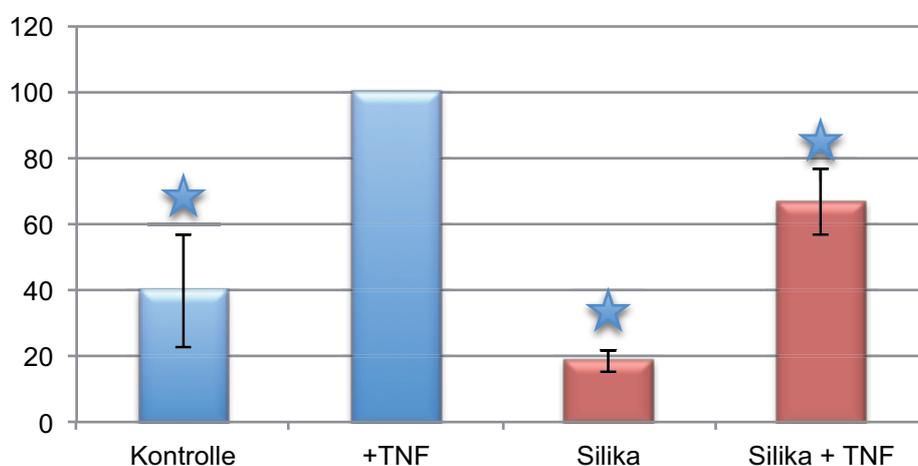


Abbildung 47: Western Blot Analyse vom nukleären p65, ★ : Werte sind im Vergleich mit +TNF (blau) signifikant, n=5

Im Nukleus führte die Inkubation mit den Silika-Präparaten zu einer sichtbaren Reduktion des p65 Proteingehaltes. Wurden die Zellen ausschließlich mit den Wundauflagen (Silika, roter Balken) inkubiert war der Proteingehalt geringer als der der unbehandelten Zellen (Kontrolle, blauer Balken). Eine Anregung mit TNF- $\alpha$  führte zwar zu einer Erhöhung von p65 im Kern, aber diese ist signifikant geringer (roter Balken, Silika + TNF) als die der Positivkontrolle (+TNF, blau).

### 3.3.15. Western Blot Analyse der Expression von p65 im Zytoplasma

#### Zytoplasmatisches p65

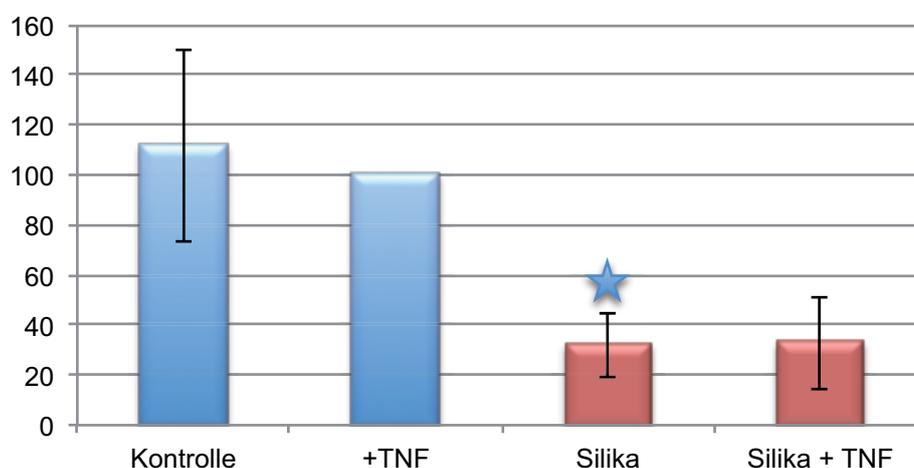


Abbildung 48: Western Blot Analyse vom zytoplasmatischen p65, ★ : Wert ist im Vergleich mit +TNF (blau) signifikant, n=3

Im Zytoplasma kommt es zu einer auffallenden Reduktion der p65-Untereinheit. Hier ist der Unterschied sogar noch stärker als mit p50 (Abb. 46), denn der p65-Proteingehalt ist durch die Inkubation mit den Silika-Vliesen nicht nur offenkundig reduziert, sondern es war fast kein Unterschied zwischen den induzierten Zellen und den Zellen, die nur mit den Vliesen behandelt worden sind festzustellen (rote Balken).

### 3.3.16. Western Blot Analyse der Expression von $\kappa$ B im Zytoplasma

#### Zytoplasmatisches $\kappa$ B

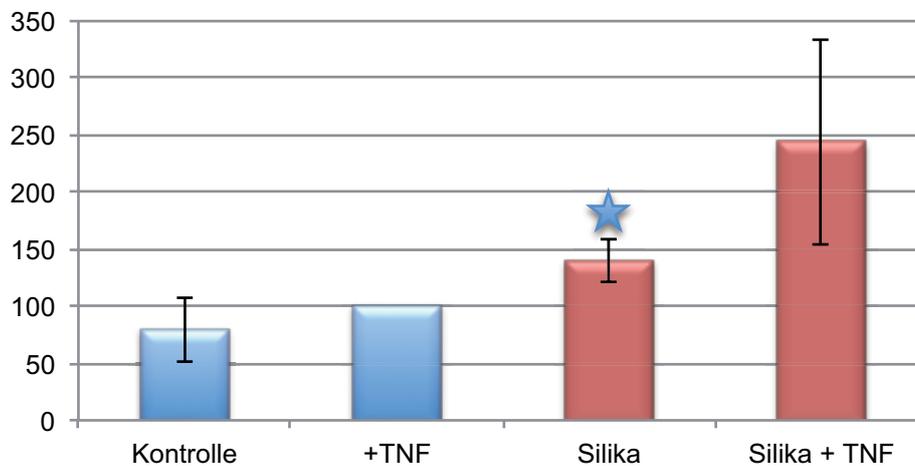


Abbildung 49: Western Blot Analyse vom zytoplasmatischen  $\kappa$ B, ★ : Wert ist im Vergleich mit +TNF (blau) signifikant, n=3

Die Kokultivierung mit den Wundauflagen (rote Balken) hatte erheblichen Einfluss auf den Proteingehalt von  $\kappa$ B im Zytoplasma und zwar kommt es zu einer signifikanten Steigerung von  $\kappa$ B. Wurden die mit den Vliesen inkubierten Zellen zusätzlich mit TNF- $\alpha$  aktiviert, wurde der Proteingehalt von  $\kappa$ B im Zytoplasma noch einmal beachtlich (um ca. 100%) gesteigert. Es könnte sein, dass die Degradation von  $\kappa$ B durch eine Inkubation durch die Silika-Präparate verhindert und oder die Protein-expression von  $\kappa$ B gesteigert wird.

### 3.3.17. Die Expression von NF- $\kappa$ B in Zellen mit einem SEAP-Reportergenkonstrukt

Für diesen Assay wurde eine stabil transfizierte, humane Lungenkarzinomzelllinie benutzt. Dieser Assay beruhte auf der Aktivierung des Reportergen-Konstruktes, das unter der Kontrolle eines NF- $\kappa$ B-abhängigen, responsiven Elements steht, welches bequem im Zellkulturüberstand zu messen war.

### Effekt der Silika-Vliese auf die Expression von NF- $\kappa$ B

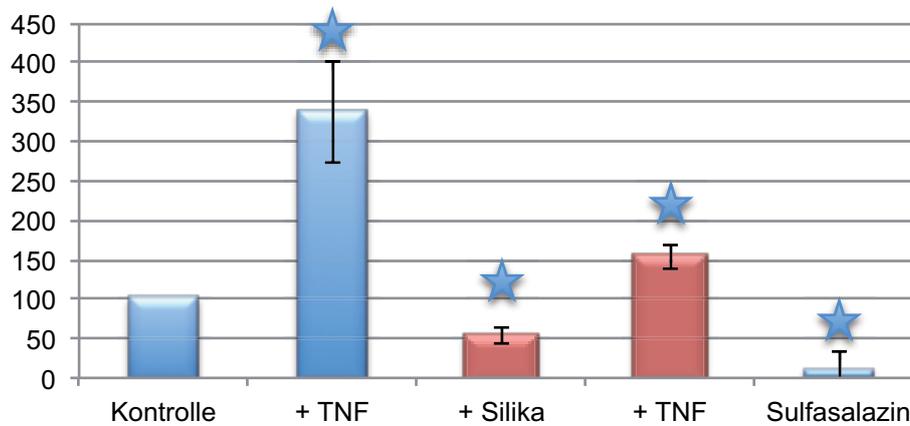


Abbildung 50: Effekt der Kieselgel-Wundauflagen auf die Expression von NF- $\kappa$ B mit einem SEAP-Reportergenkonstrukt analysiert, ★ : signifikant, n=8,

Die Aktivierung der Zellen (A549) mit TNF- $\alpha$  führte zu einer fast dreifachen Erhöhung der Expression von NF- $\kappa$ B (blaue Balken, Abb. 50). Wurden die Zellen hingegen mit den Vliesen inkubiert kommt es schon unter normalen Zellkulturbedingungen zu einer Reduktion der Expression von NF- $\kappa$ B (vergleiche Kontrolle, blau und +Silika, rot). Wenn die Zellen aktiviert wurden, konnte man einen deutlichen Unterschied zwischen den Zellen, die nur mit TNF- $\alpha$  (+TNF, blau) behandelt wurden und den Zellen (+TNF, rot), die gleichzeitig mit den Wundauflagen inkubiert wurden erkennen. Die Expression von NF- $\kappa$ B wurde nämlich unter dem Einfluss der Silika-Präparate, um fast die Hälfte signifikant reduziert.

### 3.3.18. Transkriptionsfaktor Assay zur Überprüfung der Aktivität von p65 im Kern

Mit Hilfe dieses Transkriptionsfaktor-Assays wurde die Aktivität der p65-Untereinheit im Nukleus mit Hilfe eines ELISAs gekoppelt mit einem EMSA nachgewiesen.

#### Relativer Gehalt von p65 im Kern

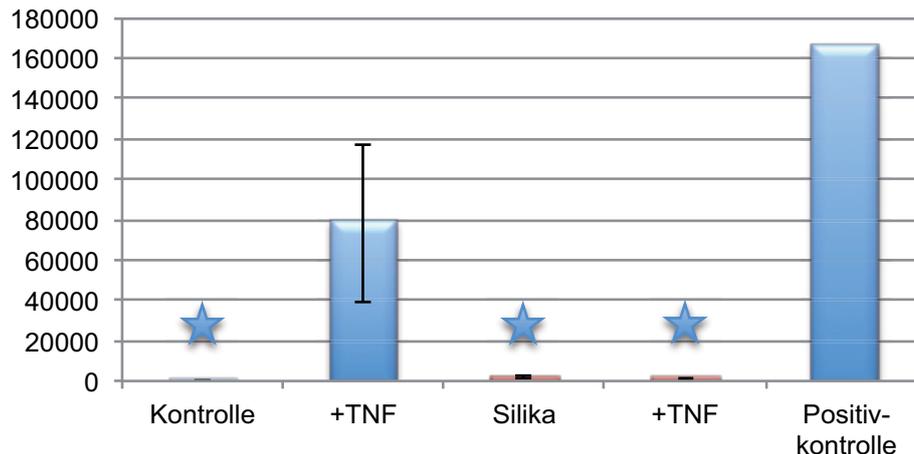


Abbildung 51: Nachweis des Transkriptionsfaktors p65 im Kern, ★ : Werte unterscheiden sich signifikant von der +TNF (blau) und der Positivkontrolle

Eine Inkubation mit den Kieselgel-Wundaufgaben führte zu einer unübersehbaren und signifikanten Reduktion der Aktivierung der Gentranskription durch die p65-Untereinheit im Kern, unabhängig ob die Zellen dabei mit TNF- $\alpha$  aktiviert wurden oder nicht. Die Resultate bestätigen nicht nur die Ergebnisse der Untersuchungen aus 3.3.14. und 3.3.17, sondern zeigen eine noch größere Kompetenz der Siliziumoxid-basierten Vliese die Aktivität von NF- $\kappa$ B zu unterdrücken. Alle diese Ergebnisse könnten auf eine entzündungshemmende Wirkung von NF- $\kappa$ B hinweisen.

### 3.4. Die physiologische Bedeutung der Kieselgel-Wundaufgaben auf die Neo-Angiogenese

Für den Wiederaufbau verletzten bzw. defekten Gewebes ist die Neo-Angiogenese ein elementarer Prozess. In diesem Zusammenhang wurde die Ausbildung von Mikrogefäßen durch Endothelzellen *in vitro* unter dem Einfluss der Vliese analysiert. Dafür wurden Endothelzellen mit den Siliziumoxid-basierten Wundaufgaben inkubiert

und als Positivkontrolle wurde die Angiogenese in Endothelzellen mit einem Wachstumsfaktor (VEGF) induziert. Mit spezifischen Oberflächenmarkern (CD31 und vWF) wurden die Ergebnisse visualisiert und ausgewertet.

### 3.4.1. Immunhistochemische Untersuchung der Neo-Angiogenese mit CD31

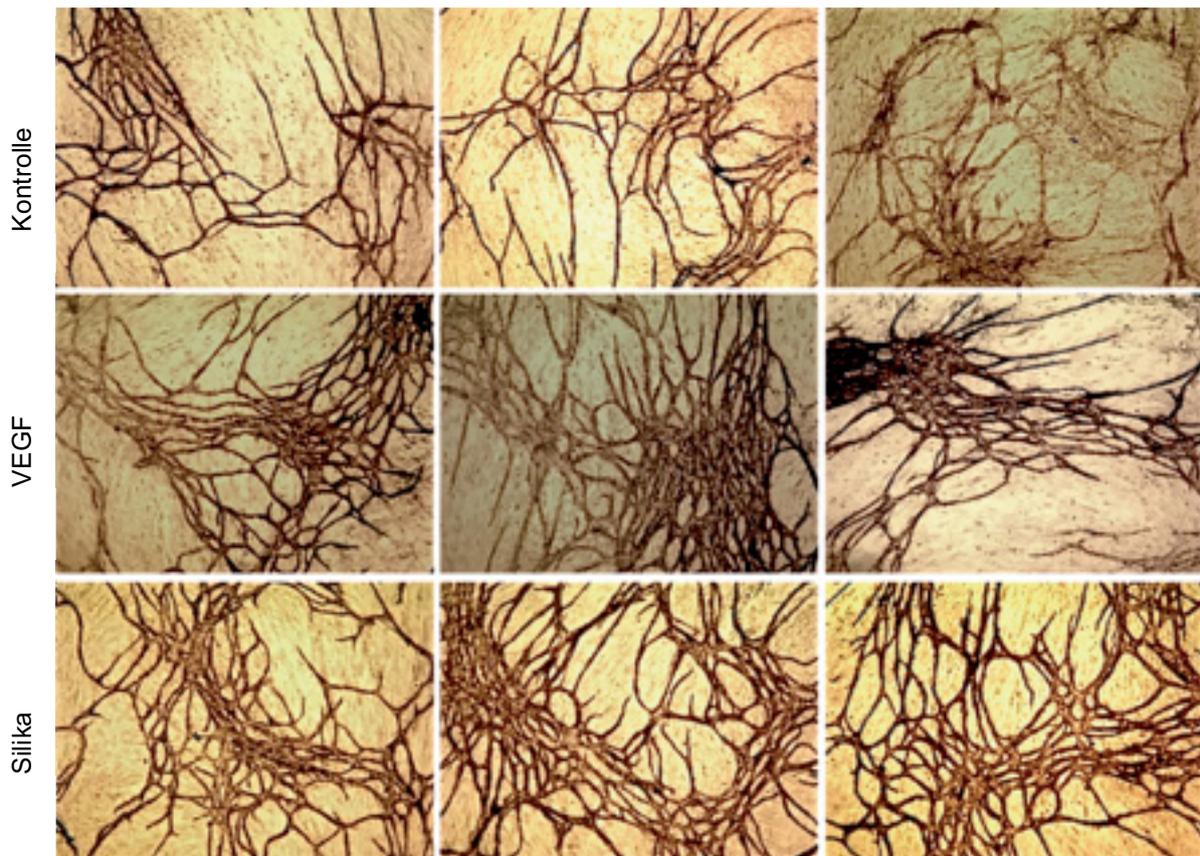


Abbildung 52: Färbung der Endothelzellen mit CD31, oben: Kontrolle, Mitte: Endothelzellen mit VEGF inkubiert, unten: Endothelzellen mit Silika inkubiert

Humane Endothelzellen entwickelten *in vitro* mikrovaskuläre Strukturen, die man mit einem spezifischen Endothelzellmarker (hier CD31) visualisieren konnte (Kontrolle). Verglichen mit der Kontrolle führte eine Inkubation der Endothelzellen mit VEGF zu einer Zunahme der Gefäßneubildung. Die Silika-Präparate (unten) konnten Endothelzellen mindestens genauso gut zur Neo-Angiogenese anregen wie VEGF.

### 3.4.2. Immunhistochemische Untersuchung der Neo-Angiogenese mit vWF (van Willebrand Faktor)

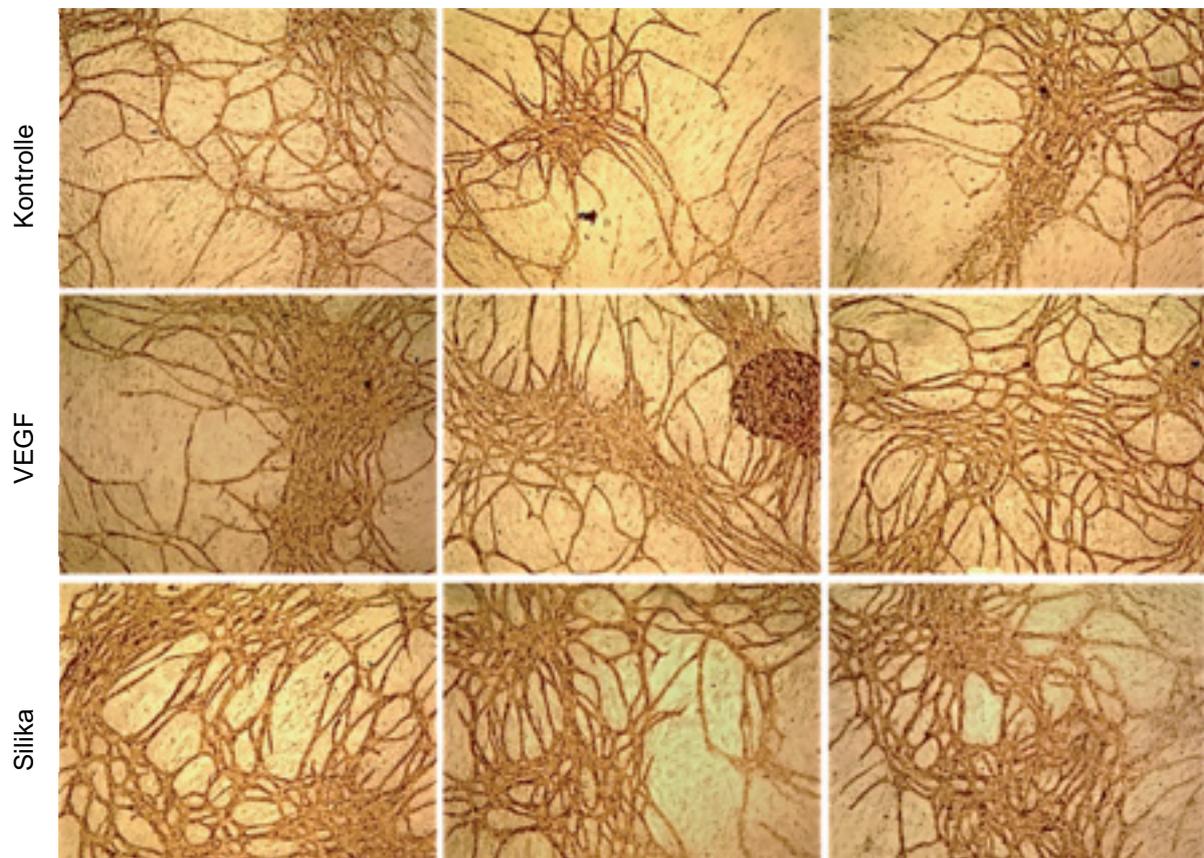


Abbildung 53: Färbung der Endothelzellen mit vWF

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde der Versuch 3.4.1. hier mit dem Endothelzellmarker „vWF“ wiederholt. In Abbildung 53 führte eine Inkubation der Endothelzellen mit VEGF verglichen mit der Kontrolle zu einer Zunahme der Gefäßneubildung. Die Silika-Vliese (unten) konnten Endothelzellen genauso gut zur Neo-Angiogenese anregen wie die Endothelzellen, die mit VEGF inkubiert wurden.

### 3.4.3. Vergleich der immunhistochemischen Untersuchungen

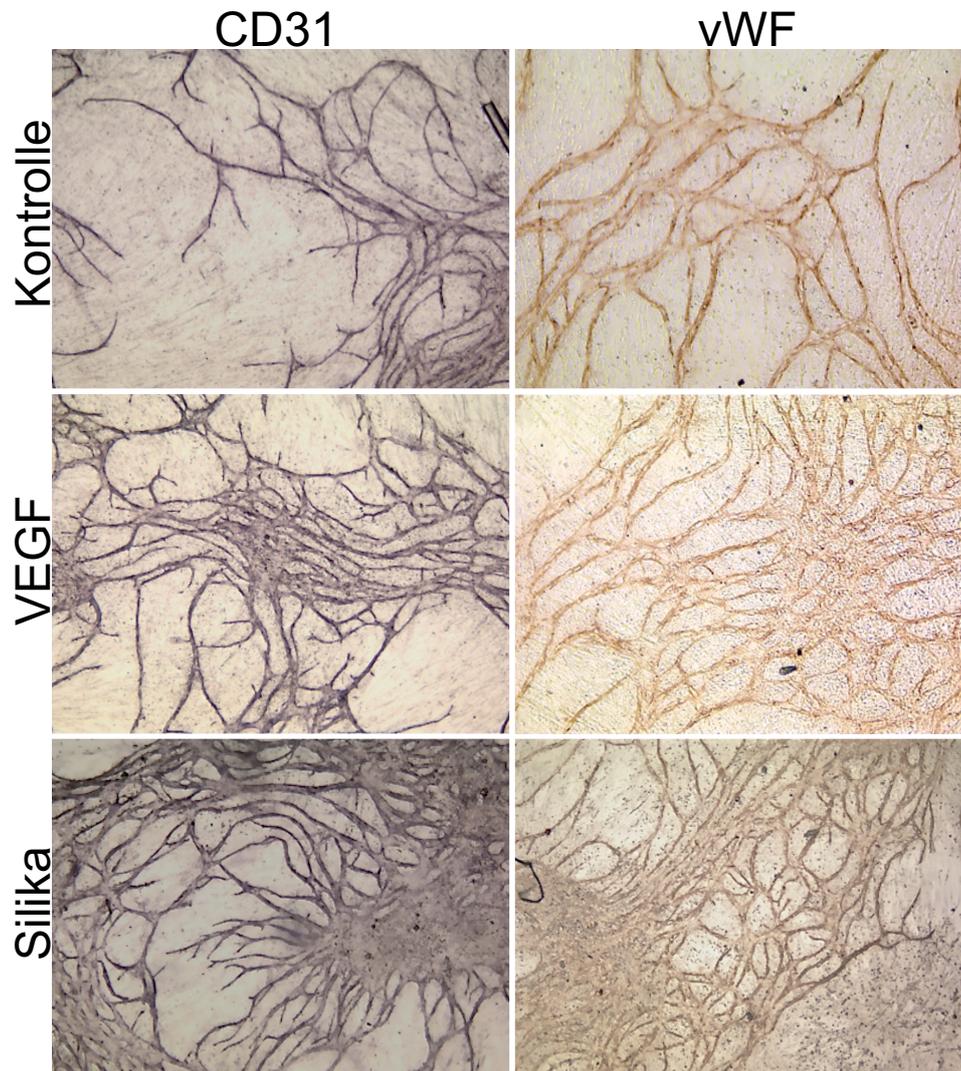


Abbildung 54: Gegenüberstellung der verschiedenen Antikörper, oben: Kontrolle, Mitte: Endothelzellen mit VEGF inkubiert, unten: Endothelzellen mit Silika-Vliesen inkubiert

Humane Endothelzellen bildeten *in vivo* Mikrogefäße aus (Kontrolle). Verglichen mit der Kontrolle, führte die Induktion der Endothelzellen mit VEGF erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Neo-Angiogenese. Wenn man die Aufnahmen „VEGF“ und „Silika“ miteinander vergleicht, zeigen Endothelzellen, die mit den Kieselgel-Wundauflagen inkubiert werden mindestens dasselbe Potenzial zur Kapillarausbildung wie die mit VEGF induzierten Zellen.

### 3.4.4. Vergleichende Quantifizierung der relativen Gefäßdichte

Die Bilder der Abbildung 54 wurden in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt und dann mit Hilfe der densitometrischen Analyse miteinander verglichen. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines Balkendiagrammes (Abb.55) dargestellt.

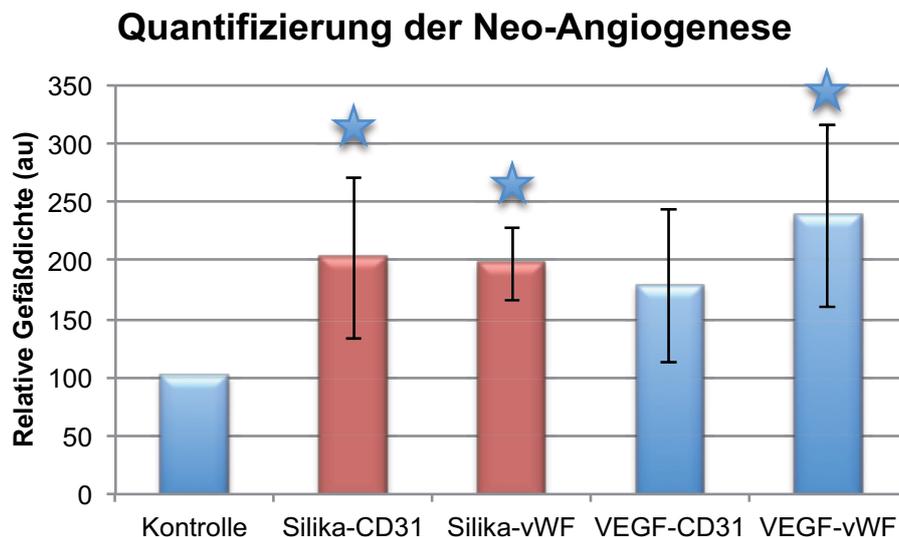


Abbildung 55: Gegenübergestellt werden mit unterschiedlichen Antikörpern markierte Endothelzellen ★ : die Werte sind im Vergleich mit der Kontrolle signifikant

In Abbildung 55 kann man deutlich erkennen, dass eine Inkubation mit den Siliziumoxid-basierten Vliesen zu einer signifikanten Steigerung der Neo-Angiogenese führte und mit der Erhöhung durch VEGF vergleichbar war. Bei dieser Auswertung schien die Benutzung des vWF-Antikörpers aber vorteilhafter zu sein, weil dieser Faktor kontinuierlichere Ergebnisse lieferte.

### 3.4.5. Quantifizierung der Neo-Angiogenese mit CD31

Im Rahmen der Experimente zur Neo-Angiogenese wurden von Seiten des Kooperationspartners vier verschiedene Vliestypen zur Verfügung gestellt. Diese unterschieden sich ausschließlich in den Ablüftzeiten nach dem Herstellungsprozess. Welchen Einfluss die unterschiedlichen Ablüftzeiten auf die Neo-Angiogenese haben, wurde immunhistochemisch mit dem CD31 Antikörper nachgewiesen. Für die densitometrische Analyse wurden von den Originalbildern Schwarz-Weiß-Bilder erstellt und diese wurden entsprechend ausgewertet.

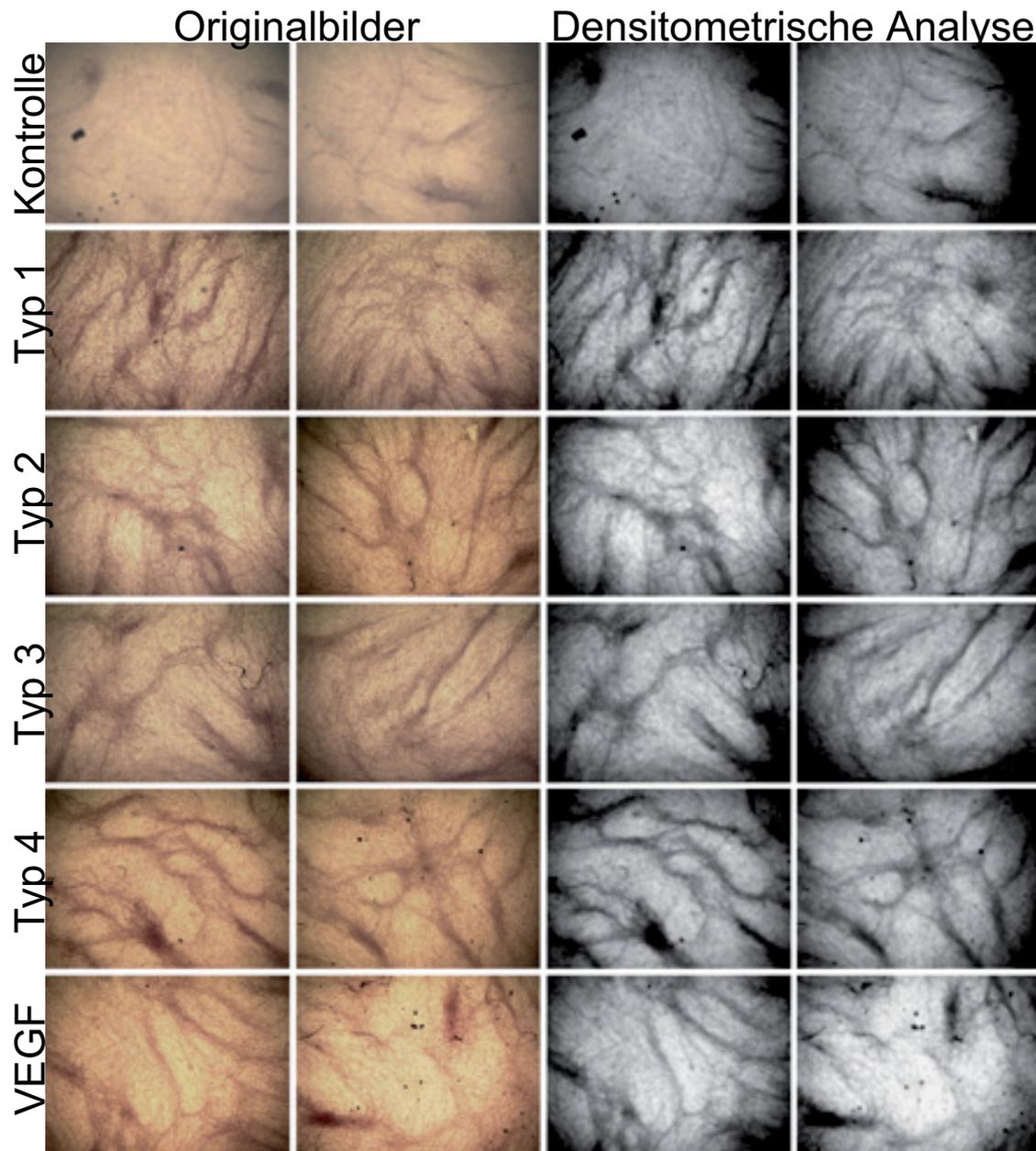


Abbildung 56: Mikroskopische Aufnahmen von den Endothelzellen und vergleichend die daraus erstellten Schwarz-Weiß-Bilder für die densitometrische Analyse

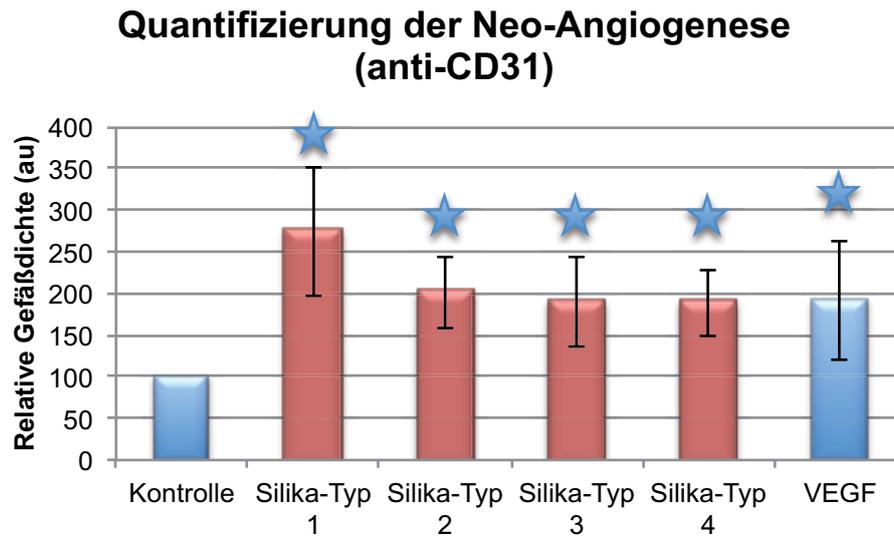


Abbildung 57: Quantifizierung der relativen Gefäßdichte mit dem CD31-Antikörper

Im Vergleich mit der Kontrolle konnte in allen Proben eine Zunahme der Gefäßneubildung erreicht werden. Wobei das Silika-Präparat mit der geringsten Ablüftzeit „Typ 1“ in der Lage war, die Neo-Angiogenese sogar im Vergleich mit den VEGF-behandelten Zellen deutlich zu steigern (Abb. 57).

### 3.4.6. Quantifizierung der Neo-Angiogenese mit vWF-Antikörper

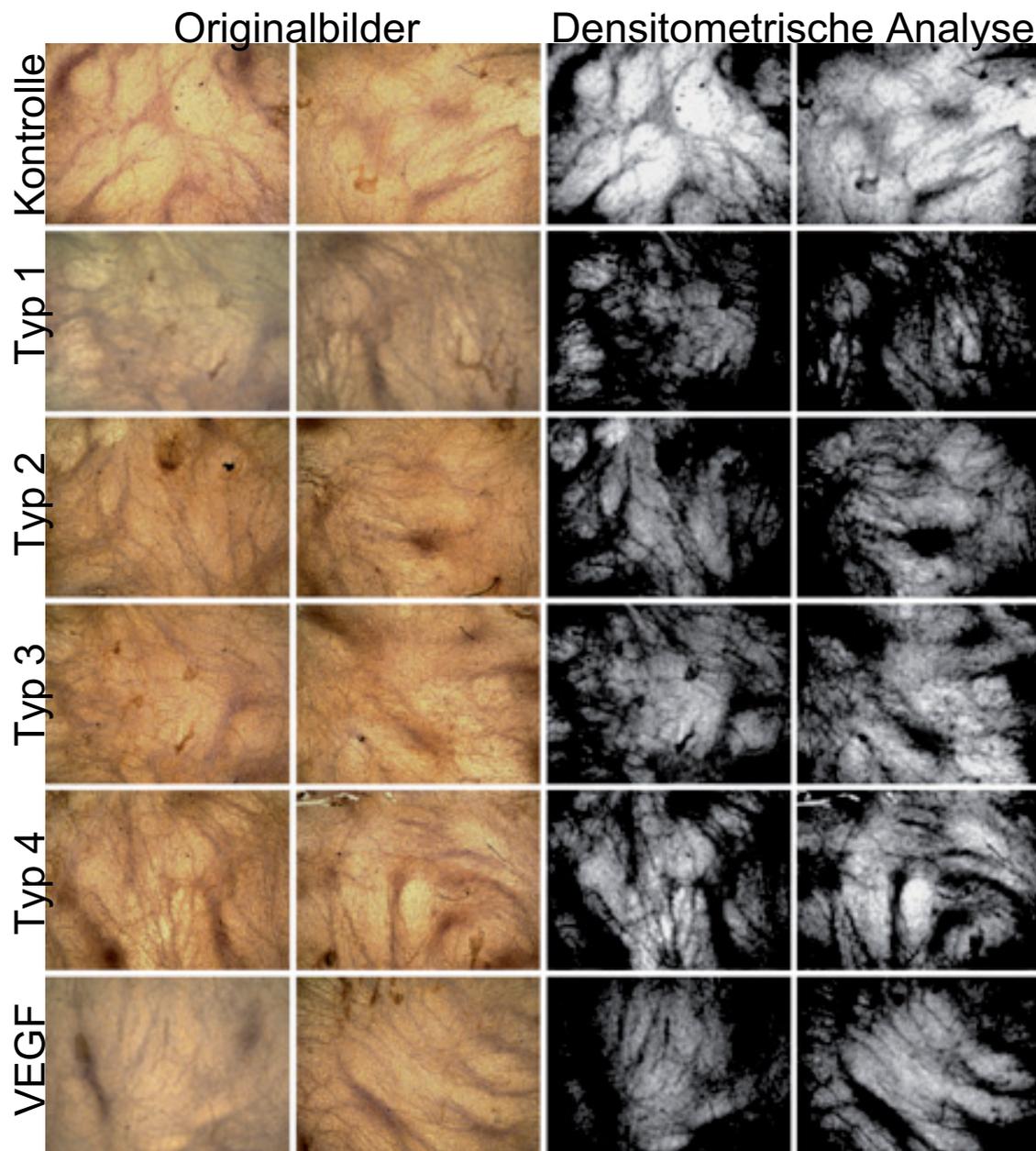


Abbildung 58: Mikroskopische Aufnahmen von den Endothelzellen und vergleichend die daraus erstellten Schwarz-Weiß-Bilder für die densitometrische Analyse

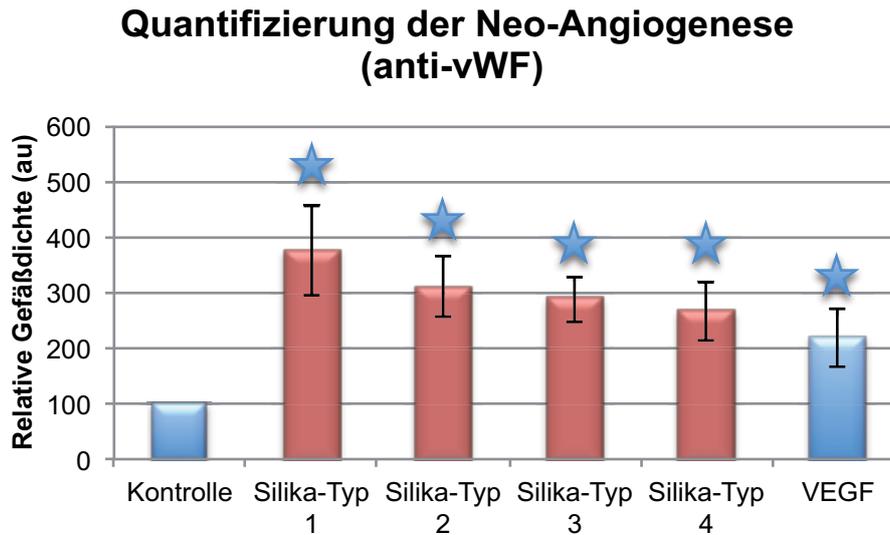


Abbildung 59: Auswertung der densitometrische Analyse der Neo-Angiogenese, ★ : die Werte sind im Vergleich mit der Kontrolle signifikant

Die densitometrische Analyse der Schwarz-Weiß-Bilder zeigte eine signifikante Erhöhung der vaskulären Strukturen in allen Proben im Vergleich mit der Kontrolle. In diesem Nachweissystem ist allerdings der Unterschied zwischen den Endothelzellen, die mit VEGF (ca. 220 au) inkubiert und den Zellen die mit den Silika-Vliesen Typ 1 inkubiert wurden noch deutlicher und zwar war die Gefäßdichte im Vergleich fast doppelt so hoch (ca. 390 au).

### 3.4.7. Untersuchung der durch die Kieselgel-Wundaufgaben induzierten VEGF-Synthese

VEGF ist ein Signalmolekül, das die Angiogenese von Endothelzellen stimuliert. Um zu untersuchen, ob die Steigerung der Neo-Angiogenese in Endothelzellen, die mit den Siliziumoxid-basierten Vliesen inkubiert wurden, durch eine Erhöhung der endogenen VEGF-Expression ausgelöst sein könnte, wurde mit Hilfe eines ELISA-Assays der VEGF-Gehalt in diesen Zellen bestimmt. Der VEGF-Gehalt wurde im Verhältnis des Gesamtproteingehaltes der lysierten Zellen ermittelt und in nachfolgender Abbildung dargestellt. In dieser Versuchsdurchführung wurde alle drei Tage das Zellkulturmedium gewechselt. Das detektierte VEGF repräsentiert die Menge, die sich nach drei Tagen Inkubation akkumulierte.

### Effekt der Silika-Vliese auf die endotheliale VEGF-Synthese

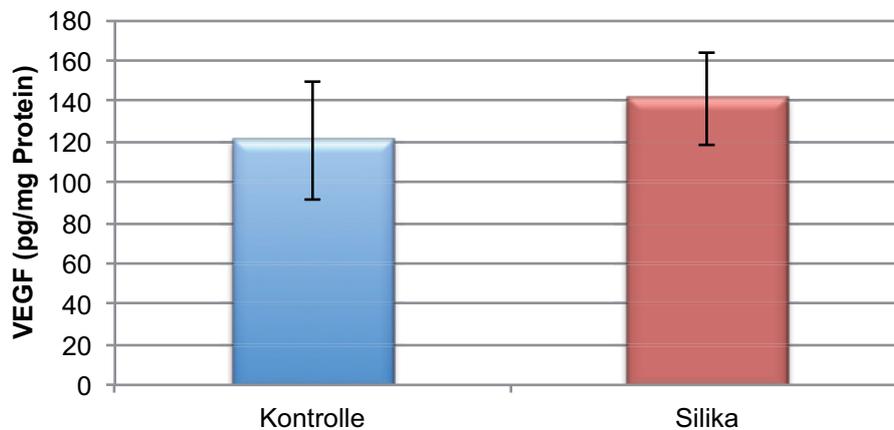


Abbildung 60: VEGF-Gehalt in mit Silika-Vliesen inkubierten Endothelzellen

Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die Silika-Vliese keinen Einfluss auf die VEGF-Synthese haben.

#### 3.4.8. Effekt der Kieselgel-Wundauflagen auf die VEGF-Synthese

In diesem Versuch wurde der VEGF-Gehalt in den Zellen analysiert, die mit verschiedenen Typen der Silika-Vliese inkubiert wurden. Im Gegensatz zu dem vorangegangenen Versuch 3.4.7. wurde das Zellkulturmedium nicht nach drei Tagen ausgetauscht, sondern jeden dritten Tag wurde neues Medium hinzugegeben. Nach zwölf Tagen wurde der VEGF-Gehalt bestimmt und im Verhältnis zu dem Proteingehalt der lysierten Zellen berechnet.

## Effekt der Silika-Vliese auf die endotheliale VEGF-Synthese

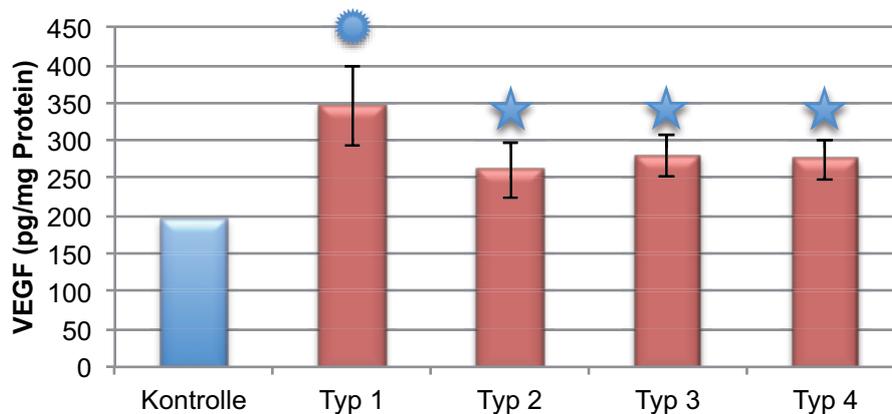


Abbildung 61: VEGF-Gehalt in mit verschiedenen Silika-Vliesen inkubierten Endothelzellen, ★ :  $p < 0,05$  die Werte sind im Vergleich mit der Kontrolle signifikant, ● :  $p < 0,05$  Werte sind signifikant im Vergleich mit der Kontrolle und den Silika-Vliesen Typ 2-4

Im Vergleich mit der Kontrolle war der VEGF-Gehalt in allen Proben signifikant erhöht. Außerdem konnte man in dem Silika-Vlies Typ 1 eine signifikante Erhöhung der endogenen VEGF-Synthese im Gegensatz zu den anderen Proben feststellen. Dies bedeutet, dass die Wundauflagen sehr wohl einen Einfluss auf die endogene VEGF-Synthese haben, aber nach einer Inkubationszeit von nur drei Tagen die Detektionsgrenze des benutzten ELISAs noch nicht erreicht wurde.

### 3.4.9. Untersuchung des Einflusses von Suramin (einem VEGF-Inhibitor) auf die Neo-Angiogenese

Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit der Siliziumoxid-basierten Präparate pro-angiogenetisch auf Endothelzellen zu wirken durch den Induktor VEGF initiiert wird, wurden Zellen mit den Silika-Präparaten, bzw. mit VEGF inkubiert. Außerdem wurde eine Kontrolle mitgeführt. Für das Experiment wurden die gleichen Proben mit Suramin, einem VEGF-Inhibitor behandelt.

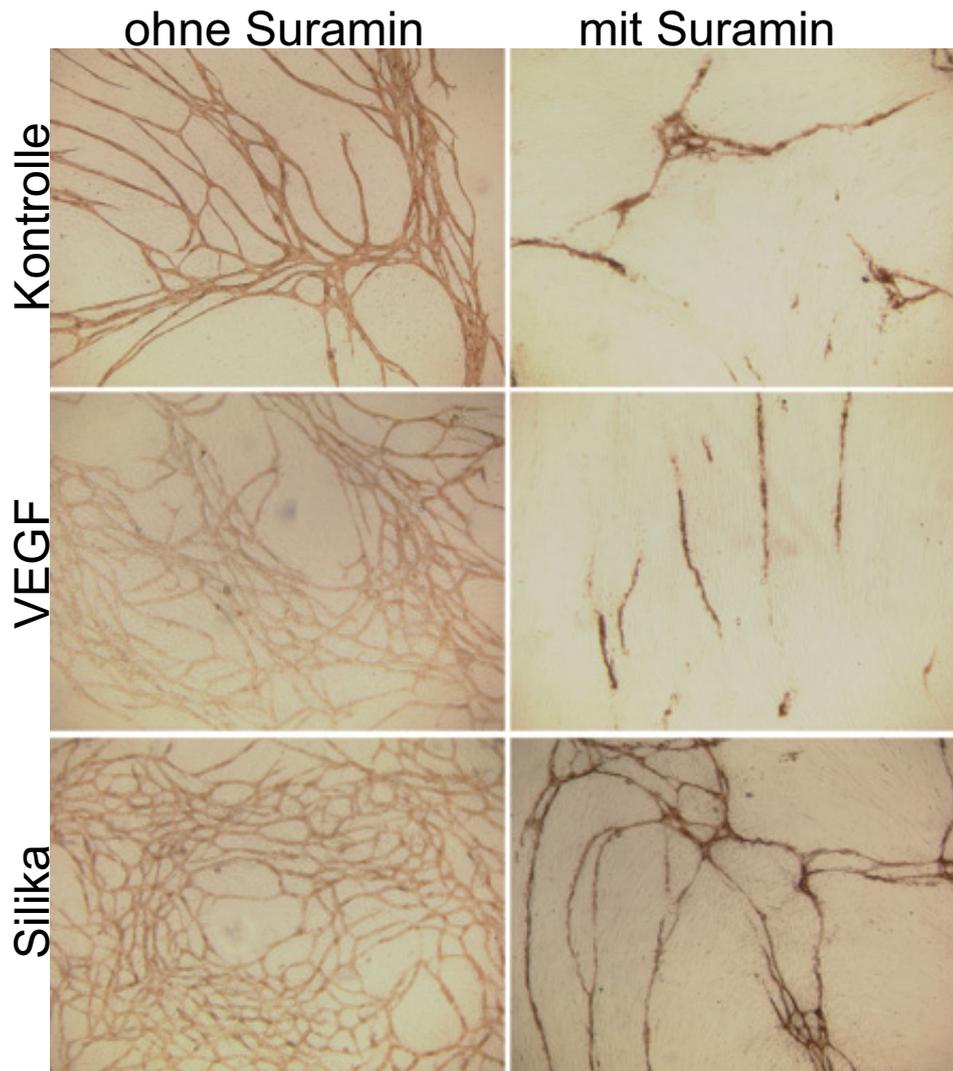


Abbildung 62: Mikroskopische Aufnahmen von den Endothelzellen, die immunhistochemisch mit dem Antikörper CD31 visualisiert worden sind und vergleichend die gleichen Proben mit Suramin inkubiert

Verglichen mit der Kontrolle führte eine Inkubation mit VEGF zu einer verstärkten Kapillarausbildung. Die Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen vermochte Endothelzellen genauso zur Angiogenese anzuregen, wie die mit VEGF kultivierten Zellen. Der VEGF-Inhibitor Suramin inhibierte die Angiogenese in allen Proben (rechte Abbildungen). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die pro-angiogenetische Wirkung der Kieselgel-Wundauflagen zu einem wesentlichen Bestandteil über VEGF vermittelt wird.

### 3.4.10. Quantitative Evaluierung des Effektes von Suramin auf die Angiogenese

Um die Ergebnisse aus 3.4.9. quantitativ zu erfassen, wurden die Bilder densitometrisch ausgewertet und in einem Balkendiagramm dargestellt.

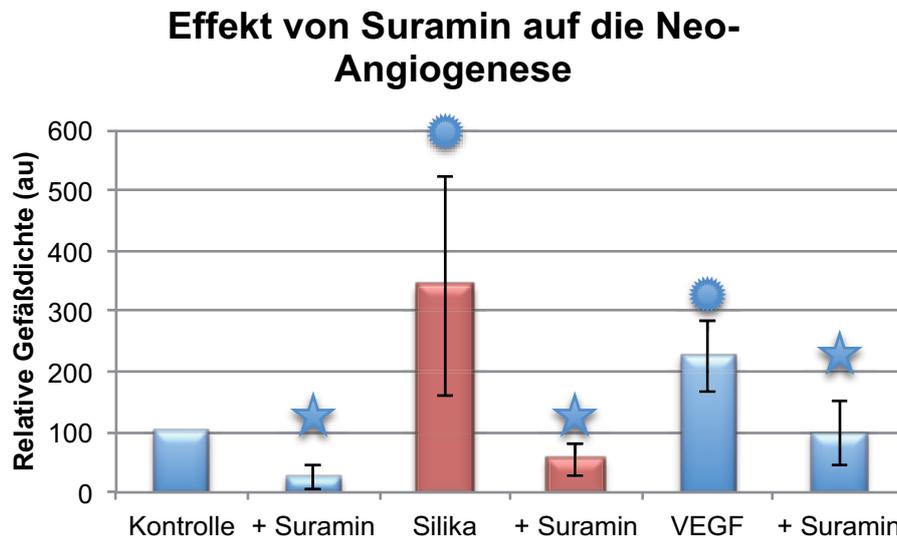


Abbildung 63: Densitometrische Analyse der Gefäßdichte, ★ : Werte sind im Vergleich mit der Kontrolle signifikant, ● : Werte sind signifikant im Vergleich mit der Kontrolle und den Zellen, die ohne Suramin inkubiert worden sind

Im Vergleich mit der Kontrolle führte die Inkubation mit VEGF zu einer Erhöhung der Gefäßneubildung der Endothelzellen. Die Silika-Vliese zeigten mindestens die gleiche Fähigkeit wie der Induktor VEGF. Der VEGF-Inhibitor Suramin inhibierte die Silika-induzierte Neo-Angiogenese signifikant. Die Ergebnisse aus 3.4.8-3.4.10 lassen den Schluss zu, dass die durch die Kieselgel-Wundaufgaben induzierte pro-angiogenetische Kompetenz hauptsächlich über VEGF vermittelt wird.

### 3.4.11. Untersuchung des Effektes der Silika-Vliese auf die Synthese von Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )

TGF- $\beta$  ist ein multifunktionales Protein, das u.a. an der Synthese der extrazellulären Matrix in Endothelzellen beteiligt ist. Über die Bindung an Serin/Threonin-Rezeptorkinasen kann es zu einer Aktivierung von VEGF kommen.

Wobei die Menge von TGF- $\beta$  mit der aktivierten Menge VEGF invers korrelieren kann. In diesem Versuch sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Wundaufgaben

gen auf die TGF- $\beta$ -Synthese haben. In Überständen humaner Endothelzellen, die über einen Zeitraum von 11 Tagen mit den Vliesen inkubiert wurden, wurde mit einem ELISA-Assay der TGF- $\beta$  Proteingehalt bestimmt. Dieser Gehalt wurde mit dem gesamten Proteingehalt der lysierten Zellen verglichen.

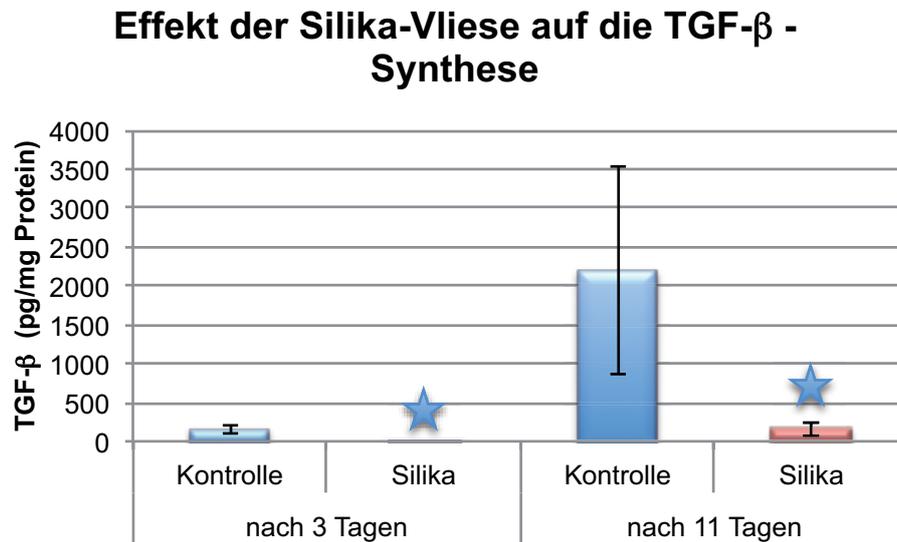


Abbildung 64: TGF- $\beta$  Gehalt in Endothelzellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, ★ : Werte sind im Vergleich mit der Kontrolle signifikant, n=4

Im Gegensatz zu beiden Kontrollen wurde die TGF- $\beta$ -Synthese durch die Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen deutlich und signifikant reduziert. Die Induktion der VEGF-Proteinsynthese könnte also über TGF- $\beta$  vermittelt werden.

### 3.5. Kollagensynthese

Die Narbenbildung nach Traumata oder Verbrennungen stellt ein medizinisches Problem dar. Neben ästhetischen Konsequenzen kann es u.a. zu Funktionseinschränkungen und einer Abnahme von Beweglichkeit und Wachstum des Gewebes kommen. Eine Ursache der mangelnden Beweglichkeit vernarbten Gewebes ist, dass im vernarbten Gewebe das von den Fibroblasten synthetisierte Kollagen nicht mehr netzartig verzweigt ist, sondern die Kollagenfasern parallel angeordnet sind.

Manche Personen neigen insbesondere zur Keloidbildung, die eine pathologische Form der Narbenbildung darstellt. Ursache ist neben einer genetischen Disposition

u.a. eine Aktivierung von Fibroblasten durch TGF- $\beta$  in deren Folge es zu einer Transformation der Fibroblasten zu Myofibroblasten und einer erhöhten Kollagensynthese kommen kann. Vor diesem Hintergrund war die Untersuchung der Wirkung der Silika-Vliese auf die Kollagensynthese folgerichtig.

### 3.5.1. Kollagensynthese in Fibroblasten

Mit Hilfe eines ELISA-Assays wurde der Kollagengehalt bestimmt. Dieser Gehalt wurde mit dem gesamten Proteingehalt der lysierten Zellen verglichen und gegen die Kontrolle normiert.

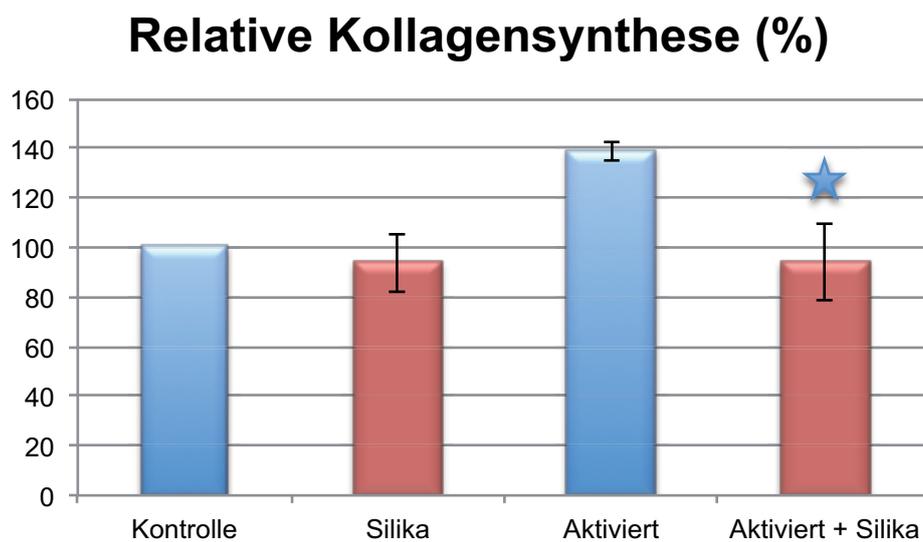


Abbildung 65: Kollagensynthese in Fibroblasten, n=6 (aus jeweils 10 Patienten werden Fibroblasten isoliert und in 3 Zellpools zusammengeführt) ★ : signifikant mit der Kontrolle verglichen

## Relative Kollagensynthese (%)

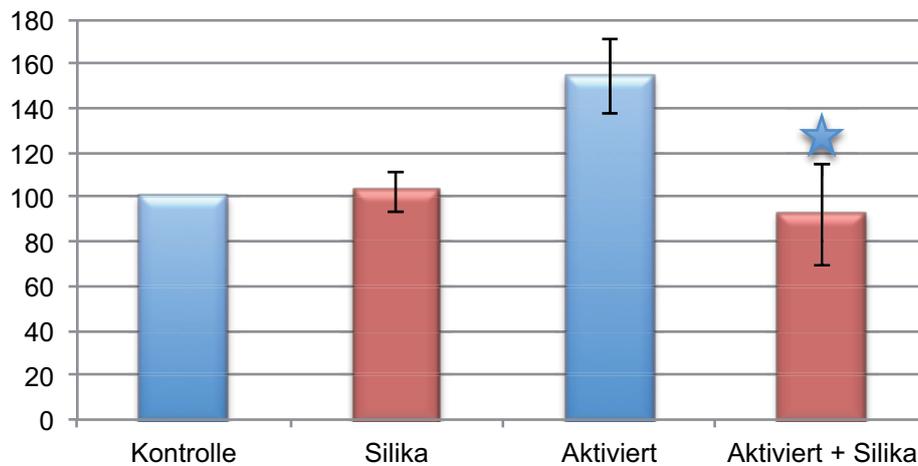


Abbildung 66: Kollagensynthese in Fibroblasten, n=6 (aus jeweils 10 Patienten werden Fibroblasten isoliert und in je 4 Zellpools zusammengeführt) ★ : mit der Kontrolle verglichen

Die Silika-Vliese beeinflussten die Expression von Kollagen in Langzeitkulturen ruhender Fibroblasten nicht. Wurden die Zellen allerdings zur Kollagensynthese durch TGF- $\beta$  und Vitamin C aktiviert, führte eine Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen Reduktion dieser Synthese. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Kieselgel-Wundauflagen einer Narben- bzw. Keloidbildung entgegen wirken könnten.

### 3.5.2. Untersuchung von $\alpha$ SMA als Indikator für Myofibroblasten als ein narbenbildender Parameter im Wundheilungsprozess

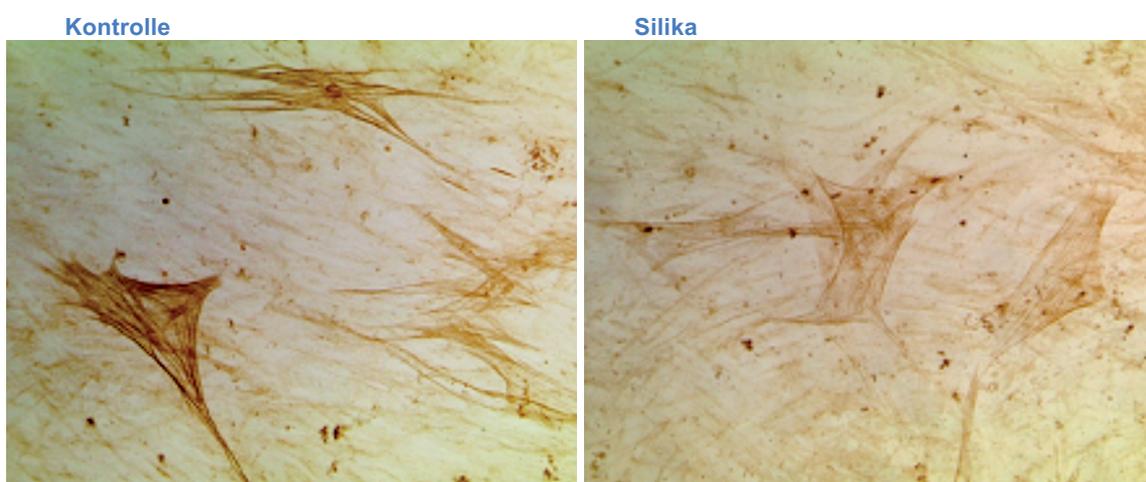


Abbildung 67: Fibroblasten als Kontrolle (links), Fibroblasten mit Silika-Vliesen (rechts)

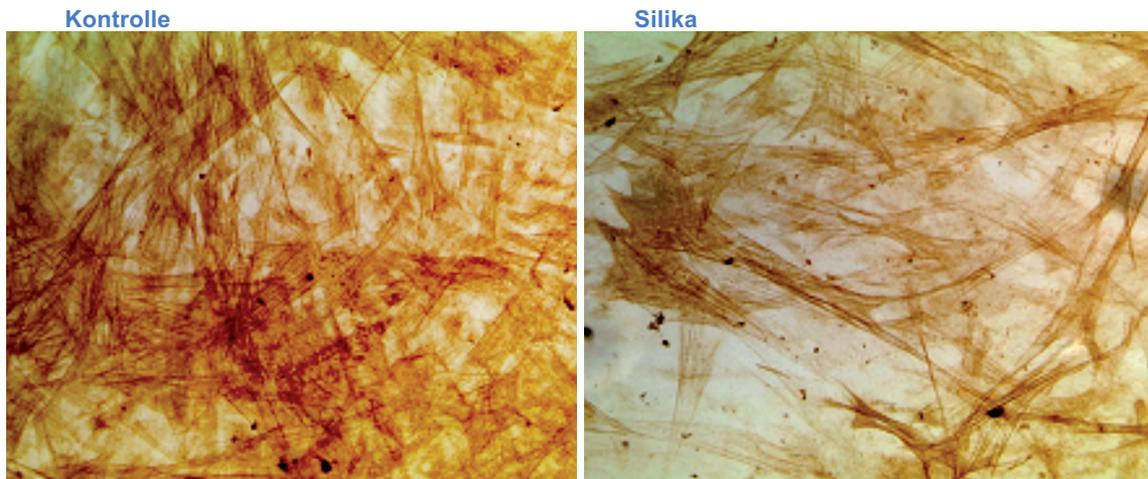
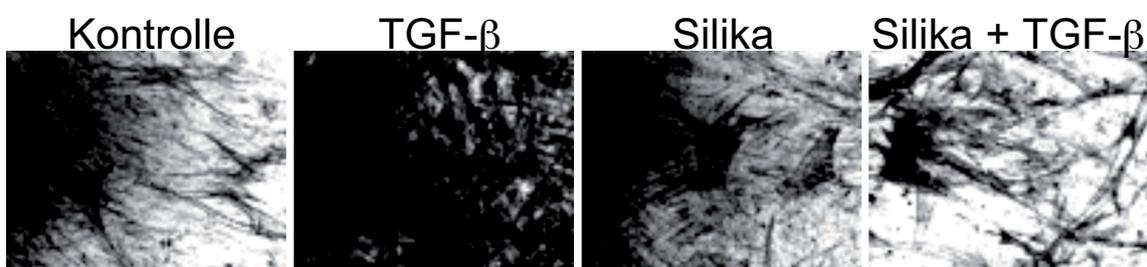
Inkubation der Fibroblasten mit TGF- $\beta$ 

Abbildung 68: Fibroblasten mit TGF- $\beta$  (links), Fibroblasten mit TGF- $\beta$  und Silika-Vliesen (rechts)

Kultivierte man Fibroblasten mit den Silika-Präparaten ohne diese Zellen zu stimulieren, konnte man kaum einen Effekt bemerken (Abb. 67). Wurden die Zellen allerdings mit TGF- $\beta$  und Vitamin C zur  $\alpha$ SMA-Synthese und der darauf folgenden Differenzierung in Myofibroblasten angeregt, waren die Kieselgel-Wundauflagen in der Lage die  $\alpha$ SMA-Synthese deutlich (Abb. 68) zu reduzieren.

### 3.5.3. Relative Quantifizierung der $\alpha$ SMA Synthese in Fibroblasten

In diesem Versuchsteil wurden von den behandelten Fibroblasten exemplarische Aufnahmen mit dem Mikroskop gemacht. Diese Bilder wurden in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt und densitometrisch ausgewertet.



### Quantifizierung der $\alpha$ SMA-Synthese in Fibroblasten

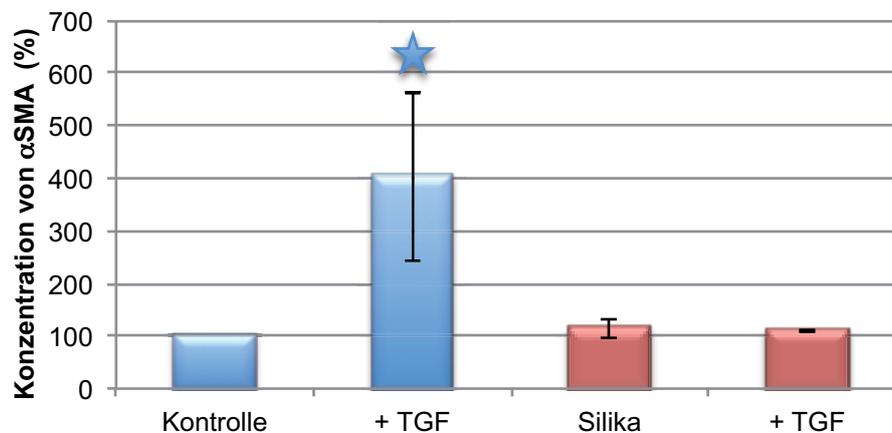


Abbildung 69: Densitometrische Auswertung der  $\alpha$ SMA Synthese in Fibroblasten, in blau: Kontrollen, in rot: mit Silika-Vliesen inkubierte Zellen, ★ : signifikant im Vergleich mit den anderen Proben

Wie man in Abbildung 69 gut erkennen kann, führte eine Inkubation von Fibroblasten mit TGF- $\beta$  zu einer ungefähr vierfachen Erhöhung von  $\alpha$ SMA. Fibroblasten, die hingegen mit TGF- $\beta$  und den Vliesen inkubiert wurden synthetisierten nur soviel  $\alpha$ SMA wie die Kontrollzellen. Die Kieselgel-Wundauflagen sind also in der Lage eine durch TGF- $\beta$  induzierte  $\alpha$ SMA-Synthese zu inhibieren. Diese *in vitro* Experimente weisen auf eine protektive Funktion der Silika-Vliese hin und lassen vermuten, dass sie die Entstehung von hypertrophen Narben und Keloiden reduzieren, wenn nicht gar verhindern könnten.

#### 3.5.3. Untersuchung von TGF- $\beta$ in Fibroblasten als ein narbenbildender Parameter im Wundheilungsprozess

Da TGF- $\beta$  ein Induktor der  $\alpha$ SMA-Synthese ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Kieselgel-Wundauflagen die Expression von TGF- $\beta$  beeinflussten. Die humanen Zellen wurden für 72 h mit den Silika-Präparaten inkubiert. Mit einem ELISA-Assay wurde im Anschluss die Konzentration von TGF- $\beta$  im Überstand lysierter Zellen gemessen und mit der Proteinmenge pro mg ins Verhältnis gesetzt.

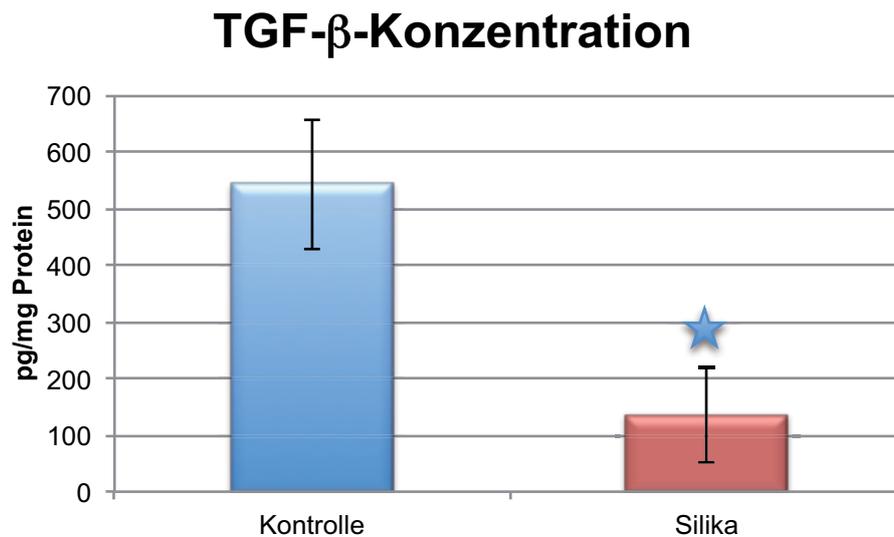


Abbildung 70: Relative Konzentration von TGF- $\beta$  in mit Interleukin-1 $\beta$  aktivierten Fibroblasten, n=9, ★ :  
signifikant

Durch die Inkubation mit den Kiesel-Wundauflagen wurde die TGF- $\beta$ -Konzentration um den Faktor 4 signifikant erniedrigt. Dies könnte bedeuten, dass die Vliese eine hypertrophe Narbenbildung, wie sie z.B. bei Brandwunden entstehen, verhindern.

## 4. Diskussion

Die Wundbehandlung dient neben dem Schutz vor Infektionen auch der Wiederherstellung der Integrität der Haut. Durch den stetig steigenden Bedarf an der Versorgung von Problemwunden, aufgrund der Zunahme des metabolischen Syndroms und der demographischen Entwicklung, nehmen die Anstrengungen zu eine adäquate Wundbehandlungstherapie zu entwickeln. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts gibt es schon heute in der Bundesrepublik 400.000 Patienten pro Jahr mit einem Dekubitusgeschwür (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2005). Für die Wundversorgung ist ein breites Spektrum verschiedenster Wundauflagen kommerziell erhältlich. Allerdings zeigen selbst Wundmaterialien, die das Prinzip der feuchten Wundbehandlung beinhalten, nur mäßigen Erfolg bei der Versorgung problematischer Wunden.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Siliziumoxid-basierte, anorganische und somit völlig neuartige Wundaufgabe auf ihre biologische Wirksamkeit, toxikologischen Eigenschaften, ihre Wirkung auf die Neo-Angiogenese und pro-inflammatorische Parameter untersucht.

### 4.1. Der Einfluss der Silika-Vliese auf die Toxizität

Die Kultivierung humaner Fibroblasten in direktem Kontakt mit den Silika-Vliesen führte zum nekrotischen Zelltod einiger Zellen (Abb. 5-7). Die Zellen konnten keinen Monolayer ausbilden, sondern unterlagen wie wir es *in vitro* beobachten konnten mechanischen Scherkräften, die zytotoxisch auf die Zellen wirkten (Abb. 5-7, Pfeile). Aus diesem Grunde haben wir in allen nachfolgenden *in vitro* Versuchen *Cell Culture Inserts* benutzt. Diese Einsätze gewährleisten eine räumliche Trennung der Zellen von den Kieselgel-Wundaufgaben, verhindern aber nicht den Stoffaustausch.

Ob sich bei einer Applikation der Kieselgel-Wundaufgaben auf humanes Wundgewebe, die gleichen Scherkräfte entwickeln könnten, wie wir es *in vitro* beobachten konnten, bleibt dagegen fraglich, denn bei der Anwendung der Silika-Präparate im Schweinmodell (nicht publizierte Daten) konnten keine lokalen nekrotischen Ereignisse als Folge der Verwendung der Vliese beobachtet werden. Der Grund für diese Beobachtung ist sicherlich, dass die Zellen der Haut *in vivo* dadurch geschützt sind, dass sie sich in einer dreidimensionalen Struktur befinden, die reich an extrazellulä-

rer Matrix ist und in die Kollagene und elastische Fasern eingebettet sind. Diese schützen vor Zugkräften und Kompressionen.

Wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt haben wir keine sichtbaren nekrotischen oder apoptotischen Ereignisse beobachten können (Abb. 4). Die Morphologie der Zellen war von den Kontrollzellen nicht zu unterscheiden. Wir konnten eindeutig zeigen, dass die Kieselgel-Wundaufgaben nicht toxisch sind und somit grundlegende Voraussetzungen für eine Applikation als Wundaufgabe erfüllen. Um möglichen negativen, mechanischen Einflüssen der Silika-Vliese zu entgehen, wäre aber auch eine Anwendung der Silika-Präparate in Mikrosphären, ähnlich wie die Arbeitsgruppe um Silva (2012) sie in ihren Experimenten benutzten oder in Lipidvesikeln möglich (Xiang et al., 2011).

Bei der Untersuchung der Wirkung der Silika-Präparate auf die Vitalität von Fibroblasten und Endothelzellen konnten wir keinen negativen Einfluss beobachten (Abb. 10-12). Im Gegensatz dazu konnte als Folge der Silika-Exposition eine signifikant erniedrigte Zellzahl der Makrophagen festgestellt werden (Abb. 13), obwohl morphologisch kein Unterschied zwischen den Silika-behandelten und den nicht Silika-behandelten Makrophagen, festgestellt werden konnte. Eine Apoptose oder Nekrose konnte als Ursache für das verminderte Wachstum der dieser Zellen ausgeschlossen werden (Abb. 17+18). Da Makrophagen als Zellen der angeborenen Immunabwehr Makromoleküle und Fremdpartikel (Hahn et al., 2009) erkennen und diese phagozytieren (Metschnikoff, 1882 und 1884), wurden die Phagosomen der murinen (RAW-Zelllinie) und der humanen (THP-1-Zellen) Makrophagen mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle mikroskopisch verglichen. Es konnte kein Einfluss der Kieselgel-Wundaufgaben auf die Größe oder Anzahl der in den Zellen enthaltenen Phagosomen erkannt werden (Abb. 19-22).

Daraufhin wurde massenspektrometrisch analysiert, ob die Zellen das Vliesmaterial phagozytierten. Es konnte in Langzeitexpositionen nachgewiesen werden, dass die murinen Makrophagen im Vergleich zu humanen Makrophagen signifikant mehr Mengen des Materials inkorporierten (Abb. 23+24). Die Aufnahme der Siliziumoxid-basierten Vliese durch Makrophagen könnte einen *respiratory burst* auslösen und wäre durch die schnelle Zunahme der Stoffwechselaktivität gekennzeichnet, in dessen Folge die phagozytierten Organismen abgetötet und verdaut werden (Babior, 1984; Borregaard, 1985). Es wäre denkbar, dass die Proliferation durch den dabei

entstehenden oxidativen Stress gehemmt werden würden. Diese Proliferationsabnahme der Makrophagen würde für eine therapeutische Anwendung der Kieselgel-Wundauflagen *in vivo* nicht von Bedeutung sein, denn im Gegensatz zu den in den Experimenten benutzten Zellkulturlinien proliferieren Makrophagen in der Regel *in vivo* nicht (Dipietro et al., 1995).

## 4.2. Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Proliferation

Bei der Untersuchung der Vliese auf ihre Wirkung auf Proliferation und Teilungsfähigkeit konnten wir feststellen, dass im Langzeitversuch die Teilungsfähigkeit von Fibroblasten und Endothelzellen nicht beeinflusst wurde (Abb. 25-28). Anders verhielt es sich bei den mit den Silika-Präparaten inkubierten Makrophagen, deren Zellzahl war am Tag 7 und Tag 10 signifikant erniedrigt. In dem Versuch 3.2.5. konnte jedoch gezeigt werden, dass die Silika-Präparate zwar kurzzeitig die Proliferation der RAW-Zelllinie einschränkten, dass die Vliese aber keinen Einfluss auf die Langzeitproliferation der Makrophagen haben, denn spätestens ab dem 16. Tag überstieg die Anzahl der Zellen, die mit den Kieselgel-Wundauflagen kultiviert wurden die der Kontrollzellen (Abb. 29).

Keratinozyten, die mit den Vliesen behandelt wurden, wiesen eine verringerte Proliferationsrate gegenüber ihren Kontrollzellen auf (Abb. 30). Diese Proliferationshemmung konnte eindeutig zurückgeführt werden auf eine Silika-induzierte Differenzierung der Keratinozyten. Wie bereits von Krischel et al. (1998) gezeigt werden konnte, führt die Induktion der Differenzierung zum Proliferationsstopp in Keratinozyten. Es wäre vorstellbar, dass die Inkubation mit den Silika-Vliesen entweder zu einer Erhöhung der endogenen NO-Synthese in Keratinozyten führt, was die Differenzierung der Keratinozyten zur Folge hätte (Krischel et al., 1998), oder dass das Silizium die Wirkung von Kalzium auf Keratinozyten mimikriert. Denn Kalzium ist konzentrationsabhängig in der Lage, die Differenzierung von Keratinozyten zu induzieren (Bikle, 2004). Weiterhin wäre es möglich, dass die Silika-induzierte Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Expression zu der erwähnten Differenzierung führt (siehe Kapitel 3.3. Effekte der Kieselgel-Wundauflagen auf inflammatorische Parameter). Ein solcher Vorgang wurde von Yang et al. (2012) in dentalen Pulpa Stammzellen gezeigt.

Die Silika-Präparate scheinen keinen schädlichen Einfluss auf die Physiologie der Keratinozyten zu haben. Eine verminderte Anzahl proliferierender Keratinozyten im

Wundheilungsprozess als Folge der Silika-Exposition könnte bedeuten, dass die für die Wundheilung nötige Reepithelialisierung retardiert ist (Singer et al., 1999). Allerdings ist die Reepithelialisierung ein später Vorgang in der Wundheilung. So wäre es möglich, dass die Silika-Vliese diesen Einfluss auf die Keratinozyten *in vivo* nicht haben können, da sie zum späten Zeitpunkt der Reepithelialisierung eigentlich schon resorbiert sein sollten. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse im Schweinmodell, denn dort konnte keine Vlies-induzierte verlangsamte Reepithelialisierung beobachtet werden (nicht publizierte Daten).

Andererseits könnte eine Reduktion der Keratinozytenzahl durch eine Silika-Behandlung in chronischen Wunden sogar von Vorteil sein, weil es dadurch zu einer Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine insbesondere von Il-1 $\beta$  im Wundbereich kommt, ähnlich wie Dinarello es in akuten und chronischen auto-inflammatorischen Erkrankungen zeigen konnte (Dinarello, 2010).

Keratinozyten exprimieren TNF- $\alpha$  und Il-1 $\beta$  konstitutiv (Feliciani et al., 1996) und sezernieren ein breites Spektrum von Zytokinen wie z.B. Il-6 und Il-8. Nach einer Gewebsverletzung wird die Proteinsynthese von Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Nozaki et al., 1993) sogar noch gesteigert, was zu einer Induktion weiterer Zytokine führt. Außerdem sind die Keratinozyten in der Haut die Hauptquelle von Il-1 $\beta$  (Feldmeyer et al., 2007; Lee et al., 2009; Szabowski et al., 2000), Il-1 $\beta$  hat vielfältige Funktionen und ist einer der Schlüsselmediatoren im Wundheilungsprozess (Sauder, 1989; Dinarello, 2011). Die Arbeitsgruppe um Niessen et al. (2001) konnte zeigen, dass ein erhöhtes Level von Il-1 $\beta$  in einer Degradation der extrazellulären Matrix und einer verlangsamten Wundheilung resultiert. Da bei einer chronischen Wunde durch u.a. Il-1 $\beta$  dieser Wundheilungsprozess immer wieder aktiviert wird, kommt es zu einem fortwährenden Einstrom von Granulozyten und Makrophagen. Granulozyten und Makrophagen sezernieren wiederum entzündungsfördernde Zytokine, die eine Erhöhung der Expression von Matrix Metallo Proteasen (MMPs) induzieren können. Dies kann zur Folge haben, dass Fibronectin und Kollagen sofort wieder abgebaut werden und sich somit das Gleichgewicht von Gewebeaufbau und –abbau in einer chronischen Wunde zugunsten des Abbaus verschiebt.

Da Keratinozyten, die mit den Kieselgel-Wundaufgaben inkubiert werden, vermehrt differenzieren und die Proliferation hemmen (Abb. 33+34), könnte das zu einem verminderten Proteinlevel von Il-1 $\beta$  im Wundmilieu führen, was sich bei der Behandlung von chronischen Wunden durchaus als vorteilhaft erweisen könnte.

### 4.3. Der Einfluss der Silika-Vliese auf verschiedene Entzündungsparameter

#### Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Il-1 $\beta$ -Expression

Ruhende und aktivierte Keratinozyten, die mit den Silika-Vliesen kultiviert wurden, exprimieren um ca. 80% weniger Il-1 $\beta$  als die unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 35). Diese Werte unterschieden sich signifikant voneinander. Die deutliche Reduktion der Il-1 $\beta$  Expression könnte sich für die Behandlung von chronischen Wunden als äußerst vorteilhaft erweisen. Kommt es zu einer Gewebsverletzung, wird eine akute und lokale Entzündungsphase induziert, um die Integrität der Haut schnellstmöglich wieder herzustellen (Medzhitov, 2008). Il-1 $\beta$  übernimmt in diesem Prozess eine Schlüsselrolle (Dinarello, 2009). Es initiiert neben der Expression von Chemokinen die Infiltration von inflammatorischen und immunkompetenten Zellen in das Wundgewebe (Dinarello, 2009). In chronischen Wunden wird Il-1 $\beta$  überexprimiert (Mast und Schultz, 1996; Lobmann et al. 2003). Il-1 $\beta$  ist ein äußerst aktives, pleiotropisches, pro-inflammatorisches Zytokin, welches bei unkontrollierter Aktivität zu einer lebensbedrohlichen systemischen und lokalen Entzündung führen kann (Feldmeyer et al., 2010). Als zentraler Mediator in verschiedensten akuten und chronischen Erkrankungen ist es zu einem relevanten therapeutischen Ziel geworden. Denn reduziert man die Aktivität von Il-1 $\beta$ , führt das zu einer schnellen Remission der Symptome (Aksentijevich et al., 2009; Godbach-Mansky et al., 2006; Reddy et al., 2009).

Die Epidermis besteht fast ausschließlich aus dicht gepackten Keratinozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (Feldmeyer et al., 2010). Könnten die Silika-Vliese, wie in der vorliegenden Arbeit *in vitro* gezeigt wurde, die Il-1 $\beta$  Expression *in vivo* um ca. 80% reduzieren und zusätzlich (Abb. 30-32) die Proliferation der Keratinozyten einschränken, könnte das insbesondere für die Behandlung von chronischen Wunden, z.B. des diabetischen Fußsyndroms einen großen Erfolg bedeuten.

#### Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Il-6-Expression

Die Expression von Il-6 konnte in ruhenden und aktivierten Keratinozyten sowie in Endothelzellen signifikant durch eine Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen reduziert werden (Abb. 36+37). Il-6 ist ebenso wie Il-1 $\beta$  ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches in der Vermittlung von Entzündungsprozessen eine Schlüsselrolle übernimmt (Ghazizadeh, 2007). So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Il-6 in gesundem Gewebe zu einer erhöhten epidermalen

Proliferation und einer Entzündung führt (Sawamura, 1998). Il-6 wird hauptsächlich von Lymphozyten und Makrophagen sezerniert, aber andere Zelltypen wie Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen sezernieren dieses Zytokin ebenfalls (Kishimoto et al., 1988). Gegen Il-6 gibt es mittlerweile kommerziell erhältliche Antikörper, die sich schon in der Behandlung verschiedener auto-inflammatorischer Erkrankungen, wie z.B. Rheumatoide Arthritis, Morbus Castleman, Morbus Crohn und juvenile idiopathische Arthritis als effektiv erwiesen haben (Nishimoto und Kishimoto, 2006). In der gestörten Wundheilung spielt ein erhöhter Level von Il-6 eine besondere Rolle. Die Arbeitsgruppe um Tuttolomondo konnte zeigen, dass im diabetischen Fußsyndrom ein signifikant erhöhtes Niveau von Il-6 zu konstatieren ist (Tuttolomondo et al., 2010). Die Inhibition der Expression von Il-6 durch die Inkubation der Silikavliese um ca. 60-70% könnte ein wirkungsvolles Target in der Behandlung entzündlicher Prozesse sein. Il-6 übernimmt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Keloidbildung (Xue et al., 2000). Denn bei Patienten, die als Folge einer gestörten Wundheilung Keloide ausbilden konnte eine erhöhte Genexpression von Il-6 und eine verstärkte autokrine Regulation von Il-6 in den Keloidfibroblasten beobachtet werden. Die Il-6 Expression konnte zwar in ruhenden Fibroblasten durch eine Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen signifikant reduziert werden, es ließ sich aber kein Einfluss auf die Expression in aktivierten Fibroblasten feststellen (Abb. 38), so dass angenommen werden muss, dass die degradierbaren Silika-Präparate zumindest über das Target Il-6 einen beschränkten therapeutischen Einfluss auf die Keloidbildung haben. Auf weitere Aspekte der Keloidbildung wird weiter unten eingegangen.

#### Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Il-8-Expression

Wurden aktivierte bzw. ruhende Endothelzellen oder Keratinozyten mit den Siliziumoxid-basierten Wundauflagen behandelt, kam es zu einer signifikanten Reduktion der Il-8 Expression (Abb. 39-40). In ruhenden Fibroblasten wurde der gleiche Effekt beobachtet, wohingegen eine Reduktion der Il-8 Expression in aktivierten Fibroblasten nicht festgestellt werden konnte (Abb. 41). Eine Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Il-8 *in vitro* einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation Keratinozyten ausüben kann (Rennekampff et al. 2000). So könnte im Umkehrschluss die Inhibition der Il-8 Synthese (wie es hier gezeigt werden konnte) eine Ursache für die verminderte Proliferation der mit den Silika-Vliesen inkubierten Keratinozyten sein (Abb. 30).

Il-8 gehört zu der Familie der Chemokine. Diese sind kleine Proteine, die die Migration und Aktivierung von Phagozyten und Leukozyten stimulieren. Il-8 ist hauptsächlich für die Einwanderung der Neutrophilen in das Wundmilieu verantwortlich (Rennekampff et al., 2000). Die Reduktion der Il-8 Expression in ruhenden Endothelzellen und Fibroblasten sowie in aktivierten Endothelzellen durch die Silika-Behandlung könnte sich positiv auswirken, wenn es dadurch zu einer minimierten inflammatorischen Immunantwort käme, in dessen Folge Entzündungsreaktionen vermindert wären. Es konnte gezeigt werden, dass signifikant hohe Level von Il-8 mit einer beeinträchtigten Wundheilung assoziiert sind (Liechty et al., 1998; Lonco et al., 2000).

Eine Reduktion der Il-8 Synthese im Wundmilieu könnte sich in einer verminderten Narbenbildung äußern, wie es Lonco et al. (2000) zeigen konnte. Liechty et al. (1989) konnte zeigen, dass die Il-8 Expression 4 Stunden nach Setzung einer Wunde in fötalem und adultem Gewebe angestiegen war, wenn man humane adulte und fötale Haut auf SCID (Severe Combined Immunodeficiency) Mäuse transplantierte. Nach 12 Stunden konnte man im fötalen Wundgewebe Il-8 nicht mehr nachweisen. Im Gegensatz dazu war Il-8 im adulten Gewebe bis zu 72 Stunden nach der Läsion noch nachweisbar. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine reduzierte inflammatorische Immunantwort in fötalem Gewebe für die verminderte Entzündungsreaktion und für die Abheilung ohne die Entstehung von Narbengewebe verantwortlich sein könnte (Liechty et al., 1998).

#### Der Einfluss der Kieselgel-Wundaufgabe auf die Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )-Expression

In ruhenden Endothelzellen führte die Inkubation mit den Kieselgel-Wundaufgaben zu einer Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentration um das 4  $\frac{1}{2}$ -fache, in aktivierten Endothelzellen hingegen zu einer Steigerung um das 2  $\frac{1}{2}$ -fache. Noch auffälliger war die Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentration in Keratinozyten. In ruhenden betrug sie ungefähr das 10-fache und in aktivierten Keratinozyten ungefähr das 5-fache. TNF- $\alpha$  kann in unterschiedlichen Zelltypen wie z.B. Keratinozyten, Neutrophilen und Makrophagen (Wang et al., 2003; Decker et al., 1987) produziert werden und im Wundheilungsprozess zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Funktionen übernehmen. So bindet TNF- $\alpha$  an verschiedene Rezeptoren, die gegensätzliche Effekte wie Proliferation, Apoptose oder die Aktivierung von Zellen induzieren können (Grivennikov et al.

2006). Diese unterschiedlichen Signalwege können sich gegenseitig beeinflussen (Grivennikov et al. 2006). Einer dieser Signalwege aktiviert über den CD95 Rezeptor („Todesrezeptor“) Initiator- bzw. Effektorcaspasen, über die wiederum Apoptose induziert werden kann (Kischkel et al., 1995). Dieser Signalweg scheint bei der Inkubation der Silika-Präparate mit den Keratinozyten und Endothelzellen trotz der Steigerung der TNF- $\alpha$  Expression allerdings nicht aktiviert zu werden, denn es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Vliese keine Apoptose induzieren (Abb. 4, 11, 12, 17).

Eine Steigerung der TNF- $\alpha$  Expression in Endothelzellen durch eine Inkubation mit den Wundaufgaben während der frühen Wundheilungsphase könnte sich in einer verbesserten Versorgung des geschädigten Gewebes mit neuen Blutgefäßen bemerkbar machen. Die Arbeitsgruppe um Frater-Schroder (1987) konnte zeigen, dass eine Steigerung der TNF- $\alpha$  Expression die Angiogenese *in vivo* unterstützen kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine deutliche Zunahme der Neo-Angiogenese durch die Inkubation mit den Vliesen beobachtet werden (siehe Punkt 3.4.). Während der Entzündungsphase induziert TNF- $\alpha$  die Synthese von Zell-Oberflächenmolekülen in Neutrophilen und Endothelzellen, diese sind für die Migration der Neutrophilen und die Adhäsion ans Endothelium wichtig (Gamble et al., 1985; Yang et al., 2005; Rajan et al., 2008). Während der Reepithelialisierungsphase proliferieren humane Keratinozyten und exprimieren als Antwort auf TNF- $\alpha$  das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) (Detmar et al., 1990). Wird dieses Adhäsionsmolekül überexprimiert, kommt es zu einer vermehrten Rekrutierung von T-Zellen und einer Erhöhung von ICAM-1 auch in Endothelzellen. Es könnte also sein, dass ein Anstieg von TNF- $\alpha$  in Endothelzellen und Keratinozyten durch eine Silika-Exposition die Ausbildung mikrovaskulärer Gefäße unterstützt.

In chronischen Wunden, wie z.B. Ulcus cruris, werden im Vergleich zu akuten Wunden hohe Level von Il-1 $\beta$ , Il-6 und TNF- $\alpha$  detektiert (Sakamoto et al., 1994; Trengrove et al., 1996; Wallace et al., 1998; Baker et al., 2000; Trengrove et al., 2000). Zum Beispiel konnte eine Studie eine 100-fach erhöhte TNF- $\alpha$  Konzentration im Ulcus im Vergleich zum normalen Wundgewebe konstatieren (Tarnuzzer et al., 1996). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der TNF- $\alpha$  Konzentration in der chronischen Wunde mit dem Heilungsfortschritt assoziiert war (Trengrove et al., 1996; Trengrove et al., 2000). Weitere Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen konnten belegen, dass ein zweifach erhöhtes Risiko an einem venösen Ulcus zu erkranken

mit einem TNFA-308 Polymorphismus assoziiert ist (Raab und Klagsbrun, 1997). Dieser Polymorphismus ist durch eine erhöhte TNF- $\alpha$  Expression gekennzeichnet (Shirakata et al., 2005). In diesem Zusammenhang ist eine zusätzliche Erhöhung der TNF- $\alpha$  Expression durch eine Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, insbesondere in der Behandlung von chronischen Wunden kritisch zu bewerten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Erhöhung von TNF- $\alpha$  alleine die Expression von entzündungsfördernden Matrix Metalloproteasen verstärken (Zhang, et al., 1998; Burnett et al., 1989; Ito et al., 1990; Richter; et al., 1990) und gleichzeitig ihre Gegenspieler Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) erniedrigen konnte (Ito et al., 1990). Dieses Ungleichgewicht zugunsten der MMPs korreliert mit einer verzögerten Wundheilung (Ladwig et al., 2002; Trengove et al., 1999; Yager et al., 1996; Vaalamo et al., 1996; Lobmann et al., 2002).

Allerdings bleibt zu bemerken, dass eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$ , Il-1, Il-6 und z.B. MMP-9 (Grivennikov et al., 2006; Le et al., 1987, Huang et al. 2011; Lin et al., 2008) über die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vermittelt wird. Im Gegensatz dazu wurde aber in dieser Arbeit gezeigt, dass die Silika-Präparate die NF- $\kappa$ B-Aktivität signifikant reduzieren und die Expression von Il-1 $\beta$ , Il-6 und Il-8 verhinderten (3.3.1.-3.3.4 und 3.3.11-3.3.18). Würde die Erhöhung von TNF- $\alpha$  die Ausbildung mikrovaskulärer Strukturen unterstützen, jedoch ohne das weitere Entzündungsparameter induziert werden, könnte die verstärkte TNF- $\alpha$  Expression sogar von Nutzen sein. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse stellt sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus, der für die Erhöhung der TNF- $\alpha$  Expression verantwortlich ist. Deswegen wird angenommen, dass ein NF- $\kappa$ B-unabhängiger Signalweg zu der Induktion von TNF- $\alpha$  führt. Diese Annahme wird bestärkt durch die Befunde von verschiedenen Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass die TNF- $\alpha$  Expression über den JNK-(Jun N-terminal protein kinase) (Kishore et al., 2004) oder ERK- (Extracellular signal-regulated kinase) (Park et al., 1992) Signalweg gesteigert werden kann.

## Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflage auf die Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-Expression

NF- $\kappa$ B ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der die Expression von über 500 Genen reguliert, die in verschiedenste zelluläre Prozesse wie Proliferation, zelluläre Transformation, Überleben, Invasion, Metastasierung und Inflammation involviert sind (Gupta et al., 2010). Die NF- $\kappa$ B-Familie besteht aus fünf Mitgliedern. Jeweils zwei dieser Untereinheiten bilden als Homo- bzw. Heterodimer den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B kann die Expression von Zielgenen aktivieren und reprimieren.

Das biologische System in dem der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B seine wichtigste Funktion übernimmt ist das angeborene und adaptierte Immunsystem (Hayden und Gosh, 2010; Li und Verma, 2002). Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg, der hauptsächlich an der Genaktivierung bzw. Transkription von Zielgenen der inflammatorischen Immunantwort beteiligt ist, wird über das Heterodimer, welches aus den Untereinheiten p50 und p65 besteht, vermittelt (Simmonds und Foxwell, 2008; Bonizzi und Karin, 2004) und wurde deswegen in der vorliegenden Arbeit besonders untersucht (Abb. 71).

Werden humane Zellen aktiviert kommt es zu einer Phosphorylierung von I $\kappa$ B, in dessen Folge I $\kappa$ B, welches mit NF- $\kappa$ B einen inaktiven Komplex bildet, proteolytisch degradiert wird. Durch den Abbau wird die Nukleäre Translokations Sequenz (NLS) von NF- $\kappa$ B frei. NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription von Zielgenen wie z.B. Il-6, Il-8, Il-1 $\beta$  und MMPs (Simmonds und Foxwell, 2008), kann dort aber auch als Repressor der Transkription fungieren.

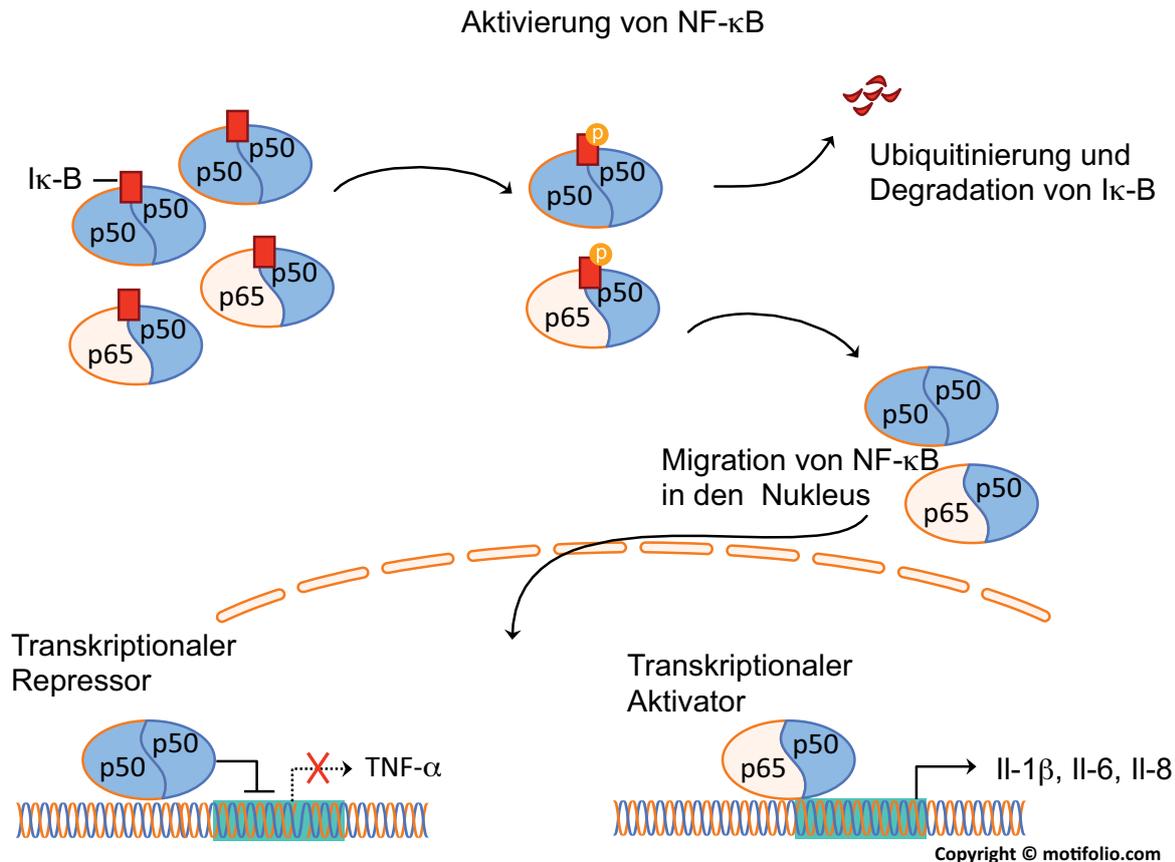


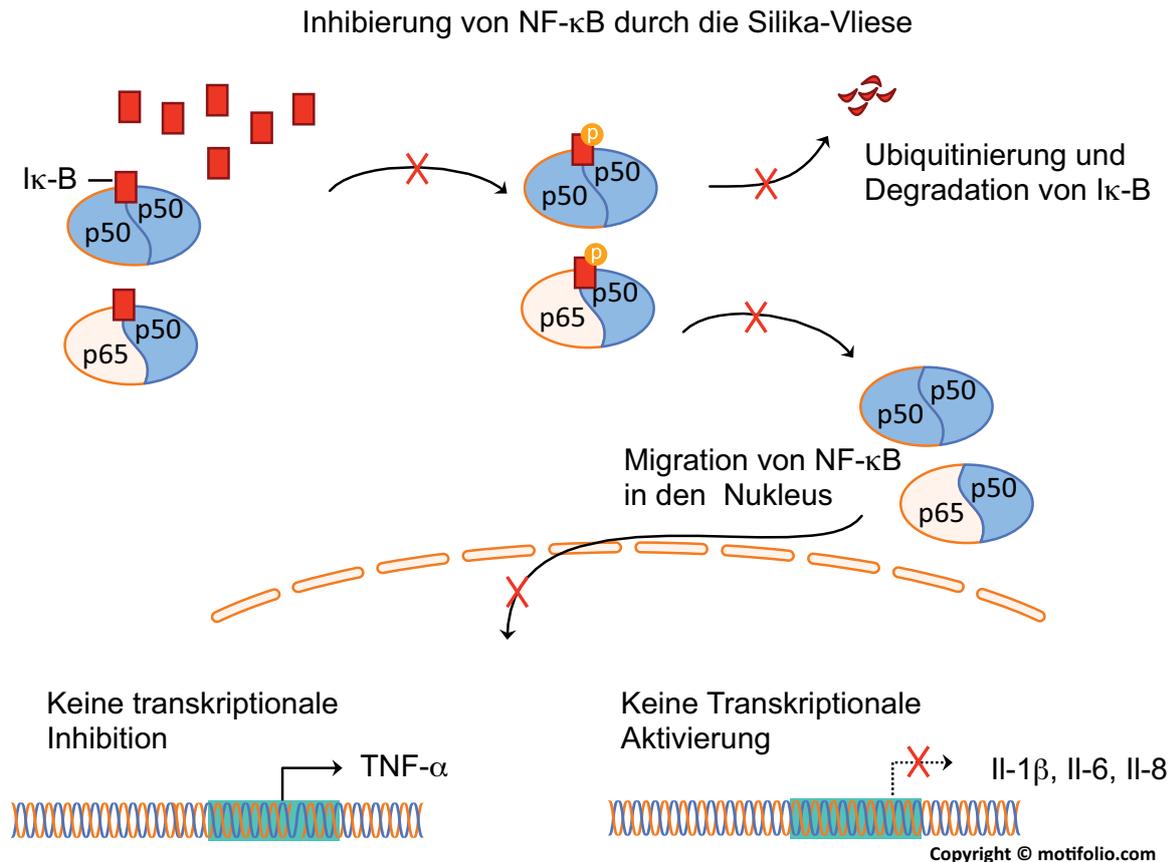
Abbildung 71: Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die Ubiquitinierung von I $\kappa$ B und Regulation der Transkription über differierende Dimerkombinationen

Schon die Visualisierung im Mikroskop zeigte eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz und Translokation von NF- $\kappa$ B durch eine Behandlung mit den Kieselgel-Wundauflagen (Abb. 44). Weitere Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass bei einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und gleichzeitiger Inkubation mit den Silika-Vliesen die Translokation von p50 in den Zellkern im Vergleich mit der Kontrolle signifikant reduziert war (ungefähr um 40%) (Abb. 45). Die alleinige Inkubation nicht aktivierter humaner Zellen mit den Silika-Präparaten führte schon zu einer signifikanten Reduktion von p50 im Zytoplasma (Abb. 46) (ca. 55%), beeinflusste aber nicht die Translokation von NF- $\kappa$ B (Abb. 45) in den Zellkern.

Die Ergebnisse, die sich bei der Untersuchung der Expression von p65 ergaben waren noch aufschlussreicher. Der Proteingehalt im Zytoplasma von p65 war unabhängig vom Aktivierungsgrad der Zellen, um ca. 70% signifikant reduziert (Abb. 48). In der nukleären Zellfraktion wurde im Vergleich mit der Kontrolle nach der Aktivierung ca. 30% weniger p65 detektiert (Abb. 47). In ruhenden Zellen vermochte eine Inkuba-

tion mit den Siliziumoxid-basierten Wundauflagen, die Translokation von p65 in den Zellkern um ca. 20% zu reduzieren (Abb. 47). Die Ergebnisse aus dem Transkriptionsfaktor-Assay waren noch deutlicher (Abb. 51). Die Siliziumoxid-basierten Präparate konnten die Aktivität (Bindung an homologe Sequenzen der DNA) von p65 um das 50-fache senken. Eine Ursache für die verminderte Translokation scheint aber nicht deren direkte Inhibition zu sein, sondern eine generelle Repression der Proteinexpression von p50 und p65, erkennbar in den Abbildungen 46 und 48.

Eine weitere Ursache für die Inhibition von NF- $\kappa$ B ist in Abbildung 49 zu sehen. Durch die Inkubation der Kieselgel-Wundauflagen kam es zu einer signifikanten Erhöhung (ca. 50%) von I $\kappa$ B im Zytoplasma. Das bedeutet, dass entweder die proteolytische Degradation von I $\kappa$ B durch die Vliese verhindert oder, dass I $\kappa$ B überexprimiert wurde. Die Folge ist, dass das Freiwerden der NLS von NF- $\kappa$ B verhindert wird, NF- $\kappa$ B weniger in den Kern transloziert werden kann und dass die Transkription bzw. Repression der Zielgene verhindert wird (Abb. 72).



**Abbildung 72: Inhibition von NF- $\kappa$ B durch die Silika-Vliese (der erhöhte I $\kappa$ B -Gehalt und der verminderte p50 und p65-Gehalt) könnte die Translokation differierender Dimerkombination minimieren, in deren Folge die Transkription von Il-1 $\beta$ , Il-6 und Il-8 inhibiert und von TNF- $\alpha$  erhöht wird**

Diese Ergebnisse erklären die Analysen vollständig, die im Kapitel „3.3. Effekte der Kieselgel-Wundaufgaben auf inflammatorische Parameter“ (Abb. 35-43) durchgeführt wurden. Denn es konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B (p50/p65) die Transkription von Il-1 $\beta$ , Il-6 und Il-8 aktivieren kann (Simmonds und Foxwell, 2008). Wird nun die Expression und damit die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern inhibiert, kann die Transkription inflammatorischer Zytokine wie Il-1 $\beta$ , Il-6 und Il-8 nicht initiiert werden. Die oben bereits erwähnte durch die Silika-induzierte signifikante Erhöhung der TNF- $\alpha$  Konzentration (Abb. 42+43) in Endothelzellen und Keratinozyten lässt sich zudem durch einen anderen Signalweg unabhängig von den oben beschriebenen Signalkaskaden erklären. Neben p65/p50 existiert ein weiterer Signalweg, der über das Homodimer p50/p50 die Transkription reguliert. Dieses Homodimer, welches keine Transaktivierungsdomäne besitzt, reprimiert die Expression verschiedener Targets von NF- $\kappa$ B (Kastenbauer und Ziegler-Heitbrock, 1999; Oakley et al., 2005; Pereira und Oakley, 2008; Lawrence und Fong, 2010; Elsharkawy et al., 2010). So

konnte die Arbeitsgruppe um Oakley 2005 zeigen, dass in p50 *Knock-out* Mäusen, die TNF- $\alpha$  Expression erhöht war (Oakley et al., 2005). Diese Analyse wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis der Reduktion der Expression von p50 durch die Silika-Inkubation, könnte die Ursache dafür sein, dass die TNF- $\alpha$ -Expression zu nimmt. Denn das Homodimer p50, dem die Transaktivierungsdomäne fehlt wird weniger synthetisiert, worauf die Inhibition der TNF- $\alpha$ -Expression nicht mehr aufrecht erhalten werden könnte (Abb. 72).

Die kritische Rolle, die NF- $\kappa$ B (p65/p50) in pro-inflammatorischen Prozessen übernimmt, hat zu enormen Anstrengungen geführt, um Inhibitoren zu entwickeln, die in diesen Signalweg eingreifen, um entzündliche Erkrankungen zu therapieren (Karin et al., 2004; Gupta et al., 2010). Wären die Kieselgel-Wundauflagen in der Lage die Aktivierung des Heterodimers p50/p65, wie in der vorliegenden Arbeit *in vitro* gezeigt werden konnte, um mindestens 30-40% zu reduzieren, könnte das in der Behandlung insbesondere von entzündlichen Erkrankungen und chronischen Wunden einen großen Fortschritt bedeuten. Hinzu kommt, dass chronische Wunden unter einer Überproduktion von entzündungsfördernden Proteasen wie MMPs leiden. Die Transkription von MMP-1, -3 und -9 wird über NF- $\kappa$ B (p50/p65) reguliert (Simmonds und Foxwell, 2008). Es ist also möglich, dass auch die Expression der MMPs durch die Inkubation mit den Silika-Vliesen reduziert werden könnte. Damit wäre ein weiteres Ziel in der Behandlung chronischer Wunden erreicht, nämlich die Minimierung entzündungsfördernder Proteasen. In deren Folge wäre es vielleicht möglich, die Wunde in eine akute Phase zu überführen und eine vollständige Wundheilung zu erreichen.

#### 4.4. Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Neo-Angiogenese

Die Wundheilung ist ein hoch dynamischer, komplexer Interaktionsprozess in den verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix, lösliche Mediatoren, dermale Zelltypen und infiltrierende Leukozyten involviert sind (Eming et al., 2007). Ziel dieser Interaktion ist eine sofortige Wiederherstellung der Gewebeintegrität und der Homöostase (Martin, 1997; Singer und Clark, 1999). Der Wundheilungsprozess besteht aus mehreren Phasen, die sich zeitlich und räumlich überlappen können. Die definierte Abfolge dieser Phasen unterstützt das Wachstum und die Remodellierung neuer Blutgefäße. Sie ist außerdem für die optimale Reparatur und Wiederherstel-

lung einer funktionellen Vaskularisation unerlässlich (Eming et al., 2007). Deswegen ist die Angiogenese eine grundlegende Komponente der Wundheilung (Eming et al., 2007). Die Angiogenese selbst ist ebenfalls ein distinkt regulierter Prozess, der eine dynamische Interaktion zwischen Endothelzellen, pro- und anti-angiogener Wachstumsfaktoren und der extrazellulären Matrix (ECM) erfordert. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der degradierbaren Silika-Präparate auf die Neo-Angiogenese in Endothelzell-Kulturen untersucht. Als Positivkontrolle wurden die gleichen Zellen mit VEGF inkubiert, da VEGF nicht nur einer der meist untersuchten pro-angiogenen Wachstumsfaktoren ist, sondern weil er innerhalb der Angiogenese von herausragender Bedeutung ist (Ferrara und Henzel, 1989; Eming et al., 2007). Es konnte nachgewiesen werden, dass VEGF in normaler, intakter Haut nicht exprimiert wird. Kommt es hingegen zu einer mechanischen Verletzung der Haut, wird die Expression stark heraufreguliert. Diese Expression korreliert räumlich und zeitlich mit der Entstehung neuer Blutgefäße (Brown et al., 1992). Während der Wundheilung reguliert VEGF verschiedene Prozesse, wie die vaskuläre Permeabilität, den Einstrom inflammatorischer Zytokine ins Wundmilieu, die Migration und Proliferation existierender Endothelzellen sowie die Rekrutierung endothelialer Progenitoren in das Wundgewebe (Brown et al., 1992; Nissen et al., 1998). Des Weiteren konnte in einem Schweinemodell gezeigt werden, dass die Angiogenese und die Ausbildung des Granulationsgewebes auffallend reduziert waren, wenn die Wunde mit neutralisierendem VEGF-Antikörpern behandelt wurde (Howdieshell et al., 2001). Im Mausmodell wurden diese Ergebnisse bestätigt. VEGF wurde viral durch einen dominant-negativen VEGFR-2 neutralisiert. Auch hier waren die Angiogenese und die Bildung des Granulationsgewebes stark retardiert (Tsou et al., 2002).

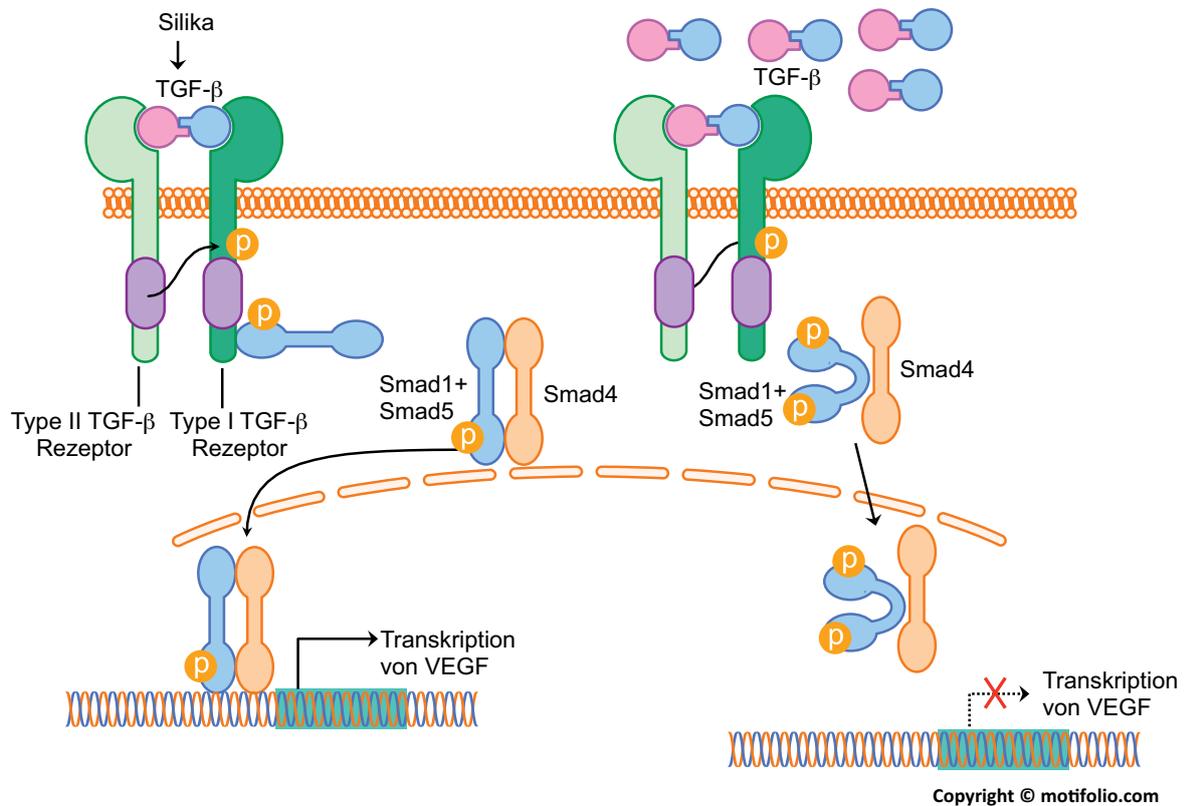
Schon allein bei der visuellen Begutachtung der Silika-behandelten Endothelzellen, die mit spezifischen Endothelzellmarkern (van Willebrandt Factor, CD 31) markiert wurden, konnte eine eindeutige Induktion der Angiogenese beobachtet werden (Abb. 52-54). Während eine Inkubation mit VEGF zu einer Verdopplung der Neo-Angiogenese führte, konnte die Inkubation mit den Kieselgel-Wundauflagen dieses Ergebnis sogar noch übertreffen (Abb. 57+59).

In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob dieser Effekt der deutlich erhöhten Angiogenese über VEGF vermittelt wurde. Diese Annahme konnte durch die weiteren Analysen vollständig bestätigt werden (Abb. 61-63).

Die besondere Bedeutung, die eine gesteigerte Expression von VEGF durch eine Inkubation der Silika-Vliese einnehmen könnte, könnte insbesondere in der Behandlung chronischer Wunden offenkundig werden. Denn im diabetischen Mausmodell konnte dargelegt werden, dass eine deutlich beeinträchtigte Wundheilung mit einer reduzierten VEGF mRNA- und Proteinsynthese koinzidiert war (Frank et al, 1995). Zusätzlich konnte im diabetischen (ischämischen) Mausmodell bestätigt werden, dass durch eine Behandlung mit VEGF-Protein oder mit einem Adenovirus vermittelten Gentransfer von VEGF165 die Wundheilung verbessert wurde (Corral et al, 1999; Romand Di Peppe et al., 2002). Außerdem konnte eine lokale Applikation von VEGF165 Protein die inkommodierte Wundheilung aufheben (Galiano et al., 2004; Roth et al., 2006). Allerdings konnte eine transgene Maus, die VEGF in der Haut überexprimierte, keine verbesserte Wundheilung im Vergleich mit den Kontrollmäusen aufzeigen. Das bedeutet, dass man für die Erforschung von VEGF-Effekten unbedingt ein retardiertes Wundmodell benutzen sollte (Hong et. al., 2004).

Auf der Suche nach der Silika-induzierten VEGF-Expression wurde der TGF- $\beta$  gesteuerte Signalweg untersucht. TGF- $\beta$  kann über die Bindung an Serin-/Threonin-Rezeptorkinasen die VEGF Expression aktivieren. So konnten wir durch die Silika-Behandlung eine 90%ige Reduktion der TGF- $\beta$ -Proteinsynthese erreichen. Es ist bekannt, dass die Expression von TGF- $\beta$  mit der VEGF-Synthese negativ korreliert. Es konnte dargelegt werden, dass eine geringe Menge TGF- $\beta$  die Proliferation und Migration von Endothelzellen verstärken konnte, wohingegen eine hohe Konzentration den gegenteiligen Effekt hat (Pepper, 1997; Goumans et al., 2002; Pardali und ten Dijke, 2009; Serrati et al, 2009) (Abb. 73).

Ein mögliches Modell zur TGF- $\beta$ -Induzierten VEGF-Transkription



**Abbildung 73: Ein mögliches Modell zur TGF- $\beta$  induzierten VEGF-Transkription**  
 Wird ein bestimmter Schwellenwert der TGF- $\beta$  Konzentration unterschritten (hier links durch die Silika angedeutet) kommt es zu einer vermehrten Transkription von VEGF

#### 4.5. Der Einfluss der Kieselgel-Wundauflage auf die TGF- $\beta$ - induzierte Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten

Hypertrophe Narben und Keloide sind Ausdruck einer aberranten Wundheilung. Die Inzidenz an einer hypertrophen Narbe zu erkranken, beträgt bei operierten Personen mit Gewebsverletzung zwischen 40-70% und bis zu 91% bei Verbrennungsopfern. Bei 6-16% der afrikanischen Bevölkerung bilden sich nach einer Verletzung der Haut aufgrund einer genetischen Disposition Keloide aus (Gauglitz et al., 2011). Beide Formen dieser abnormen Narbenbildung sind durch eine überhöhte Kollagensynthese gekennzeichnet. So enthalten hypertrophe Narben hauptsächlich Kollagen des Typs III. Keloide bestehen aus Kollagen Typ I und III (Slomp und Kirschner, 2006; Leask, 2010; Gauglitz et al., 2011).

Aus diesem Grunde wurde hier, der Einfluss der Silika-Vliese auf die Kollagensynthese analysiert, was zu folgenden Ergebnissen führte: Wurden ruhende Fibroblasten mit den Siliziumoxid-basierten Wundauflagen kultiviert, konnte kein Einfluss auf die Kollagensynthese beobachtet werden. Wurden die Fibroblasten allerdings mit TGF- $\beta$  zur Synthese von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen angeregt (Uroste et al., 1999; Ignatz und Massagne, 1986), konnte eine signifikante (ca. 45%) Reduktion der Kollagensynthese durch eine Inkubation mit den Silika-Präparaten konstatiert werden (Abb. 65+66).

Ein histologisches Charakteristikum von Keloiden, hypertrophen Narben und Fibrosen ist das übermäßige Vorhandensein von Fibroblasten und Myofibroblasten (Gabbiani, 1992; Gauglitz et al., 2011) im Narbengewebe. Die Myofibroblasten sind durch die Expression von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) gekennzeichnet. In regelrecht abheilenden Wunden sind ebenfalls transient Myofibroblasten vorhanden (Darby, et al, 1990), diese werden aber nach vermittelter Wundkontraktion apoptotisch (Nedelec et al., 2001) oder verlassen das Wundmilieu. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Kieselgel-Wundauflagen auf die Entstehung von Myofibroblasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von  $\alpha$ -SMA in ruhenden Fibroblasten durch eine Behandlung mit den Siliziumoxid-basierten Vliesen kaum gesenkt werden konnte. Wurden im Gegensatz dazu die Fibroblasten zur  $\alpha$ -SMA-Synthese angeregt, konnte die induzierte Expression von  $\alpha$ -SMA auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abb. 69) gesenkt werden. Zudem konnte die

Differenzierung von Myofibroblasten durch eine Inkubation mit den Vliesen signifikant gesenkt werden.

TGF- $\beta$  ist ein wesentlicher Induktor der  $\alpha$ -SMA-Synthese (Desmouliere et al., 1993; Younai et al., 1996) und dessen erhöhte Expression korreliert mit der erhöhten Synthese von Kollagen (Nagy et al., 1991; Urioste et al., 1999). TGF- $\beta$  steht mit der Pathophysiologie von Keloiden, hypertrophen Narben und mit der Ausbildung von Fibrosen in engem Zusammenhang. Deswegen wurde in weiteren Versuchen die Wirkung der Wundaufgaben auf die endogene TGF- $\beta$ -Expression näher untersucht. Hier konnte ein signifikanter Effekt der Silika-Präparate beobachtet werden, denn die TGF- $\beta$ -Synthese konnte in ruhenden und aktivierten Fibroblasten durch eine Kultivierung mit den Vliesen um das 5-fache reduziert werden (Abb. 70). Dies könnte insbesondere für die Behandlung von Keloiden und hypertrophen Narben einen großen Fortschritt bedeuten, denn in einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der TGF- $\beta$ -Expression zu einer reduzierten Narbenbildung führte (Cordeiro et al., 2003). In zwei weiteren Studien konnte sogar belegt werden, dass eine Behandlung mit Antikörpern die Narbenbildung einer gesetzten Wunde im Rattenmodell verhindern konnte (Shah et al., 1992 und 1995). Unsere Analysen untermauern die Ergebnisse der oben genannten Arbeitsgruppen und stützen die Annahme, dass die Silika-Vliese einen protektiven Schutz vor der Ausbildung hypertropher Narben und der Keloidbildung haben könnten.

Auch Patienten, die an der Duchenne Muskeldystrophie leiden, könnte möglicherweise mit einer Silika-Vlies-Behandlung geholfen werden, denn diese Erkrankung ist auch mit einer erhöhten TGF- $\beta$ -Expression koinzidiert (Bernasconi et al. 1995).

## Zusammenfassung

Die kutane Wundheilung ist ein streng regulierter interaktiver Prozess, in den lösliche Mediatoren, Zellen des Blutes, die extrazelluläre Matrix und verschiedene Zellen der Haut involviert sind. Für die Wiederherstellung der Integrität der Haut ist eine distinkte Regulation stimulierender und inhibierender Faktoren von übergeordneter Bedeutung. Ein Ungleichgewicht innerhalb dieser Prozesse kann die Entstehung chronischer Wunden begünstigen. Die moderne Wundbehandlung, die das Prinzip der feuchten Wundbehandlung favorisiert weist jedoch in der Behandlung von problematischen Wunden keinen besonderen Vorteil im Vergleich mit der klassischen Wundversorgung auf.

Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit der Einfluss eines völlig neuartigen, degradierbaren Silika-Präparates auf differierende Wundheilungsparameter untersucht werden. Die Kieselgel-Wundaufgaben hatten keinen toxischen Einfluss auf Makrophagen, Endothelzellen Fibroblasten und Keratinozyten. In Langzeitkulturen konnte kein negativer Einfluss auf Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten nachgewiesen werden. Nur in Keratinozytenkulturen führte eine Silika-Inkubation zu einem Proliferationsstopp, der auf einer durch die Silika induzierten Differenzierung beruhte.

Die anorganischen Siliziumoxid-Präparate konnten die Expression der Entzündungsmediatoren Il-1 $\beta$ , Il-6 und Il-8 in ruhenden und insbesondere in aktivierten Zellen signifikant um bis zu 50% inhibieren. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus scheint eine durch die Silika-Präparate induzierte Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs zu sein. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der im wesentlichen Maße die Expression der erwähnten Entzündungsmediatoren steuert, konnte nämlich um bis zu 40% signifikant reduziert werden.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Silika-Vliese auf die Angiogenese als essentielle Komponente der Wundheilung untersucht. Die Analyse der Daten ergab, dass nach Inkubation der Endothelzellkulturen mit dem Kieselgel-Präparat eine um 75% höhere Neo-Angiogeneserate im Vergleich mit der Kontrolle erreicht werden konnte. Es wurde der Nachweis erbracht, dass die Silika-Präparate die endogene VEGF-Expression in humanen Endothelzellen signifikant um mehr als das Doppelte erhöhen konnten, was in den Versuchen der wesentliche Mechanismus der Silika-induzierten Erhöhung der Angiogenese darstellte.

Mit der hier vorgestellten Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass neuartige, Silika-basierte Wundaufgaben ohne eine besondere anti-inflammatorisch-pharmakologische Derivatisierung entzündungshemmende Eigenschaften haben und die Neo-Angiogenese deutlich verbessern können und somit in der Therapie chronischer Wunden Verwendung finden könnten.

## Summary

Cutaneous wound healing is a distinctly regulated, interactive process involving soluble mediators, blood cells, extracellular matrix and different subtypes of dermal cells. For the regeneration of skin integrity a distinct regulation of stimulating and inhibiting factors is of paramount importance. An imbalance within these processes can further the development of chronic wounds. Modern wound care, favorising the principle of moist wound treatment, have mostly no benefit compared to classical wound treatment.

Hence this work examine the impact of a novel degradable, anorganic, silicium-oxidised dressing on different parameters of wound healing. The silica dressings have no toxic effect on macrophages, endothel cells, keratinocytes and fibroblasts. Under long-term exposure no negative effect on macrophages, endothel cells and fibroblasts could be investigated. Only in keratinocytes proliferation was inhibited by their differentiation.

The anorganic silicium-oxidised dressings gave evidence that the expression of inflammatory mediators e.g. Il-1 $\beta$ , Il-6 and Il-8 in inactive and active cells could be significantly inhibited by up to 50%.

The underlying molecular mechanism appear to be an inhibition of activation the transcriptional factor NF- $\kappa$ B, which regulates the expression of the inflammatory mediators mentioned above, was significantly reduced up to 40%.

Supplemental data indicate the influence of silica-dressings on angiogenesis as an essential component of wound healing.

This analyses reveal that endothelial cells incubated with dressings have an increased rate of angiogenesis of up to 75% compared to the control. This effect could not reach with VEGF, actually. Further examinations have shown that silicium-oxidised dressings significantly more than doubled endogen expression of VEGF, which displays the fundamental mechanism of inducing angiogenesis.

This study has shown for the first time ever, that a novel silica-based wound dressings without any pharmacological derivatisation have anti-inflammatory properties and ameliorate neo-angiogenesis and therefore could be used for therapy of chronic wound healing.

## Literaturverzeichnis

- Alder, A.J. Etzion, Z. Berlyne, G.M. (1986) Uptake, distribution, and excretion of <sup>31</sup>silicon in normal rats. *American Journal of Physiology* 251:E670-E673
- Ahmed, S.A., Gogal, R.M. Jr., Walsh, J.E. (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods*. Apr 15;170(2):211-24.
- Aksentijevich, I., Masters, S.L., Ferguson, P.J., Dancy, P., Frenkel, J., van Royen-Kerkhoff, A., Laxer, R., Tedgård, U., Cowen, E.W., Pham, T.H., Booty, M., Estes, J.D., Sandler, N.G., Plass, N., Stone, D.L., Turner, M.L., Hill, S., Butman, J.A., Schneider, R., Babyn, P., El-Shanti, H.I., Pope, E., Barron, K., Bing, X., Laurence, A., Lee, C.C., Chapelle, D., Clarke, G.I., Ohson, K., Nicholson, M., Gadina, M., Yang, B., Korman, B.D., Gregersen, P.K., van Hagen, P.M., Hak, A.E., Huizing, M., Rahman, P., Douek, D.C., Remmers, E.F., Kastner, D.L., Goldbach-Mansky, R. (2009) An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med*. 4;360(23):2426-37.
- Baker, E.A. Leaper, D.J. (2000) Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid. *Wound Repair Regen* (:392-8)
- Baldino, F., Jr., Chesselet, M.F., and Lewis, M.E. (1989) High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol.* 168, 761-777
- Bendtsen, K. (1988) Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunology Letters*, 19: 183-192
- Berlyne, G.M., Shaikin-Kestenbaum, R., Yagil, R. Alfassi, Z. Kushelevsky, A. Etzion, Z. (1986) Distribution of <sup>31</sup>silicon-labeled silicic acid in the rat. *Biological Trace Element Research* 10:159-162
- Bernasconi, P., Torchiana, E., Confalonieri, P. Brugnoli, R., Barresi, R., Mora, M., Corenno, F., Morandi, L., Mantegazza, R. (1995) Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. *J. Clin. Invest.* 96, 1137-1144
- Bikle, D. (2004) Vitamin A regulated keratinocyte differentiation. *92(3):436-44*
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (2001) *Pathologie Urban & Fischer Verlag München Jena*
- Bonizzi, G., Karin, M. (2004) The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* Vol. 25. No.6
- Borenfreund, E. und Puerner, J.A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 24(2-3):119-24.
- Borregaard, N. (1985) The Respiratory Burst of Phagocytes: Biochemistry and subcellular Localization. *Immunology Letters*, 11, 165-171
- Bullard, K.M., Longaker, M.T., Lorenz, H.P. Fetal wound healing: current biology. *World J. Surg.* 27, 54-61
- Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54
- Brown, L.F., Yeo, K.T., Berse, B., Yeo, T.K., Senger, D.R. Dvorak, H.F., van de Water, L. (1992) Expression of VEGF by epidermal keratinocytes during wound healing. *J. Exp. Med.* 176: 1375-9
- Bruns, V. v. (1870) Über Baumwollschärpe, *Schwäbischer Merkur*
- Burnett, D., Chamba, A., Hill, S.L., Stockely, R.A. (1989) Effects of plasma, tumour necrosis factor, endotoxin and dexamethasone on extracellular proteolysis by neutrophils from healthy subjects and patients with emphysema. *Clin Sci (Lond)* 77: 35-41
- Calderon, M., Lawrence, W.T. Banes, A.J. (1996) Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. *J Surg Res* 61:343-347
- Carmeliet, P. (2000) Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature* 6: 389-395
- Carmeliet, P. (2004) Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med* 255:538-61

- Clark, R. A. F., Ed. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (Plenum, New York, 1996)
- Clark, R.A. (1993): Basics of cutaneous wound repair *J Dermatol Surg Oncol* 19: 693-706
- Cohen, I.K., Keiser, H.R., Sjoerdsma, A. (1997) Collagen synthesis in human keloid and hypertrophic scar. *Surg Forum* 22:488
- Cordeiro, M.F., Mead, A., Ali, R.R, Alexander, R.A., Murray, S., Chen, C., York-DeFalco, C., Dean, N.M., Schultz, G.S., Khaw, P.T. (2003) Novel antisense oligonucleotides targeting TGF-beta inhibit in vivo scarring and improve surgical outcome. *Gene Ther.* 10:59-71
- Corral, C. J., Siddiqui, A., Wu, L., Farrell, C.L., Lyons, D., Mustoe, T.A. (1999) VEGF is more important than bFGF during ischemic wound healing. *Arch Surg* 134: 200-5
- D'Aquisto F., May, M.J., Gosh, S. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B (NF-κB): An Emerging Theme in Anti-Inflammatory Therapies. *Molecular Interventions* 2002, 2, 22-35
- Darby, I., Skalli, O., Gabbiani, G. (1990) Alpha smooth-muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing *Lab Invest* 63: 21-29
- Decker, T.; Lohmann-Matthes, M.L., Gifford, G.E. (1987) Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages *J. Immunol.* 138: 957-62
- Delavary, B.M., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., Beelen, R. H. J. (2011) Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216, 753-762
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G. (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblast. *J Cell Biol* 122: 103-111
- Detmar, M., Orfanos, C.E. (1990) Tumor necrosis factor-alpha inhibits cell proliferation and induces class II antigens and cell adhesion molecules in cultured normal human keratinocytes in vitro. *Arch. Dermatol. Res.* 282:238-45
- Detmar, M., Yeao, K.T., Nagy, J.A., (1995) Keratinocyte-derived VEGF (VEGF) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 105: 44-50
- Diegelmann, R.F., Cohen, I.K., McCoy, B. (1997) Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, scar and keloid fibroblasts in vitro. *J Cell Physiol* 98:341-346
- Dinarello, C.A. (1998) Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 1-11
- Dinarello, C.A. (2004) Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 378-385
- Dinarello, C.A. (2009) Interleukin-1 beta and the autoinflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 360, 2467-2470
- Dinarello, C.A. (2009) Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519-550
- Dinarello, C.A. (2010) Blocking interleukin-1β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *J Intern Med.* 269:16-28
- Dinarello, C.A. (2011) A clinical perspective of IL-1β as a gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41: 1203-1217
- Dipietro, L.A., Polverini, P.J., Rahbe, S.M., Kovacs, E.J. (1995) Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am. J. Pathol.* 146, 868-875.
- Dissemond, J. (2003) *Wundfibel-Das moderne Wundmanagement.* Arbeitskreis der Wundambulanzen Essen
- Dissemond, J., Gerber, V., Kramer, A., Riepe, G., Stohal, R., Vassel-Biergans, A., Eberlein, T. (2009) *Wund Management Praxisorientierte Expertenempfehlung zur Behandlung kritisch kolonisierter und lokal infizierter Wunden mit Polihexanid.* mhp-Verlag GmbH 65183 Wiesbaden

- Dor, Y., Djonov, V., Abramovitch, R., Itin, A., Fishman, G.I., Carmeliet, P., Goelman, G., Keshet, E., (2002) Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* 21:1939-47
- Elsharkawy, A.M., Oakley, F., Lin, F., Packham, G., Mann, D. A. Mann, J. (2010) The NF- $\kappa$ B p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *Journal of Hepatology* Vol. 53: 519-27
- Eming, S. A., Brachvogel, B., Odorisio, T., Koch, M. (2007) Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 42: 115-170
- Engelhardt, E., Toksoy, A., Goebeler, M., Debus, S., Bröcker, E., Gillitzer, R. (1998) Chemokines IL-8, GRO $\alpha$ , MCP-1, IP-10 and Mig Are Sequentially and Differentially Expressed During Phase-Specific Infiltration of Leukocyte Subsets in Human Wound Healing. *American Journal of Pathology*, Vol. 153, No.6, 1849-1860
- Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., Beer, H-D. (2007) The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of Interleukin-1 beta by keratinocytes. *Curr. Biol.* 17, 1140-1145
- Feldmeyer, L., Werner, S., French, L., E., Beer, H-D. (2010) Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *European Journal of Cell Biology* 89, 638-644
- Feliciani, C., Gupta, A.K., Saucier, D.N. (1996) Keratinocytes and Cytokine/Growth Factors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 7(4): 300-18
- Ferrara, N., Henzel, W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-Binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res. Commun* 161:861-8
- Fields, R.D., Lancaster, M.V. (1993) Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab.* Mar;11(4):48-50.
- Frank, S., Hübner, G., Breier, G., Longaker, M. T., Greenhalgh, D.G., Werner, S. (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem* 270, 12607-12613
- Frater-Schroder, M. Risau, M.W., Hallmann, R., Gautschi, P., Bohlen, P. (1987) Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 5277-81
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksier, Tl, Jain, R.K., Seed, B. (1998) Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94: 715-25
- Gabbiani, G. (1992) The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 41:530-532
- Galiano, R.D. Tepper, O.M., Pelo, C.R., Bhatt, K.A., Callaghan, M., Bastidas, N. Bunting, S., Steinmetz, H.G., Gurtner, G.C. (2004) Topical VEGF accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J. Pathol* 164:1935-47
- Gamble, J.R., Harlan, J.M. Klebanoff, S.J., Vadas, M.A. (1985) Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8667-71
- Gauglitz, G.G., Korting, H.C., Pavicic, T. Ruzicka, T., Jeschke, M.G. (2011) Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies *Mol Med* 17(1-2) 113-125
- Ghahany, A., Shen, Y.J., Nedelec, B., Scott, P.G. Tredget, E. (1995) Enhanced expression of mRNA for insulin-like growth factor-1 in post-burn hypertrophic scar tissue and its fibrogenic role by dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 148: 25
- Goldach-Mansky, R., Dailey, N.J., Canna, S.W., Gelabert, A., Jones, J., Rubin, B.I., Kim, H.J., Brewer, C., Zalewski, C., Wiggs, E., Hill, S., Turner, M.L., Karp, B.I., Aksenitjevich, I., Pucino, F., Penzak, S.R., Haverkamp, M.H., Stein, L., Adams, B.S., Moore, T.L., Fuhlbrigge, R.C., Shaham, B., Jarvis, J.N., O'Neil, K., Vehe, R.K., Beitz, L.O., Gardner, G., Hannan, W.P., Warren, R.W., Horn, W., Cole, J.L., Paul, S.M., Hawkins, P.N., Pham, T.H., Snyder, C., Wesley, R.A., Hoffmann, S.C., Holland, S.M., Butman, J.A., Kastner, D.L. (2006) Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med.* 10;355(6):581-92.
- Goumans, M.J., Valdiansdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., ten Dijke, P. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *EMBO J.* 21, 1743-1753
- Greten, S.B., von Siebenthal, D., Huber, T., Rüede, P. (2001) Die Lokalthherapie chronischer Wunden: Auswahlhilfe moderner Wundauflagen. *Schweizer med. Forum* (8): 10-18

- Grivennikov, S. I., Kuprash, D.V. Liu, Z., Nedospasov, S. A. (2006) Intracellular Signals and Events Activated by Cytokines of the Tumor Necrosis Factor Superfamily: From Simple Paradigms to Complex Mechanisms International Review of Cytology, Vol 252: 129-161
- Gupta, S.C., Sundaram, C., Reuter, S., Aggarwal, B.B. (2010) Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation by Small Molecules As a Therapeutic Strategy. Biochim Biophys Acta; 1799 (10-12): 775-787
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008) Wound repair and regeneration. Nature 453, 314-321.
- Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F., Suerbaum, S. (2009) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg Kap.14.2. S91-92
- Hajeer, A. H., Hutchinsons, I.V. (2001) Influence of TNF $\alpha$  production and disease. Hum. Immunol 62: 1191-9
- Hayden, S.M., Ghosh, S. (2010) Signaling to NF- $\kappa$ B. Genes and Development 18:2195-2224
- Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L.M., Heinegard, D., Twardzik, D., Dorder, W.A., Rouslahti, E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta . Biochem J. 303, 527-534
- Hinmann, C.D. und Maibach, H. (1963) Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds. Nature Bd. 200, S. 377-379
- Hinz, B., (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. J. Invest Dermatol. 127: 526-37
- Hoffman, W.L., Jump, A.A. (1989) Inhibition of Streptavidin Biotin Interaction by Milk. Anal. Biochem. 181, 318-320
- Hoffman, W.L., Jump, A.A., Kelly, P.J., Rugles, A.O. (1991) Binding of Antibodies and Other Proteins to Nitrocellulose in Acidic, Basic, and Chaotrophic Buffers. Anal. Biochem. 198, 112-118
- Hong, Y.K., Lange-Aschenfeld, B. Velasco, P., Hirakawa, S., Kunstfeld, R. , Brown, L., Bohlen, P., Senger, D.R., Detmar, M. (2004) VEGF-A tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the  $\alpha$ 1b1 and  $\alpha$ 2b1 integrins. FASEB J: 18:1111-3
- Howdieschell, T.R. Callaway, D., Webb, W.L., Gaines, M.D., Procter, C. C. Jr., Sathyanarayana Pollock, J.S., Brock, T.L., McNeil, P.L. (2001) Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. J Surg. Res. 96: 173-182
- Huang, L., Tang, Y., Qin, J., Yuan, Q. Zhang, F., Tao, L. (2011) Vasoactive Intestinal Peptide enhances TNF- $\alpha$ -Induced IL-6 and IL-8 Synthesis in Human Proximal Renal Tubular Epithelial Cells by NF- $\kappa$ B Dependent Mechanism. Inflammation Dec 30
- Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener, R. Fassler and S. Werner, Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. Cytokine 8:548-556, 1996.
- Hunt, TK. Wound healing and wound infection: theory and surgical practice. New York: Appleton-Century-Crofts. 1980
- Hutchings, H., Ortega, N., Plouet, J. (2003) Extracellular matrix-bound VEGF promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. FASEB J 17: 1520-2
- Huttenlocher, A., Werb, Z., Tremble, P., Huhtala, P., Rosenberg, L., Damsky, C.H. (1996) Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin Matrix Biol 15: 239-250
- Ignatz, R.A. Massagne, J. (1986) Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J. Biol.Chem. 261: 4337-4345
- Iocono, J.A., Collieran, K.R., Remick, D.G., Gillespie, B.W., Ehrlich, H.P., Garner, W.L. (2000) Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. Wound repair Regen 8: 216-225
- Ishida, Y., Gao, J. L., Murphy, P.M. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. J. Immunol. 180, 569-579
- Ito, A. Sato, T., Iga, T., Mori, Y. (1990) Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. FEBS Lett 269: 93-5

- Jugdohsingh, R. (1999) Soluble silica and aluminium bioavailability. University of London Phthesis
- Kalluri, R. Neilson, E.G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implication for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776-1784.
- Kang, Y-M., Kyoung-Hwa, K., Yang-Jo, S., Sang-Hoon, R. (2008) Evaluations of osteogenic and osteoconductive properties of a non-woven silica gel fabric made by the eletrospinning method. *Acta Biomaterials* 5: 462-469
- Karin, M., Ymamamoto, Y., Wang, Q.M. (2004) The IKK NF-[kappa]
- Kastenbauer, S. und Ziegler-Heitbrock, H.W.L. N (1999) NF- $\kappa$ B1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immunol* 67(4):1553-9
- Kikuchi, K., Kadono, T., Takehara, K. (1995) Effects of various growth factors and histamine on cultured keloid fibroblasts. *Dermatology* 190: 4-8
- Kischkel, F. C.; Hellbardt, S., Berhmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, O.H., Peter, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588
- Kishimoto, T., Hirano, T (1988) Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 485-512
- Kishore, R., McMullen, M. R., Cocuzzi, E., Nagy, L. E. (2004) Lipopolysaccharide-mediated signal transduction: Stabilization of TNF-alpha mRNA contributes to increased lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha production by Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Comparative Hepatology* 3 (Suppl1):S31
- Knapp, T.R., Daniels, R.J., Kaplan, E.N. (1977) Pathologic scar formation. Morphologic and biochemical correlates. *Am J Pathol* 86: 47-69
- Krischel, V. Bruch-Gerharz, D. Suschek, C. Kröncke, K.-D., Ruzicka, T., Kolb-Bachhofen (1998) Biphasic Effect of Exogenous Nitric Oxide on Proliferation and Differentiation in Skin Derived Keratinocytes but Not Fibroblasts. *The J Invest Dermatol* 111:286-291
- Ladwig, G.P., Robson, M.C., Liu, R., Kuhn, M.A., Muir, D.F., Schultz, G.S. (2002) Ratios of activated matrix metalloproteinases-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 10: 26-37
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lawrence und Fong (2010) The resolution of Inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- $\kappa$ B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42; 519-523
- Le, J.M., Weinstein, D, Gubler, U., Vilcek, J. (1987) Induction of membrane-associated interleukin-1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J. Immunol* 138:2137-42
- Leask, A. (2010) Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis: TGF $\beta$ , Angiotensin, Endothelin, CCN2, and PDGF, Partners in Fibroblast Activation. *Circulation Research* 106: 1675-1680
- Lee, O., Lee, D.J., Chan, C., Chen, S.W., Ch'en, I., Jamora, C. (2009) Dynamic expression of epidermal caspase 8 simulates a wound healing response. *Nature* 458, 519-523
- Leffmann, C., Anders, J., Heinemann, A., Leutenegger, M., Pröfener, F. (2002) Dekubitus. Robert Koch-Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 12: 9
- Li, Q., Verma, I.M. (2002) NF- $\kappa$ B Regulation in the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* 2(10):725-34.
- Liechty, K.W., Crombleholme, T.M., Cass, D.L., Martin, B., Adzick, N.S. (1998) Diminished interleukin-8 (IL-8) production in the fetal wound healing response. *J. Surg. Res.* 77: 80-84
- Lin, C.-C., Tseng, H.-W., Hsieh, H.-L., Lee, C.-W., Wu, C.-Y., Cheng, C.-Y., Yang, C.-M. (2008) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor- $\kappa$ B in A549 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 229:386-398
- Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., Lehnert, H. (2002) Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologica* 45: 1011-6

- Lobmann, R., Schultz, G., Lehner, H. (2003) Molecular fundamentals of wound healing in diabetic foot syndroms. *Med Klein* 25: 98(5):292-301
- Lynch, S.E., Colvin, R.R., Antoniades, H.N. (1989) Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine wounds. *J Clin Invest* 84: 640
- Mast, B. A. und Schultz, G. S. (1996) Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Rep Reg* 1996; 4: 411-20
- Mariani, T.J., Roby, J. D., Mecham, R.P., Parks, W.C., Crouch, E. Peirce, R. A. (1996) Localization of type-1 procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor  $\beta$  as a mediator of fibrosis. *Am. J. Pathol.* 148: 151-164
- Martin, P. (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309): 75-81.
- Martin, P., Leibovich, S.J. (2005) Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 15, 599-607
- Martin, S.J., Reutelingsperger, P.C., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., La Face, D.M., Green, D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182(2):1545-56
- Martinez-Ferrer, M., Fshar-Sherif, A.R., Uwamariya, C., de, C.B., Davidson, J.M. Bhowmick, N.A. (2010) Dermal transforming growth factor-beta responsiveness mediates wound contraction and epithelial closure. *Am.J. Pahtol.* 176, 98-107
- Mast, B.A. und Schultz, G.S. (1996) Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 4(4):411-20
- Matera, M.G., Calzetta, L., Cazzola, M. (2010) TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther.* 23(2):121-8
- Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435
- Metschnikoff, E. (1882) Zur Lehre über die intracelluläre Verdauung niederer Tiere. *Zoologischer Anzeiger*, 3, pp.44-47
- Metschnikoff, E. (1884) Ueber die pathologische Bedeutung der intracellulären Verdauung Fortschritte der Medizin 17, 558-569
- Mignatti, P., Rifkin, D.B., Welgus, H.G., Parks, W.C. (1996) Proteinases and tissue remodeling. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 427-74
- Murray, J.C. (1993) Scars and keloids. *Dermatol Clin* 11: 697-708
- Nedelec, B., Shankowsky, H., Scott, P.G., Gharary, A., Tredget, E.E. (2001) Myofibroblasts and apoptosis in human hypertrophic scars: the effect of interferon-alpha2b. *Surgery* 130: 798-808
- Niessen, F.B., Andriessen, M.P., Schalkwijk, J., Visser, L., Timens, W., (2001) Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J. Pathol.* 194, 207-216.
- Nishimoto, N. und Kishimoto, T. (2006) Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2: 619-626
- Nissen, N.N., Polverini, P.J., Koch, A.E., Volin, M.V., Gamelli, R. L., DiPietro, L.A. (1998) VEGF mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 152:1445-52
- Nozaki, S., Filiciani, C, Sauder, D.N. (1993) Keratinocyte cytokines. *Dermatols*7: 83-100
- Oakley, F., Mann, J., Nailard, S. Smart, D. E., Mungalsingh, N. Constandinou, C., Ali, S., Wilson, S. J., Millward-Sadler, H., Iredale, J.P., Mann, D. A. (2005) Nuclear Fractor-kB1 (p50) Limits the Inflammatory and Fibrogenic Responses to Chronic Injury. *AJP*, Vol.166, No.3
- O'Kane, S., Ferguson, M.W., (1997) Transforming growth factor beta and wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29. 63-78

- Ortega, N., L'Faqihi, F.E., Plouet, J. (1998) Control of VEGF activity by the extracellular matrix *Biol Cell* 90: 381-90
- Overall, C.M., Wrane, J.L., Sodek, J. (1989) Independent regulation of collagenase, 72 kd-prgelatinase and metalloproteinase inhibitor (TIMP) expression in human fibroblasts by transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* 264:1860-1869
- Pages, G., Pouyssegur, J. (2005) Transcriptional regulation of the VEGF gene – a concert of activating factors. *Circulation* 112:564-73
- Pardali, E., ten Dijke, P. (2009) Transforming growth factor- $\beta$  signaling and tumor angiogenesis. *Front. Biosci.* 14, 4848-4861
- Park, H. Park, S. G., Kim, J., Ko, Y-G., Kim, S. (2002) Signaling pathways for TNF production induced by human aminoacyl-tRNA synthetase-associating factor, p43. *Cytokine*, Vol.20, No.4:148-153
- Park, J., Keller, G.A., Ferrara, N. (1993) The VEGF isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4: 1317-26
- Pary, R., Poowman, D. Delves, H.T. Roberts, N.B. Birhcall, J.D. Bellia, J.P. Davenport, A., Ahmad, R., Fahal, I. Altman, PI (1998) Silicon and aluminium interactions in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 13:1759-1762
- Pepper, M.S. (1997) Transforming growth factor- $\beta$ : vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 21-43
- Pereira, S.G. und Oakley, F. (2008) Nuclear factor- $\kappa$ B1: Regulation and function. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 1425-1430
- Perkins, N. D.: Integrating cell-signaling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2007, Volume 8, 49-62
- Rajan, S. Ye, J. Bai, S., Huang, F., Guo, Y.L. (2008) NF- $\kappa$ B, but not p38 MAP kinase, is required for TNF- $\alpha$ -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cell: *J. Cell Biochem* 105:477-86
- Reddy, S., Jia, S., Geoffrey, R., Lorier, R., Suchi, M., Broeckel, U., Hessner, M.J., Versky, J., (2009) An autoimmune disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N. Engl. J. Med.* 360, 2438-2444
- Reffit, D.M. Jugdaohsingh, R. Thompson, R.P.H. Powell, J.J. (1999) Silic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. *Journal of inorganic Biochemistry* 76:141-147
- Rennekampff, H.O., Hansbrough, J.F., Kiessig, V., Dore, C., Sticherling, M.Schröder (2000) Bioreactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J. Surg. Res.* 93:41-54
- Richter, J., Ng-Sikorski, J., Olsson, I., Andersson, T. (1990) Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18 integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> *Proc Natl. Acad. Sci USA* 87: 9472-6
- Robert Koch-Institut (2002) Gesundheitsberichterstattung des Bundes „Dekubitus“ Heft 12, S.7
- Roberts, N.B., Williams, P. (1990) Silicon measurement in serum and urine by direct current plasma emission spectrometry. *Clinical Chemistry* 36: 1460-1465
- Rodland, K.D., Muldoon, L.L., Magun (1990) Cellular mechanisms of TGF-beta action. *J Invest Dermatol* 94:33S-40S
- Romano die Peppe, S., Mangoni, A., Zambruno, G., Spinetti, G., Melillo, G., Capogrossi, M.C. (2002) Adenovirus-mediated VEGF (165) gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. *Gene Ther* 9: 1271-7
- Roth, D., Piekarek, M., Christ, H., Bloch, W., Paulsson, M., Krieg, T. (2006) Plasmin modulates VEGF-A mediated angiogenesis during repair. *Am J. Pathol* 168: 670-84
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ionnidou, S., Fujisawa, H., Bestholtz, C., Shima, D.T. (2002) Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A morphogenesis. *Gene Dev* 16:2684-98
- Russel, S.B., Trupin, K.M., Rodriguez-Eaton, S., Russel, J.D. Trupin, J. (1988) Reduced growth-factor requirement of keloid-derived fibroblasts may account for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:587-591

- Rychlik, W. und Rhoads, R.E. (1989) A Computer Program Choosing Optimal Oligonukleotides for Filter Hybridization, Sequencing and for In Vitro Amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.* 17, 8543
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- Sakamoto, K., Arakawa, H., Mita, S., Ishiko, T., Ikei, S., Egami, H., Hisano, S., Ogawa, M. (1994) Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level. *Cytokine* 6:181-6
- Salinovich, O., Montelaro, R.C. (1986) Reversible Staining and Peptide Mapping of Proteins Transferred to Nitrocellulose After Separation by Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156, 341-347
- Sauder, D.N. (1989) Interleukin-1 *Arch Dermatol* 123:679-682
- Sawamura, D., Meng, X., Ina, S. (1998) Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocytes gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes. *J. Immunol* 161: 5633-5639
- Scott, P.G., Dodd, G.M., Tredget, E.E., Ghahary, A., Rahemtulla, F. (1996) Chemical characterization and quantification of proteoglycans in human post-burn hypertrophic and mature scars. *Clin Sci* 90:417
- Shah, M., Foreman, D. M., Ferguson, M.W. (1994) Neutralising antibody to TGF- $\beta$ 1,2, reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci* 107: 1137-1157
- Shah, M., Foreman, D. M., Ferguson, M.W. (1995) Neutralisation of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 or exogenous addition of TGF- $\beta$ 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J. Cell Sci.* 108 (Pt. 3), 985-1002
- Silva, R., Ferreira, H., Vasconcelos, A., Gomes, A.C., Cavaco-Paulo, A. (2012) Sonochemical proteinaceous microspheres for wound healing. *Adv Exp Med Biol.* 733: 155-64
- Singer, A. J. und R. A. Clark (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341(10): 738-46
- Simmonds, R.E., und Foxwell, B.M. (2008) NF- $\kappa$ B and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* 47: 584-590
- Slemp, A.E., Kirschner, R.E. (2006) Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr. Opin. Pediatr.* 18: 396-402
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as isoform-specific receptor for VEGF. *Cell* 92: 735-45
- Stemke, G.W., Laigret, F., Grau, O. und Bové, J.M. (1992) Phylogenetic Relationships of Three Porcine Mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and Complete 16S rRNA Sequence of *M. flocculare*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* p. 220-225
- Stokvis, E., Rosing, H., Crul, M., Rieser, M.J., Heck, A.J., Schellens, J.H. Beijnen, J.H. (2004) Quantitative analysis of the novel anticancer drug ABT-518, a matrix metalloproteinase inhibitor, plus the screening of six metabolites in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *JMass Spectrom* 39(3):277-88
- Sullivan, K.M., Lorenz, H.P., Meuli, M., Lin, R.Y., Adzick, N.S., A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta. *J Pediatr Surg* 30: 198-203, 1995
- Szabowski, A., Maas-Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N.E., Angel, P. (2000) c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103, 745-755
- Tarnuzzer, R.W., Schultz, G.S. (1996) Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 4: 321-5.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brwon, R. A. (2002) Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev.* 3: 349-63.

- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- Trengove, N., Langton, S., H., Stacey, M. (1996) Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing chronic leg ulcers. *Wound Rep. Regen* 4: 234-9
- Trengove, N., Stacey, M.C., Macauley, S., Bennett, N., Geibson, J., Burslem, F., (1999) Analysis of acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Regen* 7: 442-52
- Trengove, N., Bielefeldt-Ohmann, H., Stacey, M. (2000) Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing leg ulcers. *Wound Rep. Regen* 8:13-25
- Tsou, R. Fathke, C., Wilson, L., Wallace, K., Gibran, N. Isik, F. (2002) Retroviral delivery of dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor type 2 to murine wounds inhibits wound angiogenesis. *Wound Repair Regen* 10: 222-229
- Tuan, T., Nichter, L.S. (1998) The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today* 1: 19-24
- Tuttolomondo, A., La Placa, S., Di Raimondo, D., Bellia, S., Caruso, A., Lo Sasso, B. Guerico, G., Diana, G., Ciaccio, M., Licata, G., Pinto, A. (2010) Adiponectin, resistin and IL-6 plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlations with clinical variables and cardiovascular co-morbidity. *Cardiovasc Diabetol.* 13: 9:50
- Urioste, S.S., Arndt, K.A., Dover, J. (1999) Keloids and Hypertrophic Scars: Review and Treatment Strategies. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, Vol 18, No 2 159-171
- Vaalamo, M., Weckroth, M.; Puolakkainen, P.P., Kere, J. Saarinen, P.O., Lauharanta, J. Saarialho-Kere, U.K. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. *Br. J. Dermatol.* 135: 52-9
- Viac, J., Schmitt, D., Claudy, A. (1994) Adhesion molecules and inflammatory dermatoses *Allerg Immunol (Paris)*. 26(8):274-7.
- Wahl, C., Liptay, S. Adler, G., Schmid, R. (1998) Sulfasalazine: a potent and Specific Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B. *J Clin Invest.*;101(5):1163-74
- Wallace, H.J. Stacey, M.C. (1998) Levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF receptors in chronic venous leg ulcers-correlations to healing- status. *J Invest Dermatol* 110: 292-6
- Wallace, H.J., Vandongen, Y.K., Stacey, M.C. (2006) Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism associated with increased susceptibility to venous leg ulceration. *J. Invest Dermatol* 126: 921-5
- Wang, C-Y, Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, Jr A.S. (1998) NF- $\kappa$ B antiapoptosis induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress Caspase-8 activation. *Science* 281(5383):1680-3
- Wang, R., Ghahary, A., Shen, Q., Scott, P.G., Roy, K., Tredget, E.E. Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-beta1 mRNA and protein than normal skin cells. *Wound. RepairRegen.* 8, 128-137
- Wang, H., Czura, C., Tracey, K. (2003) Tumor necrosis factor In: Thomson, A., Lotze, M., editors. *The cytokine handbook* San Diego: Academic Press 837-60
- Weber, L., Meigel, W.N., Spier, W. (1978) Collagen polymorphism in pathologic human scars *Arch Dermal Res* 261: 63-71
- Werner, S. Grose, R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol.Rev.* 83, 835-870.
- Westermark, B. und Blomquist, E. (1980) Stimulation of fibroblast migration by epidermal growth factor *Cell Biol Int Rep* 4: 649-654
- Winter, G.D. (1962) Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* Bd. 193, S293-294
- Winter, G. D. und Scales, J.T. (1963) Effect of fair drying and dressings on the surface of a wound. *Nature* Bd. 197, S.91-92

- Xiang, Q., Xia, J., Zhang, H., Zhang, X., Lu, M., Zhang, H., Su, Z., Zhao, W., Lin, C., Huang, Y., Li, X. (2011) Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. *Burns* 37(5):886-95
- Xue, H., McCauley, R.L., Zhang, W. (2000) Elevated interleukin-6 expression in keloid fibroblasts. *JSurg. Res* 89: 74-77
- Yager, D.R. Zhang, L.Y., Liang, H.X., Diegelmann, R.F., Cohen, I.K. (1996) Wound fluids from human pressure ulcers and activity compares to surgical wound fluids. *J. Invest Dermatol.* 107:743-8
- Yang, L. Foio, R.M. Sciuto, T. E. , Dvorak, A.M. Alon, R., Sussinkas, F.W. (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106:584-92
- Yang, X., Zhang, S., Pang, X., Fan, M. (2012) Pro-inflammatory cytokines induce odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells. *J Cell Biochem:* 113(2): 669-77
- Younai, S., Nichter, L.S., Wellisz, T. (1994) Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor- $\beta$  in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. *Ann Plast Surg* 33: 148-151
- Younai, S., Venters, G., Vu, S., Nichter, L., Nimni, M.E., Tuan, T.L. (1996) Role of growth factors in scar contraction: an in vitro analysis. *Ann Plast Surg* 36: 495-501
- Zhang, L.Q., Laato, M., Muona, P., Penttinen, R., Oikarinen, A., Peltonen, J. (1995b): A fibroblast cell line cultured from a hypertrophic scar displays selective downregulation of collagen genes expression: barely detectable messenger RNA levels of the pro alpha 1 (III) chain of type III collagen *Arch Dermatol Res* 287: 534-538

## Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Prof. h.c. mult. Norbert Pallua danke ich für die Möglichkeit die Arbeit an der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie anzufertigen.

Mein ernsthafter und wirklich besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek für die Möglichkeit eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine sehr gute wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung sowie die Erstellung des Erstgutachtens.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Henrike Heise danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, das Gefühl Ihr nicht lästig gewesen zu sein und das Interesse an meiner Arbeit.

Und ganz doll möchte ich mich bei Dr. Michèle Hoffmann bedanken, für was alles kann ich hier gar nicht sagen. Und bei Andrea möchte ich mich bedanken, die mich beim Anfertigen der Arbeit sehr unterstützt hat. Bedanken möchte ich mich bei Sandra, Eva, Katja, Sigrid mit denen es im Labor einfach viel Spaß gemacht hat.

Und bei meinen Freunden, denen es nie langweilig wird zu fragen, wann ich denn nun fertig bin: Saskia, Anika, Jessie, Anke, Eva, Beate, Brigitte, Gerti, Silke ;-)

Und meiner Schwester gebührt auch ein großes Dankeschön! Denn Du hast mir den Rücken frei gehalten!

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Mann bedanken, für seine fortwährende liebevolle Unterstützung und den fortwährenden Unglauben, dass man für so wenig Geld so viel arbeiten kann.

Und bei den besten Männern der Welt möchte ich mich von Herzen bedanken: meinen Söhnen Simon und Robin, denn nur Sie geben dem ganzen einen Sinn.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegt Dissertation eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die vorgelegte Dissertation ist in der vorliegenden Form noch keiner anderen Institution eingereicht worden. Ich habe bislang keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Neuss, den