Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Entwicklung eines in-vitro-Modells zur Untersuchung des sekundären Wundprogresses in der Stase-Zone von Verbrennungsverletzungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Niklas Markus Wergen 2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Zusammenfassung

Der sekundäre Wundprogress ist weiterhin ein großes Problem in der Verbrennungsmedizin. Er beschreibt das zeitlich verzögerte Nachtiefen und Wachsen von Verbrennungswunden, das vor allem in der von Jackson beschriebenen Stase-Zone auftritt. Bei den Betroffenen kann dies den Heilungsverlauf deutlich verlangsamen, zu verstärkter Narbenbildung führen und letztlich Einschränkungen der Lebensqualität bedeuten. Als ursächlich für diesen Prozess werden in der Literatur hauptsächlich ischämische und entzündliche Mechanismen beschrieben. Vollständig verstanden ist der sekundäre Wundprogress bislang jedoch nicht, zumal wenig Erkenntnisse zu den Prozessen auf zellulärer Ebene vorliegen.

In Ermangelung an guten *in-vitro* Modellen wurden in dieser Arbeit zwei Modelle für Verbrennungsverletzungen entwickelt, vor allem um die zellulären Prozesse in der Stase-Zone von Verbrennungen besser zu verstehen. Dafür wurden humane dermale Fibroblasten (HDF) aus Hautpräparaten isoliert und die geschaffenen Zellkulturen anschließend mittels zwei verschiedenen Versuchsaufbauten für wenige Sekunden sehr stark erhitzt. Anhand eines Resazurin-Reduktions-Assay konnte die Abnahme der Viabiltität nach der Hitzeexposition beobachtet werden. Hier wurde deutlich, dass bei den gewählten Expositionsparametern ein Großteil der HDF erst im Verlauf der ersten 24 Stunden in den Zelltod übergeht und somit einen verzögerten Zelltod aufzeigten.

Zur Differenzierung dieses Zelltodes wurde ein Apoptose Assay nach Nicoletti per Durchflusszytometrie durchgeführt. Aufgrund des nicht eindeutigen Ergebnisses wurden weitere Methoden wie bspw. ein Western-Blot verwendet. Hierbei wurde das Auftreten von Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP), bzw. cleaved-PARP, sowie verschiedener Hitzeschockproteine untersucht. Es konnte ein deutlich hochreguliertes PARP festgestellt werden, was Rückschlüsse auf eine massive DNA-Schädigung zulässt. Das auf eine Apoptose hinweisende cleaved-PARP konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde untersucht, inwiefern apoptosemodulierende Pancaspase-Inhibitoren, GDF-5, ROS-Scavenger oder ein Translationshemmer den beobachteten Zelltod beeinflussen können. Dabei gelang es nicht den Zelltod zu hemmen, es ergaben sich aber wichtige Hinweise auf die grundlegenden Mechanismen. Letztlich wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ein Tunel-Assay und eine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Zusammenschau der Ergebnisse macht deutlich, dass Apoptose bei den gewählten Expositionsparametern kaum abläuft.

Anhand der verwendeten Modelle konnte gezeigt werden, dass das Phänomen des sekundären Wundprogresses auch *in-vitro* vergleichbar zu beobachten ist. Dies legt nahe, dass dieser Prozess nicht rein durch ischämische oder entzündliche Mechanismen erklärt werden kann, sondern auch intrinsische Faktoren der geschädigten Zellen von Bedeutung sind. Auch wenn apoptotische Prozesse bei den hier gewählten Versuchsbedingungen keine Relevanz hatten, können anhand der Modelle zukünftig weitere mögliche Einflussfaktoren wie bspw. reaktive Sauerstoffspezies oder die Rolle von PARP untersucht werden.

Abstract

Burn wound progression remains an important issues in the treatment of burn patients. This process, which according to Jackson's Burn model takes place in the Stasis Zone, leads to a delayed deepening as well as growth of burn wounds and can cause a conversion to a higher burn grade. Thus, it delays the healing process, can cause hypertrophic scarring and often negatively influences the patients quality of life. Various factors are known to have an influence on burn wound progression, most frequently mentioned are mechanisms like reduced perfusion as well as overwhelming inflammation. However, generally, burn wound progression is poorly understood and, in particular, there is very little knowledge about the processes on the cellular level

In the absence of a good *in-vitro* model for burn wounds, two models were developed and discussed in this work, especially to examine the cellular processes in Stasis Zone. For this purpose, human dermal fibroblasts (HDF) were isolated from tissue donated by healthy patients after abdominoplasty. The resulting cell cultures were treated following two different procedures, each with a short but intense heat exposure. The decrease in viability resulting from this treatment was measured using a resazurin reduction assay. It was observed that, depending on the specific parameters of the exposure, a large part of the HDF survived initially, but died a delayed cell death later within the following 24 hours.

To investigate and understand this delayed cell death more accurately, an apoptosis assay according to Nicoletti was performed. In this context, because of ambiguous results, additional methods such as a Western blot, were used. Here, the appearance of poly (ADPribose) polymerase 1 (PARP), cleaved PARP and some types of heat shock proteins were measured. A great amount of PARP indicated a massive DNA damage, while cleaved-PARP, that would have indicated an apoptosis, was not detected. Furthermore, it was examined, how apoptosis-modulating pancaspase inhibitors, GDF-5, ROS scavenger or a translation inhibitor can influence delayed cell death. These substances failed to inhibit cell death, but important clues towards understanding the fundamental mechanism could be gathered. Finally, a Tunel-Assay and a fluorescence microscopy were performed at various times after the heat exposure. In summary, the results of this analysis, indicate that it is unlikely that, under the chosen exposure parameters, apoptosis played a crucial role in the occurrence of delayed cell death.

Based on the models used, it could be shown that the phenomenon of secondary wound progression can also be observed in a comparable manner *in-vitro*. This suggests that wound progression cannot be explained solely by ischemic or inflammatory mechanism. Instead, intrinsic processes within the damaged cells also play a role. Even though there were no apoptotic processes found here, the developed models will allow further research on the fundamental mechanisms, e.g. on the role of PARP or ROS.

Abkürzungsverzeichnis

$^{\circ}\mathrm{C}$	Grad Celsius
μ	Mikro
ABSI	Abbreviated Burn Severity Index
ADP	A denos indiphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser (lat. aqua destillata)
ATP	A denosint riphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid
BHT	Butylhydroxytoluol
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CHX	Chlorhexidin
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTB	$CellTiterBlue^{\textcircled{R}}$
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell Sorting)
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	${ m Growth/differentiation\ factor}$
HCL	Salzsäure
HDF	Humane dermale Fibroblasten
HSF	Heat Shock Factor
HSP	Hitzeschockproteine (engl. Heat Shock Protein)
ICD-10	International Classification of Diseases (in der 10. Auflage)
l	Liter
LD50	Mittlere letalen Dosis
LT50	Mittlere letale Temperatur
m	Milli
M	Molar
MnTBAP	Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin
NADH	${ m Nicotinamidadenindinukleotid}$
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase

PBS	Phosphate Buffered Saline, bzw. phosphatgepufferte Salzlösung
РJ	Propidiumiodid
Q-VD-OPH	N-(2-Quinolyl)valyl-aspartyl-(2,6-diffuor ophenoxy)methyl~Keton
R^2	Bestimmtheitsmaß, bzw. Determinationskoeffizient
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
SSC	Saline Sodium Citrate
TBS/T	Tris-buffered Saline with Tween20
TGF	Transforming Growth Factor
Tunel	TdT-mediated $dUTP$ -biotin nick end labeling
USB	Universal Serial Bus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z-VAD-FMK	$N ext{-}Benzyloxy carbonyl ext{-}Val ext{-}Ala ext{-}Asp(O ext{-}Me) ext{-}Fluoromethylketon$

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung		1
	1.1	Bedeu	tung und Epidemiologie des thermischen Traumas	1
	1.2	Patho	physiologie	2
		1.2.1	Grundlegende Begriffe	2
		1.2.2	Systemische Reaktionen	4
		1.2.3	Sekundärer Wundprogress	5
		1.2.4	Zelluläre Reaktionen auf thermische Schädigung	9
	1.3	Behan	dlungsstrategien zur Verminderung des sekundären Wundprogresses.	12
	1.4	Bestel	nende Verbrennungsmodelle	13
	1.5	Zielset	tzung der Arbeit	15
2	Mat	terial u	nd Methoden	16
	2.1	Mater	ial	16
		2.1.1	Geräte	16
		2.1.2	Agenzien	18
		2.1.3	Puffer und Lösungen	20
		2.1.4	Antikörper	22
		2.1.5	Verwendete Kits	22
		2.1.6	Verbrauchsmaterialien	23
		2.1.7	Software	24
	2.2	Metho	pden	25
		2.2.1	Grundlegende Methoden der Zellkultur	25
		2.2.2	Methoden der Behandlung	27
		2.2.3	Methoden der Analyse	33
3	Erg	ebnisse		41
	3.1	Verbri	ühungsmodell	41
		3.1.1	Regressionsanalyse	42
		3.1.2	Behandlung mit z-VAD-FMK und GDF-5	44
		3.1.3	Hoechst 33342-/PJ-Färbung \ldots	47
	3.2	Konta	ktverbrennungsmodell	47
		3.2.1	Zellviabilität	49

		3.2.2	Apoptose-Assay nach Nicoletti	51
		3.2.3	Behandlung mit Q-VD-OPH	52
		3.2.4	Behandlung mit GDF-5	53
		3.2.5	Western-Blot	54
		3.2.6	Tunel-Assay	57
		3.2.7	Hoechst 33342-/PJ-Färbung \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots	58
		3.2.8	Antioxidantien	58
		3.2.9	Cycloheximid	61
4	Disl	kussion		63
	4.1	Vergle	eich und Bewertung der unterschiedlichen Modelle	63
		4.1.1	Verbrühungsmodell	63
		4.1.2	Kontaktverbrennungsmodell	64
	4.2	Verzögerter Zelltod und Vergleich zu <i>in-vivo</i> -Verbrennungswunden 66		
	4.3	Ätiologie des verzögerten Zelltodes		
		4.3.1	Apoptose-Assay nach Nicoletti	67
		4.3.2	Tunel-Assay	68
		4.3.3	Q-VD-OPH	68
		4.3.4	PARP und cleaved-PARP	68
		4.3.5	Cycloheximid	69
		4.3.6	Schlussfolgerung	69
		4.3.7	GDF-5	70
	4.4	Absch	lussbetrachtung und Ausblick	71

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Epidemiologie des thermischen Traumas

Schwere Verbrennungsverletzungen sind seit jeher für die Betroffenen ein stark traumatisierender Einschnitt in ihr Leben und schon lange Gegenstand der Forschung. Bereits im Ägypten des 15. Jahrhundert v. Chr. begann eine wissenschaftliche Auseinandersetzung über die optimale Behandlung von Brandwunden [1, S. 40]. Vor 400 Jahren erarbeitete der aus der Nähe von Düsseldorf stammende Wundarzt Wilhelm Fabry die erste Gradeinteilung von Verbrennungswunden [2]. Er behandelte Brandwunden damals noch indem er das betroffene Körperteil solange in heißes Wasser gehalten oder ausgebrannt hat, bis dies vom Patienten nicht mehr auszuhalten war [2].

Heutzutage findet in entwickelten Ländern die Therapie von Schwerstverbrannten großteils in hochspezialisierten Verbrennungszentren statt und es gelang durch das Verständnis der Pathophysiologie von Brandwunden die Mortalität deutlich zu senken [3]. So starben 2018 von 18.850 Patienten, die in Deutschland stationär mit Verbrennungsverletztungen behandelt wurden, nur noch 188 [4]. 1982 gingen Tobiasen et al., bei dem von ihnen entwickelten ABSI-Score zur Einschätzung der Prognose von Verbrennungsverletzungen, bei schweren Verbrennungen (10-11 Punkte) von einer Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 20 bis 40 % aus [5]. Laut Jahresbericht 2020 des Verbrennungsregisters haben die teilnehmenden Verbrennungskliniken eine Überlebenswahrscheinlichkeit von über 50% erreicht [6].

Trotzdem bleiben Brandverletzungen ein weltweites Problem. Laut WHO erleiden jährlich weltweit 11 Millionen Menschen eine schwere Verbrennung. 180.000 Patienten sterben an den Folgen, davon die überwiegende Mehrheit in Entwicklungsländern. [7]

Die Problematik bei Verbrennungsverletzungen besteht aber neben der akuten Letalität vor allem in den zumeist gravierenden Einschnitten in die Lebensqualität der Überlebenden. Bei über 70% der schwer verbrannten Patienten kann die Bildung von hypertrophen Narben oder Kontrakturen beobachtet werden [8]. Häufige Folge sind auch psychische Erkrankungen [9]. Insgesamt haben Verbrennungspatienten über viele Jahre hinweg eine erhöhte Mortalität [10]. Die teilweise lebenslangen Einschränkungen wiegen besonders schwer, da ein Großteil der Verbrennungsverletzungen Kinder im Alter zwischen 1 bis 4



Abb. 1.1: Fallzahlen von Verbrennungsverletzungen (ICD-10: T20-T32) nach den Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern in Deutschland [4]. Die Aufgliederung nach Altersgruppen zeigt die deutlich erhöhte Prävalenz von Verbrennungen bei Kindern.

Jahren betrifft (siehe Abbildung 1.1)[4].

Aus den in der Vergangenheit erreichten Erfolgen in der Behandlung von Schwerstverbrannten, mit Senkung der Mortalität, muss nun auch ein gesteigerter Anspruch an das funktionelle Outcome und die Lebensqualität resultieren [11]. Um dies zu erreichen sind weitere Erkenntnisse über Verbrennungsverletzungen notwendig und beispielsweise ein besseres Verständnis des sekundären Wundprogesses. Dieser in den folgenden Abschnitten weiter erläuterte Prozess kann zu einem deutlichen Vertiefen und Vergrößern von Verbrennungswunden führen [12]. So kann er zu einer verzögerten Wundheilung und übermäßiger Narbenbildung beitragen.

1.2 Pathophysiologie

1.2.1 Grundlegende Begriffe

Mechanismen thermischer Schädigung

Thermische Schädigungen der Haut können aus verschiedenen Unfallhergängen entstehen. Bei Erwachsenen ist der am häufigsten vorkommende Mechanismus eine direkte Flammeneinwirkung [13, S. 5]. Bei Kindern hingegen sind Verbrühungsverletzungen öfter [14, S. 8]. Seltener treten sogenannte Kontaktverbrennungen durch Berührung von heißen Oberflächen auf. Diese sind zwar meist nur kleinflächig aber oft sehr tief [13, S. 6]. Des Weiteren werden auch Elektroverbrennungen, Strahleneinwirkungen und Verbrennungen durch Explosionen zu den thermischen Traumata gezählt [15].

Verbrennungsgrade

Die Tiefe von jeder Art von Verbrennungsverletzung wird in Graden von I bis IV angegeben (siehe: Tabelle 1.1 und Abbildung 1.3). Je nach Grad reicht die Verbrennung bis in unterschiedliche Hautschichten [15]. Dies beeinflusst maßgeblich die Wundheilung [16]. Grund dafür ist zum einen die Lokalisation der epidermalen Stammzellen in den Haarfolikeln [16]. Werden diese geschädigt, was ab einem Verbrennungsgrad IIb° der Fall ist, kann eine spontane Wundheilung deutlich gestört und verzögert sein [16]. Zum anderen nimmt die Konzentration von Fibroblasten und Makrophagen in der Dermis in der Tiefe hin ab [17]. Auch sie spielen durch ihre Produktion von Extrazellulärer Matrix und Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle für die Wundheilung [17]. Somit benötigen tiefe Verbrennungswunden meist eine chirurgische Versorgung und heilen nur unter Narbenbildung ab [14, S.41].

Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf Fibroblasten, dem Hauptzelltyp der Dermis. Diese sind für die Sythese und den Umbau der Extrazellulär Matrix zuständig.

Verbrennungsgrad	Geschädigte Struktur	Klinik
Grad I (superficial burn)	Epidermis	Rötung; starker Schmerz;
		vergleichbar mit Sonnen-
		brand
Grad IIa (superficial partial-	Oberflächige Dermis	Blasenbildung; Wund-
thickness burn)		grund rosig und reka-
		pillarisierend; starker
		Schmerz; Haare fest veran-
		kert; Heilung meist ohne
		Narbenbildung
Grad IIb (deep partial-	Tiefe Dermis	Blasenbildung; Wund-
thickness burn)		grund blasser und nicht
		oder schwach rekapil-
		larisierend; reduzierter
		Schmerz; Haare leicht zu
		entfernen; Heilung meist
		mit Narbenbildung

Grad	III	(full-thickness	Komplette Derm	nis	Trockener, weißer, leder-
burn)					artig harter Wundgrund;
					keine Schmerzen; keine
					Haare mehr vorhan-
					den; meist chirurgische
					Intervention notwendig
Grad I	V (sul	odermal burn)	Unterhautfettgev	webe,	Verkohlung
			Muskelfaszie,	Muskeln,	
			Knochen		

Tabelle 1.1: Verbrennungsgrade (inklusive englischsprachiger Entsprechung) mit betroffener Hautschicht und vorliegender Klinik. Adaptiert nach Rennekampff [15]

Expositionstemperatur und -dauer

Für das Ausmaß und den Verbrennungsgrad einer Verletzung spielt nicht nur die Expositionstemperatur eine wichtige Rolle, sondern auch die Expositionsdauer ist entscheidend. So konnten 1947 schon Henriques und Moritz in ihrer Arbeit zeigen, dass auch niedrige Temperaturen von 44°C über eine entsprechend lange Expositionszeit von 6 Stunden zu II° und III° Verbrennungen führen können, wohingegen höhere Temperaturen auch im Bruchteil einer Sekunde starke Verbrennungen auslösen [18].

Bei dem Kontakt der Epidermis mit einem heißem Gegenstand, Flammen oder Flüssigkeiten entsteht im Gewebe ein Temperaturgradient. Die Temperatur nimmt mit Abstand zur Hitzequelle ab. Wie stark der Gradient ist, ist unter anderem abhängig von der Wärmeleitfähigkeit der einzelnen Hautschichten, aber auch von der Perfusion. Fu et al. haben anhand einer numerischen Simulation diesen Gradienten berechnet und dabei auch gezeigt, wie schnell die einzelnen Hautschichten nach Ende der Exposition wieder abkühlen. Abbildung 1.2 zeigt beispielhaft die Temperaturverläufe im Gewebe nach einer 15 sekündigen und 90°C heißen Exposition. [19]

1.2.2 Systemische Reaktionen

Pathophysiologisch lassen sich lokale und systemische Reaktionen auf Verbrennungsverletzungen unterscheiden [13, S. 8 ff.]. Da der Fokus dieser Arbeit auf den lokalen und zellulären Prozessen liegt, werden die systemischen Auswirkungen im Folgenden nur soweit aufgeführt, wie sie einen Einfluss auf die lokalen Wundbedingungen haben:

Bei Erwachsenen kann es ab einer verbrannten Körperoberfläche von 10% zu einer Verbrennungskrankheit kommen, bei Kindern bereits ab 5% [20]. Dabei handelt es sich um ein komplexes, intensivmedizinisches Krankheitsbild, welches durch eine Schrankenfunktionsstörung der kapillären Gefäße zu einer Flüssigkeitsverschiebung mit Ödembildung und



Abb. 1.2: Numerische Simulation der in der Haut auftretenden Temperaturgradienten nach Hitzeexposition der Hautoberfläche (15 Sekunden, 90°C). Abbildung entnommen von Fu et al. [19].

konsekutiven hypovolämischen Schock führen kann [15, 20]. Das sogenannte *capillary leak* wird durch Mediatoren wie Kinine, Prostaglandine, Leukotriene, Histamin und Serotonin vermittelt [14, S.49]. Zusätzlich werden endogene Katecholamine ausgeschüttet, die zu einer Vasokonstiktion führen [14, S. 50]. Der *platelet activating factor* führt 2 bis 3 Stunden nach der Verbrennung zu einer Hyperkoagulabilität [14, S. 50]. Im Weiteren können eine Myokarddepression, Organischämien, Sepsis und die überschießende Aktivierung von Immun- und Gerinnungssystem auftreten [15, 20]. All diese Mechanismen führen auch im Bereich der Verbrennungswunde zu einer reduzierten Perfusion des Wundbettes und damit zu einer weiteren ischämischen Schädigung der bereits durch die Hitze gestressten Zellen [21]. Dies ist einer der Mechanismen, der zu einem sekundären Wundprogress führen kann [21]. Dieser Prozess wird in den folgenden Abschnitten weiter erläutert.

1.2.3 Sekundärer Wundprogress

Der sekundäre Wundprogess ist ein häufiges Phänomen bei Verbrennungswunden. Dabei handelt es sich um ein zeitlich verzögertes Nachtiefen der Wunde, welches sogar zu einer Konversion der Wunde zu einem höheren Verbrennungsgrad führen kann (*burn wound conversion*) [17]. Auch die Wundfläche kann sich dabei in den ersten Tagen nach der initialen Verbrennung vergrößern [21]. Im deutschsprachigen Raum wird der Prozess häufig auch als Nachbrennen bezeichnet. Dieser Begriff ist jedoch irreführend, da im Wundbereich keine erhöhte Temperatur mehr vorliegt, sondern es sich um eine Reaktion des Gewebes und der angrenzenden Zellen handelt.

Wie in Abschnitt 1.2.1 bereits ausgeführt hat der Verbrennungsgrad massiven Einfluss auf die Wundheilung. Somit kann ein Wundprogress, der eine IIb° Verletzung zu einer III° macht gravierende klinische Auswirkungen haben und so beispielsweise eine Spontanheilung verhindern und zur Bildung einer hypertrophen Narbe führen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass der sekundäre Wundprogress durch eine optimale Therapie zu verringern, beziehungsweise vollständig zu verhindern ist. [17]



Verbrennungsmodell nach Jackson

Abb. 1.3: Querschnitt der Haut mit der Darstellung der drei Zonen des Jackson Verbrennungsmodells: Koagulationszone (schwarz), Stase-Zone (violett) und Hyperämie-Zone (rot) [12]. Die horizontalen Linien (--) zeigen die Tiefe der Verbrennung entsprechend der verschiedenen Grade [15]. Abbildung adaptiert nach Schmauss et. al [22].

Der sekundäre Wundprogress findet in der sogenannten Stase-Zone einer Verbrennungsverletzung statt. Diese Zone ist eine von drei Zonen, die Douglas Jackson 1953 erstmals beschrieben hat und die Teil eines bis heute gängigen Modells zur Beschreibung von Verbrennungswunden ist (siehe Abbildung 1.3). Jackson beschreibt, dass sich die drei Zonen konzentrisch anordnen und differenziert die Zonen vor allem anhand der nach der Verbrennung vorliegenden Perfusionsverhältnisse. Im äußersten Bereich von Verbrennungswunden liegt demnach die Hyperämie-Zone. Namensgebend ist eine reaktiv gesteigerte Perfusion in dieser Zone. Die kapilläre Gefäßversorgung ist sowohl direkt nach der Verbrennung, als auch im Verlauf vollständig intakt und das Gewebe bleibt vital und heilt ohne Folgen aus. [12]

Richtung Zentrum der Verbrennung grenzt nun die Stase-Zone an. Hier beschreibt Jackson zunächst eine intakte Perfusion, jedoch eine eingeschränkte Reduktion des Oxyhämoglobins. Daraus folgert er einen bereits früh reduzierten Metabolimus dieses Gewebes. Im Verlauf von 24 Stunden kommt es dann durch den Verschluss und die Zerstörung der Kapillare zu einem Verlust der Perfusion und somit zur Stase. Nach weiteren Tagen wird das Gewebe dieser Zone avital und ist nicht mehr von dem Gewebe der zentral liegenden Koagulationszone zu unterscheiden. Hier sind bereits direkt nach der Hitzeexposition alle



Abb. 1.4: Schematische Darstellung der beschriebenen Zusammenhänge und ablaufenden Prozesse im Rahmen des sekundären Wundprogresses sowie Verortung der hier behandelten zentralen Forschungsfrage: Inwieweit führt Hitzestress gewebsunabhängig zu einer Apoptose oder Nekrose?

Gefäße obliteriert und alle Zellen irreversibel geschädigt. [12]

Mechanismen des sekundären Wundprogresses

Die Mechanismen, die in der Stase-Zone der Wunde ablaufen und damit ursächlich für den sekundären Wundprogress sind, sind vielfältig beschrieben. Jedoch besteht weiter Unklarheit über die Relevanz der einzelnen Mechanismen. Wie im Folgenden dargestellt handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess, der nur in Teilaspekten geklärt ist. Abbildung 1.4 soll die Komplexität der ablaufenden Prozesse und deren Zusammenhänge darstellen, wobei kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden kann. Salibian et al. sehen im sekundären Wundprogress weiterhin den am schlechtesten verstandenen und therapierten Aspekt von Verbrennungswunden. [17, 21]

Bereits Jackson hat die Störung der Mikrozirkulation in der Stase-Zone beobachtet [12]. Diese wird bis heute als einer der grundlegenden Mechanismen angesehen und ist wiederum multifaktoriell bedingt. Zum einen spielen Faktoren ein Rolle, die bereits auch im Abschnitt 1.2.2 im Rahmen der systemischen Reaktionen vorgestellt wurden. Beispielsweise führt die nach einer Verbrennung auftretende vermehrte Freisetzung von Vasokonstriktoren wie Endothelin zu einer verringerten Perfusion des Wundbettes [23]. Weiter wird die lokale Perfusion durch Ödembildung im Rahmen der Verbrennungskrankheit verschlechtert [22]. Aber auch lokale Mechanismen wie die Schädigung der Endothelzellen scheinen relevanten Einfluss auf die Wundprogression zu haben. So korrelierte bei Hirth et al. das Ausmaß der Endothelzellnekrosen eine Stunde nach der Verbrennung mit dem Ausmaß der nach 7 Tagen evaluierten Tiefe der Gewebsnekrose [24]. Endothelschädigungen können auch durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bedingt sein. So vermuteten Till et al., dass die erhöhte Aktivität der Xanthinoxidase nach Verbrennungsverletzungen zur verstärkten ROS-Bildung führt und so Gefäßschäden und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität entstehen [25].

ROS gelten generell als bedeutender Faktor im sekundären Wundprogress. Sie entstehen nicht nur im Rahmen der erhöhten Aktivität der Xanthin-Oxidase sondern auch direkt durch die thermische Energie [26]. Auch durch die Entzündungsreaktion einwandernde Immunzellen setzen weitere ROS frei [27]. Insgesamt wird dadurch das Gleichgewicht von oxidativen und antioxidativen Substanzen zu Gunsten des oxidativen Stress gestört. Die Folge sind vor allem die Zerstörung der Zellmembranen durch Lipidperoxidation, jedoch können auch diverse andere Zellbestandteile wie Proteine und DNA durch ROS geschädigt werden [28, 29]. Letztendlich kann der oxidative Stress so sowohl per Nekrose aber auch per Apoptose zum Zelltod führen [30].

Die Einwanderung von Entzündungszellen hat wiederum auch Effekt auf die Perfusion im Wundbereich. So zeigte sich, dass die Aggregation von Neutrophilen in den postkapillären Venolen von Brandwunden zu Mikrothromben führen kann [31]. Verstärkt wird dieser Effekt durch die bereits in Abschnitt 1.2.2 erwähnte Hyperkoagulität [29]. Diverse Arbeiten konnten zeigen, dass eine lokale Hemmung der Migration von Leukozyten den sekundären Wundprogress reduzieren kann [31, 32].

Die Apoptose wird neben der Perfusion, Inflammation und ROS bei der Beschreibung des sekundären Wundprogresses mit am häufigsten genannt. Singer et al. haben 2008 in ihrer Arbeit die Stase-Zone im *rat burn comb model* (siehe Abschnitt 1.4) immunhistochemisch untersucht und dabei apoptotische Zellen mit CC3a-Antikörpern markiert. Zu allen Untersuchungszeitpunkten konnten vermehrt apoptotische Zellen detektiert werden, am deutlichsten 30 Minuten nach Verbrennung. Ein Großteil der Zellen schien jedoch per Nekrose zu sterben. Die Beobachtung, dass Apoptose nur in einem geringen Anteil der Zellen zu beobachten war, kann laut Singer sowohl dafür sprechen, dass es sich dabei um einen transienten Effekt handelt und somit immer nur wenige apoptotische Zellen zeitgleich zu erkennen sind. Oder aber auch, dass Apoptose nur eine untergeordnete Rolle im sekundären Wundprogess spielt. [33]

Die Frage ob Apoptose einen nennenswerten Einfluss auf den sekundären Wundprogress hat konnten auch andere Arbeiten nicht zweifelsfrei klären und ist zentraler Gegenstand dieser Arbeit. Hierbei soll unabhängig von gewebsspezifischen Faktoren untersucht werden, wie Fibroblasten auf einen kurzen hohen Hitzeimpuls reagieren und inwieweit durch den zellulären Schaden eine Apoptose induziert wird. Dafür soll im folgenden Abschnitt auf den aktuellen Forschungsstand bezüglich der zellulären Reaktion auf Hitze eingegangen werden.

1.2.4 Zelluläre Reaktionen auf thermische Schädigung

Erhöhte Temperaturen führen zu strukturellen Veränderungen von Makromolekülen in der Zelle [34]. Am besten ist dies für Proteine beschrieben. Die Proteine verlieren ihre physiologische Faltung und ihre Funktionsfähigkeit wird reduziert [34]. Es kommt zur Exposition von hydrophoben Gruppen nach außen, was wiederum zur Aggregation von weiteren, bislang intakten Proteinen führen kann [35]. Aber auch Lipidmembranen und DNA werden durch Hitze geschädigt. Daraus resultiert ein sehr breites Feld aus gestörten Zellfunktionen und somit ist es schwierig den kritischen Endpunkt zu finden, der letztlich zum Zelltod führt. [34]

Erschwert wird dies durch die Tatsache, dass das Ausmaß des Schadens durch Hitze auf Zellen abhängig von der Höhe der Temperatur und der Expositionszeit ist. Dies wurde von Henriques und Moritz für Verbrennungswunden gezeigt und gilt auch auf zellulärer Ebene [18, 34]. Bei entsprechender Expositionszeit führen bereits Temperaturen über 40°C zu Veränderungen an Makromolekülen [34]. Bis 47°C scheinen Schäden der Proteine durch Chaperone umkehrbar zu sein, während bei höheren Temperaturen davon ausgegangen wird, dass die Denaturierung der Proteine irreversibel ist [34]. Es lässt sich somit vermuten, dass Unterschiede in der Expositionstemperatur und -dauer auch unterschiedliche zelluläre Reaktionen hervorrufen. Die meisten Forschungsergebnisse, die die Reaktion hitzegestresster Zellen untersuchen, stammen aus Arbeiten zum Hitzeschlag oder der Hyperthermiebehandlung von Krebszellen [36]. Hier wird mit milden Temperaturen (bis maximal 47°C) und langen Expositionszeiten (bis zu mehreren Stunden) gearbeitet (siehe bspw.: [37]). Der Mechanismus bei Verbrennungsverletztungen ist jedoch meist durch einen sehr starken Hitzeimpuls gekennzeichnet, der nur wenige Sekunden einwirkt. Es ist nicht geklärt in wie weit sich Ergebnisse aus der Hyperthermie-Forschung auf Verbrennungsverletztungen übertragen lassen. Trotzdem sollen hier grundlegende Mechanismen beschrieben werden, die vermutlich auch bei Verbrennungen von Bedeutung sind.

Hitzeschockproteine

Eine der bekanntesten zellulären Reaktionen auf Hitze sind die Hitzeschockproteine (HSP). Sie wurden 1962 von Ritossa and Vonborstel entdeckt [38] und sind hoch konservative Proteine, die in allen pro- und eukaryotischen Zellen vorkommen [39]. Unterschieden werden 5 Protein-Familien anhand ihres Molekulargewichts: *small* HSPs, HSP60, HSP70, HSP90 und HSP110 [40]. Ihre Hauptaufgabe als Chaperone ist die Aufrechterhaltung der Protein Homöostase. Hierbei unterstützen sie die Faltung neu synthetisierter Proteine, aber stellen unter Verbrauch von ATP auch die Funktionsfähigkeit denaturierter und aggregierter Proteine wieder her [40]. Es wurde in den letzten Jahren deutlich, dass die HSP zusätzlich komplex mit diversen zellulären Prozessen verknüpft sind: So sind sie beispielsweise auch an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt [40] und können sowohl die Signalwege von Apoptose als auch Nekrose hemmen [41].

Auch in ungestressten Zellen werden HSP exprimiert [39]. Bei jedweder Art von zellulärem Stress wie Hitze, Hypoxie, Schwermetalle oder DNA-Schäden werden diese durch den Transkriptionsfaktor *Heat Shock Factor* (HSF) hoch reguliert [39]. Die HSP machen die Zellen widerstandsfähiger. So konnte seit langem gezeigt werden, dass die Induktion von HSP zu einer Thermotoleranz führt und hierdurch hitzegestresste Zellen deutlich später sterben [42].

In dieser Arbeit wurden an erhitzten Fibroblasten HSP 60, 70 und 90 mittels Western-Blot untersucht, sowohl um zu zeigen, dass die geschädigten Zellen noch zu einer Stressantwort im Stande waren, als auch um die Dynamik der Expression zu zeigen.

Art des Zelltodes

Geschädigte Zellen können zum Schutz des Gesamtorganismuses über unterschiedliche Arten ihren eigenen Tod einleiten. Häufig wird der programmierte, energieverbrauchende Zelltod in Form der Apopotose von dem unkontrollierter ablaufendem Zelltod, der Nekrose unterschieden. [43, S.678]

Bei der Apoptose kommt es durch die Aktivierung von Caspasen zu einem Schrumpfen des Zellkernes. DNA wird fragmentiert (*DNA laddering*) und es kommt zum Abschnüren von apoptotischen Vesikeln. Ausgelöst werden kann die Apoptose über einen extrinsischen oder intrinsischen Signalweg. Die extrinsische Aktivierung der Apoptose wird über die Bindung von Cytokinen oder Oberflächenmolekülen benachbarter Zellen gestartet. Bei der intrinsischen Aktivierung kann der Stimulus beispielsweise eine starke DNA-Schädigung sein. Vorteil einer Apoptose ist, dass es zu keiner Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes kommt, da die apoptosischen Vesikel einfach phagozytiert werden können. [43, S.678-681]

Bei der Nekrose einer Zelle kommt es hingegen zu einer Entzündung. Grund dafür ist das Freisetzen von Zellinhalt nach extrazellulär [44, S.633]. Dazu kommt es, indem die Energiereserven der Zelle, in Form von ATP, vollständig aufgebraucht wurden und so die Ionenpumpen die Zellhomöostase nicht mehr aufrecht halten können [29]. Es kommt zum Einstrom von Flüssigkeit nach intrazellulär, was zu einer Schwellung und letztlich der Lyse der Zelle führt [43, S.679]. Da die Apoptose ein Energie verbrauchender Prozess ist kann es auch im Verlauf der Apoptose zu einem ATP-Mangel kommen. Dies führt dann ebenfalls zum Zusammenbruch der Zellhomöostase und zur Nekrose.

Grund für einen Mangel an ATP kann beispielsweise ein massive Aktivierung der Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARP) sein [29]. Diese Enzymfamilie ist ein wichtiger

Bestandteil der DNA-Reparaturmechanismen und wird bei starken DNA-Schäden hoch reguliert [45]. Aber auch ROS können eine Hyperaktivität von PARP1 bedingen [43, S.679]. Für die Apoptose ist PARP aufgrund seines starken Energieverbrauches jedoch hinderlich, somit ist ein zentraler Schritt der Apoptose das Spalten von PARP1 durch die Caspasen 3 und 7 [45]. Dieser Mechanismus kann sich, wie im Folgenden auch geschehen, zu Nutze gemacht werden um eine ablaufende Apoptose indirekt nachzuweisen, indem man im Western Blot nach cleaved-PARP1, dem Spaltprodukt von PARP1, sucht [45].

Nun stellt sich die Frage welche Art des Zelltodes maßgeblich am sekundären Wundprogress beteiligt ist. Eine klare Aussage darüber würde neue Therapieoptionen eröffnen, wie zum Beispiel den Einsatz von anti-apoptotischen Substanzen.

Auch hier stammen die meisten Erkenntnisse aus der Hyperthermieforschung: Es konnte seit längerem gezeigt werden, dass erhöhte Temperaturen eine Apoptose auslösen können. 2015 konnten Gu et al. einen möglichen Signalweg aufzeigen: Sie beschreiben, dass Hitzestress zu einer Aktivierung des mitochondrialen Signalweges der intrinsischen Apoptose führen kann, also der Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma. Dies geschieht durch die Translokation von Bax in die mitochondriale Membran. Diese Translokation wird nach Gu et al. durch zwei Wege bedingt: Zum einen transkriptions-unabhänig durch die Translokation von p53 zu den Mitochondrien und zum anderen durch einen Anstieg der interzelluären Calcium-Konzentration. Beide Mechanismen, so Gu, sind auf die intrazelluläre Entstehung von ROS zurückzuführen. So konnte sowohl die Translokation von p53, wie auch der Anstieg der Calcium-Konzentration durch die Gabe von MnTBAP, einem ROS-Scavenger, unterbunden werden. [37]

Solche Ergebnisse aus der Hyperthermieforschung sind aus den beschrieben Gründen sicherlich nicht vollständig auf die Bedingungen in Brandwunden übertragbar.

Ahnlicher Ansicht war auch Matylevitch et al.: Ihr Team hat, in klarer Abgrenzung zur Hyperthermieforschung, 1998 an Keratinozyten die Art des Zelltodes nach einer hohen, einsekündigen Hitzexposition untersucht. Für ihren Versuchsaufbau wurden humane Keratinozyten auf Deckgläsern kultiviert und diese für eine Sekunde in erhitztes Medium getaucht. Anschließend wurde ein Tunel-Assay mit einem LIVE/DEAD Assay ergänzt. Das Tunel-Assay (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-Assay*) ist ein Verfahren bei dem freie 3'-OH-Gruppen markiert werden, die bei einer Aktivierung von Endonukleasen im Rahmen einer Apoptose entstehen. Als apoptotisch wurden alle Zellen definiert die zum Zeitpunkt des Tunel-positiv Werdens noch vital waren. [36]

Matylevitchs Ergebnisse zeigten, dass die Frage nach Apoptose oder Nekrose mit der Höhe der Expositionstemperatur zusammenhängt. Bei Expositionstemperaturen von 58°C und 60°C starben in diesem Versuchsaufbau der Großteil der Zellen per Apoptose. Bei höheren Temperaturen überwog der Anteil der Zellen, die per Nekrose starben. [36]

1.3 Behandlungsstrategien zur Verminderung des sekundären Wundprogresses

Zunächst soll ein kurzer Überblick der etablierten Therapie von Verbrennungspatienten gegeben werden. Hier konnten, wie in Abschnitt 1.1 gezeigt, deutliche Fortschritte erzielt werden, wobei bislang keine einheitliche Standardtherapie definiert wurde [46, S.95]. Allgemein hat sich jedoch bei geringgradigen Verletzungen bei der primären Wundversorgung der Einsatz von Lokalantiseptikern, wie z.B. Polyhexanid oder Silbersulfadiazin bewährt. Bei Verbrennungen ab Grad IIb ist eine chirurgische Therapie mit einer Nekrektomie und bei zirkulären Verbrennungen eine Escharotomie indiziert. Anschließend findet meist eine temporäre oder definitive Defektdeckung statt. Zur Deckung können verschiedene Methoden angewandt werden, wie zum Beispiel: allogene Hauttransplantation, Xenografts, alloplastische Verfahren oder auch autologe Verfahren wie Spalthauttransplantationen oder Lappenplastiken. Zudem muss durch intensivmedizinische Maßnahmen eine adäquate Kreilaufsituation des Patienten hergestellt werden, auch um die Mikrozirkulation im Wundbereich zu verbessern. [46, (S.35;41-50)]

Alle oben genannten Verfahren unterstützen zwar die Wiederherstellung und die Erhaltung der Homöostase im Wundbereich und vermindern so vermutlich auch den sekundären Wundprogress. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Ausmaß der Volumentherapie den sekundären Wundprogress beeinflussen kann [47]. Sie stellen jedoch keine kausale Therapie dar [21]. Es existieren diverse Ansätze und Studien zu möglichen gezielten Therapien des sekundären Wundprogresses, jedoch schaffte es bislang kein Ansatz flächendeckend zu einer klinischen Anwendung [22].

Die Therapieansätze zielen meist jeweils auf einen oder mehrere der obengenannten beteiligten Pathomechanismen ab. Beispielsweise haben Tobalem et al. bei einem Verbrennungsmodel an Ratten den Wundprogress mit der Gabe von Erythropoetin (EPO) vermindert. EPO wirkt über eine Verbesserung der Mikrozirkulation, ist aber auch antientzündlich und wirkt somit auf zwei Pathomechanismen des sekundären Wundprogresses. Zu betonen ist auch, dass nur bei einer frühen Anwendung von EPO (45 Minuten nach der Verbrennung) ein Effekt zu beobachten war. Eine spätere Anwendung nach 6 Stunden hatte keinen Effekt. [48]

Singer et. al konnten zeigen, dass die orale Gabe von Curcumin ebenfalls zu einer Reduktion des sekundären Wundprogresses führen kann. Curcumin ist ein aus der Kurkuma Pflanze gewonnener Farbstoff mit einer vor allem anti-oxidativen Wirkung, vergleichbar mit der von Vitamin E und C. Es konnten aber auch anti-inflamatorische, wundheilungsfördernde und antimikrobielle Wirkungen von Curcumin nachgewiesen werden. Damit scheint es für den multifaktoriellen Prozess des sekundären Wundprogresses besonders geeignet. [49] In dieser Arbeit soll nun eine weitere, potentiell wirksame Substanz untersucht werden. Vorarbeiten von Schiefer et al. haben gezeigt wie der Growth Differentiation Factor 5 (GDF 5) mit einem sehr breiten Spektrum an Effekten die Wundheilung von Vollhautdefekten positiv beeinflusst [50]. GDF 5 ist ein Protein der TGF- β Superfamilie und wird auch als Bone Morphogenetic Protein 14 (BMP 14) bezeichnet. GDF 5 spielt vor allem in der embryonalen Entwicklung des skelettalen Systems eine entscheidende Rolle. Hierbei ist es bei der Entwicklung der Extremitäten und bei der Chondrogenese von Bedeutung [51]. Es konnte gezeigt werden, dass GDF 5 die Differenzierung, Migration und Proliferation von Zellen positiv beeinflussen kann [50]. Zusätzlich verstärkt GDF 5 die Angiogenese in Wunden und wirkt anti-apoptotisch [51]. Aufgrund dieser vielfältigen Wirkung scheint GDF 5 ein guter Kandidat für einen so multifaktoriellen Prozess wie den sekundären Wundprogress. Somit soll in dieser Arbeit eine *in-vitro* Testung von GDF 5 an Hitze-gestressten Fibroblasten durchgeführt werden.

1.4 Bestehende Verbrennungsmodelle

Es wurden bereits diverse Versuchsaufbauten genannt, im Rahmen derer der sekundäre Wundprogress und Verbrennungsverletzungen im Allgemeinen untersucht wurden. Neben klinischen Studien, bei denen Verbrennungswunden im Verlauf dokumentiert und auch histologisch untersucht werden, ist das Tiermodel ein häufig verwendeter Standard. Hier wird meist an Ratten oder Schweinen geforscht. Ein weithin etabliertes Modell ist das "*rat burn comb model*", entwickelt von Regas et al [52]. Dabei wird auf dem Rücken einer Ratte eine Verbrennung mit Hilfe eines erhitzen Metallstempels induziert. Dieser Stempel besteht aus mehreren aneinandergereihten, rechteckigen Blöcken mit jeweils 5mm Abstand. So bildet sich ein Kammmuster und bei der Verletzung entstehen Zwischenräume mit intakter, unverbrannter Haut. Diese Areale sollen die Stase-Zone repräsentieren und hier kann der sekundäre Wundprogress beobachtet und histologisch untersucht werden. [52]

Problematisch an diesem Model ist, dass die Stase-Zone hier von zwei Seiten an verbranntes Gewebe grenzt und somit die Perfusion deutlich stärker eingeschränkt ist als bei einer herkömmlichen Verbrennungsverletztung [33]. Somit wird vermutlich der Beitrag der eingeschränkten Perfusion und Ischämie zum sekundären Wundprogress überbewertet [33].

Nichtsdestotrotz bietet das *burn comb model* die Möglichkeit die Prozesse im gesamten geschädigten Gewebe zu beobachten und hierbei auch gewebesspezifische Reaktionen wie Entzündungen zu untersuchen. Aber wie bei allen Tiermodellen bestehen Nachteile: Neben der häufig diskutierten ethisch-moralischen Fragestellung sind Tiermodelle auch sehr kostspielig und erlauben keine breit angelegte Untersuchung von verschiedenen Substanzen auf den sekundären Wundprogress. Somit bieten sich *in-vitro* Modelle deutlich besser an. Bei Zellkultur-basierten Modellen wird der Untersuchungshorizont auf die zellulären Prozesse begrenzt. Diese können so isolierter und ohne die Beeinflussung von Ischämie und Inflamation betrachtet werden. Es ist zu vermuten, dass falls in der Zellkultur ein verzögerter Zelltod nach einem Hitzestress auftritt ein ähnlicher Mechanismus auch auf Zellen im Gewebe zu übertragen ist. Dieser ist jedoch in einer Zellkultur deutlich gezielter zu untersuchen.

In der Literatur lassen sich kaum geeignete *in-vitro* Modelle finden. Wie bereits beschrieben existieren zwar viele Erkenntnisse aus der Hyperthermieforschung, mit langen Expositionszeiten und milderen Temperaturen, jedoch wenig Arbeiten mit Übertragbarkeit auf Verbrennungswunden, sprich hohe Temperaturen über sehr kurze Expositionszeiten. Auch nach langer Literaturrecherche konnte einzig das von Matylevitch et al. verwendete Modell gefunden werden, welches bereits in Abschnitt 1.2.4 beschrieben wurde. Vor- und Nachteile dieses Modells und der Vergleich mit den im Folgenden entwickelten Versuchsaufbauten finden sich im Diskussionsteil in Abschnitt 4.1.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den sekundären Wundprogress von Verbrennungswunden in-vitro an einem Zellkultur-basierten Modell zu zeigen und dort die zugrundeliegenden Prozesse zu erklären. Zunächst stand dabei die Entwicklung und die Etablierung eines entsprechenden Modells im Fokus. In diesem Modell sollten die HDF, ähnlich wie in der Stase-Zone, eine zeitlich verzögerte Abnahme der Vitalität zeigen, nachdem sie thermalem Stress ausgesetzt wurden. Dieser thermale Stress sollte bestmöglich die Temperaturexposition eines in der Cutis liegenden Fibroblasten bei einer *in-vivo* Verbrennungsverletzung imitieren.

Das zunächst entwickelte und im Methodenteil beschriebene Modell, basierend auf einer Verbrühung der Fibroblasten, stellte sich im Prozess der Arbeit als teilweise unvorteilhaft heraus. Aus diesem Grund wurde ein zweites Modell entwickelt. Auch dieses Modell ist im Methodenteil beschrieben und stellt eher eine Kontaktverbrennung der Zellen dar. Die Vor- und Nachteile beider Modelle sind in Abschnitt 4.1 beschrieben.

Nach der Etablierung des Modells und dem Nachweis eines verzögerten Zelltodes, stand vor allem die Klärung der Ätiologie dieses Zelltodes im Mittelpunkt. Hier bestand die zentrale Forschungsfrage darin zu klären, inwieweit Apoptose einen relevanten Beitrag leistet. Hierzu wurden Apoptose Assays mit Hilfe von Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und auch Western-Blot durchgeführt. Besonderer Fokus lag hier auf der zeitlichen Dimension der beobachten Prozesse. Zudem sollten die grundlegenden Mechanismen in Hitze-gestressten Zellen und deren molekularen Grundlagen erforscht werden. Hierzu wurde der Einfluss von apoptosemodulierenden Pancaspase-Inhibitoren, GDF-5, ROS-Scavengern und Translationshemmern untersucht.

Im Rahmen dessen war das wissenschaftliche Vorgehen vor allem durch die ständige Verbesserung des Versuchsaufbaues und der entsprechenden Abläufe geprägt. Somit bestand der Prozess aus einer ständigen Evaluation und regelmäßigen Anpassungen des Modells. Daraus ergibt sich, dass Teile der hier präsentierten Ergebnisse vor allem deskriptiv sind und in manchen Fällen nicht mit statistischer Signifikanz belegt sind, da die Versuche nicht mit einer entsprechenden Wiederholung durchgeführt wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Laboport [®]	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutsch-
	land
Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co.
	KG, Wangen, Deutschland
Autoklav DX-90	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Blotting-Transfersystem Semi Dry Blot-	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Ka-
ter Trans-Blot [®] Turbo TM	lifornien, USA
Brutschrank Heracell 150 i CO_2 -	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,
Inkubator	Massachusetts, USA
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey,
	USA
Eismaschine AF 80	Scotsman IceSystems, Vernon Hills, IL, USA
Elektrophoresekammer Mini-Protean	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Ka-
TetraCell PowerPac HC	lifornien, USA
Eppendorf Research $^{\textcircled{R}}$ fix 0,5–10 μl /	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2–20 μl / 10–100 μl / 20–200 μl /	
100–1000 μl	
Fluoreszenzlampe NAG-fHBO 50	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C Premium No-	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Frost	
Gefrierschrank $-80^{\circ}\mathrm{C}$ Hera Freeze	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutsch-
	land
Geldokumentationsanlage GelDoc	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Ka-
	lifornien, USA
Heizblock TB1 Biometra Thermoblock	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland

Infrarotthermometer IR-Thermometer	Voltcraft, Conrad Electronic AG, Hirschau,	
IR 1200-50D USB	Deutschland	
Kryo-Einfrierbehälter	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Ser-	
	vice GmbH, Wien, Österreich	
Kühlschrank 4°C	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz	
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	
Mikroskop Axiovert 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	
Mikroskopkamera Axiocam MRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	
${\it Mirkovolumen-Spektralphotometer}$	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,	
NanoDrop TM ND-1000	Massachusetts, USA	
Multiplattenlesegerät	Perkin Elmer, Walthamm, USA	
VICTOR3 TM Model 1420		
Pipettboy Accujet [®] pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim,	
	Deutschland	
Plattenschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutsch-	
	land	
${\it Sicherheits werk bank~HERAsafe}^{\it @}$	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,	
	Massachusetts, USA	
Taumel-Rollenmischer (RM5-V 1750;	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau,	
RM5-V80 1752)	Deutschland	
Temperaturfühler Thermoelement Typ-	Voltcraft, Conrad Electronic AG, Hirschau,	
K (Messbereich -20 °C bis 250 °C)	Deutschland	
Ultraschallprozessor $\rm UP50H$	Hielscher Ultrasonics GmbH, Berlin,	
	Deutschland	
Vortex-Mixer IKA MS3 basic (3000	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen,	
U/min)	Deutschland	
Wärmedrehschrank Biometra OV 3	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,	
	Massachusetts, USA	
Zentrifuge Eppendorf Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	
Zentrifuge Haraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,	
	Massachusetts, USA	
Zentrifuge Heraeus Pico 17 Mikrozentri-	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,	
fuge	Massachusetts, USA	

Tabelle 2.1: Geräteverzeichnis

2.1.2 Agenzien

Agenz	Hersteller
ß-Mercaptoethanol	M6250, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Aqua dest. (steril)	Fresenius Kabi Ampuwa 1000ml Plastipur
BSA	Albumin Fraktion V, 8076.4, Carl Roth
	GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Butylhydroxytoluol	sc-204659, Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
	Dallas, Texas, USA
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz, A512.1, Carl
	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutsch-
	land
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DAPI	D9542, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Dispase Typ II	Cat. No. 04 942 078 001, Hoffmann-La Roche
	AG, Basel, Schweiz
DMEM	Gibco DMEM - Dulbecco's Modified Ea-
	gle Medium 500ml (+4,5g/l D-Glucose, L-
	Glutamin, Pyruvat), Thermo Fisher Scien-
	tific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
DMSO	D4540, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
DNAse	79254, Qiagen, Hilden, Deutschland
Entwicklerlösungen	Immobilon Forte Western HRP substrate,
	WBLUF0100, Merck Millipore, Burlington,
	Massachusetts, USA
Ethanol	100983, Supelco, Merck, Burlington, Massa-
	chusetts, US
FACS clean	340345, BD Biosciences, Franklin Lakes,
	USA
FACS Puffer $Flow^{TM}$	342003, BD Biosciences, Franklin Lakes,
	USA
FACS Rinse 340346	340346, BD Biosciences, Franklin Lakes,
	USA

FCS	P30-3702, Sera Plus, EU approved regions,
	special processed FBS, PAN-Biotech GmbH,
	Aidenbach Deutschland
GDF-5	8340-G5, Recombinant Human GDF-5 Pro-
	tein, R & D Systems, Minneapolis, Minneso-
	ta, USA
Glycin	3908.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls-
	ruhe, Deutschland
Glycerol	3783.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls-
	ruhe, Deutschland
HCL	109057, Supelco, Merck, Burlington, Massa-
	chusetts, US
HEPES	H0887, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Hoechst 33342	62249, Thermo Fisher Scientific GmbH, Wal-
	tham, Massachusetts, USA
Kollagenase Typ I	C1-22, Biochrom, Berlin, Deutschland
Methanol	8388.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls-
	ruhe, Deutschland
Mounting-Medium	S3023, Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA
NaCl	3957.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls-
	ruhe, Deutschland
Na-Deoxycholat	3484.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls-
	ruhe, Deutschland
NP-40	United States Biological, Salem, MA, USA
Paraformaldehyd 4 $\%$	104005, Merck, Burlington, Massachusetts,
	US
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o
	Calcium w/o Magnesium, L0615, Biowest,
	Nuaillé, Frankreich
Penicillin / Streptomycin	15140122, Gibco Penicillin-Streptomycin
	(10,000 U/mL), Thermo Fisher Scientific
	GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
${\it Protease in hibitor}$	11836170001, Hoffmann-La Roche AG, Ba-
	sel, Schweiz
Proteinstandard	0948.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls-
	ruhe, Deutschland

Phosphataseinhibitor	4906845001, Hoffmann-La Roche AG, Basel,
	Schweiz
Ponceau-S	P3504, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Propiumiodid	P4170, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Q-VD-OPH	SML0063, Q-VD-OPh hydrate, Sigma-
	Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Staurosporin	ALX-380-014-C100, Enzo Life Sciences
	GmbH, Lörrach, Deutschland
Tris	AE15.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karls-
	ruhe, Deutschland
Tris-Base	103154M, VWR International, Radnor,
	Pennsylvania, USA
Triton X100	T8787, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Trolox	648471, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Trypanblau	T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
Trypsin / EDTA	X0930-100, Biowest, Nuaillé, Frankreich
Tween	P9416, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,
	USA
SDS	0183.2, Carl Roth $GmbH + Co. KG$, Karls-
	ruhe, Deutschland
z-VAD-FMK	187389-52-2, Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
	Dallas, Texas, USA

Tabelle 2.2: Agenzien

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blotting-Puffer	40 ml 25 x Transferpuffer
	50 ml Methanol
	ad 500 ml H_2O

Laufpuffer	25 mM Tris, pH 8,3 - 8,8
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS
Fibrozyten-Medium	DMEM
	10 % FCS
	1 % Penicillin / Streptomycin
Dispase-Lösung	PBS
	0,1 % Dispase Typ II
	5 % HEPES
Collagenase-Lösung	PBS
	1,5 % BSA
	0,2 % Kollagenase Typ I
RIPA-Puffer	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,5 % Na-Deoxycholat
	0,1 % SDS
	Proteaseinhibitor (1 Tablette auf 7 ml)
	Phosphataseinhibitor (1 Tablette auf 7 ml)
TBS	7,7 mM Tris (pH 7,5)
	150 mM NaCl
TBS/T	TBS
	1 % Tween 20
Tris-Glycin Transferpuffer	12 mM Tris-Base
	96 mM Glycin

Laemmli-Puffer (4x)	252 mM Tris-HCL
	40 % Glycerol
	8 % SDS
	0,01 % Bromphenolblau
	Vor Gebrauch: 20 % ß-Mercaptoethanol zu-
	setzten

Tabelle	2.3:	Puffer	und	Lösungen
---------	------	--------	-----	----------

2.1.4 Antikörper

Antikörper		Hersteller
PARP/cleaved-PARP		9542S, Cell Signaling Technology, Danvers,
		Massachusetts, USA
HSP 60		SC136291, Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
		Dallas, Texas, USA
HSP 70		SC59569, Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
		Dallas, Texas, USA
HSP 90		SC101494, Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
		Dallas, Texas, USA
GAPDH		12004167, hFAB Rhodamine Housekeeping
		Protein Fluorescent Primary Antibodies,
		Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Ka-
		lifornien, USA
Goat Anti-Rabbit In	nmunoglobu-	P044801-2, Agilent Dako, Santa Clara, CA,
m lins/HRP		USA
Goat Anti-Mouse In	nmunoglobu-	P044701-2, Agilent Dako, Santa Clara, CA,
m lins/HRP		USA

Tabelle 2.4: Antikörper

2.1.5 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
CellTiter-Blue [®] Cell Viability Assay	Promega Corporation, Madison, Wisconsin,
	USA
DeadEnd TM Fluorometric TUNEL Sys-	Promega Corporation, Madison, Wisconsin,
tem	USA

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,
	Massachusetts, USA

Tabelle 2.5: Verwendete Kits

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	$\mathbf{Produktname}/\mathbf{Hersteller}$
12-Well Platten	12-Well Cellstar [®] Tissue Culture Plates,
	Greiner Bio-One TM , Kremsmünster, Öster-
	reich
96-Well Platten	96-Well Mikrotiterplatten, Greiner Bio-
	One TM , Kremsmünster, Österreich
Blotting-Filterpapier	Blotting Filter Papers, 2.5-mm thick, 7.5 x
	8.4 cm, LC2010, Invitrogen, Thermo Fisher
	Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts,
	USA
Einmalhandschuhe	Micro-Touch [®] Nitra-Tex [®] , Ansell GmbH,
	München, Deutschland
Falcons $15ml; 50ml$	Cellstar [®] Polypropylen Röhrchen $15ml$;
	50ml, Greiner Bio-One TM , Kremsmünster,
	Österreich
Glas - Pasteurpipetten	Pasteurpipetten Natron-Kalk-Glas, Brand
	GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Glas-Slides	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,
	Massachusetts, USA
Kryoröhrchen 2,0 <i>ml</i>	$Cryo.sTM^{TM}$, Greiner Bio-One TM , Krems-
	münster, Österreich
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Nitrozellulose Blottingmembran (Poren-	VWR International, Radnor, Pennsylvania,
größe 0,2 μm)	USA
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik
	GmbH, Edermünde, Deutschland
Petrischale 94/16 mm	Greiner Bio-One TM
Pinzette (Metall)	VWR International, Radnor, Pennsylvania,
	USA
Pipettenspitzen	$\operatorname{TipOne}^{\textcircled{R}}$ Pipettenspitzen, Starlab Interna-
	tional GmbH, Hamburg, Deutschland

QIAshedder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml; 2ml	Safe-Lock Tubes TM $0,5ml$; $1,5ml$; $2ml$, Ep-
	pendorf AG, Hamburg, Deutschland
Skalpell	2975-21 Feather Disposable Scalpels, GF He-
	alth Products Inc., Atlanta, GA, USA
$\operatorname{Spritzen}/\operatorname{Spritzenkolben}$	Injekt [®] , B. Braun Melsungen AG, Melsun-
	gen, Deutschland
Sterilfilter 0,2 μm	Millex-GS, 0,22 μm , Zellulosemischester, 33
	mm; Merck Millipore Burlington, Massachu-
	setts, USA
Stripetten 5 ml ; 10 ml ; 25 ml	Costar [®] 5 ml ; 10 ml ; 25 ml Shorty Stripett [®]
	Serological Pipets, Corning, New York, USA
T-75er Kulturflaschen	Cellstar [®] Cell Culture Flasks 75 cm^2 red fil-
	ter cap, Greiner Bio-One TM , Kremsmünster,
	Österreich
Trenngele	4561086, 4–15 $\%$ Mini-PROTEAN TGX Pre-
	cast Protein Gels, 15-well, 15 μl , Bio-Rad
	Laboratories GmbH, Hercules, Kalifornien,
	USA
Zellschaber	Cell Scraper, blue, 40cm, Greiner Bio-
	One TM , Kremsmünster, Österreich
${ m Zellsieb}/{ m Teflonsieb} \ 100 \mu m$	Falcon $100\mu m$ Cell Strainer, Yellow, Sterile,
	352360, Corning, New York, USA

 Tabelle 2.6:
 Verbrauchsmaterialien

2.1.7 Software

Software	Hersteller
AxioVision rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
BD CellQuest Pro TM Software	BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey,
	USA
Image Lab 4.0.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Ka-
	lifornien, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washing-
	ton, USA
NanoDrop 1000 Operating Software	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham,
	Massachusetts, USA

Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Texmaker 5.0.3	GNU General Public License, Version 2
Voltcraft VoltSoft Datenlogger-Software	Voltcraft, Conrad Electronic AG, Hirschau,
	Deutschland
Wallac 1420	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
WorkOut 2.0	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA

 Tabelle 2.7:
 Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Grundlegende Methoden der Zellkultur

Isolation von Fibroblasten aus Vollhaut

Sämtliche Versuche dieser Arbeit wurden an humanen, dermalen Fibroblasten (HDF) durchgeführt, für deren Verwendung das Ethikvotum mit der Studiennummer 3634 an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorliegt. Die HDF wurden aus der Dermis menschlicher Haut gewonnen, die durch die Klinik für Plastische und Ästhetische Chirurgie des Krankenhaus Köln-Merheim unter der Leitung von Prof. Paul Fuchs zur Verfügung gestellt wurde. Dort wurde sie von gesunden erwachsenen Spendern in abdomino- und brustplastischen Eingriffen gewonnen und unter Kühlung nach Düsseldorf in das Labor für Unfallund Handchirurgie transportiert.

Die Isolation erfolgte nach etablierten und bewährten Standardprotokollen. Dafür wurde zunächst, mittels Skalpell und Pinzette, das subkutane Fettgewebe entfernt und die Cutis in $0,5cm^2$ große Stücke zerteilt. Zur Trennung der Dermis von der Epidermis wurden die Hautstücke nun für 24 Stunden bei 4°C auf einem Taumel-Rollemischer in einer Dispase-II-Lösung inkubiert. Am Folgetag wurde diese Mischung dann für 10 Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Die Dispase-Reaktion musste anschließend durch das Hinzugeben von kaltem PBS gestoppt werden. Nach dieser Behandlung ließ sich die Epidermis einfach von der Dermis mit einer Pinzette ablösen. Die nun isolierte Dermis wurde in einem 50ml-Falcon mit Collagenase-I-Lösung vollständig bedeckt und für eine Stunde im 37 °C warmen Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde die Dermis mitsamt der Collagenase-Lösung durch ein Teflonsieb gedrückt, wobei dies unter Zuhilfenahme eines Spritzenstempel erleichtert werden konnte. Die resultierende Zellsuspension enthielt nun vorwiegend HDF. Durch Zentrifugieren mit 1300 rpm für 5 Minuten und anschließendem Absaugen konnte der Überstand entfernt werden. Das Pellet wurde in wenigen Millilitern Medium resuspendiert und anschließend in 15ml des oben beschriebenen Fibrozytenmediums in einer T75-Kulturflasche kultiviert. Aufbewahrt wurden die Zellen in einem Zellkulturschrank mit $37 \,^{\circ}$ C bei $5\% CO_2$.

Bis zur vollständigen Konfluenz des Zellrasens wurde das Medium jeden dritten Tag gewechselt. Danach erfolgte das wie im Folgenden beschriebene Einfrieren der Zellen. Die Plastische Chirurgie in Köln-Merheim stellte dem Labor regelmäßig Haut zur Verfügung, so dass mit der Zeit eine Zellbank mit diversen Spendern angelegt werden konnte. Diese wird ständig erweitert und diente im Folgenden auch zur Durchführung der Versuche dieser Arbeit.

Zellzahlbestimmung

Sowohl zur Vorbereitung von Versuchen als auch zur Kryokonservierung der Zellen musste eine Zellzahlbestimmung durchgeführt werden. Dafür wurde zunächst eine 1% Trypsin-/EDTA-Lösung hergestellt, indem die 10% Trypsin/EDTA-Stammlösung entsprechend mit PBS verdünnt wurde. Das Trypsin diente dazu die HDF aus ihrer Adhärenz zu lösen. Hierzu wurden 5ml der 1% igen-Lösung auf die Zellen gegeben und für 6-8 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls musste sie mit einem Zellschaber mechanisch unterstützt werden. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt, indem 5ml des FCS-haltigen Fibrozytenmediums hinzugegeben wurde. Nun wurde die Zellsuspension bei 1300rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Resuspendierung erfolgte je nach Pelletgröße in 1-5ml Medium. Zur Zellzahlbestimmung wurden nun $20\mu l$ der Suspension entnommen und mit $20\mu l$ Trypanblau angefärbt. Diese Färbung dient der Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop, da Trypanblau nur avitale Zellen anfärbt. Die Zählung der vitalen HDF erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer, indem alle ungefärbten Zellen innerhalb der vier Quadrate der Zählkammer gezählt wurden. Mit folgender Formel konnte so die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden.

$$Zellzahl/ml = \frac{Anzahl \ der \ gezaehlten \ Zellen}{4} \cdot 2 \cdot 10^4$$

Kultivierung und Passagierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden mit 15ml Medium in T75-Kulturflaschen kultiviert und im Zellkulturschrank bei 37°C bei 5% CO^2 gelagert. Bei allen in Kultur befindlichen Zellen wurde mindestens alle drei Tage das Medium gewechselt.

Zur Passagierung wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, durch Trypsin aus ihrer Adhärenz gelöst und nach dem Zentrifugieren auf entweder 2 oder 3 T75-Kulturflaschen aufgeteilt. Zur Vorbereitung der Versuche wurden die Zellen auf 12-Well-Platten kultiviert. Dafür wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Well wurden entweder 10^5 (bei Versuchen des Verbrühungsmodells) oder $5 \cdot 10^4$ Zellen (bei Versuchen des Kontaktverbrennungsmodells) verwendet.

Kryokonservierung

Das Einfrieren erfolgte in Portionen von je 10^6 Zellen. Auch dafür wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anhand der ermittelten absoluten Zellzahl wurden die Fibrozyten nun in einer entsprechende Menge FCS + 10% DMSO resuspendiert, so dass eine Suspension mit 10^6 Zellen/ml entsteht. Davon wurde je ein Milliliter in ein Kryoröhrchen gefüllt und in einem Kryocontainer in einem -80 °C Gefrierschrank gelagert. Durch den Kyrocontainer wurde ein gleichmäßiges langsames Einfrieren der Zellen gewährleistet. Bei längerfristiger Konservierung der Zellen wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C verwahrt. Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und der aufgetaute Inhalt mit 15ml Medium in eine Kulturflasche übertragen. Die Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.2 Methoden der Behandlung

Verbrühungsmodell

Im Rahmen des zunächst entwickelten Versuchsaufbaus wurden die HDF direkt mit erhitzen PBS übergossen. Dieses Vorgehen ähnelt dem Ablauf bei der Entstehung von Verbrühungsverletzungen *in-vitro*. Aus diesem Grund wird dieser Versuchsaufbau im Folgenden als Verbrühungsmodell bezeichnet.

Für das Verbührungsmodell wurde zunächst PBS in 1, 5ml Eppendorf Gefäße gefüllt und in einem Heizblock erhitzt. Es wurden Temperaturen zwischen 40 und 100 °C gewählt. Das Erreichen der gewünschten Temperatur konnte mittels eines Kontaktthermometer-Sensors überprüft werden. Bei Vorliegen der gewünschten Temperatur wurde die als erstes zu behandelnde 12-Well-Platte aus dem Zellkulturschrank entnommen. Die Platten wurden am Vortag vorbereitet und mit je 10^5 HDF pro Well inkubiert. Nun wurden die Wells der Platte einzeln behandelt, indem zunächst das in dem Well befindliche Medium mit einer Absaug-Pipette und einer Vakuumpumpe abgesaugt wurde. Die Absaug-Pipette wurde weiterhin angeschaltet im Well belassen. Mittels einer Eppendorf-Pipette wurde nun 1ml des erhitzen PBS aufgezogen und zügig, aber unter Vermeidung von Abscherungen der Zellen, in das Well gegeben. Die noch im Well befindliche Absaug-Pipette entfernte das heiße PBS sofort wieder, so dass nur eine kurze Hitzeexposition entstand.

Die Uberprüfung der tatsächlichen Expositionstemperatur erfolgte mittels des Infra-



Abb. 2.1: Versuchsaufbau des Verbrühungsmodells. (A) Das heiße PBS wird mit einer 1ml Pipette aufgenommen und direkt in das Well pipettiert. (B) Die Absaugpipette entfernt das erhitzte PBS sofort wieder. Der Temperaturverlauf wird mittels Infrarotthermometer aufgezeichnet.

rotthermometers VOLTCRAFT IR-1200-50D USB. Dafür wurde es mit einem Stativ so oberhalb der zu behandelnden Platte positioniert, dass die gesamte Grundfläche des Wells innerhalb des Messbereiches lag. Dies konnte mit dem Ziellaser des Thermometers entsprechend eingestellt werden (siehe Abbildung 2.1 A). Die durch das Thermometer angezeigte Temperatur entsprach nun der Durchschnittstemperatur der 3, 65*cm*² großen Grundfläche des Wells. Durch den USB-Anschluss des Thermometers wurde die aktuell gemessene Temperatur sekündlich an einen Computer übertragen und mit Hilfe der Hersteller-Software "Voltcraft VoltSoft" aufgezeichnet. Aus den resultierenden Temperaturkurven während des Verbrühungsvorgangs ließen sich sowohl die Expositionszeit als auch die maximale Expositionstemperatur bestimmen. Als Expositionszeit wird im Folgenden die Zeitdauer definiert, in der die Expositionstemperatur 40 °C übersteigt. Nach dem Absaugen des PBS wurde 37 °C warmes Medium auf die Zellen geben. Diese Prozedur wurde bei allen zu behandelnden Wells der Platte wiederholt. Bei den Wells, die als Kontrolle mitgeführt wurden, wurde nur ein Mediumwechsel mit 37 °C warmem Medium durchgeführt.

Kontaktverbrennungsmodell

Der zweite entwickelte Versuchsaufbau sollte eine größere Standardisierung des Erhitzungsvorgangs ermöglichen. Dafür wurde die Art der Hitzeinduktion verändert, indem
nun die Well-Platte direkt auf dem Heißblock erhitzt wurde. Daher lassen sich Parallelen zur *in-vitro* bekannten Kontaktverbrennung ziehen und somit wird dieser Versuchsaufbau im Folgenden als Kontaktverbrennungsmodell bezeichnet.

Im Rahmen des Kontaktverbrennungsmodell werden die Zellen also indirekt durch das Aufheizen des Well-Bodens erhitzt. Dafür wurde eine speziell gefertigte Aluminium-Platte verwendet, die durch eine Fräsung am Rand an den Boden der Well-Platten adaptiert war. Diese Platte wurde auf dem Heizblock platziert und konnte so die Hitze an den Well-Boden weitergeben.

Vor der ersten Behandlung der Zellen musste der Heizblock längere Zeit aufheizen, so dass sich die Aluminium-Platte gleichmäßig erhitzte. Innerhalb der Behandlung ermöglichte das Modell zwei Variablen: Zum Einen die Expositionszeit, zum Anderen die Temperatur des Heizblockes. Bei der Findung der optimalen Versuchsbedingungen wurde sich an den im Verbrühungsmodell verwendeten Temperaturen orientiert und eine Temperatur gewählt bei der nach einer Stunde noch circa 50% der HDF vital waren. Somit lassen sich bei möglichen Behandlungen sowohl positive als auch negative Veränderungen der Vitalität abbilden. Zudem wurde eine Temperaturkurve angestrebt, die die Expositionsbedingungen eines in der Cutis sitzenden Fibroblasten in einer *in-vivo* Verbrennungsverletzung nachbildet. Bei einer Heizblockeinstellung von 80 °C und einer Kontaktzeit von 10 Sekunden konnte dem am besten entsprochen werden, so dass alle folgenden Versuche mit diesen Parametern durchgeführt wurden.

Die Zellen wurden wie beschrieben am Vortag auf 12-Well-Platten kultiviert. Kurz vor der Erhitzung wurde das Medium der Zellen entfernt. Dies geschah auch bei der Kontrollplatte. Nun wurde die Platte für die entsprechende Expositionszeit auf den Heizblock gestellt. Anschließend wurde die Platte für 20 Sekunden auf Eis abgekühlt. Ohne Abkühlung hätte der Kunststoff der Platte die erreichte Temperatur über eine zu lange Zeit gehalten und die Hitzeexposition hätte sich so unbeabsichtigt verlängert. Während des Erhitzens blieben die Deckel der Well-Platten geschlossen, sowohl um eine Kontamination zu verhindern, aber auch um die Austrocknung der Zellen zu verringern. Sicherlich fand Austrocknung, bedingt durch das Entfernen des Medium vor der Erhitzung, zu einem gewissen Grad trotzdem statt. Das Entfernen des Mediums stellte sich trotzdem als sinnvoll heraus, da ansonsten zu viel Hitze durch die Flüssigkeit abgepuffert würde.

Aufgrund der Struktur der Aluminium-Platte und des Heizblockes ist die Mitte der Platte auch nach langem Aufheizen immer um wenige Grad wärmer als die Randbereiche. Um diesen Effekt auszugleichen wurden bei allen Versuchen des Kontaktverbrennungsmodells die mittleren beiden Wells der 12-Well-Platte nicht mit Zellen kultiviert. Zur Aufzeichnung des Temperatur-Verlaufes am Well-Boden (Abbildung 3.7) wurde eine leere Platte ohne Deckel erhitzt.





 Abb. 2.2: Versuchsaufbau des Kontaktmodells. (A) Die Well-Platte wird auf die speziell gefräste Aluminum-Platte gelegt, die wiederum auf einem Heizblock liegt. (B) Zur genauen Untersuchung des Temperaturverlaufes, wie in Abbildung 3.7, muss der Deckel des Well-Platte abgenommen werden und die Temperatur am Boden des Wells gemessen werden.

GDF 5 Behandlung

Das eingesetzte rekombinante, humane GDF 5 wurde bei der Firma R&D Systems bestellt und in Falcons mit je $50\mu g$ geliefert. Das lyophilisierte GDF 5 musste mit $250\mu g/ml$ in 4mM Salzsäure (HCL) gelöst werden. Dafür wurde der Inhalt eines Falcon in $250\mu l 4mM$ Salzsäure suspendiert. Die Lagerung erfolgte in $5\mu g$ Portionen bei -20 °C. Die gewählte Endkonzentration von $1\mu g/ml$ wurde von Liu et al. 2009 übernommen [53]. Zum Erreichen dieser Konzentration wurden je $5\mu g$ GDF 5 in 5ml Medium angesetzt.

Um auch langsamere Prozesse innerhalb der Zellen durch das GDF 5 zu beeinflussen, wurden die Zellen bereits eine Stunde vor dem Erhitzen mit 1ml der angesetzten $1\mu g/ml$ Lösung vorinkubiert. Kurz vor dem Induzieren des Hitzestresses wurde das GDF-haltige Medium in 1.5ml Tubes überführt um es nach der Behandlung Well-spezifisch wieder auf die Zellen zu geben. Das GDF 5 blieb bis zum entsprechenden Messzeitpunkt auf den Zellen.

z-VAD-FMK Behandlung

Das eingesetzte z-VAD-FMK wurde bei der Firma Santa Cruz bestellt. Die Lieferung erfolgt in 500 μg Tubes. Das lyophilisierte z-VAD-FMK musste in DMSO gelöst werden. Durch Zugabe von 1.06*ml* wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1*mM* hergestellt. Um möglichst wenig zellschädigendes DMSO einzusetzen wurde das z-VAD-FMK zunächst in 100 μg DMSO suspendiert. Dann wurden 906 μl Medium hinzugegeben. Die Stamm-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

$$M(z - VAD - FMK) = 467.5g/mol$$
$$n = \frac{m}{M} \Rightarrow n = \frac{500\mu g}{467.5g/mol} = 1.069\mu mol$$
$$V = \frac{n}{c} \Rightarrow V = \frac{1.069\mu mol}{1mmol/l} = 1,06ml$$

Im Weiteren musste eine für unsere Fibroblasten angepasste Arbeits-Konzentration gefunden werden. Dafür wurde der Apoptose-Induktor Staurosporin eingesetzt. Zunächst wurde z-VAD-FMK in verschiedenen Konzentrationen zwischen 5 und $50\mu M$ auf die Fibroblasten gegeben. Nach einer Stunde prä-Inkubationszeit wurde das Staurosporin in einer Konzentration von $1\mu M$ hinzugeben. Zur Analyse der Apoptose-Rate wurde nach 5 und 24 Stunden ein Apoptose-Assay nach Nicoletti durchgeführt. Dabei konnte die für unsere Zellen optimale Konzentration von $10\mu M$ festgestellt werden. Im folgenden wurde immer mit dieser Konzentration gearbeitet. Auch bei der Behandlung mit z-VAD-FMK wurden die Zellen bereits vor dem Erhitzen für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend blieb das z-VAD-FMK bis zum Messzeitpunkt auf den Zellen.

Q-VD-OPH

Das verwendete Q-VD-OPH stammte von der Firma Sigma-Aldrich und wurde lyophilisiert in 1mg Tubes geliefert. Als Stammlösung wurde eine 10mM Lösung angesetzt, dafür wurden $195\mu l$ DMSO eingesetzt.

$$M(Q - VD - OPH) = 513.8g/mol$$
$$n = \frac{m}{M} \Rightarrow n = \frac{1mg}{513.8g/mol} = 1.95\mu mol$$
$$V = \frac{n}{c} \Rightarrow V = \frac{1.95\mu mol}{10mmol/l} = 195\mu l$$

Zur Anwendung an den Zellen wurde die Stammlösung 1:1000 mit Medium auf $10\mu M$ verdünnt. Auch Q-VD-OPH wurde bereits eine Stunde vor dem Erhitzen eingesetzt und bis zu den verschiedenen Messzeitpunkten auf den Zellen belassen.

Trolox

Trolox, beziehungsweise 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure ist ein Derivat von Vitamin E und dient hier als Antioxidans um die Rolle von ROS zu untersuchen. Trolox wurde in einer Konzentration von $500\mu mol/l$ eingesetzt. Zunächst wurde eine 10fach konzentriertere Stammlösung angesetzt. Analog zu den oben verwendeten Formeln und Berechnungen wurden 12, 5mg Trolox (M = 250, 25g/mol) in 10ml Medium gelöst um eine 5mmol/l Stammlösung zu erhalten. Trolox ist schwer löslich und gelingt nur unter starken und langem Vortexen. Die Stammlösung wurde vor der Verwendung auf den Zellen 10-fach verdünnt und bereits eine Stunde vor dem Erhitzen auf die Zellen gegeben. Nach dem Erhitzen blieb Trolox bis zum Auswertungszeitpunkt auf den Zellen.

Butylhydroxytoluol

Auch Butylhydroxytoluol (BHT) diente als Antioxidans mit einer Arbeitskonzentration von $10\mu M$. Dafür wurde eine Stammlösung mit 1mol/ml mit Ethanol als Lösungsmittel angesetzt und anschließend steril filtriert. Für die Arbeitskonzentration wurde diese 1:100.000 mit Fibrozyten-Medium verdünnt und ebenfalls wieder eine Stunde vor dem Erhitzten auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde BHT bis zum Auswertungszeitpunkt auf den Zellen belassen.



Abb. 2.3: Reduktion von Resazurin zu Resorufin durch NADH. Die Menge des entstanden Resorufin ist proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen. Abbildung erstellt mittels Chemograph Plus Software (DigiLab Software GmbH, Altenholz, Deutschland)

Cycloheximid

Cycloheximid (CHX) ist eine giftige Substanz, die als Translationshemmer dient. Sie wurde in einer Arbeitskonzentration von $10\mu g/ml$ eingesetzt. Dafür wurde eine Stammlösung mit 10mg/ml angesetzt, indem zunächst 1mg in 4ml Ethanol gelöst und anschließend mit 96ml Aqua dest. verdünnt wurde. Dies wurde steril filtriert und für die Behandlung eine Stunde vor dem Erhitzen 1000fach verdünnt ins Medium der Zellen gegeben. Anschließend wurde CHX bis zum Auswertungszeitpunkt auf den Zellen belassen.

2.2.3 Methoden der Analyse

Resazurin-Reduktions-Assay

Bei dem Resazurin-Reduktions-Assay handelt es sich um ein Assay, mit Hilfe dessen die Anzahl lebender Zellen in einer Zellkultur abgeschätzt werden kann [54]. Metabolisch aktive Zellen sind in der Lage mittels cytosolischen, mitochondrialen und mikrosomalen Enzymen Resazurin zu reduzieren (siehe Abbildung 2.3) [55]. Der dabei entstehende Flouresenzfarbstoff Resorufin lässt sich dann bei einer Anregungswellenlänge von 560nm und einer Emissionswellenlänge von 590nm messen [54]. Die Menge des entstandenen Resorufin ist proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen [54]. In dieser Arbeit wurde für dieses Assay das CellTiter-Blue[®]-Assay (CTB-Assay) von Promega verwendet.

Das Resazurin wurde in einer Verdünnung von 1:20 in Fibrozyten-Medium angesetzt und auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden diese für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Bei jeder Messung wurde ein Blank mitgeführt, indem für den gleichen Zeitraum die Medium-Farbstoff-Lösung in einem zellfreien Well mit inkubiert wurde. Nach einer Stunde wurden jeweils $200\mu l$ des Medium entnommen und zur Doppelbestimmung auf je zwei Wells einer 96-Well-Platte aufgeteilt. Zur Messung des entstandenen Resorufin wurde nun der VICTOR Multilabel Plate Reader verwendet.

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurden mit Excel die jeweiligen Doppelbestimmungen eines Wells gemittelt und der Blankwert abgezogen.

Im Fall des Verbrühungsmodells wurden die Werte der unterschiedlichen Platten standardisiert. Dafür wurden alle Werte der exponierten Wells ins Verhältnis zur auf der Platte befindlichen, unbehandelten Kontrolle gesetzt und als prozentuale Abnahme angegeben. Den jeweiligen Werten wurde die entsprechende Expositionstemperatur des Wells zugeordnet. Beide Werte wurden dann grafisch mittels GraphPad Prism 5 gegeneinander aufgetragen (Abbildung 3.2 (A)). Die entstandenen Punktewolken wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 5 einer Regressionsanalyse unterzogen. Dafür wurde im Analyse-Tool "nonlinear regression (curve fit)" geöffnet und die Formel "Cumulative Gaussian - Percents" gewählt. So wurde für jede Punktwolke eine entsprechende Fitting-Kurve gefunden.

Im Fall des Kontaktverbrühungsmodells wurden alle gemessenen Werte jeweils in Bezug zur entsprechenden 1-Stunden-Kontrolle gesetzt. Die 1-Stunden-Kontrolle dient hier als Ausgangswert, da hier noch nahezu die gleiche Zellzahl wie bei den behandelten Zellen vor dem Erhitzen vorliegt. Somit wird die 1-Stunden-Kontrolle mit 100% gleichgesetzt und alle anderen Werte als prozentuale Veränderung hierzu angegeben.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die oben beschriebene Annahme, dass im Resazurin-Reduktions-Assay die Menge an entstandem Resorufin proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen ist, kann nur unter einer Bedingung getätigt werden: Die Behandlung der Zellen darf nicht deren Reduktionsäquivalents verändern. Somit musste einmalig gezeigt werden, dass unter unseren Versuchsbedingungen die im Assay ermittelten Werte tatsächlich mit der absoluten Zellzahl korrelieren. Dazu wurde als Indikator für die absolute Zellzahl die DNA-Konzentration ermittelt.

Hierfür wurden die Zellen nach den beschriebenen Verfahren erhitzt und anschließend 1,24 und 48 Stunden nach der Behandlung aus ihrer Adhärenz gelöst. Gleich behandelte Proben wurden gegebenenfalls gepoolt. Die Proben wurden in 1,5ml Tube gegeben und bei 13000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit $300\mu l$ stark erhitzten Aqua dest. übergossen. Durch kräftiges Vortexen wurde das beim Zentrifugieren entstandene Pellet resuspendiert. Nun wurde der gesamte Inhalt des Tube in einen QIAshredder gegeben und erneut bei 13000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde die Probe eingefroren, um die Proben der verschiedenen Zeitpunkte eines Versuches in einem Durchgang photometrisch analysieren zu können.

Nach dem Auftauen wurden die Proben mittels des UP50H Ultraschallprozessors von Hielscher sonifiziert. Dabei wurden 5 Stöße mit einer Amplitude von 80% und 0,5 Zyklen appliziert. Da nun von einer vollständigen Zelllyse ausgegangen werden konnte, konnte nun die Bestimmung der Nucleinsäuren-Konzentration im NanoDrop 1000 Fluorospectrometer durchgeführt werden. Eine Probe wurde mindestens zweimal gemessen und die Ergebnisse gemittelt. Zur Messung musste ein kleiner Tropfen, bestehend aus $2\mu l$ der Probe auf die Messkammer gegeben werden. Als Blank wurde DNA freies, destilliertes Wasser verwendet.

Apoptose-Assay nach Nicoletti



Abb. 2.4: Hier wurde die Stärke des Floureszensignals (FLH-3) gegenüber der Anzahl der gezählten Ereignisse aufgetragen (**A**). In diesem Fall wurde eine unbehandelte Kontrolle gemessen und ein Gate M_1 gesetzt, welches in Messung der entsprechenden Probe in Abbildung 2.5 übertragen wurde. Innerhalb des Gates liegen 1,59% der gemessenen Zellkerne. (Abbildung wurde dem Programm BD CellQuest ProTM (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) entnommen)



Abb. 2.5: Hier wurden mit Hitze behandelte Zellen gemessen und es wird deutlich, dass mit 10,47% aller gemessenen Zellkerne deutlich mehr Zellkerne innerhalb von Gate M_1 liegen als in der Kontrolle in Abbildung 2.4. Damit liegen hier mehr hypodiploide Zellkerne vor, die auf apoptotische Prozesse hindeuten. (Abbildung wurde dem Programm BD CellQuest ProTM(BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) entnommen)

Um die Art des durch den Hitzestress induzierten Zelltod zu differenzieren wurde ein Apoptose Assay nach Nicoletti durchgeführt. Dieses Assay beruht auf der Detektion hypodiploider Zellkerne, die durch DNA-Fragmentierung im Zuge der Apoptose entstehen. Dafür wurde Propidiumiodid (PJ), ein Fluoreszenz-Farbstoff verwendet. Dieser kann mit DNA interkalieren und macht sie in der Durchflusszytometrie messbar [56].

Für die Durchführung dieses Assays wurden die Zellen nach dem Induzieren des Hitzestress zu den Zeitpunkten 5, 24, 48 und 72 Stunden nach Erhitzen analysiert. Dazu wurden pro Well 750 μl Trypsin/EDTA (1%ig) für 7 Minuten im Brutschrank inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1, 5ml FCS-haltiges Medium auf die Zellen gegeben. Aufgrund der hohen Zellzahl, die für das Assay benötigt wurden, wurden nach dem Trypsinieren immer mehrere Wells gepoolt.

Nach dem Poolen wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen übertragen und anschließend erneut zentrifugiert. Dieser Schritt dient laut Protokoll von Nicoletti und Riccardi dem Waschen der Zellen. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 0, 5ml PBS resuspendiert. Durch das Ergänzen von 4, 5ml eiskaltem 70%igen Ethanol wurden die Zellen fixiert und konnten bis zur Messung bei -20 °C eingefroren werden.

Nachdem alle Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten fixiert und eingefroren waren, wurden alle Proben aufgetaut, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun wurden die Proben 30 Minuten mit der Farbstofflösung inkubiert. Diese enthielt eine PJ-Konzentration von $20\mu g/ml$ in PBS und 0.1% Triton X-100, um eine bessere Zellpermeabilität des PJ zu erreichen. Nach der Färbung wurden die Proben mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen. Dabei wurde die Stärke des Floureszenzsignals der einzelnen Zellkerne gemessen. Die hypodiploiden Zellkerne geben ein schwächeres Floureszenzsignal ab, da sie weniger PJ gebunden haben.

Zur Analyse und Auswertung der Proben wurde das Programm CellQuest Pro verwendet. Dabei wurde in der unbehandelten Kontrollprobe ein Gate eingestellt, das die Signale der hypodiploiden Zellkerne enthält (siehe Abbildung 2.4). Dieses Gate M_1 wurde nun auf die Daten der behandelten Zellen angewandt und der Anteil der Signale innerhalb dieses Gates bestimmt (Abbildung 2.5). Die so ermittelte Rate gibt den Prozentsatz der durch die Behandlung veränderten, hypodiploiden Zellkerne an der Gesamtzellzahl an. Die Abbildungen 2.4 und 2.5 dienen nur zur Verdeutlichung der Auswertungsmethodik und stellen kein repräsentatives Ergebnis dar.

Floureszenzmikroskopie

Zur Visualisierung des ablaufenden Zelltodes wurden die Zellen mit Hoechst 33342 und PJ angefärbt und unter dem Floreszenzmikroskop analysiert. Hoechst 33342 ist ein zellpermeabler Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und so den Nucleus gut anfärbt. PJ interkaliert wie oben bereits beschrieben ebenfalls mit Nukleinsäuren, kann jedoch intakte Zellmembranen nicht passieren, somit färben sich nur tote Zellen mit Membran-Perforationen an. PJ wurde in der Konzentration $0, 5\mu g/ml$, Hoechst 33342 mit $8\mu g/ml$ verwendet. Beide Farbstoffe wurden dafür in PBS gelöst. Für die Färbung wurden die beiden Farbstoffe für 5 Minuten auf den Zellen im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und von nun an nur noch lichtgeschützt verwahrt. Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde das Mikroskop Axiovert 200 der Firma Carl Zeiss AG verwendet. Für PJ liegt die Extinktion/Emission bei Interkalierung mit DNA bei 535/617 nm, für Hoechst 33342 bei 350/461 nm. Entsprechende Filter wurden gewählt. Im Rahmen der Mikroskopie lag das Augenmerk vor allem auf pyknotischen und fragmentierten Zellkernen, die sich noch nicht PJ-positiv darstellten. Diese Zellkerne würden auf sich in Apoptose befindliche Zellen hinweisen. Die Aufnahmen für diese Arbeit wurden mittels der AxioVision Software der Firma Carl Zeiss erstellt.

TUNEL-Assay

Eine weitere Methode zur Visualisierung von apoptotischen Prozessen ist das TUNEL-Assay. Es beruht auf der Markierung von freien 3'-OH Enden, die bei der Fragmentierung von DNA bei Apoptose entstehen. An diese freien Enden wird im Rahmen des Assays Flourescein-12-dUTP, ein Flourescein-markiertes Nukleotid, angehängt. Diese Reaktion wird durch die *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* katalysiert. Apoptotische Zellen können so mittels Floureszenzmikoskopie detektiert und visualisiert werden. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem Protokoll des Kit-Herstellers [57].

Zu Beginn des Versuchs mussten dünne *Slides* aus Glas in die Wells der 12-Well-Platten eingelegt werden. Anschließend wurden, wie oben beschrieben, die Fibrozyten in den Wells ausgesät und inkubiert. In den folgenden 24 Stunden wurden die Zellen im Well und auf der Oberfläche des *Slides* adhärent. Es erfolgte die standardmäßige Durchführung der Erhitzung im Sinne des Kontaktverbrennungsmodells. Zu den Zeitpunkten 5, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Erhitzen wurden die *Slides* vorsichtig aus den Wells entfernt und in eine neue 12-Well-Platte überführt.

Dort wurden die Zellen zunächst fixiert, dafür wurden sie für 20 Minuten, unter dem Abzug, mit 4%igem Formaldehyd bedeckt. Anschließend wurde überschüssiges Formaldehyd entfernt und die *Slides* zweimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nun erfolgte das Permeabilisieren der Fibrozyten, dazu ließ man 0, 2% Triton X-100 in PBS für 5 Minuten einwirken. Erneut wurde überschüssige Lösung entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Für eine Positiv-Kontrolle wurde ein zuvor nicht erhitztes *Slide* für 10 Minuten bei RT mit DNAse behandelt. Dafür wurde $100\mu l$ Tris HCL + EDTA mit $1\mu l$ DNAse-Stock angesetzt und auf das *Slide* gegeben. Auch hier musste erneut zweimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen werden. *Equilibration*-Puffer wurde nun für 10 Minuten auf alle Slides gegeben und anschließend wieder entfernt.

Die eigentliche Markierung der freien 3'-OH Enden erfolgte durch das Auftragen von je

 $100\mu l$ Reaktionslösung. Diese Reaktionslösung setzte sich aus $45\mu l$ Equilibration-Puffer, $5\mu l$ Nucleotid-Mix und $1\mu l$ rTdT Enzym zusammen. Bei der mitgeführten Negativ-Kontrolle, die zuvor zwar erhitzt wurde, wurde nun aber das rTdT-Enzym durch aqua dest. ersetzt. Die Positiv-Kontrolle wurde wie die Proben mit der Reaktionslösung behandelt. Die Reaktionslösung inkubierte für eine Stunde, lichtgeschützt bei 37 °C. Um ein Austrocknen zu verhindern und eine gleichmäßige Verteilung der Lösung gewährleisten zu können, wurden die Slides für diese Zeit mit Plasik-Deckstreifen bedeckt.

Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch 15-minütige Inkubation der *Slides* in 2X SSC gestoppt. Es erfolgte erneutes, zweimaliges Waschen mit PBS. Letztendlich wurden die *Slides* noch auf Objektträger eingedeckelt und im gleichen Schritt mit DAPI gefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit der DNA im Zellkern der Fibrozyten interkaliert und hier somit zur Gegenfärbung eingesetzt wurde. Hierzu wurde es dem *Dako Fluorescence Mounting Medium* im Verhältnis 1:500 zugesetzt. Nun wurden Objektträger mit jeweils einem Tropfen der DAPI/*Mounting*-Medium Lösung bedeckt und die *Slides* mit der Oberseite nach Unten auf die Tropfen gelegt. In den folgenden 24 Stunden härtete das *Mounting*-Medium aus und die Proben konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Apoptotische Zellen fluoreszieren durch die Markierung mit Flourescein grün bei einem Emissionsmaximum von 520nm. Die Gegenfärbung mit DAPI führt zur blauen Fluoreszenz aller Zellkerne bei 460nm.

Western-Blot

Um PARP, cleaved-PARP sowie HSP 60, 70 und 90 nachzuweisen wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dafür wurden die Fibroblasten wie im Kontaktverbrühungsmodell beschrieben erhitzt. 5, 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen trypsiniert und gleichbehandelte Wells gepoolt. Nach dem Zentrifugiern der Zellen und dem Resuspendieren des Pellets wurden die Proben in ein 1, 5ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dort wurden die Probe erneut zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet mit $20\mu l$ RIPA bedeckt. Die Proben konnten dann bei -20 °C gelagert werden.

Nach dem Auftauen musste zunächst eine Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben durchgeführt werden. Dazu wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit genutzt. Zunächst wurden die Proben stark gevortext und zur vollständigen Zelllyse mit dem UP50H Ultraschallprozessor von Hielscher sonifiziert. Dabei wurden 10 Stöße pro Probe, eine Amplitude von 80% und 0,5 Zyklen appliziert. Im Weiteren musste eine Proteinkonzentrationsreihe mit BSA hergestellt werden. Dazu wurde eine 2mg/ml Standard-BSA-Lösung mit PBS in neun verschiedenen Konzentrationen angesetzt. Diese Standardreihe wurde nun in eine Mikrotiterplatte mit $10\mu l$ pro Well pipettiert und dient im Folgenden zur Quantifizierung der Messung der Proben. $4\mu l$ der Proben wurden zunächst mit $20\mu l$ PBS

Konzentration $(\mu g/\mu l)$	Probe	BSA-Standard (μl)	PSA (μl)
2	A	300	0
1,5	В	375	125
$1,\!0$	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	Н	100 von G	400
$0 = \mathrm{Blank}$	I	0	400

 Tabelle 2.8: Konzentrationen zur Herstellung des BSA-Standard entsprechend den Herstellerangaben.

um ein 6faches verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden dann ebenfalls $10\mu l$ in die Wells der Mikrotitierplatte gegeben. Sowohl für die Standardreihe als auch für die Proben wurden Duplets angelegt. Nun wurde den Wells der Standardreihe und der Proben je $200\mu l$ Working-Solution hinzugegeben. Diese ist eine 50:1 Mischung von BCA Reagent A und B des Kites. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Das Kit beruht auf der Biuret-Reaktion, also der Reduktion von Cu^{2+} -Kationen zu Cu^+ -Kationen durch Proteine in alkalischem Medium und der anschließenden Bindung der Cu^+ -Kationen an Bicinchoninsäure (BCA)[58]. Der dadurch entstehende BCA/Kupfer-Komplex erscheint violett und lässt sich bei einem Absorptionsmaximum von 562nm in einem VICTOR Multilabel Plate Reader messen. Mit Hilfe der BSA-Standardreihe konnte so die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Mit der Konzentration der einzelnen Proben mit destilliertem Wasser auf eine einheitliche Proteinkonzentration von $1\mu g/\mu l$ verdünnt. Die Proben wurden anschließend mit $4\mu l$ 4xLaemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Dies bezweckte die Denaturierung der Proteine.

Die Trenngele wurden von der Firma BioRad erworben. Sie wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt. Nun erfolgte das Befüllen der Geltaschen mit den Proteinproben. Hierbei wurden $10\mu g$ Proteine pro Tasche eingefüllt. In die erste Geltasche wurden $2\mu l$ eines Proteinstandards eingefüllt.

Zunächst wurde der Elektrophoreseprozess mit 60 V gestartet, bis die Proteine das Sammelgel durchlaufen haben. Nun wurde mit einer Spannung von 160 V gearbeitet. Der Prozess wurde gestoppt sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

Zum anschließenden Blotting wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System verwendet. Dazu wurde zunächst eine Nitrozellulosemembran und zwei Stücke 2, 5mm Blotting-Papier passend zugeschnitten und mit Blotting-Puffer befeuchtet. Auf die sich am Boden der Blotting Kammer befindliche Anode wurde nun zunächst ein Blotting-Papier gelegt, gefolgt von der Nitrozellulosemembran, dem Gel und letztlich dem zweiten BlottingPapier. Die Kammer wurde verschlossen und für 20 Minuten mit einer Spannung von 25 V mit einer Stromstärke von 2,5 A betrieben.

Der Erfolg des Blotting wurde anschließend mit einer Ponceau S-Färbung überprüft. Dazu wurde die Membran für 2 Minuten in die Ponceau-S-Gebrauchslösung gelegt. Durch die unspezifische Anfärbung der Banden konnte so das korrekte Blotten dargestellt werden. Zur Entfärbung wurde TBS/T verwendet.

Für die Immunmarkierung musste die Membran zunächst mit TBS/T + 5% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt werden. Dies erfolgte, wie alle nachfolgenden Inkubations- und Waschungsschritte, auf einem Taumelroller. Nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellungen wurden die primären Antikörper nach Herstellerangaben in TBS/T + 5% BSA verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Membranen inkubiert. Danach erfolgten drei Waschungen mittels TBS/T für jeweils 5 Minuten und die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (1 Stunde bei Raumtemperatur und lichtgeschützt). Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS/T wurde die Membran für 5 Minuten mit der Entwicklerlösung inkubiert. Für diese Lösung wurde das SuperSignalTM West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate genutzt. Es enthält eine Luminol/Enhancer-, sowie eine Stable Peroxide-Lösung, die zu gleichen Teilen gemischt die Entwicklerlösung ergibt. Das darin befindliche Luminol wird durch die am sekundären Antikörper gekoppelte Horseradish-Peroxidase oxidiert und durch die entstehende Chemilumineszenz lassen sich die Banden nun im ChemiDoc Imaging System darstellen.

Der beschriebene Ablauf wurde für die unterschiedlichen Antikörper (PARP, HSP 60, HSP 70, HSP 90) wiederholt. Um Fehler beim Pipettieren oder in der Vorbereitung der Proben auszugleichen, wurde ebenfalls bei jeder Bande das *housekeeping*-Protein GAPDH bestimmt. Dafür wurde der hFAB Rhodamin Anti-GAPDH Antikörper der Firma BioRad verwendet. Dieser Antikörper ist mit Rhodamin gekoppelt und ermöglicht so die direkte Quantifizierung von GAPDH in jeder Bande ohne die Notwendigkeit eines Zweitantikörpers.

Für die Auswertung der Blots wurde die *Image LabTM* Software von BioRad verwendet. In der Auswertung wurden alle ermittelten Ergebnisse in Relation zur GAPDH-Signalstärke der entsprechenden Bande gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Verbrühungsmodell

In der Entwicklung des Verbrühungsmodells wurde zunächst ein anderer als im Methodenteil beschriebener Ansatz verfolgt. Dabei wurden die Vitalität und andere in den Zellen induzierte Prozesse im Bezug zu der vor der Verbrühung bestehenden Temperatur des PBS gesetzt. Diese konnte mittels des Heizblockes reguliert werden. Es zeigte sich jedoch, dass es während des Pipettiervorganges zu einem starken Temperaturverlust des PBS kam. Dieser ließ sich nicht standardisieren. Somit waren die Schwankungen zwischen der tatsächlichen Expositionstemperatur und der durch den Heizblock vorgegebenen Temperatur zu groß, um valide Aussagen über die Temperaturabhängigkeit zellulärer Prozesse



Abb. 3.1: Beispielhafte Darstellung eines Temperaturverlaufes für ein behandeltes Well im Verbrühungsmodell. Die maximale Expositionstemperatur für dieses Well beträgt 81,6°C und die Expositionszeit, in der die Temperatur an der Wellboden-Oberfläche über 40°C beträgt, ist 3,7 Sekunden.

zu treffen. Aus diesem Grund wurde der Versuchsaufbau entsprechend geändert und wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Messung der Oberflächentemperatur am Wellboden mittels Infrarotthermometer ermöglichte eine deutlich genauere Bestimmung der Expositionstemperatur.

Wie beschrieben wurde immer die gleiche Flüssigkeitsmenge erhitztem PBS eingesetzt. Durch die konstante Absaugrate der Pumpe wurde eine reproduzierbare und für alle Wells identische Kontaktzeit mit der Flüssigkeit erreicht. Dabei ist jedoch zu beachten, dass höhere Maximaltemperaturen zu einer stärkeren Erwärmung des Kunststoffes der Well-Platte führten. Daraus resultierte eine minimal verlängerte Expositionszeit bei höheren Expositionstemperaturen. Die Expositionszeit lag beim Verbrühungsmodell bei circa 4 Sekunden. Abbildung 3.1 zeigt eine beispielhafte Temperaturkurve für ein Well. Aufgrund der Abhängigkeit der Expositionszeit von der Maximaltemperatur sowie der Annahme, dass neben der Expositionszeit die Maximaltemperatur die einflussreichste Variable im Bezug auf die Zellvitalität ist, wurde bei den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen die Maximaltemperatur als wichtigste Bezugsgröße angesehen.

3.1.1 Regressionsanalyse

Durch die beschriebene Verbrühung der Zellen kommt es zu einer Abnahme der Zellzahl und Vitalität. Mittels Resazurin-Reduktions-Assay wurde diese Vitalitätsabnahme eine und 24 Stunden nach Erhitzung quantifiziert. Wie im Methodenteil beschrieben wurde die maximale Expositionstemperatur und die prozentuale Vitatlitätsabnahme gegeneinander aufgetragen. Daraus resultierte jeweils eine Punktwolke bestehend aus den Daten von 97 Wells zu Stunde 1 und 94 zu Stunde 24 (Abbildung: 3.2).

Bei der Analyse der Punktwolken zeigte sich eine nicht-lineare Abhängigkeit der Zellviabilität von der Expositionstemperatur. Zur genaueren Beschreibung dieser Abhänigigkeit wurde eine nicht-lineare Regressionanalyse durchgeführt. Dafür wurde angenommen, dass die Temperatur, bei der der Zelltod der einzelnen Zelle eintritt, von Zelle zu Zelle schwankt, jedoch um einen Mittelwert normalverteilt ist. Da die relative Abnahme der Viabilität bzw. der Vitalität der Zellen aus der Kumulation der Zelltode hervorgeht, müssten die Punkte der erhobenen Daten auf einer kumulativen Normalverteilungskurve liegen. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde für die jeweiligen Punktwolken eine entsprechende Fitting-Kurve ermittelt. Die Kurven für die ein und 24 Stunden Werte der Vitalitätsmessung werden in Abbildung 3.3 dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß \mathbb{R}^2 ist ein Gütemaß dieser Regression und gibt somit an, wie gut sich die Varianz der Vitalität in Abhängigkeit der Exposition mit der ermittelten Funktion erklären lässt. \mathbb{R}^2 beträgt für die nach einer Stunde bestimmten Wert 0,77 und für die Werte nach 24 Stunden 0,79. Beides sind für biologische Prozesse gute Werte und sprechen dafür, dass die oben beschriebene Annahme der Normalverteilung zutrifft.



Abb. 3.2: Die im Resazurin-Reduktions-Assay gemessenen Werte der einzelnen Wells wurden auf die jeweiligen Kontrollen der Platten standartisiert und die prozentuale Abnahme errechnet. Diese Abnahme wurde ins Verhältnis zur Expositionstemperatur gesetzt. A: 1 Stunde nach Verbrühung (97 Einzelmessungen). B: 24 Stunden nach Verbrühung (94 Einzelmessung).



Abb. 3.3: Fitting einer kumulativen Normalverteilungskurve auf die im Resazurin-Reduktions-Assay bestimmten Werte zu den Zeitpunkten 1 und 24 Stunden nach dem Erhitzen. R^2 für 1-Stunden-Werte: 0,77 ; R^2 für 24-Stunden-Werte: 0,79. LT50 für 1-Stunden-Werte: 65, 67 °C ; für 24-Stunden-Werte: 57, 04 °C.

Zur genaueren Erläuterung der Abbildung 3.3 soll ein neuer Begriff eingeführt werden. Entsprechend der aus der Toxikologie bekannten mittleren letalen Dosis (LD_{50}) , soll hier eine mittlere letale Temperatur (LT_{50}) definiert werden. LT_{50} ist als die Temperatur definiert, bei der 50% der Zellpopulation avital sind. Dabei handelt es sich definitionsgemäß um den Wendepunkt der beiden gezeigten Kurven.

Entscheidend bei der Betrachtung der beiden ermittelten Kurven ist nun, dass LT_{50} abhängig vom Messzeitpunkt ist. Die LT_{50} für die 1-Stunden-Werte lautet 65,5 °C, die für die 24-Stunden-Werte 57 °C. Somit liegt insgesamt eine Linksverschiebung vor. Daraus folgt, dass die im bestimmten Temperaturbereich erhitzten Zellen erst im Verlauf der ersten 24 Stunden sterben. Dieses Ergebnis zeigt, dass ähnlich wie bei dem Nachbrennen bei Verbrennungswunden auch *in-vitro* ein verzögerter Zelltod zu beobachten ist.

3.1.2 Behandlung mit z-VAD-FMK und GDF-5

Im Weiteren sollte die Genese dieses verzögerten Zelltodes untersucht und eine Möglichkeit der Inhibierung des Selbigen gefunden werden. Dafür wurden die Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, vor und nach der Erhitzung mit z-VAD-FMK, bzw. GDF-5 behandelt.



Abb. 3.4: Werte und entsprechende *Fitting*-Kurve aus dem Resazurin-Reduktions-Assay 24 Stunden nach dem Erhitzen. (---): Mit GDF-5 behandelte HDF (LT_{50} : 57, 26 °C); (···): Mit z-VAD-FMK behandelte HDF (LT_{50} : 51, 48 °C); (--): Unbehandelte HDF (LT_{50} : 57, 04 °C).

Erneut wurde die Vitalität mittels Resazurin-Reduktions-Assay nach 24 Stunden ermittelt. Nun ließen sich die bereits vorher gewonnene Regressionskurve der unbehandelten Zellen nach 24 Stunden und die neu ermittelten Kurven für die mit z-VAD-FMK, bzw. GDF-5 behandelten Zellen vergleichen.

Abbildung 3.4 zeigt alle drei Kurven. Alle Werte wurden nach 24 Stunden ermittelt. Es wird deutlich, dass zwischen der GDF-5-Kurve und der Kurve der unbehandelten Zellen nahezu Deckungsgleichheit besteht. Auch die LT_{50} der beiden Kurven liegt nahezu identisch bei 57 °C. Daraus schließt sich, dass die Behandlung der Zellen mit GDF 5 nicht zu einer Inhibierung des verzögerten Zelltodes führt.

Die Behandlung mit z-VAD-FMK hatte sogar negative Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen, jedoch auch auf die nur mäßig oder gar nicht erhitzten. Aufgrund dieser unerwünschten Wirkung des z-VAD-FMK auf die humanen dermalen Fibroblasten musste im Folgenden eine alternative Substanz zur Inhibierung von apoptotischen Prozessen eingesetzt werden. Somit wurde bei den Versuchen des Kontaktverbrennungsmodells stattdessen Q-VD-OPH verwendet.



Abb. 3.5: Mit PJ und Hoechst 33342 angefärbte Fibroblasten 1 Stunde (links) und 24 Stunden (rechts) nach dem Erhitzen. Expositionstemperaturen im oberen linken Bildrand. Zellkerne vitaler Zellen sind durch Hoechst 33342 blau-fluoreszierend (Ex/Em = 350/461 nm); Zellkerne avitaler Zellen: rot-floureszierend (Ex/Em = 535/617 nm).

3.1.3 Hoechst 33342-/PJ-Färbung

Die beschriebenen Ergebnisse der Regressionsanalyse zeigen, das bei bestimmten Temperaturen die Zellen erst im Verlauf der ersten 24 Stunden sterben. Dies sollte auch visuell dargestellt werden. Dafür wurde eine und 24 Stunden nach dem Erhitzen eine Färbung mit Hoechst 33342 und PJ eingesetzt. Abbildung 3.1.3 zeigt exemplarische Ausschnitte der Präparate zu den verschiedenen Zeitpunkten und bei unterschiedlichen Expositionstemperaturen. Propiumiodid-positive Zellen sind rot eingefärbt und als avital anzusehen, im Gegensatz zu den Hoechst-postiven, die sich blau darstellen und zum Zeitpunkt der Färbung vital sind.

Beispielhaft ist in den oberen beiden Aufnahmen der Abbildung 3.1.3 zu sehen, dass bei einer relativ hohen Temperatur von 60 °C zwar bereits vereinzelt avitale Zellen in der unteren Bildhälfte zu erkennen sind, es aber hingegen nach 24 Stunden sogar bereits bei einer Temperatur von 50,6 °C Areale vorliegen, bei denen die avitalen Zellen deutlich überwiegen. Bei den Zellen mit höheren Expositionstemperaturen (62,9 °C und 72,9 °C) sind bereits bei den frühen Aufnahmen deutlich mehr avitale Zellen zu erkennen. Nach 24 Stunden wird auch deutlich, dass es zu einer Zerstörung der extrazellulären Matrix und damit zu einer Ablösung von Zellen kommt. Deutlich wird auch, dass es im Verbrühungsmodell zu zonalen Unterschieden kommt. Der Schädigungsgrad der Zellen ist bedingt durch die Abkühlung der heißen Flüssigkeit während der Ausbreitung innerhalb der Wells nicht homogen.

3.2 Kontaktverbrennungsmodell

Im Verbrühungsmodell konnte schon gezeigt werden, dass es auch *in-vitro* einen verzögerten Zelltod bei erhitzen Fibroblasten gibt. Dieser ähnelt dem im *in-vivo* beobachteten verzögerten Wundprogress. Zur genaueren Untersuchung der ablaufenden Prozesse wurde, aus den im Diskussionsteil beschriebenen Gründen, das Kontaktverbrennungs-Modell entwickelt und genutzt.

Als Expositionsparameter wurden eine Temperatur und Kontaktzeit gewählt, bei denen nach einer Stunde noch circa 50% der HDF vital waren. So sollten sowohl positive als auch negative Veränderungen der Vitalität nach möglichen Behandlungen abgebildet werden können. Wie im Methodenteil beschrieben wurde eine entsprechende Heizblockeinstellung von 80 °C und eine Kontaktzeit von 10 Sekunden gewählt.

Zunächst sollte die Validität des Kontaktverbrennungsmodells und insbesondere die Reproduzierbarkeit der Temperaturexpositionen gezeigt werden. Hierzu wurde der Temperaturverlauf am Wellboden während der Kontaktzeit und der anschießenden Abkühlungsphase wiederholt mittels Infrarotthermometer aufgezeichnet. Es erfolgten 10 Erhitzungsvorgänge, in denen jeweils die Temperatur in einem Well aufgezeichnet wurde (siehe



Abb. 3.6: A: Temperaturverläufe am Boden der Wells im Kontaktverbrennungsmodell (n=10, Einzelmessungen in unterschiedlichen Wells, unterschiedlicher Platten). (---): 40 °C, ab dieser Temperatur können laut Roti Roti [34] Veränderungen von Makromolekülen und somit Zellschädigungen auftreten. B: Maximale Expositionstemperatur \pm SD (T_{max}) und durchschnittliche Temperatur \pm SD ($T_{average}$) von den in A gezeigten Einzelmessungen.



Abb. 3.7: Resultierende durchschnittliche Temperaturkurve aus den Einzelmessungen aus Abbildung 3.6. Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten \pm SD. Durchschnittliche Maximaltemperatur: 67,02 °C , SD $\pm 0,54$ °C

Abbildung 3.6 und 3.7). Hierdurch konnte untersucht werden, inwieweit eine Vergleichbarkeit zwischen zwei erhitzen Platten gegeben ist.

Die durchschnittlich erreichte Maximaltemperatur beträgt 67,02 °C mit einer SD von $\pm 0,54$ °C. Es wurde die mittlere Temperatur der einzelnen Messungen bestimmt, wobei Messwerte unterhalb von 40 °C unberücksichtigt blieben, da diese niedrigen Temperaturen

vermutlich keinen Einfluss auf den induzierten Zellschaden haben. Hier ergab sich eine durchschnittliche Temperatur von 51, 17 °C mit einer SD von $\pm 1, 73$ °C. Die Expositionszeit, in der die Temperatur über 40 °C lag, liegt im Durchschnitt bei 22 Sekunden.

Es zeigt sich also, dass die Maximaltemperatur sehr genau reproduzierbar ist. Die Varianz bei der mittleren Expositionstemperatur ist jedoch größer. Diese Ungenauigkeit scheint vor allem durch den Abkühlungsprozess bedingt zu sein. Um den Effekt dieser Varianz auf die späteren Ergebnisse zu minimieren, wurden auf einer 12-Wellplatte immer fünf behandelte und fünf unbehandelte Zellen mitgeführt und entsprechend in Relation gesetzt. Die Temperaturmessungen der einzelnen Wells einer Platte ergaben, dass alle 10 äußeren Wells sich gleichermaßen erhitzten. Die mittleren zwei Wells der Platte erhitzten sich jedoch stärker als die am Rand befindlichen, sodass diese beiden Wells in den folgenden Versuchen immer leer und unberücksichtigt blieben.

3.2.1 Zellviabilität

Resazurin-Reduktions-Assay

Zur Beurteilung der Viabilitätsabnahme nach Erhitzen wurde auch beim Kontaktverbrennungsmodell das Resazurin-Reduktions-Assay verwendet. Dieses wurde in den ersten 7 Stunden stündlich durchgeführt, anschließend alle 24 Stunden, bis 96 Stunden nach dem Erhitzen. Abbildung 3.8 **A** zeigt den Verlauf der Viabilität in den ersten 7 Stunden im Bezug zur Kontrolle. Dort zeigt sich, dass es in den ersten vier Stunden zu einer starken Abnahme von bis zu 50% kommt. Bemerkenswert ist, dass nach einer Stunde nur eine geringfügige Abnahme der Viabilität zu beobachten ist. Daraus lässt sich folgern, dass nur wenige Zellen direkt durch Hitzefixierung sterben. Von 7 bis 48 Stunden nach dem Erhitzen bleibt die Zellzahl nahezu konstant (Abbildung 3.8 **B**). Anschließend kommt es zu einem Anstieg der CTB-Werte.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Da, wie im Methodenteil beschrieben, das Resazurin-Reduktions-Assay grundsätzlich nur ein Maß der Reduktionsäquivalenten der Zellen ist, musste gezeigt werden, dass die ermittelten Werte überhaupt eine Aussage über die Viabilität und die Zellzahlveränderung zulassen. Dies wurde einmalig überprüft, indem nach dem Erhitzen und dem Resazurin-Reduktions-Assay zusätzlich noch die DNA-Konzentrationsmessung durchgeführt wurde.

Abbildung 3.9 zeigt auf der linken y-Achse die ermittelten Werte des CTB-Assay und auf der rechten y-Achse die der DNA-Konzentrationsmessung. In beiden Fällen wurde auf die nicht erhitzte Kontrolle normiert und Veränderungen in Prozent angegeben. Es zeigt sich, dass zwischen den beiden Verfahren zwar leichte Schwankungen vorliegen, jedoch wird auch die gute Korrelation deutlich. Somit ist die Verwendung des Resazurin-Reduktions-



Abb. 3.8: Die im Resazurin-Reduktions-Assay gemessene Viabilität. Die Werte der einzelnen Zellreihen wurden auf die jeweiligen nicht erhitzten 1-Stunden Kontrollen normiert. A zeigt den Verlauf in den ersten 7 Stunden und den entsprechenden 24 Stunden Wert. B zeigt den weiteren Verlauf bis zu 96 Stunden nach dem Erhitzen $(n=3, \pm SD)$.



Abb. 3.9: Vergleich der Ergebnisse des Resazurin-Reduktions-Assay (CTB) und der DNA-Konzentrationsmessung. Die beiden Methoden wurden sequenziell, bei den selben Zellen zu den Zeitpunkten 1, 24 und 48 Stunden (nach Erhitzen) durchgeführt. Alle Werte wurden anhand der jeweiligen Kontrolle normiert. Linke y-Achse: Resazurin-Reduktions-Assay; rechte y-Achse: DNA-Konzentrationsmessung.

Assay als Maß der Viabilität im Rahmen unseres Versuchsaufbaus durchaus legitim.

3.2.2 Apoptose-Assay nach Nicoletti

Um den gezeigten verzögerten Zelltod genauer zu beschreiben und um dessen Ätiologie zu bestimmen wurden diverse Assays durchgeführt. Dabei stand erneut vor allem die Frage nach einer ablaufenden Apoptose im Fokus.

Durch das Apoptose-Assay von Nicoletti und Riccardi werden hypodiploide Zellkerne mittels FACS-Analyse detektiert. Dieses Assay wurde zu den Zeitpunkten 5, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Erhitzen durchgeführt. Abbildung 3.10 zeigt den Anteil der hypodiploiden Zellkerne in den erhitzten Proben und den entsprechenden Kontrollen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Es zeigt sich ein höherer Anteil an hypodiploiden Zellkernen bei den erhitzten Zellen. Die Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant und somit nur als Tendenz zu werten. Der höchste Anteil scheint nach 5 Stunden aufzutreten, jedoch bleibt der Anteil auch über einen längeren Zeitraum, bis 72 Stunden, erhöht. Die Ergebnisse könnten also auf eine kontinuierlich ablaufende Apoptose hindeuten, diese beträfe aber immer nur einen kleinen Teil der Zellen.



Abb. 3.10: Anteil der hypodiploiden Zellkerne an der Gesamtpopulation bei erhitzten Fibroblasten und nicht erhitzten Kontroll-Proben. Die FACS-Analysen erfolgten jeweils 5, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Erhitzen. (n=4, \pm SD)

3.2.3 Behandlung mit Q-VD-OPH

Um eine genauere Aussage zum Anteil von Apoptose bei dem verzögerten Zelltod zu treffen wurden die Zellen mit $10\mu M$ Q-VD-OPH behandelt. Dieser Pan-Caspase Inhibitor unterbindet das Ablaufen einer Apoptose und sollte, sofern der verzögerte Zelltod durch Apoptose bedingt ist, einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten haben. Wie im Methodenteil beschrieben wurden die Fibroblasten vor und nach dem Erhitzen mit Q-VD-OPH inkubiert. 1, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach dem Erhitzen erfolgte ein Resazurin-Reduktions-Assay. Der verlängerte Beobachtungszeitraum von 96 Stunden wurde aufgrund der Ergebnisse des Apoptose-Assay nach Nicoletti gewählt. Dort konnten auch nach 72 Stunden vermehrt hypodiploide Zellkerne detektiert werden. Somit soll die 96 Stunden Messung verhindern, dass mögliche sehr späte Prozesse, wie zum Beispiel eine sehr spät ablaufende Apoptose nicht verpasst werden.

Abbildung 3.11 zeigt die entsprechenden Ergebnisse. Es wird deutlich, dass zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Viabilität zwischen behandelten und unbe-



Abb. 3.11: Vergleich von erhitzten Fibroblasten mit und ohne zusätzliche Behandlung mit $10\mu M$ Q-VD-OPH. Zu den Zeitpunkten 1, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde ein Resazurin-Reduktions-Assay durchgeführt. Die Werte der einzelnen Zellreihen wurden auf die jeweiligen nicht erhitzten 1-Stunden Kontrollen normiert (n=3, ± SD).

handelten Zellen vorliegt. Somit scheint Q-VD-OPH kein Einfluss auf die Viabilität der erhitzten Zellen zu haben und eine ablaufende Apoptose als Ursache des verzögerten Zelltods wird unwahrscheinlicher.

3.2.4 Behandlung mit GDF-5

Im Verbührungsmodell konnte wie oben beschrieben kein signifikanter Einfluss von GDF-5 auf die Vitalität und den verzögerten Zelltod beobachtet werden. Jedoch aufgrund der bereits in der Einführung (Abschnitt 1.3) erwähnten viel versprechenden klinischen Einsatzmöglichkeit sollten positive Effekte sicher ausgeschlossen werden. Somit wurden die Fibroblasten auch im Rahmen des Kontaktverbrennungsmodell mit $1\mu g/ml$ GDF-5 behandelt.

Erneut wurde das Resazurin-Reduktions-Assay verwendet um mögliche Effekte darzustellen. Abbildung 3.12 zeigt die Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten. Auch im Kontaktverbrennungsmodell konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.



Abb. 3.12: Vergleich von erhitzten Fibroblasten mit und ohne zusätzlicher Behandlung mit $1\mu g/ml$ GDF-5. Zu den Zeitpunkten 1, 24, 48 und 72 Stunden wurde ein Resazurin-Reduktions-Assay durchgeführt. Die Werte der einzelnen Zellreihen wurden auf die jeweiligen nicht erhitzte 1-Stunden Kontrollen normiert. (n=3, ± SD)

Somit ist davon auszugehen, dass GDF-5, zumindest bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen, keinen Einfluss auf den verzögerten Zelltod nach Verbrennungen hat.

3.2.5 Western-Blot

PARP

Um eine abschließende Aussage zur Ätiologie des verzögerten Zelltodes treffen zu können, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Hierbei sollte PARP und cleaved-PARP detektiert werden, da cleaved-PARP bei aktivierter Caspase 3, bzw. 7 im Rahmen einer Apoptose entsteht (siehe Abschnitt 1.2.4).

Erneut wurden verschiedene Zeitpunkte nach dem Erhitzen gewählt (5, 24, 48 und 72 Stunden). Eingesetzt wurde der im Methodenteil beschriebene Antikörper, dieser bindet PARP bei 116 kDa und cleaved-PARP bei 89 kDa. Wie im exemplarischen Ausschnitt des Blot zu sehen (Abbildung 3.13), zeigte sich, dass zu keinem Zeitpunkt cleaved-PARP



Abb. 3.13: Expression von PARP in erhitzten Fibroblasten und nicht erhitzten Kontroll-Proben, zu den Zeitpunkten 5, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Erhitzen. Alle Werte sind auf die 5 Stunden Kontrolle normalisiert (n=2, \pm SD). Der Blot Ausschnitt zeigt beispielhaft die Bereiche zwischen 80 und 120 kDA. Die Banden von PARP sind deutlich bei 116kDA zu erkennen. Cleaved-PARP (89kDA) konnte nicht detektiert werden.

detektiert werden konnte. PARP hingegen wurde nach 5 und 24 Stunden nach dem Erhitzen im Vergleich zur Kontrolle deutlich verstärkt exprimiert. Dies deutet auf eine starke, durch das Erhitzen induzierte DNA-Schädigung hin.

Hitzeschockproteine

Ein bekannter Mechanismus von Zellen nach Exposition mit Hitze stellt die verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen dar. Dies sollte auch für das Kontaktverbrennungsmodell gezeigt werden. Vor allem stand hier die zeitliche Dynamik im Fokus. Somit wurden erneut die Zeitpunkte 5, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Erhitzen gewählt. Es wurden Antikörper gegen HSP 60, HSP 70 und HSP 90 verwendet.

HSP 90 konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. Jedoch zeigen Abbildung 3.14 und 3.15 die deutlich gesteigerte Expression von HSP 60 und 70. HSP 60 lässt sich bereits nach 5 Stunden verstärkt detektieren und ist bis 72 Stunden weitgehend stabil. HSP 70 (Abbildung: 3.15) zeigt deutlich mehr Dynamik. Hier ist ein *Peak* nach 24 Stunden fest-



Abb. 3.14: Expression von HSP 60 in erhitzten Fibroblasten und nicht erhitzten Kontroll-Proben, zu den Zeitpunkten 5, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Erhitzen. Alle Werte sind auf die 5 Stunden Kontrolle normalisiert (n=2, \pm SD). Der Blot Ausschnitt zeigt beispielhaft die Bereiche zwischen 60 und 70 kDA.



Abb. 3.15: Expression von HSP 70 in erhitzten Fibroblasten und nicht erhitzten Kontroll-Proben, zu den Zeitpunkten 5, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Erhitzen. Alle Werte sind auf den Maximalwert (24h heat-stressed) normalisiert (n=2, \pm SD). Der Blot Ausschnitt zeigt beispielhaft die Bereiche zwischen 60 und 70 kDA.

zustellen und anschließend eine kontinuierliche Abnahme. Zusammenfassend muss auch hier wieder betont werden, dass die Erhitzung der Zellen die zellulären Prozesse deutlich langfristiger und nachhaltiger schädigt als primär erwartet.



3.2.6 Tunel-Assay



Abb. 3.16: Fibroblasten 5 (A), 24 (B), 48 (C) und 72 (D) nach dem Erhitzen. Es wurde ein Tunel-Assay durchgeführt. (E): Positiv Kontrolle mittels Staurosporin. Tunelpositive Zellkerne: grün (Ex/Em = 495/519nm). Gegenfärbung der vitalen Zellen mit DAPI: blau (Ex/Em = 350/461 nm).

Eine häufig verwendete Methode zur Visualisierung von apoptotischen Prozessen ist das Tunel-Assay. Wie im Methodenteil bereits beschrieben markiert es freie 3'-OH Enden fragmentierter DNA. Das Tunel-Assay wurde zu den Zeitpunkten 5, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Abbildung 3.2.6 zeigt exemplarische Ausschnitte zu den entsprechenden Zeitpunkten sowie eine Positiv-Kontrolle (**E**), bei der die Apopotose der Zellen durch Staurosporin ausgelöst wurde. Sogenannte Tunel-positive Zellkerne fluoreszieren grünlich. Die Gegenfärbung mit DAPI, die alle Zellkerne anfärbt, ist blau-fluoreszierend.

Nach 5 Stunden treten nur sehr vereinzelt eindeutig Tunel-positive Zellkerne auf. In Abbildung 3.2.6 **A** sind nur drei Kerne deutlich grün hervorgehoben. Bei den Aufnahmen, die nach 24 Stunden und später entstanden sind, sind deutlich vermehrt grüne Zellkerne zu erkennen. Vor allem nach 24 Stunden erscheinen die Tunel-positiven Zellkerne auch geschwollen und vergrößert. Eine klare Aussage, ob diese Zellen eine Apoptose durchlaufen haben, ist jedoch nicht eindeutig zu treffen, da die verwendete Färbemethode keine Differenzierung erlaubt, zwischen Zellen die, vor oder nach deren Tod Tunel-positiv wurden.

In der 48 Stunden Aufnahme ist noch zu beobachten, dass es zu flächigen Ablösungen von Zellen kam. Dies konnte wie unten beschrieben auch im Rahmen der Hoechst und PJ-Färbungen regelhaft beobachtet werden.

3.2.7 Hoechst 33342-/PJ-Färbung

Auch beim Kontaktverbrennungsmodell wurde eine Fluoreszenzmikroskopie mit Hoechst 33342 und PJ durchgeführt. Hier sollten nochmal die im Resazurin-Reduktions-Assay gezeigten Ergebnisse visualisiert werden, bei denen ein Großteil der Fibroblasten erst im Verlauf der ersten 24 Stunden sterben. Dafür wurde 1 und 24 Stunden nach dem Erhitzen mit Hoechst 33342 und PJ gefärbt. Abbildung 3.17 zeigt exemplarische Ausschnitte der Präparate zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Die Aufnahmen auf der linken Seite von Abbildung 3.17 wurden eine Stunde nach dem Erhitzen aufgenommen. Rote Zellkerne und damit avitale Fibroblasten sind nur vereinzelt zu finden. Der Fluoreszenzmikroskopie ist zu diesem Zeitpunkt noch homogen und keine Zellen haben sich abgelöst. Auf der rechten Seite sind Aufnahmen von Fibroblasten des selben Spenders 24 Stunden später gezeigt. Trotz der stärkeren Vergrößerung und damit eines kleineren Ausschnittes sind mehr avitale Zellen zu erkennen.

Die beiden mittleren Bilder der rechten Seite zeigen erneut, dass der Zellrasen deutlich aufgelockert erscheint und sich wie bereits beschrieben diverse Zellen aus dem Well abgelöst haben. Diese Ablösung, bedingt durch die Zerstörung der extrazellulären Matrix konnte auch schon bei dem Verbrühungsmodell gezeigt werden. Unklar ist, ob die sich abgelösten Zellen vital oder avital waren.

3.2.8 Antioxidantien

Wie in der Einleitung ausgeführt spielen radikale Sauerstoffspezies (ROS) vermutlich eine große Rolle im Mechanismus des sekundären Wundprogresses. Antioxidantien werden bereits klinisch bei Brandwunden eingesetzt. Nun sollte überprüft werden, ob das Hinzugeben von Antioxidantien zu den erhitzten Zellen auch *in-vitro* einen Effekt auf das



Abb. 3.17: Mit PJ und Hoechst 33342 angefärbte Fibroblasten 1 Stunde (links) und 24 Stunden (rechts) nach dem Erhitzen. Zellkerne vitaler Zellen sind durch Hoechst 33342 blau-fluoreszierend ($Ex/Em = 350/461 \ nm$); Zellkerne avitaler Zellen: rot-fluoreszierend ($Ex/Em = 535/617 \ nm$).

Überleben der erhitzten HDF hat. Dazu wurden zwei Substanzen ausgewählt: Butylhydroxytoul (BHT) und 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure, besser bekannt als Trolox.

Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse des Resazurin-Reduktions-Assays bei mit BHT behandelten Zellen. Bis zum spätesten untersuchten Zeitpunkt, 72 Stunden nach dem Erhitzen konnte kein Einfluss des BHT auf die Viabilität gefunden werden. Es handelt sich jedoch nur um eine kleine Testreihe mit Zellen nur eines Spenders und mit einer relativ niedrigen Konzentration von BHT.



Abb. 3.18: Vergleich von erhitzten Fibroblasten mit und ohne zusätzlicher Behandlung mit $10\mu M$ BHT. Zu den Zeitpunkten 1, 24, 48 und 72 Stunden wurde ein Resazurin-Reduktions-Assay durchgeführt. Die Werte wurden auf die nicht erhitzte 1-Stunden Kontrolle normiert. (n=1, ± SD)

Bei der Untersuchung von Trolox auf das verzögerte Sterben der HDF wurde sich auf die ersten 24 Stunden beschränkt. Bei einem zusätzlichen Versuchsansatz wurde Trolox mit z-VAD-FMK ergänzt. Hier bestand die Überlegung, dass Trolox wohl möglich eine sekundäre Nekrose verhindern kann, dies sich jedoch nicht in der Viabilität widerspiegelt, da die Zellen stattdessen in eine Apoptose übergehen. Abbildung 3.19 zeigt die Ergebnisse des Resazurin-Reduktions-Assays nach 24 Stunden. Es konnte weder ein Einfluss von Trolox noch von Trolox zusammen mit z-VAD-FMK gefunden werden. Aber auch hier handelt es sich um eine nur sehr kleine Testreihe mit nur einem Spender.



Abb. 3.19: Vergleich von erhitzten Fibroblasten mit und ohne zusätzlicher Behandlung mit Trolox $(500\mu mol/l)$, bzw. Trolox $(500\mu mol/l) + z$ -VAD-FMK $(10\mu M)$. 24 Stunden nach dem Erhitzen wurde ein Resazurin-Reduktions-Assay durchgeführt. Die Werte wurden auf die nicht erhitzte 1-Stunden Kontrolle normiert. $(n=1, \pm SD)$

3.2.9 Cycloheximid

Wie in der Einleitung in Abschnitt 1.2.4 beschrieben kann Nekrose durch einen übermäßigen ATP-Verbrauch des PARP-Reparaturmechanismuses bedingt sein. Da bereits in Abschnitt 3.2.5 gezeigt werden konnte, dass PARP als Antwort auf den Hitzestress massiv hoch reguliert wird, ist diese Art von Zelltod für die Hitze-geschädigten HDF durchaus denkbar. Um zu untersuchen, ob eine Hemmung des PARP Mechanismus einen Einfluss auf die Vitalität hat wurde Cycloheximid eingesetzt. Es dient als Translationshemmer und unterbindet somit die Synthese von PARP.

Abbildung 3.20 zeigt die Vitalität der erhitzten HDF im Resazurin-Reduktions-Assays nach 5 und 24 Stunden, mit und ohne CHX. Es handelt sich erneut nur um eine kleine Testreihe mit nur einem Spender. Nach 5 Stunden ist zwar eine leichte Tendenz zu Gunsten der mit CHX behandelten Zellen zu erkennen, jedoch ohne jegliche Signifikanz. In der 24 Stunden Messung zeigt sich die deutlich zytotoxische Wirkung von CHX bei der nicht erhitzten Kontrolle mit CHX. Interessant zu beobachten ist hier, dass CHX bei den erhitzten Zellen zu keinem weiteren Vitalitätsverlusten führt.



Abb. 3.20: Vergleich von erhitzten Fibroblasten mit und ohne zusätzlicher Behandlung mit CHX $(10\mu g/ml)$. 5 (A) und 24 (B) Stunden nach dem Erhitzen wurde ein Resazurin-Reduktions-Assay durchgeführt. Die Werte wurden auf die jeweilige nicht erhitzte Kontrolle ohne CHX normiert. $(n=1, \pm SD)$

4 Diskussion

4.1 Vergleich und Bewertung der unterschiedlichen Modelle

Um den bei einer Verbrennung der Haut auf die Zellen wirkenden Hitzestress zu imitieren, wurde versucht ein Modell zu entwickeln, das es ermöglicht die Zellen mit einer kurzen aber hohen Hitzeexposition zu schädigen. Wie in der Einleitung bereits beschrieben fand sich in der Literatur einzig das Modell von Matylevitch et al. von 1998 als mögliche Orientierung. Hier wurde die kurze und starke Hitzeexposition ermöglicht, indem die Zellen auf Deckgläsern kultiviert wurden. Diese wurden anschließend für wenige Sekunden in heiße Flüssigkeit getaucht [36].

4.1.1 Verbrühungsmodell

Das Verbrühungsmodell ist in Anlehnung an das Modell von Matylevitch et al. entstanden, da der Zellschaden ebenfalls durch das Übergießen mit heißer Flüssigkeit induziert wurde. Das Verbrühungsmodell versucht jedoch ein Problem von Matylevitchs Modell zu lösen: Die Standardisierung der Expositionszeit in Matylevitchs Modell ist nur sehr schwer zu erreichen. Grund dafür ist, dass die Deckgläser händisch eingetaucht wurden und dabei vermutlich Ungenauigkeiten entstanden. Durch manuelles Eintauchen kommt es schnell zu leichten Abweichungen, beispielsweise durch Variationen der Eintauchgeschwindigkeiten und des Abtropfverhaltens. Dies ist vor allem deshalb problematisch, da bei den verwendeten hohen Expositionstemperaturen bereits minimale Abweichungen im Bereich einer Dezisekunde zu starken Verschiebungen der Ergebnisse führen können. Dies wurde schon durch Henriques und Moritz 1947 gezeigt, die den Zusammenhang von Expositionstemperaturen und Expositionsdauer beschrieben haben [18]. Das Verbrühungsmodell hat hier den Vorteil, dass die Expositionszeit weitgehend Untersucher unabhängig ist, da sie nur durch die Laufrate der Absaugpumpe vorgegeben wird.

Eine weitere Stärke des Verbrühungsmodells, die auch gegenüber dem Kontaktverbrennungsmodell besteht, ist die Möglichkeit, die Abhängigkeit der Zellvitalität gegenüber der Expositionstemperatur darzustellen. Dies wurde ermöglicht, da viele, voneinander unabhängige Messungen durchgeführt wurden, die alle unterschiedliche Expositionstemperaturen repräsentieren. Eine Grafik, wie sie Abbildung 3.3 zeigt, wäre im Rahmen des Kontaktverbrennungsmodells nur mit einer sehr hohen Anzahl an Versuchsdurchläufen möglich gewesen. Anhand des Verbrühungsmodells konnte so jedoch einfach gezeigt werden, dass die Abhängigkeit von Vitalität und Expositionstemperatur einer kumulativen Normalverteilungskurve entspricht.

Dieser Umstand, dass jede Probe eine unterschiedliche Expositionstemperatur besitzt und die daraus nötig werdende, komplizierte Auswertungsmethodik impliziert jedoch auch einen sehr großen Nachteil des Verbrühungsmodells: Für eine konkrete Aussage wird hier immer eine sehr große Anzahl an Proben benötigt. So muss davon ausgegangen werden, dass mindestens 50 Wells behandelt und gemessen werden müssen, um eine ausreichend genaue Regressionsanalyse durchführen zu können. Dieser Sachverhalt macht aufwendigere und kostspieligere Assays kaum mehr verwendbar. Und auch in Bezug auf das Resazurin-Reduktions-Assay ist beispielsweise eine kleinschrittige Analyse des zeitlichen Verlaufes aufgrund des extremen zeitlichen und finanziellen Mehraufwands kaum umsetzbar.

Ein weiterer Nachteil des Verbrühungsmodells ist, dass es zum Auftreten von zonalen Temperaturunterschieden innerhalb des Wells kommt. Beim Pipettieren trifft das heiße PBS auf den kühleren Kunststoff des Wellbodens. Es kommt also im Zuge des Verteilens des PBS auf dem Zellrasen zum Abkühlen des selbigen. Somit resultiert eine deutlich höhere Expositionstemperatur an der Pipettierstelle und ein Temperaturgefälle in den Randbereichen. Auch wenn dies natürlich eine gewisse Analogie zu *in-vivo*-Verbrennungen darstellt erschwert es genaue Aussagen über die tatsächliche Expositionstemperatur. Die durch das Infrarotthermometer ermittelte Temperatur entspricht nur dem Durchschnittswert der gesamten Kulturfläche des Wells.

4.1.2 Kontaktverbrennungsmodell

Das Kontaktverbrennungsmodell war als Alternative zum Verbrühungsmodell gedacht, um aufwändigere Assays durchführen zu können und um bei Behandlungen, beispielsweise mit Q-VD-OPH, eine bessere Vergleichbarkeit zwischen nicht behandelten und behandelten Proben zu erreichen. Dafür wurde nun bei allen erhitzten Proben mit den identischen Expositionsparametern gearbeitet.

Auch wenn das Aufsetzen der Platte auf den Heißblock händisch geschieht, ist die Hitzeexposition deutlich besser reproduzierbar als bei Matylevitch. Grund dafür ist, dass die Kontaktzeit von Heizblock und Platte mit 10 Sekunden relativ lang ist und dadurch eine insgesamt längere Expositionszeit der Zellen resultiert. Um jedoch den selben Hitzeschaden zu induzieren musste entsprechend die Expositionstemperatur nach unten angepasst werden. Der Vorteil dieser längeren Expositionszeit und der niedrigeren Expositionstemperatur ist, dass minimale Variationen der Kontaktzeit, die durch das händische Aufsetzen entstehen, weniger ins Gewicht fallen.
Die Reliabilität des Kontaktverbrennungsmodells wird weiter dadurch verbessert, dass alle Zellen auf einer Platte die exakt gleichen Expositionsbedingungen haben. So lassen sich Abweichungen, die beim händischen Aufsetzen zwischen den verschiedenen Platten entstehen, ausgleichen, indem behandelte und unbehandelte Zellen (z.B. mit Q-VD-OPH) auf der selben Platte mitgeführt werden. Bei der späteren Auswertung heben sich so Effekte, die aufgrund von Fehlern bei der Exposition entstanden sind, wieder auf. Zudem konnten inhibierende und verstärkende Effekte auf den Zelltod optimal dargestellt werden, da die Expositionsbedingungen so gewählt wurden, dass eine Viabilitätsabnahme von 50% nach 24 Stunden zu beobachten war. Somit konnten durch mögliche Behandlungen Veränderungen in beide Richtungen gut abgebildet werden.

Das Kontaktverbrennungsmodel zeigt auch im Vergleich zu den Verhältnissen in einer *in-vivo* Verbrennungswunde deutliche Vorteile. Der fehlende direkte Kontakt zur Hitzequelle und die damit verbundene Pufferwirkung des dünnen Wellbodens führt zu einem gleichmäßigeren Hitzetransfer. Die Expositionsbedingungen eines in der tiefen Dermis liegenden Fibroblasten bei einer Verbrennungswunde werden so optimal imitiert. Auch diese Fibroblasten erfahren aufgrund der schützenden Epidermis nur eine abgepufferte, bzw. indirekte Hitzeeinwirkung.

Wie im Methodenteil bereits erwähnt muss das Medium vor dem Erhitzen entfernt werden. Hieraus ergibt sich ein Nachteil des Kontaktverbrennungsmodells. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Verdunstungs- und Austrockungseffekte Einfluss auf die Zellen haben. Bei den von uns gewählten Temperaturen ist dieser Effekt aber vermutlich zu vernachlässigen. Umso höher die Expositionstemperatur, umso größer wird der Einfluss der Austrockungseffekte. Auch die Auswirkung der Hitze auf das Polystyrol der Well-Platten müssen bedacht werden, jedoch kann auch hier von vernachlässigbaren Effekten ausgegangen werden, da die Glasübergangstemperatur von Polystyrol mit circa 100 °C deutlich über den verwendeten Temperaturen liegt [59].

Zusammenfassend stellt sich das Kontaktverbrennungsmodell als das Modell mit der größeren Reliabilität dar. Auch im Bezug auf Handhabbarkeit, Wirtschaftlichkeit und Vergleichbarkeit mit *in-vivo* Verbrennungswunden liegen die Vorteile deutlich beim Kontaktverbrennungsmodell.

Bei beiden Modellen muss auch die Art der Auswertung diskutiert werden. Hier wurde vor allem das Resazurin-Reduktions-Assay verwendet. Dabei wird die Vitalität der Zellen nicht direkt quantifiziert sondern indirekt über das entstandene Resorufin (siehe Abschnitt 2.2.3). Somit lassen die Ergebnisse nur dann eine Aussage über die Anzahl der vitalen Zellen zu, wenn die überlebenden Zellen einen konstanten Metabolismus mit einer konstanten Fähigkeit zur Reduktion von Resazurin aufweisen. In Abschnitt 3.2.1 wurde zwar gezeigt, dass die in der erhitzten Probe vorhandene DNA mit der Resazurin-Reduktions-Assay Messung korreliert, jedoch wurden mögliche Einflüsse der im Verlauf hinzugegebenen Substanzen wie Q-VD-OPH oder GDF-5 auf den Resazurin-Umsatz nicht untersucht. Somit kann eine Verfälschung der Vitalitätsergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren muss bei beiden Modellen die gewählte Zellart kritisch betrachtet werden. Es wurden primäre humane Fibroblasten verwendet, bei denen von einer gewissen Spendervarianz auszugehen ist. Für eine bessere Standardisierung und bessere, spenderunabhängigere Aussagekraft der Ergebnisse wäre eine etablierte Zelllinie vorteilhaft gewesen.

4.2 Verzögerter Zelltod und Vergleich zu *in-vivo*-Verbrennungswunden

In der Einleitung (Abschnitt 1.2.3) wurde der aktuelle Forschungsstand zum sekundären Wundprogress vorgestellt und es wurde deutlich, wie multifaktoriell dieser Prozess ist. Viele der beschriebenen Pathomechanismen beruhen auf Reaktionen des umliegenden Gewebes, wie beispielsweise der Störung der Mikrozirkulation oder Entzündungsreaktionen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass ein verzögerter Zelltod auch in einem Zellkultur-vermittelten Modell auftritt und somit auch unabhängig von Gewebevermittelten Prozessen ablaufen kann.

Dieser verzögerte Zelltod konnte sowohl im Verbrühungsmodell, als auch im Kontaktverbrennungsmodell gezeigt werden (siehe Abbildungen 3.3 und 3.8). Er wurde im Verlauf der ersten 24 Stunden nach der Hitzeexposition beobachtet. Genauer grenzt Abbildung 3.8 A den Prozess auf die ersten 4 Stunden ein. In diesem zeitlichen Rahmen wurde auch bei in-vivo Studien der signifikanteste Wundprogress beobachtet [60]. Für spätere Zeitpunkte bleibt unklar inwiefern im Kontaktverbrennungsmodell ein anhaltender Zelltod abläuft. In Abbildung 3.8 **B** wird deutlich, dass die Werte des Resazurin-Reduktions-Assays erst nach 48 Stunden wieder ansteigen. Somit ist durchaus möglich, dass der verzögerte Zelltod nicht nur ein Phänomen der ersten 4 Stunden ist, sondern auch fortlaufend stattfindet, jedoch von der Proliferation weniger stark geschädigter Zellen überlagert wird. Diese Option muss vor allem unter dem Gesichtspunkt beachtet werden, dass die Zellen sehr langfristig und nachhaltig geschädigt zu sein scheinen. Dies zeigt beispielsweise die Untersuchung der Hitzeschockproteine in Abschnitt 3.2.5, bei der bis zu 72 Stunden nach der Exposition noch ein deutlich hochreguliertes HSP 60 zu finden war. Um dieser lang anhaltenden Schädigung gerecht zu werden, wurden die Beobachtungszeiträume bei der Untersuchung der Atiologie des verzögerten Zelltodes entsprechend großzügig gewählt.

Allgemein muss betont werden, dass der verzögerte Zelltod nur bei einem bestimmten Maß an Hitzeexposition zu beobachten war (siehe Abbildung 3.3). Zu hohe Temperaturen führten zu einem direkten Zelltod und niedrigere Temperaturen beeinflussten die Vitalität der Zellen kaum. Ob die entsprechenden Expositionsparameter, für die der verzögerte Zelltod gezeigt wurde, auch in *in-vivo* so auftreten, ist unklar. Aufgrund des zonalen Aufbaus von *in-vivo* Verbrennungswunden ist dies jedoch sehr wahrscheinlich. Durch die Temperaturgradienten im Gewebe, die in der Einleitung bereits beschrieben wurden (siehe Einleitung 1.2), lässt sich vermuten, dass bei den meisten Verbrennungswunden Zonen vorliegen, in denen die Zellen eine vergleichbare Hitzeexposition erfahren haben wie die hier *in-vitro* verwendete.

Anhand des *in-vitro* Modells konnte also gezeigt werden, dass es einen verzögerten Zelltod bei thermisch geschädigten Fibroblasten gibt. Den Einfluss dessen auf den sekundären Wundprogress *in-vivo* ist schwer abzuschätzen. Es ist jedoch gut denkbar, dass dieser Mechanismus einen weiteren Faktor beim multifaktoriell bedingten Wundprogress darstellt.

Alle Versuche dieser Arbeit wurden mit Fibroblasten durchgeführt und es ist unklar inwieweit die Ergebnisse auf andere in Verbrennungswunden vorkommende Zelltypen übertragbar sind. Vor allem von Interesse für den sekundären Wundprogress scheinen die Endothelzellen zu sein, da der Perfusion des Wundbettes eine entscheidende Rolle zukommt. Hirth et. al haben die hohe Bedeutung der Endothelzellnekrose für den sekundären Wundprogress gezeigt [24]. Hier ist von Interesse, ob Endothelzellen ein ähnliches Verhalten wie die Fibroblasten aufzeigen und ob möglicherweise eine größere Thermolabilität besteht. Auch Versuche mit Keratinozyten könnten zu einem besseren Gesamtverständnis der Prozesse führen.

4.3 Ätiologie des verzögerten Zelltodes

Nachdem der verzögerte Zelltod im Resazurin-Reduktions-Assay gezeigt werden konnte, sollte dieser genauer beschrieben werden. Der verzögerte Beginn nach ein einer Stunde und die Dynamik der Viabiltiätsabnahme macht eine primäre Nekrose, bzw. Hitzefixierung der Zellen unwahrscheinlich. Somit muss eine Form eines zumindest teilweise kontrolliert ablaufenden Zelltodes vorliegen. Die gängigste und auch schon bei Verbrennungswunden beobachtete Form wäre eine Caspase-abhängige Apoptose. Mit dieser Arbeit sollte der Anteil und die Bedeutung dieser Art von Zelltod bei hitzegestressten HDF untersucht werden.

4.3.1 Apoptose-Assay nach Nicoletti

Zunächst wurde hierzu ein Apoptose-Assay nach Nicoletti durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.2). Hier zeigte sich ein erhöhter Anteil an hypodiploiden Zellkernen, was auf eine Fragmentierung der DNA im Rahmen einer aktiven Apoptose hinweist. Zu allen Zeitpunkten war jedoch nur ein geringer Prozentsatz der Zellen betroffen und es konnte keine Signifikanz der Ergebnisse erreicht werden. Berücksichtigt werden muss, dass es zu einem Unterschätzen des Anteils an hypodiploiden Zellkernen kommen kann, da die im Medium schwimmenden Zellen durch das notwendige Entfernen des Mediums im Nicoletti-Assay nicht detektiert werden können.

Abbildung 3.10 könnte als eine kontinuierlich ablaufende Apoptose interpretiert werden, die zwar immer nur wenige Zellen zeitgleich beträfe, über den zeitlichen Verlauf aber trotzdem relevanten Einfluss hätte. Insgesamt muss das Ergebnis aus dem Nicoletti-Assay jedoch zurückhaltend interpretiert werden, zumal es nicht auszuschließen ist, dass allein durch die thermische Energieeinwirkung hypodiploide Zellkerne entstehen.

4.3.2 Tunel-Assay

Ebenso kritisch muss das Ergebnis des Tunel-Assays bewertet werden. Auch hier lassen zunächst diverse Tunel-positive Zellkerne auf eine ablaufende Apoptose schließen. Jedoch erscheinen die Zellkerne eher geschwollen und nicht kondensiert, wie es für eine Apoptose typisch wäre. Möglich ist auch hier, dass die durch die *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* markierten freien 3'-OH Enden direkt durch die thermische Schädigung entstanden sind. Hinzukommt, dass das Assay in der hier durchgeführten Form Zellen, die vor ihrem Tod Tunel-positiv wurden, nicht von solchen unterscheiden kann, die nach ihrem Tod Tunel-positiv wurden.

4.3.3 Q-VD-OPH

Mit Q-VD-OPH behandelte HDF haben keinen verminderten verzögerten Zelltod gezeigt (siehe Abschnitt 3.2.3). Dies spricht zwar gegen eine Apoptose, lässt aber nur darauf schließen, dass apoptotische Prozesse nicht einflussnehmend auf die Viabilität sind. Möglich bleibt, dass die in ihrer Apoptose gehemmten Zellen stattdessen in Form einer Nekrose sterben.

4.3.4 PARP und cleaved-PARP

Letztendlich wurde ein Western-Blot mit PARP-Antikörpern durchgeführt, auch um entstandenes cleaved-PARP nachzuweisen. Die Abwesenheit von cleaved-PARP zu den gewählten Zeitpunkten spricht deutlich gegen eine vollständig ablaufende Apoptose. Jedoch ist die Spaltung von PARP ein eher später Schritt in der Signalkaskade der Apoptose, da zunächst die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert werden müssen. Ob frühere Schritte initiiert werden wurde nicht untersucht.

Eine mögliche Erklärung, warum es nicht zu einer vollständigen Apoptose kommt, könnte eine zu starke Zellschädigung sein. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, wie ein Mangel an ATP über den Ausfall von Ionenpumpen und dem Zusammenbruch der Zellhomöostase letztlich zu einer Nekrose führen kann [29]. Shupp et al. haben dabei vor allem die Bedeutung von PARP als stark energieverbrauchendes Enzym betont [29]. Die gezeigte starke Exprimierung von PARP scheint diese Theorie für die Ätiologie des verzögerten Zelltodes zu stützen. Eine massive DNA Schädigung induziert die Expression von PARP, welches wiederum zur Nekrose der Zelle führt. Auch die hoch regulierten Hitzeschockproteine HSP 60 und 70 verbrauchen ATP [40] und wirken zusätzlich antiapoptotisch [41]. So leisten sie dem Prozess möglicherweise weiteren Vorschub.

4.3.5 Cycloheximid

Um zu untersuchen, ob die Zellen durch eigene Reparaturmechanismen ihre Nekrose bedingen, wurde, wie in Abschnitt 3.2.9 bereits beschrieben, versucht die Exprimierung von PARP, aber auch allen anderen Reperaturproteinen durch einen Translationshemmer zu unterbinden. Abbildung 3.20 zeigt, dass das eingesetzte CHX per se zytotoxisch wirkt, auch auf die nicht erhitzten Zellen. Das Ergebnis der deutlich zu kleinen Testreihe lässt sich maximal als Tendenz werten, welche nahe legt, dass CHX die erhitzten Zellen zumindest nicht weiter schädigt. Ob dies für die obengenannte These spricht, lässt sich nicht abschließend beurteilen. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig. Beispielsweise eine direkte Quantifizierung des ATP-Haushaltes, oder aber auch der Einsatz von spezifischen PARP-Inhibitoren erscheint sinnvoll.

4.3.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte kein überzeugender Hinweis auf eine ablaufende Apoptose gefunden werden. Dieses Ergebnis ist jedoch auf die gewählten Expositionsparameter limitiert. Matylevitch et al. haben an ihrem, bereits mehrfach erwähnten Model die Expositionstemperaturen variiert und die erhitzten Keratinozyten mittels Tunel-Assay und Elektronenmikroskopie untersucht [36]. Sie sind zu dem Schluss gekommen, dass die Frage nach Apoptose oder Nekrose durch die Höhe der Hitzeexposition entschieden wird [36]. Dies würde bedeuten, dass die hier gewählten Expositionsparameter die Zellen für eine Apoptose zu stark geschädigt haben.

Diese Erkenntnis kann auch auf *in-vivo* Verbrennungswunden übertragen werden. Wie bereits beschrieben nehmen die Expositionstemperaturen der einzelnen Zellen in Verbrennungswunden nach außen sowie in die Tiefe hin ab [19]. Somit ist davon auszugehen, dass die Zonen, in denen Apoptose einen relevanten Einfluss hat, außerhalb von den Zonen liegen, in denen Nekrose dominiert. So konnte es auch Lanier et al. in einem "*rat burn comb model*" beobachten. Hier fanden sich per Nekrose gestorbene Zellen vor allem in den zentralen Abschnitten der Stase-Zone, während in den äußersten Bereichen des vom sekundären Wundprogress betroffenen Gewebes maßgeblich Apoptose ursächlich war [60]. Eine mögliche anti-apoptotische Therapie hätte somit nur einen Effekt auf diese Zonen und nicht auf die gesamte Stase-Zone.

Auch wenn eine Caspase-abhängige Apoptose bei den hier gewählten Expositionsparametern scheinbar keine Relevanz zeigt, spricht - wie bereits beschrieben - die Dynamik der beobachteten Viabilitätsabnahme für einen zumindest teilweise kontrolliert ablaufenden Zelltod und gegen eine klassische primäre Nekrose. Es ist zu vermuten, dass zwischen Temperaturbereichen, die zu einer Apoptose und Temperaturen, die zu einer klassischen Nekrose führen, Bereiche existieren, die zu einer Form einer sekundären Nekrose führen. Eine zukünftige Forschungsfrage könnte somit sein, ob ein grundlegender Mechanismus existiert, der all diese Zelltodformen vermittelt. Die Überexprimierung von PARP deutet auf eine starke Schädigung der DNA hin. Hier müsste geklärt werden, ob diese direkt durch die physikalische Schädigung entsteht oder ob hier möglicherweise ROS einen solchen grundlegenden Mechanismus darstellt.

Die in dieser Arbeit bereits untersuchten Einflüsse von ROS auf den verzögerten Zelltod sind kaum aussagekräftig. Es wurde nur eine kleine Testreihe mit nur jeweils einer Konzentration und zwei Antioxidantien durchgeführt. Hierbei wurde sich auch nur auf die Auswertung durch das Rezazurin-Assay beschränkt und nicht untersucht ob beispielsweise die DNA-Schädigung durch Antioxidantien begrenzt werden konnte. Im Rahmen möglicher weiterer Forschung wäre auch ein direkter Nachweis der entstehenden ROS von großem Interesse.

4.3.7 GDF-5

Da Apoptose sich als nicht relevant für den hier beobachteten verzögerten Zelltod herausgestellt hat, ist auch GDF-5 mit seiner anti-apoptotischen Wirkung nicht einflussnehmend auf die Vitatlität der erhitzten HDF. Dieses Ergebnis disqualifiziert GDF-5 jedoch nicht für weitere Forschungen im Rahmen der Verbrennungsmedizin. Durch die in Abschnitt 1.3 beschriebenen vielfältigen Wirkmechanismen von GDF-5 erscheint weiterhin ein positiver Effekt auf Verbrennungswunden denkbar und wahrscheinlich. Somit ist es möglich, dass GDF-5 aufgrund seiner angiogenetischen Effekte trotzdem einen positiven Einfluss auf den sekundären Wundprogress hat, dieser aber in dem hier verwendeten in-vitro-Modell nicht abgebildet werden kann. Auch ist davon auszugehen, dass sich GDF-5 in den weiteren Heilungsphasen von Verbrennungsphasen positiv auf die Zellproliferation und Migration auswirkt, wie es auch schon bei chronischen Wunden gezeigt werden konnte [50]. Um dies genauer zu untersuchen kann auch das hier etablierte *in-vitro* Modell verwendet werden. Bei niedrigeren Expositionsparametern sind entsprechende Assays denkbar. So wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits Vorversuche mithilfe eines Scratch-Assays durchgeführt, bei dem die Fähigkeit zur Migration bei hitzegeschädigten Fibroblasten untersucht werden kann. Möglicherweise lässt sich ein Einfluss von GDF-5 auf diese Migration feststellen. Im Weiteren erscheinen auch in-vivo oder ex-vivo Verbrennungsversuche mit GDF-5 sinnvoll.

4.4 Abschlussbetrachtung und Ausblick

Mit dem Kontaktverbrennungsmodell gelang es einen Versuchsaufbau zu entwickeln, mit dem die Hitzeexpositition von Zellen in der Stase-Zone von Verbrennungsverletztungen imitiert werden kann und der zugleich reliable Ergebnisse liefert. Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten nach einer entsprechend hohen aber kurzen Hitzeexposition per se einen verzögerten Zelltod zeigen und dies vermutlich auch zum sekundären Wundprogress in der Stase-Zone beiträgt. Letztendlich wurde vermutet, dass eine Form eines zumindest teilweise kontrolliert ablaufenden Zelltodes vorliegen muss. Die Rolle von Apoptose hat sich hierbei als nicht bedeutsam herausgestellt, wobei laut Literatur geringere Temperaturen vermutlich zu anderen Ergebnissen geführt hätten. Bei den hier gewählten Expositionsbedingungen scheint vielmehr die Überexprimierung von PARP einen relevanten Einfluss zuhaben.

Zusammenfassend lassen sich aus den gewonnenen Erkenntnissen neue Forschungsfragen ableiten, die wiederum mit Hilfe des Kontaktverbrennungsmodells untersucht werden könnten:

- Welchen Einfluss hat die Überexprimierung von PARP auf den beobachteten Zelltod und wie wirkt sich eine Behandlung mittels PARP-Inhibitoren auf die erhitzen Zellen aus?
- Wie groß ist der Einfluss von ROS?
- Wie wird die Migration und Proliferation durch die Hitzeschädigung beeinflusst?
- Wie verhalten sich andere Zelltypen nach der Hitzeexposition?
- Lassen sich bei anderen Expositonsparametern oder zu anderen als den hier untersuchten Zeitpunkten Hinweise auf eine ablaufende Apoptose finden?

Ergebnisse, die beispielsweise zu einem reduzierten verzögerten Zelltod führen, können im nächsten Schritt in einem *ex-vivo* oder auch *in-vivo* Tiermodell überprüft werden. Möglicherweise lassen sich so Therapieansätze entwickeln, die den sekundären Wundprogress reduzieren können und so auch zu einer schnelleren Wundheilung und geringerer Narbenbildung bei den Betroffenen führen. Spätestens dann muss jedoch auch diskutiert werden, inwiefern eine Hemmung des Zelltodes der massiv geschädigten Zellen überhaupt als sinnvoll erscheint. Es muss davon ausgegangen werden, dass die durch die Hitze entstandene DNA-Schädigung der Kanzerogenese Vorschub leistet und bei der Hemmung einer normalerweise ablaufenden Apoptose oder Nekrose die Gefahr eines Brandnarbenkarzinoms steigt.

Literaturverzeichnis

- Wolfhart Westendorf. Handbuch der altägyptischen Medizin, 1999, Brill, Leiden, ISBN: 90-04-10319-8.
- [2] Wilhelm Fabricius Hildanus. De Combustionibus, translated out of Latine by John Steer, veröffentlicht: 1642, http://name.umdl.umich.edu/A41151.0001.001, zuletzt geprüft am 10.9.2020.
- [3] Christian Smolle, Janos Cambiaso-Daniel, Abigail A. Forbes, Paul Wurzer, Gabriel Hundeshagen, Ludwik K. Branski, Fredrik Huss, and Lars-Peter Kamolz. Recent trends in burn epidemiology worldwide: A systematic review. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries, 43(2):249–257, 2017.
- [4] Statistisches Bundesamt. Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) 2018, veröffentlicht: 2020: https://www.statistischebibliothek.de/mir/receive/DEHeft_mods_00131401, zuletzt geprüft am: 09.09.2020.
- [5] Joyce Tobiasen, John M. Hiebert, and Richard F. Edlich. The abbreviated burn severity index. Annals of Emergency Medicine, 11(5):260-262, 1982.
- [6] Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin Verbrennungsregister. Jahresbericht 2020 für den Zeitraum Jan. – Dez. 2019, veröffentlicht 2020: https://www.verbrennungsmedizin.de/files/dgv_files/pdf/jahresbericht/Jahresbericht% 20VR%202020%20gesamt.pdf, zuletzt geprüft am 9.9.2020.
- [7] World Health Organization: WHO. Burns, 2018: https://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/burns, zuletzt geprüft am 9.9.2020.
- [8] Ezio Nicola Gangemi, Dario Gregori, Paola Berchialla, Enrico Zingarelli, Monica Cairo, Daniele Bollero, Jamal Ganem, Roberto Capocelli, Franca Cuccuru, Pompeo Cassano, Daniela Risso, and Maurizio Stella. Epidemiology and risk factors for pathologic scarring after burn wounds. Archives of facial plastic surgery, 10(2):93–102, 2008.
- [9] S. Ripper, A. Stolle, A. Seehausen, M. Klinkenberg, G. Germann, B. Hartmann, and B. Renneberg. Psychische Folgen schwerer Brandverletzungen: Belastungen und

Ressourcen berufsgenossenschaftlich vs. nicht berufsgenossenschaftlich Versicherter ein Jahr nach der Brandverletzung. Der Unfallchirurg, 113(11):915–922, 2010.

- [10] Janine M. Duke, James H. Boyd, Suzanne Rea, Sean M. Randall, and Fiona M. Wood. Long-term mortality among older adults with burn injury: a population-based study in Australia. *Bulletin of the World Health Organization*, 93(6):400–406, 2015.
- [11] Marc G. Jeschke, Margriet E. van Baar, Mashkoor A. Choudhry, Kevin K. Chung, Nicole S. Gibran, and Sarvesh Logsetty. Burn injury. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1):11, 2020.
- [12] D. M. Jackson. The diagnosis of the depth of burning. The British journal of surgery, 40(164):588-596, 1953.
- [13] Lars-Peter Kamolz, David N. Herndon, and Marc G. Jeschke. Verbrennungen: Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas, 2009.
- [14] Marcus Lehnhardt, Bernd Hartmann, and Bert Reichert, editors. Verbrennungschirurgie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg and s.l., 1 edition, 2016.
- [15] Hans-Oliver Rennekampff. Behandlung thermischer Verletzungen des Erwachsenen. AWMF. Stand: 08/2018, erstellt als Leitlinie Deutder schen Gesellschaft für Verbrennungsmedizin (DGV): abgerufen unter: https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/044-001.html, zuletzt geprüft am 11.9.2020.
- [16] Peter Shakespeare. Burn wound healing and skin substitutes. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries, 27(5):517–522, 2001.
- [17] Vijay Singh, Lara Devgan, Satyanarayan Bhat, and Stephen M. Milner. The pathogenesis of burn wound conversion. Annals of plastic surgery, 59(1):109-115, 2007.
- [18] A. R. Moritz and F. C. Henriques. Studies of Thermal Injury: II. The Relative Importance of Time and Surface Temperature in the Causation of Cutaneous Burns. *The American journal of pathology*, 23(5):695-720, 1947.
- [19] Ming Fu, Wenguo Weng, and Hongyong Yuan. Numerical Simulation of the Effects of Blood Perfusion, Water Diffusion, and Vaporization on the Skin Temperature and Burn Injuries. Numerical Heat Transfer, Part A: Applications, 65(12):1187–1203, 2014.
- [20] Alperen S. Bingoel, Nicco Krezdorn, and Peter M. Vogt. Standards in der Verbrennungsmedizin. Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen, 91(4):361-376, 2020.

- [21] Ara A. Salibian, Angelica Tan Del Rosario, Lucio De Almeida Moura Severo, Long Nguyen, Derek A. Banyard, Jason D. Toranto, Gregory R. D. Evans, and Alan D. Widgerow. Current concepts on burn wound conversion-A review of recent advances in understanding the secondary progressions of burns. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries, 42(5):1025–1035, 2016.
- [22] Daniel Schmauss, Farid Rezaeian, Tom Finck, Hans-Guenther Machens, Reto Wettstein, and Yves Harder. Treatment of secondary burn wound progression in contact burns-a systematic review of experimental approaches. Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association, 36(3):e176-89, 2015.
- [23] M. N. Battal, Y. Hata, K. Matsuka, O. Ito, H. Matsuda, Y. Yoshida, and T. Kawazoe. Reduction of progressive burn injury by using a new nonselective endothelin-A and endothelin-B receptor antagonist, TAK-044: an experimental study in rats. *Plastic* and reconstructive surgery, 99(6):1610–1619, 1997.
- [24] Douglas Hirth, Steve A. McClain, Adam J. Singer, and Richard A. F. Clark. Endothelial necrosis at 1 hour postburn predicts progression of tissue injury. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 21(4):563-570, 2013.
- [25] G. O. Till, L. S. Guilds, M. Mahrougui, H. P. Friedl, O. Trentz, and P. A. Ward. Role of xanthine oxidase in thermal injury of skin. *The American journal of pathology*, 135(1):195–202, 1989.
- [26] T. F. Slater. Free-radical mechanisms in tissue injury. The Biochemical journal, 222(1):1–15, 1984.
- [27] O. Cetinkale, M. Demir, H. B. Sayman, F. Ayan, and C. Onsel. Effects of allopurinol, ibuprofen and cyclosporin A on local microcirculatory disturbances due to burn injuries. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries, 23(1):43-49, 1997.
- [28] B. Latha and Mary Babu. The involvement of free radicals in burn injury: a review. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries, 27(4):309-317, 2001.
- [29] Jeffrey W. Shupp, Teresa J. Nasabzadeh, Dean S. Rosenthal, Marion H. Jordan, Philip Fidler, and James C. Jeng. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association, 31(6):849–873, 2010.
- [30] Chuanyu Li and Robert M. Jackson. Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury. American journal of physiology. Cell physiology, 282(2):C227– 41, 2002.

- [31] L. P. Bucky, N. B. Vedder, H. Z. Hong, H. P. Ehrlich, R. K. Winn, J. M. Harlan, and J. W. May. Reduction of burn injury by inhibiting CD18-mediated leukocyte adherence in rabbits. *Plastic and reconstructive surgery*, 93(7):1473-1480, 1994.
- [32] Liang Tso Sun, Emily Friedrich, Joshua L. Heuslein, Rachel E. Pferdehirt, Nicole M. Dangelo, Shanmugasundaram Natesan, Robert J. Christy, and Newell R. Washburn. Reduction of burn progression with topical delivery of (antitumor necrosis factor-alpha)-hyaluronic acid conjugates. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 20(4):563-572, 2012.
- [33] Adam J. Singer, Steve A. McClain, Breena R. Taira, Jennifer L. Guerriero, and Wexing Zong. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine, 15(6):549-554, 2008.
- [34] Joseph L. Roti Roti. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group, 24(1):3-15, 2008.
- [35] Klaus Richter, Martin Haslbeck, and Johannes Buchner. The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, 40(2):253-266, 2010.
- [36] N. P. Matylevitch, S. T. Schuschereba, J. R. Mata, G. R. Gilligan, D. F. Lawlor, C. W. Goodwin, and P. D. Bowman. Apoptosis and accidental cell death in cultured human keratinocytes after thermal injury. *The American journal of pathology*, 153(2):567–577, 1998.
- [37] Z. T. Gu, L. Li, F. Wu, P. Zhao, H. Yang, Y. S. Liu, Y. Geng, M. Zhao, and L. Su. Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca(2+) dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Scientific reports*, 5:11497, 2015.
- [38] F. M. Ritossa and R. C. Von Borstel. Chromosome Puffs in Drosophila Induced by Ribonuclease. Science (New York, N.Y.), 145(3631):513-514, 1964.
- [39] M. Jäättelä and D. Wissing. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. Annals of medicine, 24(4):249–258, 1992.
- [40] Laurence Dubrez, Sébastien Causse, Natalia Borges Bonan, Baptiste Dumétier, and Carmen Garrido. Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. Oncogene, 39(3):516-529, 2020.

- [41] Shinichi Takayama, John C. Reed, and Sachiko Homma. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. Oncogene, 22(56):9041–9047, 2003.
- [42] J. Landry, D. Bernier, P. Chrétien, L. M. Nicole, R. M. Tanguay, and N. Marceau. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer research*, 42(6):2457–2461, 1982.
- [43] Manfred Schartl, Manfred Gessler, and Arnold von Eckardstein. Biochemie und Molekularbiologie des Menschen, 2013.
- [44] Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve, and Georg Löffler. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014.
- [45] C. Soldani and A. Ivana Scovassi. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 7(4):321-328, 2002.
- [46] Frank Wappler, Gerald Spilker, and Holger Bannasch. Verbrennungsmedizin: Vom Unfallort bis zur Rehabilitation ; 51 Tabellen, 2009.
- [47] D. E. Kim, T. M. Phillips, J. C. Jeng, A. G. Rizzo, R. T. Roth, J. L. Stanford, K. A. Jablonski, and M. H. Jordan. Microvascular assessment of burn depth conversion during varying resuscitation conditions. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 22(6):406-416, 2001.
- [48] Mickaël Tobalem, Yves Harder, Farid Rezaeian, and Reto Wettstein. Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Critical care medicine*, 41(4):963–971, 2013.
- [49] Adam J. Singer, Steve A. McClain, Alexander Romanov, Jean Rooney, and Tom Zimmerman. Curcumin reduces burn progression in rats. Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine, 14(12):1125–1129, 2007.
- [50] Jennifer L. Schiefer, Manuel Held, Paul C. Fuchs, Erhan Demir, Frank Plöger, Hans-Eberhard Schaller, and Afshin Rahmanian-Schwarz. Growth Differentiation Factor 5 Accelerates Wound Closure and Improves Skin Quality During Repair of Full-Thickness Skin Defects. Advances in skin & wound care, 30(5):223-229, 2017.
- [51] H. Yamashita, A. Shimizu, M. Kato, H. Nishitoh, H. Ichijo, A. Hanyu, I. Morita, M. Kimura, F. Makishima, and K. Miyazono. Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo. *Experimental cell research*, 235(1):218–226, 1997.
- [52] F. C. Regas and H. P. Ehrlich. Elucidating the vascular response to burns with a new rat model. *The Journal of trauma*, 32(5):557–563, 1992.

- [53] Zhipei Liu, Jia Shen, Kui Pu, Hugo A. Katus, Frank Plöger, Christiane P. Tiefenbacher, Xiaobo Chen, and Thomas Braun. GDF5 and BMP2 inhibit apoptosis via activation of BMPR2 and subsequent stabilization of XIAP. *Biochimica et biophysica* acta, 1793(12):1819–1827, 2009.
- [54] Promega GmbH. CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Technical Bulletin: https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technicalbulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf (Zuletzt geprüft am: 22.11.2017), Letzte Aktualisierung: 1.3.2016.
- [55] R.J Gonzalez and J.B Tarloff. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro*, 15(3):257–259, 2001.
- [56] Carlo Riccardi and Ildo Nicoletti. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1(3):1458–1461, 2006.
- [57] Promega GmbH. DeadEndTM Fluorometric TUNEL System Protocol: https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technicalbulletins/0/deadend-fluorometric-tunel-system-protocol.pdf?la=en (Zuletzt geprüft am: 04.10.2019), Letzte Aktualisierung: 8.8.2016.
- [58] Thermo Scientific. User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/man0011430_pierce_bca_protein _asy_ug.pdf (Zuletzt geprüft am 22.10.2019), Letzte Aktualisierung: 2.6.2017.
- [59] J. Rieger. The glass transition temperature of polystyrene. Journal of Thermal Analysis, 46(3-4):965-972, 1996.
- [60] Steven T. Lanier, Steve A. McClain, Fubao Lin, Adam J. Singer, and Richard A. F. Clark. Spatiotemporal progression of cell death in the zone of ischemia surrounding burns. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 19(5):622-632, 2011.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Joachim Windolf für die Möglichkeit, diese Dissertation im Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie anfertigen zu können.

Herzlichst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph V. Suschek für die Uberlassung dieses Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Mit seiner Expertise unterstütze er mich in allen Phasen meiner Promotion und stand stets hinter mir und dem Projekt.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Paul Fuchs für die Übernahme der Zweitbetreuung meiner Dissertation sowie bei Frau Priv. Doz. Dr. med. Jennifer Schiefer für den regen wissenschaftlichen Austausch und die Mitbetreuung dieses Projekts.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Jutta Schneider, Samira Seghrouchni und Christa Maria Wilkens für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Versuche und die stets herzliche Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern. Ihr Rückhalt und ihre liebevolle Unterstützung machte es mir möglich, sowohl das Medizinstudium als auch meine Dissertation erfolgreich abzuschließen.